

大豆たん白質加水分解物の発酵特性へ寄与する ペプチド輸送体の基質多選択性の解明

伊藤圭祐*¹・本山貴康²・北川さゆり³・加藤竜司¹・河原崎泰昌¹

¹静岡県立大学食品栄養科学部 ²不二製油株式会社基盤研究所 ³不二製油株式会社食品素材研究所

Substrate Multispecificity of the Yeast Peptide Transporter Ptr2p

Keisuke ITO*¹, Takayasu MOTOYAMA², Sayuri KITAGAWA³, Ryuji KATO¹
and Yasuaki KAWARASAKI¹

¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526

²Soy protein, Processed Foods R & D Center, Fujioil Co., LTD., Izumisano 598-8540

³Food Science Research Institute, Research & Development Division, Fujioil Co., LTD.,
Tsukubamirai 300-2497

ABSTRACT

Peptide uptake systems that involve members of the proton-coupled oligopeptide transporter (POT) family are conserved across all organisms. Due to their substrate multispecificity, it is assumed that each of these POT family transporters can recognize as many as 8,400 types of di/tripeptides, which are products generated by protein hydrolysis, at a single substrate-binding site that resides on each transporter and can actively transport these peptides. The question 'how one substrate-binding site can recognize a variety of substrates?' is the major focus in peptide transport research. However, the entire spectrum of the substrate preference of POT family transporter has not been elucidated. In this study, the substrate multispecificity of Ptr2p, a major peptide transporter of *Saccharomyces cerevisiae*, was characterised by a comprehensive analysis using a dipeptide library. The affinities (K_i) of di/tripeptides toward Ptr2p showed a wide distribution range from 48 mM to 0.020 mM. The result also showed that dipeptides containing aromatic amino acids and branched-chain amino acids frequently appeared in the high-affinity group. This substrate multispecificity indicated that Ptr2p plays an important role in the preferential uptake of vital amino acids, which imposes a biosynthesis burden on yeasts. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 62-67, 2013.

Key words : peptide transporter, Ptr2p, substrate multispecificity, soy peptides,
Saccharomyces cerevisiae

*〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1

大豆たん白質加水分解物（大豆ペプチド）はその優れた発酵特性から「第3のビール」等の原材料として利用されている。我々は、ペプチド性培地による酵母の生育促進効果には、ペプチド輸送体Ptr2pを介したジ・トリペプチドの取り込みが重要であることを報告した¹⁾。Ptr2pの属するPOTファミリーのペプチド輸送体は全生物で保存されており、8,400種類のジ・トリペプチドを細胞内に輸送する幅広い“基質多選択性”を有するが²⁾、これまで、その詳細は解明されていない。

そこで本研究では、出芽酵母Ptr2pの基質多選択性の全貌解明を目的とした、酵母発現系と蛍光トレーサー基質（ β Ala-Lys (AMCA))を組み合わせることで、ペプチド輸送体へのペプチドの親和性 (K_i)をハイスループットに解析可能なFluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) assay systemを開発し、全400種類ジペプチドの親和性を網羅的に解析した結果、ジ・トリペプチドの親和性は最大で2,400倍以上も大きく異なることが明らかとなった。解明されたPtr2pの基質多選択性から、酵母は生合成の困難な芳香族・分岐鎖アミノ酸をペプチド形態として優先的に取り込むことが明らかとなり、高親和性ペプチドを培地アミノ酸源とした場合に酵母の生育が促進された。これらの結果から、芳香族・分岐鎖アミノ酸に富むことが大豆ペプチドの優れた発酵特性の要因として特定された。

方 法

Ptr2p発現酵母株の作成

Ptr2pの遺伝子配列は、*Saccharomyces cerevisiae* FGY217株のゲノムから、以下2つの特異的プライマー 5'-ACCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCATGCTCAACCATCCCAGCCAAG-3'と5'-AAATTGACCTTGAAAATATAAATTTTCCCCTCACTTGT CATCGTCGTCCTTGTAGTCATATTTGGTGGTG GATCTTAGAC-3'を用い、pRS426 GAL1_GFPプラスミドベクターへクローニングした。このベクターはGAL1プロモーター下流の遺伝子発現をガラクトースにより強力に誘導することが可能である³⁾。2%グルコース、0.1% yeast synthetic drop-out medium without uracil, 0.67% Yeast Nitrogen Base, を含む培地で24時間30℃で培養した菌体を、2%ガラクトースを含む培地にOD₆₀₀=0.05となるように植え継ぎ、24時間30℃で培養することでPtr2pの発現を行なった。

Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) 法によるPtr2p親和性の解析

Ptr2p発現酵母細胞を回収し、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、OD₆₀₀=15になるように菌体を懸濁した。0.05 mMのトレーサー基質（ β Ala-Lys (AMCA))と解析対象のペプチドを添加し、30℃で1時間インキュベートした。トレーサー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。解析対象ペプチドのIC₅₀値とトレーサー基質のKm値および使用濃度から、チェン・プルソフ式によってKi値を算出した⁴⁾。

結果と考察

Ptr2p発現系の構築

内因性ペプチド輸送体の影響を排除するため、Ptr2ノックアウト株 (BY4742-*ptr2Δ*) をPtr2p発現細胞 (SC-Ptr2p) の親株として用いた。Ptr2pの発現を確認するため、細胞膜画分をanti-FLAG抗体を用いてウエスタンブロットイングにより解析した結果、Ptr2pは単一のバンドとして68 kDaのサイズに検出され、完全な形で発現していた (Fig. 1a)。FLAG-tagの代わりにC末端へGFPを融合し、共焦点蛍光顕微鏡観察によってPtr2p-GFP融合たん白質の細胞表面への局在が確認されたことから (Fig. 1b)、酵母細胞で発現したPtr2pは正しくフォールディングされ、細胞膜へ運ばれたことが示された。続いて、SC-Ptr2p細胞のジペプチド取り込み能を解析するため、必須アミノ酸であるロイシンとヒスチジンをジペプチド形態 (His-Leu) で培地に添加し、寒天プレート上でのスポットアッセイを行なった (Fig. 1c)。親株と異なり、SC-Ptr2pはコロニーを形成した。これらの結果から、SC-Ptr2pにおいてPtr2pは活性型で細胞表面へ発現することが示された。

蛍光ラベル化トレーサー基質取り込みの定量解析

Ptr2pの機能解析には代謝的に安定な蛍光ラベル化トレーサー基質を用いた。トレーサー基質はPtr2pを介して取り込まれ、液胞へ蓄積した (Fig. 2a)。この取り込みはモデルジペプチド カルノシン (β Ala-His) によって阻害された。トレーサー基質の取り込みは時間依存的であり、親株における取り込み活性はごくわずかだった (Fig. 2b)。このトレーサー基質の取り込みは濃度依存的であり、ミカエリス・メンテン式によってKm値は0.16 mMと算出された (Fig. 2c)。F-CUp法によりアミノ酸、および鎖長の異なるペプチ

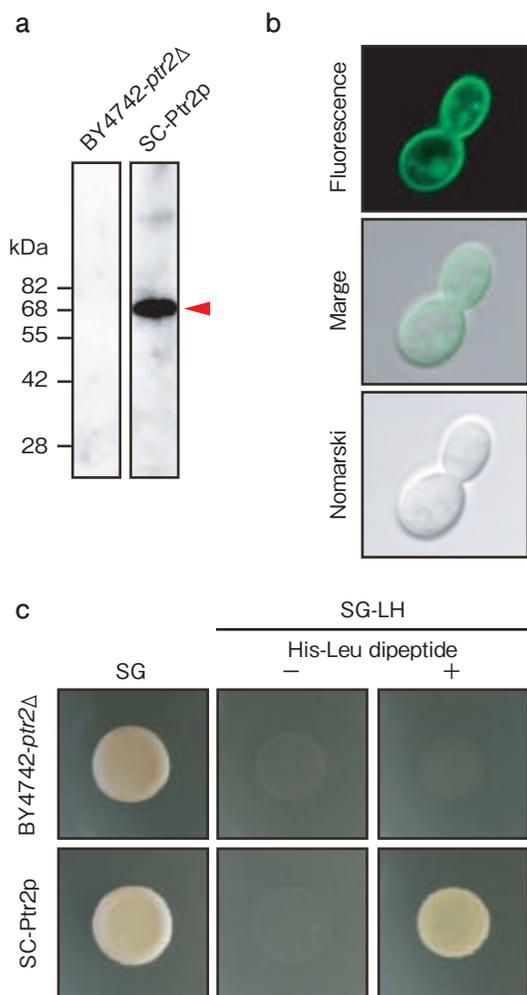


Fig. 1. Generation of Ptr2p expressing cells. (a) Western blot analysis of the membrane fraction prepared from SC-Ptr2p cells using an anti-FLAG antibody. Arrowhead indicates expressed Ptr2p. (b) Localization of a Ptr2p-GFP fusion protein using confocal fluorescence microscopy. (c) Spot assay. Dipeptide uptake capability of SC-Ptr2p cells was analysed. Leucine and histidine, which are required for the growth of strain BY4742, were added to medium in the form of a dipeptide (His-Leu).

ドを用いて親和性を解析した結果、Gly-Gly、Gly-Gly-Glyの K_i 値は17 mM、48 mMとそれぞれ算出された一方、アミノ酸やテトラペプチドの親和性は検出限界以下であった (Fig. 2d)。続いてアミノ酸配列の違いによりPtr2p親和性が異なるかどうかを調べるために、3つのジペプチド、Ala-Ala、Ala-Leu、Leu-Alaの親和性を解析した (Fig. 2e)。これらの親和性はLeu-Ala

($K_i=0.15$ mM)、Ala-Leu ($K_i=0.31$ mM)、Ala-Ala ($K_i=0.40$ mM) であり、同じアミノ酸組成であっても、その配列によってPtr2pへの親和性は異なることが示された。

Ptr2pへの親和性と酵母の生育の関連

Ptr2pへの親和性と酵母の生育の関連を解析した (Fig. 3)。His-Leu、Leu-His、Leu-Gly、Gly-Leuの K_i 値はそれぞれ0.050 mM、0.13 mM、0.36 mM、0.60 mMであり、BY4742株を用いた生育解析では、それぞれの逆配列ペア内において K_i 値の低いジペプチドを培地に加えた場合に酵母の生育が優れていた。この結果から、F-CUp法によって K_i 値として算出されるPtr2pへの親和性が、酵母細胞内への取り込み特性と関連していることが示された。

ジペプチドライブラリーの網羅的解析

Ptr2pへのペプチドの親和性は鎖長とアミノ酸配列によって異なることが示された。Ptr2pの基質多選択性の全貌を解明するために、F-CUp法のハイスループット性を生かし、ジペプチドライブラリーを網羅的に解析した (Fig. 4a)。その結果、最も高い親和性を有するジペプチドはTrp-PheおよびTrp-Val (ともに $K_i=0.020$ mM) であり、本研究で解析したオリゴペプチド中で最も低い親和性を示したGly-Gly-Gly ($K_i=48$ mM) と比較して、Ptr2pへの親和性は2,400倍もの大きな差があることが明らかとなった (Fig. 4b)。 K_i 値によって上位30%の高親和性ジペプチドグループと、下位30%の低親和性ジペプチドグループを選別し、WebLogoプログラムでアミノ酸残基の出現頻度解析を行なった結果、高親和性ジペプチドグループではTrp、Phe、Tyrの芳香族アミノ酸やLeuやIle等の分岐鎖アミノ酸が多く含まれていることが明らかとなった (Fig. 4c)。一方、低親和性ジペプチドグループではAspやGluの、負の電荷を有するアミノ酸や、GlyやProのような、ペプチド結合のコンフォメーションに影響することが予想されるアミノ酸が高頻度に含まれていた。生体内において、酸性アミノ酸はTCAサイクルから容易に合成可能であるが、芳香族アミノ酸はその合成に複数の酵素の発現誘導が要求される⁵⁾。Ptr2pの基質多選択性は、この輸送体が、芳香族アミノ酸に代表される生合成の困難な“高価値な”アミノ酸を優先的に外界から取り込む役割を担っていることを示唆している。これらのアミノ酸のほとんどはヒトにおける必須・准必須アミノ酸であることから、アミノ酸スコアの高い大豆たん白質由来のペプチドは酵母細胞に取り込まれやすく、発酵促進効果に優れていることが示された。

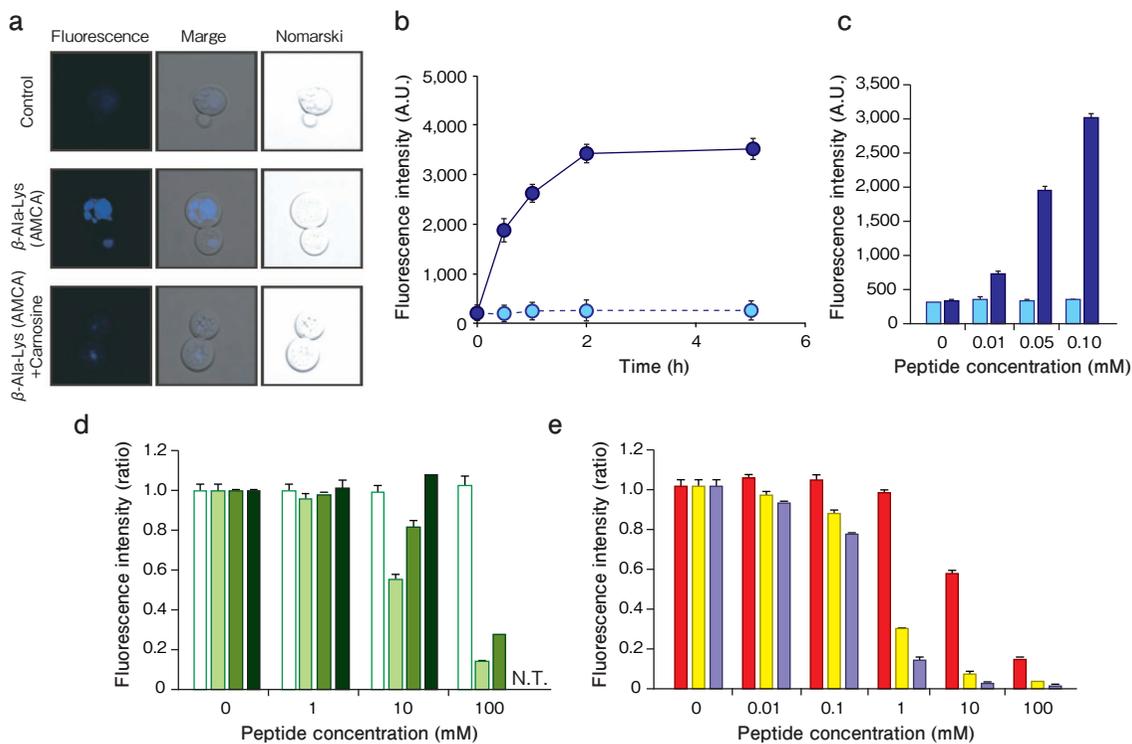


Fig. 2. Establishing the F-CUp assay system. (a) Analysis of tracer substrate, β -Ala-Lys (AMCA), uptake by SC-Ptr2p cells using confocal fluorescence microscopy. (b) Time course for the uptake of the tracer substrate. Dark blue: SC-Ptr2p cells, Light blue: parental strain BY4742-*ptr2* Δ . (c) Concentration dependence of tracer substrate uptake. Dark blue column: SC-Ptr2p cells, Light blue column: parental strain BY4742-*ptr2* Δ cells. (d) Effect of peptide chain length on tracer substrate uptake based on competitive inhibition. White column: Gly, Light green column: Gly-Gly, green column: Gly-Gly-Gly, Dark green column: Gly-Gly-Gly-Gly. N.T.: not tested. (e) Effect of amino acid sequence on tracer substrate uptake based on competitive inhibition. Red column: Ala-Ala, Yellow column: Ala-Leu, Purple column: Leu-Ala. Results are means \pm SD ($n=3$).

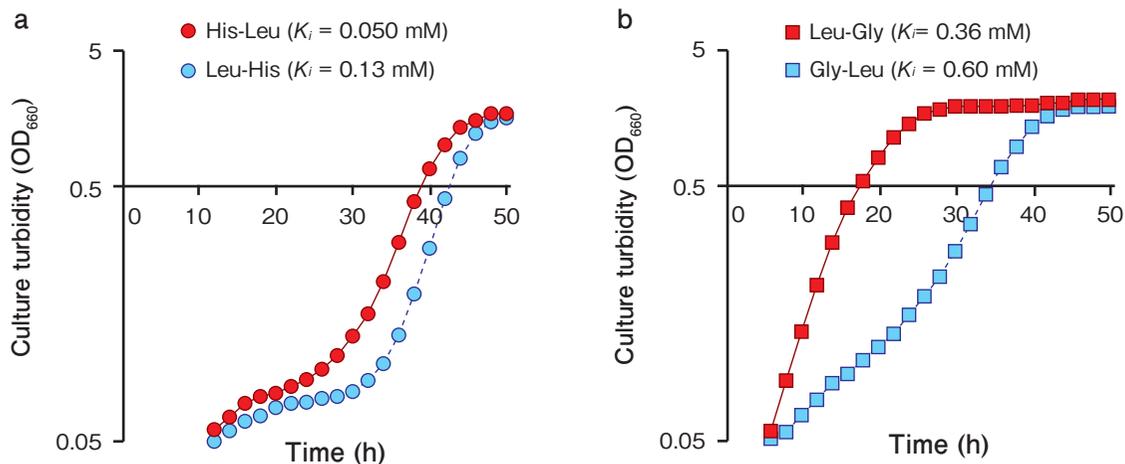


Fig. 3. Relationship between affinity for Ptr2p and *S. cerevisiae* growth. Analysis using dipeptides (a) comprising histidine and leucine (b) comprising glycine and leucine.

a

		C-terminal																		
		A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
N-terminal	A	0.40 ±0.01	>0.77	>0.77	0.072 ±0.003	>0.77	0.060 ±0.006	0.49 ±0.04	0.61 ±0.02	0.31 ±0.07	0.46 ±0.02	N.T.	>0.77	0.57 ±0.02	0.32 ±0.01	0.40 ±0.01	0.37 ±0.01	0.071 ±0.002	0.039 ±0.003	0.045 ±0.008
	D	>0.77	>0.77	N.T.	>0.77	>0.77	>0.77	N.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
	E	>0.77	>0.77	>0.77	N.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	0.63 0.0154	>0.77
	F	0.028 ±0.007	>0.77	>0.77	0.030 ±0.005	0.10 ±0.01	0.060 ±0.002	0.036 ±0.008	0.19 ±0.02	0.034 ±0.006	0.045 ±0.003	0.035 ±0.008	N.T.	0.062 ±0.004	0.046 ±0.009	0.36 ±0.06	0.058 ±0.003	0.062 ±0.003	0.042 ±0.001	0.051 ±0.007
	G	>0.77	>0.77	>0.77	0.27 ±0.00	>0.77	>0.77	0.32 ±0.02	N.T.	0.60 ±0.08	0.70 ±0.06	>0.77	>0.77	>0.77	0.63 ±0.02	>0.77	>0.77	>0.77	0.61 ±0.04	>0.77
	H	0.045 ±0.003	>0.77	>0.77	0.044 ±0.002	N.T.	0.071 ±0.008	0.054 ±0.004	0.74 ±0.07	0.050 ±0.008	0.069 ±0.007	0.071 ±0.007	0.39 ±0.02	N.T.	0.17 ±0.04	0.072 ±0.010	0.067 ±0.004	0.062 ±0.003	0.056 ±0.006	0.049 ±0.006
	I	0.21 ±0.08	>0.77	>0.77	0.067 ±0.004	N.T.	0.36 ±0.08	0.31 ±0.03	0.070 ±0.002	>0.77	0.075 ±0.005	0.075 ±0.006	>0.77	0.27 ±0.12	0.067 ±0.006	0.66 ±0.13	0.53 ±0.06	0.27 ±0.02	0.063 ±0.002	N.T.
	K	0.56 ±0.06	>0.77	>0.77	0.34 ±0.06	0.54 ±0.11	0.075 ±0.012	0.41 ±0.02	>0.77	0.54 ±0.03	0.50 ±0.02	0.40 ±0.01	0.42 ±0.03	0.52 ±0.04	0.50 ±0.05	0.42 ±0.06	0.53 ±0.09	0.31 ±0.05	0.062 ±0.005	0.041 ±0.001
	L	0.15 ±0.00	0.65 ±0.13	0.68 ±0.16	0.056 ±0.002	0.36 ±0.08	0.13 ±0.06	0.063 ±0.003	N.T.	0.31 ±0.04	0.070 ±0.009	0.056 ±0.001	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	0.15 ±0.14	0.065 ±0.003	0.041 ±0.001	0.27 ±0.06
	M	0.26 ±0.05	0.40 ±0.27	>0.77	0.057 ±0.002	0.11 ±0.06	0.12 ±0.10	0.053 ±0.002	0.40 ±0.03	0.059 ±0.006	0.058 ±0.004	0.055 ±0.003	N.T.	0.38 ±0.07	0.051 ±0.001	0.41 ±0.05	>0.77	0.12 ±0.02	0.059 ±0.002	0.061 ±0.002
	N	0.23 ±0.03	>0.77	>0.77	0.040 ±0.002	0.43 ±0.04	0.19 ±0.04	0.072 ±0.006	0.66 ±0.01	0.21 ±0.01	0.22 ±0.00	0.25 ±0.01	>0.77	0.39 ±0.04	0.075 ±0.007	N.T.	0.37 ±0.17	0.046 ±0.002	0.041 ±0.0	0.059 ±0.003
	P	>0.77	>0.77	>0.77	0.20 ±0.03	>0.77	>0.77	0.58 ±0.03	>0.77	N.T.	0.35 ±0.03	0.47 ±0.05	>0.77	>0.77	N.T.	>0.77	>0.77	>0.77	0.24 ±0.01	>0.77
	Q	0.46 ±0.01	>0.77	>0.77	0.056 ±0.005	>0.77	>0.77	0.25 ±0.09	0.66 ±0.00	0.34 ±0.01	0.30 ±0.01	0.72 ±0.04	0.52 ±0.00	>0.77	N.T.	0.50 ±0.03	0.41 ±0.01	0.34 ±0.04	0.041 ±0.002	0.29 ±0.04
	R	0.080 ±0.045	0.66 ±0.02	0.59 ±0.01	0.073 ±0.002	0.44 ±0.01	0.41 ±0.02	0.11 ±0.01	>0.77	0.092 ±0.042	0.18 ±0.01	0.13 ±0.01	0.23 ±0.04	N.T.	0.33 ±0.01	0.39 ±0.01	0.26 ±0.00	0.11 ±0.03	0.058 ±0.005	N.T.
	S	0.52 ±0.01	>0.77	>0.77	0.055 ±0.003	N.T.	0.31 ±0.02	0.059 ±0.016	>0.77	0.19 ±0.10	0.43 ±0.01	0.32 ±0.01	>0.77	>0.77	0.43 ±0.01	>0.77	0.20 ±0.06	0.26 ±0.02	0.059 ±0.006	0.11 ±0.09
	T	0.50 ±0.00	>0.77	>0.77	0.042 ±0.004	>0.77	0.29 ±0.018	0.45 ±0.05	>0.77	0.31 ±0.03	0.32 ±0.01	0.49 ±0.02	>0.77	0.63 ±0.04	0.11 ±0.06	>0.77	0.28 ±0.04	0.19 ±0.07	0.038 ±0.006	0.49 ±0.06
	V	0.32 ±0.03	>0.77	>0.77	0.058 ±0.004	0.30 ±0.03	0.24 ±0.02	0.29 ±0.03	0.40 ±0.03	0.13 ±0.07	0.076 ±0.023	0.057 ±0.01	0.47 ±0.06	0.30 ±0.005	0.060 ±0.005	0.32 ±0.05	0.29 ±0.02	N.T.	0.052 ±0.002	0.059 ±0.009
	W	0.028 ±0.004	0.069 ±0.010	0.24 ±0.01	0.020 ±0.004	0.039 ±0.007	0.13 ±0.08	0.054 ±0.002	0.35 ±0.03	0.045 ±0.002	0.047 ±0.003	0.034 ±0.019	0.064 ±0.017	0.050 ±0.005	0.038 ±0.006	0.025 ±0.007	0.028 ±0.005	0.024 ±0.007	0.045 ±0.002	0.049 ±0.002
	Y	0.14 ±0.10	>0.77	>0.77	0.043 ±0.002	0.32 ±0.07	0.17 ±0.03	0.058 ±0.005	0.61 ±0.03	0.038 ±0.008	0.050 ±0.005	0.24 ±0.06	0.47 ±0.09	0.081 ±0.010	0.160 ±0.023	0.077 ±0.003	0.063 ±0.003	0.064 ±0.012	0.033 ±0.000	0.064 ±0.006

K_i (mM)

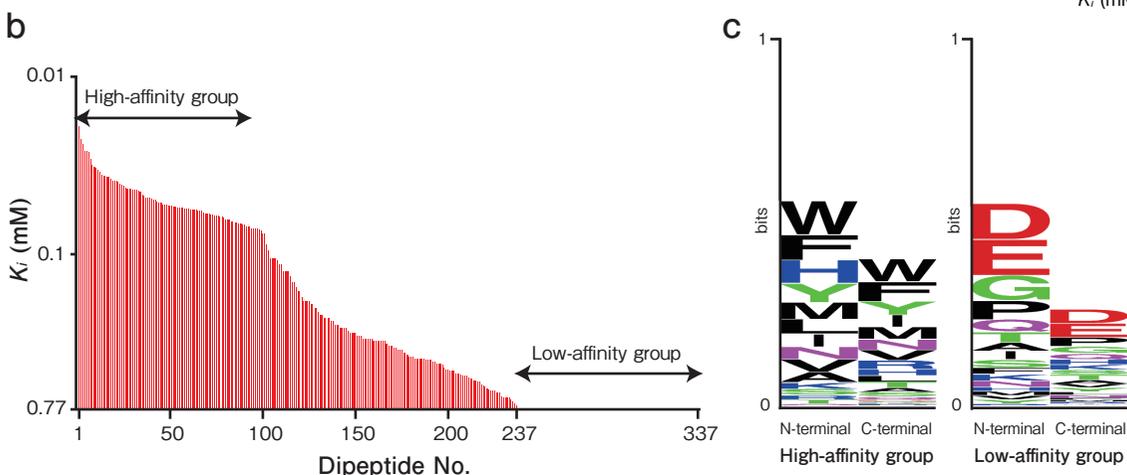


Fig. 4. Substrate multispecificity of Ptr2p. (a) Comprehensive analysis using a dipeptide library by the F-CUP assay system. Colors of cells correspond to K_i values. N.T.: not tested. Data are presented as means \pm SD ($n=3$). (b) Distribution of K_i values. (c) Frequency analysis of amino acid residues with high or low affinity dipeptides using the WebLogo program (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

要 約

本研究では、ハイスループットな解析システムの開発により、酵母におけるジ・トリペプチドの取り込みを担うペプチド輸送体Ptr2pの基質多選択性を解明した。結果として、酵母はPtr2pにより、大豆ペプチド中に豊富に存在する芳香族・分岐鎖アミノ酸をペプチド形態として高効率に取り込むことが明らかとなった。このことが、大豆ペプチドの優れた発酵特性の一要因である。

文 献

- 1) Ito K, Hikida A, Kitagawa S, Misaka T, Abe K and Kawarasaki Y (2012): Soy peptides enhance heterologous membrane protein productivity during the exponential growth phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **76**, 110965-1-4.
- 2) Daniel H, Spanier B, Kottra G and Weitz D (2006): From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 93-102.
- 3) Sugawara T, Ito K, Shiroishi M, Tokuda N, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Misaka T, Nomura N, Murata T, Abe K, Iwata S and Kobayashi T (2009): Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **382**, 704-710.
- 4) Cheng Y and Prusoff WH (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, **22**, 3099-3108.
- 5) Braus GH (1991): Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol Rev*, **55**, 349-370.