

## 肝細胞特異的転写因子 HNF4- $\alpha$ の活性向上を目指した変異体作製

工学部 生命医療工学科 二見 翠、 岩田 哲也 (二見研究室)

**Keywords:** 肝細胞 再生医療 細胞機能制御

### 1. 研究目的

肝臓の臓器移植にはドナー不足の問題があり、現在代替治療法が模索されている。その一手段として正常な肝細胞を体外培養により増やし、移植することで肝臓臓器を再生させる方法が考えられるが、体外培養における機能低下が大きな問題がある。そこで、本研究室では体外培養中の肝細胞の機能向上を狙い、肝機能の中樞を担う転写因子HNF4- $\alpha$ をカチオン化タンパク質導入技術により肝細胞に導入し、活性化させる技術に取り組んでいる。化学修飾によりカチオン化したHNF4- $\alpha$ は培地に添加するだけで細胞内に導入され、活性を發揮するが、更なる導入効果の向上が必要な状況である。HNF4- $\alpha$ は細胞内の天然のタンパク質であり、細胞内の仕組みによってその活性が制御される。HNF4- $\alpha$ が不活性化される仕組みを防ぐ工夫は、HNF4- $\alpha$ の導入効果を向上させる可能性がある。本研究では遺伝子工学によりHNF4- $\alpha$ の不活性化び関連するアミノ酸に変異を入れることで、導入効果が高いHNF4- $\alpha$ を作成し、その効果を検証した。

### 2. 方法

HNF4- $\alpha$ の458番目のアミノ酸であるリジン残基は、アセチル化されることでHNF4- $\alpha$ のDNA結合能が低下し、HNF4- $\alpha$ の転写活性が阻害される。そこで458番目のリジンを、正の電荷は維持したままアセチル化修飾を受けないアルギニンに変えた、HNF4- $\alpha$ -K458R変異体遺伝子を作成した。また304番目のセリン残基は、リン酸化されることでその負の電荷が2量体形成を阻害し転写活性が下がる。そこで304番目を、リン酸化修飾を受けないアラニンに変化させた、HNF4- $\alpha$ -S304A変異体遺伝子も作成した。HNF4- $\alpha$ -K458R、HNF4- $\alpha$ -S304A変異体をそれぞれ大腸菌により発現させ、細胞導入能を付与するためのカチオン化化学修飾を行った。

### 3. 結果および考察

大腸菌により生産させたHNF4- $\alpha$ 両変異体は不溶性で不活性なインクルージョンボディとして得られた。これら変異体タンパク質を水溶媒に可溶性にするため、そして細胞内に入り込む能力を付加するために、変性剤中で化学修飾により可逆的にカチオン化し、変性剤を除去した。その結果、両変異体共に変性剤を含まない水溶媒への溶解度が向上した。今後、HNF4- $\alpha$ 両変異体の発現ベクターを動物細胞に導入し、天然のHNF4- $\alpha$ に対して活性がどのように変化するのか検証すると共に、カチオン化HNF4- $\alpha$ 変異体の細胞導入効果も評価していく。