

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702002

研究課題名(和文)ペプチド栄養の根幹 - - 生体吸収スペクトル - - の完全解明

研究課題名(英文)Analyzing the substrate multispecificity of human peptide transporter

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロトン共役型オリゴペプチド輸送体(POT)は8,400種類のジ・トリペプチドを輸送する“基質多選択性”を有し、生体内への窒素栄養源の高効率な吸収に重要な役割を担っている。本研究では、ヒトhPEPT2をはじめとする5種類の真核生物POTについて、ジペプチドの網羅的親和性解析によって基質多選択性の全貌を解明した。hPEPT2はヒト必須・準必須アミノ酸である芳香族・分岐鎖アミノ酸含有ペプチドを高効率に取り込むことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Proton-coupled oligopeptide transporter (POT) family proteins are characterized by their substrate multispecificity that one transporter can recognize as many as 8,400 types of di/tripeptides as substrates. This unique characteristic enables certain types of drugs to be absorbed by the human intestine and kidney. In this study, we elucidated the substrate multispecificity of human PEPT2 by the comprehensive analysis using a dipeptide library. Dipeptides that comprised aromatic amino acids and branched-chain amino acids displayed high-affinity for hPEPT2. The biosynthesis of aromatic amino acids and branched-chain amino acids requires the expression of multiple enzymes and involves energy-consuming reactions. Therefore, the substrate multispecificity of hPEPT2 is suitable to import the high-value amino acids.

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

ヒトが摂取した食品たんぱく質は、消化管プロテアーゼによる加水分解の後、ペプチドもしくはアミノ酸形態として小腸上皮細胞より吸収される。特にペプチド形態での吸収はアミノ酸形態よりも高効率であり、窒素源の吸収実体として中心的な役割を果たしている (Matthews *Physiol. Rev.* 1975)。この特徴から、ペプチド性食品素材はアミノ酸源の優れた吸収性が要求される経腸栄養剤やスポーツ用途食品等として広く活用されている。しかし一口にペプチドといってもそのバリエーションは膨大であり、例として天然たんぱく質中に存在する 20 種類のアミノ酸が 2 個または 3 個結合したジ・トリペプチドに限っても 8,400 種類もの数が存在するため、どの種類のペプチドがどの程度吸収されやすいのか？ という本質的な疑問は解明されていない。この“生体吸収スペクトル”はペプチド栄養の根幹として重要であるにもかかわらず、解析が困難であったために、これまで着手されてこなかった。

ヒトにおいて体内へのペプチド吸収を担う輸送体は、プロトン共役型オリゴペプチドペプチド輸送体 (POT) ファミリーに属する hPEPT1 および hPEPT2 である (Daniel et al. *Physiology (Bethesda)* 2006)。これらのペプチド輸送体は各種アミノ酸輸送体と協働して体内窒素源の恒常性維持に寄与しており、小腸では hPEPT1 が食品たんぱく質由来ジ・トリペプチドの吸収を担い、腎臓では hPEPT2 が原尿から血中へのジ・トリペプチドの再吸収を担っている。ペプチド輸送体は膨大なバリエーションを持つ基質群を認識する“基質多選択性”をもつことが特徴であり、その結果、ラクタム抗生物質、血圧上昇抑制剤、抗がん剤等の各種医薬品の吸収担体としても機能している。これは医薬品の生体利用効率や血中半減期に直接寄与する他、抗インフルエンザ薬タミフルや血圧上昇抑制剤カプトプリルの吸収 (薬効) が食品たんぱく質の同時摂取によって阻害される原因でもある (Morimoto et al. *J. Pharm. Sci.* 2011)。



近年、原核生物由来ペプチド輸送体の立体構造が相次いで解明された (Newstead et al. *EMBO J.* 2011, Solcan et al. *EMBO J.* 2012, Doki et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013)。これらはヒトペプチド輸送体の構造モデルとして利用できると考えられており、

多基質認識メカニズムを分子レベルで解明するために大きな意義を持つ。しかし一方で、栄養ペプチドの生体吸収スペクトルを明らかにするためには、“基質多選択性”の直接解析、すなわち基質ペプチドの網羅的親和性解析が不可欠である。

2. 研究の目的

我々はペプチド輸送体の新規ハイスループット解析システム (Fluorescence-based Competitive Uptake assay: F-CUp assay) を開発することで、世界に先駆けて酵母ペプチド輸送体の基質多選択性の解析に成功した (Ito et al. *Nature Commun.* 2013)。本研究では、開発したペプチド輸送体解析システムを基盤技術として、小腸、腎臓に発現するペプチド輸送体の基質多選択性を解明することを目的とした。

		C-terminal																			
		A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
N-terminal	A	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	D	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	E	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	F	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	G	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	H	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	I	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	K	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	L	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	M	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	N	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	P	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	Q	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	R	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	S	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	
	T	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	-0.77	
	V	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	-0.77	
	W	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	-0.77	
	Y	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	-0.77	0.46	

酵母ペプチド輸送体の基質多選択性 (ジペプチド) 色が濃い程、親和性が高い

3. 研究の方法

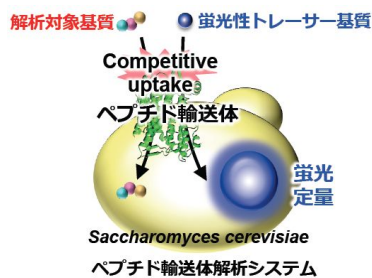
ペプチド輸送体の基質多選択性の全貌を解明するためには、可能な限り多くの基質の親和性 (ペプチド輸送体を介した吸収性) を調べる必要がある。すなわち、本研究成功のカギとなるのはハイスループットな解析システムである。

本研究に先立ち開発したペプチド輸送体のハイスループット解析システムは、酵母細胞表面に発現させたペプチド輸送体を介して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の定量を原理とする。解析対象基質のペプチド輸送体への親和性は蓄積蛍光量の減少から K_i 値として算出できる。従来、ペプチドの生体吸収性解析には、動物にペプチドを摂取させ血中アミノ酸の濃度変化を解析する方法、またはペプチド輸送体を発現させた培養細胞を用いて放射性ラベル化ペプチドの取り込みを定量する方法のどちらかが利用されてきた。これらに対し当該システムは非常に高いスループットがアドバンテージである。

本研究ではヒト小腸 (hPEPT1)、腎臓ペプチド輸送体 (hPEPT2) の他、生物種間におけるペプチド輸送体の基質多選択性の保存性を解析するため、シロイヌナズナ (NPF8.2)

線虫 (cePEPT1)、カンジダ酵母 (caPTR2)、枯草菌 (YcIF) のペプチド輸送体について、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (By4742_ptr2) を宿主とした発現系を構築した。続いて各 POT 発現酵母株を用いて蛍光基質 Ala-Lys(AMCA)の取り込み量を調べ、 K_m 値を算出した。また基質取り込み阻害の定量評価により、阻害定数 K_i 値として基質親和性を算出することで、ジペプチドライブラリーを用いた網羅的解析によって、各ジペプチドの親和性 (輸送特性) を明らかとした。

さらに、ジペプチドライブラリーの解析から得られた網羅的親和性データを用い、544 種類のアミノ酸指標を用いた重回帰分析により、*in silico* の基質親和性予測モデルを構築した。



4. 研究成果

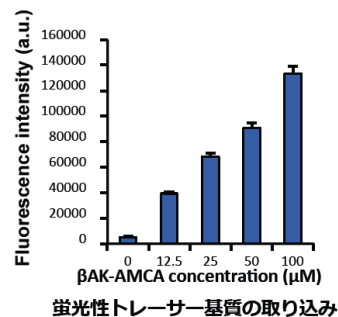
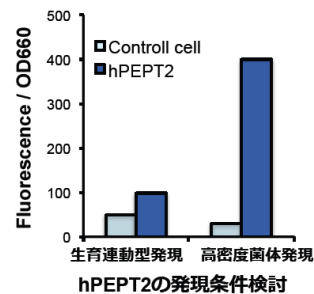
hPEPT2 (Uniprot: Q16348) の cDNA を用いて *S. cerevisiae* 発現系を構築し、hPEPT2-GFP 融合タンパク質の細胞内局在を解析した結果、hPEPT2-GFP は細胞膜への局在が確認された。続いて *S. cerevisiae* のもつ唯一の POT である Ptr2p を欠損した変異株を宿主として、hPEPT2 を介したペプチド取り込みを解析した。His および Leu 要求性である宿主株は SG-LH (+Leu-His ペプチド) 寒天培地上で生育しなかったのに対し、hPEPT2 発現株はコロニーを形成したことから、hPEPT2 がペプチド輸送能を有することが示された。続いて最適な発現条件を検討した結果、高密度菌体発現法 (Kimata et al. *J. Biosci. Bioeng.* 2012) により、hPEPT2 の細胞当たりの発現量は通常の生育連動型発現と比較して 4 倍程度増加した。本条件にて hPEPT2 発現株を作製し、蛍光性トレーサー基質である

Ala-Lys(AMCA)の輸送能を解析した結果、濃度依存的な輸送が確認され、速度論的解析により、その K_m 値は 0.05 mM と算出された。この値は *S. cerevisiae* Ptr2p の K_m 値 (0.20 mM) と比較して顕著に低かったことから、hPEPT2 が高親和性型の輸送体であることが確認された。

続いてジペプチドライブラリーを用いて網羅的な親和性解析を行なった結果、hPEPT2 親和性はジペプチドごとに 500 倍以上大きく異なることが明らかとなった。WebLogo プログラムにより高・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を解析した結果、高親和性ジペプチドには芳香族・分岐鎖

アミノ酸等のヒト必須アミノ酸が高頻度に含有されていた。一方で低親和性ジペプチドには酸性アミノ酸や Pro、Gly を含有するジペプチドが高頻度に含有されていた。この“基質多選択性”の全体像は、過去に我々が明らかとした出芽酵母 Ptr2p の基質多選択性と類似していた。ヒト小腸に発現するペプチド輸送体である hPEPT1 に関しては、これまでに一部のジペプチドについてしか親和性が明らかとなっていないものの、やはり hPEPT2 との類似性が示唆された。本研究成果は、POT の基礎的性質や生物学的意義の解明につながる期待される。

ジペプチドライブラリーの網羅的解析データと、544 種類のアミノ酸指標、および各種物理化学的指標を用いた重回帰分析により、基質認識に寄与する因子の解析を行なった。その結果、hPEPT2 は “Normalized van der Waals volume” や “Isoelectric point” 等のアミノ酸指標に基づいて基質を認識すること、またその結果として、ヒト必須・準必須アミノ酸含有ペプチドを優先的に輸送することが明らかとなった。また同時に 90% 以上の高い精度をもつ *in silico* 親和性予測モデルの構築に成功した。今後本モデルは新規基質の探索等に利用できる可能性がある。



		C-terminal																			
		A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
N-terminal	A	0.004	0.02	0.19	0.12	0.15	0.02	0.02	0.06	0.00	0.00	NT	0.00	0.04	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	D	0.23	0.06	NT	0.11	0.21	0.23	NT	0.06	0.11	0.04	0.20	0.50	0.00	0.00	0.17	0.10	0.10	0.10	0.04	
	E	0.04	0.00	0.00	NT	0.10	0.00	0.12	0.00	0.10	0.16	0.27	0.00	0.00	0.26	0.06	0.10	0.10	0.10	0.00	
	F	0.00	0.20	0.20	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	K	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	M	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Q	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	R	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	T	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	W	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Y	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

hPEPT2の基質多選択性 (Ki値: 色の濃いセルのジペプチド親和性が高い)

また本研究では、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、前述のように hPEPT2 の基質多選択性の全貌を解明するとともに、5 種類の POT について基質多選択性の全貌を明らかにした。今後、得られた知見が食品や医薬品の開発へ応用されることが期待される。

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、河原崎泰昌 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 ファ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

ストーリー 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