

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

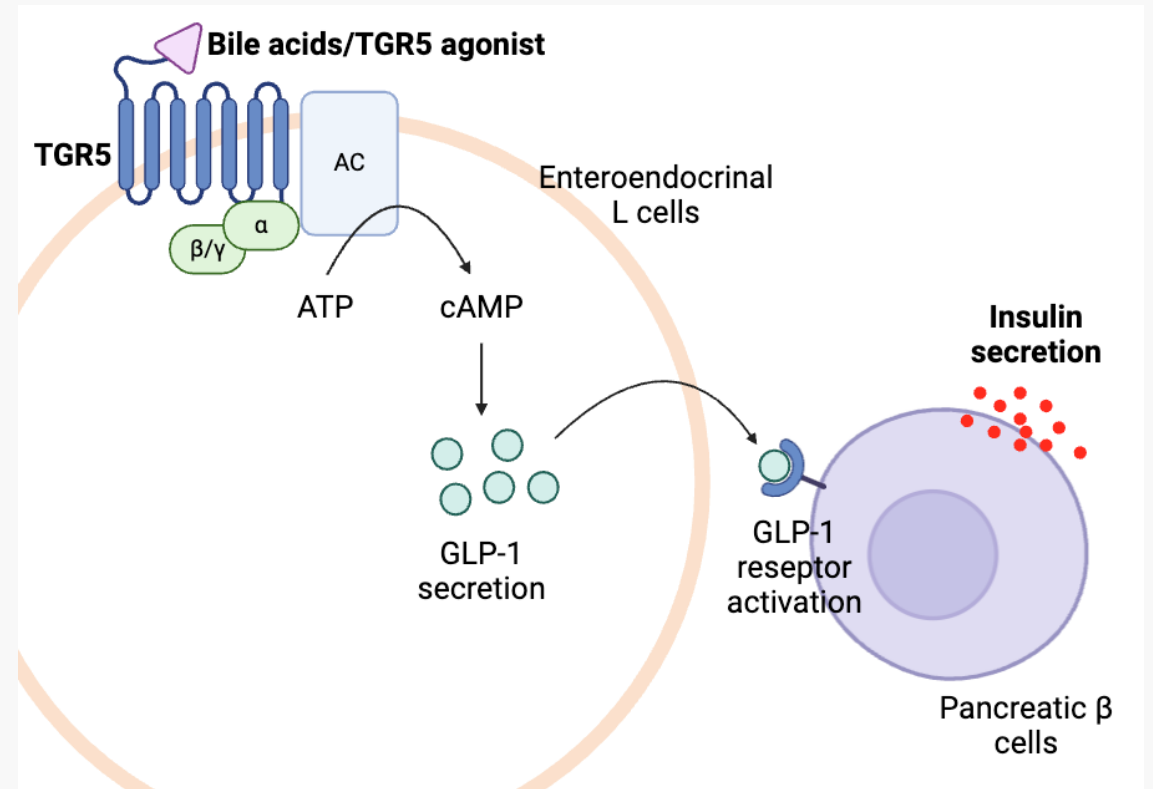
中村 優作

名古屋大学 生命分子工学専攻 本多研究室

TGR5

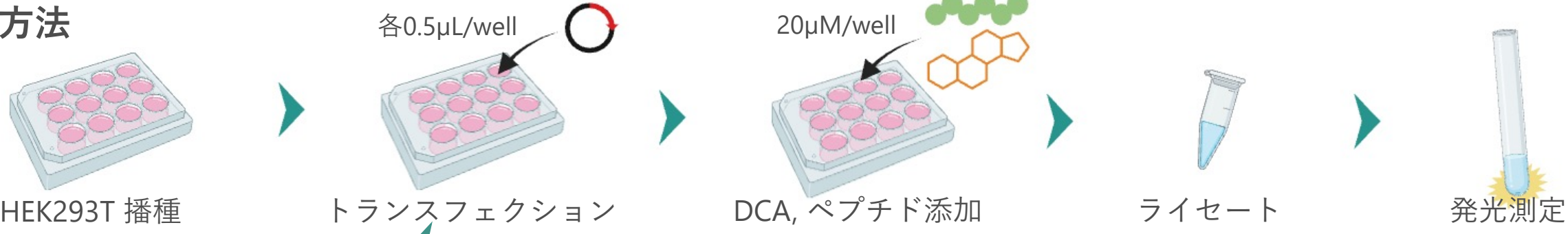
- 肝臓、褐色脂肪細胞、骨格筋などで発現している胆汁酸受容体
- 胆汁酸と結合し、腸内L細胞におけるGLP-1分泌を促進
- 膵β細胞におけるインスリン分泌を促進

➡ 抗肥満、血糖降下作用



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

目的：DCA結合ペプチドのTGR5活性の検証

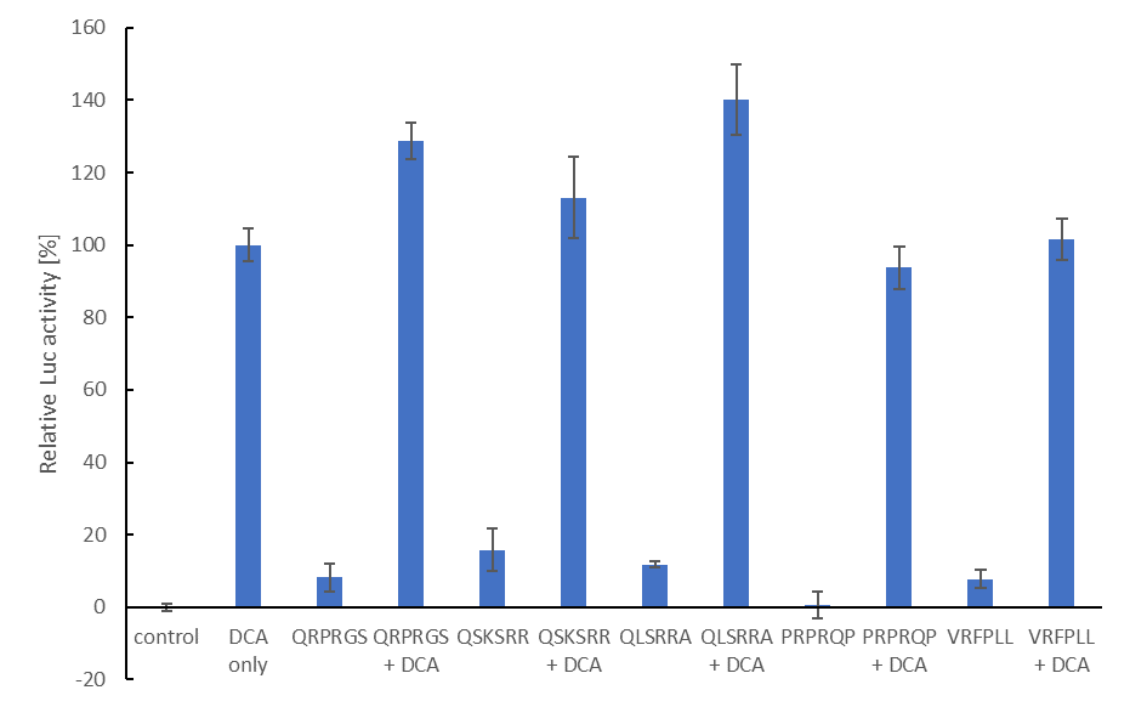


- hTGR5
- CRE-luc
- β-gal

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

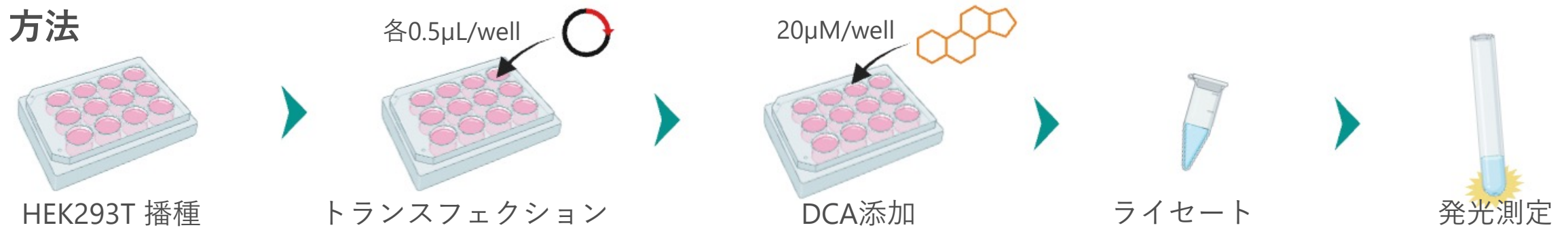
結果

- PRPRQP以外の4種でluc活性
- QLSRRA, QRPRGS, QSKSRRがDCAと相加効果



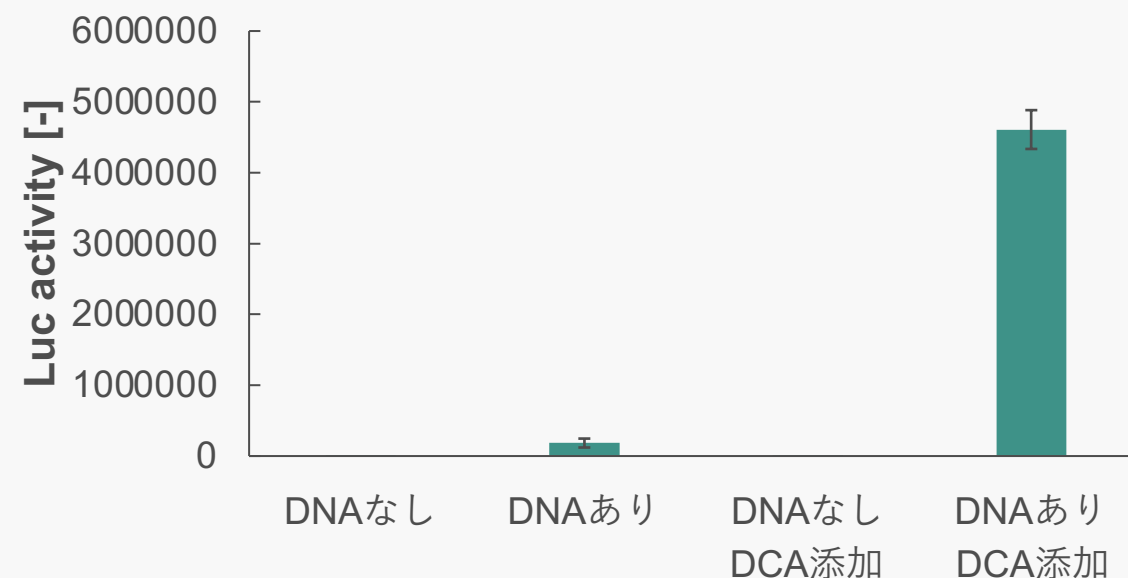
目的：ルシフェラーゼ発現による評価系の再現

方法



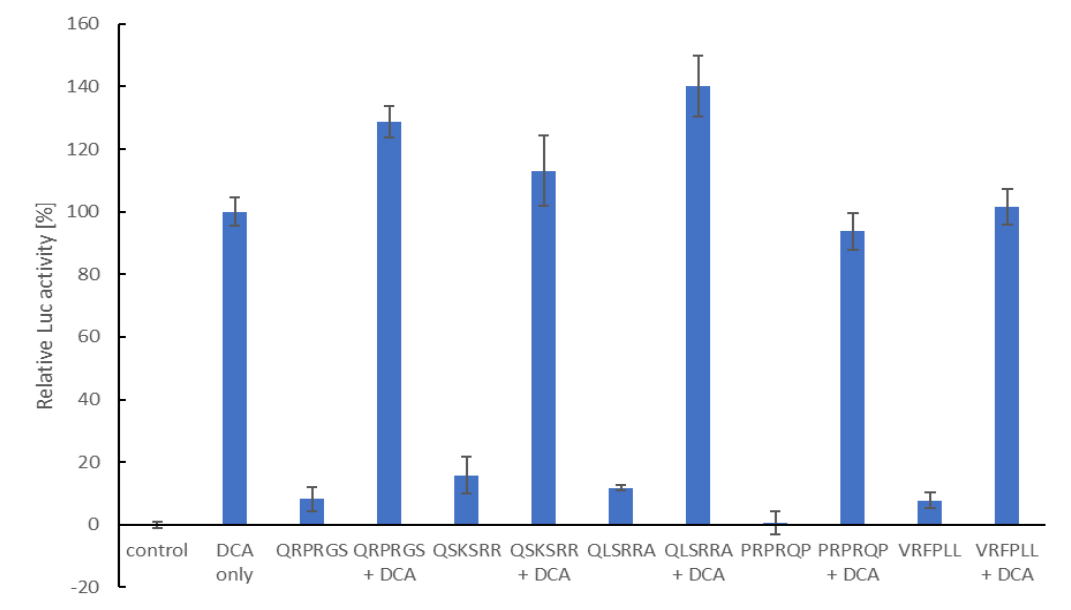
結果

- TGR5が導入された細胞で発光
- TGR5が導入された細胞にDCAを添加するとより強い発光

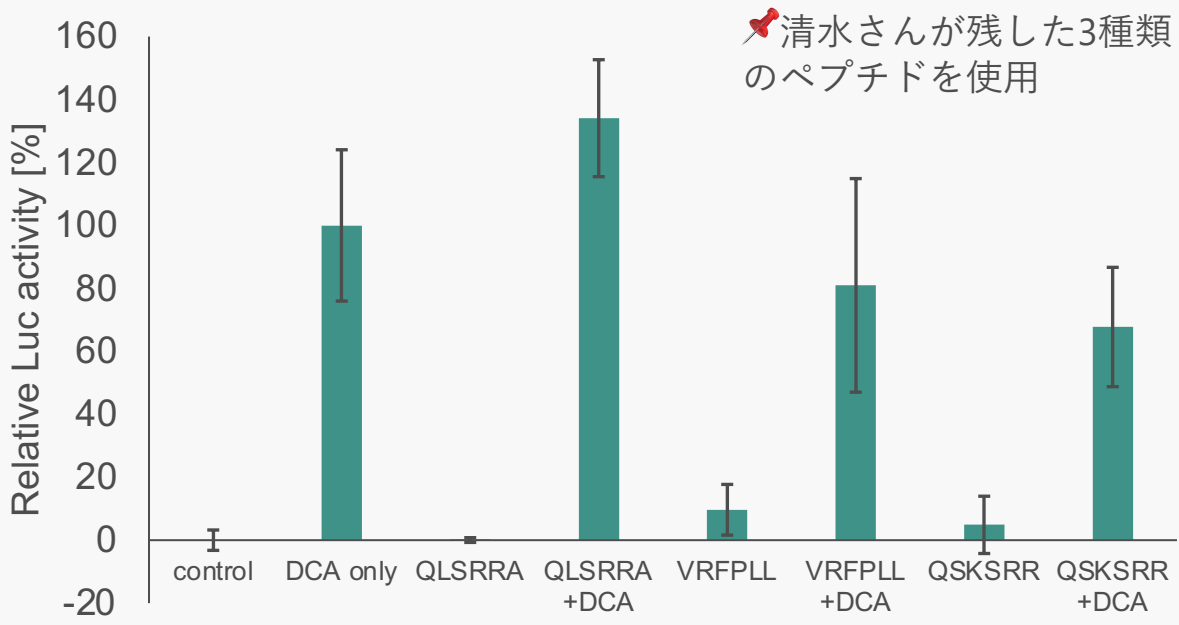


ルシフェラーゼ発現による評価系の再現に成功

結果



ペプチド添加とDCA共添加でのRelative Luc activity(清水)



ペプチド添加とDCA共添加でのRelative Luc activity(中村)

- 先行研究で活性が高かった、QLSRRA+DCA共添加の系で高い活性
- DCA only, VRFPLL+DCAの系などで、誤差が大きい

ある程度の再現は取れたが結果のばらつきが大きかった

課題トランスフェクション後の細胞が剥がれ、wellごとの細胞数にばらつきが生じる**考察**

- **コラーゲンコート濃度が低い**
 - Cellmatrix typeIC (3mg/mL)を0.02N酢酸で50 μ g/mLに希釈(1/60希釈)している
 - コラーゲンコートの濃度が薄く、細胞が剥がれてしまう？
- **手技の問題**
 - dishを傾けて壁面に沿ってゆっくり添加 -> 傾けてたdishを戻すときに流れている？
 - ゆっくりとdishを戻す様に気をつける
 - 12well分全て吸ってから添加 -> 空気に晒される時間が長く、細胞がダメージを受ける？
 - 3wellずつで吸って添加をする様にする
- **Lipofectamine濃度が高い**
 - 1.5 μ L/wellでトランスフェクションを行っている
 - Lipofectamine濃度が高く、細胞がダメージを受けて剥がれやすくなっている？

課題 実験方法の煩雑さ

ボトルネック

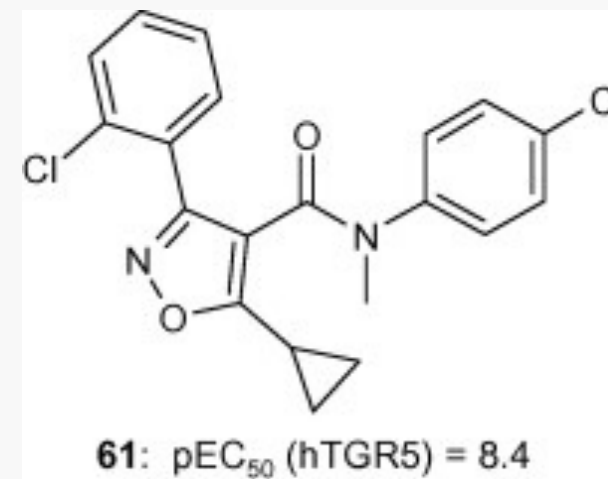
- **トランスフェクションの時間**
 - 4時間トランスフェクションを行った後、成長培地に交換する
 - これ以上実験系が増えると1日で実験が完了できなくなる
 - 24時間でもいいのではないかな？
- **DCA添加後の5時間待ち**
 - これ以上実験系が増えると1日で実験が完了できなくなる
 - もっと短い時間でもいいのではないかな？
 - 1, 3, 5時間などで検討してみる
- **12wellだとdish一枚あたりで評価できる系が少ない**
 - dish一枚で評価できるのはペプチド2種類分
 - 今後他のペプチドを評価する場合、12wellだとスループット性が低い
 - 24wellでも再現できるか検討する

TGR5アゴニストに構造類似のペプチド

- 3-アリール-4-イソオキサゾールカルボキサミドはTGR5の低分子アゴニスト
- QPF, QPYなどが構造類似



TGR5アゴニストである可能性



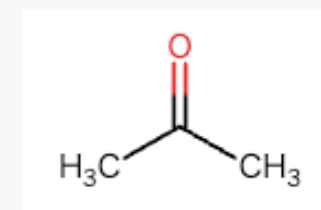
3-アリール-4-イソオキサゾールカルボキサミド

SMILES表記

- 化学構造情報をグラフに基づく線表記で記述したもの
- 化合物グラフを文字列に置き換えてコンピュータに認識させる表現

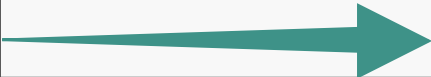

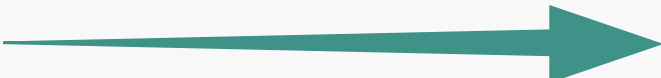


SMILES表記を用いて構造相関の評価をする



例：**CC(=O)C**

短期予定

	5/20～5/24	5/27～5/31	6/3～6/7
24well, コラーゲンコート濃度の検討			
DCA後の待ち時間, Lipofectamine濃度の検討			
自動合成した5配列について評価			

長期予定

- その他の候補ペプチドについても評価する
 - 清水さんの修論でスクリーニングした、その他の胆汁酸結合ペプチドについて評価する
 - DCAのみに活性を示す配列、DCAとCAに活性を示す配列など
- TGR5の活性化にDCA結合ペプチドがどの様に関与しているかを調査する
 - ペプチドが阻害剤の影響を受けるのかどうか
- 構造相関を評価する手法について調べる