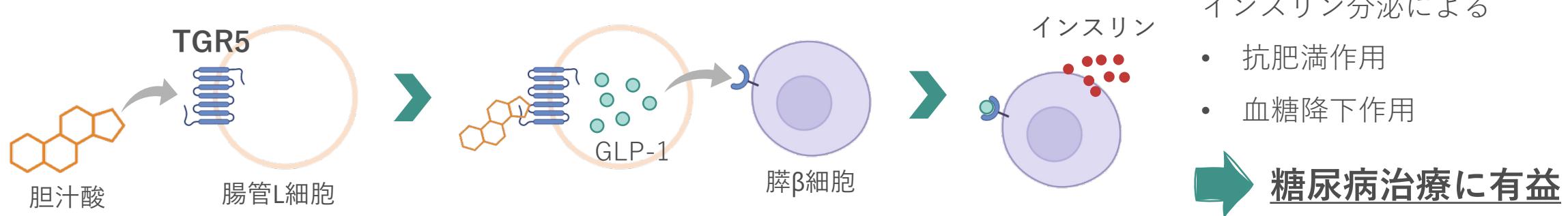


# Lucレポーター遺伝子発現系を 使ったTGR5アゴニストペプチド の探索

B4 中村 優作

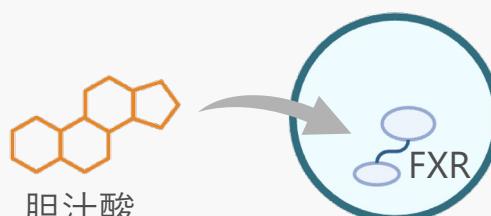
名古屋大学 生命分子工学専攻 本多研究室

## TGR5：小腸、胃、肝臓などで発現している胆汁酸受容体

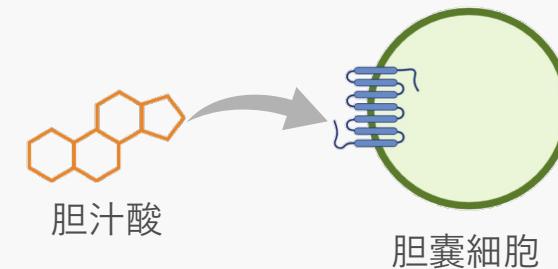


[Hyeonhui Kim, Sungsoon Fang, Lab Anim Res, 2018]

### 胆汁酸の問題点



#### 潜在的な副作用



TGR5以外の胆汁酸受容体に影響を与える

腸管L細胞以外に発現しているTGR5に影響

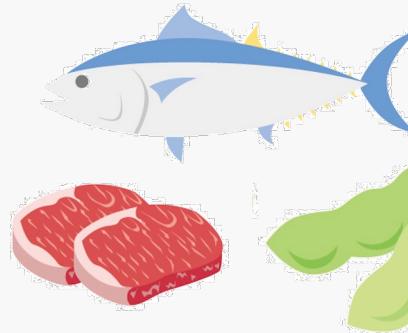
TGR5に特異的に結合するアゴニストが必要

## 複数のDCA結合ペプチドがTGR5を活性化

- PRPRQP以外の4種類のペプチドでTGR5活性
- QRPRGS, QSKSRR, QLSRRAがDCAと相加効果

➡ TGR5アゴニストとして作用するペプチドが存在

## TGR5アゴニストペプチドの機能性表示食品への応用



加水分解



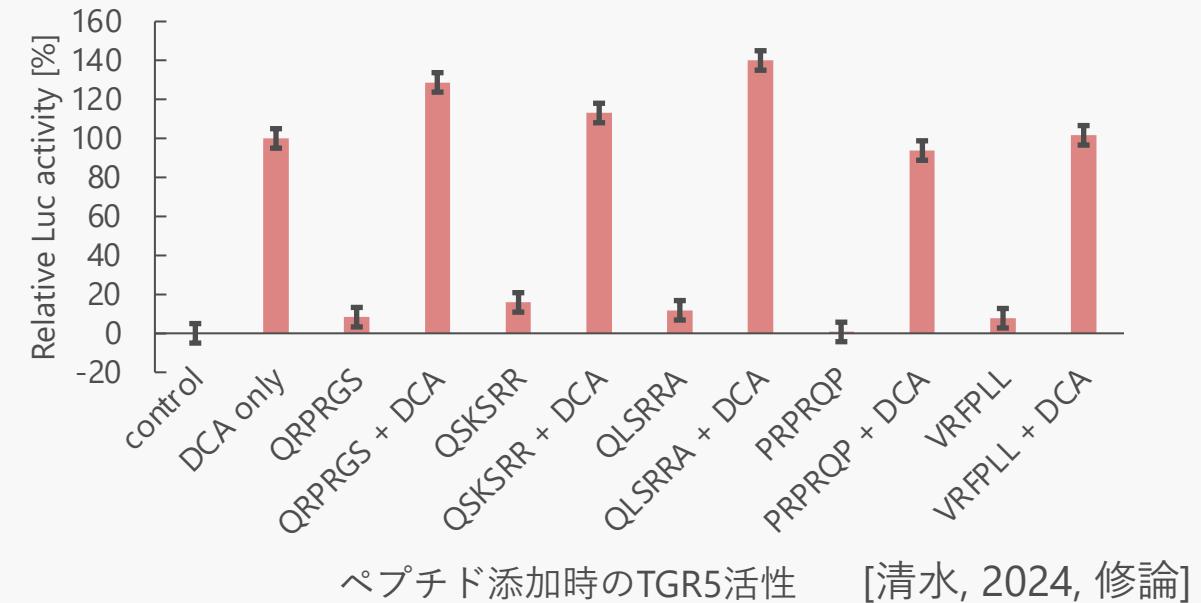
加水分解物

分取

生理活性ペプチド

機能性表示食品への  
応用が期待

- 抗肥満
- 血糖降下



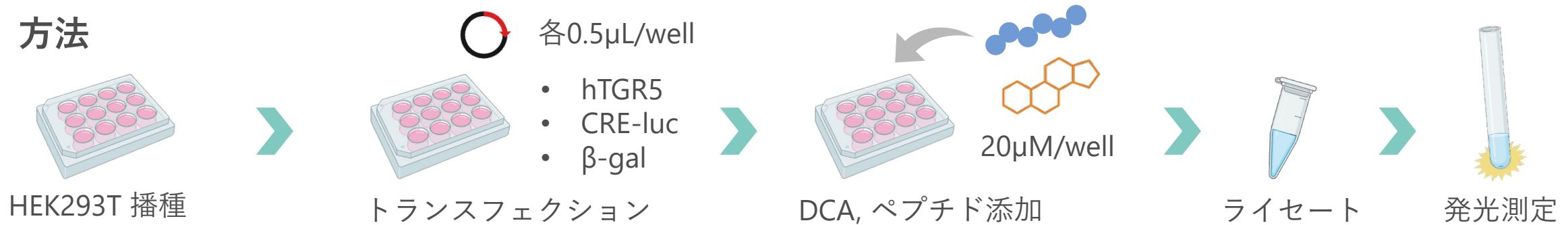
[清水, 2024, 修論]

## 目的：TGR5に結合して活性化する作用をもつ生理活性ペプチドの探索



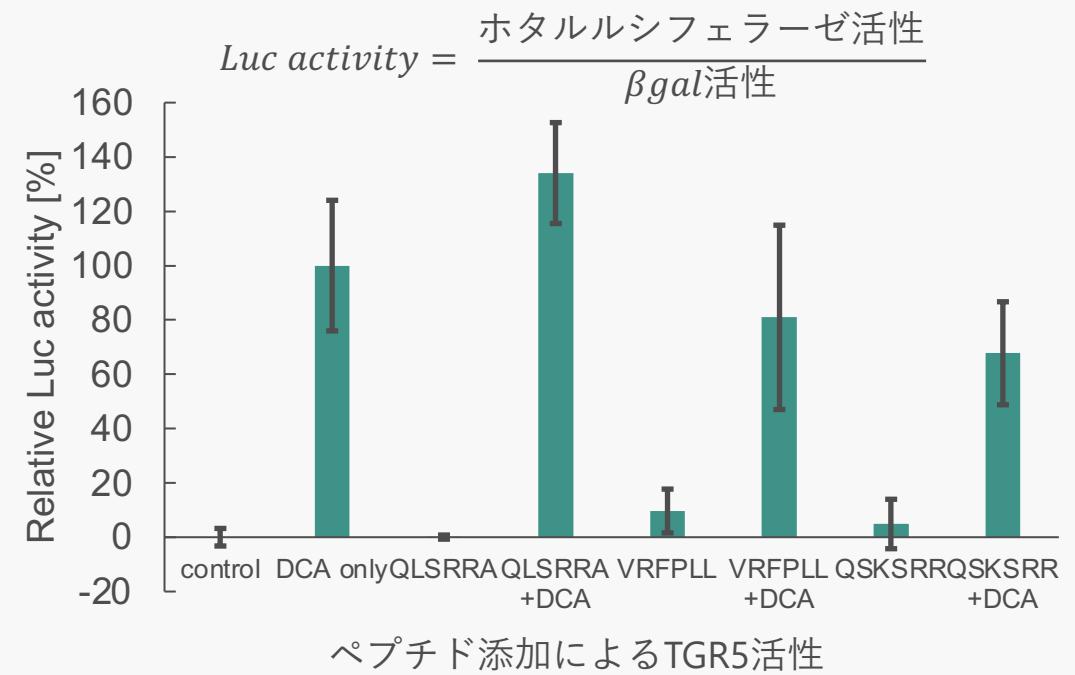
## 1. TGR5活性評価系の改善

2. TGR5アゴニスト類似ペプチドの探索



# 結果

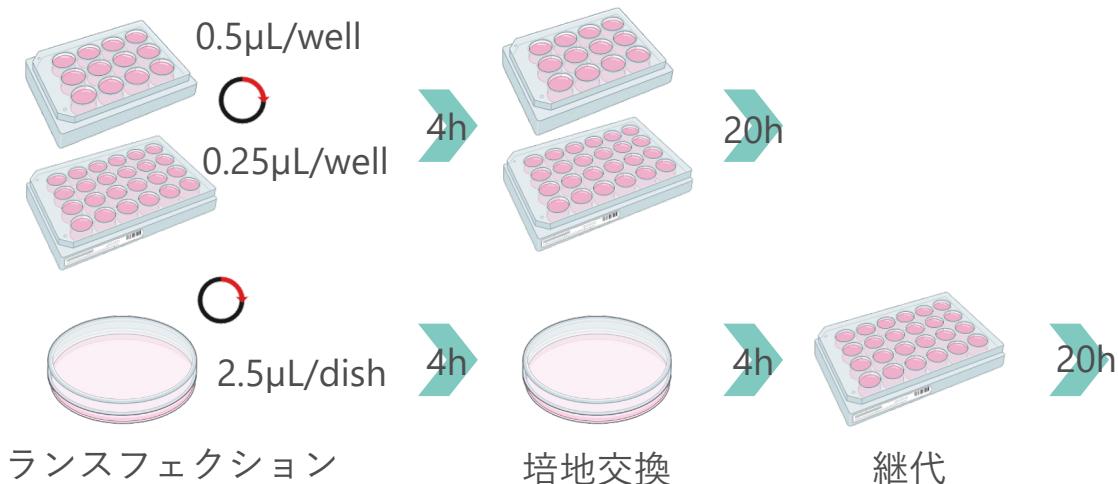
- 一部の再現は取れた
    - 先行研究で活性が一番高かった、QLSRRA+DCA共添加の系で高い活性
    - QLSRRA, VRFPLL, QSKSRRで活性が出るはずが、QLSRRAでは活性が出なかった
  - 細胞の剥がれに起因する誤差が大きかった
  - 実験操作に長い時間がかかってしまった



一部の再現は取れたが結果のばらつきが大きかった

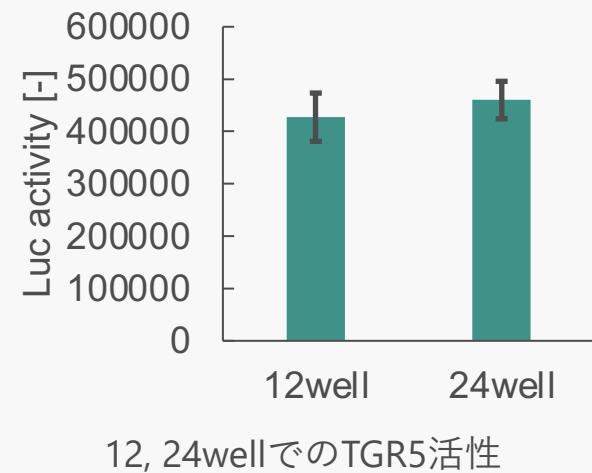
## 目的と方法

- 12wellから24wellにしてプレート1枚あたりで評価できるペプチドの種類を増やす
- トランスフェクション時に細胞の剥がれによる結果のばらつきを抑制する

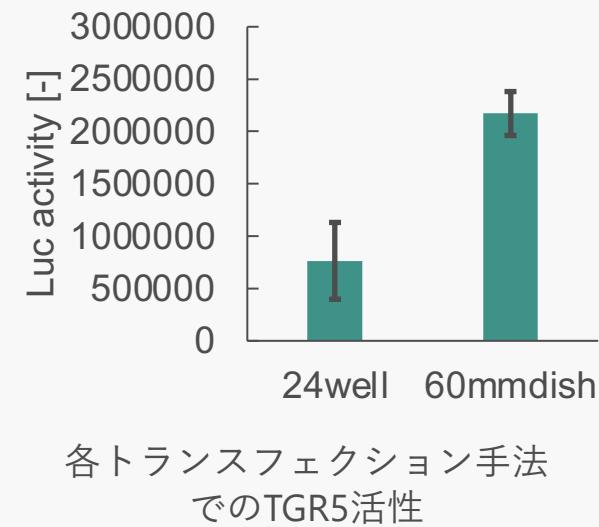


## 結果

- 24wellでも12wellと同様にTGR5活性を評価できた
- 24wellでと比べて60mmdishでのトランスフェクションはばらつきを抑制できた



12, 24wellでのTGR5活性



各トランスフェクション手法でのTGR5活性

60mmdishでのトランスフェクションを採用

## 目的と方法

- トランスフェクションが4時間だと1日にする実験の量が増える
- トランスフェクションを24時間にできないか検討

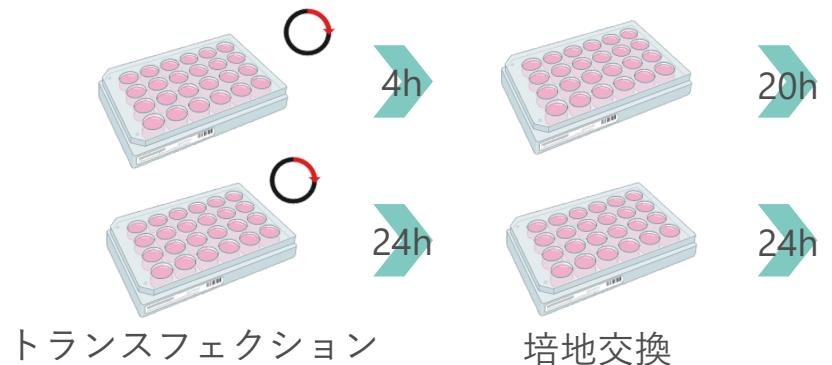
## 結果

- ルシフェラーゼの発現量はほとんど変わらない
- $\beta$ -galの発現量は24hで大きくなつた

$\beta$ -galはwellでの遺伝子の発現量を見るためのもので、  
 $\beta$ -gal活性が時間によって増えることに問題はない

$$Luc\ activity = \frac{\text{ホタルルシフェラーゼ活性}}{\beta gal\ 活性}$$

トランスフェクションは24hを採用

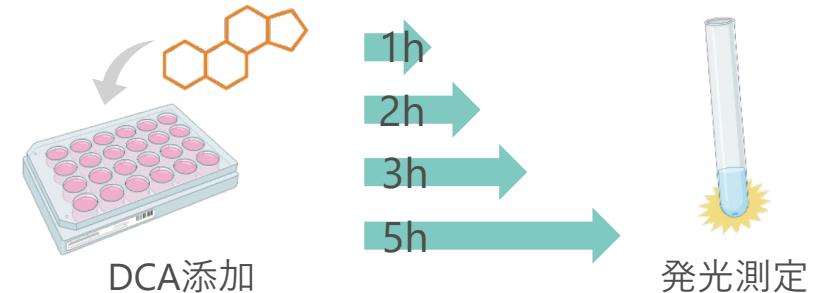


4h トランスフェクションでの活性		
	ルシフェラーゼ活性	$\beta$ -gal活性
N1	130885	0.134
N2	192369	0.185
N3	53250	0.085
平均	125501.3333	<b>0.134666667</b>

24h トランスフェクションでの活性		
	ルシフェラーゼ活性	$\beta$ -gal活性
N1	107097	0.222
N2	120166	0.251
N3	103814	0.248
平均	110359	<b>0.240333333</b>

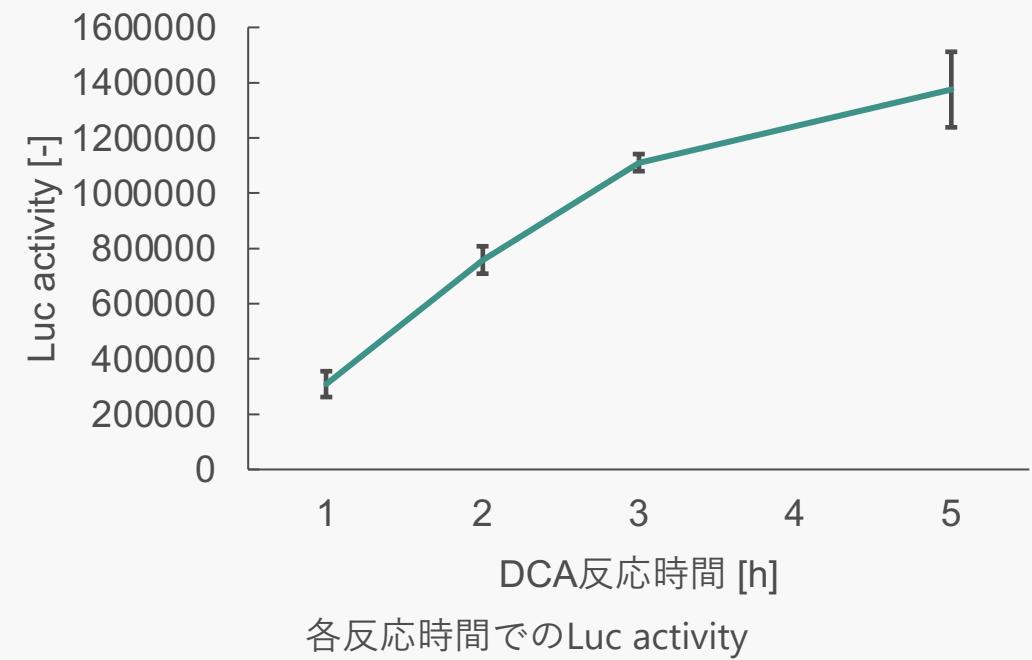
## 目的と方法

- 反応時間を短くして早く実験を終わらせるようにする
- DCA添加後1, 2, 3, 5h反応させ、それぞれについて発光測定



## 結果と考察

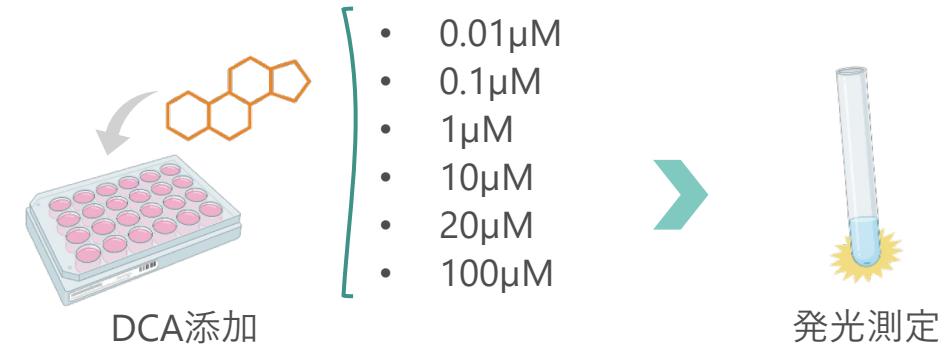
- 時間に依存してルシフェラーゼの発現量が増加した
  - ルシフェラーゼの発現量が上限に達している場合、ペプチドを共添加してもさらなる活性が望めない可能性がある
  - 2時間でDCAを添加しない場合と比べて、Luc activityには有意差がある



DCAの反応時間は2時間に決定

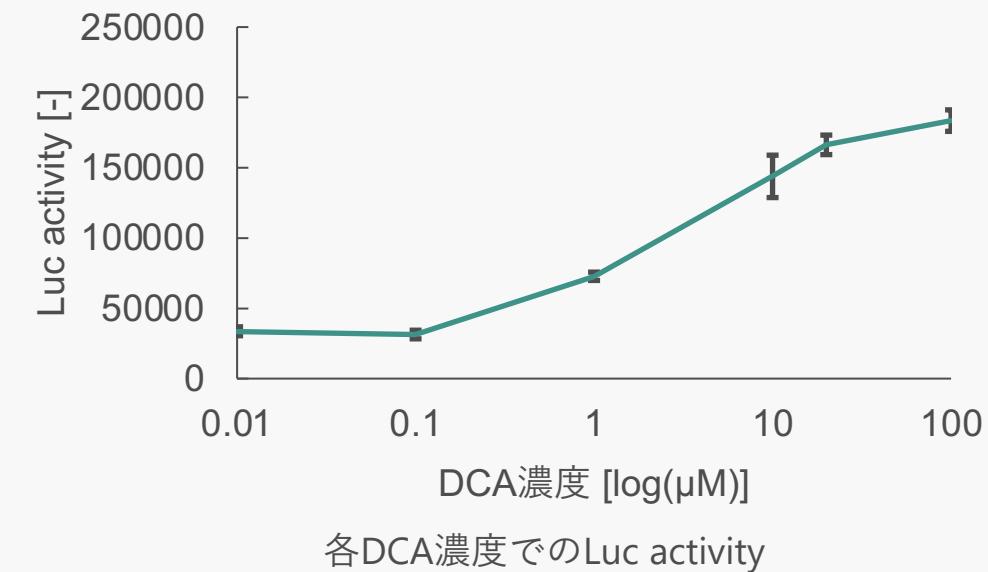
## 目的と方法

- 報告されているEC50は1.01μMであるのに対して、  
20μMと高い濃度で行っていた  
[Wangrui Jin, et al., EJMECH, 2024]
- 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 100μMでDCAを添加して比較

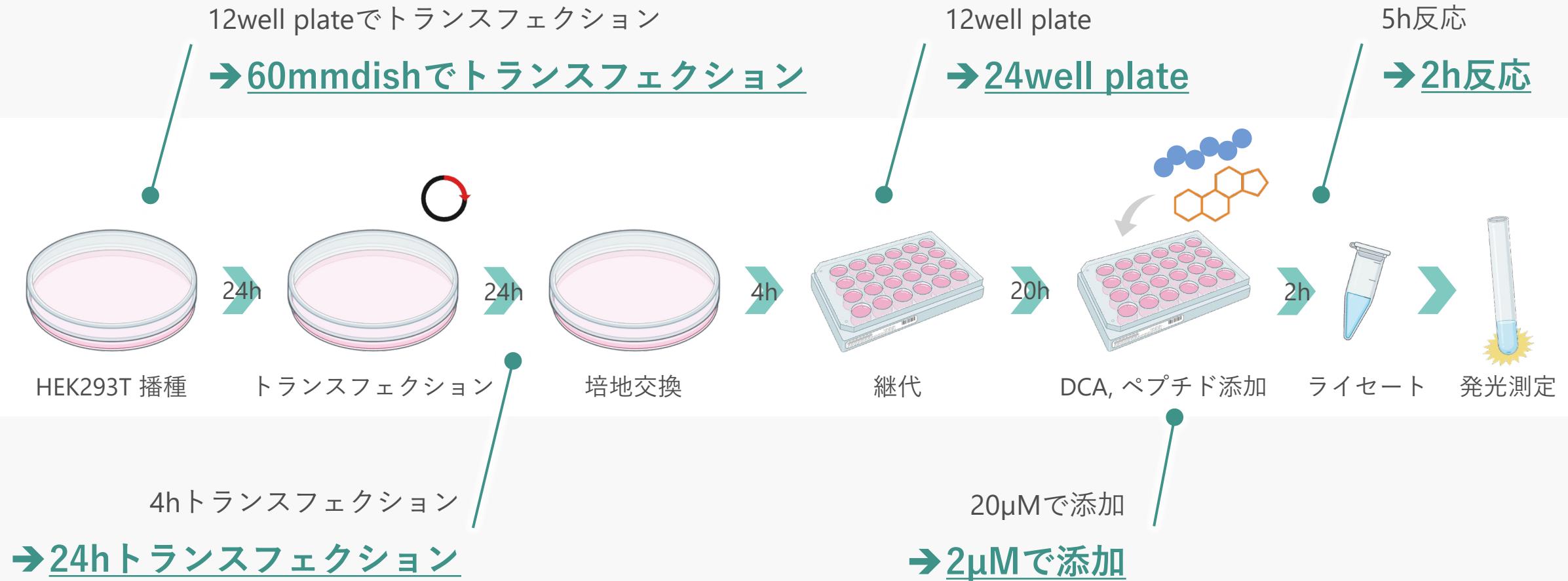


## 結果

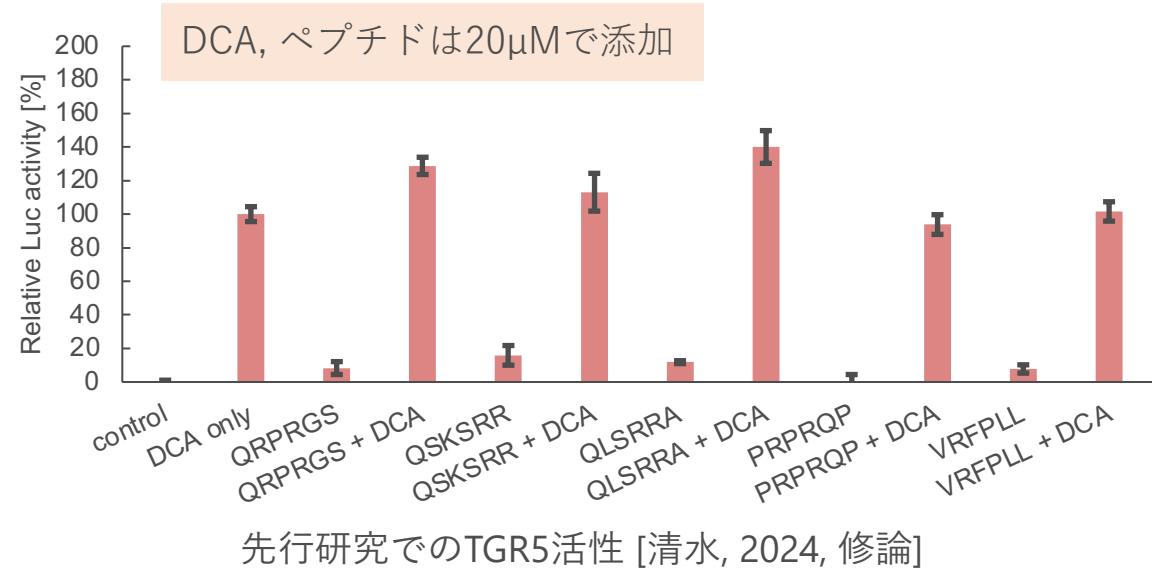
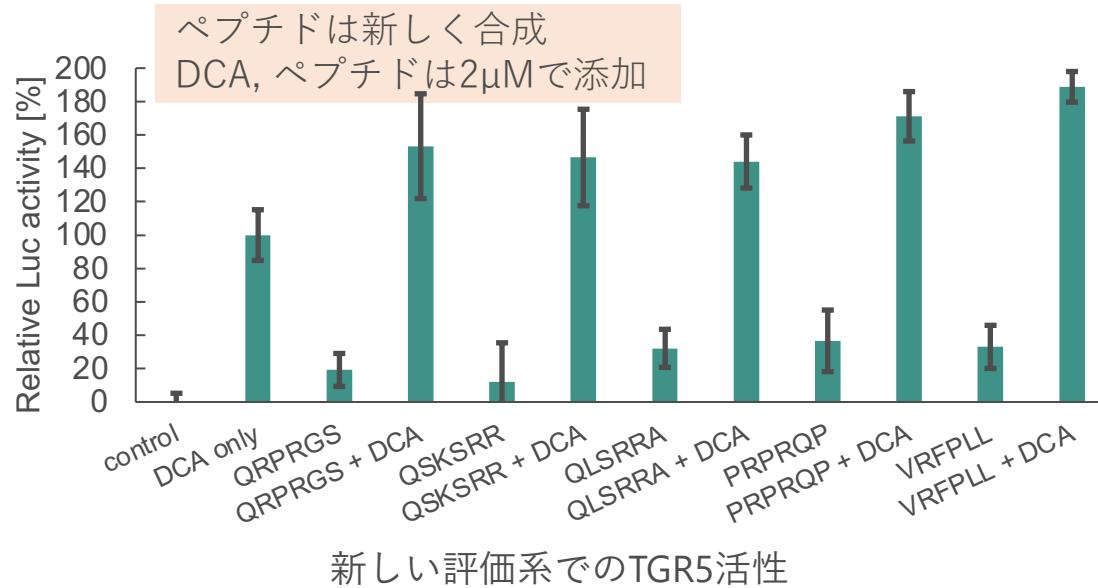
- 図からEC50は2μM程度と読み取れ、文献値と近い結果  
が得られた
- 20μMは上限に近い濃度であった
  - DCAとTGR5の反応が上限に達している場合、ペプチドを  
共添加してもさらなる活性が望めない可能性がある



DCAの濃度は2μMに決定



**評価系の改善が完了**



- 共添加した系で、先行研究よりも高い活性が得られた
  - DCAの濃度を減らしたことにより、ペプチドの反応の余地が生まれた
- どのペプチドでも活性が見られた
  - DCA結合ペプチド以外の、適当なペプチド配列で活性が出ないことを確認する必要がある
- 今回の実験では全体的に細胞の数が少なかったため、誤差が大きく出てしまった

新しい評価系でペプチドのTGR5活性を有位に評価できることを確認

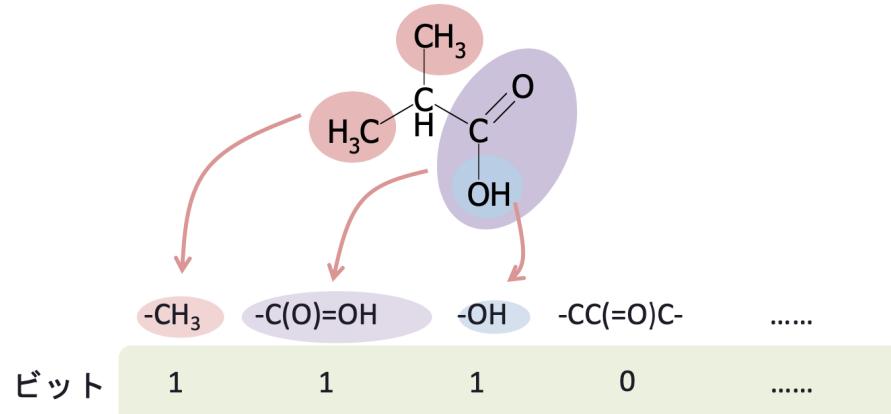
1. TGR5活性評価系の改善
2. TGR5アゴニスト類似ペプチドの探索

## 化学構造が類似の化合物は同じ作用を持つ傾向がある

フィンガープリントを用いて化合物同士の類似度を算出することができる

### 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

分子A: 

1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

例:

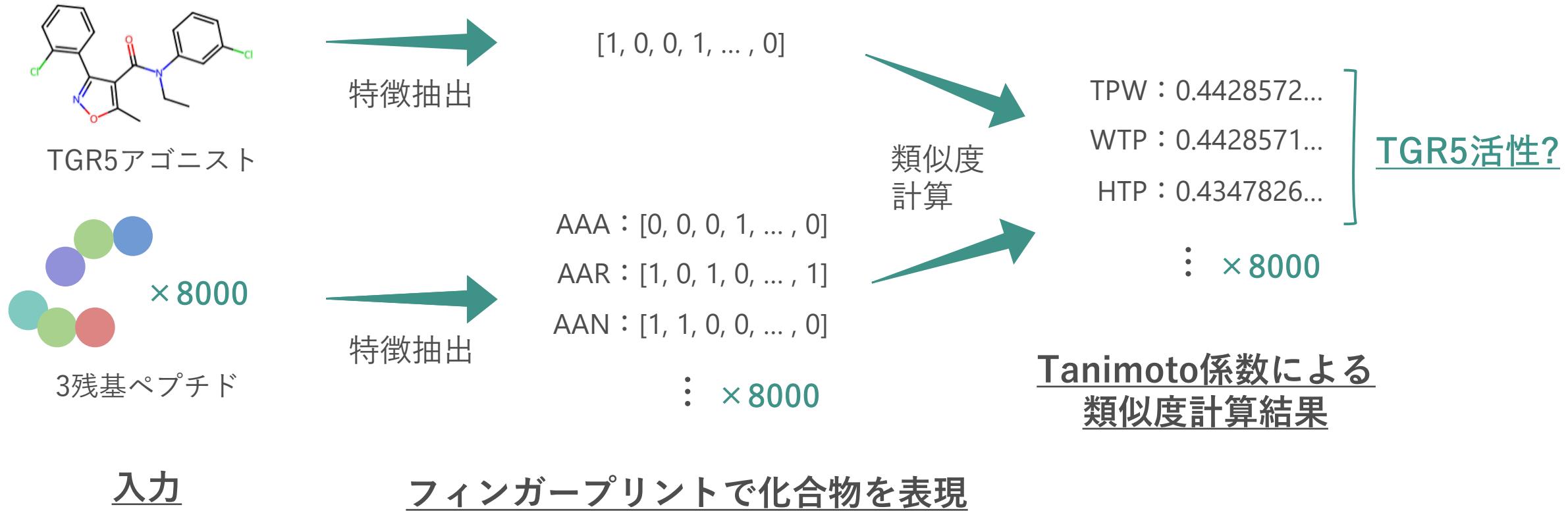
分子B: 

0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

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

仮説：TGR5アゴニストと構造類似しているペプチドはTGR5活性を持つ

## 方法

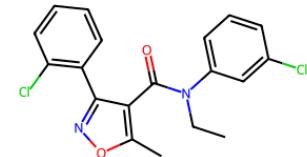


## MACCS\_Keys フィンガープリント

官能基などの、あらかじめ決められた166個の部分構造を評価するフィンガープリント

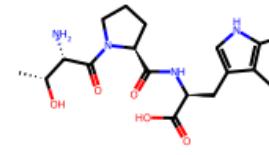
### 結果

- 上位のペプチドを見る限り、感覚的に似ている構造ではないように思える
- 166個の部分構造以外は評価できないため、MACCS-Keysは精度が高くない



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

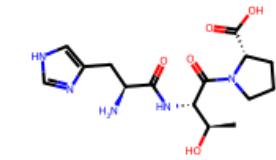
類似度が高かった上位3つのペプチド



TPW (0.443)



WTP (0.443)



HTP (0.435)

### 方針

- 化合物の特徴をより多く表現できる手法(**KCF-S**)を用いる
- 化学的性質を表現することができる手法(**ドナーアクセプターフィンガープリント**)を用いる

**KCF-S**

7つの属性を用いて部分構造を定義し、化合物の特徴を抽出する手法

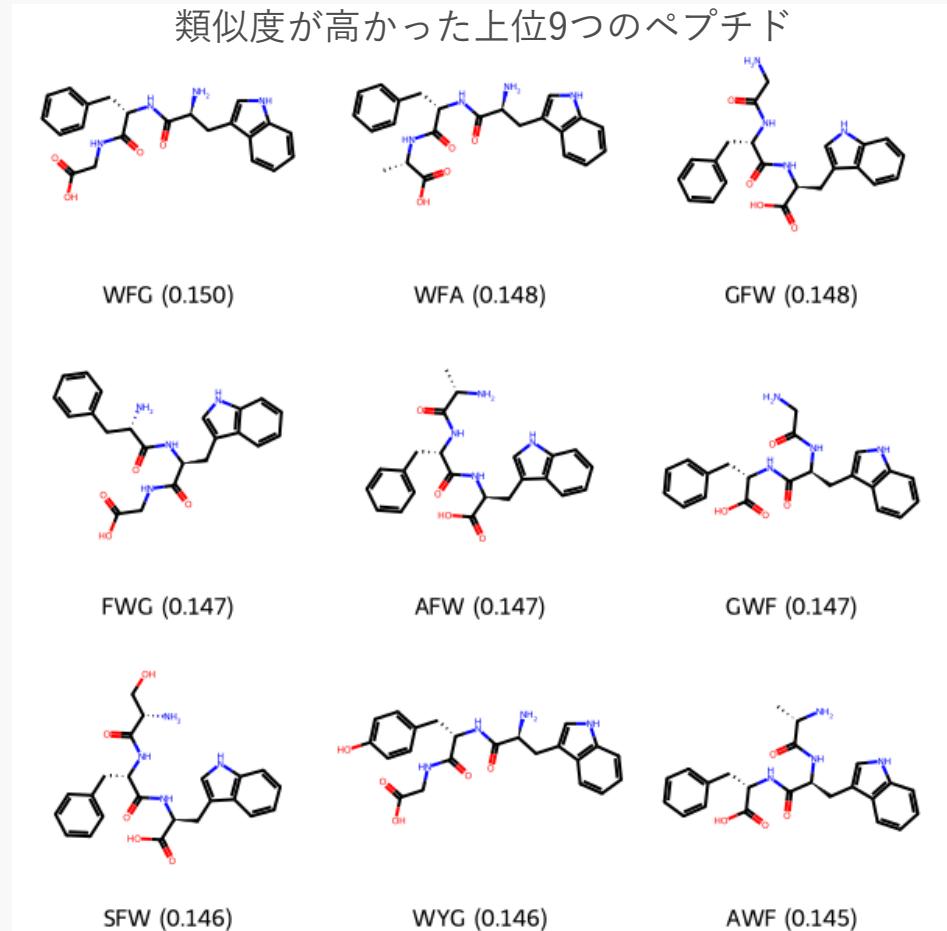
ATOM	分子グラフを形成するノードに対応。
BOND	分子内で化学結合を形成するATOMエントリーのペア
TRIPLET	3つのATOMが順次接続された中心ATOMを共有するBONDエントリーのペア
VICINITY	中心原子とそれに接続する原子 少なくとも3つのBONDエントリーと少なくとも4つのATOMエントリーから構成される
RING	3~12の環を含む環状部分構造
SKELETON	アルキル基やアリール基などの炭素骨格
INORGANIC	炭素原子以外の元素で構成される連結原子グループ

[Masaaki Kotera, et al., BMC Systems Biology, 2013]

MACCS\_Keysよりも詳細に構造の特徴を表現することが可能



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

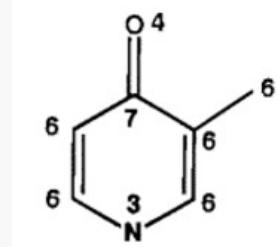


## ドナーアクセプターフィンガープリント

- 原子を7つの分類のいずれかに割り当て、原子ペアと連続した4つの原子の2つの形式で特徴を表す
- 化合物の化学的性質を表現することができる

1	陽イオン
2	陰イオン
3	中性水素結合供与体
4	中性水素結合受容体
5	極性原子
6	疎水性原子
7	その他

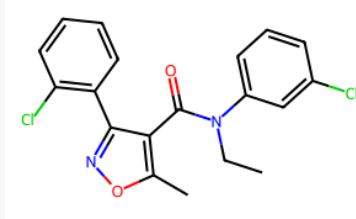
例



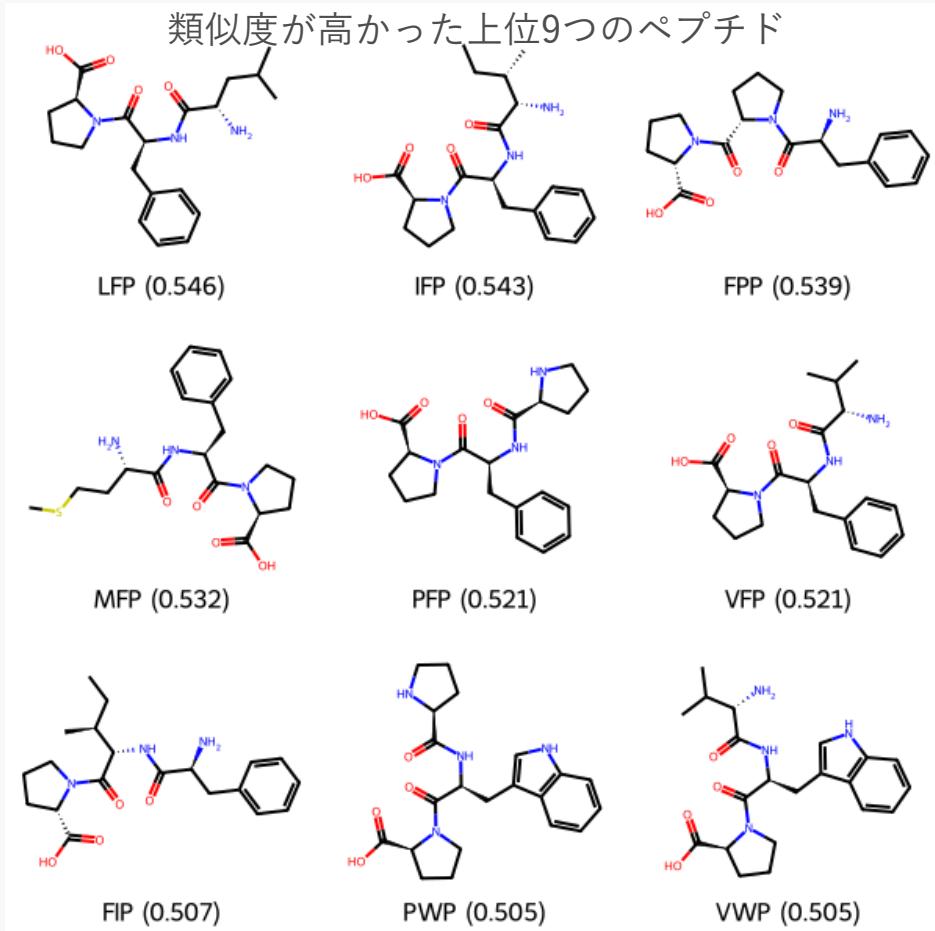
unique bt	frequency
1 4-7-6-6	3
2 6-6-7-6	3
3 3-6-6-7	2
4 6-3-6-6	2
5 3-6-6-6	1
11 total	

[Simon K. Kearsley, et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1996]

アゴニストの類似度を評価するのに適している



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



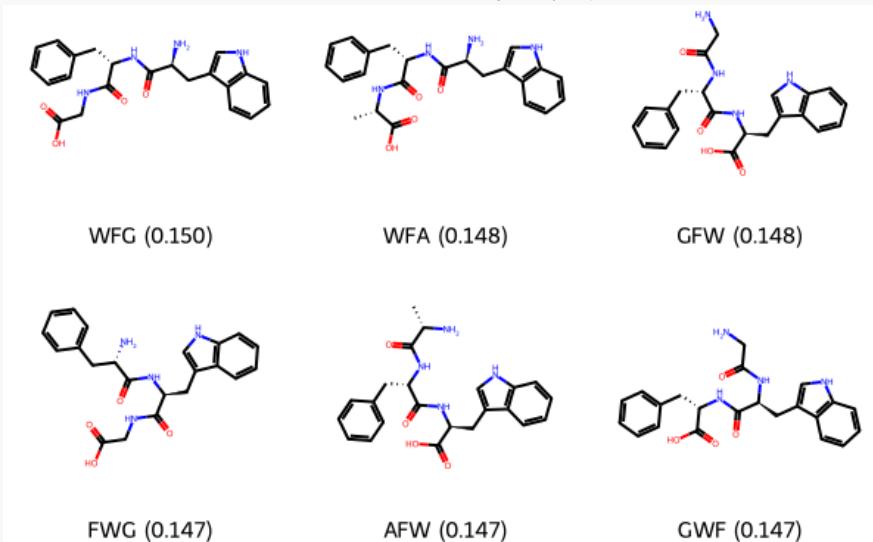
## 結果

KCF-Sでもドナーアクセプターフィンガープリントでも類似しているなそうな構造が得られた

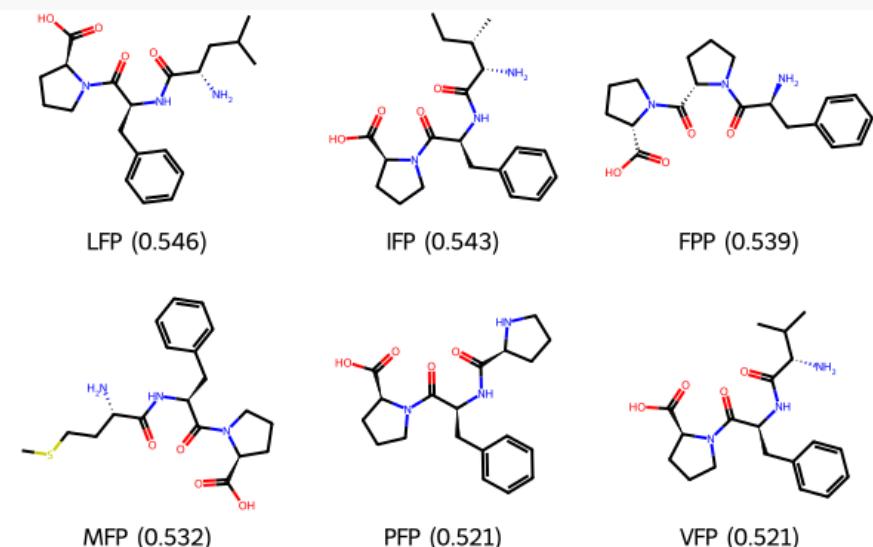
## 今後の方針

- KCF-S, ドナーアクセプターフィンガープリントそれぞれの上位の配列を合成し、活性が得られるかどうかを実験する
- 他のTGR5アゴニストとの類似度を比較した結果の配列についても実験する
- どの部分構造が類似度に寄与しているのか、データを詳しく見る

KCF-Sでの上位6配列



ドナーアクセプターフィンガープリントでの上位6配列



## 短期予定

- 適当な配列のペプチド合成
- 適当な配列でTGR5活性が出るかどうかの検証
- 3-アリール-4-イソオキサゾールカルボキサミド類似ペプチドの合成

## 長期予定

	7月	8月	9月
他のTGR5アゴニストとの類似度評価			
トリペプチドの合成			
トリペプチドのTGR5活性評価			