

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年1月31日(31.01.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/022189 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/04 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/028050
- (22) 国際出願日: 2018年7月26日(26.07.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-145308 2017年7月27日(27.07.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 杉山 大介 (SUGIYAMA Daisuke); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
松本 雅記 (MATSUMOTO Masaki); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: GLOBIN TYPING PEPTIDE

(54) 発明の名称: グロビンタイピングペプチド

(57) Abstract: [Problem] To provide a human globin typing peptide and a globin test method. [Solution] A globin typing peptide that belongs any of hemoglobin $\alpha 1$, hemoglobin $\alpha 2$, hemoglobin β , hemoglobin δ , hemoglobin $\epsilon 1$, hemoglobin γA , hemoglobin γG , hemoglobin μ , hemoglobin $\theta 1$ and hemoglobin ζ chains and comprises a definite amino acid sequence.

(57) 要約: 【課題】ヒトグロビンタイピングペプチド及びグロビンの検査方法の提供。【解決手段】ヘモグロビン $\alpha 1$ 、ヘモグロビン $\alpha 2$ 、ヘモグロビン β 、ヘモグロビン δ 、ヘモグロビン $\epsilon 1$ 、ヘモグロビン γA 、ヘモグロビン γG 、ヘモグロビン μ 、ヘモグロビン $\theta 1$ 及びヘモグロビン ζ のいずれかの鎖に属するグロビンタイピングペプチドであって、所定のアミノ酸配列からなるグロビンタイピングペプチド。



WO 2019/022189 A1

明 細 書

発明の名称： グロビンタイピングペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトグロビンタイピングペプチド及びグロビンの検査方法に関する。

背景技術

[0002] ヘモグロ빈は、赤血球中に大量に存在する酸素運搬を司るタンパク質である。成人では、ヘモグロ빈は α 鎖と β 鎖から構成される4量体タンパク質であるHbAが発現し機能しているが、胎児期には α 鎖と γ 鎖で構成される胎児期Hb (HbF)が存在する。また、初期胚では ϵ 鎖及び ζ 鎖によって構成されるHb Gower1が存在する。その量的及び質的異常はHemoglobinopathies (異常ヘモグロ빈症)と呼ばれ、貧血状態を惹起する。

[0003] 異常ヘモグロ빈症の多くは単一遺伝子疾患であり、世界人口のおおよそ5.2%が罹患している。世界中の夫婦の1.1%は異常ヘモグロ빈症の素因を保持しており、実際に異常ヘモグロ빈症を発症する子供の危険率は、1000人中2.7人と推定されている。異常ヘモグロ빈症の中でも、サラセミアは世界でもっとも罹患率の高い遺伝性貧血疾患である（一病型だけで世界人口の約7%、2.4億人が罹患）。特に、 β -グロ빈鎖に異常を認める β -サラセミアは貧血の程度が強く、発育障害、知能発達障害などを合併するため小児期死亡の原因となり臨床問題となる。

[0004] 重症 β -サラセミア患者は慢性的に貧血状態であるため定期的な赤血球輸血を必要とし、更に発育遅延、骨の変化、肝脾腫大症、重度の鉄過剰、心不全、骨粗鬆症、他の内分泌疾患などを合併する。サラセミア患者は生涯に渡る輸血によって常に感染や鉄過剰症のリスクに晒されており、また先進国においては献血者の減少が深刻な問題となりつつある。

[0005] これまで、iPS細胞などの多能性幹細胞から赤血球を作製する研究も進められているが、未だヒト多能性幹細胞由来の赤血球においては、大部分が胎児

型グロビンから成人型へのスイッチングが不完全であり、その制御機構は解明されていない。また、 β -サラセミア/HbEは単一遺伝子疾患にもかかわらず、その臨床症状や重症度のパターンは不均一であり、疾患の重症度を規定する機構の解明が重要な課題である。

[0006] β -サラセミアは、 β -グロビンの減少によって過剰な遊離 α -グロビンが生じ、これが毒性を有することで未成熟赤血球のアポトーシス(無効造血)を引き起こし(Libani IV et al., Blood, 2008, Vol. 112, 875-885)、脾臓肥大および鉄過剰症という2つの致命的な合併症が生じる。従来、無効造血の診断には骨髓穿刺による検体収集が行われてきたが、これは極めて大きな侵襲を伴うことから患者にとって大きな負担となっており、末梢血を用いた診断法の開発が渴望されている。

[0007] 末梢血における各グロビン鎖の絶対定量は、 β -サラセミアを始めとする異常ヘモグロビン症の診断に有効であると考えられるが、複数のグロビン鎖を同時かつ絶対値として定量することが必要であることから、ELISAなどの抗体ベースの手法では当該目的を達成できない。グロビン鎖のように類似した複数分子の一斉定量には、近年、特異的ペプチド定量技術として注目されている3連4重極型質量分析計を用いた多重反応モニタリング(MRM: multiple reaction monitoring)法が有効であり、MRM法を利用したペプチドの定量などが試みられている(特許文献1: 特許第5468073号)。

しかしながら、一般に質量分析計によるタンパク質解析では試料調製の煩雑さや装置の堅牢性の低さが障壁となり、医療現場での普及には程遠いのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1: 特許第5468073号

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Libani IV et al., Blood, 2008, Vol. 112, 875-885

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、グロビンタイピングペプチド、及び当該ペプチドを用いたグロビンの検査方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、グロビタンパク質のアミノ酸配列のうち、所定のアミノ酸配列を有するペプチドがグロビンの検査に有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の(1)～(9)のいずれかのヘモグロビン鎖に属し、下記アミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる少なくとも1つのグロビンタイピングペプチド。

(1) ヘモグロビン α 1鎖又はヘモグロビン α 2鎖

LRVDPVNFK (配列番号1)

FLASVSTVLTSK (配列番号2)

(2) ヘモグロビン β 鎖

EFTPPVQAAYQK (配列番号3)

VNVDEVGGEALGR (配列番号4)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号5)

GTFATLSELHC[CAM]DK (配列番号6)

SAVTALWGK (配列番号7)

FFESFGDLSTPDVMGNPK (配列番号8)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号9)

(C[CAM]はカルバミドメチル化システインを表す。以下、同様。)

(3) ヘモグロビン δ 鎖

EFTPQMQAAYQK (配列番号10)

LLGNVLVC[CAM]VLAR (配列番号11)

GTFSQLSELHC[CAM]DK (配列番号12)

(4) ヘモグロビン ε 1 鎖

LSELHC[CAM]DK (配列番号 13)

EFTPEVQAAWQK (配列番号 14)

FFDSFGNLSPPSAILGNPK (配列番号 15)

AAVTSLSWK (配列番号 16)

MNVEEAGGEALGR (配列番号 17)

VLTSFGDAIK (配列番号 18)

AAVTSLSWK (配列番号 19)

NMDNLKPAFAK (配列番号 20)

(5) ヘモグロビン γ A 鎖

VLTSLGDAIK (配列番号 21)

(6) ヘモグロビン γ A 鎖又はヘモグロビン γ G 鎖

VNVEDAGGETLGR (配列番号 22)

EFTPEVQASWQK (配列番号 23)

GTFAQLSELHC[CAM]DK (配列番号 24)

FFDSFGNLSASAIMGNPK (配列番号 25)

ATITSLWGK (配列番号 26)

EFTPEVQASWQK (配列番号 27)

(7) ヘモグロビン μ 鎖

MLAAVGAHVQHDNLR (配列番号 28)

AALSPLADLHALVLR (配列番号 29)

LFTVYPSTK (配列番号 30)

(8) ヘモグロビン θ 1 鎖

TFLAFPAIK (配列番号 31)

VADALSLAVER (配列番号 32)

TYFSLDLSPGSSQVR (配列番号 33)

KLGSNKGVTTEALER (配列番号 34)

(9) ヘモグロビン ζ 鎖

FLSVVSSVLTEK (配列番号 35)

TYFPFHDLHPGSAQLR (配列番号 36)

SIDDIGGALSK (配列番号 37)

ISTQADTIGTETLER (配列番号 38)

VVAAGDAVK (配列番号 39)

LFLSHPQTK (配列番号 40)

LSELHAYILR (配列番号 41)

[2] 以下の(1)～(9)のいずれかのヘモグロビン鎖に属し、下記アミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる少なくとも1つの変異型グロビンタイピングペプチド。

(1) ヘモグロビン α 1鎖又はヘモグロビン α 2鎖

LRVDPVNFK (配列番号 1)

FLASVSTVLTSK (配列番号 2)

(2) ヘモグロビン β 鎖

EFTPPVQAAYQK (配列番号 3)

VNVDEVGGEALGR (配列番号 4)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 5)

GTFATLSELHC[CAM]DK (配列番号 6)

SAVTALWGK (配列番号 7)

FFESFGDLSTPDVVMGNPK (配列番号 8)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 9)

(C[CAM]はカルバミドメチル化システインを表す。以下、同様。)

(3) ヘモグロビン δ 鎖

EFTPQMQAAYQK (配列番号 10)

LLGNVLVC[CAM]VLAR (配列番号 11)

GTFSQLSELHC[CAM]DK (配列番号 12)

(4) ヘモグロビン ϵ 1鎖

LSELHC[CAM]DK (配列番号 13)

EFTPEVQAAWQK (配列番号 14)

FFDSFGNLSSPSAILGNPK (配列番号 15)

AAVTSLSK (配列番号 16)

MNVEEAGGEALGR (配列番号 17)

VLTSFGDAIK (配列番号 18)

AAVTSLSK (配列番号 19)

NMDNLKPAFAK (配列番号 20)

(5) ヘモグロビン γ A 鎖

VLTSLGDAIK (配列番号 21)

(6) ヘモグロビン γ A 鎖又はヘモグロビン γ G 鎖

VNVEDAGGETLGR (配列番号 22)

EFTPEVQASWQK (配列番号 23)

GTFAQLSELHC[CAM]DK (配列番号 24)

FFDSFGNLSSASAIMGNPK (配列番号 25)

ATITSLWGK (配列番号 26)

EFTPEVQASWQK (配列番号 27)

(7) ヘモグロビン μ 鎖

MLAAVGAHVQVDNLR (配列番号 28)

AALSPLADLHALVLR (配列番号 29)

LFTVYPSTK (配列番号 30)

(8) ヘモグロビン θ 1 鎖

TFLAFPAK (配列番号 31)

VADALSLAVER (配列番号 32)

TYFSHLDLSPGSSQVR (配列番号 33)

KLGSNVGVYTTEALER (配列番号 34)

(9) ヘモグロビン ζ 鎖

FLSVVSSVLTEK (配列番号 35)

TYFPHFDLHPGSAQLR (配列番号 36)

SIDDIGGALSK (配列番号 37)

ISTQADTIGTETLER (配列番号 38)

VVAAVGDAVK (配列番号 39)

LFLSHPQTK (配列番号 40)

LSELHAYILR (配列番号 41)

[3] 前記[1]に記載のグロビンタイピングペプチド又は[2]に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを標準ペプチドとして用いて、生体試料を質量分析法で解析することを特徴とする、グロビンの検査方法。

[4] グロビンの検査が、グロビンの同定又はグロビンの定量である、[3]に記載の方法。

[5] 前記[1]に記載のグロビンタイピングペプチド又は[2]に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを標準ペプチドとして用いて、生体試料を質量分析法で解析することを特徴とする、グロビン関連疾患の検査方法。

[6] グロビン関連疾患が、グロビン合成異常症、血液疾患又は炎症性疾患である[5]に記載の方法。

[7] 血液疾患が溶血性疾患である[6]に記載の方法。

[8] 生体試料が、iPS細胞、骨髓細胞、血清又は血漿である[3]～[7]のいずれか1項に記載の方法。

[9] 前記[3]～[8]のいずれか1項に記載の方法により得られた結果を指標として、下記(a)～(d)の項目からなる群から選ばれる少なくとも1つを評価する方法。

(a) 抗癌剤の副作用又は血液毒性

(b) 造血刺激の有無

(c) 血液疾患又は炎症性疾患の病態

(d) 疾患の予後

[10] グロビン試料調製手段、質量分析手段及びデータ解析手段を含む、グロビン解析装置。

[11] グロビン試料調製手段が、生体試料回収部、溶血消化処理部、及び脱塩処理部を含む、[10]に記載の装置。

[12] 前記[1]に記載のグロビンタイピングペプチド又は[2]に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを含む、グロビンの検査用キット。

発明の効果

[0012] 本発明により、グロビンタイピングペプチドが提供される。本発明のグロビンタイピングペプチドにより、大量に存在する α 鎖や β 鎖、及び微量に存在するその他のアイソザイムを同時に計測することが可能である。さらに、得られるデータは各タンパク質の絶対量であることから、各グロビン鎖の組成が明らかとなり、新たな診断指標を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明のグロビン解析装置のブロック図である。

[図2]本発明の方法を示す模式図である。

[図3]本発明の方法を示すフローチャートの図である。

[図4]本発明のペプチドを用いてグロビンのタイピングを行った結果を示す図である。

[図5]本発明のペプチドを用いて、血液疾患患者の末梢血のタイピングを行った結果を示す図（総ヘモグロビン量に対する各グロビン鎖の量の割合）である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、所定のアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる少なくとも1つのグロビンタイピングペプチド、及び当該ペプチドを用いたグロビンの検査方法に関する。

本発明者は、赤血球が発現しているグロビン鎖を定量的にタイピングする技術、及びその技術を多検体に対して高速に実行できる装置を開発した。そして、グロビン遺伝子変異の結果生じるグロビン異常の定量的モニタリングによって各種血液疾患の診断法や治療法を開発することに成功した。

質量分析を用いたタンパク質の定量には、特異的かつ感度が高いペプチド

断片の選出が極めて重要である。本発明においては、ヒト赤血球や臍帯血、あるいは分化誘導可能なヒト赤白血病細胞(K562)を用いて各グロビン遺伝子産物を質量分析計によって同定した。タンパク質の同定には複数の質量分析計(Qq-TOF型やQq-Orbitrap型など)を用いて、普遍的に同定できるペプチドを探索した。その結果、各サブタイプに属するグロビン鎖に特異的なアミノ酸配列を同定することができた。本発明はこの知見により完成されたものでり、各種疾患の診断等に利用することが可能となる。特に、本発明は、(1)末梢血による β -サラセミア等のヘモグロビン異常症の診断法開発、及び(2)多能性幹細胞から誘導した赤血球に重要なグロビン発現機構の解明に利用することができ、高速グロビンタイピング装置の評価及び有効性の実証に有用である。

[0015] 1. 本発明のグロビンタイピングペプチド

本発明のグロビンタイピングペプチドは、各グロビン鎖に特異的なペプチドであり、ヘモグロビン α 1 鎖 (HBA1) 又はヘモグロビン α 2 鎖 (HBA2)、ヘモグロビン β 鎖 (HBB)、ヘモグロビン δ 鎖 (HBD)、ヘモグロビン ϵ 1 鎖 (HBE1)、ヘモグロビン γ a 鎖 (HBG1) 又はヘモグロビン γ g 鎖 (HBG2)、ヘモグロビン μ 鎖 (HBM)、ヘモグロビン θ 1 鎖 (HBQ1) 及びヘモグロビン ζ 鎖 (HBZ) からなる群のいずれかに属するペプチドである。

[0016] 本発明において標準ペプチドとして使用されるグロビンタイピングペプチドを以下に示す。

(1) HBA1;HBA2

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン α 1 鎖又はヘモグロビン α 2 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

LRVDPVNFK (配列番号 1)

FLASVSTVLTSK (配列番号 2)

(2) HBB

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン β 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

EFTPPVQAAYQK (配列番号 3)

VNVDEVGGEALGR (配列番号 4)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 5)

GTFATLSELHC[CAM]DK (配列番号 6)

SAVTALWGK (配列番号 7)

FFESFGDLSTPDVGMGNPK (配列番号 8)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 9)

上記アミノ酸配列において、C[CAM]はカルバミドメチル化システインを表す。以下、同様である。

[0017] (3) HBD

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン δ 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

EFTPQMQAAYQK (配列番号 10)

LLGNVLVC[CAM]VLAR (配列番号 11)

GTFSQLSELHC[CAM]DK (配列番号 12)

(4) HBE1

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン ϵ 1 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

LSELHC[CAM]DK (配列番号 13)

EFTPEVQAAWQK (配列番号 14)

FFDSFGNLSPPSAILGNPK (配列番号 15)

AAVTSLSWK (配列番号 16)

MNVEEAGGEALGR (配列番号 17)

VLTSFGDAIK (配列番号 18)

AAVTSLSWK (配列番号 19)

NMDNLKPAFAK (配列番号 20)

[0018] (5) HBG1

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン γ A 鎖であり、以下のアミノ酸

配列からなる。

VLTSLGDATAK (配列番号 2 1)

(6) HBG1;HBG2

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン γ A鎖又は γ G鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

VNVEDAGGETLGR (配列番号 2 2)

EFTPEVQASWQK (配列番号 2 3)

GTFAQLSELHC[CAM]DK (配列番号 2 4)

FFDSFGNLSASAIMGNPK (配列番号 2 5)

ATITSLWGK (配列番号 2 6)

EFTPEVQASWQK (配列番号 2 7)

[0019] (7) HBM

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン μ 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

MLAAVGAHVQHDNLR (配列番号 2 8)

AALSPLADLHALVLR (配列番号 2 9)

LFTVYPSTK (配列番号 3 0)

(8) HBQ1

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン θ 1鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

TFLAFPATK (配列番号 3 1)

VADALSLAVER (配列番号 3 2)

TYFSHLDLSPGSSQVR (配列番号 3 3)

KLGSNVGVYTTALER (配列番号 3 4)

[0020] (9) HBZ

この群に属するグロビン鎖はヘモグロビン ζ 鎖であり、以下のアミノ酸配列からなる。

FLSVVSSVLTEK (配列番号 3 5)

TYFPHFDLHPGSAQLR (配列番号 36)

SIDDIGGALSK (配列番号 37)

ISTQADTIGTETLER (配列番号 38)

VVAAGDAVK (配列番号 39)

LFLSHPQTK (配列番号 40)

LSELHAYILR (配列番号 41)

[0021] これらのアミノ酸配列からなるペプチドは、公知のペプチド合成方法を用いて得ることができる。合成方法としては、例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法及び酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。市販のペプチド合成装置を使用してもよい。合成反応後は、クロマトグラフィー等の公知の精製法を組み合わせることでペプチドを精製することができる。市販のアミノ酸合成装置を用いて合成することも可能である。

[0022] 2. 本発明の変異型グロビンタイピングペプチド

本発明の変異型グロビンタイピングペプチド（本明細書において「変異型ペプチド」ともいう）は、前記グロビンタイピングペプチドのアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなるものである。

上記「1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列」としては、例えば、1個～5個程度、好ましくは1個～2個程度のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列が挙げられ、限定はされない。

[0023] ここで、天然に存在するアミノ酸は、側鎖特性に基づいて、以下の通り分類することができる。このため、ペプチドのアミノ酸残基は、このような側鎖特性に基づくグループ内のアミノ酸残基（下記）に置換することができる。

非極性脂肪族：Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro

極性非電荷：Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln

負電荷（酸性）： Asp、Glu

正電荷（塩基性）： His、Lys、Arg

芳香族： Trp、Tyr、Phe

[0024] 但し、上記グループ内に限らず、他のグループに属するアミノ酸残基に置換することも可能であり、特に限定されるものではない。

[0025] 3. グロビンの検査方法

本発明は、前記グロビンタイピングペプチド又は変異型グロビンタイピングペプチド（本明細書においては、これらのペプチドを総称して「グロビンペプチド」ともいう）を標準ペプチドとして用いて、生体試料を質量分析法で解析することを特徴とする、グロビンの検査方法である。

本発明の方法で試験することができる生体試料としては、例えば全血、血清若しくは血漿、尿、その他の体液（糞便、涙液、滑液、痰）、又は骨髓細胞が挙げられるが、iPS細胞も生体試料として含めることとする。本発明においては、生体試料としてiPS細胞、骨髓細胞、血清又は血漿等を使用することができる。

[0026] 1つの態様において、本発明の検査方法は、生体試料を質量分析法で解析するステップを含む。その際、前記グロビンペプチドを内部標準ペプチドとして使用する。

例えば、本発明においては、検査対象の生物学的試料中のグロビタンパク質を抽出し、酵素消化したものに、安定同位体標識を施した本発明のグロビンペプチドを既定量添加し、質量分析により測定する。そして、検体由来のシグナルと評品（内部標準ペプチド）由来のシグナルとを比較して、検体由来のグロビンペプチドの量を決定する。

[0027] 質量分析では、高電圧をかけた真空中で試料をイオン化すると、静電力によって試料は装置内を飛行する。飛行しているイオンを電氣的・磁氣的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、その後それぞれを検出することで、 m/z を横軸、検出強度を縦軸とするマススペクトルを得ることができる。

[0028] 本発明において採用される質量分析は、特に限定されるものではないが、

例えば液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）、MALDI TOF MSなどが挙げられる。

また、多重反応モニタリング（MRM）は、選択されたイオンのモニタリングを可能とする質量分析技術である。この技術を使うことにより、測定対象グロビンの絶対的な定量値を得ることができる。

[0029] 本発明のグロビンペプチドは、質量分析の際に内部標準として使用することができる。本発明における「内部標準」とは、検体と同一のペプチド配列を持つが安定同位体標識などで質量差をもたせたペプチドであることを意味する。

このようにして得られた検査結果は、後述のグロビン関連疾患の検査、グロビンのモニタリングに使用することができる。

また、本発明においては、標準ペプチドの質量分析データと、測定対象由来の質量分析データとが一致したときは、測定対象は、標準ペプチドが属するグロビン鎖であると同定することができる。他方、標準ペプチドの質量分析データと、測定対象由来の質量分析データとの間に差異（偏差）が生じたときは、測定対象は、標準ペプチドが属するグロビン鎖ではないと判断することができる。

[0030] 4. グロビン関連疾患の検査方法

本発明は、前記グロビンペプチドを標準ペプチドとして用いて、生体試料を質量分析法で解析することを特徴とするグロビン関連疾患の検査方法を提供する。

グロビン関連疾患としては、グロビン合成異常症、血液疾患又は炎症性疾患が挙げられる。また、血液疾患としては、溶血性疾患、骨髓機能低下に基づく疾患などが挙げられ、炎症性疾患としては例えば膠原病、悪性腫瘍、免疫関連疾患などが挙げられる。

溶血性疾患とは、溶血性貧血などを代表とする赤血球の溶血により生じる疾患である。溶血性疾患には先天性及び後天性が含まれる。先天性疾患には鎌状赤血球症、遺伝性球状赤血球症、サラセミア、グルコース-6-リン酸脱水

素酵素欠損症などがある。また、後天性疾患には自己免疫性溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、バンチ症候群などがある。

骨髓機能低下に基づく疾患には、再生不良性貧血(AA)、骨髓異形成症候群(MDS)などがある。

[0031] 5. 評価方法

本発明は、前記検査方法により得られた結果を指標として、下記(a)～(d)の項目からなる群から選ばれる少なくとも1つをモニタリング又は評価する方法を提供する。

- (a) 抗癌剤の副作用又は血液毒性
- (b) 造血刺激の有無
- (c) 血液疾患又は炎症性疾患の病態
- (d) 疾患の予後

[0032] 6. グロビン解析装置

質量分析手段によるタンパク質の解析では、1アミノ酸の違いを容易に区別することができるが、ハイスループットな分析を実施するためには試料調製から分析までを自動化した迅速な分析システムの構築が必須である。

本発明は、グロビン試料調製手段、質量分析手段及びデータ解析手段を含む、グロビン解析装置を提供する。

[0033] 図1に示すように、本発明のグロビン解析装置1は、グロビン試料調製手段10、質量分析手段20及びデータ解析手段30を備える。

(1) グロビン試料調製手段

グロビン試料調製手段10は、試料調製部101と、試薬供給部102とを備える。試料調製部101は、生体試料を回収する回収部101aと、回収された試料を、溶血、細胞融解又は酵素消化する溶血消化処理部101bと、脱塩処理部101cとを備える。

試料調製部101には、試薬102aを収容する試薬供給部102が接続されている。試薬102aは、細胞溶解液、酵素、還元剤、アルキル化剤、標識、希釈液等である。試料調製部101は、試薬102aと、血液等の生

体試料とを混和して、測定試料を調製する。試薬 102a は、測定試料を質量分析手段 20 に流すための溶液としても用いられる。

[0034] 回収部 101a は、多検体収容部を備え、例えば試験管、96ウェルプレート、バイアルなどである。予め採取された生体試料は、自動ロボットにより回収部 101a に分注される。

溶血消化処理部 101b は、生体試料が分注された回収部 101a に細胞溶解液、酵素、還元剤、アルキル化剤などを添加する処理部である。

脱塩処理部 101c は、C18担体を用いた固相抽出をする処理部である。

本発明では多検体を並列的に処理できるように、グロビン試料調製手段 10 を複数設けることができる。

[0035] (2) 質量分析手段

質量分析手段 20 は、試料をイオン化するイオン源 201 と、生成されたイオンを質量と電化の比で分離する質量分析部 202 と、分離されたイオンを検出する検出部 203 とを備える。

イオン源 201 は、目的に応じて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI 法)、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) などが採用される。

[0036] 分析部 202 は、 m/z の近いピークを区別する能力 (質量分解能) と測定可能質量範囲の二つの要素の要求される特性によって、四重極型、飛行時間型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型、タンデム型などが採用される。

検出部 203 は、分析部 202 で選別されたイオンを電子増倍管やマイクロチャンネルプレートで増感して検出する。本発明においては、ファラデーカップで検出してカウントする形式を採用してもよい。増倍管の数に限定されるものではなく、単一チャネル検出器及びマルチチャネル検出器のいずれでもよい。

検出部 203 は、データ解析手段 30 の情報処理部 301 と通信を行う。

[0037] (3) データ解析手段

データ解析手段30は、情報処理部301と、出力部302と、入力部303とを備え、情報処理部301は、記憶部301aを備える。

情報処理部301は、グロビンタイピングペプチドのデータベースを作成し、これと被験試料のマススペクトルと比較することで試料の同定、定量を行う。そして、検出されたデータからマススペクトルを作製する。

記憶部301aは、情報処理部301により実行されるプログラムと、各種データとを記憶している。

出力部302は、文字情報や図形情報を表示するためのディスプレイである。入力部23は、ユーザーによる入力を受けるためのキーボード及びマウスである。

[0038] 本発明のハイスループット・グロビンタイピング装置の一例を図2に示す。

本発明の装置は、例えば、試料調製を1バッチ、96検体単位で一斉処理できるように、C18フィルターと固相化酵素(トリプシン)が充填されたチップカラムが並列して配置された構成となっている(図2)。これにより、生体試料から酵素消化までを1時間以内で達成することができる。分析対象は既知の8種類のグロビン鎖であるから、本発明の装置を用いることにより、これを全て特異的に識別して一斉に定量することが可能となる。測定に要する時間は1検体あたり5～30分、96検体(一括試料調製単位)であれば8時間で分析可能である。

[0039] 本発明の装置の動作を、図3を用いて説明する。

グロビン試料調製手段では、試料回収(S31)の後、検査対象の生物学的試料中のグロビタンパク質を抽出し、酵素消化する(S32)。必要に応じて、安定同位体標識又は還元アルキル化等の処置を施し(S32)、本発明のグロビンペプチドを内部標準ペプチドとして既定量添加する(S33)。得られたサンプルを質量分析により測定する(S34)。質量分析手段では、被験試料由来のシグナル(マススペクトル)と評品(内部標準ペプチド)由来のシグナルとを比較して、検体由来のグロビンペプチドの量を決定

する（S34）。

データ解析手段では、グロビンタイピングペプチドのデータベースを作成し、これと被験試料のマスペクトルと比較することで試料の同定、定量を行う（S35）。

[0040] 7. キット

本発明のキットは、前記グロビンペプチド又は変異型グロビンペプチドの少なくとも1つを含む。グロビンペプチドの組み合わせは任意でよく、1つの鎖に属するグロビンペプチドの1つ又は複数の組み合わせでのみでもよく、1つの鎖に属するグロビンペプチドの1つ又は複数と、他の鎖に属するグロビンペプチドの1つ又は複数とを組み合わせてもよい。

さらに、本発明のキットには、ペプチドの調製に必要な緩衝液、酵素、使用説明書などを含めることができる。

[0041] 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1

[0042] 方法

各グロビン鎖に特異的なペプチドを各種タンパク質試料の分析結果および公共データベースから抽出した。得られた候補ペプチドを合成し、これらをアルキル化処理したのち、mTRAQD0試薬にて標識した。得られた合成ペプチドを用いてMRMメソッドの評価を実施し、測定条件を固定した。さらに、評価用検体であるヒト健常人末梢血、臍帯血、およびK562細胞からタンパク質抽出液を得て、酵素消化後、還元アルキル化、mTRAQD4試薬による標識を行い、mTRAQD0合成ペプチドと混合して評価実験を行い、最終的なMRM測定メソッドを構築した。

[0043] 設定されたMRMメソッドを表1に示す。

[表1-1]

Q1	Q3	RTime	Q2	OP	EP	CE	CSP
586.966	562.265	29.32990074	TB252412 [MT3]- GTFATLSELHC[CAM]DE[MT3] 3y3_1 light	50	10	33.3483	19.7511615
586.966	609.324	29.32990074	TB252412 [MT3]- GTFATLSELHC[CAM]DK[MT3] 3y4_1 light	50	10	33.3483	25.1103684
586.966	618.325	29.32990074	TB252412 [MT3]- GTFATLSELHC[CAM]DK[MT3] 3b5_1 light	50	10	33.3483	21.9431075
589.638	566.273	29.32990074	TB252412 [MT7]- GTFATLSELHC[CAM]DK[MT7] 3y3_1 heavy	50	10	33.4819	19.9078743
589.638	703.331	29.32990074	TB252412 [MT7]- GTFATLSELHC[CAM]DE[MT7] 3y4_1 heavy	50	10	33.4819	25.2668421
589.638	623.332	29.32990074	TB252412 [MT7]- GTFATLSELHC[CAM]DK[MT7] 3b5_1 heavy	50	10	33.4819	22.0997812
530.315	517.298	39.60710144	TB467098 [MT3]-FLSVVSSVLTEK[MT3] 3y3_1 light	50	10	30.51575	17.9929518
530.315	630.382	39.60710144	TB467098 [MT3]-FLSVVSSVLTEK[MT3] 3y4_1 light	50	10	30.51575	22.4143362
530.315	686.424	39.60710144	TB467098 [MT3]-FLSVVSSVLTEK[MT3] 3b5_1 light	50	10	30.51575	24.6657784
530.315	488.287	39.60710144	TB467098 [MT3]-FLSVVSSVLTEK[MT3] 3b3_1 light	50	10	30.51575	16.8586217
532.987	521.305	39.60710144	TB467098 [MT7]-FLSVVSSVLTEK[MT7] 3y3_1 heavy	50	10	30.64935	18.1406255
532.987	634.389	39.60710144	TB467098 [MT7]-FLSVVSSVLTEK[MT7] 3y4_1 heavy	50	10	30.64935	22.5712989
532.987	690.431	39.60710144	TB467098 [MT7]-FLSVVSSVLTEK[MT7] 3b5_1 heavy	50	10	30.64935	24.7624521
532.987	492.294	39.60710144	TB467098 [MT7]-FLSVVSSVLTEK[MT7] 3b3_1 heavy	50	10	30.64935	17.0152954
452.589	571.272	29.46890068	TB467032 [MT3]-SHDDGGALSK[MT3] 3b4_1 light	50	10	26.62945	20.1033352
452.589	487.324	29.46890068	TB467032 [MT3]-SHDDGGALSK[MT3] 3y3_1 light	50	10	26.62945	16.8209584
452.589	798.399	29.46890068	TB467032 [MT3]-SHDDGGALSK[MT3] 3b7_1 light	50	10	26.62945	28.9840009
455.261	575.279	29.46890068	TB467032 [MT7]-SHDDGGALSK[MT7] 3b4_1 heavy	50	10	26.76305	20.2800509
455.261	491.331	29.46890068	TB467032 [MT7]-SHDDGGALSK[MT7] 3y3_1 heavy	50	10	26.76305	16.9776421
455.261	802.408	29.46890068	TB467032 [MT7]-SHDDGGALSK[MT7] 3b7_1 heavy	50	10	26.76305	29.1406746
577.302	744.356	29.88570023	TB110350 [MT3]-EFTPEVQASWQK[MT3] 3b5_1 light	50	10	32.8651	26.8709186
577.302	518.261	29.88570023	TB110350 [MT3]-EFTPEVQASWQK[MT3] 3b3_1 light	50	10	32.8651	18.0306051
577.302	688.378	29.88570023	TB110350 [MT3]-EFTPEVQASWQK[MT3] 3y4_1 light	50	10	32.8651	24.6821798
579.973	748.363	29.88570023	TB110350 [MT7]-EFTPEVQASWQK[MT7] 3b5_1 heavy	50	10	32.90865	27.0275933
579.973	522.268	29.88570023	TB110350 [MT7]-EFTPEVQASWQK[MT7] 3b3_1 heavy	50	10	32.90865	18.1872788
579.973	692.385	29.88570023	TB110350 [MT7]-EFTPEVQASWQK[MT7] 3y4_1 heavy	50	10	32.90865	24.8388535
642.88	631.341	28.67090034	TB110344 [MT3]-VLTSLGDATK[MT3] 2y5_1 light	50	10	33.28672	22.4520331
642.88	459.293	28.67090034	TB110344 [MT3]-VLTSLGDATK[MT3] 2y3_1 light	50	10	33.28672	15.7249563
642.88	1045.39	28.67090034	TB110344 [MT3]-VLTSLGDATK[MT3] 2y9_1 light	50	10	33.28672	38.649159
642.88	932.505	28.67090034	TB110344 [MT3]-VLTSLGDATK[MT3] 2y8_1 light	50	10	33.28672	34.2275455
646.887	635.348	28.67090034	TB110344 [MT7]-VLTSLGDATK[MT7] 2y5_1 heavy	50	10	33.463028	22.6087068
646.887	463.3	28.67090034	TB110344 [MT7]-VLTSLGDATK[MT7] 2y3_1 heavy	50	10	33.463028	15.88163
646.887	1049.6	28.67090034	TB110344 [MT7]-VLTSLGDATK[MT7] 2y9_1 heavy	50	10	33.463028	38.80596
646.887	936.512	28.67090034	TB110344 [MT7]-VLTSLGDATK[MT7] 2y8_1 heavy	50	10	33.463028	34.3842192
645.33	502.745	30.71579933	TB125559 [MT3]-TYF5HLDLSPGSSQVR 3b7_2 light	50	10	36.2665	17.4239205
645.33	730.384	30.71579933	TB125559 [MT3]-TYF5HLDLSPGSSQVR 3y7_1 light	50	10	36.2665	26.3246144
645.33	817.416	30.71579933	TB125559 [MT3]-TYF5HLDLSPGSSQVR 3y8_1 light	50	10	36.2665	29.7275656
645.33	1045.53	30.71579933	TB125559 [MT3]-TYF5HLDLSPGSSQVR 3y10_1 light	50	10	36.2665	38.6448223

[表1-2]

646.666	504.749	30.71579933	TB125559 [MT7]-YF5HLLDLSPGSSQVR_367_2 heavy	50	10	36.3333	17.5023859
646.666	730.384	30.71579933	TB125559 [MT7]-YF5HLLDLSPGSSQVR_3y7_3 heavy	50	10	36.3333	26.3246144
646.666	817.416	30.71579933	TB125559 [MT7]-YF5HLLDLSPGSSQVR_3y8_1 heavy	50	10	36.3333	29.7275656
646.666	1045.53	30.71579933	TB125559 [MT7]-YF5HLLDLSPGSSQVR_3y10_1 heavy	50	10	36.3333	38.646823
511.64	475.288	36.10580063	TB239262 [MT3]-FLASVSTVLTSK [MT3]_3y3_1 light	50	10	29.582	16.3583698
511.64	588.372	36.10580063	TB239262 [MT3]-FLASVSTVLTSK [MT3]_3y4_1 light	50	10	29.582	20.7719452
511.64	559.324	36.10580063	TB239262 [MT3]-FLASVSTVLTSK [MT3]_3b4_1 light	50	10	29.582	19.6361684
511.64	472.292	36.10580063	TB239262 [MT3]-FLASVSTVLTSK [MT3]_3b3_1 light	50	10	29.582	18.2323172
514.311	479.295	36.10580063	TB239262 [MT7]-FLASVSTVLTSK [MT7]_3y3_1 heavy	50	10	29.71555	16.5070345
514.311	592.379	36.10580063	TB239262 [MT7]-FLASVSTVLTSK [MT7]_3y4_1 heavy	50	10	29.71555	20.9286189
514.311	563.331	36.10580063	TB239262 [MT7]-FLASVSTVLTSK [MT7]_3b4_1 heavy	50	10	29.71555	19.7928421
514.311	476.299	36.10580063	TB239262 [MT7]-FLASVSTVLTSK [MT7]_3b3_1 heavy	50	10	29.71555	16.3896909
621.864	382.245	30.81739998	TB427035 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_2b3_1 light	50	10	32.362016	12.7123795
621.864	881.483	30.81739998	TB427035 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_2y6_1 light	50	10	32.362016	31.4505853
621.864	560.319	30.81739998	TB427035 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_2y3_1 light	50	10	32.362016	19.6750729
621.864	1031.39	30.81739998	TB427035 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_2y8_1 light	50	10	32.362016	38.109769
625.871	386.252	30.81739998	TB427035 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_2b3_1 heavy	50	10	32.538324	12.8690532
625.871	865.49	30.81739998	TB427035 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_2y6_1 heavy	50	10	32.538324	31.607259
625.871	564.326	30.81739998	TB427035 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_2y3_1 heavy	50	10	32.538324	19.8317466
625.871	1035.6	30.81739998	TB427035 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_2y8_1 heavy	50	10	32.538324	38.23856
414.912	560.319	30.81739998	TB412708 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_3y3_1 light	50	10	24.7456	19.6750729
414.912	382.245	30.81739998	TB412708 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_3b3_1 light	50	10	24.7456	12.7123795
414.912	870.325	30.81739998	TB412708 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_3b5_1 light	50	10	24.7456	30.0663075
414.912	483.293	30.81739998	TB412708 [MT3]-AAVTSLWSK [MT3]_3b4_1 light	50	10	24.7456	16.6633563
417.583	564.326	30.81739998	TB412708 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_3y3_1 heavy	50	10	24.87915	19.8317466
417.583	386.252	30.81739998	TB412708 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_3b3_1 heavy	50	10	24.87915	12.8690532
417.583	574.332	30.81739998	TB412708 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_3b5_1 heavy	50	10	24.87915	20.229812
417.583	487.3	30.81739998	TB412708 [MT7]-AAVTSLWSK [MT7]_3b4_1 heavy	50	10	24.87915	16.82093
445.927	572.34	31.73089981	TB532757 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_3y4_1 light	50	10	26.29635	20.145094
445.927	475.288	31.73089981	TB532757 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_3y3_1 light	50	10	26.29635	18.3593608
445.927	502.302	31.73089981	TB532757 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_3b3_1 light	50	10	26.29635	17.4066082
445.927	601.371	31.73089981	TB532757 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_3b4_1 light	50	10	26.29635	21.2802061
448.999	578.347	31.73089981	TB532757 [MT7]-LFTVYPSTK [MT7]_3y4_1 heavy	50	10	26.42995	20.3017677
448.999	479.295	31.73089981	TB532757 [MT7]-LFTVYPSTK [MT7]_3y3_1 heavy	50	10	26.42995	16.5070345
448.999	506.31	31.73089981	TB532757 [MT7]-LFTVYPSTK [MT7]_3b3_1 heavy	50	10	26.42995	17.563321
448.999	605.378	31.73089981	TB532757 [MT7]-LFTVYPSTK [MT7]_3b4_1 heavy	50	10	26.42995	21.4388798
668.387	572.34	31.72209978	TB532741 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_2y4_1 light	50	10	34.409028	20.145094
668.387	735.404	31.72209978	TB532741 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_2y5_1 light	50	10	34.409028	26.5208984
668.387	601.371	31.72209978	TB532741 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_2b4_1 light	50	10	34.409028	21.2802061
668.387	502.302	31.72209978	TB532741 [MT3]-LFTVYPSTK [MT3]_2b3_1 light	50	10	34.409028	17.4066082

[表1-3]

672.394	576.347	31.72209978	TS532741 [MT7]-LFTVYVPSTK [MT7] 2v4_1 heavy	50	10	34.585336	20.3017677
672.394	739.411	31.72209978	TS532741 [MT7]-LFTVYVPSTK [MT7] 2y5_1 heavy	50	10	34.585336	26.6775701
672.394	605.378	31.72209978	TS532741 [MT7]-LFTVYVPSTK [MT7] 2b4_1 heavy	50	10	34.585336	21.4368798
672.394	506.31	31.72209978	TS532741 [MT7]-LFTVYVPSTK [MT7] 2b3_1 heavy	50	10	34.585336	17.363321
733.947	637.403	41.44460833	TS532762 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2b5_1 light	50	10	37.293668	22.6890573
733.947	538.335	41.44460833	TS532762 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2b4_1 light	50	10	37.293668	18.8154985
733.947	1100.62	41.44460833	TS532762 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2y10_1 light	50	10	37.293668	40.800842
733.947	1213.71	41.44460833	TS532762 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2y11_1 light	50	10	37.293668	45.222661
735.951	641.41	41.44460833	TS532762 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2b5_1 heavy	50	10	37.381844	22.845731
735.951	542.342	41.44460833	TS532762 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2b4_1 heavy	50	10	37.381844	18.9721722
735.951	1100.62	41.44460833	TS532762 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2y10_1 heavy	50	10	37.381844	40.800842
735.951	1213.71	41.44460833	TS532762 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 2y11_1 heavy	50	10	37.381844	45.222661
489.634	538.335	41.42047405	TS532763 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3b4_1 light	50	10	28.4817	18.8154985
489.634	618.339	41.42047405	TS532763 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3y5_1 light	50	10	28.4817	21.9436549
489.634	717.402	41.42047405	TS532763 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3y6_1 light	50	10	28.4817	25.8172528
489.634	637.403	41.42047405	TS532763 [MT3]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3b5_1 light	50	10	28.4817	22.6890573
490.97	542.342	41.42047405	TS532763 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3b4_1 heavy	50	10	28.5485	18.9721722
490.97	618.339	41.42047405	TS532763 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3y5_1 heavy	50	10	28.5485	21.9436549
490.97	717.402	41.42047405	TS532763 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3y6_1 heavy	50	10	28.5485	25.8172528
490.97	641.41	41.42047405	TS532763 [MT7]-LLGNVLVC [CAM] VLAR 3b5_1 heavy	50	10	28.5485	22.845731
451.228	514.745	28.06970024	TS533133 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 4y7_2 light	50	10	25.5614	17.8931295
451.228	562.265	28.06970024	TS533133 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 4y3_1 light	50	10	25.5614	19.7511615
451.228	699.324	28.06970024	TS533133 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 4y4_1 light	50	10	25.5614	23.1101684
451.228	661.33	28.06970024	TS533133 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 4b5_1 light	50	10	25.5614	23.624603
453.232	516.749	28.06970024	TS533133 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 4y7_2 heavy	50	10	25.6616	17.9714839
453.232	566.273	28.06970024	TS533133 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 4y3_1 heavy	50	10	25.6616	19.9078743
453.232	703.333	28.06970024	TS533133 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 4y4_1 heavy	50	10	25.6616	23.2668421
453.232	665.338	28.06970024	TS533133 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 4b5_1 heavy	50	10	25.6616	23.7813158
601.302	562.265	28.06970024	TS532969 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 3y3_1 light	50	10	34.0651	19.7511615
601.302	699.324	28.06970024	TS532969 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 3y4_1 light	50	10	34.0651	23.1101684
601.302	661.33	28.06970024	TS532969 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 3b5_1 light	50	10	34.0651	23.624603
601.302	774.414	28.06970024	TS532969 [MT3]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT3] 3b6_1 light	50	10	34.0651	28.0461874
603.973	546.273	28.06970024	TS532969 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 3y3_1 heavy	50	10	34.19865	19.9078743
603.973	703.333	28.06970024	TS532969 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 3y4_1 heavy	50	10	34.19865	23.2668421
603.973	665.338	28.06970024	TS532969 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 3b5_1 heavy	50	10	34.19865	23.7813158
603.973	778.422	28.06970024	TS532969 [MT7]-GTFSQLSELHC [CAM] DK [MT7] 3b6_1 heavy	50	10	34.19865	28.2029062

表1において、Q1はペプチドイオンのm/zの値、Q3は断片イオンのm/zの値、RTTimeは保持時間、IDは任意の呼称、DPはdeclustering potential、EPはentrance potential、CEはCIDのエネルギー、CXPはcollision cell exit potentialを表す。ただし、この表で示す、RT、DP、EP、CE、CXPは使用する質量分

析計によって最適値が異なるため、Q1, Q3以外は使用する装置に合わせて調整すべきである。

実施例 2

[0044] 方法

1) 試料の溶解

表2に示す5つの検体に対して、それぞれ100 μ l又は200 μ lの1% SDS/7 M 塩酸グアニジンを含む100 mM Tris-HCl, pH8.5を添加し溶解後、BCA法にてタンパク質定量を実施した。

[表2]

No.	ラベル情報		Volume (目視判断)	Total Protein Concentration (ng/ml)
	キャップ側	チューブ側面		
1	MBS blood	1 $\times$ 10 ⁶ cells 19Feb2015	100 μ l	0.886 ng/ml
2	Human Peripheral blood	1 $\times$ 10 ⁶ cells Erythrocyte 4Feb2015	100 μ l	N/D
3	CB	Human cord blood 2 $\times$ 10 ⁶ cells 10Feb2015	200 μ l	1.03 ng/ml
4	NaB K562 d5	24Jan2015	200 μ l	0.604 ng/ml
5	Control K562 d5	24Jan2015	200 μ l	0.489 ng/ml

[0045] 2) メタノールクロロホルム法による試料浄化

各サンプルに対して600 μ lの氷冷メタノールを添加し、ボルテックス後、氷冷クロロフォルム200 μ lと氷冷MQ 400 μ lを加えてボルテックスで攪拌した。その後、氷上で30分静置後、マイクロ冷却遠心機 (TOMY MX207) にて遠心 (4 $^{\circ}$ C、13500 rpm、5分) し、上層をピペットで除去後、氷冷メタノール1mLを加えて攪拌した。スイングローター式の遠心機 (KUBOTA6200) にて遠心 (4 $^{\circ}$ C、3300 rpm、5分) 後、アングルローター式の遠心機 (TOMY MX207) にてさらに遠心 (4 $^{\circ}$ C、13500 rpm、5分) し、上清をピペットを使って除去後、氷冷した80%メタノールを1.0mL加えて攪拌した。スイングローター式の遠心機 (

KUBOTA6200) にて遠心 (4℃、3300 rpm、5分) 後、アングルローター式の遠心機 (TOMY MX207) にて遠心 (4℃、13500 rpm、5分)。

上清を除去後、得られた沈殿に7 M Guanidine HClを含む0.5 M Triethylammonium bicarbonate bufferに溶解した。ヒートブロックにて65℃で15分インキュベート後、MQ 28 μ lを加えてボルテックスで攪拌した。各サンプル2 μ l (N = 3) ずつBCAアッセイにて定量した。(サンプル残量50 μ lの想定)

[0046] 各サンプルともチューブ辺りのタンパク質量は200 μ g以下であるため (表3)、このまま酵素消化とmTRAQラベリングを実施することとした。

[表3]

No.	Sample	Lysate (μ g)	MeOH/Chloroform Extract (μ g)	Yield(%)
1	MBS blood	85.6	27.7	32%
2	Human Peripheral blood	N/D	N/D	N/D
3	Human cord blood	206	154	75%
4	NaB K562 d5	131	122	101%
5	Control K562 d5	97.8	93.7	96%

[0047] 3) 酵素消化・還元アルキル化

・ 濃度測定後 (終体積50 μ l) の各サンプルに対し50 μ lのDDWを添加した後、Lysyl endopeptidase溶液を1 μ l添加し、37℃で3時間インキュベートした。さらに、100 μ Lの水で希釈し、Trypsin溶液 1 μ lを添加した後37℃で3時間インキュベートした。さらにTrypsin溶液 1 μ lを添加し一晩インキュベートした。その後、50 mM TCEP HCl溶液を2.5 ml添加 (Final conc.0.625mMとなるように) して37℃で30分インキュベートし、250 mM Iodoacetamide溶液を2.5 μ l添加し遮光して室温で30分反応させた。500 mMのN-Acetyl-L-Cystein溶液を1 μ l添加して室温で30分反応した。得られたペプチド消化物は4時間凍結乾燥した。

[0048] 4) mTRAQ標識

凍結乾燥後のペプチド消化物を20 μ lの水に溶解後、イソプロパノール 50 μ lを添加して攪拌した。mTRAQ Reagent Δ O 試薬を20 μ l添加し攪拌後、室

温で2時間インキュベートした。100 μ lのMQを添加し、室温で30分静置した。得られた標識ペプチドは一晩凍結乾燥後、1.0 mlの0.1% TFAに再溶解した。

[0049] 5) MRM解析

各消化物に濃度既知のmTRAQd0標識ペプチドを添加し、MRMの測定を行なった。MRMによる分析はnano-LCを連結したQTRAP5500 (SCIEX社)で実施した。5 から 45% B を40分、45 から95% B を 1分、そして95% Bで10分 (A 溶媒: 0.1% 蟻酸/2% アセトニトリル, B 溶媒: 0.1% 蟻酸 90% アセトニトリル) のグラジエントを使用して200 nl/分の流速で自作のキャピラリーカラム (内径 100 μ m, 長さ15cm, 3 μ m L-column2) で分離した。スプレー電圧は2000 V, Gas1は30, interface heater temp.: 150 $^{\circ}$ Cの測定条件で行った。

[0050] 詳細は表4に示す。

[表4]

Mass Spectrometer	QTRAP5500 E
Ion Source	Nano Spray
Ion Spray Voltage	2000V
Ion Source Gas 1	30
Interface Heater Temp.	150
Acquisition Method (MS)	20150305_MRM_Hb_synthetic_adjusted01.dam
MRM detection window	180sec
Target Scan Time	2sec
Acquisition Method (NanoLC)	Methods130722\VI 40m 0545_95%B 200nl 60min. met
Flow	200 nl/min
Measuring Time	60 min
Injection Volume	5 μ L

[0051] 結果

結果を図4及び表5に示す。

[表5]

Component Name	Healthy Peripheral Blood (fmol)	Cord Blood (fmol)	MDS Blood (fmol)
Hemoglobin delta (TB652969)	0.516	0.07	1.32
Hemoglobin beta (TB252412)	19.2	8.2	45.8
Hemoglobin gamma (TB110550)	0	32.9	5.3
Hemoglobin α 1, α 2 (TB239262)	30.9	49.3	79.1

[0052] 健常者末梢血および臍帯血のヘモグロビンは、1細胞あたりそれぞれ500amol、70amolのHb δ を有するのに対して、MDS患者末梢血のヘモグロビンはそれぞれ2.6倍、18.6倍の1300amolものヘモグロビン δ を含むことが明らかとなった。また今回の患者においては、 γ 型が特徴的に発現していることも示された。

実施例 3

[0053] 各種疾患におけるグロビン鎖の解析

[0054] 方法

本実施例では、健常者、骨髓異形成症候群（MDS）の以下の6つの病型、不応性貧血（RCUD-RA）、鉄芽球性不応性貧血（RARS）、多血球系異形成を伴う不応性血球減少症（RCMD）、芽球増加を伴う不応性貧血-1（RAEB-1）、芽球増加を伴う不応性貧血-2（RAEB-2）、分類不能性骨髓異形成症候群（MDS-U）、MDS以外の以下の3つの血液疾患、再生不良性貧血（AA）、悪性貧血（PA）、急性骨髓性白血病（AML）のそれぞれについて、各グロビン鎖を定量し、各グロビン鎖の量の総ヘモグロビン量に対する割合を算出した。

各グロビン鎖の量は、実施例2の方法と同様にして測定した。内部標準として使用したグロビンペプチドのアミノ酸配列は、表6の「Component name」の欄に記載した（「alpha」、「beta」等の各グロビン鎖を示す用語の後にアルファベット大文字で記載。）。

[0055] 結果

結果を表6～7及び図5に示す。

[表6]

AQUA peptide濃度から算出した定価値(fmol/μL)×2-溶液0.1μL											
Index	Sample Index	Component Name	Pediatric Name	1	2	3	4	5	6	7	8
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106.702103	15.55739995	31.3000562	8.275681704
73	11	Hb0004	delta GTFSQ SELCDK 3b7 1	Hb 8	3.81037905	5.054544548		5.749725695			
121	17	Hb0005	epsilon ANVTI WSK 2b5 1	Hb 8							
102	15	Hb0006	zeta SIDQIGALSK 2b6 1	Hb 7							
131	18	Hb0007	theta TYFSLDLSPSSQVR 3b6 1	Hb 8							
1	1	Hb0008	multitYPSTK 2b4 1	Hb rnu							
			patient diagnosis	Healthy	AA	AA	AA	AA	AA		
93	14	Hb0001	alpha FLASGVTMSK 2b2 1	Healthy	383.3112709	905.4676832	3474.17653	531.4186289	1016.71565	495.3568998	933.7015393
65	10	Hb0002	beta GFATF SEIIRCDK 3b9 1	Hb 8	137.577671	120.074483	29.48043798	137.6497988	23.03827182	42.1318785	20.63965195
41	7	Hb0003	gamma EF7FVQASWQK 2b6 1	Hb 31			239.5835986	106			

[表7]

総ヘモグロビン鎖に対する各ペプチドの割合

Index	Sample Index	Component Name	Peptide Name	patient diagnosis	1	2	3	4	5	6	7	8
93	14	Hb0001_alpha.FLASVSTV.TSK.262.1	Healthy	Healthy	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
95	10	Hb0002_beta.GTFATLSEIHQDK.392.1	Hb_β	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
41	7	Hb0003_gamma.EFTPEVQASWQK.296.1	Hb_γ1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
73	11	Hb0004_delta.GTFSQLSEIHQDK.397.1	Hb_δ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
121	17	Hb0005_epsilon.AAVTSLWSEK.295.1	Hb_ε	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
103	15	Hb0006_zeta.SIDDIGGALK.296.1	Hb_ζ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
131	18	Hb0007_theta.TYFSHDLSPGSSQVR.396.1	Hb_θ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1	3	Hb0008_mu.LFTVVPSTK.294.1	Hb_μ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
93	14	Hb0001_alpha.FLASVSTV.TSK.262.1	patient diagnosis	patient diagnosis	9	10	11	12	13	14	15	16
95	10	Hb0002_beta.GTFATLSEIHQDK.392.1	Hb_β	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
41	7	Hb0003_gamma.EFTPEVQASWQK.296.1	Hb_γ1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
73	11	Hb0004_delta.GTFSQLSEIHQDK.397.1	Hb_δ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
121	17	Hb0005_epsilon.AAVTSLWSEK.295.1	Hb_ε	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
103	15	Hb0006_zeta.SIDDIGGALK.296.1	Hb_ζ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
131	18	Hb0007_theta.TYFSHDLSPGSSQVR.396.1	Hb_θ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1	3	Hb0008_mu.LFTVVPSTK.294.1	Hb_μ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
93	14	Hb0001_alpha.FLASVSTV.TSK.262.1	patient diagnosis	患者調査結果*	17	18	19	20	21	22	23	24
95	10	Hb0002_beta.GTFATLSEIHQDK.392.1	Hb_β	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
41	7	Hb0003_gamma.EFTPEVQASWQK.296.1	Hb_γ1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
73	11	Hb0004_delta.GTFSQLSEIHQDK.397.1	Hb_δ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
121	17	Hb0005_epsilon.AAVTSLWSEK.295.1	Hb_ε	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
103	15	Hb0006_zeta.SIDDIGGALK.296.1	Hb_ζ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
131	18	Hb0007_theta.TYFSHDLSPGSSQVR.396.1	Hb_θ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1	3	Hb0008_mu.LFTVVPSTK.294.1	Hb_μ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

[0056] 表6は、ペプチド濃度から算出した各グロビン鎖の濃度(fmol/ライセート溶液0.1μl)である。表6において、Blank Ratioの10倍未満の値(定量下限

値以下)であったものは空欄にしてある。

表 7 及び図 5 は、総ヘモグロビン量に対する各グロビン鎖の割合である。

図 5 において、縦軸は60～100%のスケールで示した。

(1) γ グロビンの発現比率は、AA、MDS、PA及びAML、IDAの順番に高い傾向がある。 γ グロビンの発現は、Healthyでは認められなかった。

(2) 各患者を加療すると、MDS、AAにおいては、 γ グロビンの発現比率が低下する傾向が認められた。

(3) 患者が貧血状態になると、 δ グロビンの発現比率が低下する傾向が認められた。

(4) MDS及びAAにおいては、 δ グロビンの発現が認められない傾向があった。

[0057] なお、表 6 及び 7 において、17番の患者はRAEB-2相当であるが、化学療法歴があるためWHO分類では治療関連骨髄腫瘍と診断した。また、★は輸血あり、▲は貧血治療薬以外の投薬あり、●は貧血治療薬の投薬ありであることを意味する。

符号の説明

[0058] 1 : グロビン解析装置

1 0 : グロビン試料調製手段

2 0 : 質量分析手段

3 0 : データ解析手段

1 0 1 : 試料調製部

1 0 2 : 試薬供給部

2 0 1 : イオン源

2 0 2 : 質量分析部

2 0 3 : 検出部 2 0 3

3 0 1 : 情報処理部

3 0 2 : 出力部

3 0 3 : 入力部

配列表フリーテキスト

[0059] 配列番号 5 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 8）。

配列番号 6 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 1 1）

。

配列番号 9 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 8）。

配列番号 1 1 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 8）

。

配列番号 1 2 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 1 1）。

配列番号 1 3 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 6）

。

配列番号 2 4 : Xaaはカルバミドメチル化システインを表す（存在位置 : 1 1）。

請求の範囲

[請求項1] 以下の(1)～(9)のいずれかのヘモグロビン鎖に属し、下記アミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる少なくとも1つのグロビンタイピングペプチド。

(1) ヘモグロビン α 1鎖又はヘモグロビン α 2鎖

LRVDPVNFK (配列番号1)

FLASVSTVLTSK (配列番号2)

(2) ヘモグロビン β 鎖

EFTPPVQAAYQK (配列番号3)

VNVDEVGGEALGR (配列番号4)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号5)

GTFATLSELHC[CAM]DK (配列番号6)

SAVTALWGK (配列番号7)

FFESFGDLSTPDVGMGNPK (配列番号8)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号9)

(C[CAM]はカルバミドメチル化システインを表す。以下、同様。)

(3) ヘモグロビン δ 鎖

EFTPQMQAAYQK (配列番号10)

LLGNVLVC[CAM]VLAR (配列番号11)

GTFSQLSELHC[CAM]DK (配列番号12)

(4) ヘモグロビン ϵ 1鎖

LSELHC[CAM]DK (配列番号13)

EFTPEVQAAWQK (配列番号14)

FFDSFGNLSSPSAILGNPK (配列番号15)

AAVTSLWSK (配列番号16)

MNVEEAGGEALGR (配列番号17)

VLTSFGDAIK (配列番号18)

AAVTSLWSK (配列番号19)

- NMDNLKPAFAK (配列番号 20)
- (5) ヘモグロビン γ A鎖
- VLTSLGDATAK (配列番号 21)
- (6) ヘモグロビン γ A鎖又はヘモグロビン γ G鎖
- VNVEDAGGETLGR (配列番号 22)
- EFTPEVQASWQK (配列番号 23)
- GTFAQLSELHC[CAM]DK (配列番号 24)
- FFDSFGNLSSASAIMGNPK (配列番号 25)
- ATITSLWGK (配列番号 26)
- EFTPEVQASWQK (配列番号 27)
- (7) ヘモグロビン μ 鎖
- MLAAVGAAVQHVDNLR (配列番号 28)
- AALSPLADLHALVLR (配列番号 29)
- LFTVYPSTK (配列番号 30)
- (8) ヘモグロビン θ 1鎖
- TFLAFPATK (配列番号 31)
- VADALSLAVER (配列番号 32)
- TYFSHLDLSPGSSQVR (配列番号 33)
- KLGSNVGVYTTEALER (配列番号 34)
- (9) ヘモグロビン ξ 鎖
- FLSVVSSVLTEK (配列番号 35)
- TYFPHFDLHPGSAQLR (配列番号 36)
- SIDDIGGALSK (配列番号 37)
- ISTQADTIGTETLER (配列番号 38)
- VVAAVGDAVK (配列番号 39)
- LFLSHPQTK (配列番号 40)
- LSELHAYILR (配列番号 41)

[請求項2]

以下の(1)～(9)のいずれかのヘモグロビン鎖に属し、下記ア

ミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる少なくとも1つの変異型グロビンタイピングペプチド。

(1) ヘモグロビン α 1 鎖又はヘモグロビン α 2 鎖

LRVDPVNFK (配列番号 1)

FLASVSTVLTSK (配列番号 2)

(2) ヘモグロビン β 鎖

EFTPPVQAAYQK (配列番号 3)

VNVDEVGGEALGR (配列番号 4)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 5)

GTFATLSELHC[CAM]DK (配列番号 6)

SAVTALWGK (配列番号 7)

FFESFGDLSTPDVMGNPK (配列番号 8)

LLGNVLVC[CAM]VLAHHFGK (配列番号 9)

(C[CAM]はカルバミドメチル化システインを表す。以下、同様。)

(3) ヘモグロビン δ 鎖

EFTPQMQAAYQK (配列番号 10)

LLGNVLVC[CAM]VLAR (配列番号 11)

GTFSQLSELHC[CAM]DK (配列番号 12)

(4) ヘモグロビン ϵ 1 鎖

LSELHC[CAM]DK (配列番号 13)

EFTPEVQAAWQK (配列番号 14)

FFDSFGNLSSPSAILGNPK (配列番号 15)

AAVTSLSK (配列番号 16)

MNVEEAGGEALGR (配列番号 17)

VLTSFGDAIK (配列番号 18)

AAVTSLSK (配列番号 19)

NMDNLKPAFAK (配列番号 20)

(5) ヘモグロビン γ A鎖

VLTSLGDATAK (配列番号 21)

(6) ヘモグロビン γ A鎖又はヘモグロビン γ G鎖

VNVEDAGGETLGR (配列番号 22)

EFTPEVQASWQK (配列番号 23)

GTFAQLSELHC[CAM]DK (配列番号 24)

FFDSFGNLSSASAIMGNPK (配列番号 25)

ATITSLWGK (配列番号 26)

EFTPEVQASWQK (配列番号 27)

(7) ヘモグロビン μ 鎖

MLAAVGAAVQHVDNLR (配列番号 28)

AALSPLADLHALVLR (配列番号 29)

LFTVYPSTK (配列番号 30)

(8) ヘモグロビン θ 1鎖

TFLAFPATK (配列番号 31)

VADALSLAVER (配列番号 32)

TYFSHLDLSPGSSQVR (配列番号 33)

KLGSNVGVYTTEALER (配列番号 34)

(9) ヘモグロビン ζ 鎖

FLSVVSSVLTEK (配列番号 35)

TYFPFHDLPQSAQLR (配列番号 36)

SIDDIGGALSK (配列番号 37)

ISTQADTIGTETLER (配列番号 38)

VVAAGDAVK (配列番号 39)

LFLSHPQTK (配列番号 40)

LSELHAYILR (配列番号 41)

[請求項3]

請求項1に記載のグロビンタイピングペプチド又は請求項2に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを標準ペプチドとして用いて、

生体試料を質量分析法で解析することを特徴とする、グロビンの検査方法。

[請求項4] グロビンの検査が、グロビンの同定又はグロビンの定量である、請求項3に記載の方法。

[請求項5] 請求項1に記載のグロビンタイピングペプチド又は請求項2に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを標準ペプチドとして用いて、生体試料を質量分析法で解析することを特徴とする、グロビン関連疾患の検査方法。

[請求項6] グロビン関連疾患が、グロビン合成異常症、血液疾患又は炎症性疾患である請求項5に記載の方法。

[請求項7] 血液疾患が溶血性疾患である請求項6に記載の方法。

[請求項8] 生体試料が、iPS細胞、骨髓細胞、血清又は血漿である請求項3～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 請求項3～8のいずれか1項に記載の方法により得られた結果を指標として、下記(a)～(d)の項目からなる群から選ばれる少なくとも1つを評価する方法。

(a) 抗癌剤の副作用又は血液毒性

(b) 造血刺激の有無

(c) 血液疾患又は炎症性疾患の病態

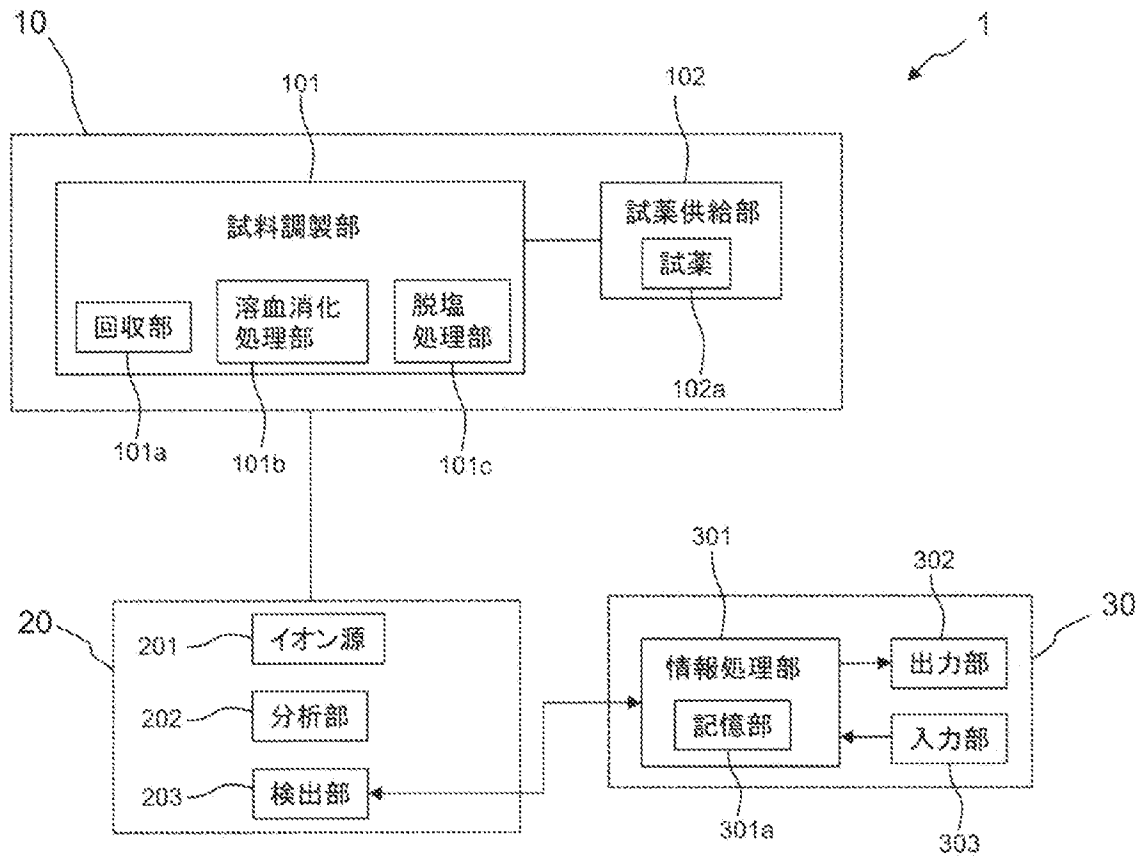
(d) 疾患の予後

[請求項10] グロビン試料調製手段、質量分析手段及びデータ解析手段を含む、グロビン解析装置。

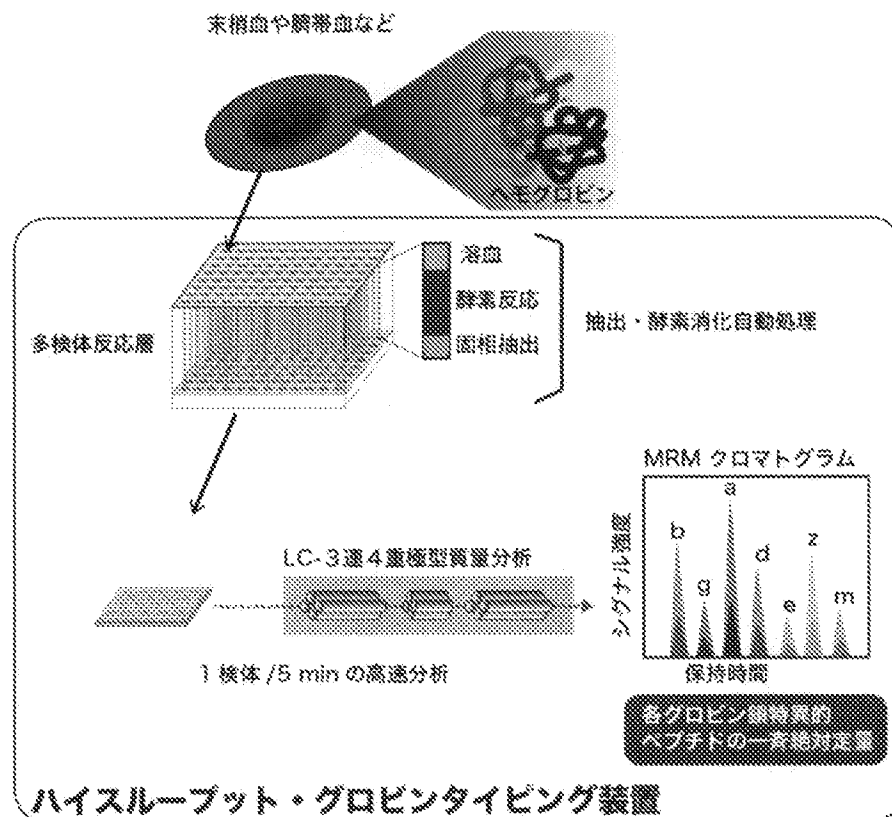
[請求項11] グロビン試料調製手段が、生体試料回収部、溶血消化処理部、及び脱塩処理部を含む、請求項10に記載の装置。

[請求項12] 請求項1に記載のグロビンタイピングペプチド又は請求項2に記載の変異型グロビンタイピングペプチドを含む、グロビンの検査用キット。

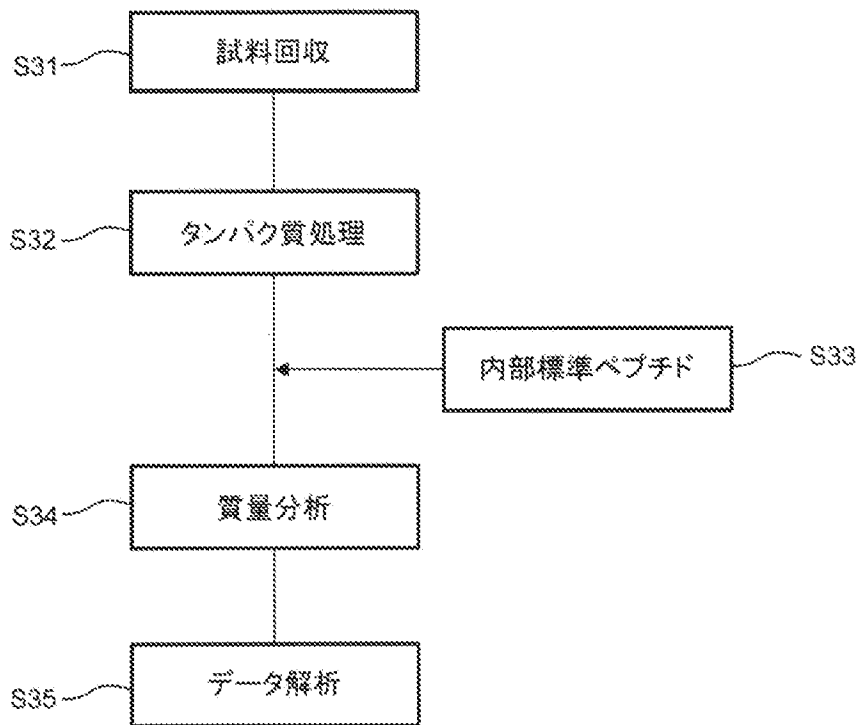
[図1]



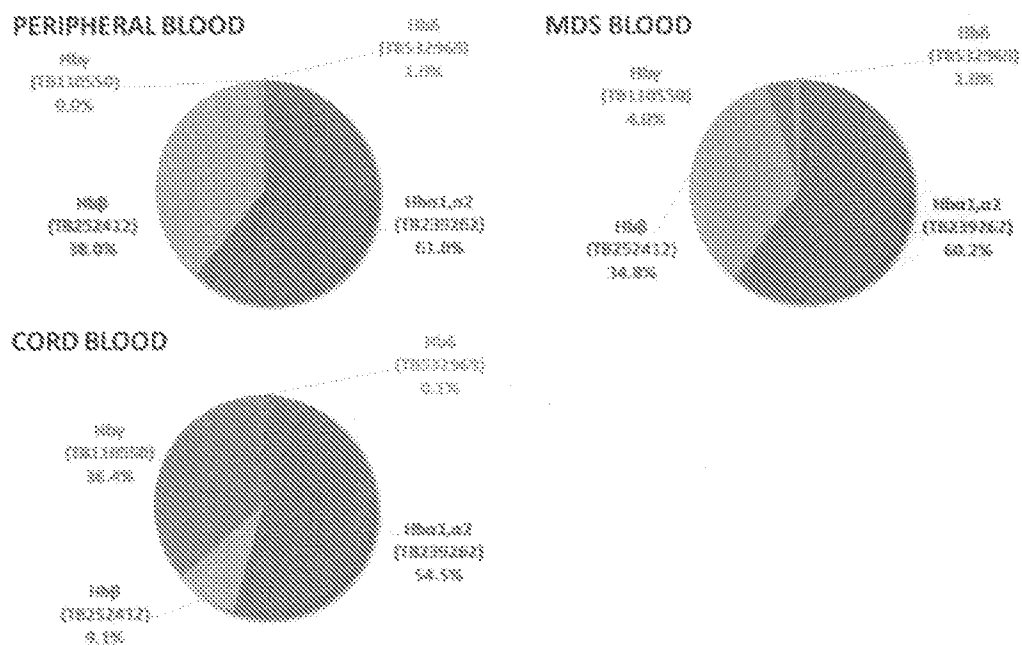
[図2]



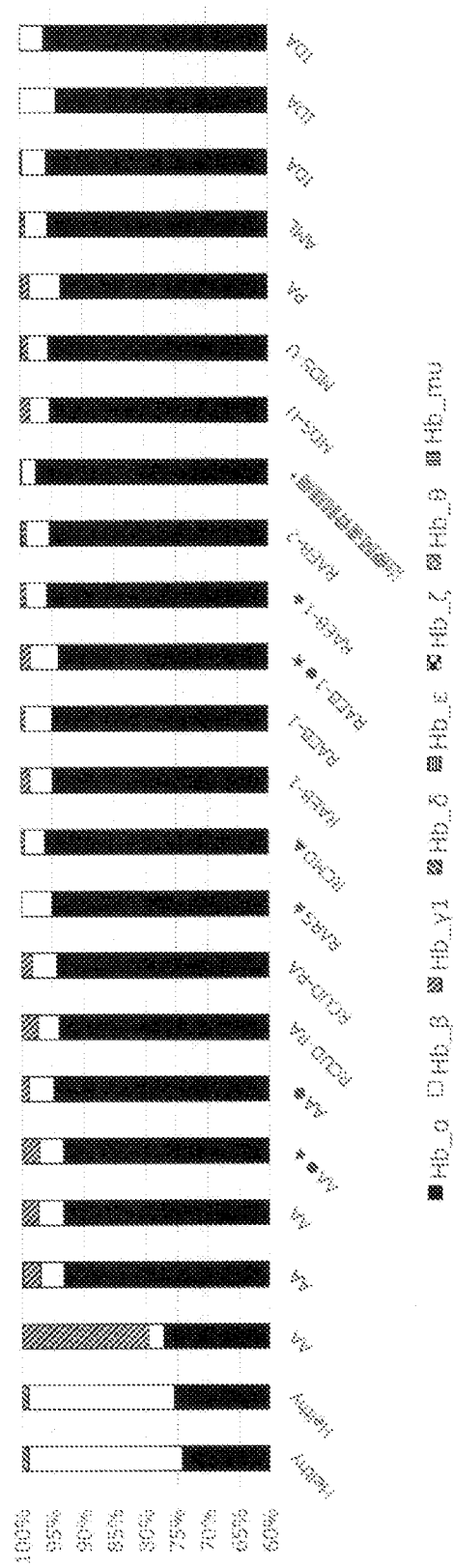
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/028050

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K7/04(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

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)

Int.Cl. C07K7/04, C12Q1/04, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KATAKUSE, I. et al., "Secondary Ion Mass Spectra of Tryptic Peptides of Human Hemoglobin Chains", BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY, 1984, vol. 11, no. 8, pp. 386-391	1-5, 8, 10-12 1-12
Y	WO 2016/030688 A1 (ILES, Raymond Kruse et al.) 03 March 2016, claims 1-12, page 2, lines 1-11, example 1 & JP 2017-525971 A, claims 1-12, paragraph [0006], example 1 & EP 3186640 A1 & CN 107110873 A	1-12
P, X	YUMINE, A. et al., "Identification of the globin typing peptide and prospects of the clinical utilization", 臨床血液, September 2017, vol. 58, no. 9, p. 537, PS1-20-1, (The Japanese Journal of Clinical Hematology)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* 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

"I" 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 October 2018 (02.10.2018)

Date of mailing of the international search report
09 October 2018 (09.10.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/04(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/04, C12Q1/04, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	KATAKUSE, I. et al., Secondary Ion Mass Spectra of Tryptic Peptides of Human Hemoglobin Chains, BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY, 1984, VOL. 11, NO. 8, p. 386-391	1-5, 8, 10-12 1-12
Y	WO 2016/030688 A1 (ILES, Raymond Kruse et al.) 2016.03.03, Claims 1-12, p.2 lines 1-11, Example 1 & JP 2017-525971 A, 請求項 1-12、[0006]、実施例 1 & EP 3186640 A1 & CN 107110873 A	1-12

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.10.2018

国際調査報告の発送日

09.10.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉門 沙央里

4 B

5081

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	YUMINE, A. et al., Identification of the globin typing peptide and prospects of the clinical utilization, 臨床血液, 2017.09, Vol.58, no.9, p.537, PS1-20-1	1-12