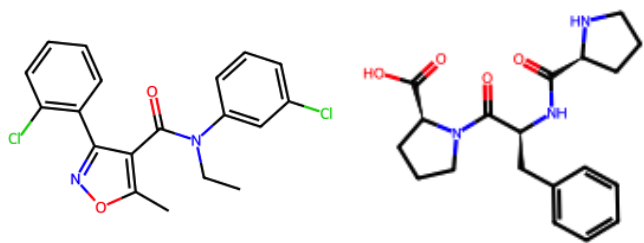


目的: TGR5に結合して活性化する作用をもつ生理活性ペプチドの探索

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



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

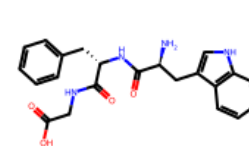
1. 3残基ペプチドの合成

2. TGR5アゴニストペプチドの予測

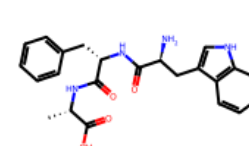
中間報告まで

- 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。

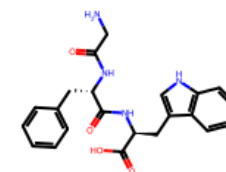
KCF-Sでの上位3配列



WFG (0.150)

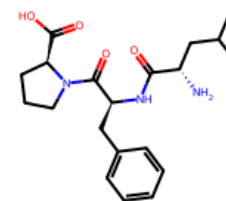


WFA (0.148)



GFW (0.148)

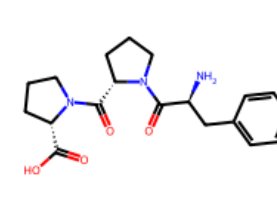
ドナーアクセプターフィンガープリントでの上位3配列



LFP (0.546)



IFP (0.543)



FPP (0.539)

➡ 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

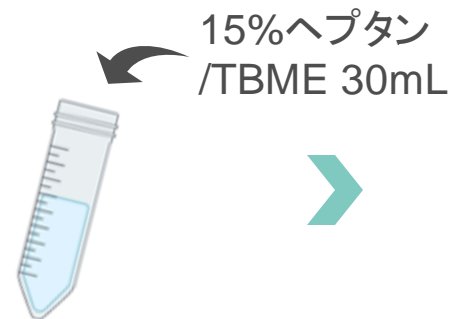
- TFA : 81.5%
- 水 : 10%
- TIS : 1%
- チオアニソール : 5%
- EDT : 2.5%



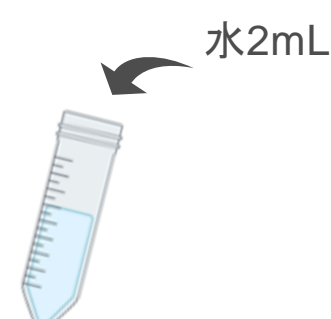
2mL



沈殿



15%ヘプタン
/TBME 30mL



水2mL

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

15%ヘプタン
/TBME 30mL

水2mL

滴下後は十分に攪拌を行った

- 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。

自動合成



WFG, WFA, LFP,
IFPを合成

脱保護

試薬の組成
• TFA : 92.5%
• 水 : 2.5%
• TIS : 5%

沈殿



2mL



15%ヘプタン
/TBME 50mL

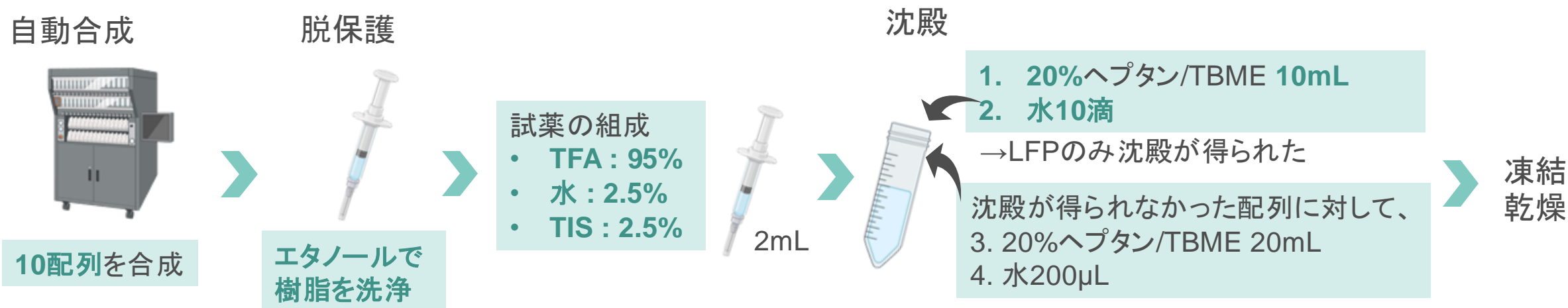


水400μL

凍結乾燥

- 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。

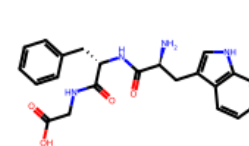
1. 3残基ペプチドの合成

2. TGR5アゴニストペプチドの予測

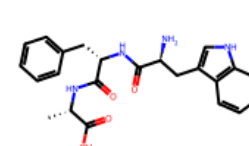
中間報告まで

- 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。

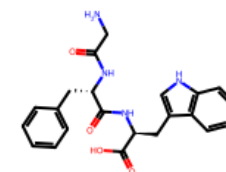
KCF-Sでの上位3配列



WFG (0.150)

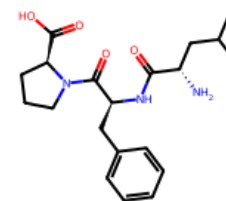


WFA (0.148)

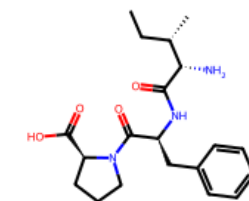


GFW (0.148)

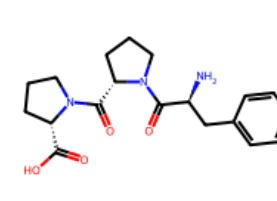
ドナーアクセプターフィンガープリントでの上位3配列



LFP (0.546)



IFP (0.543)



FPP (0.539)

➡ 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

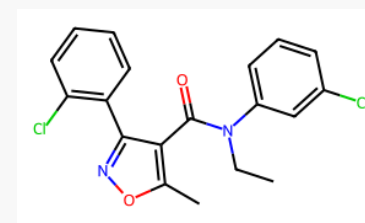
- KCF-Sフィンガープリントで類似度計算をしたところ、六員環があるかどうか大きく依存していた。
 - 単なる構造類似度であるため、六員環が重要な部分構造であるという根拠はない。

→ TGR5活性に重要な構造に依存した予測がしたい

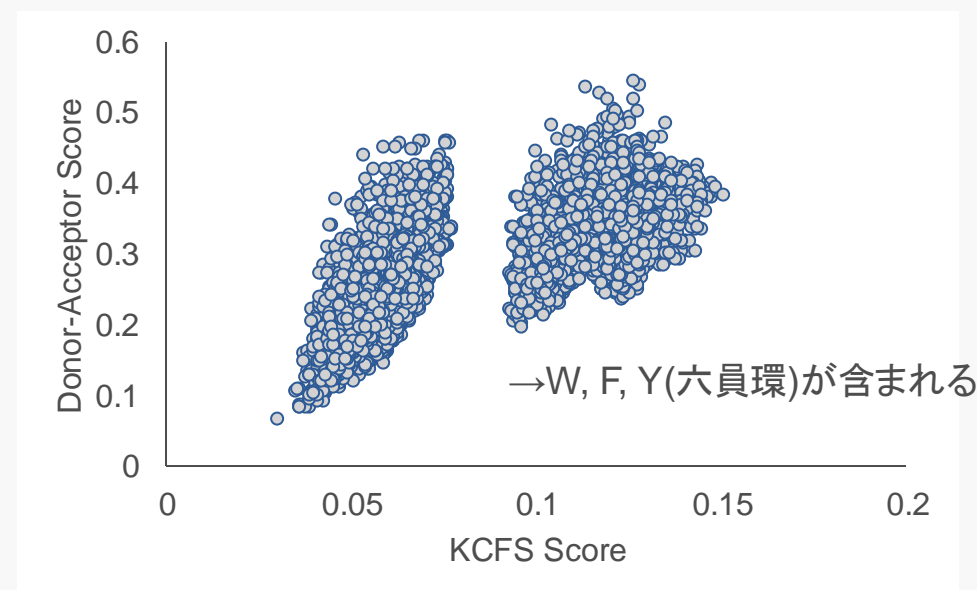
参照するアゴニストに依存する

- 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。

1. データ取得

*BindingDB*TGR5のEC50の
データを取得

重複、欠損値削除

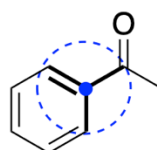
1773件のデータ

2. データ前処理

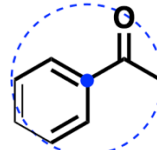
- EC50が500 μ M未満のものを1(活性あり), 以上のものを0(活性なし)とする。
- 1773件のアゴニストのECFPフィンガープリントを作成(radius=4)

原子からある距離にある部分構造を数えるもの

radius = 1



radius = 2



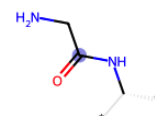
3. 学習

ランダムフォレストモデル
を作成

存在する？

yes

no



存在する？

yes

no

活性あり

活性なし

4. 予測

作成したモデルにより、3残基
ペプチドのTGR5活性予測

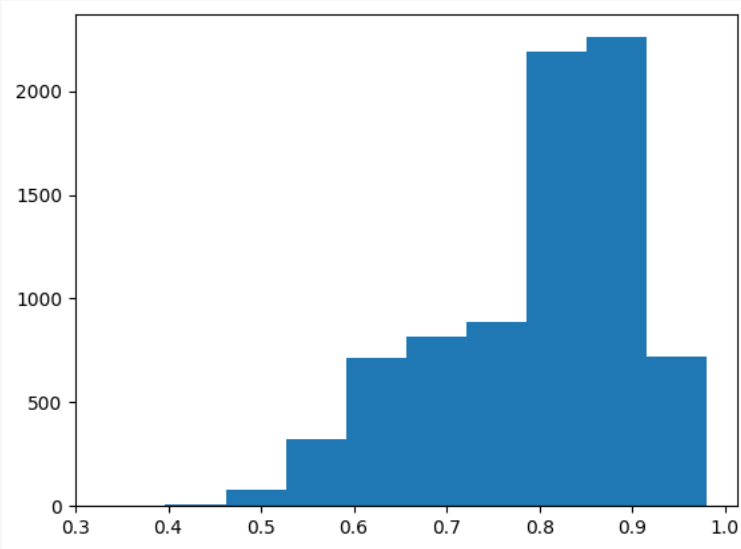
3残基ペプチド

モデルによる予測

- 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。
 - 部分構造を見ることができるので、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500μM以上か未満かの2値分類により、500μM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ことができないかを試みる。
 - 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