

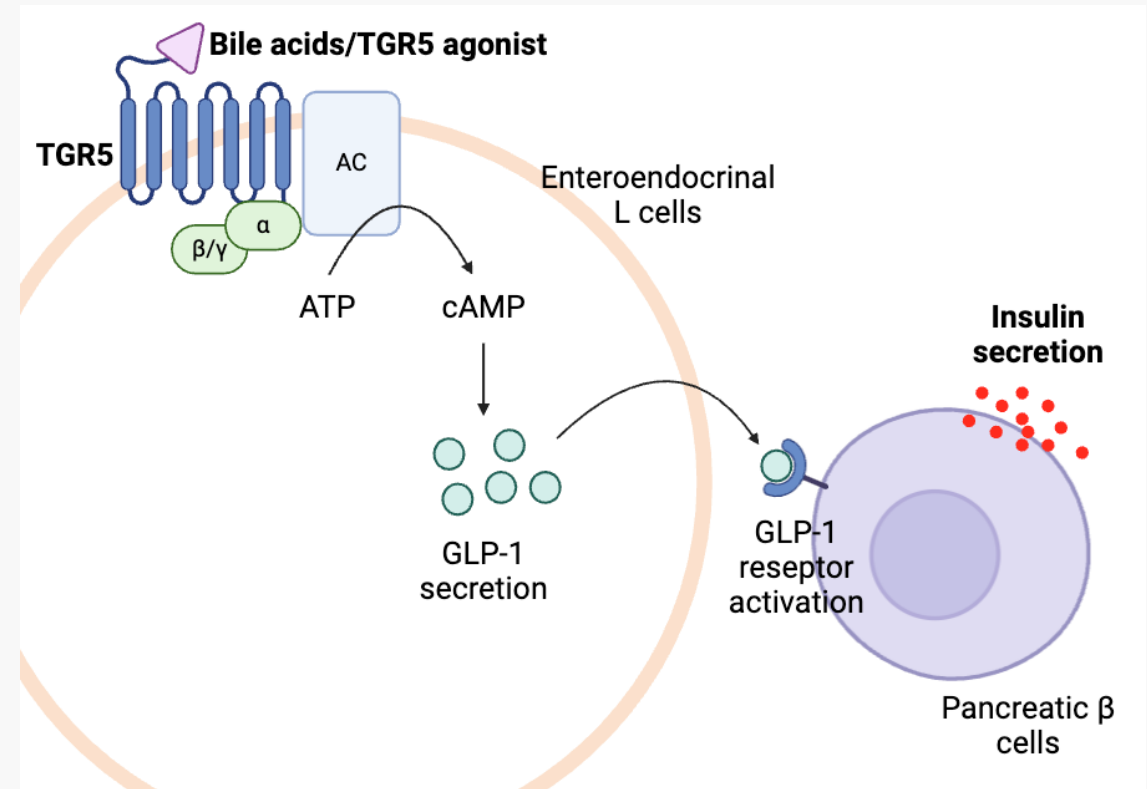
## 研究内容について

### 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
- GLP-1は膵 $\beta$ 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

## 可食性タンパク質の加水分解物に帰着させる

- 胆汁酸や報告されているTGR5アゴニストの分子サイズの的に、ペプチドアゴニストを探索する場合、3残基程度の配列が妥当
- 3残基程の配列であれば、大豆などの天然の食品に含まれるタンパク質のアミノ酸配列に、ペプチドアゴニストと同じ配列がある可能性が高い
- その配列を切り出すことで、天然由来の生理活性ペプチドを取得できる
- 糖尿病、肥満予防に効く機能性食品への応用が期待できる

## 1. TGR5活性評価系の改善

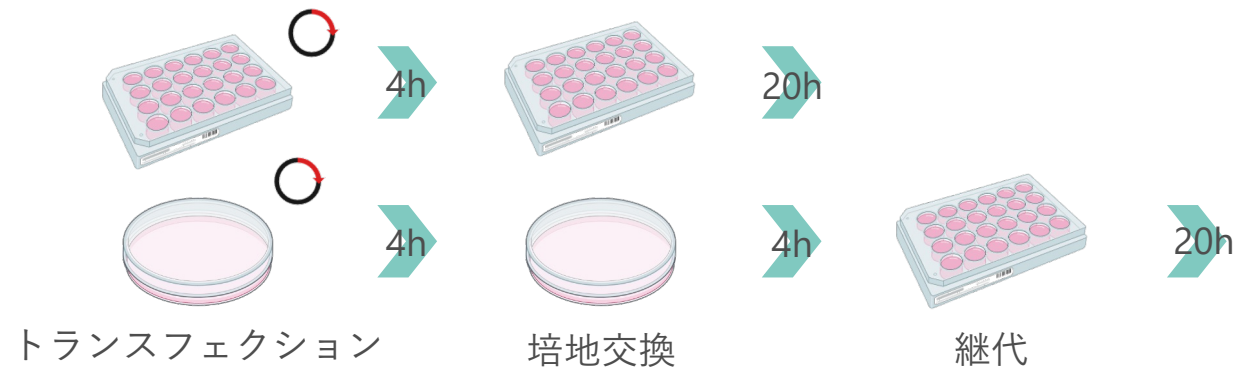
## 2. TGR5アゴニスト類似ペプチドの探索

# 評価系改善実験1：トランスフェクション手法の検討

4/10

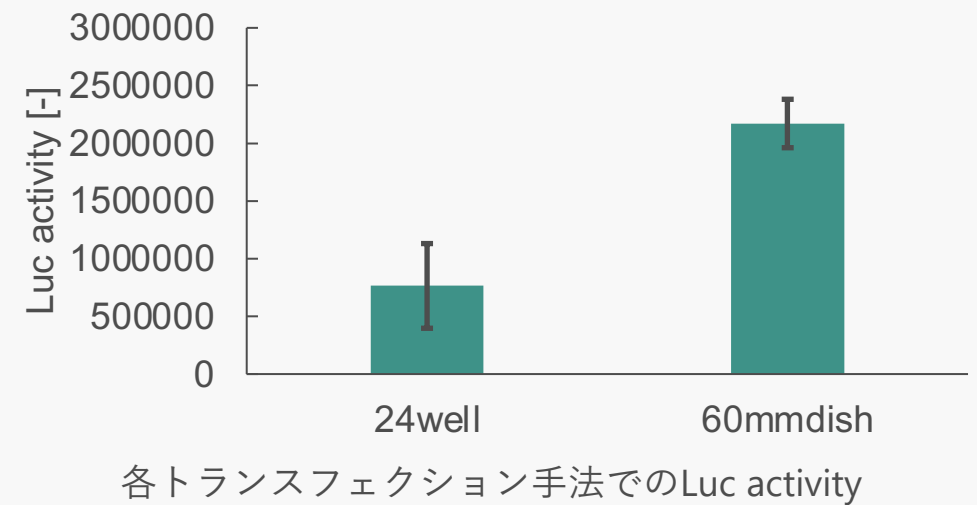
## 目的と方法

- 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
- 2つの手法を検討する



## 結果

- 24wellでのトランスフェクションでは細胞が剥がれてしまうwellがあった
- Luc activityの結果もwellの手法の方がばらつきが大きい
- 60mmdishで細胞のばらつきを抑制できた

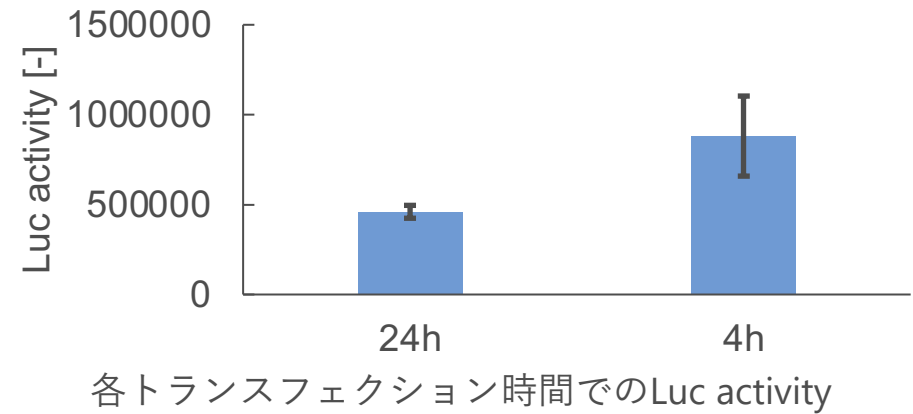


dishでのトランスフェクションを採用

## 前回の訂正：トランスフェクション時間に関して

### 前回の報告

- 24hトランスフェクションでLuc activityが低下した
  - 長時間のトランスフェクションによる発現量の低下
- トランスフェクションは4時間で行う



### データ比較の結果

- ルシフェラーゼの発現量に対して、 $\beta$ -galの発現量が24hで大きくなっている
  - このためLuc activityが大きくなっていた

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

- ルシフェラーゼの発現量に影響はない
- トランスフェクションは4hでも24hでもどちらでも良い

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	0.134666667

24hトランスフェクションでの活性

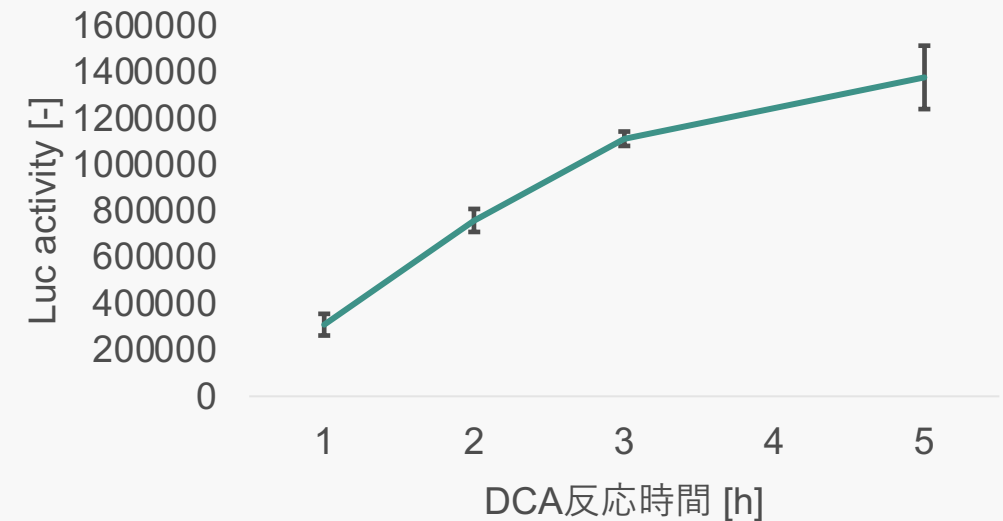
	ルシフェラーゼ活性	$\beta$ -gal活性
N1	107097	0.222
N2	120166	0.251
N3	103814	0.248
平均	110359	0.240333333

## 目的と方法

- 反応時間を短くして早く実験を終わらせれるようにする
- DCAを添加し、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
  - 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
  - 2時間でもDCAを添加しない場合と比べて、Luc activityには有意差がでるため、2時間で行う
- DCA濃度は20 $\mu$ Mで行っている
  - DCAのTGR5に対するEC50は1.01 $\mu$ Mと報告されており、高い濃度で行っている
  - DCA濃度に対する検討も行う



各反応時間でのLuc activity

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：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：

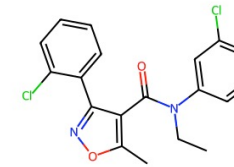
分子A:	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
分子B:	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1

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



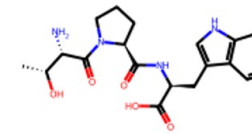
## 背景

- MACCS Keysを用いた類似度評価の結果、あまり類似していなそうな化合物が得られた
- 情報学研究科の山西先生にフィンガープリントの手法について相談

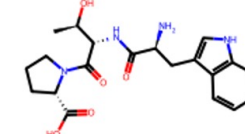


ターゲット：  
3-アリアル-4-イソオキサゾールカルボキサミド

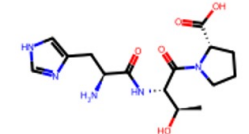
類似度が高かった上位3つのペプチド



1. TPW  
類似度：0.443



2. WTP  
類似度：0.443





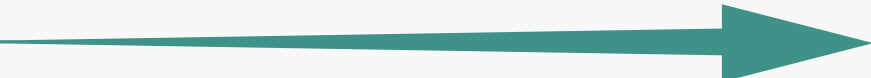

3. HTP  
類似度：0.435

## 結果

- MACCS Keysは166個の部分構造しか見ておらず、精度は低め
  - 部分構造の有無のみを表し、部分構造の数は考慮されない
  - 官能基を識別することができず、反応性の違いなどの観点からは異なる
- 上記の問題を解決したKCF-Sを山西先生は基本的に使っている
- 部分構造の数も考慮できる一般化タニモト係数を用いた類似度の評価も検討すると良い

KCF-S, 一般化タニモト係数について調査する

## 短期予定

	～6/21	6/24～6/28	7/1～7/5
DEA濃度の検討			
自動合成した5配列について評価			
KCF-Sを用いた類似度評価			
類似度が高いペプチドの合成			

## 長期予定

- 各フィンガープリント手法で高い類似度を示したペプチドの検証