

Title	苦味を抑える薬の理論設計
Author(s)	
Citation	令和5(2023)年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95181
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書						
ふりがな 氏 名	ふくながはるな 福永陽奈	学部 学科	薬学部薬学科	学年	1年	
共同研究者	ますだあやか 増田綾華	学部 学科	薬学部薬学科	学年	1年	
	しらくらかの 白倉花野		薬学部薬学科		1年	
	_{みきりさこ} 三木理紗子		薬学部薬学科		1年	
	やすだみつき 安田光輝		薬学部薬学科		1年	
	わたなべみさき 渡邉美咲		薬学部薬学科		1年	
アドバ イザー 教員 氏名	福澤薫	所属	薬学研究科			
研究課題名		苦味を抑える薬の理論設計				
研究目	薬物治療において子供は苦味の強い薬の服用に抵抗感を感じることが多い。我々は薬の苦味 に対処することができれば、苦味が苦手な方の薬への抵抗感を小さくし、患者の服用アドヒア ランスの向上につながると考えた。苦味はヒトの体内に存在する苦味を感知するタンパク質で ある苦味受容体に対する薬物結合により引き起きされる。 本研究では苦味受容体である TAS2R の立体構造に基づく薬物設計(SBDD)を試み、新規 薬物設計のための指針を検討した。Weixiu Xu らによる報告(参考文献 1)では、苦味を感じ る機構として、本受容体と苦味を引き起こすリガンド分子の結合により TAS2R46 の結合部位 近傍の Tyr241 のコンフォメーション変化に起因する細胞内へのシグナル伝達が提唱されてい る。そこで我々は"苦味受容体に結合し、かつ苦味受容体と反応を起こさないリガンド化合物が 薬の苦味を緩和する"という仮説を設定した。 本研究は、苦味受容体 TAS2R の生理学的機能に基づき、薬の苦味を緩和する効果的なアン タゴニストの開発を行う。今後の展開として、本研究で設計方法を確立した後に、デザインし た化合物の実際の苦味の緩和効果を実験によって実証したい。					
研 究 方 法	 ・受容体構造の準備 クライオ電子顕微鏡によって唯一構造決定がされた TAS2R46 という苦味受容体(参考文献 1)と、 Meyerhof らの 2010 の報告(文献 2)にあった 104 種の化合物の中から PubChem に登 					

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

 研究方 録されていた 85 種の化合物を用いてリガンドと受容体間の相互作用について調べた。本研究
 法 で用いる 85 種の化合物は、反応の有無を、発現した受容体が放出するカルシウムイオンを感知する蛍光強度の違いにより評価するカルシウムイメージング法(文献3、4)を用いて TAS2R46と結合した際に苦みを感じるかどうかを評価した化合物である。

> 今回の研究では苦みを感じずに苦味受容体である TAS2R46 に結合するアンタゴニストを考 え出すことが目標のため、 TAS2R46 に結合することにより、TAS2R46 の結合部位の付近に ある Tyr241 が 90 度フリップし(動き)、苦みを感受する化合物(以下 response 化合物と呼ぶ) と TAS2R46 に結合した際に Tyr241 が 90 度フリップせず、苦みを感受しない化合物(以下 non-response 化合物と呼ぶ)を比較し、目標とするリガンドの構造について考察することにし た。

・受容体構造処理とドッキング計算

MOE を使用し PDB 内に登録されている TAS2R46 の中で事前の Redock 検討で、結果が一 番再現できた構造である 7XP6 を使い、ドッキングポーズと受容体間の相互作用を評価した。 構造の前処理は MOE 2022.02 の Structure Preparation 機能を用い、系の部分電荷、欠損残基 を補完した。Protonate3D を用いて水素を付加し水素原子の最適化を行った。その後、MOE-DOCK のデフォルト条件で、共結晶のリガンドの位置に 85 種のリガンドをドッキングした。 ドッキング条件の検証のために共結晶リガンドであるストリキニーネのリドッキング計算で 検証した。

・FMO 計算の実施と解析

MOE を使い前処理した TAS2R46 構造と 85 種の化合物のドッキング構造を用いて得られた 結合様式に対して FMO 計算を実施し、リガンドと受容体間の相互作用エネルギーを求めた。 FMO 計算によって得られた結果を BioStation Viwer を使用し、結合の強さをリガンドとレセ プター間の相互作用を Inter-Fragment Interaction Energy (IFIE) として得た。論文により TAS2R46 とリガンドの結合にあたり、重要な残基である Trp88、Tyr241、Glu265 等に注目し た。(参考文献 1)さらに得られた相互作用を表す数値の中で特に Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA)の成分である静電相互作用(ES)、分散相互作用(DI) に着目 し、上記のアミノ酸における IFIE、ES、DI を response 化合物と non-response 化合物で比較 した。

研究経 ・受容体構造の選定について

過

苦味受容体について文献調査を実施したところ、TAS2R という苦味受容体群の存在、及び それらの受容体のうち実験的に構造が彫られている種は TAR2R46 のみであり、クライオ電子 顕微鏡により構造が判明していたことがわかった。TAS2R46 は口腔内に発現しており苦味を 感受することがわかった。

この先行研究によると、TAS2R46 にストリキニーネと呼ばれる苦味をもたらすリガンドが 結合することにより、TAS2R46 の結合部位の付近にある Tyr241 が 90 度フリップする。これ により、苦味が発生する。このように先行研究により受容体の構造と結合する低分子及びその 複合体構造が判明しており、受容体構造に基づく薬物設計(SBDD)によるアプローチが可能

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

・受容体構造及び既存の苦味に関与するリガンド分子 85 種のモデリング

MOE を用いて TAS2R46 の結合ポケットの位置と、ストリキニーネと Trp88 との間に π - π 相互作用が形成されることと、ストリキニーネと Glu265 との間にアミンと水素による静電 相互作用が形成されることを確認した。リガンド分子については TAS2R46 に結合する事が必 須であるため、既報の 85 個の化合物の苦味の伝達に関する違いを調査したところ、大きく苦 味を感じるもしくは感じない化合物の二種類が含まれる事がわかった。

TAS2R46 への結合の仕方を探索するため、85 個の化合物を MOE を用いて TAS2R46 にド ッキングさせ、ドッキングスコアが高い順に 5 つの予測結合様式を出した。そのうち 1 番安定 な結合形式を研究に用いることにした。

次にリガンドとの相互作用が実験的に確認されているアミノ酸残基と 85 個それぞれの化合物との相互作用を確認するため、それらを FMO 計算にかけた。現在、FMO 計算と並行して TAS2R46 とリガンドの結合の際、重要な相互作用を形成する Trp88、Tyr241、Glu265 に注目 し、その相互作用の強さを解析している。

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

考察	response 化合物と non-response 化合物の間でストリキニーネ結合ポケットにおける残基の
	相互作用の違いを調べるために、FMO 計算で得た各残基と化合物の ES(静電相互作用エネル
	ギー)値と DI(分散エネルギー)値のそれぞれの母平均を求め、response 化合物と non-response
	化合物の間で有意な差があるか有意水準 5%で t 検定を行った。この時の帰無仮説は"response
	化合物の母平均は non-response 化合物の母平均に等しい"、対立仮説は"response 化合物の母
	平均は non-response 化合物の母平均に等しくない"とした。(両側検定)以下【Table.1】はそ
	れぞれの残基のp値を表にしたものである。p≦0.05 の値は太字で示してある。

浅基	IFIE	ES	DI
a266	0.855632	0.799769	0.232092
Ala268	0.616731	0.988123	0.548137
Asn176	0.202075	0.640145	0.933704
Asn184	0.548526	0.894804	0.233213
Asn65	0.074509	0.087663	0.859486
Asn92	0.379718	0.482133	0.023717
Asn96	0.850184	0.884534	0.478877
Glu253	0.453612	0.447	0.723479
Glu265	0.362517	0.549865	0.818741
His93	0.857839	0.816729	0.29091
Ile181	0.764542	0.74227	0.936118
Ile245	0.980719	0.764927	0.208188
Ile246	0.255082	0.247247	0.944868
Leu185	0.266176	0.295627	0.019208
Leu58	0.167629	0.448233	0.083815
Leu62	0.161769	0.06288	0.33173
Phe252	0.035963	0.232519	0.144471
Phe261	0.021259	0.352	0.00108
Phe269	0.079171	0.101904	0.037701
Pro272	0.420199	0.25685	0.237857
Ser248	0.102915	0.104733	0.012691
Ser270	0.65577	0.345441	0.633073
Thr177	0.085859	0.762535	0.84574
Thr180	0.095264	0.12201	0.292954
Trp88	0.001029	0.046922	0.000033
Trp66	0.367629	0.976911	0.021748
Tyr241	0.155896	0.331978	0.077948
Tyr271	0.943968	0.81931	0.926922
Tyr85	0.886235	0.290986	0.439949
Val249	0.858295	0.919953	0.602712

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4



力の相互作用が弱い時、苦みを感じにくい傾向があると考えられる。

様式 6 申請先学部 薬学部 採択番号 No. 4



様式 6 申請先学部 薬学部 採択番号 No.4



【Fig.5 Trp88の IFIE 値、ES 値、DI 値の box plot】

【Fig.5】は(参考文献 1)で苦味を感知する際に重要な役割を果たしていると報告されている Trp88 のそれぞれのエネルギー値の box plot を示している。Trp88 において response 化合物 と比べて non-response 化合物がエネルギー的に高い IFIE 値をもつ傾向があった。また、エネ ルギー的に高い ES 値をもつ傾向、エネルギー的に高い DI 値をもつ傾向があった。 (IFIEresponse,mean=-8.778412816 kcal/mol, IFIEnon-response,mean= -5.783445902

kcal/mol)

(ESresponse,mean=-4.731150026 kcal/mol, ESnon-response,mean= -3.232520171 kcal/mol) (DIresponse,mean=-9.194616763 kcal/mol, DInon-response,mean= -5.797009951 kcal/mol) このことより、Tyr241 とリガンド分子間のフラグメント間力の相互作用が弱く、静電相互作 用が弱く、分散力の相互作用が弱い時、苦味を感じにくい傾向にあることが考えられる。



申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

考察 物と比べて non-response 化合物がエネルギー的に高い IFIE 値をもつ傾向があった。また、エ ネルギー的に低い ES 値をもつ傾向、エネルギー的に低い DI 値をもつ傾向があった。 (IFIE_{response,mean}=-3.352421294 kcal/mol, IFIE_{non-response,mean}= -4.757562514 kcal/mol) (ES_{response,mean}=-3.095114314 kcal/mol, ES_{non-response,mean}= -4.308864211 kcal/mol)、 (DI_{response,mean}=-2.384152118 kcal/mol, DI_{non-response,mean}= -2.89511773 kcal/mol) このことより、Tyr241 とリガンド分子間のフラグメント間力の相互作用が弱く、静電相互作 用が強く、分散力の相互作用が強い時、苦味を感じにくい傾向にあることが考えられる。



【Fig.7 Glu265 の IFIE 値、ES 値、DI 値の box plot】 【Fig.7】は(参考文献 1) で苦味を感知する際に重要な役割を果たしていると報告されている Glu265のそれぞれのエネルギー値の box plot を示している。Glu265 において、response 化合 物と比べて non-response 化合物がエネルギー的に同等な IFIE 値をもつ傾向があった。また、 エネルギー的に同等な ES 値をもつ傾向、エネルギー的に高い DI 値をもつ傾向があった。 (IFIE_{response,mean}=-26.70034253 IFIE_{non-response,mean}=-22.63892029 kcal/mol, kcal/mol) kcal/mol, kcal/mol) $(ES_{response,mean} = -23.34794697)$ ES_{non-response,mean}=-20.10877176 $(DI_{response,mean} = -4.467401889 \text{ kcal/mol}, \quad DI_{non-response,mean} = -3.413750974 \text{ kcal/mol})$ pろtこのことより、Tyr241 とリガンド分子間の分散力の相互作用が弱い時、苦味を感じに くい傾向にあることが考えられる。

次に、以上の各残基とリガンド間の相互作用の結果と、受容体における各残基の位置関係とど のように関係しているのかを考察する。 様式 6 申請先学部 薬学部 採択番号 No.4



記することにする。



申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

【Fig.9】は【Fig.8】の受容体の同部分で、ストリキニーネを外し、本研究の考察で用いた残基 考察 のみを表示した図である。 【Fig.9】と上記の結果から、response 化合物は、ストリキニーネ結合ポケット上に位置する残 基と特に強い結合を形成していることがわかる。また、non-response 化合物はストリキニーネ 結合ポケットより下の領域に位置する【Fig.8】に示したストリキニーネ結合ポケットに位置す る残基と特に強い結合を形成していることがわかる。 参考文献(参考文献1)で述べられているように、Tyr241が90度フリップし、苦味受容体 TAS2R46 のコンフォメーションが変化することで苦味を感知することが分かっている。この 事実と本研究の結果を踏まえて、ストリキニーネ結合ポケットより下の領域で化合物が強く結 合することによって Tyr241 のフリップが起こりにくくなると、その後に起きる TAS2R46 の コンフォメーション変化が阻害され、苦味を感じにくくなることが考えられる。また、その際 にストリキニーネ結合ポケット内の残基とも結合を形成してしまうと阻害効果が弱くなって しまうことも考えられる。 そこで、我々は TAS2R46 のアンタゴニストの構造として、以下のことを提案する。 ①ストリキニーネ結合ポケット領域を通過し、ストリキニーネ結合ポケットより下の領域で強 力な結合を形成できる化合物をデザインする。 ②特に Tyr241 と強力に結合する化合物のデザインをする。 今後の 今回我々が提案したアンタゴニストの構造をさらに具体化するために、85 個の化合物のそ 展望 れぞれの結合様式を確認する。特に、本研究で non-response 化合物は response 化合物より、 ストリキニーネ結合ポケットより下の領域にある Asn92, Tvr241 などの残基との間に比較的強 い相互作用が形成されていることが示唆されたため、それらの残基と non-response 化合物間 の相互作用の種類を詳しく調べる。 次に、研究の結果をもとに具体的なアンタゴニストに適した構造を決定し、アンタゴニスト 候補の化合物を複数個コンピューター上で設計する。その後、設計した化合物を MOE を用い てドッキングし、FMO 計算を実行する。この結果と non-response 化合物の FMO 計算結果を 照らし合わせ、我々が想定する相互作用が実際に形成されているかを確認する。期待通りの結 果が得られた場合、実際にアンタゴニスト候補化合物を合成し、味覚センサーを用いてそれぞ れがアンタゴニストとして作用するかの味覚的な評価を行う。

申請先学部 薬学部 採択番号 No.4

参考文	(1) Xu, W.; Wu, L.; Liu, S.; Liu, X.; Cao, X.; Zhou, C.; Zhang, J.; Fu, Y.; Guo, Y.; Wu, Y.; Tan,			
献	Q.; Wang, L.; Liu, J.; Jiang, L.; Fan, Z.; Pei, Y.; Yu, J.; Cheng, J.; Zhao, S.; Hao, X.; Liu, ZJ.;			
	Hua, T. Structural Basis for Strychnine Activation of Human Bitter Taste Receptor TAS2R46.			
	Science 2022, 377 (6612), 1298–1304.			
	(2) Meyerhof, W.; Batram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Bufe, B.; Appendino, G.;			
	Behrens, M. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors.			
	Chemical Senses 2010, 35 (2), 157–170.			
	(3) Maehashi, K.; Matano, M.; Wang, H.; Vo, L. A.; Yamamoto, Y.; Huang, L. Bitter Peptides			
	Activate hTAS2Rs, the Human Bitter Receptors. Biochemical and Biophysical Research			
	Communications 2008, 365 (4), 851-855.			
	(4) Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, E. Human Receptors for Sweet			
	and Umami Taste. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, 99 (7), 4692–4696.			