

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03195

研究課題名(和文) ヒト小腸における8,400種類ジ・トリペプチド吸収基盤の解明

研究課題名(英文) Analyzing the substrate multispecificities of eukariotic proton-coupled oligopeptide transporters

研究代表者

伊藤 圭祐 (Ito, Keisuke)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40580460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド取り込みシステムはバクテリアから高等動植物に至るまで生物全体で保存されており、窒素源を高効率に獲得するために重要である。このペプチド取り込みシステムは、8,400種類ものジ/トリペプチドを認識できるPOTファミリーのペプチド輸送体が担っている。本研究では、ジペプチドライブラリーを用いた網羅的解析によって、真核生物POTの基質多選択性を解明した。結果として、真核生物のPOTは、ヒトの必須アミノ酸を高効率に取り込むための共通した性質を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた成果は、食品ペプチドの吸収実態の理解を通じ、病中病後の経腸栄養療法への応用、スポーツ用途食品の開発、高齢者や発展途上国における高効率な栄養供給法の開発等につながる。また、 β -ラクタム系抗生物質、抗がん剤、降圧薬、抗ウイルス薬等のペプチド類似構造を持つ医薬品がPOTを介して吸収されることが報告されていることから、医薬品開発や食薬相互作用の理解への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Peptide uptake system is conserved across organisms from bacteria to higher animals and plants and is important for acquiring nitrogen resources with high efficiency. The molecules involved in this system are categorized into the Proton-coupled Oligopeptide Transporter (POT) family. POT can recognize as many as 8,400 types of di/tripeptides. In this study, we analyzed the substrate multispecificities of the eukariotic POTs. Eukariotic POTs were involved in the preferential uptake of essential amino acids in humans, which impose a biosynthesis burden on organisms. Moreover, an in silico POT affinity prediction models using 'combinations of physicochemical compound properties' were constructed with reasonable accuracy. Our results provide the POT molecular basis to develop high-absorbable peptides.

研究分野：食品化学

キーワード：ペプチド輸送体 ジペプチド 栄養素吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体へのペプチド取り込みシステムは微生物から高等動植物まで全生物において保存されており¹⁾、高効率な窒素源の獲得に重要な役割を担っている。タンパク質の吸収形態としてジ・トリペプチドはアミノ酸よりも高効率であるため²⁾、ペプチド素材はスポーツ用途食品や経腸栄養剤として活用されている。ヒトにおいてこのペプチドの吸収を担う分子は Proton-coupled Oligopeptide Transporter (POT)ファミリーのペプチド輸送体である。POT は 1 つの輸送体が多数の基質を認識する“基質多選択性”を有することが特徴である。ヒトの場合、小腸上皮に発現する hsPEPT1 が生体への食品ペプチドの吸収を担い、腎尿細管に発現する hsPEPT2 が血中へのペプチドの再吸収を担う。これらペプチド輸送体はそれぞれが、その基質多選択性によって、タンパク質加水分解物である 400 種のジペプチドおよび 8,000 種のトリペプチドを、ただ一つの基質結合部位で認識し、輸送できる³⁾。

(2) 先行研究において我々は、ハイスループットな POT 親和性解析システムを開発することで、ペプチド栄養の分子基盤として重要な POT の基質多選択性を初めて解明した⁴⁾。また近年、POT の結晶構造から基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基の 3 次元配置が明らかとなり⁵⁾、基質認識メカニズムの解析が進められている。しかし POT の基質多選択性の全貌、および多基質認識メカニズムについては未だ不明な点が多く残されている

2. 研究の目的

(1) 生体へのペプチド取り込みシステムが種を超えて保存されていること、また少数の基質の親和性が類似していることから、POT の基質多選択性には共通性があることが示唆されている。しかし基質の数が膨大であるため、ほとんどの POT の基質多選択性は未だ不明である。ペプチドの高効率な吸収の分子基盤を明らかとし、得られた知見を食品開発、栄養療法等へ応用するためには、腸管に発現する PEPT1 を含め、様々な POT の基質多選択性を解明することが不可欠である。そこで本研究では、6 種類の真核生物由来 POT について基質多選択性を解析した。

3. 研究の方法

(1) 蛍光トレーサー基質を用いた POT 親和性の解析 *Saccharomyces cerevisiae* (BY4742-*ptr2Δ* 株)を宿主として、出芽酵母 (scPtr2p)、ヒト (hsPEPT2)、シロイヌナズナ (atNPF8.2)、線虫 (cePEPT1)、カンジダ酵母 (caPTR2)、枯草菌 (bsYclF) 由来 POT の発現細胞を構築した。POT を発現させた後、細胞をアッセイ用緩衝液 (150 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)) で洗浄し、トレーサー基質 (β Ala-Lys(AMCA)) と解析対象のペプチドを添加し、30°C で 1 時間インキュベートした。トレーサー基質を取り込んだ細胞はアッセイ用緩衝液で 3 回洗浄後、励起波長 355 nm における 460 nm の蛍光強度を測定した。解析対象基質の POT 親和性は K_i 値として算出した。

4. 研究成果

(1) ジペプチドライブラリーを用いた cePEPT1 の基質多選択性の解析 ジペプチドライブラ

リーを用いて cePEPT1 親和性を網羅的に解析した (図 1)。合成可能な 338 種のジペプチドの cePEPT1 親和性を解析した結果、 K_i 値は 0.47 mM 以下から 2.0 mM 以上まで幅広く分布していた。平均的なジペプチドの K_i 値は 0.41 mM であり、この値は scPtr2p や hsPEPT1 での報告値と同程度であった。網羅的な親和性解析データに基づき、高親和性ジペプチド (全体の 1/4 番目まで) と低親和性ジペプチド (全体の 3/4 番目以降) を抽出し、WebLogo プログラムによりアミノ酸の出現頻度を解析した。高親和性グループのペプチドには芳香族アミノ酸、正電荷を有するアミノ酸、また分岐鎖アミノ酸が高頻度に見られた一方、低親和性グループのペプチドには負電荷のアミノ酸が高頻度に含まれていた。いずれのグループのペプチドにおいても N 末端と C 末端に含まれるアミノ酸には違いがみられなかった。本研究では、その他の POT についても同様にジペプチドライブラリーの網羅的解析によって基質多選択性を明らかとした。

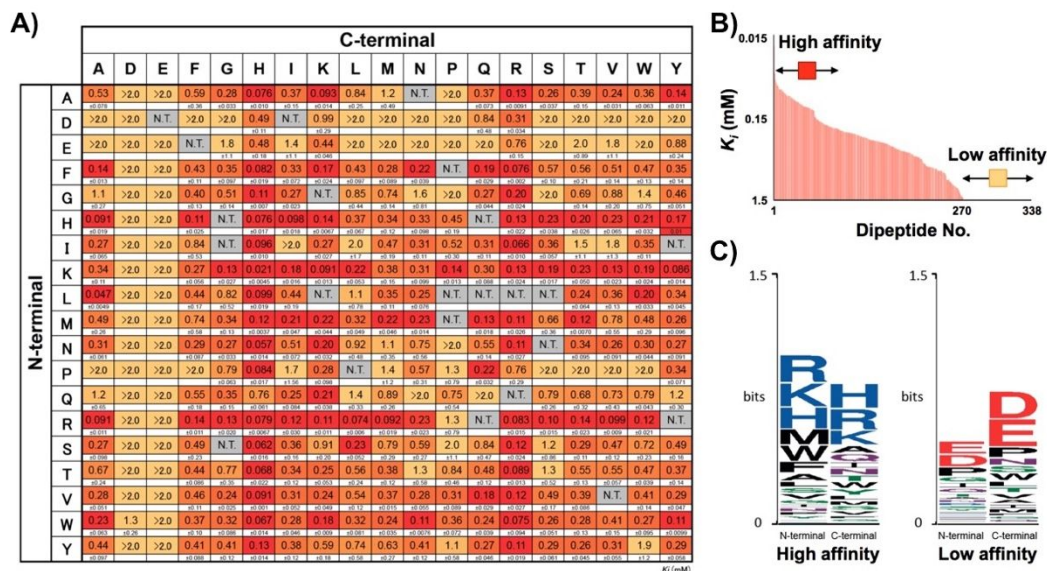


図 1 cePEPT1 の基質多選択性 A) ジペプチドライブラリーの網羅的解析データ。赤が濃いセルのジペプチドほど親和性が高いことを示す。B) cePEPT1 親和性の分布。C) 高・低親和性ジペプチドに含まれるアミノ酸残基の出現頻度

(2) POT の多基質認識メカニズムの解析 各 POT に対して得られたジペプチドライブラリーの網羅的解析データを用い、各種物理化学的指標を用いた重回帰分析により、POT 親和性を予測する機械学習モデルを構築した (図 2)。このモデルは、ジペプチド全体を一つの化合物として捉え、“各空間座標における物理化学的指標の総和”をアルゴリズムとする *in silico* 基質親和性予測モデルである。結果として、cePEPT1 の場合、pKa、ALogP、Molecular_SurfaceArea、NumAliphaticDoubleBonds に代表される指標の組み合わせによって構築されたモデルにより、88.3% の高精度でジペプチド親和性を予測できることが示された。その他の真核生物 POT である caPTR2、scPtr2p、atNPF8.2、hsPEPT2 においても、同様の物理化学的指標の組み合わせが選ばれ、予測精度はそれぞれ 89.4%、94.5%、89.4%、87.9%であった。このことから、真核生物 POT の他基質認識メカニズムは種を超えて保存されていることが示唆された。

(3) POT の基質多選択性の生物学的意義 6 種類の POT の基質多選択性解析の結果から、真核生物 POT は芳香族・分岐鎖・塩基性アミノ酸をジペプチド形態で高効率に取り込む共通した性質をもつことが示唆された。これらのアミノ酸は生合成に多段階の酵素反応が要求されるため、一般に生体にとって価値が高く、多くの動物において外界からの摂取が不可欠な必須アミノ酸となっている。一方で酸性アミノ酸は TCA サイクルから少ないステップで生合成できるため、外界から吸収する必要性は比較的少ないと考えらる。POT の基質多選択性が生体におけるアミ

ノ酸の摂取価値と対応していることは生物学的に理にかなっており、大変興味深い。

以上のように、本研究により、真核生物POTの基質多選択性はヒト必須アミノ酸のような生合成の困難なアミノ酸を取り込む仕組みとして高度に保存されていることが明らかとなった。得られた知見は、スポーツ用途食品や経腸栄養剤など、ペプチド栄養を活用する食品の開発、また微生物の発酵基材、植物用肥料など幅広い分野に応用が期待できる。

Parameter	Group	CaPTR2	Ptr2p	cePEPT1	NPF8.2	hPEPT2
pKa.1.	Class A					
pKa.2.						
Molecular_Solubility						
Num_UnknownTrueStereoAtoms	Class B					
ALogP						
Minimized_Energy	Class C					
Num_Rings5						
Molecular_Volume	Class D					
Molecular_SurfaceArea						
Molecular_Weight						
Num_Atoms						
Num_ExplicitAtoms						
Num_Bonds						
Num_ExplicitBonds						
Num_SingleBonds						
Num_AtomClasses						
Num_RingBonds						
Num_Rings	Class E					
Num_RingAssemblies						
Num_AromaticBonds						
Num_AromaticRings						
Num_DoubleBonds						
Num_Rings6	Class F					
Num_ChainAssemblies						
Num_H_Donors	Class G					
Num_H_Acceptors						
Num_AliphaticDoubleBonds						
Num_TerminalRotomers	Class H					
Num_RotatableBonds						
Num_Hydrogens						
Num_AliphaticSingleBonds						
Num_Chains	Class I					
Num_StereoAtoms						

図2 物理化学的指標を用いた *in silico* 親和性予測モデル。セルは赤が濃いほどその指標が親和性にポジティブな影響を、青が濃いほどネガティブな影響を与えることを示す。

< 参考文献 >

- 1) Daniel, H., Spanier, B., Kottra, G., Weitz, D. From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda)* **21**, 93-102 (2006).
- 2) Matthews, D.M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.* **55**, 537-608 (1975).
- 3) Biegel A., Knütter I., Hartrodt B., Gebauer S., Theis S., Luckner P., Kottra G., Rastetter M., Zebisch K., Thondorf I., Daniel H., Neubert K., Brandsch M. The renal type H+/peptide symporter PEPT2: structure-affinity relationships. *Amino Acids* **31**, 137-156 (2006).
- 4) Ito K., Hikida A., Kawai S., Lan V.T.T., Motoyama T., Kitagawa S., Yoshikawa Y., Kato R., Kawarasaki Y. Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. *Nat. Commun.* **4**, 2502 (2013).
- 5) Newstead S., Drew D., Cameron A.D., Postis V.L.G., Xia X., Fowler P.W., Ingram J.C., Carpenter E.P., Sansom M.S.P., McPherson M.J., Baldwin S.A., Iwata S. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J.* **30**, 417-426 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 I. Ojiroa, H. Nishioa, T. Yamazaki-Ito, S. Nakanoa, S. Ito, Y. Toyohara, T. Hiramoto, Y. Terada, K. Ito.	4. 巻 85
2. 論文標題 Trp-Trp acts as a multi-functional blocker for human bitter taste receptors, hTAS2R14, hTAS2R16, hTAS2R43, and hTAS2R46.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1526-1529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Tsuchiya, Y. Terada, M. Matsuyama, T. Yamazaki-Ito, K. Ito.	4. 巻 85
2. 論文標題 A new screening method for identifying chemosensory receptors responding to agonist.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1521-1525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Matsuyama, Y. Terada, T. Yamazaki-Ito, K. Ito.	4. 巻 10
2. 論文標題 A luminescence-based human TRPV1 assay system for quantifying pungency in spicy foods.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods10010151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 K. Ito, M. Koike, Y. Kuroda, T. Yamazaki-Ito, Y. Terada, T. Ishii, Y. Nakamura, T. Watanabe, Y. Kawarasaki.	4. 巻 27
2. 論文標題 Bitterness-masking peptides for epigallocatechin gallate identified through peptide array analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res.	6. 最初と最後の頁 221-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Ito, T. Hosoya, T. Yamazaki-Ito, Y. Terada, Y. Kawarasaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase IV inhibitory dipeptides contained in hydrolysates of green tea grounds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res.	6. 最初と最後の頁 329-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.27.329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Yamamoto, Y. Terada, T. Motoyama, T. Saito, K. Ito.	4. 巻 521
2. 論文標題 Sweet proteins lysozyme and thaumatin are protein-type agonists for the calcium-sensing receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 227-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Yamamoto, Y. Terada, T. Motoyama, M. Shibata, T. Saito, K. Ito.	4. 巻 84
2. 論文標題 N-terminal [Glu]3 moiety of -glutamyl peptides contributes largely to the activation of human calcium-sensing receptor, a kokumi receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1497-1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1743169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤圭祐、加藤竜司、杉山栄二、水野初、轟木堅一郎、寺田 祐子
2. 発表標題 機械学習モデルを用いたジペプチドの網羅的分析挙動・機能性の予測
3. 学会等名 クロマトグラフィー科学会議 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤圭祐、河合駿
2. 発表標題 プロトン共役型オリゴペプチド輸送体の基質多選択性解析
3. 学会等名 日本生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾城一恵、西尾洋美、伊藤豊実、豊原良和、平本忠浩、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 アゴニスト構造を元に見出したヒト苦味・甘味受容体共阻害ペプチド
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田祐子、中山綾花、久田拓海、藤谷将也、福井芹菜、蟹江慧、加藤竜司、繁田亮、杉山栄二、水野初、轟木堅一郎、伊藤圭祐
2. 発表標題 DMT-(S)-Pro-OSu誘導体化によるジペプチド一斉分析法の開発と発酵カカオ豆の成分プロファイリング
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本深月、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 甘味タンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いたCaSR相互作用領域の解析と高活性“コク味”ペプチドの創製
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本深月、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 甘味タンパク質の分子表面から新たに見出した“コク味”受容体(CaSR)活性化ペプチド
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 竜司 (kato Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	田中 瑞己 (Tanaka Mizuki) (70803344)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	
研究分担者	河原崎 泰昌 (Kawarasaki Yasuaki) (80303585)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------