

ヒトにおける優れた吸収特性へ寄与する大豆ペプチドの特定

伊藤圭祐*¹・本山貴康²・北川さゆり²・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不二製油株式会社研究開発本部

High-Absorbable Soy Peptides Revealed by the Analysis of Substrate Multispecificity of a Human Peptide Transporter

Keisuke ITO*, Takayasu MOTOYAMA, Sayuri KITAGAWA, Ryuji KATO
and Yasuaki KAWARASAKI

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

²Research & Development Division, Fujioil. Co., LTD., Tsukubamirai 300-2497

ABSTRACT

The peptide uptake system that involves members of the proton-coupled oligopeptide transporter (POT) family is conserved across all organisms. POTs can recognise as many as 8,400 types of di- and tripeptides. In this study, the substrate multi-specificity of human POT, hPEPT2, was elucidated by comprehensive analysis using a dipeptide library. Among the 337 dipeptides, the *K_i* values of 321 dipeptides for hPEPT2 were successfully determined. The dipeptide affinities toward hPEPT2 showed a wide distribution range from 0.0033 mM to 0.55 mM. Aromatic amino acids and branched-chain amino acids frequently appeared in the high-affinity dipeptides. In contrast, the low-affinity dipeptides had a high frequency of acidic amino acids. The substrate multispecificity of hPEPT2 was similar to that of yeast POT, Ptr2p. These results suggests that POT family transporters possess similar substrate multi-specificities that allow them to preferentially uptake peptides containing high-value amino acids that are difficult to biosynthesize. The substrate multispecificity of human POT indicates that the dipeptides containing aromatic or branched-chain amino acids are high-absorbable soy peptides. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 58-62, 2014.

Key words : peptide transporter, hPEPT2, 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）はその優れた生体吸収特性から経腸栄養剤、スポーツ用途食品等として利用されている。ヒトにおいてペプチド吸収を担うプロトン共役型オリゴペプチド輸送体は“基質多選択性”によって8,400種類ものジ・トリペプチドを認識するが¹⁾、その詳細は不明である。我々はこれまでに、ペプチド輸送体のハイスループット解析システムを開発し、酵母ペプチド輸送体 (Ptr2p) をモデルとして世界で初めて基質多選択性の全貌を解明した²⁾。本研究では大豆ペプチドが吸収特性に優れる理由を明らかとすることを目的に、ヒトペプチド輸送体 (hPEPT2) の基質多選択性を解析した。まず初めに各種大豆ペプチド素材のhPEPT2親和性を解析した結果、親和性はジ・トリペプチド含量と相関することが示された。続いて全337種類ジペプチドの親和性を網羅的に解析した結果、ペプチドの種類により親和性は大きく異なり、ヒト必須アミノ酸である芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、塩基性アミノ酸を含むペプチドが顕著に高親和性であることが明らかとなった。この結果は酵母Ptr2pの基質多選択性と全体的に類似しており、ペプチド輸送体が生体にとって外界からの摂取の必要性が高いアミノ酸をペプチド形態として優先的に取り込む普遍的な役割を担っていることが示唆された。以上より、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吸収特性の一要因として特定された。

方 法

hPEPT2発現細胞の作成

hPEPT2の遺伝子は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構から分譲いただいたヒトcDNA (AK289820) を鋳型として、以下2つの特異的プライマー 5'-ACCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCATGAATCCTTTCCAGAAAAATGAGT-3' and 5'-AAATTGACCTTGAAAATATAAATTTCCCCTCACTTGT CATCGTCGTCCTTGTAGTCGAGTTTTGTCTTCTTGGTCTCTAGTTTG-3'を用いて増幅し、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、0.19% yeast synthetic drop-out medium without uracil、0.67% Yeast Nitrogen Base、を含む培地により30℃で24時間震盪培養した菌体を2%ガラクトースを含む培地 (100 mMリン酸ナトリウム緩衝液でpH6.0に調整) にOD₆₆₀=3.0となるように懸

濁し、20℃で24時間震盪培養することでhPEPT2発現細胞を調整した。

Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) 法によるhPEPT2親和性の解析

hPEPT2発現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 (pH6.0)) で洗浄した後、OD₆₆₀=15になるように同緩衝液に懸濁した。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、37℃で1時間インキュベートした。アッセイ用緩衝液で細胞を3回洗浄後、励起波長355 nmにおける460 nmの蛍光強度を測定することで、トレーサー基質の細胞内への取り込みを定量した。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・プルソフ式に従ってKi値を算出した²⁾。

結果と考察

hPEPT2に対する大豆ペプチドの親和性解析

ヒトペプチド輸送体hPEPT2について出芽酵母と蛍光性トレーサー基質をツールとするペプチド輸送体解析システム (F-CUp法) を構築し、各種大豆ペプチド素材の親和性を測定した (Fig. 1)。その結果、hPEPT2親和性は大豆ペプチド素材の平均分子量や濁度などではなく、ジ・トリペプチド含量とR²=0.62の

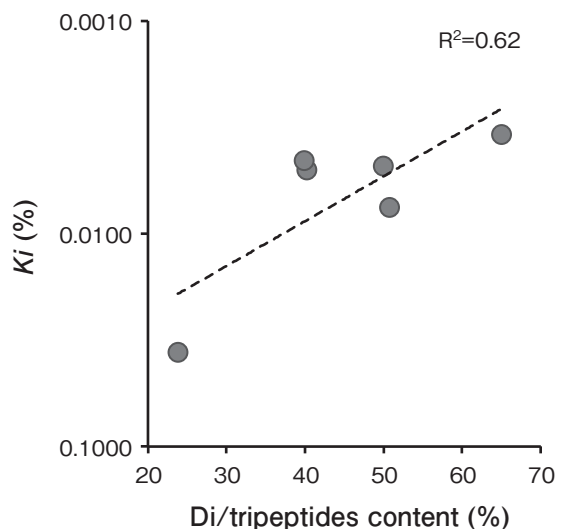


Fig. 1. Affinities of soy protein hydrolysates for hPEPT2. Six soy protein hydrolysates were analysed by the fluorescence-based competitive uptake assay system of hPEPT2.

高い相関を示した。hPEPT2の属するペプチド輸送体ファミリーの輸送体はジ・トリペプチドを主に取り込み、一部の例外を除いてアミノ酸やテトラペプチド以上のペプチドは取り込まないと考えられている。我々が行なった酵母Ptr2pの解析結果においても、この仮説と一致する結果が得られている²⁾。hPEPT2も主にジ・トリペプチドを認識し、それらオリゴペプチドを豊富に含む大豆ペプチドがヒトへの吸収特性に優れることが示唆された。

hPEPT2へのジペプチド親和性の網羅的解析

我々はこれまでに、酵母ペプチド輸送体Ptr2pの基質多選択性をジペプチドライブラリーの網羅的解析によって明らかとした²⁾。本研究では同様の戦略により、hPEPT2の基質多選択性を解析した (Fig. 2)。合

成可能な337種のジペプチドのうち、321種についての*K_i*値が算出することができた (溶解性の問題から*IC₅₀*値が1 mMを越えるジペプチドの*K_i*値は算出できなかった) (*K_i*>0.55 mM)。 *K_i*値は0.0033 mM以下から0.55 mM以上まで幅広く分布していた。平均ジペプチド (全体の1/2番目のジペプチド) の*K_i*値は0.033 mMであり、これはPtr2p (0.34 mM) と比較して1/10だった。hPEPT2へのジペプチドの親和性はこれまで個別の基質を用いた解析によって算出されてきた。本研究での結果はそれらの報告ともおおよそ一致しており、hPEPT2が他のペプチド輸送体と比較して高親和性型の輸送体であることが実証された。hPEPT2は主に腎臓に発現し、ペプチドの再吸収により生体内窒素源の維持を担っていると考えられている。仮にhPEPT2が存在しなければ、1日当たり150リットル生成される原

| | | C-terminal | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|--|
| | | A | D | E | F | G | H | I | K | L | M | N | P | Q | R | S | T | V | W | Y | |
| N-terminal | A | 0.034 ±0.001 | 0.22 ±0.001 | 0.19 ±0.001 | 0.027 ±0.001 | >0.55 | 0.022 ±0.001 | 0.032 ±0.001 | 0.039 ±0.002 | 0.029 ±0.002 | 0.039 ±0.001 | N.T. | 0.099 ±0.033 | 0.042 ±0.003 | 0.029 ±0.002 | 0.023 ±0.002 | 0.026 ±0.001 | 0.015 ±0.004 | <0.0055 | 0.0084 ±0.0028 | |
| | D | 0.29 ±0.06 | >0.55 | N.T. | 0.17 ±0.05 | 0.31 ±0.09 | 0.029 ±0.002 | N.T. | 0.048 ±0.006 | 0.11 ±0.03 | 0.094 ±0.040 | 0.20 ±0.13 | >0.55 | >0.55 | 0.039 ±0.003 | 0.17 ±0.05 | 0.38 ±0.13 | 0.13 ±0.05 | 0.045 ±0.001 | 0.044 ±0.001 | |
| | E | 0.044 ±0.002 | >0.55 | >0.55 | N.T. | 0.38 ±0.11 | 0.033 ±0.002 | 0.12 ±0.02 | 0.051 ±0.002 | 0.15 ±0.08 | 0.18 ±0.08 | 0.27 ±0.12 | >0.55 | >0.55 | 0.26 ±0.11 | 0.16 ±0.06 | 0.32 ±0.18 | 0.25 ±0.05 | 0.029 ±0.002 | 0.047 ±0.001 | |
| | F | 0.020 ±0.002 | 0.26 ±0.06 | 0.25 ±0.10 | 0.011 ±0.005 | 0.028 ±0.002 | 0.014 ±0.007 | 0.021 ±0.001 | 0.036 ±0.003 | 0.019 ±0.003 | 0.025 ±0.002 | 0.026 ±0.002 | N.T. | 0.025 ±0.004 | 0.031 ±0.004 | 0.033 ±0.004 | 0.028 ±0.002 | 0.029 ±0.002 | <0.0055 | 0.013 ±0.004 | |
| | G | 0.049 ±0.003 | >0.55 | >0.55 | 0.027 ±0.001 | 0.18 ±0.05 | 0.030 ±0.003 | 0.031 ±0.001 | N.T. | 0.038 ±0.006 | 0.037 ±0.001 | 0.081 ±0.014 | 0.21 ±0.04 | 0.039 ±0.001 | >0.55 | 0.10 ±0.04 | 0.036 ±0.001 | 0.033 ±0.002 | 0.026 ±0.003 | 0.033 ±0.002 | |
| | H | 0.013 ±0.002 | 0.20 ±0.02 | 0.30 ±0.01 | <0.0055 | N.T. | 0.010 ±0.000 | 0.022 ±0.002 | 0.16 ±0.04 | 0.032 ±0.001 | 0.021 ±0.001 | 0.034 ±0.002 | 0.038 ±0.002 | N.T. | 0.041 ±0.004 | 0.023 ±0.000 | 0.023 ±0.004 | 0.011 ±0.004 | <0.0055 | <0.0055 | |
| | I | 0.033 ±0.002 | 0.39 ±0.08 | 0.050 ±0.01 | 0.027 ±0.002 | N.T. | 0.025 ±0.002 | 0.043 ±0.003 | 0.022 ±0.001 | >0.55 | 0.026 ±0.001 | 0.032 ±0.001 | 0.036 ±0.001 | 0.025 ±0.002 | 0.11 ±0.01 | 0.040 ±0.002 | 0.043 ±0.002 | 0.036 ±0.002 | 0.019 ±0.001 | N.T. | |
| | K | 0.039 ±0.003 | 0.13 ±0.04 | 0.22 ±0.03 | 0.033 ±0.002 | 0.037 ±0.004 | 0.0084 ±0.002 | 0.026 ±0.002 | 0.051 ±0.002 | 0.041 ±0.003 | 0.037 ±0.002 | 0.035 ±0.003 | 0.026 ±0.002 | 0.038 ±0.002 | 0.11 ±0.06 | 0.022 ±0.003 | 0.034 ±0.002 | 0.024 ±0.003 | 0.021 ±0.003 | <0.0055 | |
| | L | 0.025 ±0.000 | 0.20 ±0.03 | 0.15 ±0.02 | 0.022 ±0.001 | 0.034 ±0.002 | 0.025 ±0.001 | 0.029 ±0.001 | N.T. | 0.034 ±0.003 | 0.027 ±0.002 | 0.024 ±0.004 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 0.034 ±0.002 | 0.025 ±0.001 | <0.0055 | 0.036 ±0.002 | |
| | M | 0.039 ±0.001 | 0.18 ±0.03 | 0.27 ±0.03 | 0.032 ±0.000 | 0.022 ±0.003 | 0.025 ±0.003 | 0.025 ±0.001 | 0.032 ±0.004 | 0.025 ±0.003 | 0.021 ±0.002 | 0.029 ±0.002 | N.T. | 0.040 ±0.002 | 0.033 ±0.002 | 0.038 ±0.002 | 0.21 ±0.03 | 0.037 ±0.001 | 0.013 ±0.002 | 0.025 ±0.005 | |
| | N | 0.036 ±0.002 | 0.41 ±0.04 | >0.55 | 0.011 ±0.008 | 0.012 ±0.009 | 0.0049 ±0.0042 | 0.021 ±0.004 | 0.041 ±0.003 | 0.041 ±0.005 | 0.031 ±0.003 | 0.029 ±0.005 | 0.032 ±0.003 | 0.28 ±0.01 | 0.028 ±0.004 | 0.025 ±0.002 | N.T. | 0.025 ±0.003 | <0.0055 | <0.0055 | |
| | P | 0.29 ±0.03 | >0.55 | >0.55 | 0.18 ±0.02 | >0.55 | 0.11 ±0.02 | 0.20 ±0.02 | >0.55 | N.T. | 0.23 ±0.03 | 0.17 ±0.04 | >0.55 | 0.047 ±0.003 | N.T. | 0.32 ±0.02 | 0.046 ±0.010 | 0.10 ±0.04 | 0.028 ±0.004 | 0.037 ±0.010 | |
| | Q | 0.027 ±0.008 | 0.34 ±0.03 | >0.55 | 0.020 ±0.003 | >0.55 | 0.041 ±0.002 | 0.032 ±0.005 | 0.045 ±0.005 | 0.031 ±0.002 | 0.028 ±0.004 | 0.18 ±0.05 | 0.022 ±0.002 | 0.12 ±0.04 | N.T. | 0.029 ±0.003 | 0.032 ±0.001 | 0.038 ±0.001 | 0.013 ±0.005 | 0.042 ±0.003 | |
| | R | 0.013 ±0.005 | 0.15 ±0.06 | 0.30 ±0.01 | 0.020 ±0.002 | 0.16 ±0.22 | 0.029 ±0.003 | 0.016 ±0.002 | 0.050 ±0.004 | 0.013 ±0.003 | 0.018 ±0.003 | 0.027 ±0.001 | 0.026 ±0.002 | N.T. | 0.081 ±0.031 | 0.030 ±0.003 | 0.019 ±0.001 | 0.016 ±0.002 | 0.014 ±0.002 | N.T. | |
| | S | 0.029 ±0.001 | >0.55 | 0.14 ±0.02 | 0.013 ±0.008 | N.T. | 0.012 ±0.003 | 0.014 ±0.004 | 0.045 ±0.004 | 0.023 ±0.002 | 0.034 ±0.004 | 0.031 ±0.001 | 0.040 ±0.001 | 0.041 ±0.001 | 0.035 ±0.002 | 0.028 ±0.004 | 0.027 ±0.003 | 0.021 ±0.003 | <0.0055 | 0.011 ±0.004 | |
| | T | 0.044 ±0.001 | >0.55 | >0.55 | 0.022 ±0.002 | 0.038 ±0.001 | 0.027 ±0.002 | 0.043 ±0.004 | 0.17 ±0.01 | 0.037 ±0.002 | 0.027 ±0.001 | 0.050 ±0.001 | 0.035 ±0.001 | 0.038 ±0.003 | 0.043 ±0.003 | 0.041 ±0.002 | 0.019 ±0.002 | 0.032 ±0.001 | 0.021 ±0.001 | 0.036 ±0.002 | |
| | V | 0.036 ±0.001 | 0.24 ±0.01 | 0.38 ±0.11 | 0.025 ±0.003 | 0.025 ±0.001 | 0.028 ±0.000 | 0.046 ±0.001 | 0.039 ±0.004 | 0.028 ±0.001 | 0.028 ±0.001 | 0.032 ±0.001 | 0.049 ±0.001 | 0.032 ±0.000 | 0.11 ±0.05 | 0.028 ±0.001 | 0.030 ±0.001 | N.T. | 0.017 ±0.004 | 0.021 ±0.001 | |
| | W | 0.016 ±0.013 | 0.038 ±0.002 | 0.30 ±0.07 | <0.0055 | 0.022 ±0.001 | 0.027 ±0.003 | 0.021 ±0.001 | 0.042 ±0.003 | <0.0055 | 0.014 ±0.0017 | 0.0095 ±0.002 | 0.041 ±0.002 | 0.027 ±0.002 | 0.011 ±0.002 | <0.0055 | 0.0033 ±0.0029 | 0.015 ±0.002 | <0.0055 | 0.0085 ±0.0017 | |
| | Y | 0.042 ±0.001 | >0.55 | 0.25 ±0.01 | 0.023 ±0.001 | 0.032 ±0.002 | 0.022 ±0.001 | 0.030 ±0.001 | 0.15 ±0.02 | 0.095 ±0.015 | 0.031 ±0.001 | 0.049 ±0.001 | 0.20 ±0.03 | 0.030 ±0.001 | 0.040 ±0.001 | 0.027 ±0.001 | 0.025 ±0.001 | 0.026 ±0.001 | <0.0055 | 0.019 ±0.002 | |

K_i (mM)

Fig. 2. Substrate multi-specificity of hPEPT2. Comprehensive analysis using a dipeptide library and the fluorescence-based competitive uptake assay system of hPEPT2. Colors of cells correspond to the *K_i* values. N.T.: not tested. Data are presented as mean ± SD (n=3).

尿に含まれる大量のペプチドが毎日漏出することになりかねない。これは生体にとって非常に深刻な問題である。そのような状況を回避するため、hPEPT2が高親和性型の基質多選択性を有することで、アミノ酸の効率的な再吸収を担っていると考えられる。

網羅的な親和性データに基づき、高親和性ジペプチド (<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残基の出現頻度を解析した結果、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含まれることが示された。高親和性ジペプチドのN末端には特に塩基性アミノ酸残基が高頻度に含まれていたが、これは高親和性ジペプチドの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、低親和性ジペプチドには高頻度に負電荷のアミノ酸が含まれていた。低親和性ジペプチドのN末端とC末端に含まれるアミノ酸残基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・塩基性アミノ酸を高効率に取り込むことが明らかとなった。これらのアミノ酸の生合成には多段階の酵素反応が要求されるため、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アミノ酸となっている。hPEPT2の基質多選択性は、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ように見える。対照的に、低親和性ジペプチドに高頻度に含まれていた酸性アミノ酸残基はTCAサイクルから少ないステップで生合成でき、外界からの摂取の必要性は比較的少ない。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外界からの摂取の必要性と対応していることは、生物学的に大変理にかなっている。hPEPT2とPtr2pのアミノ酸配列相同性は30%程度とあまり高くはないにもかかわらず、両輸送体の基質多選択性には類似性がみられた。この事実は、全生物に保存されているペプ

チド輸送体がアミノ酸源の取り込みにおいて普遍的に重要な役割を担っていることを示唆しており、ペプチド輸送体に共通する多基質認識メカニズムに興味を持たれる。

本研究の解析対象としたペプチド輸送体はhPEPT2であるが、実際に小腸で大豆ペプチドの吸収に関わる分子はhPEPT1である。これまでの個別の基質を用いたいくつかの研究からhPEPT1とhPEPT2は類似した基質選択性を有することが示唆されており、hPEPT2の基質多選択性を基に大豆ペプチドの生体吸収特性を議論することにはある程度の妥当性がある。一方で、hPEPT1の基質多選択性の解明は大豆ペプチドの優れた吸収特性の直接的証拠として重要であるため、現在我々はhPEPT1の基質多選択性の解析を進めている。

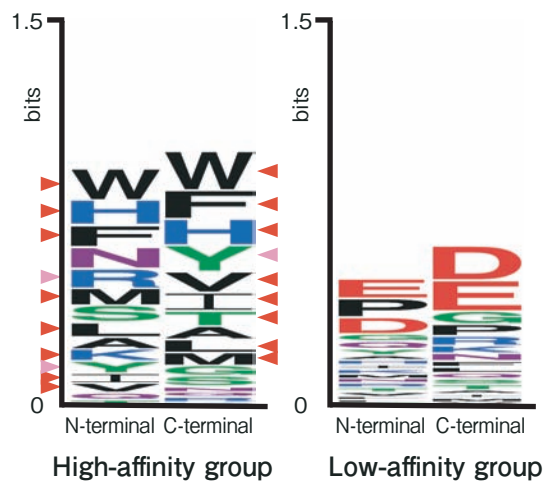


Fig. 3. Frequency analysis of amino acid residues. Frequency analysis of amino acid residues with high- or low-affinity dipeptides was performed by using the WebLogo program (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Red and pink arrowheads indicate the essential- and semi-essential amino acids for humans, respectively.

要 約

本研究では、我々が開発したハイスループットな解析システムを用いることで、ヒトペプチド輸送体hPEPT2の基質多選択性を解明した。hPEPT2は大豆ペプチド中に豊富に存在する芳香族・分岐鎖アミノ酸を含有するジ・トリペプチドを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吸収特性の一要因であると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Ito K, Hikida A, Kawai S, Lan VT, Motoyama T, Kitagawa S, Yoshikawa Y, Kato R and Kawarasaki Y (2013): Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. *Nat Commun*, **4**, 2502.
- 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.