

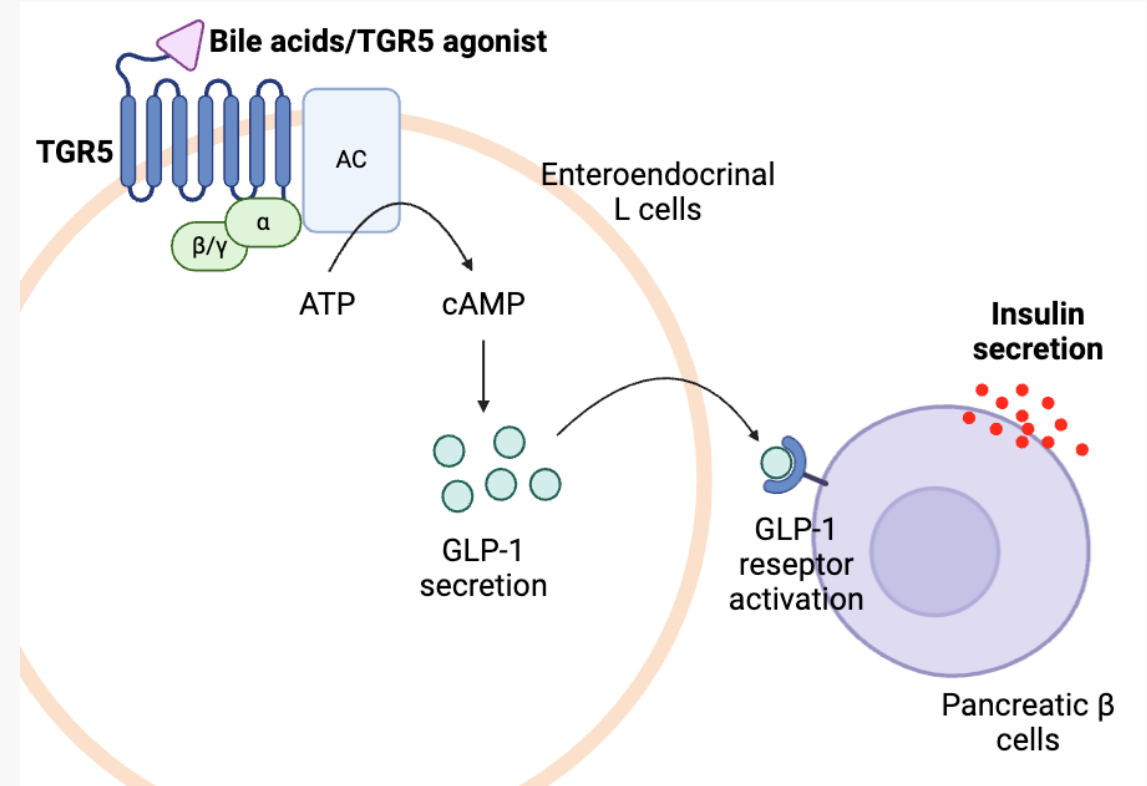
## 研究内容について

### 背景

- TGR5は肝臓、褐色脂肪細胞、骨格筋などで発現している胆汁酸受容体
- 腸管L細胞で、TGR5はTGR5アゴニストによってGLP-1分泌を亢進する
- 膵β細胞におけるインスリン分泌を促進し、抗肥満, 血糖降下作用をもたらす



糖尿病治療に有益



目的：TGR5に結合して活性化する作用を持つ生理活性ペプチドの探索

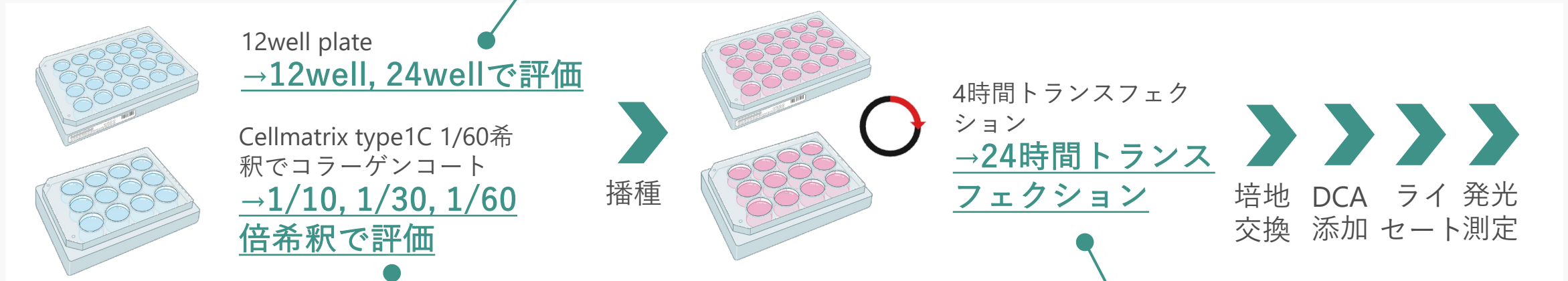
## 1. TGR5活性評価系の改善

## 2. TGR5アゴニスト類似ペプチドの探索

## 評価系改善実験の方法

## 3条件を変えて実験

- 12wellだとプレート1枚あたりで評価できるペプチドの種類が少ない
- 24wellでも同様の結果が得られるか調査



- トランスフェクション後の細胞が剥がれ、結果にばらつきが生じる
- コラーゲン濃度を高めることで細胞の剥がれを防げないか調査

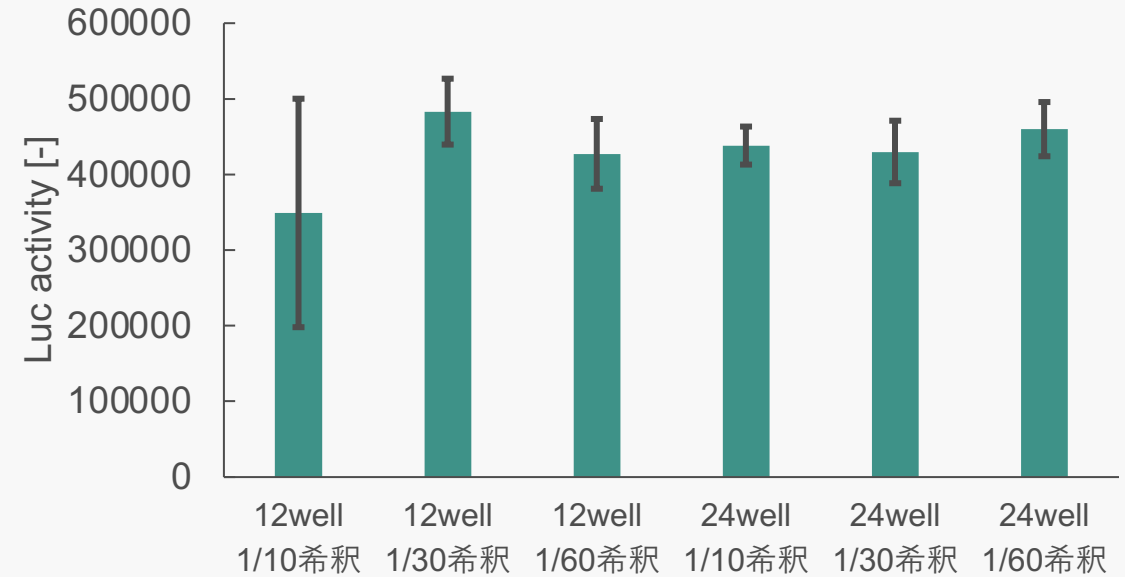
- 1日にやる操作の量が多くなる
- 24時間でも同様の結果が得られないか調査

## 評価系改善実験の結果

### コラーゲン濃度、24wellに関して

- 12well, 1/10希釈で細胞が7割型剥がれた
  - Luc activityの誤差も大きくなっている
  - コラーゲンがゲル化してしまった？
- 他のwellでは細胞の剥がれはほとんど見られなかった
  - 手技の向上によるもの
  - 12well, 1/60希釈では3割程度剥がれているものもあった
    - 24wellの方が培地の流れが起きにくく剥がれにくい？
- 24wellでも12wellと同様にTGR5活性を評価できた

➡ 1/60希釈、24wellを使うようにする



各wellプレート、コラーゲン濃度でのLuc activity

各トランスフェクション時間におけるDCA添加時のLuc activity

- Luc activityが低下した
  - 4時間のトランスフェクションと比べて2~3倍小さくなっている
  - 長時間のトランスフェクションにより発現量が低下？

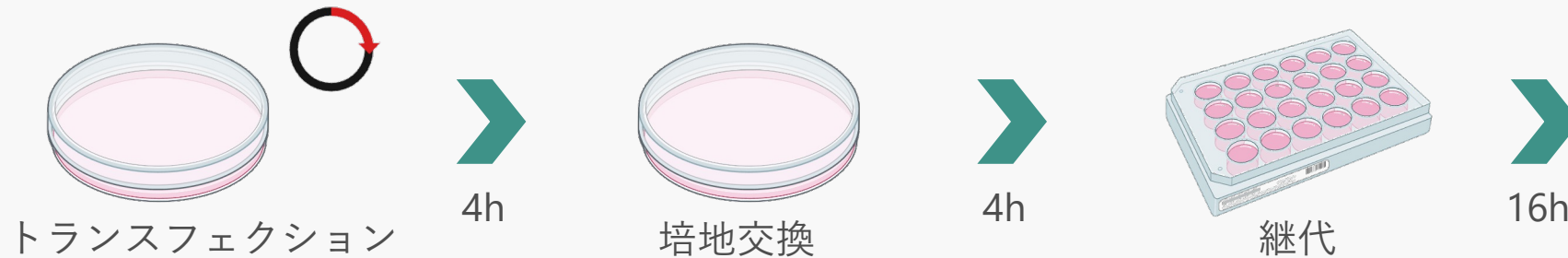
➡ トランスフェクションは4時間にする

	Luc activity [-]
24hトランスフェクション + 24h	427270
4時間トランスフェクション(前回) + 20h	1383982
4時間トランスフェクション(清水) + 20h	1036587

## 今後の検討事項

### ● トランスフェクションの方法

- 清中研のプロトコルを参考
- wellプレートに撒くのではなく、dishに撒く方法
- wellごとの細胞数のばらつきをなくすることができる



### ● DCA添加後の5時間待ち

- 実験開始時間が遅くなると、その日に実験を完了できなくなる可能性
- 1, 2, 3, 5時間で結果が変わるのか検討する

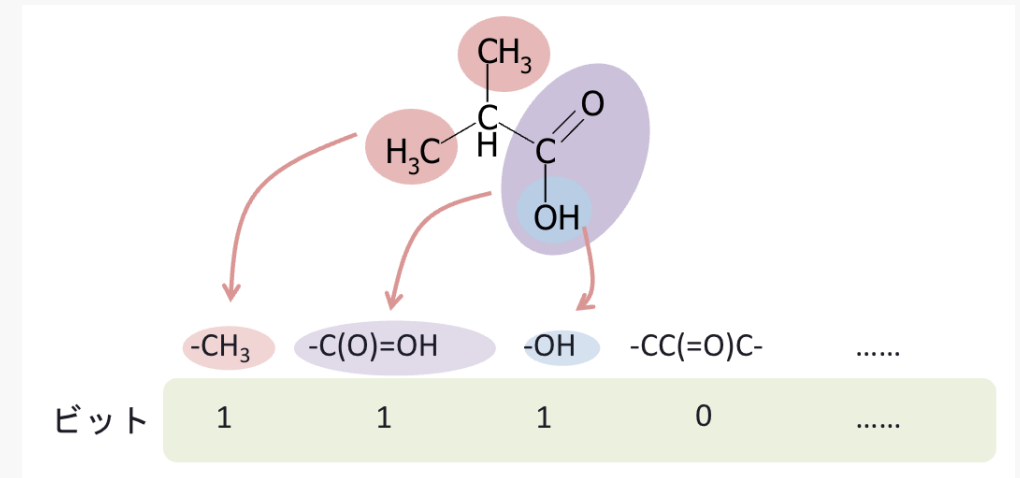
1. TGR5活性評価系の改善

2. TGR5アゴニスト類似ペプチドの探索

# フィンガープリントについて

## フィンガープリント：化学構造の特徴ベクトル表現

- 化合物の構造の中で特徴的な部分構造を構造フラグメントとしてあらかじめ定義
- 注目している化合物が、各フラグメントを持つか持たないかの情報をビット(0か1か)として羅列



## Tanimoto係数：フィンガープリントに基づく類似度評価法

$$T(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

$|A \cap B|$  : AとBで共通する特徴の数

$|A \cup B|$  : AとBのいずれかに含まれる特徴の数

例：

分子A:	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
分子B:	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1

$$T(A, B) = \frac{5}{8 + 6 - 5} = 0.56$$

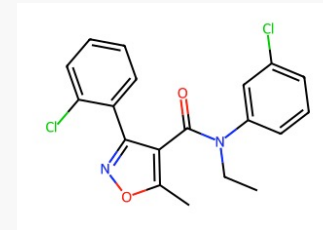
# 類似度評価の結果

## MACCS Keysを用いた類似度の計算

- MACCS Keysは官能基など、166個の部分構造を評価するフィンガープリント
- TGR5の低分子アゴニストの3-アリール-4-イソオキサゾールカルボキサミドと比較
- 3残基のペプチド全8000個の類似度を評価

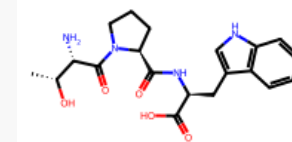
## 結果

- 1番類似度の高いものでも0.443と、数值的に構造の類似度は高いとは言えない
- 見た目的にも似ていない構造のように思える

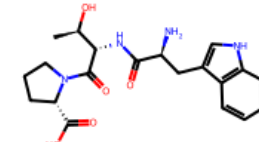


ターゲット：  
3-アリール-4-イソオキサゾールカルボキサミド

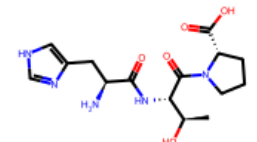
類似度が高かった上位9つのペプチド



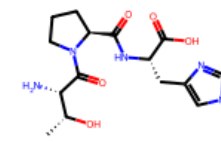
1. TPW  
類似度：0.443



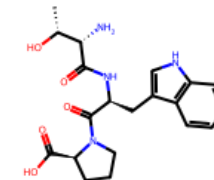
2. WTP  
類似度：0.443



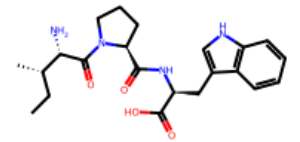
3. HTP  
類似度：0.435



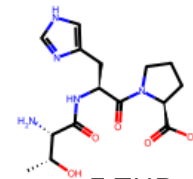
4. TPH  
類似度：0.435



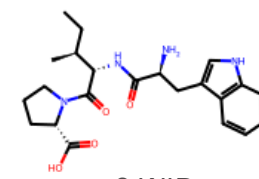
5. TWP  
類似度：0.431



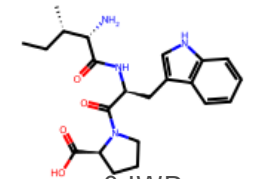
6. IPW  
類似度：0.423



7. THP  
類似度：0.423



8. WIP  
類似度：0.423



9. IWP  
類似度：0.417



# 類似度評価の考察






## 考察

- **フィンガープリントの手法に関して**
  - 今回使ったMACCS Keysは官能基などの166個の部分構造を評価するフィンガープリント
  - TGR5のアゴニストとの類似を示すのであれば、電気陰性度の大小、水素結合を形成できるかなどが評価軸として有用なのではないか？
  - 他のフィンガープリントの手法について調べる
- **TGR5アゴニストに関して**
  - 3-アリアル-4-イソオキサゾールカルボキサミドがペプチドと類似しにくい？
    - イソオキサゾール部分の類似構造がペプチドでうまく表現できないのではないか
  - その他の低分子アゴニストについて調べる

## 今後の予定

- **情報学研究科の山西先生に相談する**
  - どのフィンガープリントを使用すべきか
  - そもそも今回の類似度の評価法としてフィンガープリントは適切か

## 短期予定

	～6/7	6/10～6/14	6/17～6/21
トランスフェクション方法の検討			
DCA添加後の時間の検討			
自動合成した5配列について評価			
細胞ストックの作成			
類似度評価方法の検討			

## 長期予定

- 類似度評価ができれば、上位のペプチドを合成して評価する
- 胆汁酸結合ペプチドの短残基化