

## 次世代リプログラミング因子 KLF4 改変体の開発

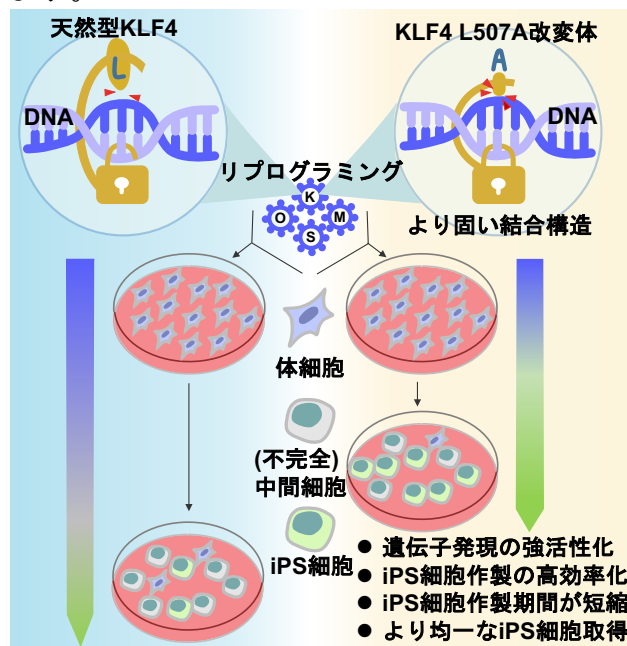
## —iPS 細胞をより高効率・高品質に作製—

理化学研究所（理研）バイオリソース研究センターiPS 細胞高次特性解析開発チームの林洋平チームリーダー（筑波大学医学医療系准教授）、ポリソワ・エフゲーニャ大学院生リサーチ・アソシエイト（筑波大学大学院人間総合科学研究科博士課程）、筑波大学医学医療系西村健准教授、久武幸司教授らの共同研究グループ<sup>※</sup>は、iPS 細胞<sup>[1]</sup>をより高効率・高品質に作製できる KLF4 タンパク質<sup>[2]</sup>改変体を開発しました。

本研究成果は、従来よりも優れた次世代リプログラミング（初期化）因子により、患者自身の体細胞から作製する iPS 細胞を用いた自家移植医療の実現に貢献すると期待できます。

今回、共同研究グループは、iPS 細胞作製の際に必要なリプログラミング因子の一つである KLF4 タンパク質において、DNA と直接相互作用するアミノ酸残基の改変体を多数作製しました。その中から「KLF4 L507A 改変体（ヒト KLF4 の 507 番目のアミノ酸残基ロイシンをアラニンに置換したもの）」を用いて iPS 細胞を作製したところ、迅速、かつ高効率で、高品質な iPS 細胞株を樹立できることが分かりました。

本研究は、科学雑誌『*iScience*』オンライン版（12月14日付：日本時間12月15日）に掲載されます。



本研究の概要

**※共同研究グループ**

- 理化学研究所 バイオリソース研究センター iPS細胞高次特性解析開発チーム  
 チームリーダー 林 洋平 (はやし ようへい)  
 (筑波大学 医学医療系 准教授 [連携大学院]、筑波大学グローバル教育院  
 ライフイノベーション学位プログラム 准教授 [協働大学院])  
 大学院生リサーチ・アソシエイト ボリソワ・エフゲーニャ  
 (Borisova Evgeniia)  
 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 博士課程)  
 テクニカルスタッフ (研究当時) 安 瑜利 (あん ゆり)  
 研修生 (研究当時) 高見 美帆 (たかみ みほ)  
 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 修士課程)  
 研修生 (研究当時) ジンユエ・リ (Jingyue Li)  
 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 修士課程)  
 研修生 ダン・ソン (Dang Song)  
 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 博士課程)  
 開発研究員 高崎 真美 (たかさき まみ)  
 研修生 (研究当時) ドリアン・ルクス (Dorian Luijckx)  
 (オランダ ユトレヒト大学大学院 修士課程)
- 筑波大学 医学医療系  
 遺伝子制御学研究室  
 教授 久武 幸司 (ひさたけ こうじ)  
 准教授 西村 健 (にしむら けん)  
 大学院生 相澤 志穂 (あいざわ しほ)
- 解剖学発生学研究室  
 助教 久野 朗広 (くの あきひろ)  
 (グローバル教育院 ヒューマンバイオロジー学位プログラム)
- プレジジョン・メディシン開発研究センター  
 センター長・教授 佐藤 孝明 (さとう たかあき)  
 客員准教授 杉原 英志 (すぎはら えいじ)  
 (藤田医科大学 研究支援推進本部 共同利用研究設備サポートセンター  
 ゲノム解析室 准教授)
- 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター  
 特任准教授 (研究当時) 湯本 史明 (ゆもと ふみあき)
- 東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻生物分子工学講座  
 准教授 寺田 透 (てらだ とおる)

**研究支援**

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の課題「リプログラミング因子変異体の DNA 相互作用における分子動力学シミュレーション」(課題番号 JP21am0101107 (支援番号 1907))、日本学術新学会 (JSPS) 科学研究費補助金 研究活動スタート支援 「KLF4DNA 結合部位アミノ酸残基の機能解析から改良リプログラミング因子の開発 (研究代表者: 林洋平)」(課題番号 JP16H06662)、同若手研究 (A) 「染色体異常を伴った疾患特異的 iPS 細胞を修復する「染色体編集法」の開発 (研究代表者: 林洋平)」(課題番号 JP17H05063)、基盤研究 (B) 「iPS 細胞誘導過程での Klf4 による

細胞形態と細胞機能のリプログラミング機構（研究代表者：久武幸司）」（課題番号 JP17H04036）、基盤研究（B）「iPS 細胞誘導における Klf4 を中心とした動的エピゲノム転写制御の分子機構（研究代表者：西村健）」（課題番号 JP19H03203）、文部科学省「ナノテクノロジープラットフォーム事業」（課題番号 JPMXP09 S20NM0001）、公益財団法人武田科学振興財団の支援、上原記念生命科学財団、東京生化学研究会、2018 年度 iPS アカデミアジャパン研究助成による支援を受けて行われました。また、ポリソワ・エフゲーニャは本研究の実施期間に大塚敏美育英奨学財団の奨学金を得ていました。

## 1. 背景

「リプログラミング（初期化）」は、転写因子<sup>[3]</sup>などのリプログラミング因子を異所的に発現させることで、体細胞を他の望ましい種類の細胞に変える技術です。iPS 細胞の開発に代表されるように、生命科学、創薬、再生医療の革新的技術として発展してきました。リプログラミング因子は、DNA のサイレンシング（遺伝子発現の抑制）された部分などに協調して結合し、「パイオニア因子」として活発な転写イベントを開始し、下流の遺伝子の発現や、細胞の初期化状態に向けたエピジェネティック<sup>[4]</sup>な状態の変更を制御します。

リプログラミングの効率や質を改善するために、過去の多くの研究では、新規・代替・追加因子の探索、エピジェネティックな状態を変える因子の探索、培養条件、因子の導入方法の改善などに焦点が当てられてきました。しかし、現在の技術では、体細胞からの直接的なリプログラミングにおいて高品質な iPS 細胞の収量が少ないことから、特に患者自身の体細胞から作製した iPS 細胞を（自家）移植医療へ応用するのが遅れています。

今回、共同研究グループは、既存のリプログラミング因子自体の機能強化を目標としました。リプログラミング因子のうち KLF4（Krüppel-like factor 4）は、転写活性化ドメインと抑制ドメインの両方を持つジンクフィンガータンパク質<sup>[5]</sup>であり、iPS 細胞の作製や他のリプログラミングにも広く使われています。この KLF4 の機能改善を図るべく、有用な KLF4 改変体の開発に取り組みました。

## 2. 研究手法と成果

共同研究グループは、リプログラミング因子を合理的に設計し、構造生物学、機能生物学なアプローチを組み合わせることで、リプログラミングがどのように改善されるかを調べました。

まず、KLF4 の DNA 結合領域であるジンクフィンガー領域（ZnF ドメイン）に着目し、DNA と相互作用するアミノ酸残基 19 個を既報の結晶構造から見いだしました（図 1）。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した改変体群を作製し（アラニンスキニング<sup>[6]</sup>）、それらの改変体をレトロウイルスベクター<sup>[7]</sup>を用いてマウス線維芽細胞に導入し、iPS 細胞を作製しました。すると、これらの改変体の多くは、天然型（野生型）KLF4 と比較して、iPS 細胞の作製効率（リプログラミング活性）を低下（または消失）させましたが、「KLF4 L507A 改変体（ヒ

ト KLF4 の 507 番目のアミノ酸残基ロイシンをアラニンへと置換したもの」  
だけは、iPS 細胞の生成速度と作製効率を向上させることが分かりました(図 2)。

KLF4 ZnFドメイン

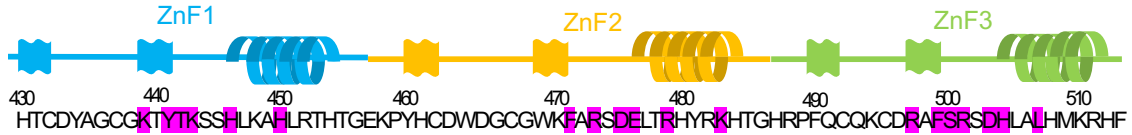


図 1 KLF4 の ZnF ドメインにおけるアミノ酸残基配列

ピンク色でハイライトした文字は、今回アラニンに置換した改変体を作製したアミノ酸残基 (19 個) を示す。これらのアミノ酸残基は DNA と相互作用する。この中で、ZnF3 領域にある 507 番目のアミノ酸残基ロイシン (L) をアラニン (A) に置換した KLF4 L507A 改変体だけが、iPS 細胞の作製に有効であることが分かった。

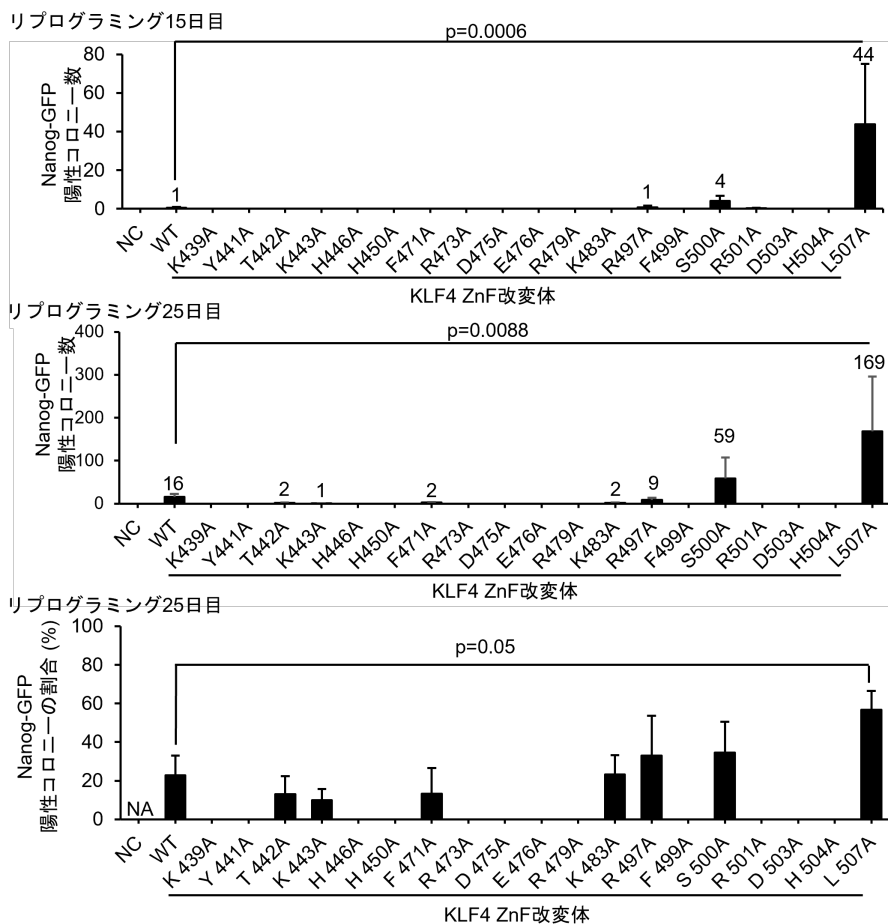


図 2 19 個の KLF4ZnF 改変体を用いた iPS 細胞作製実験の結果

iPS 細胞になると緑色蛍光タンパク質 (Nanog-GFP) を発現するマウス繊維芽細胞に、各 KLF4 改変体レトロウイルスベクターを導入して iPS 細胞を作製し、15 日目、25 日目にそれぞれコロニー数を計測した。25 日目にはさらにコロニー総数の割合を計測した。KLF4 L507A 改変体では iPS 細胞を多く作製できた。

KLF4 L507A 改変体は、ヒト繊維芽細胞に対しても同様に iPS 細胞の作製効率を向上させました。また、ゲノム DNA に挿入されず、ヒト細胞に高い感染性を示すことから再生医療に高い応用性があると考えられているセンダイウイルスベクター<sup>[7]</sup>を用いても、KLF4 L507A 改変体は同じように、マウス、ヒトの体細胞の両方から、天然型 KLF4 よりも高い iPS 細胞作製効率を示しました。

作製したヒト iPS 細胞 (クローン) 株を単離直後に解析したところ、多くの細胞で iPS 細胞マーカーの *NANOG* 遺伝子<sup>[8]</sup>発現の不均一性が比較的低いこと、センダイウイルスベクターの残存による RNA 発現が低いこと、分化抵抗性<sup>[9]</sup>を示す iPS 細胞株のマーカー RNA (HERV-H や lincRNA-RoR) の発現が低いことが分かりました。この結果は、天然型 KLF4 と比較して、KLF4 L507A 改変体を用いた方がより均一に高品質の iPS 細胞を作製できることを示しています。

また、KLF4 の L507 部位のアミノ酸残基を天然アミノ酸 20 種にそれぞれ置換した改変体を用いて iPS 細胞を作製し、その作製効率を比較しました。すると興味深いことに、アラニンやグリシンといった分子体積の小さいアミノ酸残基に置換した改変体を用いた場合は iPS 細胞の作製効率が高く、L507 部位のアミノ酸残基の分子体積の大きさと iPS 細胞の作製効率が逆の相関を示すことが分かりました (図 3)。このことは、L507 部位のアミノ酸残基が iPS 細胞へのリプログラミングにおける KLF4 の機能に立体障害となることを示しています。

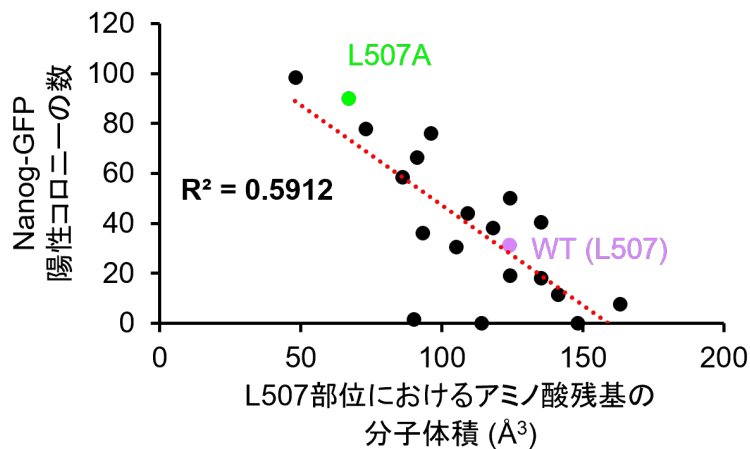


図 3 L507 部位におけるアミノ酸残基の分子体積と iPS 細胞作製効率の関係

KLF4 の L507 部位のアミノ酸残基を天然アミノ酸 20 種それぞれに置換した改変体を用いて、iPS 細胞を作製した。グラフの  $R^2$  は決定係数 (相関関数の 2 乗)、WT (L507) は天然型を示す。

次に、iPS 細胞の作製効率を向上させることが知られているいくつかの因子をそれぞれ追加して、KLF4 L507A 改変体または天然型 KLF4 を用いて iPS 細胞を作製しました。その結果、KLF4 と同様に ZnF ドメインを持つ転写因子の Glis1<sup>[10]</sup> や Klf5<sup>[10]</sup> を添加した場合は、iPS 細胞作製効率を向上させる効果が KLF4 L507A 改変体によって打ち消されることが分かりました。これは、KLF4 L507A 改変体が Glis1 や Klf5 を追加したときと同様の効果を持つことを示しています。



また、ChIP-Seq<sup>[11]</sup>やRNA-Seq<sup>[12]</sup>の実験により、KLF4 L507A 変異体はKlf5 などの一部の多能性関連遺伝子のプロモーター<sup>[13]</sup>やエンハンサー<sup>[13]</sup>に多く結合し、リプログラミングの際にそれらの遺伝子発現を天然型因子よりもさらに強く促進することが明らかになりました。

最後に、KLF4 L507A 変異体が KLF4 と DNA の結合構造にどのような変化をもたらすかを予想するため、分子動力学シミュレーション解析<sup>[14]</sup>を行いました。その結果、KLF4 L507A 変異体のタンパク質-DNA 複合体では、いくつかのアミノ酸残基と DNA との間に水素結合が新たに形成され、タンパク質と DNA の結合が天然型 KLF4 よりも強化されるようなコンフォメーション（立体配座）が存在する可能性を見いだしました（図 4）。

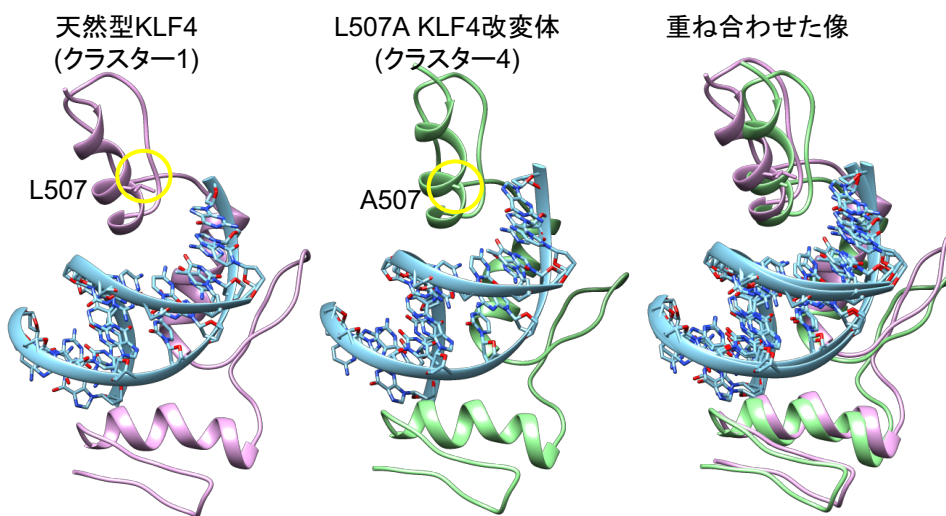


図 4 分子動力学シミュレーションを用いた KLF4ZnF ドメインと DNA の複合体構造予測

タンパク質はリボンで、DNA はボールアンドスティックで示す。L507A 変異体のクラスター4 構造（中央）は 34%の存在確率であり、この変異体に固有の構造である。いくつかのアミノ酸残基と DNA との間に水素結合が新たに形成され、タンパク質と DNA の結合が天然型 KLF4 よりも強化されると考えられる。

本研究では、iPS 細胞の作製に用いられるリプログラミング因子である KLF4 に着目し、その DNA の相互作用の構造的知見から変異体を探索しました。その結果、iPS 細胞の作製を高効率化・高品質化する機能強化型変異体として L507A（および L507 部位における小さなアミノ酸残基変異体）を見いだしました。この変異体は、ゲノム DNA との複合体においてより固い結合状態を取りうると考えられます。iPS 細胞のリプログラミング時に Klf5 などの多能性関連遺伝子の転写をより強く活性化します。以上の分子機構から、iPS 細胞作製の期間がより短くなり、効率が高くなります。作製された iPS 細胞は、従来よりも分化抵抗性のものが少ない、質の高いものがより均一的になります（図 5）。

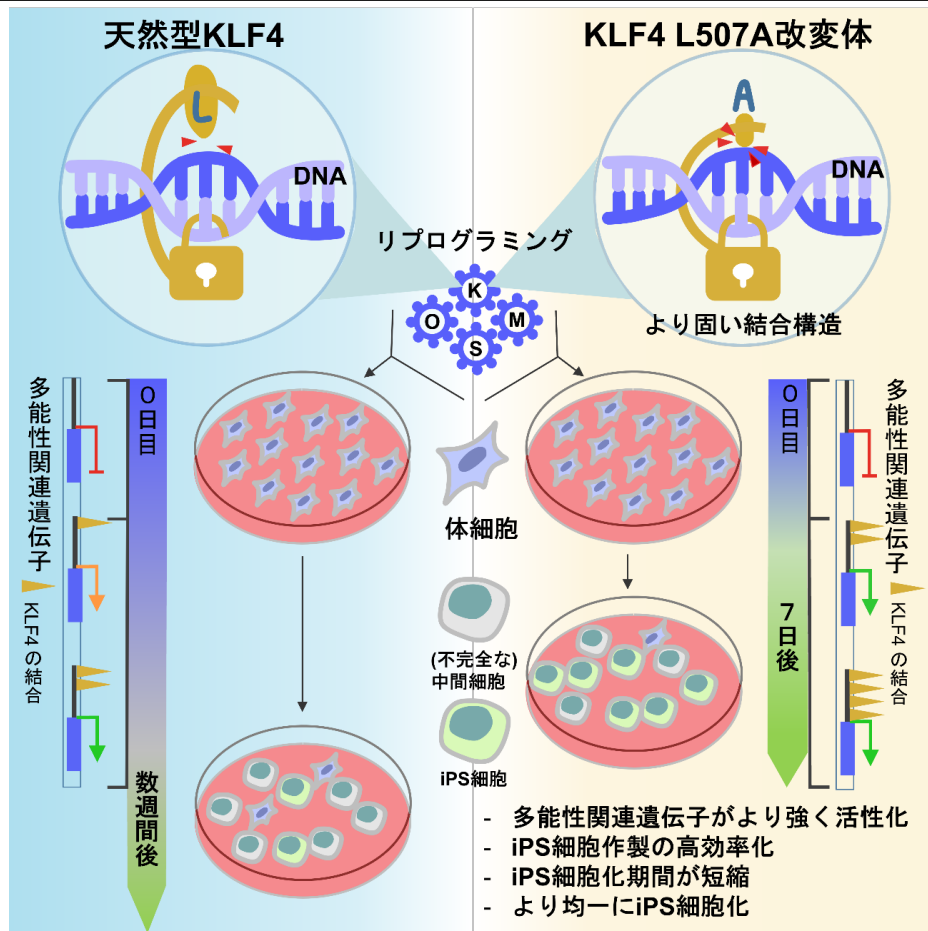


図5 本研究成果の概要

天然型 KLF4 と今回の研究で見いだした KLF4 L507A 改変体を用いた iPS 細胞の作製実験における違い。

### 3. 今後の期待

本研究成果は、従来の天然型タンパク質よりも優れたリプログラミング能を持つ「次世代リプログラミング因子」を開発した初めての例です。今後、他のリプログラミング因子においても同様な機能増強型の改変体が開発されると考えられます。その延長線上では、より効率よく高品質の iPS 細胞を容易に作製できることから、患者自身から作った iPS 細胞 (My iPS 細胞) を用いた自家移植医療の実現に貢献すると期待できます。

また、本研究成果に関する特許のライセンスを受けて事業化を希望する企業を募集しています。

### 4. 論文情報

<タイトル>

Structurally-discovered KLF4 variants accelerate and stabilize reprogramming to pluripotency

---

< 著者名 >

Evgeniia Borisova, Ken Nishimura, Yuri An, Miho Takami, Jingyue Li, Dan Song, Mami Matsuo-Takasaki, Dorian Luijckx, Shiho Aizawa, Akihiro Kuno, Eiji Sugihara, Taka-aki Sato, Fumiaki Yumoto, Tohru Terada, Koji Hisatake, and Yohei Hayashi

< 雑誌 >

*iScience*

< DOI >

10.1016/j.isci.2021.103525

## 5. 補足説明

### [1] iPS 細胞

ヒトを含む哺乳類の体細胞にごく少数の因子を導入し、培養すると、その細胞はさまざまな組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力を持つ多能性幹細胞に変化する。この細胞を iPS 細胞（人工多能性幹細胞、induced pluripotent stem cells）と呼ぶ。

### [2] KLF4 タンパク質

iPS 細胞を作製する際に用いられるリプログラミング因子の一つ。そのほかにも、初期発生や恒常性の維持、がん化など多様な生命現象に関わる。構造的には、転写抑制ドメイン、転写活性化ドメイン、ジンクフィンガードメインを含む。

### [3] 転写因子

DNA に特異的に結合するタンパク質の一群であり、DNA 上のプロモーター、エンハンサー領域に結合し、転写を調節する。

### [4] エピジェネティック

広義には、遺伝性ではない形質を幅広く指すが、ここでは、狭義として（DNA の配列そのものの変化ではなく）DNA のメチル化およびヒストンの化学的修飾など、RNA 発現とタンパク質の翻訳に対する細胞内環境の状態変化を意味する。

### [5] ジンクフィンガータンパク質

ジンクフィンガーはタンパク質ドメインの一種で、DNA に結合する性質を持つ。亜鉛（ジンク）イオンがその構造の安定化に重要である。

### [6] アラニンスキャニング

タンパク質の特定アミノ酸残基をアラニンに置換した改変体を作製し、そのアミノ酸残基の機能を調べる手法。アラニンは側鎖がメチル基だけで、分子半径が小さく、極性も持たないため、別のアミノ酸残基の効果を打ち消す目的で広く利用される。



---

### [7] レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター

それぞれ、レトロウイルス、センダイウイルスを改変して作られた細胞内への遺伝子導入のために用いられるベクター（運び屋）である。レトロウイルスベクターは分裂する細胞のゲノム DNA に安定に組み込まれて、長期的な遺伝子の発現が可能であるのに対し、センダイウイルスベクターは非分裂細胞にも遺伝子導入でき、ゲノム DNA には取り込まれずに、数週間ほど発現が持続する。

### [8] *NANOG* 遺伝子

多能性幹細胞（や生殖細胞の一部）のみで高発現している遺伝子であり、多能性幹細胞の多能性や自己複製を制御している。iPS 細胞作製実験においては、作製された iPS 細胞の指標（マーカー）遺伝子として用いられる。

### [9] 分化抵抗性

iPS 細胞などの幹細胞は、一般的にさまざまな細胞に分化する能力を持っているが、リプログラミングが不十分、長期培養による変化などが原因となり、分化しにくい性質を帯びてしまうことがある。これを「分化抵抗性」と呼び、基礎研究や再生医療における分化誘導に支障を来す要因となる。

### [10] Glis1、Klf5

ともにジンクフィンガータンパク質であり、iPS 細胞作製を促進することが知られている。Klf5 は Klf4 に類似した構造、機能を持っており、Klf4 の代替として iPS 細胞を作製できる (Nakagawa *et al.*, *Nature Biotechnology* 2008)。Glis1 は iPS 細胞の効率を促進するものの、体細胞や iPS 細胞自身にはほとんど発現していないことが過去に示されている (Maekawa *et al.*, *Nature* 2011)。

### [11] ChIP-seq

ある特定の転写因子やヒストンなどの DNA 結合タンパク質が、細胞内において DNA のどの配列にどの程度結合しているかを網羅的に解析する手法。

### [12] RNA-seq

細胞内から RNA を回収し、その配列を網羅的に読むことで、その発現量や発現している遺伝子の種類を解析する実験手法。

### [13] プロモーター、エンハンサー

プロモーター (Promoter) とは転写 (DNA から RNA を合成する段階) の開始に関与する遺伝子上流領域の配列を指す。エンハンサー (Enhancer) はさらに周辺領域で、遺伝子の転写を調節する配列を指す。

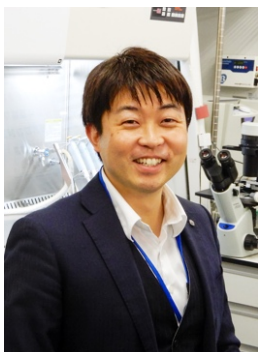
### [14] 分子動力学シミュレーション解析

原子ならびに分子の物理的な動きを予測するコンピューターシミュレーション手法。原子および分子は、ある時間の間相互作用することが許され、これによって原子の動的発展の状況予測が得られる。化学物理学、材料科学、生体分子のモデリングに広く利用されている。

## 6. 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。  
理化学研究所 バイオリソース研究センター iPS 細胞高次特性解析開発チーム  
チームリーダー 林 洋平 (はやし ようへい)  
大学院生リサーチ・アソシエイト ボリソワ・エフゲーニャ (Evgeniia Borisova )  
TEL : 029-846-0042 (林) FAX : 029-846-0043 (林)  
E-mail : yohei.hayashi[at]riken.jp (林)

筑波大学 医学医療系 遺伝子制御学研究室  
准教授 西村 健 (にしむら けん)  
教授 久武 幸司 (ひさたけ こうじ)  
TEL : 029-853-3929 FAX : 029-853-3929  
E-mail : kojihisa[at]md.tsukuba.ac.jp (久武)、ken-nichimura[at]md.tsukuba.ac.jp (西村)



林 洋平



ボリソワ・エフゲーニャ



西村 健



久武 幸司

### <機関窓口>

\*今般の新型コロナウイルス感染症対策として、理化学研究所では在宅勤務を実施しておりますので、メールにてお問い合わせ願います。

理化学研究所 広報室 報道担当  
E-mail : ex-press[at]riken.jp

筑波大学 広報室  
TEL : 029-853-2040 FAX : 029-853-2014  
E-mail : kohositu[at]un.tsukuba.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。