

ペプチド輸送体による大豆たん白質加水分解物吸収メカニズムの解明

伊藤圭祐*・本山貴康・石黒正路・河原崎泰昌

静岡県立大学食品栄養科学部

Alanine-scanning Mutagenesis Reveals the Di- and Tripeptide Recognition Mechanism of Ptr2p, a Proton-coupled Oligopeptide Transporter

Keisuke ITO*, Takayasu MOTOYAMA, Masaji ISHIGURO and Yasuaki KAWARASAKI

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

ABSTRACT

Peptide uptake systems that involve members of the proton-coupled oligopeptide transporter (POT) family are conserved across all organisms. POTs can recognize as many as 8,400 types of di- and tripeptides. In this study, the contribution of amino acid residues to the recognition of di- and tripeptides was quantitatively and systematically analyzed by alanine-scanning mutagenesis of yeast Ptr2p. Y365 of Ptr2p was involved in the recognition of the R1 side-chain of dipeptides, whereas Y248 and I251 were responsible for the recognition of the R2 side-chain of dipeptides. On the other hand, Y365, S484, and F507 greatly contributed to the recognition of the R1 side-chain of tripeptides. The R2 side-chain of tripeptides was not involved in a specific interaction with the residues in Ptr2p. Y248, S484, and F507 contributed to the recognition of the R3 side-chain of tripeptides. The contribution of the interaction with the R2 (R3) side-chain of di- and tripeptides was greater than that with the R1 side-chain. On the basis of these results, an alternative recognition model for di- and tripeptides at a single substrate-binding site is suggested as a molecular basis of POT family proteins. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 82-88, 2015.

Key words : peptide transporter, Ptr2p, substrate multispecificity, dipeptides, tripeptides

*〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1

ペプチド形態としてのアミノ酸源の吸収はアミノ酸形態よりも優れることから¹⁾、大豆たん白質加水分解物(大豆ペプチド)は経腸栄養剤やスポーツ用途食品に活用されている。ペプチドは主に、8,400種類のジ・トリペプチドを認識・輸送できるユニークな“基質多選択性”を有するプロトン共役型オリゴペプチド輸送体(POT)により、生体へ吸収される²⁾。最近、我々はハイスループットなPOT解析システム(F-CUp法)を開発し、出芽酵母Ptr2pをモデルとしてPOTの基質多選択性を初めて解明した³⁾。Ptr2pの解析結果から、POTが生合成の困難な(すなわち生体にとって高価値な)芳香族・分岐鎖アミノ酸含有ペプチドを優先的に取り込むことが明らかとなった。一方で、基質結合ポケットにおいて多種多様なペプチドを認識する分子メカニズムは未だ不明である。近年、POTの結晶構造が相次いで報告され^{4, 5, 6, 7)}、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った。POTの“基質多選択性”と“3次元構造”に関する知見は共に基質認識メカニズムを理解する上で重要な手がかりとなるが、基質認識の分子メカニズムの理解には、輸送体たん白質の変異体を用いた生化学的解析もまた不可欠である。そこで本研究では、POTの多基質認識メカニズムの解明を目指し、Ptr2pの基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基について、基質認識への寄与をAlanine-scanning mutagenesisにより比較定量解析することで、ジ・トリペプチドの結合配向を推定した。

方 法

Ptr2p変異体発現株の作製

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'-ACCCCGGATTCTAGAACTAGTGATCCCCCA TGCTCAACCATCCCAGCCAAG-3'と5'-AAATTGACCTTGAAAATATAAATTTTCCCTCACTTGTC ATCGTCGTCCTTGTAAGTCATATTTGGTGGTGG ATCTTAGAC-3'を用いてPCRにより取得し、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OD₆₆₀=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。Ptr2pの基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基は、PepTsoの結晶構造(PDB: 2XUT)を基に構築したホモロジーモデルから特定し(Fig. 1)、それぞれのアミノ酸残基をAlanineへ置換した変異体を作製した。

Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) 法による解析³⁾

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、OD₆₆₀=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を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K_m値および使用濃度から、チェン・プルソフ式によってK_i値を算出した⁸⁾。

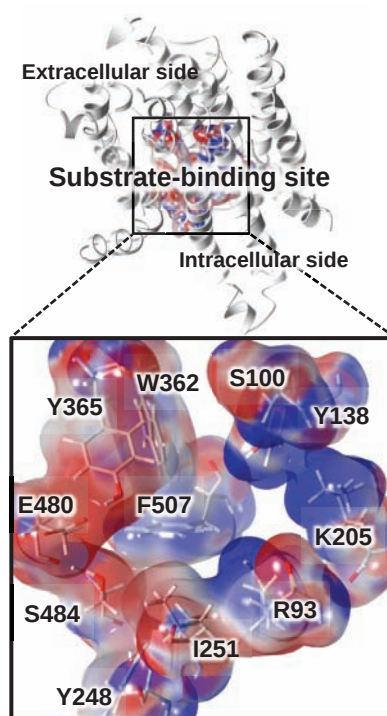


Fig. 1. Substrate-binding site structure of Ptr2p. The homology model for Ptr2p was constructed using PepTso (PDB: 2XUT) as a template. The colors of the surface model correspond to the electrostatic potential.

結果と考察

基質結合ポケットを構成する各アミノ酸残基のジペプチド認識への寄与

ジペプチド認識におけるPtr2pの各アミノ酸残基の寄与をAlanine-scanningによって定量的に解析した (Fig. 2). Alanineへの置換によりwild-type Ptr2pよりも大幅に K_i 値が増加した位置のアミノ酸残基は、基質認識への寄与が特に大きいと判断できる。一方で、Trp含有ジペプチドは顕著に高い親和性をもつため³⁾、本研究では、ジ・トリペプチドのアミノ酸側鎖が相互作用する輸送体アミノ酸残基を特定するためのプローブとしてTrp含有ペプチドを用いた。例えば、各Alanine置換体へのTrp-AlaとAla-Trpの K_i 値の比較により、ジペプチドのN末端アミノ酸側鎖 (R1), C末端アミノ酸側鎖 (R2) の認識に寄与するPtr2pのアミノ酸残基を特定できる。レーダーチャートパターンの比

較から、ジペプチドの側鎖R1の認識に寄与するアミノ酸残基としてY365が、R2の認識に寄与するアミノ酸残基としてI251とY248が特定された。PepTsoの結晶構造を基に構築したPtr2pのシミュレーションモデルは、これらの実験結果と一致するジペプチド結合配向モデルを示した (Fig. 2E)。このモデルにおいて、E480はジペプチドのN末端アミノ基と、K205はC末端カルボキシル基と静電的に相互作用した。側鎖R1は細胞外側へ、R2は細胞内側に配向した。

Ala-Trpの場合と同様に、Y248A, I251A変異体へのTrp-Trpの親和性は大きく減少した一方、Y365AへのTrp-Trpの親和性は25倍向上した。この結果は、輸送体とジペプチド側鎖R2との間の相互作用はR1よりも認識への寄与が大きいことを意味する。さらにこの結果は、Y365の側鎖がバルキーなジペプチドとの相互作用への立体障害となることを示唆する。

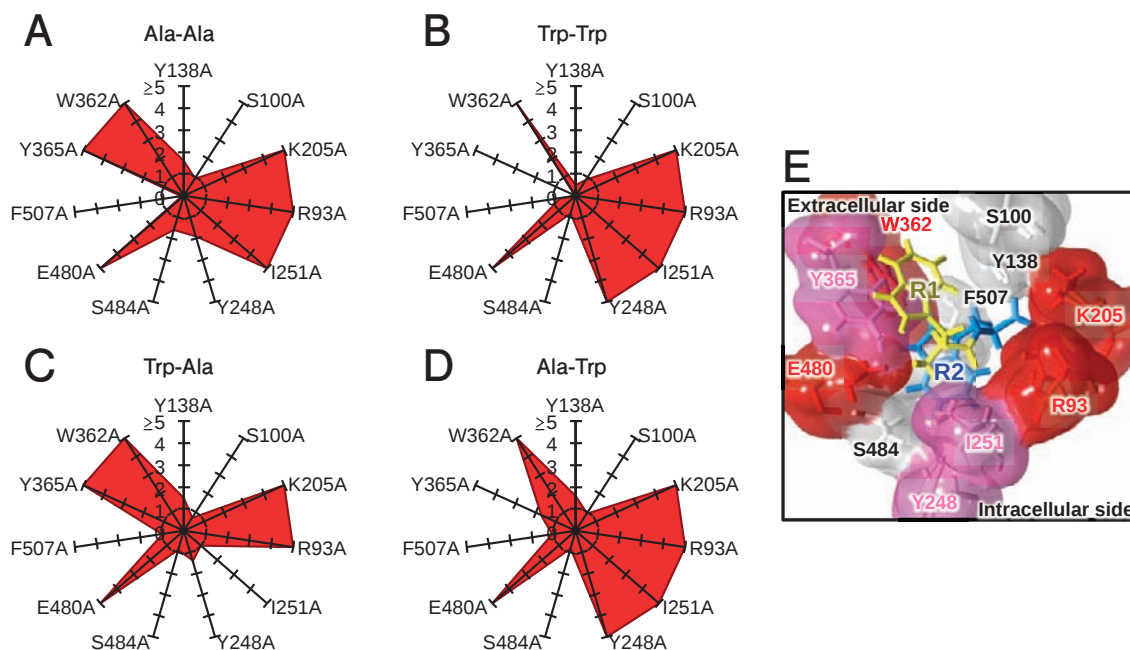


Fig. 2. Alanine-scanning of Ptr2p to analyze dipeptides. Effects of alanine substitution at each amino acid position on the affinity for the dipeptides Ala-Ala (A), Trp-Trp (B), Trp-Ala (C), and Ala-Trp (D). The ratios of the K_i values of dipeptides in each mutant compared with those in the wild-type Ptr2p are shown. The positions of the alanine-substitution mutants in a cobweb chart approximately correspond to the location in the substrate-binding site (Fig. 1). (E) Binding model of Trp-Trp. Molecular dynamics simulation for substrate binding was performed using Insight II. The amino acid residues that construct the substrate-binding site in Ptr2p are shown as a surface model. Putative binding substrate is shown as a stick model. The colors of the surface model correspond to the degree of contribution toward dipeptide recognition. Red: definitive; pink: supporting; white: no contribution.

基質結合ポケットを構成する各アミノ酸残基のトリペプチド認識への寄与

ジペプチドと同様に、Trp-Ala-Ala、Ala-Trp-Ala、Ala-Ala-Trpの K_i 値変化のレーダーチャートパターンをAla-Ala-Alaと比較することで (Fig. 3), トリペプチドの側鎖R1の認識に寄与するアミノ酸残基としてY365, F507, S484が, R3の認識に寄与するアミノ酸残基としてY248が特定された。一方で、全ての変異体へのAla-Trp-Alaの K_i 値変化はAla-Ala-Alaと同程度だったことから、R2はPtr2pとの相互作用にほとんど関与しないことが示唆された。これはwild-typeへのAla-Ala-Ala ($K_i=0.35$ mM) とAla-Trp-Ala ($K_i=0.32$ mM) の K_i 値がほぼ同じであることとも一致している。トリペプチドの結合配向モデルにおいて (Fig. 3F),

E480はトリペプチドのN末端アミノ基と、K205はC末端カルボキシル基と静電的に相互作用した。側鎖R1, R3は共に細胞内側に配向していた。R2は細胞外側の空間に位置し、Ptr2pとの相互作用が見られなかった。

Y365Aに対するTrp-Trp-Trpの親和性の顕著な向上から、Y365の側鎖が、ジペプチドの場合と同様にバルキーなトリペプチドとの相互作用への立体障害となることが示唆された。

ジ・トリペプチド認識モデル

ジ・トリペプチドの認識に重要なアミノ酸残基において、N末端アミノ酸の側鎖R1の認識にはY365 (このアミノ酸残基はバルキーなジ・トリペプチドに対しては立体障害となる) が、C末端アミノ酸の側鎖R2 (R3) の認識にはY248が重要である点が共通していた

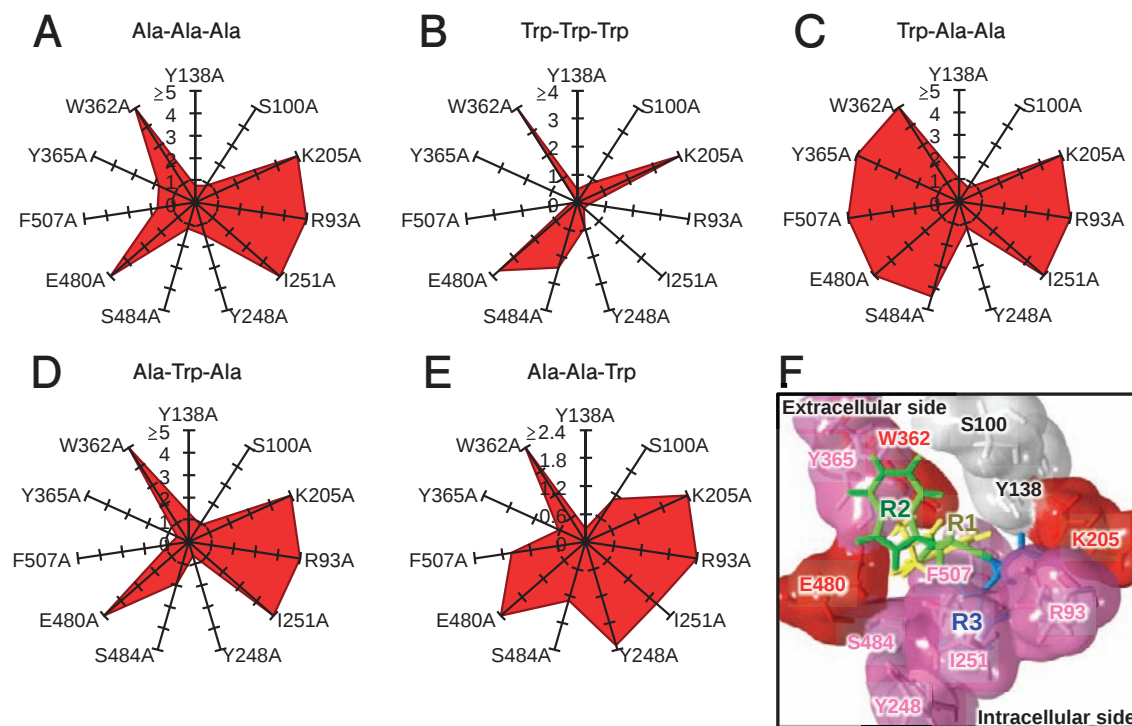


Fig. 3. Alanine-scanning of Ptr2p to analyze tripeptides. Effects of alanine substitution at each amino acid position on the affinity for the tripeptides Ala-Ala-Ala (A), Trp-Trp-Trp (B), Trp-Ala-Ala (C), Ala-Trp-Ala (D), and Ala-Ala-Trp (E). The ratios of the K_i values in tripeptides for each mutant compared with those in the wild-type Ptr2p are shown. The positions of the alanine-substitution mutants in a cobweb chart approximately correspond to the location in the substrate-binding site (Fig. 1). (E) Binding model of Trp-Trp-Trp. Molecular dynamics simulation for substrate binding was performed using Insight II. The amino acid residues that construct the substrate-binding site in Ptr2p are shown as a surface model. Putative binding substrate is shown as a stick model. The colors of the surface model correspond to the degree of contribution toward tripeptide recognition. Red: definitive; pink: supporting; white: no contribution.

(Fig. 4). 一方で、結合配向モデルからは、ジペプチドR1はY365の細胞外側に位置するのに対し、トリペプチドR1は細胞内側に位置することが示唆された。このように、相互作用の詳細は異なるものの、共通するいくつかのアミノ酸残基が中心となってジ・トリペプチドのN末端、C末端のアミノ酸側鎖を認識することで、Ptr2pは多様なジ・トリペプチドをただ一つの基質結合ポケットで認識できると考えられる。

基質認識に寄与するアミノ酸残基の保存性

POTの基質認識基盤を明らかにするため、ホモログの1次構造アライメントを行なった (Fig. 5)。基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基のほとんどは高度に保存されていたが、S100、Y365、F507の3つのアミノ酸残基はPtr2pに特徴的であった。Ptr2pのS100の位置は他のPOTではArginineであるが、Ptr2pのS100はこの研究で解析した全ての基質の認識へほとんど寄与しなかった。Ptr2pのY365の位置は保存性が低く、またF507の位置は他の多くのPOTではTryptophanであった。これらの位置のアミノ酸残基はジ・トリペプチドのR1の認識に寄与するため、この違いは基質多選択性を変化させ得る。特にY365の位置に見られたアミノ酸残基の多様性は、各POT輸送体が固有の基質多選択性をもつことを示唆する。とはいえ、Y365やF507の基質認識への寄与はその他のアミノ酸残基（特にW362、K205、E480）と比較すれば相対的に低く (Fig. 2および3)、またR1認識の寄与はジ・トリペプチド共にR2 (R3) よりも小さいため、これらの位置のアミノ酸残基の基質認識への寄与は補助的である。すなわちPOTは、基質結合ポケットのアミノ酸残基に多少の違いはあるものの、全体としては類似した基質多選択性をもつと考えられる。また、アミノ酸残基の性質から、基質認識には厳密な方向性を持たない疎水性相互作用が重要であることが示唆された。この特徴が、多種多様な芳香族・分岐鎖アミノ酸（これらは生合成が困難である）を優先して取り込むPOTの“基質多選択性”の分子基盤であると考えられる。

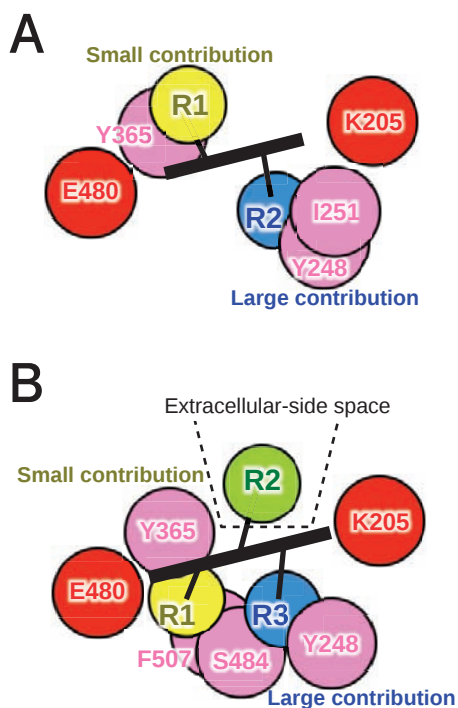


Fig. 4. Alternative recognition model of di- and tripeptides. Binding models of dipeptides (A) and tripeptides (B) are shown. The colors of the amino acid residues correspond to the degree of contribution toward di- and tripeptide recognition (Figs. 2 and 3). Red: definitive; pink: supporting.

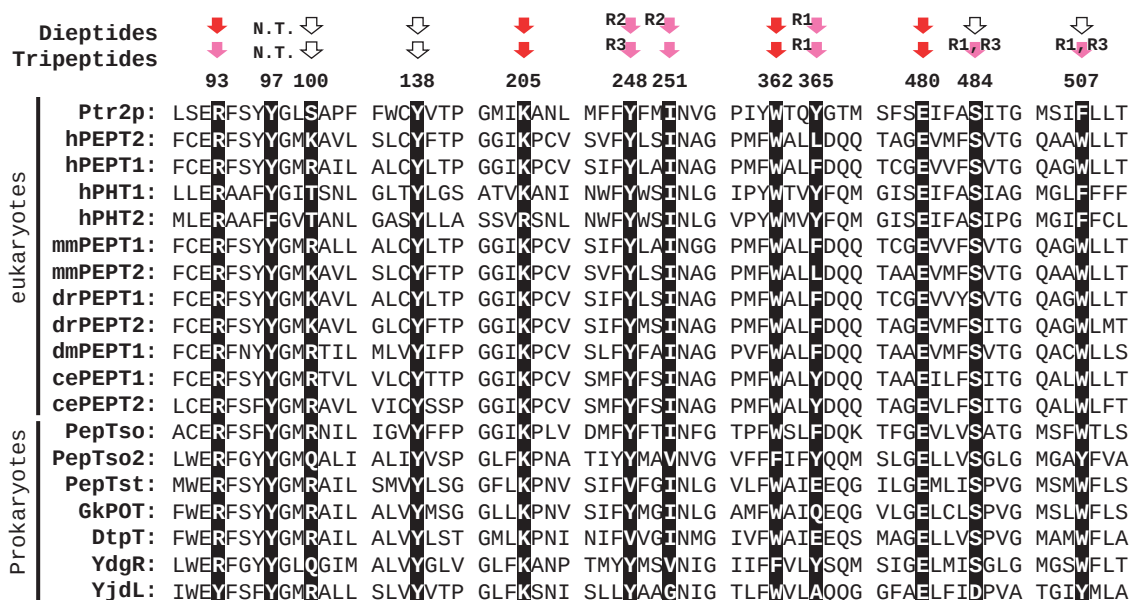


Fig. 5. Primary sequence alignment of POT family members. Amino acid sequence alignment of Ptr2p (UniProt: P32901) from *Saccharomyces cerevisiae* with hPEPT2 (Q16348), hPEPT1 (P46059), hPHT1 (Q8N697), and hPHT2 (Q8IY34) from *Homo sapiens*; mmPEPT1 (Q9JIP7) and mmPEPT2 (E9QMN8) from *Mus musculus*; drPEPT1 (Q7SYE4) and drPEPT2 (Q2F800) from *Danio rerio*; dmPEPT1 (P91679) from *Drosophila melanogaster*; cePEPT-1 (Q21219) and cePEPT-2 (Q17758) from *Caenorhabditis elegans*; PepTso (Q8EKT7) and PepTso2 (Q8EHE6) from *Shewanella oneidensis*; PepTst (Q5M4H8) from *Streptococcus thermophilus*; GkPOT (Q5KYD1) from *Geobacillus kaustophilus*; DtpT (U6EMX6) from *Lactococcus lactis*; and YdgR (H0Q8G3) and YjdL (Q8XDS3) from *Escherichia coli*. The amino acid residues that constitute the substrate-binding site are highlighted against a black background. The numbers from the N-terminus of Ptr2p are shown. A summary of the contributions for substrate recognition of each amino acid position of Ptr2p is indicated by an arrowhead in the upper part of the alignment. The colors correspond to the degree of contribution toward substrate recognition (Figs. 2 and 3). Red: definitive; pink: supporting; white: no contribution. N.T.: not tested.

要 約

本研究では、ジ・トリペプチドの生体吸収を担うペプチド輸送体（POT）について、基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基の基質認識への寄与を解析した。その結果、ジ・トリペプチドのR2（R3）の認識には共通性が見られる一方で、R1の認識は相互作用の詳細が異なることが示唆された。以上より、POTが多様なジ・トリペプチドをただ一つの基質結合ポケットで認識する分子メカニズムの一端が明らかとなり、大豆ペプチドの生体吸収に関する基礎的知見が得られた。

文 献

- 1) Matthews DM (1975): Intestinal absorption of peptides. *Physiol Rev*, **55**, 537-608.
- 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) 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.
- 4) Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VL, Xia X, Fowler PW, Ingram JC, Carpenter EP, Sansom MS, McPherson MJ, Baldwin SA and Iwata S (2011): Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J*, **30**, 417-426.
- 5) Lyons JA, Parker JL, Solcan N, Brinth A, Li D, Shah ST, Caffrey M and Newstead S (2014): Structural basis for polyspecificity in the POT family of proton-coupled oligopeptide transporters. *EMBO Rep*, **15**, 886-893.
- 6) Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, Newstead S, Ishitani R and Nureki O (2013): Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 11343-11348.
- 7) Guettou F, Quistgaard EM, Raba M, Moberg P, Löw C and Nordlund P (2013): Selectivity mechanism of a bacterial homolog of the human drug-peptide transporters PepT1 and PepT2. *Nat Struct Mol Biol*, **21**, 728-731.
- 8) Cheng Y and Prusoff WH (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, **22**, 3099-3108.