

総説

ペプチドトランスポーターの分子栄養学

白神 俊幸, 田中 裕子, 宮本 賢一

徳島大学医学部病態栄養学教室

(平成10年8月27日受付)

Molecular nutrition of intestinal oligopeptide transporter

Toshiyuki Shiraga, Hiroko Tanaka, and Ken-ichi Miyamoto

Department of Clinical Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima

はじめに

腸管からの栄養素の吸収は、生命維持に最も必要な基本的機能の一つであり、分子生物学の進歩とともに新しい局面が展開されている。特に、蛋白質の吸収機構は、これまで考えられていたように小腸管腔内でアミノ酸にまで完全に加水分解されて吸収されるのではなく、管腔内では主にオリゴペプチドとして存在し、ジおよびトリペプチドに転換された後、ペプチド輸送システムにより輸送されることが明らかにされている。またペプチド輸送システムは、幅広い基質認識特性を有することから、ペプチド様構造のβ-ラクタム抗生物質をはじめとするペプチド性薬物のドラッグデリバリーシステムを考えるうえでも重要な働きをしている。このように、蛋白終末消化産物や薬物の吸収の中核をなすペプチド輸送システムは、栄養学、薬理学および生理学的に極めて重要であり、最近多くの注目が寄せられている。本稿では、ペプチド輸送担体の機能や発現調節を中心に、最近の進歩について概説する。

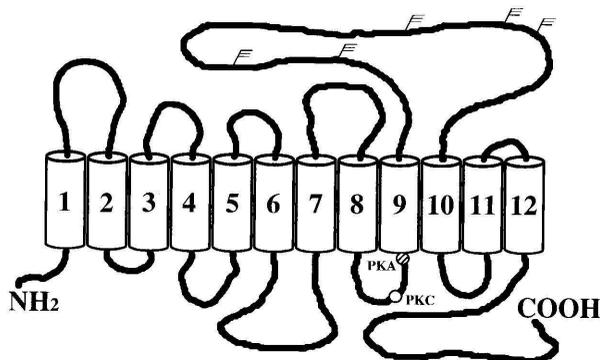
1. ペプチド輸送担体分子

小腸および腎臓の上皮細胞刷子縁膜には、2~3個のアミノ酸から構成されるペプチドをH⁺濃度勾配依存的に細胞内へ共輸送するシステムが存在する⁽¹⁻³⁾。最近、ウサギの小腸よりPepT1⁽⁴⁾と呼ばれるペプチド輸送担体をコードするcDNAがクローニングされたのに続いて、ヒト⁽⁵⁾およびラット^(6,7)小腸PepT1、また腎臓に特異的なペプチド輸送担体であるPepT2⁽⁸⁻¹⁰⁾がクローニングされた。ラットPepT1 cDNAは約3 kbの全長

を有し、710個のアミノ酸をコードしていた^(6,7)。その推定の一次構造は12回の膜貫通領域を有し、その9番目(M9)と10番目(M10)の膜貫通領域間の親水性細胞外大ループに5つの糖鎖付加部位が、またM8とM9の細胞内小ループにprotein kinase C (PKC) (Ser357) およびprotein kinase A (PKA) (Thr362) 依存性のリン酸化部位がそれぞれ存在する⁽⁶⁾(図1)。また、ラットPepT1とウサギおよびヒトPepT1とのアミノ酸配列を比較した結果、膜貫通領域は3種間で高度に保存されており、全体でそれぞれ77%および83%のホモロジーが確認された。しかし、細胞外ループ部および細胞内C末端部におけるアミノ酸配列には類似性が見られなかった。

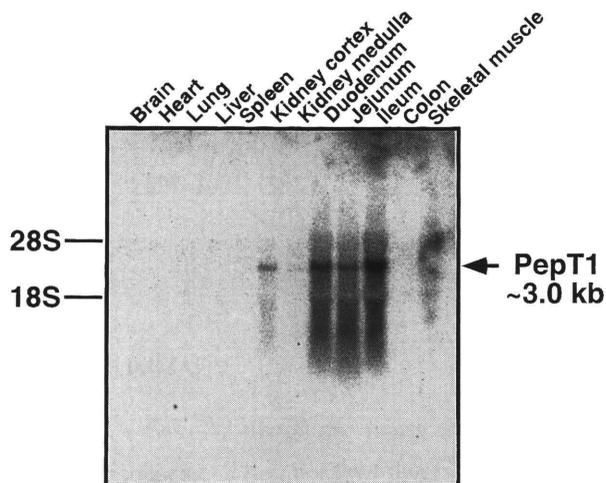
また、PepT2は約4 kbの全長を有し、729個のアミノ酸から構成され、PepT1蛋白と同様、12回の膜貫通

図1. ラットPepT1の一次構造



9番目(M9)と10番目(M10)の膜貫通領域間の親水性細胞外大ループに付けた5つの印は推定の糖鎖付加部位を、またM8とM9の細胞内小ループのPKCおよびPKAはそれぞれprotein kinase Cおよびprotein kinase A依存性のリン酸化部位を示す。

図2. ラット PepT 1 mRNA の組織分布



を有している⁽⁸⁻¹⁰⁾。両者のアミノ酸配列を比較すると、全体としては約47%前後のホモロジーしか認められないが、膜貫通領域は比較的保存されていた。

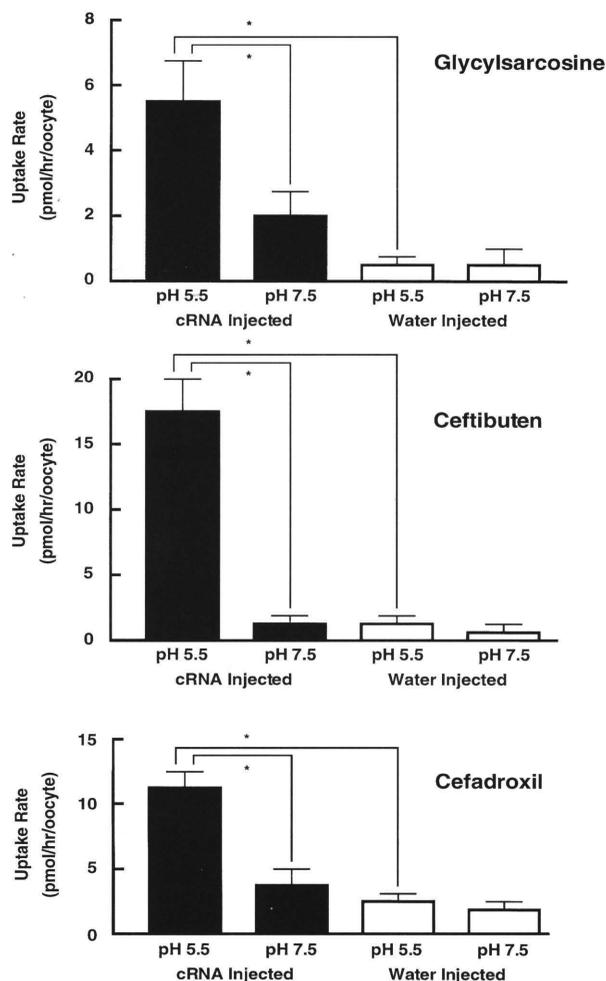
さらに興味深いことに、PepT 1およびPepT 2のアミノ酸配列は、植物⁽¹¹⁾あるいは酵母⁽¹²⁾の窒素やペプチドの輸送蛋白に一部類似性が見られ、一連のコンセンサス配列 (ALGTGG および ERFSSYYG) が高度に保存されていることから、ペプチド輸送において機能的に重要な配列であると考えられた。

次に、ラットの各組織における PepT 1 mRNA の発現を図2に示している。ラット PepT 1 mRNA は、小腸 (十二指腸, 空腸, 回腸) および腎臓皮質での発現が認められた⁽⁶⁾。しかし、ウサギやヒトのような脳や肝臓等における発現は総 RNA を用いたノーザンプロットでは検出されない。また、ラット、ヒトおよびウサギ PepT 2 mRNA の発現量は極めて少なく、各組織の poly (A)+RNA を用いたノーザンプロットや reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) により腎臓に発現していることが明らかとなっている⁽⁸⁻¹⁰⁾。

2. 機能解析

ラット PepT 1 cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションし、機能を検討した。PepT 1 はジペプチドであるグリシルサルコシン (Gly-Sar) およびβ-ラクタム抗生物質 (Ceftibuten, Cefadroxil) を、H⁺濃度勾配依存的に輸送する活性を有していた⁽¹³⁾ (図3)。また、Gly-Sar の取り込みはジおよびトリペプチドにより阻害されるが、テトラ以上のペプチドや遊

図3. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析



[¹⁴C] Glycylsarcosine (50μM) およびβ-ラクタム抗生物質 (2 mM) の取り込みは、それぞれ25℃, pH5.5あるいはpH7.5で1~2時間行った。N=5~8, Mean±S.E.M. *P<0.05

離のアミノ酸による影響は全く見られなかった⁽¹³⁾ (図4)。以上のことから、PepT 1 の小腸での機能は図5のように考えられる。

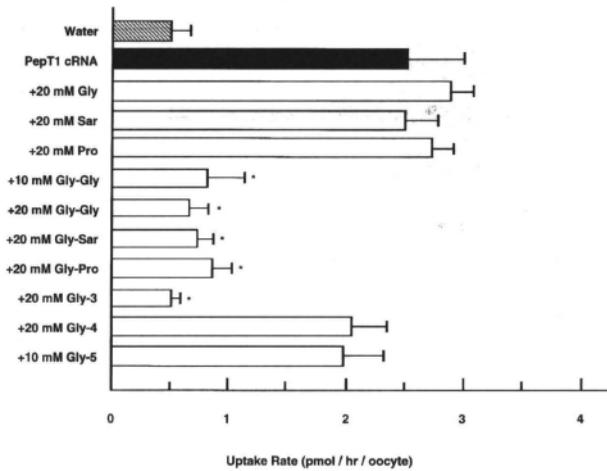
PepT 2 に関しては機能解析の結果から、PepT 1 に比べて high-affinity, low-capacity な輸送特性を有すること、ペプチド性薬物に対する親和性が PepT 1 と異なることが明らかになっている^(14,15)。

3. 遺伝子プロモーター

我々は PepT 1 の発現調節機構を解明するために、ラット PepT 1 遺伝子の 5' 上流領域をクローニングした⁽¹⁶⁾ (図6)。

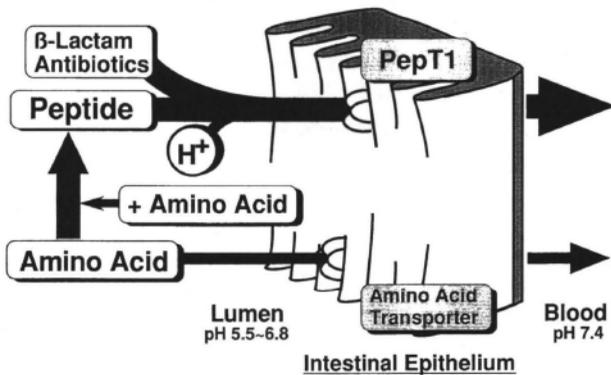
さらに、種々の鎖長のルシフェラーゼキメラ遺伝子を腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞にトランスフェクション

図4. $[^{14}C]$ Glycylsarcosineの取り込みにおける各種遊離アミノ酸およびペプチドの影響



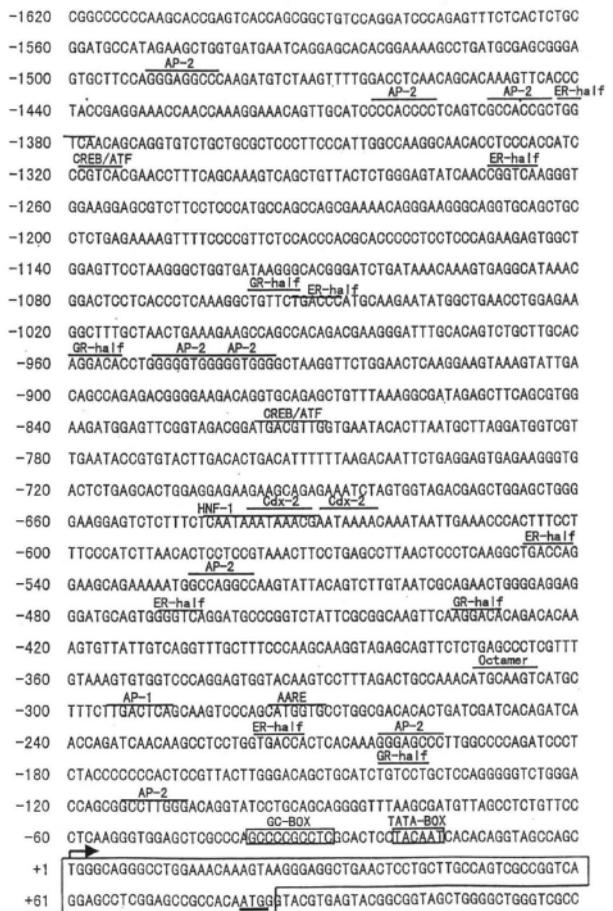
$[^{14}C]$ Glycylsarcosine (50 μ M)の取り込みは、図に示した濃度のアミノ酸およびペプチドの存在下において、25 $^{\circ}C$, pH5.5で1時間行った。
N=5~9, Mean \pm S. E. M. *P<0.05vs. control (closed column)

図5. 小腸におけるジ、トリペプチドおよびペプチド性薬物の吸収機構



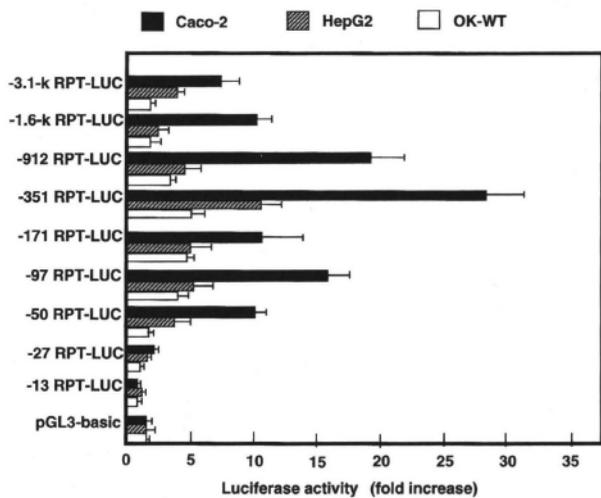
し、プロモーター活性を調べた(図7)。TATA-like boxあるいはGC-boxを含む転写開始点より上流50bp内に基本プロモーター活性があり、転写調節因子AP-1結合サイトを含む351bpまでの領域で最大のプロモーター活性を示した。小腸特異的転写因子の1つ、caudal-related homeodomain transcription factor Cdx-2⁽¹⁷⁾の結合サイトに類似の配列が、PepT1プロモーターの-630bp付近にも見出された。そこで、この領域を含む-912RPT-LUCクローンをCaco-2細胞にトランスフェクションし機能を検討したが、小腸特異性は示さなかった。PepT1の小腸特異的発現を規定している配列について今後の解明が待たれる。

図6. ラット PepT1 プロモーター領域の塩基配列



矢印は転写開始点, 大きい box で囲んだ配列は Exon 1, 下線は翻訳開始コドン, 配列上部の線は推定した転写因子結合サイトをそれぞれ示している。

図7. プロモーター解析



種々の鎖長のラット PepT1 プロモーター-ルシフェラーゼキメラ遺伝子をヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞, 肝癌由来 HepG2 細胞およびフクロネズミ腎尿管由来 OK 細胞にトランスフェクションし, プロモーター活性を調べた。β-galactosidase 活性をトランスフェクション効率のコントロールとした⁽¹⁶⁾。

4. アミノ酸誘導 (アミノ酸応答配列)

PepT 1 の発現を調節する主な因子として、食事性蛋白質摂取が知られており^(16,18,19)、蛋白質の終末消化産物であるペプチドやアミノ酸が直接発現を調節している可能性が示唆されている⁽¹⁹⁾。我々はペプチドによる転写調節機構を解明するため、Caco-2 細胞の培養メディアウムにグリシルフェニルアラニン (Gly-Phe) あるいはフェニルアラニン (Phe) を添加し、ディリーションミュータントクローンの応答性を検討した。-351までの領域内でこれらのジペプチドおよび遊離アミノ酸に対する応答性が認められた (図 8 A)。

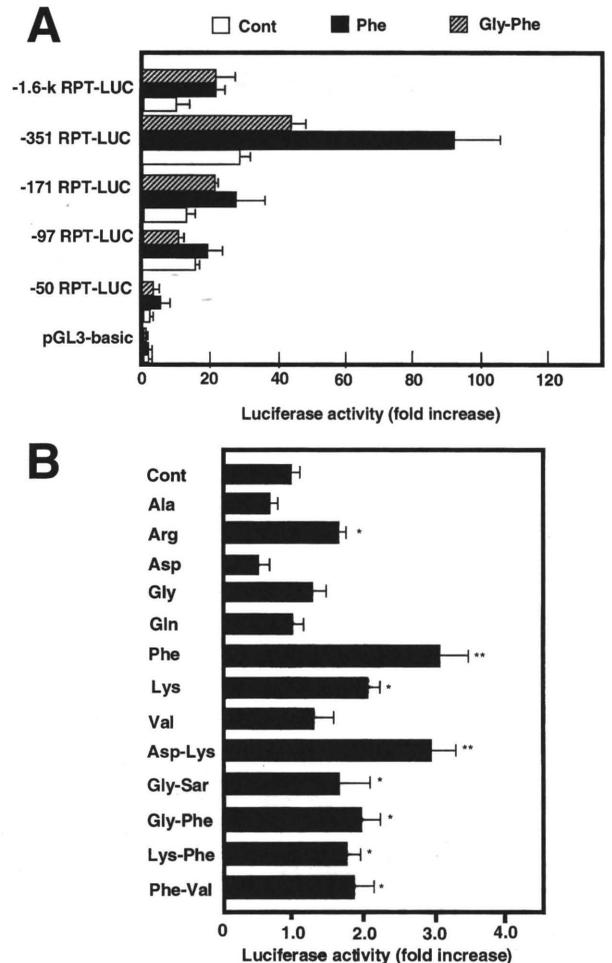
興味深いことにこの領域内には、アミノ酸合成酵素 asparagine synthetase 遺伝子のプロモーター領域に見出されるアミノ酸応答配列 amino acid response element (AARE) 5'-CATGATG-3'⁽²⁰⁾ に極めて高いホモロジーを示す配列 5'-CATGGTG-3' が存在する。さらに、AP-1 の構成要素の1つである c-jun はアミノ酸欠乏時に誘導され⁽²¹⁾、また AP-1 結合サイトは、アミノ酸欠乏環境下において窒素源の調節を制御する酵母の転写因子 GCN 4 の結合サイトに類似している⁽²¹⁾。よって、これらの配列がアミノ酸応答に重要と考えられた。

次に、-351RPT-LUC クローンのプロモーター活性に与える、種々のジペプチドあるいは遊離アミノ酸の効果を検討した。ジペプチドおよび一部の遊離アミノ酸 (Phe, リジン (Lys) およびアルギニン (Arg)) に転写の誘導能が認められた (図 8 B)。よって、食事性蛋白質の終末消化産物が直接 PepT 1 プロモーター活性を誘導することが示唆された。

5. ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用

PepT 1 は小腸において蛋白質分解産物のジおよびトリペプチドだけでなく、ペプチド様構造の β -ラクタム抗生物質をはじめとするペプチド性薬物をも輸送すること、またペプチド輸送システムは、アミノ酸輸送システムに比べて幅広い基質認識特性を有すると共に、極めて高い輸送効率を有していることから、ペプチド性薬物のドラッグデリバリーシステム (DDS) を考えるうえで極めて重要であると考えられている^(22,23)。また、PepT 2 は腎臓に特異的であり、基質親和性が高いことから、腎臓近位尿管におけるペプチド再吸収と血中アミノ酸濃度の調節は、PepT 1 よりもむしろ PepT 2 が担ってい

図 8. ペプチドおよびアミノ酸に対するプロモーターの応答性



- (A) Caco-2 細胞にディリーションクローンをトランスフェクションし、4日後10mM Glycylphenylalanine (Gly-Phe) あるいは20mM phenylalanine (Phe) を含む DMEM メディアウムに交換し、さらに48時間培養した。
- (B) 種々のジペプチドおよび遊離アミノ酸 (10mM あるいは20mM) を添加した場合の-351RPT-LUC クローンのプロモーター活性を調べた⁽¹⁶⁾。

ると考えられる。

このような点から、小腸における PepT 1 はペプチド性薬物の吸収制御に、また腎臓の PepT 2 および PepT 1 は薬物の再吸収による体内滞留時間の制御に意義があると考えられる。

黒質のメラニン含有ニューロンの変性とそれに伴うドーパミン欠乏により起こるパーキンソン病の治療薬として以前用いられていた L-3,4-dihydroxydopamine (L-DOPA) や L- α -methyldopa は、Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送担体を介して吸収されるが、血液脳関門に達する以前にドーパミンに代謝されるため、治療効率が極めて低かった^(24,25)。そこで、フェニルアラニンを結合

させてジペプチド様構造にした L- α -methyldopa-L-phenylalanine^(24,25)や、さらに腸管での脱炭酸による不活化を回避するためにトリペプチド様構造にした p-Glu-L-DOPA-L-Pro⁽²⁶⁾がプロドラッグとして経口投与されるようになった。これらプロドラッグは、小腸におけるペプチド輸送担体を介して吸収させた後、循環血流により最終的に脳へドーパミンを送り込むために設計されたものである⁽²⁵⁻²⁸⁾。

実際、我々の行った輸送実験でも L-DOPA-L-Phe が PepT 1 を介して輸送されることが示された (図 9)。したがって、パーキンソン病治療薬以外にもジあるいはトリペプチド様構造に修飾したプロドラッグを本輸送システムを利用して吸収させる経口ドラッグデリバリーが可能であると考えられる。また、腎臓においても薬物の再吸収と排泄を制御することが可能であろう。

6. 小腸粘膜障害時における PepT 1 発現誘導

手術侵襲時や栄養素吸収不良時のような、腸管粘膜上皮の萎縮により栄養素の吸収障害が起こる状況下において、ペプチド輸送システムはアミノ酸や糖の輸送システムに比べて障害されにくいことが報告されている⁽²⁹⁾。そこで、抗癌剤 5-fluorouracil (5-FU) の投与により実験的に小腸粘膜を障害させたラットにおけるペプチド吸収能、PepT 1 蛋白および mRNA の発現量と組織局在を検討した⁽³⁰⁾。

小腸粘膜障害ラットの刷子縁膜小胞において、アミノ酸の取り込み活性はコントロールに比べて有意に低下したが、ジペプチド Gly-Sar の取り込みはほとんど影響を受けなかった。抗 PepT 1 抗体を用いた免疫組織化学染色では、5-FU 投与により著しく萎縮した絨毛の villi から crypt にかけて発現が見られたが (図10D)、コントロールとしての sucrase 蛋白の発現は見られなかった

図 9. 小腸における L-DOPA-L-Phe および L-DOPA の吸収機構

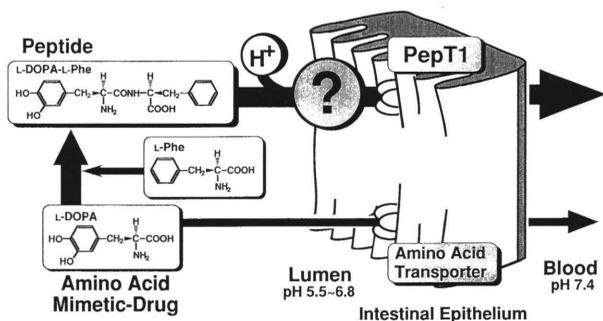
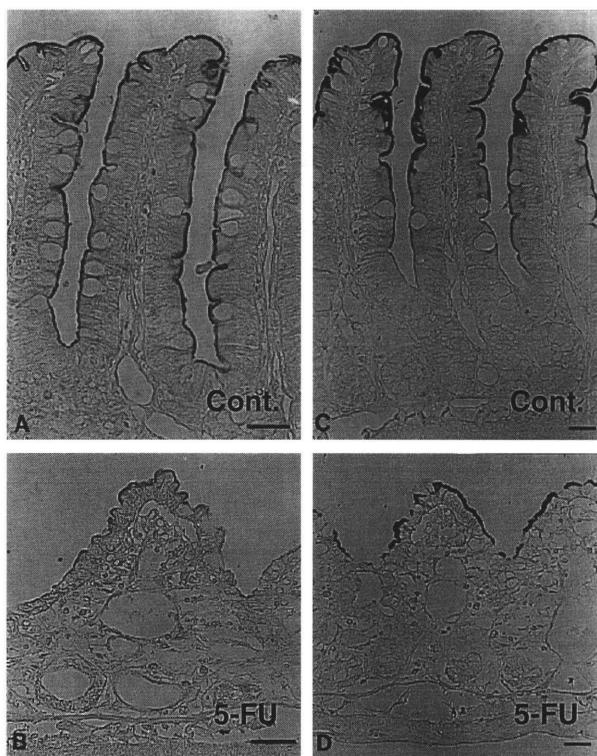


図10. 免疫組織化学染色



Sucrase

PepT1

5-fluorouracil (5-FU) を胃内投与したラットの回腸における抗 PepT 1 抗体あるいは抗 sucrase 抗体を用いた免疫組織化学染色。(A と C) はコントロール, (B と D) は 5-FU 処理, (A と B) は sucrase, (C と D) は PepT 1 をそれぞれ示している⁽³⁰⁾。

(図10B)。また、ウエスタンブロット解析においても、同様の結果が得られた。以上の結果は、ペプチド吸収能が粘膜障害に対して強い抵抗性を示す理由と考えられた。さらに、小腸の種々の栄養素輸送担体や酵素遺伝子 mRNA の発現レベルを検討したところ、5-FU 投与により PepT 1 mRNA のみ約2.2倍発現量が増加していた。したがって、粘膜障害時におけるペプチド吸収や PepT 1 蛋白レベルの維持は、PepT 1 遺伝子の発現レベルの増加によるものと考えられた⁽³⁰⁾。つまり、小腸粘膜障害時に見られるアミノ酸や糖の吸収能低下によるエネルギー供給不足の状態においても、代償的にペプチド輸送担体遺伝子の発現が増加することにより、ペプチド由来の窒素源を十分に確保しているものと考えられる。これらのことから、オリゴペプチドを利用した経腸栄養剤は、易吸収性に加え、病態時における蛋白源として極めて有用であることが示唆された。

おわりに

栄養素吸収機構の研究は、栄養学をはじめ臨床医学の分野でもその重要性が再認識されている。特に蛋白質の吸収の問題は、アレルギー疾患の発症に深く関与しており、その解明が急がれている。本稿では、ペプチド輸送担体 PepT 1 の機能および遺伝子発現調節機構を中心に述べた。PepT 1 は、蛋白質終末消化産物の吸収過程でその中核となる分子であり、今後多くの研究成果が蓄積され、新しい局面が展開されると思われる。

文 献

- Ganapathy, V. and Leibach, F.H. : Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.*, **249** : G153-G160, 1985
- Nussberger, S. and Hediger, M.A. : How peptides cross biological membranes. *Exp. Nephrol.*, **3** : 211-218, 1995
- Hediger, M.A., Kanai, Y., You, G., and Nussberger, S. : Mammalian ion-coupled solute transporters. *J. Physiol.*, **482** : 7 S-17S, 1995
- Fei, Y. -J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., et al. : Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, **368** : 563-566, 1994
- Liang, R., Fei, Y. -J., Prasad, P.D., Ramamoorthy, S., et al. : Human intestinal H⁺/peptide cotransporter : Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.*, **270** : 6456-6463, 1995
- Miyamoto, K., Shiraga, T., Morita, K., Yamamoto, H., et al. : Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1305** : 34-38, 1996
- Saito, H., Okuda, M., Terada, T., Sasaki, S., et al. : Cloning and Characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of β -lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275** : 1631-1637, 1995
- Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y. -J., et al. : Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, **1235** : 461-466, 1995
- Saito, H., Terada, T., Okuda, M., Sasaki, S., et al. : Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT 2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1280** : 173-177, 1996
- Boll, M., Herget, M., Wagener, M., Weber, W.M., et al. : Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** : 284-289, 1996
- Tsay, Y.F., Schroeder, J., Feldmann, K.A., and Crawford, N.M. : The herbicide sensitivity gene CHL 1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, **72** : 705-713, 1993
- Perry, J.R., Basrai, M.A., Steiner, H.Y., Naider, F., et al. : Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell. Biol.*, **14** : 104-115, 1994
- Tamai, I., Nakanishi, T., Hayashi, K., Terao, T., et al. : The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT 1 to intestinal absorption of β -lactam antibiotics in the rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.*, **49** : 796-801, 1997
- Ganapathy, M.E., Brandsch, M., Prasad, P.D., Ganapathy, V., et al. : Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J. Biol. Chem.*, **270** : 25672-25677, 1995
- Terada, T., Saito, H., Mukai, M., Inui, K. : Recognition of β -lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2, in LLC-PK 1 cells. *Am. J. Physiol.*, **273** : F706-F711, 1997
- Shiraga, T., Miyamoto, K., Tanaka, H., Yamamoto, H., et al. : Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/peptide transporter PepT 1. *Gastroenterology*, in press
- Wu, G.D., Wang, W., and Traber, P.G. : Isolation and characterization of the human sucrase-isomaltase gene and demonstration of intestine-specific transcriptional elements. *J. Biol. Chem.*, **267** : 7863-7870, 1992
- Erickson, R.H., Gum Jr, J. R., Lindstrom, M.M., McKean, D., et al. : Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216** : 249-257, 1995
- Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.

- J., et al. : Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT 1. *J. Physiol.*, 507 : 697-706, 1998
20. Guerrini, L., Gong, S.S., Mangasarian, K., and Basilico, C. : cis- and trans-Acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 13 : 3202-3212, 1993
21. Pohjanpelto, P. and Holtta, E. : Deprivation of a single amino acid induces protein synthesis-dependent increases in c-jun, c-myc, and ornithine decarboxylase mRNAs in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, 10 : 5814-5821, 1990
22. Tsuji, A. : Intestinal absorption of β -lactam antibiotics. *In* : Peptide-based drug design (Talur, M.D. and Amidon, G.L., eds.), American Chemical Society, Washington, DC, 1995, pp. 299-316
23. Tamai, I., Tomizawa, N., Takeuchi, T., Nakayama, K., et al. : Functional expression of transporter for β -lactam antibiotics and dipeptides in *Xenopus laevis* oocytes injected with messenger RNA from human, rat and rabbit small intestines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273 : 26-31, 1995
24. Tsuji, A. and Tamai, I. : Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.*, 13 : 963-977, 1996
25. Yee, S. and Amidon, G.L. : Oral absorption of angiotensin-converting enzyme inhibitors and peptide prodrugs. *In* Peptide-based drug design (Taylor, M. D. and Amidon, G.L., eds.), American Chemical Society, Washington, DC, 1995, pp. 299-316
26. Bai, J.P. : pGlu-L-Dopa-Pro : a tripeptide prodrug targeting the intestinal peptide transporter for absorption and tissue enzymes for conversion. *Pharm. Res.*, 12 : 1101-1104, 1995
27. Tsuji, A., Tamai, I., Nakanishi, M., and Amidon, G.L. : Mechanism of absorption of the dipeptide α -methyldopa-phe in intestinal brush-border membrane vesicles. *Pharm. Res.*, 7 : 308-309, 1990
28. Amidon, G.L. and Lee, H.J. : Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34 : 321-341, 1994
29. 萩平博, 中坊幸弘 : ペプチドの吸収と代謝. *代謝*, 27 : 37-44, 1990
30. Tanaka, H., Miyamoto, K., Morita, K., Haga, H., et al. : Regulation of the PepT 1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology*, 114 : 1-11, 1998

SUMMARY

The oligopeptide transporter (PepT 1), which is located in the intestinal brush border membrane, provides a major mechanism for protein absorption in the small intestine. Molecular cloning of the gene encoding rat PepT 1 has predicted a 78,710 -kilodalton protein consisting of 710 amino acid residues and processing 12 putative membrane-spanning domains. The characterization of its function has shown that (1) it transports dipeptides, tripeptides, and β -lactam antibiotics but not free amino acids or peptides with more than four amino acid residues, and (2) its driving force for uphill transport requires proton binding. A human intestinal cell line (Caco-2) has been used to investigate the molecular regulation of the PepT 1 gene. These studies suggest that amino acids directly stimulate the promoter activity of the PepT 1 gene. Thus, PepT 1 plays important roles in nutritional and pharmacological therapies.

Key words : H^+ -dependent oligopeptide transporter, di- and tripeptides, promoter region, drug delivery system, intestinal mucosal injury