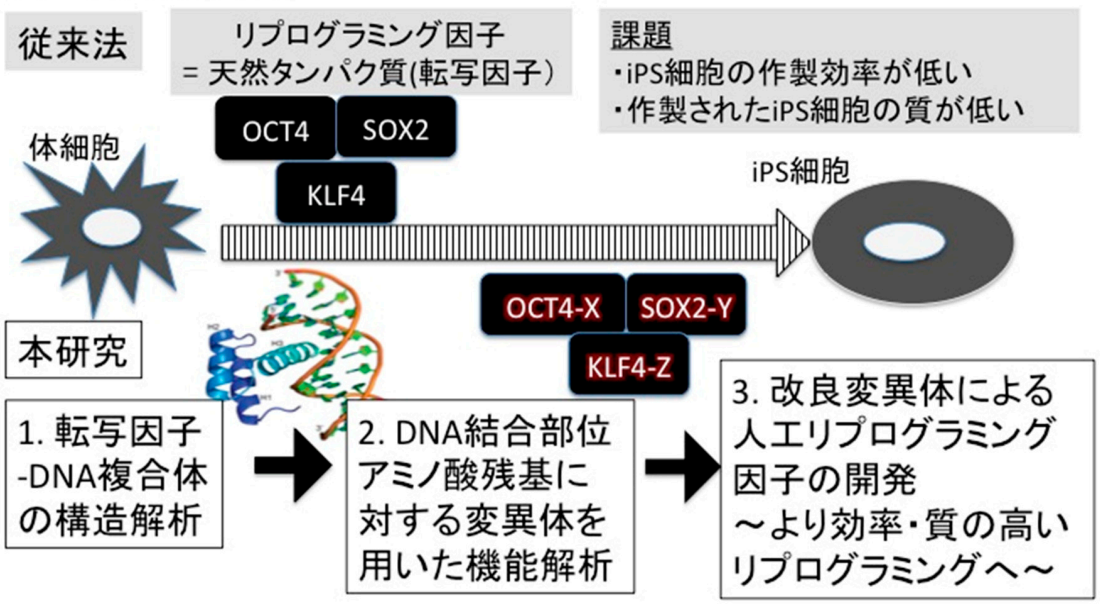
151　リプログラミング因子の構造基盤の解析と改良	林　洋平

【目的】誘導多能性幹（iPS）細胞の開発に端を発し、細胞種を遺伝子工学的に操作する「リプログラミング」技術が基礎生物学と再生医療における革新的技術として進展してきた。しかし、リプログラミングの効率が低い、リプログラミングした細胞の分化能が不十分、などが依然として問題となっている。その原因として、リプログラミングに用いられる遺伝子である「転写因子」の基本的な分子基盤が十分に解明されていないことが挙げられる。

【方法】本研究計画においては、①リプログラミングで中心的役割を果たす転写因子、特にiPS細胞の作製に用いられるOCT4、SOX2、KLF4の分子構造基盤を解明する。②これらの分子構造基盤に基づいて、天然型タンパク質よりも優れた改良リプログラミング因子とそれを用いた 画期的なリプログラミングの制御技術を開発する。

【結果】これまでにKLF4については改良型変異体を得ることができ、NANOG-GFPレポーターを指標としたiPS細胞の作成効率の上昇が見られた。この結果は、タンパク質の構造と機能の知見から、野生型タンパク質よりも優れたリプログラミング能を持つ「人工リプログラミング因子」の開発が可能なことを実証している。

本研究計画の概要



151. リプログラミング因子の構造基盤の解析と改良

林　洋平

*筑波大学 医学医療系 遺伝子制御学グループ

Key words：リプログラミング，iPS 細胞，OCT4，SOX2，KLF4

緒　言

2006 年の誘導多能性幹（iPS）細胞の開発に端を発し、細胞種を遺伝子工学的に操作する「リプログラミング」技術が基礎生物学と再生医療における革新的技術として進展してきた。しかし、リプログラミングの効率が低い、リプログラミングした細胞の分化能が不十分、などが依然として問題となっている。その原因として、リプログラミングに用いられる遺伝子である「転写因子」の基本的な分子基盤が十分に解明されていないことが挙げられる。

我々はこれまで多数の iPS 細胞を作製した実績があり、多能性維持ならびにリプログラミング機構の研究を実施してきた［1〜3］。その一つとして、多能性幹細胞の多能性維持に重要な転写因子である NANOG のホメオドメイン-DNA 複合体の結晶構造を決定し、その構造から DNA と直接相互作用するアミノ酸残基を同定した。それらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作製し、各変異体について精製したタンパク質と iPS 細胞内発現での機能を解析した。その結果、各アミノ酸残基の分子的役割を解明するとともに、野生型 NANOG より DNA 結合能ならびに複合体の安定性が高く、よりリプログラミング能の高い改良型変異体の開発に成功した［4］。この研究手法と知見を生かすことで、他のリプログラミング因子の作用機構の分子基盤を解明し、リプログラミング能を改良できると着想した。

これまで、リプログラミング研究において、因子の選定や遺伝子導入法などについては研究が進んできたが、リプログラミング因子自体は天然の遺伝子のみがほぼ用いられてきた。他の様々なバイオメディカル業界の技術に目を向けると、タンパク質の構造情報に着目し、タンパク質工学などの技術を駆使し、天然タンパク質よりも優れた人工タンパク質を作製して医薬業の発展に役立ってきた例は枚挙に暇がない。そこで本研究計画においては、①リプログラミングで中心的役割を果たす転写因子、特に iPS 細胞の作製に用いられる OCT4、SOX2、KLF4 の分子構造基盤を解明する。②これらの分子構造基盤に基づいて、天然型タンパク質よりも優れた改良リプログラミング因子とそれを用いた画期的なリプログラミングの制御技術を開発する。

方　法

本研究計画の方法は以下の通りである。概要を図 1 に示す。

（1）OCT4、SOX2、KLF4 の DNA 結合ドメインと DNA の複合体構造を対象にタンパク質−DNA 相互作用を解析し、DNA と直接相互作用しているアミノ酸残基を同定し、それぞれのアミノ酸残基に対するアラニン置換変異体を作製する。

（2）各変異体を用いて iPS 細胞の作製を試み、各アミノ酸残基の重要性を明らかにする。Nanog-GFP レポーターを持つマウス胎児繊維芽細胞に対して、上記のアラニン置換変異体を用いて iPS 細胞へのリプログラミングを行ない、Nanog-GFP 陽性の細胞コロニー数を iPS 細胞作製効率の指標として計測した。

（3）各変異体の哺乳類細胞内でのタンパク質寿命を測定し、各アミノ酸残基に対する変異の影響を明らかにする。方法としては、野生型、変異型それぞれ 3xFLAG タグを融合させたリプログラミング因子を遺伝子導入した哺乳類細胞をシクロヘキシミド処理によってタンパク質翻訳を停止させる。その後、異なった時間（例えば、0 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間）に細胞からタンパク質を回収する。その後、Western Blotting によって各変異体のタンパク量を測定する。

*現在の所属：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

（4）各変異体の精製タンパク質を用いて、各アミノ酸残基に対する変異が DNA との結合能に与える影響を明らかにする。BIACORE（GE Healthcare)などの機器を用いて、上記で精製された野生型、変異型タンパク質それぞれの DNA 結合能（アフィニティー）を測定する。結合する 2 本鎖 DNA（10 塩基程度）を合成し、5'端にビオチンを結合させておく。それをストレプトアビジンバイオセンサーに固相化させ、異なるタンパク質濃度の野生型、変異型を加えたのちの表面プラズモン共鳴現象（Surface Plasmon Resonance : SPR)シグナルの変化を読み取る。この値の変化からそれぞれの DNA 結合能（アフィニティー）を測定する。

（5）各変異体の精製タンパク質と DNA の複合体において、各アミノ酸残基の変異が熱安定性に与える影響を明らかにする。示査走査型蛍光分析法（Differential Scanning Fluorimetry : DSF)を用いて、精製した野生型または変異体 KLF4ZFN それぞれの熱変性温度を測定する。蛍光試薬である Sypro Orange は変性タンパク質と効率的に結合し、蛍光強度が上昇する。この原理を用いて、熱変化に対する蛍光強度をリアルタイムサーマルサイクラーでモニターすることで、温度に対する複合体の熱変性具合を測定する。その変化から、50%変性する温度（T_m values（V50））を導出する。

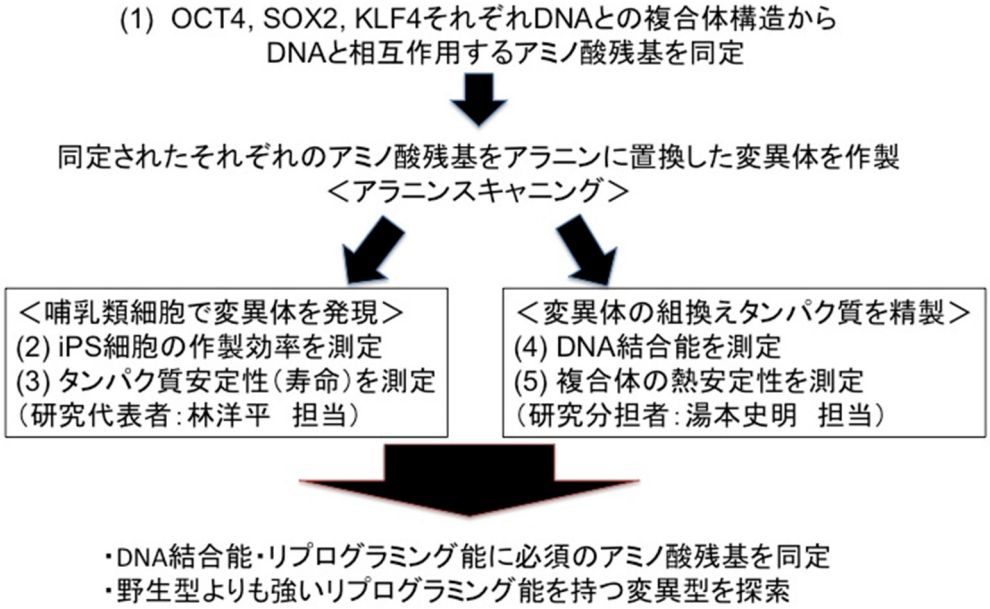


図 1. 本研究計画における研究方法の概要

結　果

（1_KLF4）タンパク質の立体構造のデータベースである Protein Data Bank (PDB)に個別に登録されている KLF4 の C2H2 ジンクフィンガードメイン（KLF4ZFD）と DNA の複合体構造を対象に、タンパク質—DNA 相互作用を解析し、DNA と直接相互作用しているアミノ酸残基を 19 個同定した。さらにこれらのアミノ酸残基に対するアラニン置換変異体を 19 種類作製した。

（2_KLF4）Nanog-GFP レポーターを持つマウス胎児繊維芽細胞に対して、上記のアラニン置換変異体を用いて iPS 細胞へのリプログラミングを行ない、Nanog-GFP 陽性の細胞コロニー数を iPS 細胞作製効率の指標として計測した。その結果、大半の変異体では、野生型 KLF4 と比較して、Nanog-GFP 陽性の細胞コロニーの形成率が低下していたが、ある変異体（19 番）では、野生型 KLF4 を超える Nanog-GFP 陽性の細胞コロニーの形成率を示していた（図 2）。

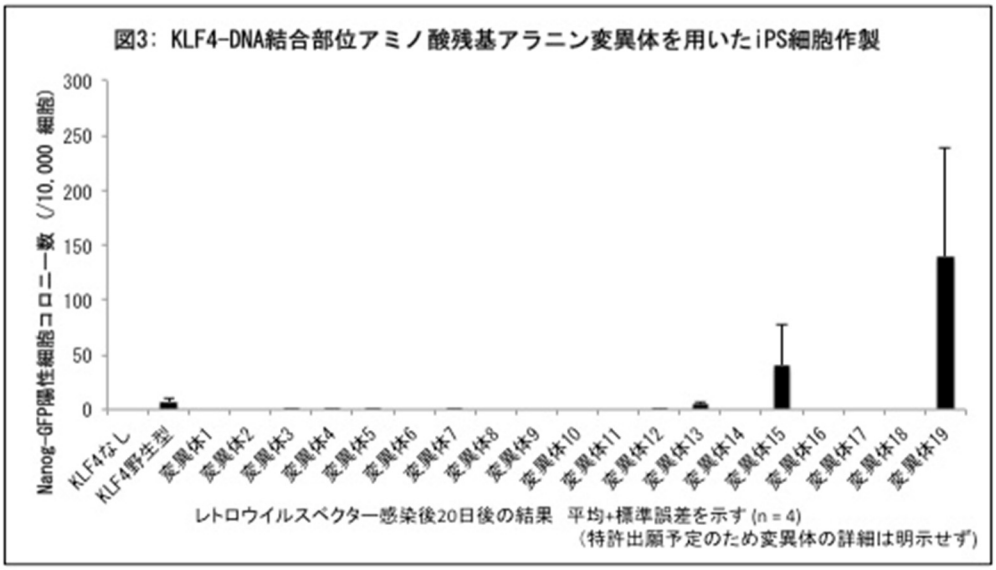


図 2. KLF4-DNA 結合部位アミノ酸残機アラニン変異体を用いた iPS 細胞作製

考　察

以上の結果は、本研究計画の妥当性を示唆するものである。今後、OCT4、SOX2 についても同様の実験を行ない、どのアミノ酸残基がリプログラミング因子としての分子基盤として重要なのかを評価する。さらに、野生型より強いリプログラミング能を持つ変異体を探索する。本研究計画のリスクとしては、強いリプログラミング能を持つ変異体が得られない可能性が特に予想される。その場合でも変異体の解析から分子基盤として重要な知見は得られるが、さらにバイオインフォマティクス解析によって、複合体がエネルギー的により安定することが予想されるアラニン以外の変異体を網羅的に探索することを検討する。

本研究計画は、細胞のリプログラミングという現象に対して、タンパク質-DNA の複合体の立体構造解析、精製した組換えタンパク質の生物物理ならびに生化学的解析、そして iPS 細胞作製という幹細胞生物学解析、という多角的なアプローチを行うものである。このように分野横断的に幅広い知識と手法を総合して研究を進める点が、従来の幹細胞生物学分野にはなかった大きな特色であり、独創的な点である。本研究により、リプログラミング因子の分子基盤について知見が得られ、野生型よりも強いリプログラミング能をもつ変異体の開発につなげられるものと考えている。プログラミングや分化の中心的役割を担うタンパク質である転写因子は様々な下流遺伝子の発現を制御する「マスター遺伝子」であるため、その基本的な分子基盤を十分に解明することにより、生命科学全体の大きな進歩を期待できる。さらに、従来野生型転写因子の利用にとどまっていたリプログラミング技術において、さらに効果の高い「改良リプログラミング因子」を作製する意義は iPS 細胞研究だけにはとどまらず、より一般的なリプログラミングを利用した再生医療や転写因子を利用した遺伝子治療の研究にまで及び、今後の幅広いバイオメディカル分野での発展に大きく寄与することが期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究者である筑波大学医学医療系遺伝子制御学研究室の久武幸司教授、福田綾准教授、西村健准教授、また、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の湯本史明准教授に大変お世話になりました。また、実際の実験の遂行にあたっては筑波大学大学院人間総合研究科博士課程の Evgeniia Borisova さんに大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Matsumoto Y, Hayashi Y, Schlieve CR, Ikeya M, Kim H, Nguyen TD, Sami S, Baba S, Barruet E, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Yamanaka S, Conklin BR, Toguchida J, Hsiao EC. Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. Orphanet J Rare Dis. 2013 Dec 9;8:190. doi: 10.1186/1750-1172-8-190. PMID: 24321451

2) Bershteyn M, Hayashi Y, Desachy G, Hsiao EC, Sami S, Tsang KM, Weiss LA, Kriegstein AR, Yamanaka S, Wynshaw-Boris A. Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2014 Mar 6;507(7490):99-103. doi: 10.1038/nature12923. Epub 2014 Jan 12. PMID: 24413397

3) Hayashi Y, Hsiao EC, Sami S, Lancero M, Schlieve CR, Nguyen T, Yano K, Nagahashi A, Ikeya M, Matsumoto Y, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K, Tomoda K, Asaka I, Toguchida J, Conklin BR, Yamanaka S. BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A-dependent senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 15;113(46):13057-13062. Epub 2016 Oct 28.PMID: 27794120

4) Hayashi Y, Caboni L, Das D, Yumoto F, Clayton T, Deller MC, Nguyen P, Farr CL, Chiu HJ, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Tomoda K, Conklin BR, Wilson IA, Yamanaka S, Fletterick RJ. Structure-based discovery of NANOG variant with enhanced properties to promote self-renewal and reprogramming of pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 14;112(15):4666-71. doi: 10.1073/pnas.1502855112. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25825768