

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560060

研究課題名(和文) ヒト小腸輸送体を介する新たな食品機能成分吸収プラットフォーム

研究課題名(英文) Constructing ligand affinity prediction model of proton-coupled oligopeptide transporter to screen functional food ingredients as novel substrates

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド輸送体はその特徴的な“基質多選択性”によって多種多様なジ・トリペプチドや各種医薬品を輸送できる。本研究では食品機能性成分がペプチド輸送体を介して輸送される可能性を検討するため、ヒトペプチド輸送体hPEPT2について、ジペプチドライブラリーの解析データを用いてin silico親和性予測モデルを構築した。食品機能性成分を解析した結果、輸送体親和性を示す新規基質候補としてシニグリン、S-アデノシルメチオニンが見出された。

研究成果の概要(英文)：The entire spectrum of substrate multispecificity of human peptide transporter, hPEPT2, was elucidated by the analysis using a dipeptide library. Using the dataset of dipeptide sequence with its affinity data, in silico affinity prediction models were constructed. The model construction process guided the understanding of dipeptide interactions with hPEPT2. Three physicochemical property features “Side-chain contribution to protein stability”, “Side chain interaction parameter” and “Isoelectric point” can be considered as the main determining factors for dipeptide recognition of hPEPT2. An in silico affinity prediction model using “combinations of physicochemical compound properties” was also constructed with reasonable accuracy. This concept is applicable to screen functional food ingredients, in addition to 8,400 types of di/tripeptides, as novel substrates for the peptide transporter.

研究分野：食品機能開発化学

キーワード：ペプチド輸送体

1. 研究開始当初の背景

如何に優れた活性を持つ食品機能成分であっても、標的に作用しなければその効果は発揮されない。例えば緑茶 EGCG の場合、ヒトでの生体吸収率が 0.01%にも満たないため、機能性を期待するために苦味を我慢して多量摂取せざるを得ないのが現状である。このように食品成分の生体吸収は食生活と密接に関わるため、新たな生体吸収経路の探索は、食品機能成分の有効活用につながると期待される。

ヒト小腸には栄養素吸収に関わる様々な輸送担体が存在するが、中でも特にプロトン共役型のオリゴペプチド輸送体は多様なバリエーションの基質群を認識する“基質多選択性”を持つことが特徴である。ペプチド輸送体は基質多選択性によって食品たんぱく質に由来する 8,400 種類のジ・トリペプチドや各種医薬品を認識でき、それらの輸送担体として機能している。ペプチド輸送体の基質多選択性は、基質となり得る未知化合物が多く存在することを示唆するが、全ての基質に共通する構造的特徴は見出されておらず、未解析化合物がペプチド輸送体の基質となるかどうかは一義的には判別できない (Smith et al. *Mol. Asp. Med.* 2013)。

2. 研究の目的

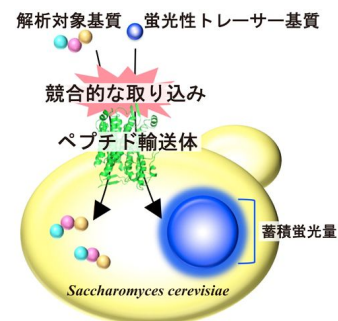
これまで、ペプチド以外の食品成分を対象としたヒト小腸ペプチド輸送体の基質探索はなされていなかった。一方でペプチド輸送体の基質多選択性は医薬品開発においては重要視されており、ラクタム系抗生物質、抗がん剤、血圧上昇抑制剤、抗ウイルス薬等、バリエーションに富んだ医薬品がペプチド輸送体を介して吸収され、優れた生物学的利用能 (Bioavailability) を示すことが実証されている (Smith et al. *Mol. Asp. Med.* 2013 等)。これら医薬品の多くはペプチドの構造をベースに化学的に合成されたものであるが、ラクタム系抗生物質等、一部の医薬品はアミノ酸を生合成原料とする二次代謝産物である。そのため、ペプチド輸送体は分子全体もしくはその一部がペプチド (アミノ酸) に類似している化合物を基質として認識することで、様々な医薬品の輸送担体としても働くと考えられた。カプサイシンやレスベラトロール等の多くの食品機能性成分もアミノ酸を生合成原料とする植物二次代謝産物であることから、これら食品機能性成分の中には、ペプチド輸送体の潜在的な基質が存在する可能性が考えられた。

そこで本研究では、ペプチド輸送体の基質多選択性が食品機能性成分の新たな吸収プラットフォームとして機能する可能性を検討するため、ヒトペプチド輸送体の基礎的性質を明らかかするとともに、新規基質を探索した。

3. 研究の方法

我々はこれまでに酵母ペプチド輸送体 Ptr2p をモデルとして新規ペプチド輸送体解析システムを開発し、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”を世界で初めて解明した (Ito et al. *Nature Commun.* 2013)。開発したシステムは、ペプチド輸送体を酵母細胞表面に発現させ、解析対象基質と同時に取り込ませた蛍光性トレーサー基質を定量する方法である。ペプチド輸送体への解析対象基質の親和性は蓄積蛍光量の減少から K_i 値として算出される。当該システムは他の方法と比較して非常に高いスループットが特徴であり、ジペプチドライブラリーの解析から得られた大量の実測データを各種物理化学的因子を用いて重回帰分析することで、ペプチド輸送体への未解析化合物の親和性を 97%の高精度で予測できる *in silico* モデルを構築することにも成功した。

本研究では、ヒトペプチド輸送体 hPEPT2 について基質多選択性を解明し、同様に *in silico* 親和性予測モデルを構築した。モデルを用いて各種食品機能性成分の親和性を予測し、有望と見られたいくつかの成分については実際に hPEPT2 への基質親和性を評価した。

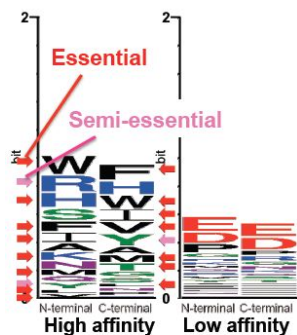


4. 研究成果

hPEPT2 の基質多選択性について、ジペプチドライブラリーを用いて網羅的に解析した。合成可能な 338 種のジペプチドのうち、321 種についての K_i 値が算出され、 K_i 値は 0.0055 mM 以下から 0.55 mM 以上まで幅広く分布していることが明らかとなった。平均的なジペプチド (全体の 1/2 番目のジペプチド) の K_i 値は 0.033 mM であり、Ptr2p での値 (0.34 mM) と比較して 1/10 であった。網羅的な親和性データに基づき、高親和性ジペプチド ($K_i < 0.025$ mM, 全体の 1/4 番目まで) と低親和性ジペプチド (> 0.1 mM, 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。その結果、高親和性グループには芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、正電荷を有するアミノ酸が高頻度に見られ、高親和性グループのジペプチドの N 末端には特に塩基性アミノ酸が高頻度に含まれていた。こ

れは、高親和性ジペプチドグループのN末端とC末端に高頻度に含まれるアミノ酸の種類がほとんど同じであるPtr2pとは異なっていた。一方、低親和性グループには高頻度に負電荷のアミノ酸が含まれていた。低親和性グループについては、ジペプチドのN末端とC末端に含まれるアミノ酸の違いはみられなかった。

hPEPT2の基質多選択性から、この輸送体が芳香族・分岐鎖・塩基性アミノ酸を含むペプチドを高効率に取り込む役割を担っていることが示唆された。芳香族・分岐鎖・塩基性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、生体にとって高い価値をもち、結果として、これらのアミノ酸の多くはヒトにおいては外界からの摂取が不可欠な必須・準必須アミノ酸となっている。すなわち、hPEPT2の基質多選択性が、生体にとって価値の高いこれらのアミノ酸を漏れなく再吸収するための仕組みであることが示唆された。低親和性グループのジペプチドには酸性アミノ酸が高頻度に含まれていたが、これらのアミノ酸はTCAサイクルから少ないステップで生合成できるため、再吸収の必要性が比較的少ないと考えられる。ペプチド輸送体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、興味深い。



高・低親和性ペプチドに含まれるアミノ酸残基の出現頻度

続いて、ジペプチドライブラリーの解析から得られた多数の K_i データ群を用い、判別分析による *in silico* 親和性予測モデルを構築した。544 種報告されている各種アミノ酸指標を 13 のクラスターに分類し、それぞれの代表的なアミノ酸指標を用いて *in silico* モデルを構築した。モデル構築過程では、主に 3 つのアミノ酸指標 “Side-chain contribution to protein stability”、“Side chain interaction parameter”、“Isoelectric point” が大きく寄与しており、このモデルによるジペプチド親和性の正答率は 87.9%であった。さらに、医薬品の親和性予測へ応用するため、化合物の物理化学的指標のみを用いたモデルを構築した結果、この条件においてもジペプチド親和性の正答率は 80%以上を維持していた。物理化学的指標のみを用いたモデルにより各種医薬品の親和性を予測した結果、ジペプチドと同等

の分子量 400 以下の医薬品については、親和性予測が可能であった。これまで、ペプチド輸送体に対する医薬品の親和性は Quantitative structure-activity relationship (QSAR) 解析により予測可能であることが報告されているが、我々の構築した *in silico* 親和性予測モデルは立体構造情報を必要とせず、化合物の構造式のみから導き出せる単純な物理化学的指標をベースにしている点が特徴である。これは膨大な数の未解析化合物を *in silico* でスクリーニングする際に大きなアドバンテージとなると期待できる。

hPEPT2	Coefficients
Num_AliphaticSingleBonds	0.649
Num_AliphaticDoubleBonds	0.545
Num_H_Acceptors	0.480
Num_ChainAssemblies	0.254
Num_TerminalRotomers	0.247
pKa.1.	0.000
ALogP	0.000
Molecular_Weight	0.000
Minimized_Energy	0.000
Molecular_Volume	0.000
Molecular_Solubility	0.000
Num_Atoms	0.000
Num_Bonds	0.000
Num_Hydrogens	0.000
Num_ExplicitAtoms	0.000
Num_ExplicitBonds	0.000
Num_RingBonds	0.000
Num_RotatableBonds	0.000
Num_AromaticBonds	0.000
Num_Rings	0.000
Num_AromaticRings	0.000
Num_RingAssemblies	0.000
Num_Rings5	0.000
Num_Rings6	0.000
Num_Chains	0.000
Num_SingleBonds	0.000
Num_DoubleBonds	0.000
Num_AtomClasses	0.000
Num_UnknownTrueStereoAtoms	0.000
Num_StereoAtoms	-0.278
Molecular_SurfaceArea	-0.389
pKa.2.	-0.508
Num_H_Donors	-0.566

hPEPT2への親和性に寄与する物理化学的指標

生化学的解析、*in silico* 解析を合わせて各種食品機能性成分の hPEPT2 親和性を解析した結果、ワサビやダイコン等のアブラナ科植物に含まれるグルコシノレート(シニグリン)が hPEPT2 の新規基質候補として見出された。シニグリンの生合成原料はメチオニンであるため、アグリコン(イソチオシアネート)部位にはアミノ酸様の物理化学的性特徴が残っており、さらに分子量(397)がジペプチドと近いため、ペプチド輸送体によって認識されたと考えられる。しかし一方で、食品として摂取したシニグリンは腸内細菌により分解され、アグリコンであるイソチオシアネートとして生体膜を透過して吸収されたと考えられている。本研究により見出されたペプチド輸送体への親和性は必ずしも高くはなく、新たな吸収プラットフォームとして機能するかどうかは今後の検討が必要である。

また hPEPT2 が腎臓だけでなく脳にも発現していることに着目し、脳機能改善効果が報告されている食品機能性成分を中心に基質候補を探索した。その結果、核酸系化合物に高い親和性があることを見出した。特に親和性が高かった化合物は S-アデノシルメチオニン(SAM)であった。本研究成果は SAM の

脳機能改善作用についての科学的エビデンスの一つとなる可能性があり、引き続き詳細な検討が必要である。

本研究では前述した以外にも、生体内へ吸収され得る機能性ペプチドの解析、および苦味マスキング効果の期待できる味覚修飾ペプチドの解析も合わせて進めた。

本研究では、hPEPT2の基質多選択性に着目し、*in silico* 親和性予測モデルを開発するとともに、新規基質候補を探索した。構築した予測モデルは化合物の“各空間座標における物理化学的因子の総和”をアルゴリズムのベースにしており、食品機能成分の親和性予測にも応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

M. Oho, K. Ito, V.T.T. Lan, M. Kusubata, C. Tometsuka, Y. Koyama, T. Motoyama, S. Ito, Y. Kawarasaki. Synergistic inhibition of human dipeptidyl peptidase IV by combinations of peptides. *Peptides* 2015 69 115-117.

V.T.T. Lan, K. Ito, M. Ohno, T. Motoyama, S. Ito, Y. Kawarasaki. Analyzing a dipeptide library to identify human dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Food Chem.* 2015 15(175) 66-73.

V.T.T. Lan, K. Ito, S. Ito, Y. Kawarasaki. Trp-Arg-Xaa tripeptides act as uncompetitive-type inhibitors of human dipeptidyl peptidase IV. *Peptides* 2014 54 166-170.

[学会発表](計10件)

中山綾花、Vu Thi Tuyet Lan、河合駿、蟹江慧、加藤竜司、河原崎泰昌、伊藤圭祐 “超”高親和性型ペプチド輸送体の発見と輸送体工学への応用 第69回日本生物工学会大会 東京 2017年9月11-14日 大会トピックス

伊藤圭祐、河合駿、本山貴康、加藤竜司、河原崎泰晶 大豆の健康成分を科学する～大豆の生理活性成分とその生理作用の科学～「大豆ペプチドの優れた生体吸収性に寄与する POT ファミリー輸送体の基質多選択性」 日本農芸化学会 2016年度大会 札幌 2016年3月 招待講演(シンポジウム)

小池 麻友、黒田 侑希、伊藤圭祐、石井剛志、中村 順行、渡辺 達夫、河原崎 泰昌 食素材蛋白質の網羅的ペプチドアレイを用いた苦味マスキング剤の新規探索法 ～茶殻RubisCo由来EGCG結合ペ

プチドの解析例～ 日本農芸化学会 2016年度大会 札幌 2016年3月 トピックス賞選定

小池麻友、黒田侑希、伊藤圭祐、石井剛志、中村順行、渡辺達夫、河原崎泰昌 緑茶の苦渋味マスキング剤となる茶殻由来ペプチド 平成27年度日本食品科学工学会中部支部大会 名古屋 2015年12月 優秀賞

伊藤圭祐、Vu Thi Tuyet Lan、河合駿、本山貴康、加藤竜司、河原崎泰昌 ペプチドの生体吸収を担う腸管輸送体cePEPT1の基質多選択性 第67回日本生物工学会大会 鹿児島 2015年10月

伊藤圭祐、大野真澄、Vu Thi Tuyet Lan、本山貴康、楠畑雅、遠目塚千紗、小山洋一、伊藤創平、河原崎泰昌、ジペプチドによるインクレチン加水分解酵素阻害データの網羅的取得とその応用 日本農芸化学会 2015年度大会 岡山 2015年3月 トピックス賞

大野真澄、Vu Thi Tuyet Lan、伊藤圭祐、本山貴康、楠畑雅、遠目塚千紗、小山洋一、伊藤創平、河原崎泰昌 他のインクレチン加水分解酵素阻害ペプチドの効果を増強する新タイプ機能性ペプチドの発見 平成26年度日本食品科学工学会中部支部大会 名古屋 2014年12月 優秀賞

伊藤圭祐 プロトン共役型オリゴペプチドトランスポーターの基質多選択性 第9回トランスポーター研究会年会 名古屋 2014年6月 招待講演(シンポジウム)

K. Ito, S. Kawai, T. Motoyama, Y. Yoshikawa, R. Kato, Y. Kawarasaki. Substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter, *Saccharomyces cerevisiae* Ptr2p. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, December 2015

M. Koike, K. Ito, Y. Kuroda, T. Ishii, Y. Nakamura, T. Watanabe, Y. Kawarasaki EGCG-binding peptides from green tea leaves as bitterness-masking agents. The 20th Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka, November 2015 Poster Award

[図書](計3件)

伊藤圭祐 バイオメディア ちぎって取り込むペプチド輸送 生物工学会誌 74巻11号 2016年709

伊藤圭祐、疋田礼、河合駿、Vu Thi Tuyet Lan、本山貴康、北川さゆり、吉川悠子、加藤竜司、河原崎泰昌 食品ペプチド・医薬品の生体吸収性に関する POT フ

アミリー輸送体の基質多選択性 日本
食品・機械研究会誌 2014 34(2) 79-87.
伊藤圭祐 河原崎泰昌 食・薬成分の生体吸
収に関わるペプチド輸送体の基質多選択性
バイオサイエンスとインダストリー 2014
72(2) 130-131.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤圭祐 (ITO, Keiuske)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号：40580460

(2) 研究分担者

三好規之 (MIYOSHI, Noriyuki)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号：70438191