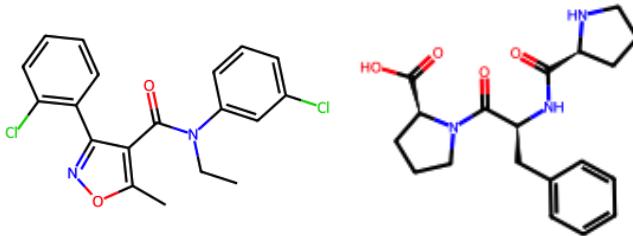


目的:TGR5に結合して活性化する作用をもつ生理活性ペプチドの探索

1. 構造相関によるTGR5活性を持つペプチドの予測



報告されているTGR5アゴニストと
ペプチドの類似度を網羅的に比較

2. 合成したペプチドのTGR5活性評価

評価



TGR5の活性化により
ルシフェラーゼを発現さ
せ、ルシフェラーゼの発
現量から
TGR5活性を評価

3. 可食性タンパク質のアミノ酸配列から 生理活性ペプチドを切り出す



可食性タンパク質の中からTGR5
アゴニストペプチドのアミノ酸配列を
探索して切り出す

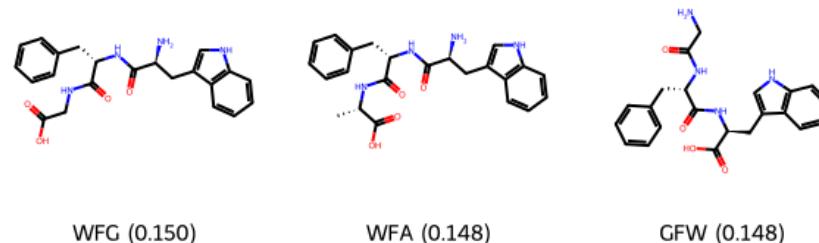
中間報告まで

- ルシフェラーゼ発現によるTGR5活性評価系の改善を完了した。
- 分子フィンガープリントによる類似度評価をした。

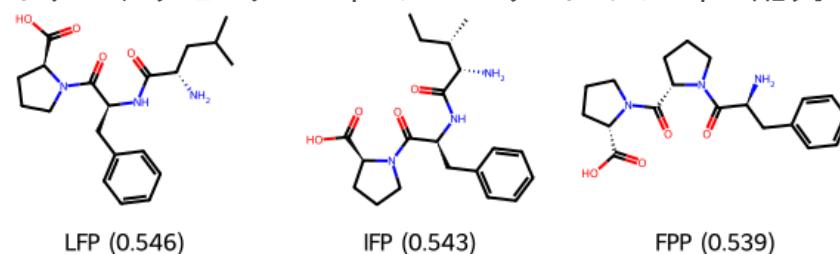
1. 3残基ペプチドの合成

2. TGR5アゴニストペプチドの予測

KCF-Sでの上位3配列



ドナーアクセプターフィンガープリントでの上位3配列



→ 類似度が高かったペプチドを合成して評価する

自動合成

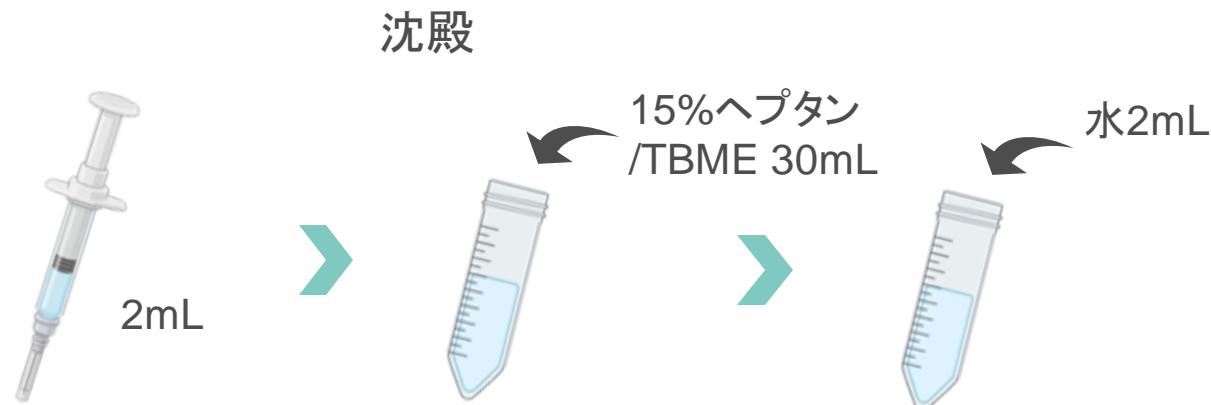


AWF, IPFを合成

脱保護

試薬の組成

- TFA : 81.5%
- 水 : 10%
- TIS : 1%
- チオアニソール : 5%
- EDT : 2.5%



過去に先輩がもらった3残基ペプチドの合成プロトコルに従って行った。

- 沈殿を得ることができなかった
- 石井さんと共同で行ったが、石井さんの6残基程度のペプチドは沈殿を得ることができた。
 - ペプチド合成までの操作には問題はないと言える
- 横野さんに問い合わせたところ、15%ヘプタン/TBME、水を加えたときに十分な攪拌が必要とのこと。
- また、使用したペプチドが沈殿しにくい性質を持っていた可能性もある。

次回はペプチドを変更し、攪拌を十分に行う

自動合成



WYT, CGEを合成

脱保護

試薬の組成

- TFA : 82.5%
- 水 : 5%
- フェノール : 5%
- チオアニソール : 5%
- EDT : 2.5%



2mL

沈殿



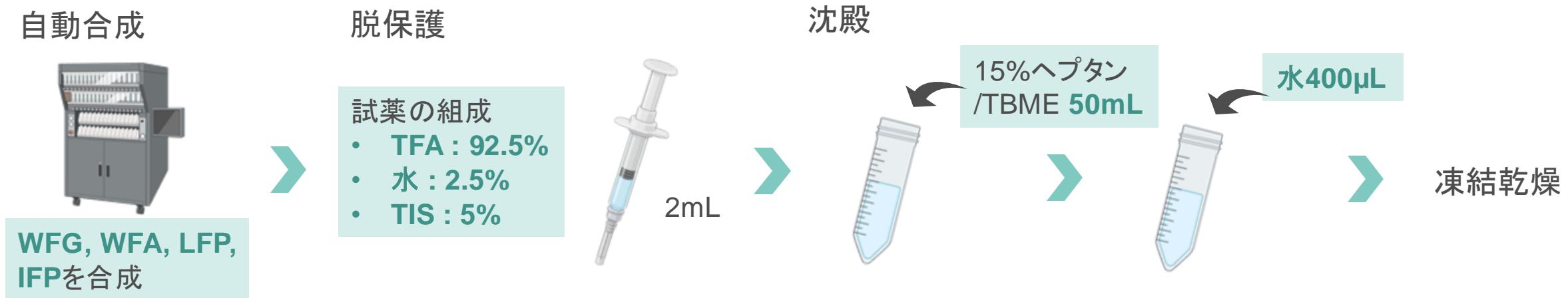
滴下後は十分に攪拌を行った

15%ヘプタン
/TBME 30mL

水2mL

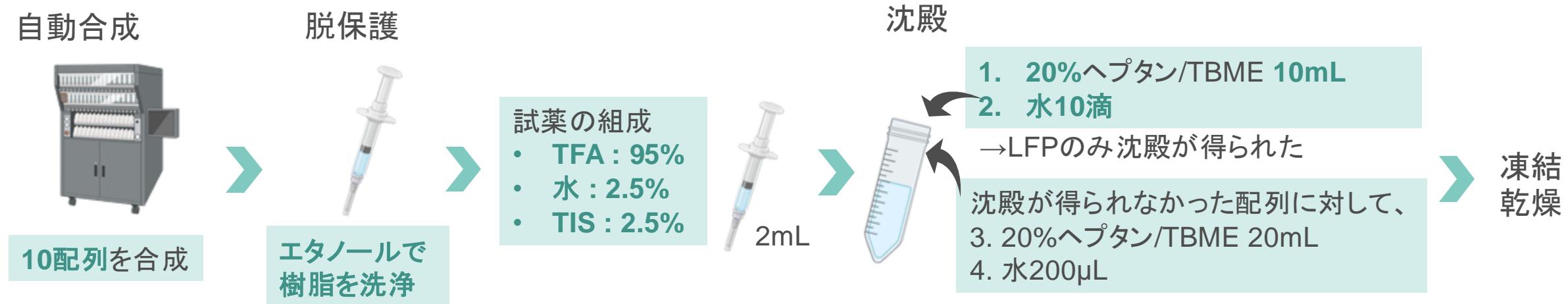
- 沈殿を得ることができなかった
- 横野さんに相談
 - トリペプチドでは、チオアニソール, フェノール, EDTの使用は不要で、ヘプタン/TBMEと相互作用を持つ可能性がある。
 - 沈殿が得られにくい場合はヘプタン/TBMEの量を増やす必要がある。
 - 水を加えたあと分離していたが、水は分離しない範囲で加える必要がある。

次回は脱保護試薬を変更、ヘプタン/TBMEの量を増やす、水の量を変更する。



- WFG, LFP, IFPで少量の沈殿が発生した。
- 凍結乾燥を行ったところ、LFPのみ0.5mg程度のペプチドを得ることができたが、その他のペプチドについては計測可能な量を得ることができなかった。
 - 遠心分離後ペプチドをキャップを外して乾かしたところ、沈殿していたペプチドがなくなってしまった。
 - 最低でも1.0mgのペプチドが欲しい。
- 横野さんが最新のプロトコルを送ってくださったので、それに従って次回配列を変えて合成してみる。

沈殿は確認できたが、計測可能な量を得ることができなかった。



- 10配列のうち、LFP, IFP, FPP, MFP, WFG, GFW, FWG, AFWは少量の沈殿が得られた。PFP, WFAの2配列は沈殿を得ることができなかった。
- 凍結乾燥を行ったところ、計測可能な量を得ることができなかった。
- 窒素吹き付けをするペプチド回収方法を試してみる。
 - 脱保護操作の後、ドラフト内で窒素を吹き付けてゲル上になるまで乾燥させ、30%アセトニトリル/水で溶解し凍結乾燥を行い、エチルエーテルで洗浄し、再度溶解させて凍結乾燥を行う。

窒素吹き付けを行い、十分な沈殿が得られるかを試してみる。

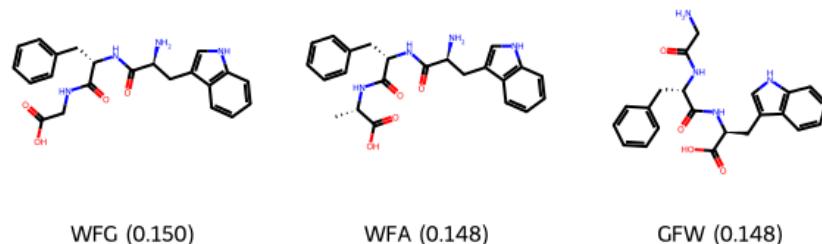
中間報告まで

- ルシフェラーゼ発現によるTGR5活性評価系の改善を完了した。
- 分子フィンガープリントによる類似度評価をした。

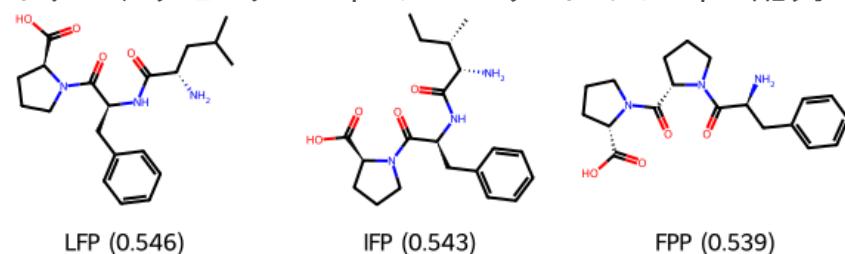
1. 3残基ペプチドの合成

2. TGR5アゴニストペプチドの予測

KCF-Sでの上位3配列



ドナーアクセプターフィンガープリントでの上位3配列



→ 類似度が高かったペプチドを合成して評価する

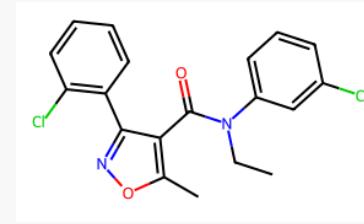
重要な構造に重みをつけることができない

- KCF-Sフィンガープリントで類似度計算をしたところ、六員環があるかどうかに大きく依存していた。
 - 単なる構造類似度であるため、六員環が重要な部分構造であるという根拠はない。

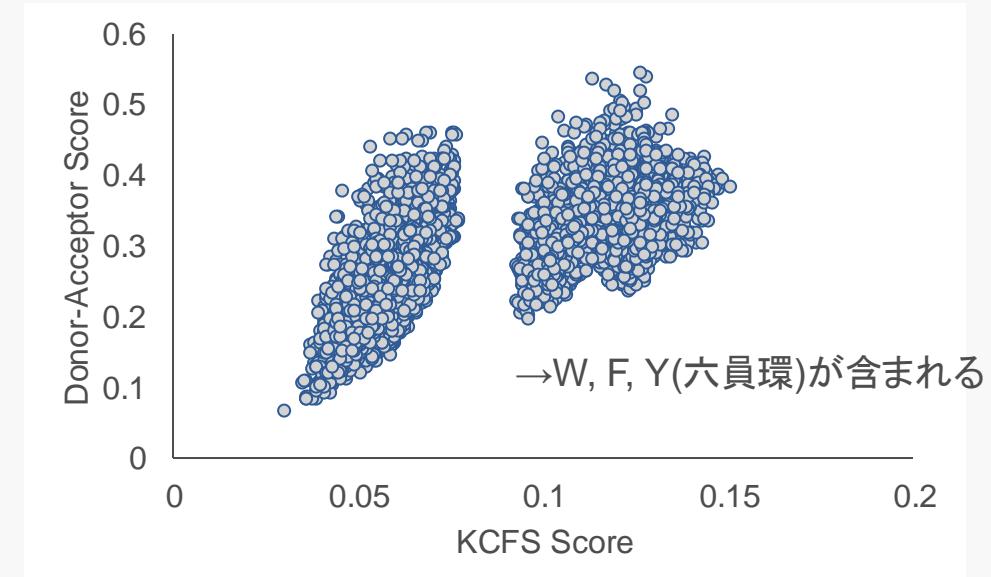
→ TGR5活性に重要な構造に依存した予測がしたい

参照するアゴニストに依存する

- 報告されているアゴニストの構造が多様であり、構造類似性の比較対象にするアゴニストによって結果が変わる
- 候補ペプチドの十分な絞り込みができていない

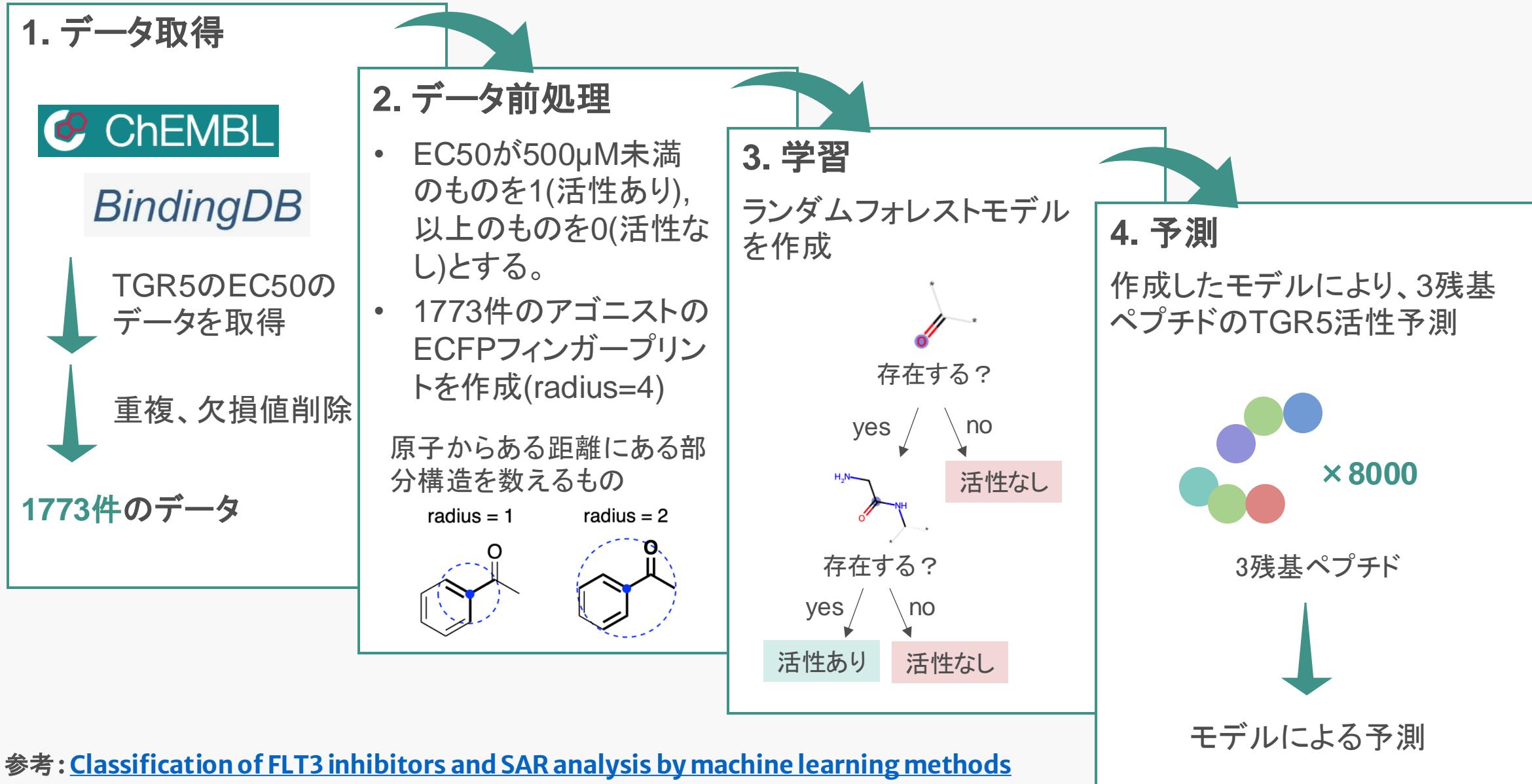


ターゲット:
3-アリール-4-イソオキサゾール
カルボキサミド



KCF-S, ドナーアクセプターフィンガープリントによる、ターゲットと3残基ペプチドでの類似度の計算結果

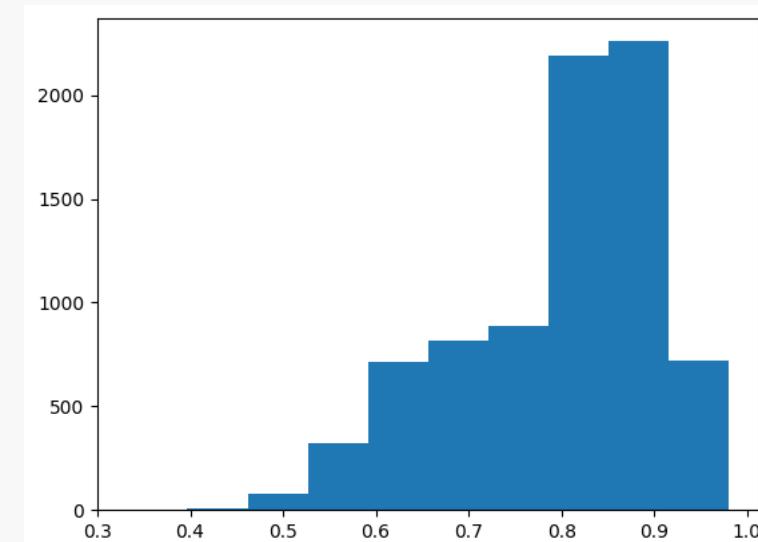
重要な部分構造を根拠とするペプチドの予測モデルを作成したい。



- 教師データ(学習データを80%, 教師データを20%でランダムにサンプリングした)の予測結果では適合率82%と、予測精度としては良いモデルが得られたと言える。
- しかし、3残基ペプチドの予測では、ほとんどのペプチドが活性が出る(0.5以上)と予測され、正しい予測ではないように思える。
- 学習によって、たまたまペプチドに有利な部分構造が重み付けされている可能性がある。
 - 部分構造を見る能够性で、それを見てどういう構造が重み付けされているのかを確認する。
 - EC50が $500\mu\text{M}$ 以上か未満かの2値分類により、 $500\mu\text{M}$ 付近の重要な構造が無視されてしまっている可能性がある。
 - 回帰モデルで学習をする能够性を試みる。
 - SVMやXGBoostなどの他のモデルで学習を試みる。

	予測値 活性あり	予測値 活性なし
実測値 活性あり	106	37
実測値 活性なし	26	186

学習モデルによる教師データの予測結果



3残基ペプチドの活性予測結果

短期予定

	9/17～9/20	9/24～9/27	9/30～10/2
窒素吹き付けでのペプチド合成			→
雑誌会準備			→
(合成できたら)TGR5活性評価			→

長期予定

- TGR5活性予測モデルの改善