

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソースの構築
2. 研究開発代表者：五島 直樹（産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター）
3. 研究開発の成果

代表研究機関である産業技術総合研究所（産総研）と分担研究機関であるバイオ産業情報化コンソーシアム（JBIC）では、今までに以下の4つの基盤技術を構築してきた。①ヒト全遺伝子の80%をカバーするヒトタンパク質発現リソース、②無細胞系でのハイスループットなタンパク質合成技術、③活性を維持したタンパク質を搭載したプロテイン・アクティブアレイ、④広範な発現リソース情報を格納したヒト遺伝子-タンパク質データベース。本課題ではこれらの基盤技術を基に、再生医療に関わる遺伝子リソースを強化することで、再生医療における初期化、分化誘導、ダイレクト・リプログラミングに関する研究進展のボトルネックを解消し、また、これら遺伝子リソースから合成したタンパク質を搭載したアレイによる機能的プロテオミクス解析で、安全な再生医療の実現に貢献することを目指している。

産総研では特に機能的プロテオミクス解析について、スループットの向上を目指したプロテインアレイの高密度化技術の開発、細胞の品質評価を目的としたリン酸化活性プロファイリング技術の開発、細胞移植の安全性評価を目的とした自己抗体検出および移植免疫モニタリング技術の開発に取り組み、以下の成果を得た。

研究開発項目4：プロテインアレイによる機能的プロテオミクス解析

4-1 プロテインアレイの基礎技術の開発

未変性タンパク質の高密度アレイ化技術について、タンパク質溶液の乾燥（変性）を防ぐ技術、アレイ作製時のタンパク質スポットのコメット化（スポット流れ）を防止する技術を開発し、1,536本のピンヘッドを装着したアレイヤーを用いて基板1枚当たり13,824個のタンパク質を、隣のスポットと融合することなく短時間に搭載することを可能とした。更に、多数の陽性スポットの高精度な検出を目的に、タンパク質溶液に蛍光色素を混ぜることでグリッド補正方法を改善し、アレイ1枚あたり1時間以上かかっていた補正時間を半分に短縮した。

4-2 細胞表面マーカー探索のためのタンパク質相互作用を用いた解析技術の開発

移植用の細胞の品質を評価する目的で、細胞中のリン酸化酵素の活性パターンによる細胞のプロファイリングを検討した。プロテインアレイを「基質アレイ」として使い、アレイ基板上で細胞ホモジネート液中のチロシンキナーゼと基質タンパク質の相互作用（リン酸化反応）を行った。抗リン酸化抗体を用いてリン酸化されたタンパク質の検出を試み、その結果、HEK293細胞で約50種の基質タンパク質のリン酸化を確認した。今後はこのリン酸化活性プロファイリングの高感度化に取り組み、細胞の状態や細胞の種類の識別に展開する。更に、膜型チロシンキナーゼについては細胞表面マーカー候補として解析を進める。

4-3 自己抗体検出技術の開発

プロテインアレイの自己抗体検出性能を評価する目的で、既知の陽性自己抗体が検出されている血清45検体（市販診断薬「抗U1-RNP抗体」と「抗ARS抗体」に関して陽性判定が出た血清）を用い、プロテインアレイで自己抗体の検出を行った。その結果、市販診断薬との高い相関性が得られ、複数の抗体の同時検査が可能というプロテインアレイの付加価値も得られた。更に、移植免疫の評価を角膜内皮細胞移植検体で開始した。まだ2例での予備検討段階ではあるが、移植前後で変動する自己抗体の検出を確認した。