

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-142231  
(P2010-142231A)

(43) 公開日 平成22年7月1日(2010.7.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 Z N A A	4 B O 1 8
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B O 2 4
A 2 3 L 1/305 (2006.01)	A 2 3 L 1/305	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 35/20 (2006.01)	A 6 1 K 35/20	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-292696 (P2009-292696)  
 (22) 出願日 平成21年12月24日 (2009.12.24)  
 (62) 分割の表示 特願2004-526636 (P2004-526636) の分割  
 原出願日 平成15年8月5日 (2003.8.5)  
 (31) 優先権主張番号 PA200201194  
 (32) 優先日 平成14年8月9日 (2002.8.9)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 PA200300361  
 (32) 優先日 平成15年3月11日 (2003.3.11)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 501216034  
 セーホーエル、ハンセン アクティーゼルス  
 スカブ  
 デンマーク国、デーコーー2970 ホー  
 ルスホルム、ペー、オー、ボックス 40  
 7、ペイエ アレ 10-12  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法

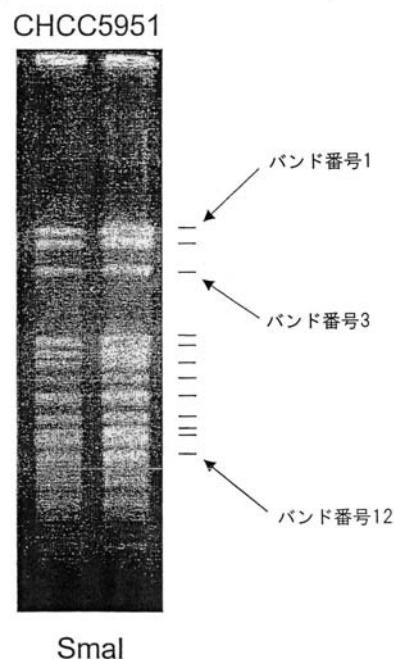
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗高血圧特性を有するペプチドの作成に関して特に改良された特徴を有する乳酸菌(LAB)の取得方法を提供する。

【解決手段】 prtH200細胞壁プロテイナーゼを有する乳酸菌(ラクトバチルス・ヘルベチカスDSM14998)、及び上記乳酸菌の使用による、抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法。前記乳酸菌を用いた機能性食品の製造方法、及び上記機能性食品。また、高血圧治療用医薬の製造のための、上記機能性食品の使用。

【選択図】 図1

図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法であって、該方法が、動物乳タンパク質又は野菜タンパク質を含む食材を乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を得ることを含み、上記乳酸菌が、(p r t H 2 0 0 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含むことを特徴とし、ここで該遺伝子配列は、

p r t H 2 0 0 が、細胞壁プロテイナーゼ活性を示す酵素をコードする DNA 配列であり、該 DNA 配列が以下の：

(a) 配列番号 1 の 1 ~ 5 5 5 0 位で表される DNA 配列；

(b) (a) で定義される DNA 配列の対応する断片に少なくとも 5 0 % 同一である、少なくとも 7 5 塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列； 10

(c) 細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1 8 4 9 位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 3 0 % 同一である、少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列；

(d) 配列番号 1 の 1 ~ 5 5 5 0 位で表される DNA 配列を含む二重鎖 DNA プローブと低い厳密度でハイブリダイズする DNA 配列；及び

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定される DNA 配列の断片である DNA 配列；

からなる群から選ばれるように定義される、前記方法。

## 【請求項 2】

前記乳酸菌がまた、(o r f F 3 と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列は、

o r f F 3 がオープン・リーディング・フレームをコードする DNA 配列であり、該 DNA 配列は以下の：

(a) 配列番号 3 の 1 ~ 2 6 7 9 位で表される DNA 配列；

(b) (a) で定義される DNA 配列の対応する断片に少なくとも 4 0 % 同一である、少なくとも 7 5 塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列；

(c) 配列番号 4 の 1 ~ 8 9 3 位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 3 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列； 30

(d) 配列番号 3 の 1 ~ 2 6 7 9 位で表される DNA 配列を含む二重鎖 DNA プローブと低い厳密度でハイブリダイズする DNA 配列；及び

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定される DNA 配列の断片である DNA 配列

を含む群から選ばれるように定義される、請求項 1 に記載の抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法。

## 【請求項 3】

前記乳酸菌がまた、受託番号 D S M 1 4 9 9 8 を有するラクトバチルス・ヘルベチカス (Lactobacillus helveticus) 菌の P F G E フィンガープリントの 2 8 3 k b p のバンド及び 2 1 9 k b p のバンドに対応する 2 個の P F G E フィンガープリントのバンドの組み合わせを含み、ここで、該 P F G E フィンガープリントが、上記乳酸菌のクロモソーム DNA を単離し、該クロモソーム DNA を制限酵素 S m a I で完全に切断し、そして該切断された DNA をアガロースゲル上で電気泳動することを含むプロトコルにより作られる、請求項 1 又は 2 に記載の抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法。 40

## 【請求項 4】

前記食材が、動物の乳タンパク質を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。

## 【請求項 5】

前記動物の乳タンパク質が、カゼインである、請求項 4 に記載のペプチドの製造方法。

## 【請求項 6】

前記食材が、乳汁又は乳汁に基く材料である、請求項 4 に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 7】

前記乳酸菌が、発酵菌(Firmicutes)門、より好ましくは、バチルス(Bacilli)綱、さらにより好ましくは、ラクトバチルス(Lactobacillales)目の細菌である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 8】

前記ラクトバチルス(Lactobacillales)目の細菌が、乳酸桿菌(Lactobacillaceae)科、より好ましくは、ラクトバチルス(Lactobacillus)属の細菌、及びさらに好ましくはラクトバチルス・ヘルベチカス(Lactobacillus helveticus)菌である、請求項 7 に記載のペプチドの製造方法。

10

【請求項 9】

前記細菌が、受託番号 D S M 1 4 9 9 8 のラクトバチルス・ヘルベチカス菌又はその突然変異体である、請求項 8 に記載のペプチドの製造方法。

【請求項 10】

抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の製造方法であって、該方法が以下のステップ：

(iii) 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法に従って発酵食材を製造し、そして

(iv) 該発酵食材を適切な方法でパッキングして機能性食品を得るステップを含む、前記方法。

20

【請求項 11】

請求項 10 に記載の機能性食品を製造する方法によって獲得できる抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品。

【請求項 12】

高血圧治療用医薬の製造のための、請求項 11 に記載される抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の使用。

【請求項 13】

受託番号 D S M 1 4 9 9 8 のラクトバチルス・ヘルベチカス菌又はその突然変異体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

発明の分野

本発明は、抗高血圧特性を有するペプチドを製造するために、約 200 kDa の細胞壁プロテイナーゼを含む乳酸菌を使用すること、及びそうした乳酸菌の取得方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術の記載

高血圧は、先進工業国において、心発作に関する最も主要な危険因子のうちの一つであると報告されている。高血圧は、アンジオテンシン変換酵素(ACE)を強く阻害する薬剤で治療されることが多い。疾患発達の初期段階で、高血圧を予防することは、薬剤による高血圧の治療の代わりとなりうる。現在では、多数の食物由来の生理活性化合物が、健康に有益であり、また健康を促進すると考えられている。

40

【0003】

血圧制御において、アンジオテンシン I 変換酵素(ACE)は、重要な役割を果たす。ACE は、血圧を増大するように作用する。レニン-アンジオテンシン系において、ACE は、アンジオテンシン I を、その C 末端の His-Leu を加水分解することにより、アンジオテンシン II へと変換する。アンジオテンシン II は、強い血管収縮性作用を示す。さらに、キニン-カリクレイン系において、ACE は、血管拡張を助けるブラジキニンを不活性化する。ACE 阻害剤はそれゆえ、血圧低減に有用である。現在、幾つかの ACE 阻害剤が既に存在している。最初に報告された ACE 阻害剤は、蛇毒中に見つかった天

50

然ペプチドであった。それから、多くの他のACE阻害剤が発見されてきた。

【0004】

乳酸菌(LAB)により発酵された乳汁は、乳酸菌のタンパク質分解活性によって乳汁中のカゼインからペプチドが遊離することに起因する抗高血圧効果を作り出しうるということが知られている。このペプチドはACE阻害剤として作用する。

【0005】

カルピス食品工業(the company Calpis Food Industry)の論文[Yamamoto et al(1994, J. Dairy Sci., 77: 917-922)は、ラクトバチルス・ヘルベチカスCP790株(Lactobacillus helveticus CP790 strain)による乳汁発酵が、抗高血圧効果をもたらし、この効果は、エル・ヘルベチカス(L.helveticus)のタンパク質分解活性によって乳汁中カゼインからペプチドが遊離することに起因するということを開示した。このペプチドは、ACE阻害剤として作用する。これらのペプチドの抗-高血圧特性は、自然発症高血圧ラットにおいて試験された。タンパク質分解活性を持たないエルビー・ヘルベチカス(Lb.helveticus)の同系突然変異体による乳汁発酵は、抗高血圧効果を示さなかった。

10

【0006】

論文[Gobbetti M. et al (2000, Appl Environ Microbiol, 66 (9), 3898-3904.)は、乳汁を発酵するためのラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスFT4 (Lactococcus lactis subsp. cremoris FT4)又はラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスSS1 (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus SS1)を使用することによって生産されるACE阻害ペプチドを含む発酵乳を記載した。

20

【0007】

EP821968(カルピス食品工業)は、受託番号FERMBP-4835のラクトバチルス・ヘルベチカス株を使用することによって生産されるACE-阻害ペプチドを含む発酵乳を記載する。

【0008】

EP1016709(カルピス食品工業)は、受託番号FERMBP-6060のラクトバチルス・ヘルベチカス株を使用することにより生産されるACE阻害ペプチドを含む発酵乳を記載する。

【0009】

WO01/32836(Valio Ltd)は、受託番号DSM 13137のラクトバチルス・ヘルベチカス株を使用することにより生産されるACE阻害ペプチドを含む発酵乳を記載する。

30

【0010】

乳酸菌(LAB)は幾つかのアミノ酸について栄養要求性であるので、LABは、乳汁中で成長する間、複合的なタンパク質分解系に依存して必須アミノ酸を得る。カゼインを、LABにより利用されるアミノ酸へ加水分解することは、カゼインをオリゴペプチドへと加水分解する細胞壁プロテイナーゼにより開始される。オリゴペプチドは、次にオリゴペプチド輸送システムを通して、細胞壁中へ輸送される。オリゴペプチドがひとたび細胞内に入ると、細胞内ペプチダーゼがオリゴペプチドを遊離アミノ酸へと加水分解する。

【0011】

ウィスコンシン大学及びユタ州立大学の論文[Pederson et al (1999, J. of Bacteriology, 181: 4592-4597)は、ラクトバチルス・ヘルベチカスCNRZ32株由来のprtH 204kDaの細胞壁プロテイナーゼのDNA配列及びアミノ酸配列を記載する。この論文では、抗高血圧特性を有するペプチドを作るためにこの株を使用することについては記載されていないし、また提案されていない。

40

【0012】

カルピス食品工業の論文[Yamamoto et al (2000), Biosci.Biotechnol. Biochem., 64 (6): 1217-1222]は、ラクトバチルス・ヘルベチカスCP790株由来のprtY 45kDaの細胞壁プロテイナーゼのDNA配列及びアミノ酸配列を記述する。CP790株は、prtH 204kDaの細胞壁プロテイナーゼを含まない[Yamamoto et al (2000)の考察を参照のこと]。「材料と方法」の項目において「CP790は、日本の発酵乳製品

50

であるカルピスのスターターカルチャーから単離された」と記述されるように、C P 7 9 0 株は、カルピス食品工業の商品において使用される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

発明の要約

本発明により解決される課題は、抗高血圧特性を有するペプチドの作成に関して特に改良された特徴を有する乳酸菌(L A B)の取得方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

課題の解決方法は、本発明の発明者により、特定の細胞壁プロテイナーゼを含む乳酸菌が、そうした性質を有するということが同定されたことに基いている。この特定の細胞壁プロテイナーゼは、本明細書中でp r t H 2 0 0と呼ばれる。本明細書中で記載されるp r t H 2 0 0細胞壁プロテイナーゼを有する乳酸菌が、改良された抗高血圧特性を有するペプチドを作ることができるということが、本明細書中の実施例5において示される。

【0015】

本明細書中に記載されるp r t H 2 0 0プロテイナーゼは、ウィスコンシン大学及びユタ州立大学の論文[Pederson et al (1999)、上記参照]において記載されるラクトバチルス・ヘルベチカスC N R Z 3 2株由来のp r t H 2 0 4 k D a細胞壁プロテイナーゼに一致する。この論文では、抗高血圧特性を有するペプチドを作るためにC N R Z 3 2を使用

10

20

【0016】

本発明者の知る限りでは、本明細書中に記載されるp r t H 2 0 0プロテイナーゼに対応する細胞壁プロテイナーゼを含む乳酸菌を記載しているほかの参考文献はない。

【0017】

W O 01/32836(Valio Ltd)で記載される受託番号D S M 1 3 1 3 7のラクトバチルス・ヘルベチカス株は、本明細書中で記載されるp r t H 2 0 0特異的P C Rプライマーにより同定できるp r t H 2 0 0細胞壁プロテイナーゼ遺伝子配列を含まないということが、本明細書中の実施例3において実験的に示された。カルピス食品工業の論文[Yamamoto et al (2000)、上記参照のこと]において説明されるように、カルピス食品工業の少なくとも

30

【0018】

p r t H 2 0 0プロテイナーゼをコードする遺伝子配列が乳酸菌内に存在することは、適切に設計されたP C Rプライマーを使用するP C R増幅により確認されうる。当業者が、適切に設計されたP C Rプライマーを持っている場合、適切な特異的P C R増幅プロトコルを行うための一般的な知識を使用して、乳酸菌に遺伝子配列が存在するかどうかを確認することはたやすいことである。

【0019】

結果として、当業者は、いくつかの乳酸菌を迅速に選別し、p r t H 2 0 0遺伝子配列を有する株を同定し、そしてそれにより産業に関連する改良された特性を有する特異的に選ばれた乳酸菌を取得しうる。

40

【0020】

従って、本発明の第一の態様は、乳酸菌の取得方法であって、以下のステップ：

(i) 乳酸菌が、(p r t H 2 0 0と名づけられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含む乳酸菌であるかを調べ、(ここで該遺伝子配列は、以下の[センス配列(S)；アンチセンス配列(A)]：

## 【化 1】

PrH200: (a): (S): 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC 3',  
 (A): 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3';  
 (b): (S): 5' GCCAAGACGCCTCTGGTA 3',  
 (A): 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'; 及び  
 (c): (S): 5' AARGTWCCWTAYGGYYWYAAAYTA 3',  
 (A): 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3';

10

からなる群から選ばれる PCR プライマー・セットを使用して、上記乳酸菌のゲノム DNA を PCR 増幅することにより同定できる) ; そして

(i i) もし該乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たすなら、該乳酸菌を取得し ; 又は

(i i i) もし乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たさないなら、別の乳酸菌についてステップ(i)を繰り返すステップ  
 を含む前記方法に関する。

20

但し、上記乳酸菌がラクトバチルス・ヘルベチカス CNRZ 32 株である場合を除く。

## 【0021】

「ラクトバチルス・ヘルベチカス CNRZ 32 株」という用語は、ウィスコンシン大学及びユタ州立大学の論文 [Pederson et al (1999)、上記参照のこと]において記載される株のことを指す。

## 【0022】

ラクトバチルス・ヘルベチカス DSM 14998 の p r t H 2 0 0 の DNA 配列及びアミノ酸配列は、配列番号 1 及び配列番号 2 に示される。

## 【0023】

p r t H 2 0 0 配列及びそれらに相同な配列に基いて、適切な PCR プライマーは、配列番号 1 の p r t H 2 0 0 遺伝子及び該配列に相同な遺伝子を同定するために、ルーチンに決められる。

30

## 【0024】

従って、本発明の第二の態様は、乳酸菌の取得方法であって、以下のステップ :

(i) 乳酸菌が、(p r t H 2 0 0 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含む乳酸菌であるかを調べ、ここで該遺伝子配列は、

p r t H 2 0 0 が細胞壁プロテイナーゼ活性を示す酵素をコードする DNA 配列であり、該 DNA 配列が、以下の :

(a) 配列番号 1 の 1 ~ 5550 位で表される DNA 配列

40

(b) (a)において定義される DNA 配列の断片に少なくとも 50% 同一である少なくとも 75 塩基対 (b p)の断片を含む DNA 配列

(c) 細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1849 位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 30% 同一である少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a)断片を含む、上記ポリペプチドをコードする DNA 配列

(d) 配列番号 1 の 1 ~ 5550 位で表される DNA 配列を含む二重鎖 DNA プローブと低い厳密度でハイブリダイズする DNA 配列 ; 及び

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)において特定化される DNA 配列の断片である DNA 配列

50

からなる群から選ばれる；そして

(ii) 上記乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たすなら、次に該乳酸菌を取得し；又は

(iii) 上記乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たさないなら、次に他の乳酸菌でステップ(i)を繰り返すステップ

を含む、前記方法に関する。但し、上記乳酸菌が、ラクトバチルス・ヘルベチカス CN R Z 3 2 株である場合を除く。

【0025】

上で記載されるように、本明細書中で記載される p r t H 2 0 0 プロテイナーゼを含む乳酸菌の利点は、抗高血圧特性を有するペプチドの作製に関して改良された特徴である

10

【0026】

結果として、第三の態様において、本発明は、抗-高血圧特性を有するペプチドの製造方法に関する。該方法は、動物乳タンパク質又は野菜タンパク質を含む食材を、乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を取得することを含み、該乳酸菌が、(p r t H 2 0 0 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含み、そして該細胞壁プロテイナーゼの存在が、以下の[センス配列(S)；アンチセンス配列(A)]：

【化2】

20

PrtH200: (a): (S): 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC3',

(A): 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3';

(b): (S): 5' GCCAAGACGCCTCTGGTA 3',

(A): 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'; 及び

(c): (S): 5' AARGTWCCWTAYGGYYWYAAAYTA 3',

(A): 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3'.

30

からなる群から選ばれるPCRプライマー・セットを使用して、乳酸菌のゲノムDNAをPCR増幅することにより同定できることを特徴とする。

【0027】

第四の態様では、本発明は、抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法に関する。該方法は、動物乳タンパク質又は植物タンパク質を含む食材を、乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を取得することを含み、該乳酸菌が(p r t H 2 0 0 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含むことを特徴とする。ここで該遺伝子配列は、

40

p r t a H 2 0 0 が、細胞壁プロテイナーゼ活性を示す酵素をコードするDNA配列であり、該DNA配列が、以下の：

(a) 配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列

(b) (a)において定義されるDNA配列の対応する断片に少なくとも50%同一である少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列

(c) 細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号2の1～1849位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも30%同一である少なくとも200個のアミノ酸(aa)断片を含む上記ポリペプチドをコードするDNA配列

(d) 配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列を含む二重鎖D

50

N A プローブと低い厳密度でハイブリダイズする D N A 配列 ; 及び

( e ) ( a )、( b )、( c )、又は( d )において特定される D N A 配列の断片である D N A 配列

からなる群から選ばれる  
と定義される。

【 0 0 2 8 】

上で説明されるように、本発明の発明者の知る限りでは、本明細書中の第三及び第四の態様に記載の方法で、本明細書中に記載される乳酸菌の使用を明確に記載する参考文献はない。但し、本出願の出願日前に、本明細書中の第三及び第四の態様に記載の方法で使用されると記載された乳酸菌が、本明細書中に記載される p r t H 2 0 0 遺伝子配列を含む  
10  
ということを将来の実験が示すこともある。そうした仮定の場合では、そうした特定の乳酸菌は、本発明の第三及び第四の態様の特許請求の範囲から削除されるだろう。言い換えれば、第三及び第四の態様は、「ある特定の乳酸株を除く」と読むことができる記載を含むだろう。

【 0 0 2 9 】

本発明の第五の態様は、ペプチドの製造方法であって、以下のステップ :

( i ) 本発明の第一及び第二態様に従った乳酸菌を取得する方法により、乳酸菌を取得し ;

( i i ) タンパク質を含む食材を、( i ) で得られた乳酸菌で発酵して、上記ペプチドを含む発酵食材を取得するステップ  
20  
を含む方法に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明の第五態様の一の実施態様は、抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法であって、以下のステップ :

( i ) 本発明の第一及び/又は第二態様に従った乳酸菌の取得方法により、乳酸菌取得し ;

( i i ) 動物乳タンパク質又は野菜タンパク質を含む食材を、( i ) で得られた乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を取得するステップ ;  
30  
を含む方法に関する。

【 0 0 3 1 】

本発明の第三及び第四態様に関する上記但し書きは、第五態様及びその実施態様には関係しない。第五態様は、乳酸菌において、本発明で議論される p r t H 2 0 0 プロテナーゼの存在を積極的に調べるステップを含む。この点で、このステップは新規のステップである。

【 0 0 3 2 】

本明細書中に記載されるように作られるペプチドは、抗高血圧特性を有する機能性食品を製造するために使用されうる。

【 0 0 3 3 】

従って、本発明の第六態様は、抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品を製造することに関し、この方法は、以下のステップ :

( i ) ペプチドに抗高血圧特性を有するペプチドを製造する方法に従って、発酵食材を製造し、そして

( i i ) 適切な方法で該食材をパッキングして、機能性食品を得るステップ  
40  
を含む。

【 0 0 3 4 】

「パッキング」という用語は、広義に理解されるべきである。ひとたび食材が発酵されるか、発酵食材が得られるなら、発酵食材は、消費者に提供されるためにパッキングされるべきである。該食品は、ボトル、テトラパック ( 登録商標 ) などの中にパッキングされる。好ましくは、該パッケージ上に又は付随する宣伝用材料に、この機能性食品が抗高血圧特性を有するということが表示される。  
50

## 【 0 0 3 5 】

第六態様の方法は、本明細書中に記載される方法の利点の一つを示す。本明細書中に記載される p r t H 2 0 0 プロテイナーゼを含む乳酸菌を使用することにより、発酵の後に、良好の抗高血圧特性を有するペプチドの有効量が直接与えられる。その結果、発酵食材からペプチドをさらに精製し又は濃縮する必要性を考慮されない。発酵食材は、直接パッキングされ、そして市場に機能性食品として提供されうる。

## 【 0 0 3 6 】

第七態様では、本発明は、本明細書中に記載される抗高血圧特性を有するペプチドを製造する方法により得ることができる抗高血圧特性を有するペプチドに関する。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書中で記載される p r t H 2 0 0 プロテイナーゼを含む乳酸菌で発酵することにより生産されるペプチドは、これらのプロテイナーゼを含まない乳酸菌で発酵することにより生産されるペプチドとは異なる。このことは、本明細書中で記載される p r t H 2 0 0 プロテイナーゼを含む乳酸菌で発酵することにより生産されるペプチドの改良された抗高血圧効果により機能的に確認された。

## 【 0 0 3 8 】

第八態様では、本発明は、本明細書中で記載される機能性食品を製造する方法により得ることができる抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品に関する。

## 【 0 0 3 9 】

第九態様では、本発明は、高血圧治療用医薬の製造のための、抗高血圧特性を有する第七態様のペプチドの使用に関する。

## 【 0 0 4 0 】

第十態様では、本発明は、高血圧治療用医薬の製造のための、抗高血圧特性を有する第八態様のペプチドを含む機能性食品の使用に関する。

## 【 0 0 4 1 】

定義：

本発明の詳細な実施態様を記述する前に、本発明の主要な態様に関わる特徴的な用語の定義を与える。

## 【 0 0 4 2 】

「乳酸菌」という用語は、本明細書中で、グラム陽性、非発芽性の細菌であって、糖の乳酸発酵を行う細菌の群を指す。

## 【 0 0 4 3 】

「遺伝子」という用語は、本明細書中で、基礎理学的及び機能的な遺伝単位として通常の意味に従って定義される。遺伝子は、特定のクロモソーム上の特定の位置に位置する秩序だったヌクレオチドの配列(例えばDNA又はRNA)であって、特定の機能的産物(つまり、タンパク質又はRNA分子)をコードする。

## 【 0 0 4 4 】

「縮重(degenerated)プライマーの命名法」は、当該技術分野の標準的命名法に従う。つまり Y = C 又は T ; R = A 又は G ; M = A 又は C ; K = G 又は T ; S = G 又は C ; W = A 又は T ; H = A 又は C 又は T ; B = G 又は T 又は C ; V = G 又は C 又は A ; D = G 又は A 又は T ; N = G , A , C 又は T である。

## 【 0 0 4 5 】

断片を含むDNA/アミノ酸配列に関する「断片」という用語は、連続的かつ部分的な配列、例えば、600個のアミノ酸を有するアミノ酸配列において75位~300位のことを指す。

## 【 0 0 4 6 】

二つの配列間の同一性比較に関して、「対応する断片」という用語は、対応する大きさの断片に関する。好ましくは、比較される二つの断片間のサイズの違いは、50%未満である。言い換えれば、一の断片が100bpであるなら、もう一方の断片は好ましくは150bp未満である。より好ましくは、比較される二つの断片間におけるサイズの違いは

10

20

30

40

50

、25%未満であり、さらにより好ましくは比較される二つの断片間のサイズの違いは、5%未満である。

【0047】

本発明の実施態様は、一例として、以下に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、ラクトバチルス・ヘルベチカスCHCC5951株(受託番号第DSM14998号)の Puls-Field-Gel電気泳動(PFGE)のフィンガープリントである。

【発明を実施するための形態】

10

【0049】

発明の詳細な記載

Pr t H 2 0 0 細胞壁プロテイナーゼ

細胞壁プロテイナーゼの活性は、好ましくは乳酸菌の中に存在する間に確認される。適切な戦略は、分析される細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子に致死変異を有する乳酸菌を構築することである。この構築された細菌のタンパク質分解活性(適切なアッセイについては以下を参照のこと)を、対応する野生型細菌の活性と比較した。対応する野生型と比較したとき、致死変異を有する乳酸菌のタンパク質分解活性の計測できる低減により、分析される細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子が、活性のある乳酸細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子であるということが実験的に確認されるだろう。

20

【0050】

当業者は、適切な致死変異を有する乳酸菌の構築の仕方を知っている。例えば、上記 Pederson et al (1999) 及び Yamamoto et al (1994) を参照のこと。

【0051】

本発明の出願日において、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)は、そのインターネットのサイト(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で、標準BLASTコンピューター・配列相同性検索を提供した。

【0052】

配列番号1及び配列番号2に示されるラクトバチルス・ヘルベチカスDSM14998の pr t H 2 0 0 のDNA配列及びアミノ酸配列は、受託番号AF133727でGeneBankデータベースで公表された。このデータベースの配列識別番号は、gi|5758038|gb|AF133727.1|AF133727である。

30

【0053】

配列番号2の1~1849位で表される pr t H 2 0 0 アミノ酸配列を、参照配列として使用する標準タンパク質-タンパク質BLAST[blastp]検索は、数ある中で以下の結果を与えた。(データベース配列識別番号は、イタリック体で与えられる。この情報は、公表された配列を明らかに特定し、そして当業者は、これに基く配列の取得の仕方を知っている)：

【0054】

gi|129346|sp|P15293|P2P\_LACLC : P I I 型プロテイナーゼ前駆体(ラクトセピン(Lactocepin))(細胞壁結合セリンプロテアーゼ)。生物体：ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス(Lactococcus lactis subsp. cremoris)

40

同一性：配列番号2の pr t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して50%の同一性を有する1600個のアミノ酸断片

【0055】

gi|149582|gb|AAA25248.1|:プロテイナーゼ 生物体：ラクトバチルス・パラカゼイ(Lactobacillus paracasei)

同一性：配列番号2の pr t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して49%の同一性を有する1632個のアミノ酸断片

【0056】

50

gi|1381114|gb|AAC41529.1| : (L48487) プロテイナーゼ前駆体 生物体:ラクトバチルス  
デルブレッキー(Lactobacillus delbrueckii)

同一性: 配列番号2の p r t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して32%の  
同一性を有する1682個のアミノ酸断片

【0057】

gi|18568398|gb|AAL76069.1| : (AF468027) 細胞外皮プロテイナーゼ 生物体:ラクトバ  
チルス・ペントサス(Lactobacillus pentosus)

同一性: 配列番号2の p r t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して63%の  
同一性を有する415個のアミノ酸断片

【0058】

gi|9963932|gb|AAG09771.1|AF243528\_1:(AF243528) 細胞外皮プロテイナーゼ  
生物体:ストレプトコッカス・サーモフィラス(Streptococcus thermophilus)

同一性: 配列番号2の p r t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して30%の  
同一性を有する781個のアミノ酸断片

【0059】

gi|482386|pir||A44833: ラクトセピン(EC 3.4.21.96) 生物体:ラクトコッカス・ラク  
チス(Lactococcus lactis)

同一性: 配列番号2の p r t H 2 0 0 のアミノ酸配列の対応する断片に対して61%の  
同一性を有する264個のアミノ酸断片

【0060】

これらの特異的配列は、全て、細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって  
、配列番号2の1~1849位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも  
30%同一である少なくとも200個のアミノ酸配列の断片を含むポリペプチドをコード  
するDNA配列を表す。

【0061】

配列番号1の1~5550位において示される p r t H 2 0 0 のDNA配列を、参照配  
列として使用する標準ヌクレオチド-ヌクレオチドブラスト[Blastn]検索は、数ある中で  
、以下の結果を与えた。

【0062】

gi|149580|gb|M83946.1|LBAMPRO プロテイナーゼ(p r t P)遺伝子。生物体:ラクト  
バチルス・パラカゼイ(Lactobacillus paracasei)

同一性: 配列番号1の p r t H 2 0 0 DNA配列の対応する断片に対して、84%の同  
一性を有する102bpの断片

【0063】

gi|47197|emb|X14130.1|SLPRT763 細胞壁結合セリンプロテイナーゼのプラスミドpLP7  
63 p r t 遺伝子。生物体:ストレプトコッカス・ラクチス(Streptococcus lactis)

同一性: 配列番号1の p r t H 2 0 0 DNA配列の対応する断片に対して、86%の同  
一性を有する81bpの断片。

【0064】

gi|472834|gb|M24767.1|STRWGPROT W g 2 プロテイナーゼ遺伝子。生物体:エス.クレ  
モリス(S. cremoris)

同一性: 配列番号1の p r t H 2 0 0 DNA配列の対応する断片に対して、86%の同  
一性を有する81bpの断片。

【0065】

gi|149476|gb|J04962.1|LACPRASE P III型プロテイナーゼ(prtP)及び成熟タンパク質  
。生物体:ラクトコッカス・ラクチス(Lactococcus lactis)

同一性: 配列番号1の p r t H 2 0 0 DNA配列の対応する断片に対して、86%の同  
一性を有する81bpの断片。

【0066】

gi|18568397|gb|AF468027.1| 細胞外皮プロテイナーゼ(p r t P)遺伝子。生物体:ラ

10

20

30

40

50

クトバチルス・ペントサス(Lactobacillus pentosus)

同一性：配列番号1のprtH200DNA配列の対応する断片に対して、83%の同一性を有する102bpの断片。

【0067】

これらの特異的配列は、全て、配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列の対応する断片に少なくとも50%同一である少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列を示す。

【0068】

他の「フィンガープリント」遺伝子配列(orfF3、orfF4、及びorfF1)：

本明細書中で記載されるprtH200遺伝子配列は、乳酸菌(LAB)の「フィンガープリント」として検出されうる。

【0069】

orfF3：

好ましくは、prtH200遺伝子配列とは別に、LABはまた、本明細書中でorfF3と名付けられるオープン・リーディング・フレームを含む遺伝子を含む。この遺伝子は、さらなるフィンガープリントとして検出されうる。

【0070】

ラクトバチルス・ヘルベチカスDSM14998のorfF3のDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号3及び配列番号4において記載される。実施例3は、適切なプライマーに基いたorfF3の同定を表す。

【0071】

従って、好ましい実施態様において、本明細書中に記載される乳酸菌は、prtH200遺伝子及び(orfF3と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該配列は、以下の[センス配列(S)；アンチセンス配列(A)]からなる群から選ばれるPCRプライマー・セットを使用して、乳酸菌のゲノムDNAをPCR増幅することにより、同定される。

【化3】

orfF3: (a): (S): 5' CGAAGGCGATAAGTCAAACCTTTGATAATGC 3',  
 (A): 5' CCCGGTTCTGTAAGATAATTTGGATCG 3'; 及び  
 (b): (S): 5' ASTCWRRYTTYGATRATGCW 3',  
 (A): 5' BHKYAMSAWARTTTGGATCR 3'.

【0072】

上記の様に、適切なPCRプライマーは、本明細書中に開示される配列に基いて同定される。

【0073】

従って、好ましい実施態様において、本明細書中に記載される乳酸菌は、prtH200遺伝子と(orfF3と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列は、以下のように定義される。

orfF3はオープン・リーディング・フレームをコードするDNA配列であって、該DNA配列は以下：

(a) 配列番号3の1～2679位で表されるDNA配列

(b) (a)において定義されるDNA配列の対応する断片に少なくとも40%同一である少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列

(c) 配列番号4の1～893位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも30%同一である、少なくとも200個のアミノ酸断片を含むポリペプチドをコードするDNA配列

(d) 配列番号3の1～2679位で表されるDNA配列を含む二本鎖DNAプローブと低い厳密度でハイブリダイズするDNA配列

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)において特定化されるDNA配列の断片であるDNA配列

を含む群から選ばれる。

【0074】

「オープン・リーディング・フレーム」という用語は、DNA配列であって、翻訳開始シグナル、それに正確な順で続くタンパク質を形成するために十分な長さのアミノ酸をコードするトリプレット、続いて翻訳終結シグナルを含むDNA配列を表し、それゆえタンパク質をコードする遺伝子の存在を指し示しうる。

10

【0075】

本出願の出願日で、配列番号4の1～893位で表される推定のorfF3アミノ酸配列を参照配列として使用するタンパク質-タンパク質BLAST[blastp]検索は、公表された相同性配列に関して、比較的限られた最終的な結果を与えた。

【0076】

しかしながら、理論に限られることなく、本明細書中で記載されるorfF3遺伝子は、細胞壁プロテイナーゼをコードすると信じられる。結果として、好ましい実施態様において、本明細書中に記載されるorfF3遺伝子は、細胞壁プロテイナーゼをコードする。

20

【0077】

orfF4:

好ましくは、prtH200遺伝子配列とは別に、LABはまた、本明細書中でorfF4と名付けられるオープン・リーディング・フレームを含む遺伝子を含む。

【0078】

ラクトパチルス・ヘルベチカスDSM14998のorfF4のDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号5及び配列番号6において示される。実施例3は、適切なプライマーに基くorfF4の同定を示す。

30

【0079】

従って、好ましい実施態様において、本明細書中で記載される乳酸菌は、prtH200遺伝子及び(orfF4と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここでこの遺伝子配列は、以下の[センス配列(S); アンチセンス配列(A)]からなる群から選ばれるPCRプライマー・セットを使用する乳酸菌のゲノムDNAのPCR増幅により同定できる。

【化4】

orfF4: (a): (S): 5' GGTGTTGCTCCTGAAGC 3'  
(A): 5' ACTCTAGCACCAGCTAATTGAACATCATG 3'.

40

上記の様に、適切なPCRプライマーは、本明細書中に開示される配列に基いて同定されうる。

【0080】

従って、好ましい実施態様では、本明細書中で記載される乳酸菌は、prtH200遺伝子及び(orfF4と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列は、以下の様に定義される。

50

o r f 4 は、オープン・リーディング・フレームをコードする D N A 配列であり、  
該 D N A 配列は、以下の：

( a ) 配列番号 5 の 1 ~ 4 8 8 1 位で表される D N A 配列

( b ) ( a ) において定義される D N A 配列の対応する断片に対して少なくとも 4 0 % 同一である、少なくとも 7 5 塩基対 ( b p ) の断片を含む D N A 配列

( c ) 配列番号 6 の 1 ~ 1 6 2 7 位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に  
少なくとも 3 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 ( a a ) の断片を含むポリペ  
チドをコードする D N A 配列

( d ) 配列番号 5 の 1 ~ 4 8 8 1 位で表される D N A 配列を含む二重鎖 D N A プ  
ローブと、低い厳密度でハイブリダイズする D N A 配列

( e ) ( a )、( b )、( c )、又は ( d ) において特定化される D N A 配列の断片である  
D N A 配列

を含む群から選ばれる。

【 0 0 8 1 】

本出願の出願日では、配列番号 6 の 1 ~ 1 6 2 7 位で表される推定 o r f F 4 アミノ酸  
配列を参照配列として使用する標準タンパク質-タンパク質 B L A S T [ b l a s t p ] 検  
索は、公表された相同性配列に関して、比較的限られた最終的な結果を与えた。

【 0 0 8 2 】

しかしながら、理論に限られることなく、本明細書中で記載される o r f F 4 遺伝子が  
、細胞壁プロテイナーゼをコードするということが信じられている。結果として、好まし  
い実施態様では、本明細書中に記載される o r f F 4 遺伝子は、細胞壁プロテイナーゼを  
コードする。

【 0 0 8 3 】

好ましくは、本明細書中に記載される乳酸菌は、p r t H 2 0 0 遺伝子、本明細書中に  
記載される o r f 3 遺伝子及び o r f 4 遺伝子を含む。

【 0 0 8 4 】

o r f F 1 :

好ましくは、p r t H 2 0 0 遺伝子配列とは別に、L A B は、本明細書中で o r f F 1  
と名付けられるオープン・リーディング・フレームを含む遺伝子を含む。

【 0 0 8 5 】

ラクトパチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の o r f F 1 の D N A 配列及びアミノ  
酸配列は、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 で表される。

【 0 0 8 6 】

従って、好ましい実施態様では、本明細書中に記載される乳酸菌は、p r t H 2 0 0 遺  
伝子及び ( o r f F 1 ) と名付けられるオープン・リーディング・フレームをコードする遺  
伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列は、以下のように定義される。

o r f F 1 は、オープン・リーディング・フレームをコードする D N A 配列であり  
、該 D N A 配列は、以下の：

( a ) 配列番号 1 9 の 1 ~ 5 3 5 8 位で表される D N A 配列；

( b ) ( a ) において定義される D N A 配列の対応する断片に対して少なくとも 4  
0 % 同一である少なくとも 7 5 塩基対 ( b p ) の断片を含む D N A 配列

( c ) 配列番号 2 0 の 1 ~ 1 7 8 5 位で表されるポリペプチド配列の対応する断片  
に少なくとも 3 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 ( a a ) の断片を含むポリペ  
プチドをコードする D N A 配列

( d ) 配列番号 1 9 の 1 ~ 5 3 5 8 位で表される D N A 配列を含む二重鎖 D N A プ  
ローブと、低い厳密度でハイブリダイズする D N A 配列；及び

( e ) ( a )、( b )、( c )、又は ( d ) で特定化された D N A 配列の断片である、D  
N A 配列

を含む群から選ばれる。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

50

本出願の出願日で、配列番号20の1～1785位で表される推定orff1アミノ酸配列を参照配列として使用する標準タンパク質-タンパク質BLAST[blastp]検索は、公表された相同性配列に関して、比較的限られた最終的な結果を与えた。

【0088】

しかしながら、理論に限られることなく、本明細書中に記載されるorff1遺伝子が、細胞壁プロテイナーゼをコードすることが信じられている。結果として、好ましい実施態様では、本発明中で記載されるorff1遺伝子は、細胞壁プロテイナーゼをコードする。

【0089】

好ましくは、本明細書中で記載される乳酸菌は、本明細書中に記載されるprth200遺伝子、orff3遺伝子、orff4遺伝子、及びorff1遺伝子を含む。

10

【0090】

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)フィンガープリント

本明細書中で記載されるLABの特徴を記述する別の適切な方法は、いわゆるパルスフィールド・ゲル・電気泳動(PFGE)フィンガープリント技術を使用する方法である。

【0091】

PFGEフィンガープリントは、標準的な技術である。本明細書中の好ましいプロトコルは、クロモソームDNAを関心の細菌から単離し、制限酵素SmaIで完全に切断し、そしてアガロースゲル上で、適切な標準分子量マーカーと共に電気泳動を行うことである。本明細書中の実施例7は、さらに詳細に好ましいPFGEプロトコルを記述する。

20

【0092】

アガロース・ゲルを分析することにより、関心のLABについての特異的DNAバンドは同定される。本明細書中の図1は、本明細書中に記載される最良のラクトバチルス・ヘルベチカスCHCC5951株(受託番号DSM14998で寄託された株)についての電気泳動を示す。CHCC5951株のPFGEフィンガープリントは、少なくとも12個の特徴的なバンドを示すということを図1及び実施例7は示す。これらのバンドは以下：

バンド番号1：283kbp

バンド番号2：259kbp

バンド番号3：219kbp

バンド番号4：138kbp

バンド番号5：127kbp

バンド番号6：119kbp

バンド番号7：106kbp

バンド番号8：88kbp

バンド番号9：71kbp

バンド番号10：59kbp

バンド番号11：54kbp

バンド番号12：46kbp

である。

30

【0093】

同一のPFGEフィンガープリントが、上記背景技術部分で記載されるカルピス食品工業及びValio Ltdの菌株を含む多数の菌株で作られた。

40

【0094】

試験された菌株は、どれも283kbpのバンド番号1及び219kbpのバンド番号3に対応する2個のバンドの組み合わせを含まなかった。さらに、試験された菌株はどれも、46kbpのバンド番号12に対応するバンドを含まなかった。

【0095】

これらのバンドは、本明細書中に記載されるLABの改良された特徴に関する情報をコードする。

【0096】

50

従って、好ましい実施態様では、本明細書中に記載される乳酸菌は、p r t H 2 0 0 遺伝子、並びに受託番号 D S M 1 4 9 9 8 を有するラクトバチルス・ヘルベチカス菌の P F G E フィンガープリントの 2 8 3 k b p のバンドと 2 1 9 k b p のバンドに対応する二つの P F G E フィンガープリントの組み合わせを含む。ここで、該 P F G E フィンガープリントは、乳酸菌のクロモソーム D N A を単離し、該クロモソーム D N A を制限酵素 S m a I で完全に切断し、そして切断された D N A をアガロースゲル上で電気泳動することを含むプロトコルにより成される。

【 0 0 9 7 】

「 P F G E フィンガー・プリントのバンドであって、受託番号 D S M 1 4 9 9 8 を有するラクトバチルス・ヘルベチカス菌についての P F G E フィンガー・プリントの特記されたサイズのバンドに対応するバンド」という用語は、ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 が、参照の菌株としてみなされうるという意味で理解されるべきである。好ましくは、同じプロトコルを使用して関心の L A B の同様の P F G E フィンガープリントと、ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 のフィンガープリントを作るべきである。関心の L A B とラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の切断された D N A は、その後適切な分子量マーカーと一緒に、同一のアガロースゲル上で電気泳動される。電気泳動されたアガロースゲルを分析することにより、当業者は次に、ルーチン技術を使用することにより、関心の L A B が、ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 についての特記された大きさのバンドに対応するバンドを含むかどうかを測定する。当業者に知られるように、大きさがわずかに変化しうる。本文脈において、そうしたわずかな変化は、好ましくは 5 k b p の範囲内であるべきである。従って、ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の参照バンドが、例えば 2 8 3 k b p であるなら、関心の分析された L A B の対応するバンドは、好ましくは、 $2 8 3 k b p \pm 5 k b$  の大きさであるはずである。

【 0 0 9 8 】

別の好ましい実施態様では、本明細書中で記載される乳酸菌は、p r t H 2 0 0 遺伝子、及び受託番号 D S M 1 4 9 9 8 のラクトバチルス・ヘルベチカス菌についての P F G E フィンガープリントの 4 6 k b p のバンドに対応する P F G E フィンガープリントのバンドを含む。ここで該 P F G E フィンガープリントは、乳酸菌のクロモソーム D N A を単離し、クロモソーム D N A を制限酵素 S m a I で完全に切断し、そしてアガロースゲル上で切断された D N A を電気泳動することを含むプロトコルにより成される。

【 0 0 9 9 】

同様に分析されるとき、本明細書中で記載される乳酸菌が、以下のフィンガープリントのバンドの全てを含むことがより好ましい。

ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の 2 8 3 k b p のバンドに対応するバンド

ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の 2 1 9 k b p のバンドに対応するバンド

ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 の 4 6 k b p のバンドに対応するバンド

【 0 1 0 0 】

最も好ましくは、本明細書中に記載される乳酸菌は、ラクトバチルス・ヘルベチカス D S M 1 4 9 9 8 について上で与えられた 1 2 個の P F G E フィンガープリント・バンドの全てに対応するバンドを含む。

【 0 1 0 1 】

P C R 増幅

上記されるように、本明細書中に記載される遺伝子配列の存在は、好ましくは本明細書中の教示に従って設計された P C R プライマーを使用する P C R 増幅により確認される。当業者が、適切に設計された P C R プライマーを持つ場合、適切な特意的 P C R 増幅プロトコルを行う一般的な知識を使用して乳酸菌の遺伝子の有無を確認することは、当業者に

10

20

30

40

50

とってたやすいことである。

【 0 1 0 2 】

好ましくは、PCR増幅プロトコル(反応)は、本明細書中の実施例1の記載に従って行われる。

【 0 1 0 3 】

ひとたびPCRが行われると、得られたPCR増幅断片が、本明細書中で記載される遺伝子の断片に一致するかどうかを調べることは、当業者にとってルーチンである。通常、一致するかどうかは、PCR断片の大きさに基いてすでに同定されているかもしれない。なぜなら、当業者は一般的に、所望のPCR断片の大きさを大体知っているからである。所望のPCR断片は、本明細書中に記載される遺伝子のPCR断片に合致する。或いは、PCR断片は、DNA配列を決定され、そして得られたDNA配列が、本明細書中に開示される配列と比較されうる。さらに、PCR断片に対応する遺伝子において致死変異を有する乳酸菌を構築することができる。この構築された細菌のタンパク質分解活性(以下を参照のこと)は、対応する野生型の細菌のタンパク質分解活性と比較され、そして二つの細胞におけるタンパク質分解活性の計測できる変化により、増幅されたPCR断片が、本発明の乳酸菌細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子であるかどうかを実験的に確かめられるであろう。

10

【 0 1 0 4 】

要約すると、当業者は、本明細書中の記載に従って設計されたPCRプライマーを使用して、特定の乳酸菌が、対応する所望のPCR断片を与えることができる遺伝子を含むかどうかをルーチンに同定できる。

20

【 0 1 0 5 】

PCRは、本明細書中に記載される遺伝子が、乳酸菌中に存在するかどうかを調べる好ましい方法である。しかしながら、例えばサザンブロット分析などの別の方法でも行われうる。

【 0 1 0 6 】

PCRプライマー：

上記で説明されるように、Pr t H 2 0 0 遺伝子に関する適切なPCRプライマーは：

【化5】

30

Pr t H 2 0 0 : ( a ) : ( S ) : 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC3',

(A): 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3';

(b): (S): 5' GCCAAGACGCCTCTGGTA 3',

(A): 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'; 及び

(c): (S): 5' AARGTWCCWTAYGGYYWYAAAYTA 3',

(A): 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3'.

40

Pr t H 2 0 0 : ( a ) : ( S ) は、配列番号7で表される；Pr t H 2 0 0 : ( a ) : ( A ) は配列番号8で表される。Pr t H 2 0 0 : ( B ) : ( S ) は、配列番号9で表される；Pr t H 2 0 0 : ( b ) : ( A ) は配列番号10で表される；Pr t H 2 0 0 : ( c ) : ( S ) は配列番号11で表される；Pr t H 2 0 0 : ( c ) : ( A ) は配列番号12で表される。

【 0 1 0 7 】

プライマー・セット(a)を使うとき、増幅されたPr t H 2 0 0 のPCR断片は、好ましくは400bp~800bp、より好ましくは500bp~700bpの大きさであるはずである。プライマー・セット(b)を使用するとき、増幅されたPr t H 2 0 0 のP

50

C R断片は、好ましくは200bp～500bp、より好ましくは250bp～375bpの大きさであるはずである。プライマー・セット(c)を使用するとき、増幅されたP r t H 2 0 0 P C R断片は、好ましくは400bp～800bp、より好ましくは500bp～700bpの大きさであるはずである。

【0108】

最も好ましいP r t H 2 0 0に関するP C Rプライマーは、プライマー・セット(a)及びプライマー・セット(b)である。

【0109】

上記の様に、o r f F 3に関する適切なP C Rプライマーは、

【化6】

10

orfF3: (a): (S): 5' CGAAGGCGATAAGTCAAACCTTTGATAATGC 3',  
 (A): 5' CCCGGTTCTGTAAAGATAATTTGGATCG 3'; 及び  
 (b): (S): 5' ASTCWRRYTTYGATRATGCW 3',  
 (A): 5' BHKYAMSAWARTTTGGATCR 3'.

20

o r f F 3 : ( a ) : ( S ) は、配列番号13で表される。; o r f F 3 : ( a ) : ( A ) は、配列番号14で表される; o r f F 3 : ( b ) : ( S ) は、配列番号15で表される; o r f F 3 : ( b ) : ( A ) は、配列番号16で表される。

【0110】

プライマー・セット(a)を使用したとき、増幅されるo r f F 3・P C R断片は、好ましくは1250～1900bp、より好ましくは1500～1725bpの大きさであるはずである。プライマー・セット(b)を使用したとき、増幅されたo r f F 3・P C R断片は、好ましくは1250bp～1900bp、より好ましくは、1500～1725bpの大きさであるはずである。

【0111】

最も好ましいo r f F 3に関するP C Rプライマーは、プライマー・セット(a)である。

30

【0112】

上記のように、o r f F 4に関する適切なP C R断片は：

【化7】

orfF4: (a): (S): 5' GGTGTTGCTCCTGAAGC 3'  
 (A): 5' ACTCTAGCACCAGCTAATTGAACATCATG 3'.

40

である。

o r f F 4 : ( A ) : ( S ) は、配列番号17で表される; o r f F 4 : ( a ) : ( A ) は、配列番号18で表される。

【0113】

プライマー・セット(a)を使用するとき、増幅されたo r f F 4・P C R断片は、好ましくは700bp～1150bp、より好ましくは875bp～1025bpの大きさであるはずである。

【0114】

50

D N A 配列の相同性/同一性

上記 D N A 配列の相同性/同一性は、二つの配列間の同一性の程度として測定され、第二配列からの第一配列の偏差を指し示す。

## 【 0 1 1 5 】

本発明の出願日において、国立バイオテクノロジー情報センター(N C B I)は、そのインターネットサイト(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で、標準 B L A S T コンピューター配列相同性検索を提供した。

## 【 0 1 1 6 】

B L A S T プログラムは、[Altschul et al (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402]で記載される。 10

## 【 0 1 1 7 】

本発明の文脈では、好ましいコンピューター相同性検索プログラムは、本出願の出願日において、N C B I インターネットサイトにおいて特定される「標準ヌクレオチド-ヌクレオチド B L A S T [blastn]」検索であって、filterをLow complexity、Expectを10に、Word Sizeを11に設定した検索である。

## 【 0 1 1 8 】

参照配列は、プログラム内に導入され、そしてプログラムは、参照配列の対応する断片に対する同一性の割合と共に、公表されている配列の断片を同定する。 20

## 【 0 1 1 9 】

この標準的ヌクレオチド-ヌクレオチド B L A S T コンピュータープログラムを使用すると、本明細書中で記載される P r t H 2 0 0 配列は、好ましくは、配列番号1の1~5550位で表される p r t H 2 0 0 D N A 配列の対応する断片と少なくとも60%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列、より好ましくは、配列番号1の1~5550位で表される p r t H 2 0 0 D N A 配列の対応する断片に少なくとも70%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列、そしてさらに好ましくは、配列番号1の1~5550位で表される p r t H 2 0 0 D N A 配列の対応する断片に少なくとも80%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列である。

## 【 0 1 2 0 】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも100塩基対(b p)、より好ましくは、少なくとも200塩基対(b p)、さらにより好ましくは、少なくとも400塩基対(b p)、及び最も好ましくは少なくとも1500塩基対(b p)であることが好ましい。 30

## 【 0 1 2 1 】

この標準ヌクレオチド-ヌクレオチド B L A S T コンピューター・プログラムを使用すると、本明細書中で記載される o r f F 3 配列は、配列番号3の1~2679位で表される o r f F 3 D N A 配列の対応する断片と少なくとも60%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列、配列番号3の1~2679位で表される o r f F 3 D N A 配列の対応する断片と少なくとも70%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列、及びより好ましくは、配列番号3の1~2679位で表される o r f F 3 の D N A 配列の対応する断片と少なくとも80%同一である少なくとも75塩基対(b p)の断片を含む D N A 配列である。 40

## 【 0 1 2 2 】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも100塩基対(b p)、より好ましくは、少なくとも200塩基対(b p)、さらにより好ましくは、少なくとも400塩基対(b p)、及び最も好ましくは少なくとも1500塩基対(b p)であることが好ましい。

## 【 0 1 2 3 】

この標準ヌクレオチド-ヌクレオチド B L A S T コンピューター・プログラムを使用すると、本明細書中で記載される o r f F 4 配列は、配列番号5の1~4881位で表される o r f F 4 ・ D N A 配列の対応する断片と少なくとも60%同一である少なくとも75 50

塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列、配列番号 5 の 1 ~ 4 8 8 1 位で表される o r f F 4 DNA 配列の対応する断片と少なくとも 7 0 % 同一である少なくとも 7 5 塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列、及びより好ましくは、配列番号 5 の 1 ~ 4 8 8 1 位で表される o r f F 4 の DNA 配列の対応する断片と少なくとも 8 0 % 同一である少なくとも 7 5 塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列である。

【 0 1 2 4 】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも 1 0 0 塩基対 (b p)、より好ましくは、少なくとも 2 0 0 塩基対 (b p)、さらにより好ましくは、少なくとも 4 0 0 塩基対 (b p)、及び最も好ましくは少なくとも 1 5 0 0 塩基対 (b p) であることが好ましい。

【 0 1 2 5 】

或いは、相同性/同一性は、当該技術分野に周知のコンピューター・プログラム、例えば G C G プログラム・パッケージ(ウィスコンシン・パッケージに対するプログラムマニュアル、第八版、1994年8月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) において提供される G A P を用いて適切に測定されうる。

【 0 1 2 6 】

G A P を DNA 配列比較について以下の設定、つまり、G A P クリエーション・ペナルティー (creation penalty) を 5 . 0 及び G A P 伸張ペナルティー (extension penalty) を 0 . 3 で使用すると、B L A S T プログラムに関して上で与えられる好ましい同一性割合はまた、G A P を使用したときの好ましい同一性である。

【 0 1 2 7 】

アミノ酸配列に対する相同性

ヌクレオチド・ホモロジー分析に類似して、本文脈において、好ましいコンピューターホモロジー検索プログラムは、本特許出願の出願日において、N C B I のインターネットサイトにおいて特定される「標準タンパク質-タンパク質 B L A S T [blastp]」検索であって、Composition-based statistics を Yes、Filter を Low complexity、Expect を 1 0、Word Size を 3、Matrix を BLOSUM 62、Gap Costs を Existence 11 Extension1 に設定する検索である。

【 0 1 2 8 】

この標準タンパク質-タンパク質 B L A S T コンピューター・プログラムを使用すると、本明細書中で記載される p r t H 2 0 0 配列は、好ましくは、細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1 8 4 9 位で表される p r t H 2 0 0 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 4 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列、より好ましくは細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1 8 4 9 位で表される p r t H 2 0 0 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 5 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列、さらにより好ましくは、細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1 8 4 9 位で表される p r t H 2 0 0 ポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 6 5 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列、そして最も好ましくは、細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 ~ 1 8 4 9 位で表される p r t H 2 0 0 ポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 8 0 % 同一である少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドをコードする DNA 配列である。

【 0 1 2 9 】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも 3 0 0 個のアミノ酸 (a a)、より好ましくは、少なくとも 4 0 0 個のアミノ酸 (a a)、さらにより好ましくは少なくとも 8 0 0 個のアミノ酸 (a a)、及び最も好ましくは少なくとも 1 2 0 0 個のアミノ酸 (a a) であることが好ましい。

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

50

この標準タンパク質-タンパク質 B L A S T コンピューター・プログラムを使用すると、本明細書中で記載される o r f F 3 配列は、好ましくは少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 4 の 1 ~ 893 位で表される o r f F 3 ポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 40% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、より好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 4 の 1 ~ 893 位で表される o r f F 3 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 50% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、さらにより好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 4 の 1 ~ 893 位で表される o r f F 3 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 65% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、及び最も好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 4 の 1 ~ 893 位で表される o r f F 3 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 80% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列である。

10

## 【0131】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも 300 個のアミノ酸 (a a)、より好ましくは、少なくとも 400 個のアミノ酸 (a a)、さらにより好ましくは少なくとも 800 個のアミノ酸 (a a)、及び最も好ましくは少なくとも 1200 個のアミノ酸 (a a) であることが好ましい。

## 【0132】

この標準タンパク質-タンパク質 B L A S T コンピューター・プログラムを使用すると、本明細書中で記載される o r f F 4 配列は、好ましくは少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 6 の 1 ~ 1627 位で表される o r f F 4 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 40% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、より好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 6 の 1 ~ 1627 位で表される o r f F 4 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 50% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、さらにより好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 6 の 1 ~ 1627 位で表される o r f F 4 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 65% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列、及び最も好ましくは、少なくとも 200 個のアミノ酸 (a a) の断片を含むポリペプチドであって、配列番号 6 の 1 ~ 1627 位で表される o r f F 4 のポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも 80% 同一であるポリペプチドをコードする D N A 配列である。

20

30

## 【0133】

上で与えられる同一性の割合で、断片が少なくとも 300 個のアミノ酸 (a a)、より好ましくは、少なくとも 400 個のアミノ酸 (a a)、さらにより好ましくは少なくとも 800 個のアミノ酸 (a a)、及び最も好ましくは少なくとも 1200 個のアミノ酸 (a a) であることが好ましい。

## 【0134】

或いは、相同性は、当該技術分野に周知であるコンピュータープログラム、例えば G C G プログラム・パッケージ (ウイスコンシン・パッケージのプログラム・マニュアル、第八版、1994年8月、Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) で提供される G A P などを用いて、適切に測定される。

40

## 【0135】

ポリペプチド配列比較について以下の設定：G A P クリエーション・ペナルティー (creation penalty) を 3.0 及び G A P 伸張ペナルティー (extension penalty) を 0.1 で使用すると、B L A S T プログラムに関して上で与えられる好ましい同一性の割合は G A P を使用した時の好ましい同一性である。

## 【0136】

ハイブリッド形成

50

上で記載されるハイブリッド形成は、二重鎖DNAプローブにハイブリダイズする類似のDNA配列を含むように企図される。ヌクレオチドプローブと、相同DNA又はRNAは配列とのあいだの低い、中間の、又は高い厳密度でのハイブリッド形成を測定するための適切な実験条件は、以下の手順を含む。DNA断片又はRNAを含むフィルターを、5 × SSC (塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、Sambrook et al., 1989)で10分間予浸して、5 × SSC、5 × デンハルト溶液(Sambrook et al., 1989)、0.5% SDS及び100 μg/mlの変性され超音波処理されたサケ精子DNA(Sambrook et al., 1989)の溶液中でプレハイブリダイゼーションを行ない、続いて、10 ng/mlのランダム-プライム化(Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132: 6-13) P-dCTP-標識プローブ(比活性 > 1 × 10<sup>6</sup> cpm/μg)で45 12時間ハイブリッド形成させた。フィルターを次に、2 × SSC、0.5% SDS中で、少なくとも55 (低厳密度)、より好ましくは少なくとも60 (中厳密度)、より好ましくは少なくとも65 (中/高厳密度)、さらに好ましくは少なくとも70 (高厳密度)、さらに好ましくは75 (超高厳密度)の温度で30分間二回洗浄した。

10

【0137】

これらの条件下でオリゴヌクレオチドプローブがハイブリッド形成する分子は、X線フィルムを使用して検出される。

【0138】

#### タンパク質を含む発酵可能材料

「タンパク質を含む材料を、乳酸菌で発酵する」などの表現における「タンパク質を含む材料」という用語は、本明細書中において、乳酸菌が成長することができ、それゆえペプチドを含む発酵材料を得ることを可能にするタンパク質を含む材料の全てを指す。ペプチドは、タンパク質の加水分解に基づく乳酸菌細胞壁プロテイナーゼにより得られるペプチドとして理解されるべきである。

20

【0139】

例えば、タンパク質を含む材料は、適切な標準乳酸菌発酵培地、例えばM17培養液又はMRS培養液でありうる。好ましくは、培地は、乳タンパク質構成要素、例えば動物乳汁全体又は脱脂動物乳汁、或いは乳カゼインなどの乳タンパク質要素により好ましく列挙される動物乳タンパク質を含む。

【0140】

30

#### 食材

食材は、動物乳タンパク質又は野菜タンパク質を含むべきである。

【0141】

好ましくは、食材は、動物乳汁全体若しくは脱脂動物乳汁又は乳カゼインなどの乳タンパク質構成要素により列挙される動物乳タンパク質を含む。

【0142】

野菜タンパク質を有する食材は、好ましくは、トウモロコシ、トウモロコシタンパク質、小麦、小麦タンパク質、ダイズ、脱脂ダイズ又はダイズ・タンパク質により列挙される。

【0143】

40

#### 乳酸菌

「乳酸菌」という用語は、本明細書中で、グラム陽性の非出芽菌であって、糖の乳酸発酵を行う菌の群を指す。

【0144】

数ある中で特に、乳酸菌は、ラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する乳酸菌、例えば、ラクトバチルス・ヘルベチカス(Lactobacillus helveticus)、ラクトバチルス・デルブレッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス(Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus)など、ラクトコッカス属に属する乳酸菌、例えば、ラクトコッカス・ラクチス(Lactococcus lactis)など、ストレプトコッカス属に属する乳酸菌、例えば、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィルス(Streptococcus salivarius su

50

bsp. thermophilus)、ルコノストック属に属する乳酸菌、例えば、ルコノストック・ラクチス(*Leuconostoc lactis*)、ビフィドバクテリウム属に属する乳酸菌、例えば、ビフィドバクテリウム・ロングム(*Bifidobacterium longum*)又はビフィドバクテリウム・ブレーブ(*Bifidobacterium breve*)など、並びにペディノコッカス属に属する乳酸菌を含む。

【0145】

乳酸菌は、他の微生物、例えば酵母などとの混合体として使用されうる。

【0146】

多数の異なる乳酸菌を、当業者が公共利用できる。例えば、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ); 及びインターネット上のNCBIの分類学ブラウザ[出願日においては、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>で利用できる]を参照のこと。

10

【0147】

適切な特異的乳酸菌を同定するために、例えば、適切な量の異なる公衆に利用可能な細菌を簡単に取得し、そして本発明に記載される遺伝子配列を含む特異的な株を1以上同定することは、当業者にとって決まりきった仕事である。好ましくは、この過程は、本明細書中に記載されるPCR増幅プロトコルにより行われる。

【0148】

好ましくは、乳酸菌は、発酵菌(Firmicutes)門(Phylum Firmicutes)、より好ましくは、パチルス(Bacilli)綱、さらに好ましくはラクトパチルス(Lactobacillales)目の細菌である。該目のうちで、好ましい乳酸菌は、乳酸桿菌(Lactobacillaceae)科の細菌であり、より好ましくはラクトパチルス属の細菌である。最も好ましくは、該乳酸菌は、ラクトパチルス・ヘルペチカス株である。生物分類学に関しさらに詳述するために、(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 第二版, 第一巻: The Archea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria)を参照のこと。

20

【0149】

特に好ましいラクトパチルス・ヘルペチカス株CHCC5951のサンプルは、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)に、受託番号DSM 14998、2002年5月15日付けで寄託された。寄託は、特許手続きの目的のため、微生物寄託を国際的に認めるブダペスト条約の条件に従って行われた。

【0150】

従って、特に好ましい実施態様は、本明細書中に記載される方法に関連しており、ここで、乳酸菌は、受託番号DSM 14998のラクトパチルス・ヘルペチカスである。

30

【0151】

この関係において、本発明の別の態様は、登録番号DSM 14998を有するラクトパチルス・ヘルペチカス菌、又はそれらの変異体に関する。

【0152】

開始材料として寄託されたDSM 14998株を使用すると、当業者は、慣用の突然変異誘発技術又は再単離技術により、抗高血圧特性を有するペプチドを調製するために適した能力を保持する突然変異体又は誘導体をさらに取得できる。

【0153】

さらに、ラクトパチルス・ヘルペチカス株CHCC4080のサンプルは、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)において、受託番号DSM 14997、2002年5月15日の受託日付で寄託された。寄託は、特許手続きの目的のため、微生物寄託を国際的に認めるブダペスト条約の条件に従って行われた。

40

【0154】

乳酸菌のタンパク質分解活性

本明細書中に記載されるprtH200、orfF3、及びorfF4遺伝子配列は、本明細書中に記載されるように有用な乳酸菌を同定するために、特に適したフィンガープリントとして見ることができる。理論に限られることなく、本明細書中に記載されるフィンガープリント遺伝子配列を含むにもかかわらず、本明細書中に記載される有利な性質を

50

示さない株が存在するということが理論的にありうる。

【0155】

従って、本明細書中に記載されるフィンガープリント遺伝子配列の存在が、乳酸菌において同定されたなら、乳酸菌のタンパク質分解活性を試験することは都合の良いことでありうる。本文脈において、好ましい乳酸菌は、以下に記載される好ましいタンパク質分解活性を有する。

【0156】

本文脈において、活性細胞壁プロテイナーゼを合成することができるとき、乳酸菌は、タンパク質分解活性を有すると考えられる。言い換えれば、細菌の細胞内部分の外側で活性のあるプロテイナーゼを提供することができる。さらに、プロテイナーゼは、タンパク質(例えば乳中に含まれるカゼイン)を分解して、抗高血圧特性を有するペプチドを得ることを可能にする特異性を持つべきである。

10

【0157】

好ましくは、細菌のタンパク質分解活性は、以下のステップ：

(i) 食材 200 ml を該細菌で一晩発酵し、

(ii) 生産されたペプチドを抽出し、そして

(iii) ACE 活性の 50% を阻害するために必要とされるペプチド濃度を計測するアッセイにより、抽出されたペプチドの抗高血圧特性を計測するステップを含むプロトコルにより確定される。

【0158】

ACE 阻害活性アッセイは、本明細書中で DL50 と名付けられる。DL50 値が低ければ低いほど、発酵食材中に含まれるペプチドの抗高血圧効果が高くなる。

20

【0159】

上記プロトコルのステップ(i)において、食材は、好ましくは新鮮な乳汁である。さらに、細菌は、一晩保存培養した形態で、食材に植菌され、そして適切な温度で一晩維持される。適切な温度は、この細菌の成長に適している温度である。当業者は、特定の乳酸菌に対して適した温度の同定の仕方を知っている。ラクトバチルス株では、適切な温度は 37 であり、そしてラクトコッカス株では適切な温度は 30 である。

【0160】

本明細書中の実施例 2 において、発酵及び抽出ステップの詳細で好ましいプロトコル、並びに DL50・ACE 活性アッセイの詳細で好ましいプロトコルが提供される。

30

【0161】

好ましくは、乳酸菌は、以下のステップ：

(i) 200 ml の食材を、該菌で一晩発酵させ、

(ii) 産生されたペプチドを抽出し、

(iii) ACE 活性の 50% を阻害するために必要とされるペプチド濃度(DL50)を計測するアッセイにより、抽出されたペプチドの抗高血圧特性を計測するステップ

を含むプロトコルにおいて、0.25 ~ 5.0 (mg/ml) のアンジオテンシン-変換酵素(ACE)阻害活性(DL50)を有するペプチドを産生することができるタンパク質分解活性を有する。

40

【0162】

より好ましくは、乳酸菌は、0.25 ~ 4.0 (mg/ml) のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性(DL50)を有するペプチドを産生することができ、そしてより好ましくは、このタンパク質分解性乳酸菌は、0.25 ~ 3.5 (mg/ml) のアンジオテンシン-変換酵素(ACE)阻害活性(DL50)を有するペプチドを産生することができる。

【0163】

DL50 範囲の下限は、0.25 mg/ml の代わりに、1.0 mg/ml でありうる。

【0164】

発酵

本発明の方法において、食材の種類及び/又は乳酸菌の組み合わせに依存して変えられ

50

ることがある稼働条件下で乳酸菌により発酵される。好ましくは、食材が既に水溶液ではないなら、食材は、適切な水性溶液に溶解され、この溶液は次に、乳酸菌と混合され、そして発酵の方法により培養される。

【0165】

乳酸菌の培養は、前培養された乳酸菌スターターを、前もって熱滅菌され、そしてインキュベーションのための既定の温度へと冷められた食材溶媒へと加えることにより行われうる。乳酸菌スターターの植菌量は、好ましくは $10^5 \sim 10^7$ 個の乳酸菌細胞数/溶媒mlでありうる。インキュベーション温度は、通常、 $20 \sim 50$  であり、好ましくは $30 \sim 45$  である。インキュベーション時間は、通常 $3 \sim 48$ 時間であり、好ましくは $6 \sim 24$ 時間である。特に、乳酸菌の培養を効率的に行うために、 $3.5 \sim 7$ 、より好ましくは $5 \sim 6$ の範囲のpHを有する溶媒中において培養を行うことが望ましい。さらに、 $4 \sim 7$ の範囲でpHを維持するpH固定培養を行うことが好ましい。インキュベーションは、乳酸菌の数が $10^8$ 細胞/mlを超えたときに、制限なしに終結されうる。

10

【0166】

好ましい実施態様は、本明細書中に記載される方法に関する。ここで、食材の発酵は、食材 $100\text{ml}$ あたり、抗高血圧特性を有するペプチド $0.5 \sim 25\text{mg}$ を産生する条件下、より好ましくは、食材 $100\text{ml}$ あたり、抗高血圧特性を有するペプチド $1 \sim 5\text{mg}$ を産生する条件下で行われる。

【0167】

発酵された食材からの抗高血圧ペプチドの精製

20

上で記載されるように、本明細書中で記載される乳酸菌の使用は、発酵の後にかなり良好の抗高血圧特性を有するペプチドの有効量を直接提供する。

【0168】

しかしながら、幾つかの場合において、発酵食材から抗高血圧ペプチドの精製を引き続いて行うことが好ましいことがある。これは、ペプチドが、かなり高濃度の抗高血圧ペプチドが必要とされる医薬錠剤中に使用される場合でありうる。

【0169】

従って、本発明の実施態様は、本明細書中に記載される抗高血圧特性を有するペプチドを製造するための方法に関し、ここで発酵された食材は、さらに抗高血圧特性を有するペプチドを精製又は濃縮する方法に供せられる。

30

【0170】

例えば、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材は、遠心され、そして得られた上清は、抗高血圧特性を有するペプチドの量が増加するサンプルを得るため、逆相レジンをを用いる精製処理へと供せられる。

【0171】

遠心は、好ましくは、例えば $2000 \sim 20000\text{rpm}$ で $1 \sim 20$ 分行われうる。遠心を遠心機内で行うこともある。

【0172】

逆相レジンをを用いる精製処理は逆相レジンでペプチドを吸収しそして溶出することにより行われうるし、及び/又は逆相クロマトグラフィーにより行われて、それによりペプチドの純度を増大する。

40

【0173】

逆相レジン・プロトコルに関するさらなる技術的な詳細は、EP821968を参照のこと。

【0174】

或いは、発酵食材はさらに、発酵食材にナノろ過を行う方法においてさらに加工される。ナノろ過は、乳酸又は一価イオンを発酵食材から取り除くために行われうる。

【0175】

ナノろ過プロトコルに関するさらなる技術的な詳細は、WO01/32905を参照のこと。

50

## 【0176】

抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品

前述されるように、本明細書中で記載される p r t H 2 0 0 プロテイナーゼを含む乳酸菌の使用は、かなり良好の抗高血圧特性を有するペプチドの有効量を発酵後に直接提供する。結果として、発酵食材から、ペプチドをさらに精製し又は濃縮する必要性が考慮されない。発酵食材は、直接パッキングされ、そして機能性食品として又は食品添加物として、例えばフリーズドライの形態で市場に提供されうる。

## 【0177】

実施例6において、このことが示される。要約すると、実施例6の結果は、発酵乳がそれ自身で、さらなる処理をすることなく、血圧減退効果をさらに有するというを示す。さらにフリーズ-ドライ化された発酵乳は、天然乳に懸濁され、それにより適切な機能性食品を与えうる。フリーズドライ化された発酵乳は、それゆえ適切な食品添加製品としてみなされうる。

10

## 【0178】

従って、本発明の実施態様は、抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の製造方法に関する。該方法は、以下のステップ：

(i) 本明細書中に記載される抗高血圧特性を有するペプチドを製造する方法に従って発酵食材を調製し

(i a) 発酵食材を乾燥し；そして

(i i) 機能性食品をえるために適切な方法で乾燥発酵食材をパッキングするステップ

20

を含む。

ステップ(i a)は、好ましくはフリーズドライである。

## 【0179】

言い換えれば、最終的な機能性食品をさらに処理する必要性がないので、機能性食品が発酵の間存在する乳酸菌のかなりの部分を含むということにより、特徴付けられる。実施例6は、そうした製品が、良好に作用することを明確に示し、そして、乳酸菌が多く の点において有益であると知られていることから、そうした乳酸菌が機能性食品中に存在するということは、実際に利点があるだろう。

## 【0180】

30

従って、本発明の実施態様は、抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の製造方法に関する。該方法は、以下のステップ：

(i i) 本明細書中に記載される抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法に従って発酵食材を製造し、

(i a) 発酵の間、存在する乳酸菌の少なくとも一部を該発酵食材中に保持し、

(i i) 該発酵食材を機能性食品を得る適切な方法でパッキングする

ステップを含む。

## 【0181】

「発酵の間存在する乳酸菌の少なくとも一部を発酵食材中に保持する」という用語は、乳酸菌を取り除くことが必要であるとは考えられないということを説明する点で理解されるべきである。細菌のいくつかは、取り除かれうる。量的に、発酵の間存在する乳酸菌の少なくとも5%を発酵食材中に保持するか、又は発酵の間存在する乳酸菌の少なくとも20%を発酵食材中に保持するというように表現されうる。

40

## 【0182】

実施例6に示されるように、熱処理された発酵食材もまた、良好の血液減少活性を有するので、機能性食品中に保持される乳酸菌は、死滅していてもよいし又は生存していてもよい。

## 【0183】

発酵食材から抗高血圧ペプチドの精製を続いていることが、好ましいかもしれない。

## 【0184】

50

従って、本発明の実施態様は、抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品を製造する方法に関する。この方法は、以下のステップ：

(iii) 本明細書中に記載される抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法に従って発酵食材を製造し、

(i a) ステップ(i)の発酵食材を、上で記載される方法に従って抗高血圧特性を有するペプチドを精製又は濃縮する方法でさらに処理し、

(i b) ステップ(i a)の精製又は濃縮されたペプチドを次に食材に加え、そして

(i v) それを適切な方法でパッキングして、機能性食品を得る

ステップを含む。

#### 【0185】

好ましくは、ステップ(i b)の食材は、本明細書中に記載される方法に従って製造された発酵食材である。この状況は、比較的高い濃度の抗高血圧特性を有するペプチドを、機能性食品中に所望する状況に対応する。

#### 【0186】

##### 抗高血圧特性を有するペプチドの使用及び好ましい投与量

本発明の方法により得られる、抗高血圧特性を有するペプチドは、通常複数のペプチドの混合体であり、そして他のペプチドを含みうる。食品及び飲料としての使用のため、ペプチド及び/又はその精製された製品を含む発酵食材は、直接使用されうる。或いは、作用物は、使用前に、フリーズドライ、スプレードライ、又はドラム乾燥機乾燥により粉末化されうる。

#### 【0187】

本発明の抗高血圧ペプチドの好ましい有効量は、年齢及び個人の状態に依存して変わり、そして0.05 ~ 10 mg / 体重 kg / 日の範囲内である。0.3 ~ 3.0 mg / 体重 kg / 日の投与が好ましい。投与量が0.05 mg / 体重 kg / 日以上であるなら、十分な効果が期待されるだろう。投与量が10 mg / 体重 kg / 日以下であるなら、効果は効率的に示されるだろう。

#### 【0188】

##### コレステロール低減治療での使用

論文(Teo, K. et al., Circulation (2000) 102: 1748-1754)は、ACE阻害剤(エナラプリル)がコレステロール低減治療、特に冠状動脈アテローム硬化症を低減する点において明確な効果を有するということを記述した。

#### 【0189】

従って、本発明の分離した態様は、本発明の方法により得られる抗高血圧特性を有するペプチドを、コレステロール低減治療、特に冠状動脈アテローム硬化症を低減することに関して使用される医薬又は機能性食品の製造のために使用することに関する。

#### 【0190】

##### 態様及び実施態様のクレーム提示

本発明の態様及び実施態様は、いわゆる特許請求の範囲の形式で提示される。以下に与えられる本発明のいくつかの態様及び実施態様は、そうした特許請求の範囲の形式である。

請求項1.

乳酸菌の取得方法であって、以下のステップ：

(i) 乳酸菌が、(prtH200と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含む乳酸菌であるかを調べるステップ、ここで該遺伝子配列は、以下の配列[センス配列(S)：アンチセンス配列(A)]：

10

20

30

40

## 【化 8】

PrfH200: (a): (S): 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC3',  
 (A): 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3';  
 (b): (S): 5' GCCAAGACGCCTCTGGTA 3',  
 (A): 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'; 及び  
 (c): (S): 5' AARGTWCCWTAYGGYYWYAAAYTA 3',  
 (A): 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3';

10

からなる群から選ばれる PCR プライマーのセットを使用して、乳酸菌のゲノム DNA を PCR 増幅により同定でき、そして

(i i) 該乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たすなら、次に該乳酸菌の培養株を取得し；又は

(i i i) 該乳酸菌が、ステップ(i)の判定基準を満たさないなら、次にステップ(i)を別の乳酸菌で繰り返すステップを含む、前記方法。

20

## 【0191】

請求項 2 .

ステップ(i)がまた、前記乳酸菌が、(o r f F 3 と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含むかどうかを調べることを含み、ここで、該遺伝子配列が、以下の配列[センス配列(S)；アンチセンス配列(A)]：

## 【化 9】

orfF3: (a): (S): 5' CGAAGGCGATAAGTCAAACCTTTGATAATGC 3',  
 (A): 5' CCCGGTTCTGTAAAGATAATTTGGATCG 3'; 及び  
 (b): (S): 5' ASTCWRRYTTYGATRATGCW 3',  
 (A): 5' BHKYAMSAWARTTTGGATCR 3'.

30

からなる群から選ばれる PCR プライマー・セットを使用して乳酸菌のゲノム DNA を PCR 増幅することにより同定できる、請求項 1 に記載の乳酸菌の取得方法。

## 【0192】

40

請求項 3 .

乳酸菌の取得方法であって、以下の：

(i) 乳酸菌が、(p r t H 2 0 0 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含む乳酸菌であるかを調べるステップ、ここで該遺伝子配列は、以下：

p r t H 2 0 0 が酵素阻害細胞壁プロテイナーゼ活性を示す酵素をコードする DNA 配列であり、該 DNA 配列が以下の：

(a) 配列番号 1 の 1 ~ 5 5 5 0 位で表される DNA 配列

(b) (a)において定義される DNA 配列の対応する断片に少なくとも 5 0 % 同一である少なくとも 7 5 塩基対 (b p) の断片を含む DNA 配列

(c) 細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号

50

2の1～1849位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも30%同一である少なくとも200個のアミノ酸(aa)の断片を含むポリペプチドをコードするDNA配列；

(d) 配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列を含む二重鎖DNAプローブと、低い厳密度でハイブリダイズするDNA配列；及び

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定されるDNA配列の断片であるDNA配列

からなる群から選ばれるというように定義され、

(ii) 上記乳酸菌がステップ(i)の判定基準を満たすなら、次に該乳酸菌を取得し；又は

(iii) 上記乳酸菌がステップ(i)の判定基準を満たさないなら、次にステップ(i)を別の乳酸菌で繰り返すステップ

を含む前記方法。

#### 【0193】

請求項4.

ステップ(i)がまた、前記乳酸菌が(orff3と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含むかどうかを調べることを含み、ここで該遺伝子配列は、以下：

orff3が、オープン・リーディング・フレームをコードするDNA配列であり、該DNA配列が、以下の：

(a) 配列番号3の1～2679位で表されるDNA配列

(b) (a)で定義されるDNA配列の対応する断片に少なくとも40%同一である、少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列

(c) 配列番号4の1～893位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも30%同一である少なくとも200個のアミノ酸(aa)の断片を含むポリペプチドをコードするDNA配列

(d) 配列番号3の1～5550位で表されるDNA配列を含む二重鎖DNAプローブと、低い厳密度でハイブリダイズするDNA配列、並びに

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定されるDNA配列の断片であるDNA配列

を含む群から選ばれるように定義される、請求項3に記載の乳酸菌の取得方法。

#### 【0194】

請求項5.

前記乳酸菌が、以下のステップ：

(i) 200mlの食材を前記菌で一晩発酵し；

(ii) 産生されたペプチドを抽出し、そして

(iii) 抽出されたペプチドの抗高血圧特性を、ACE活性の50%を阻害するために必要とされるペプチド濃度(DL50)を計測するアッセイにより計測するステップ

を含むプロトコルで、0.25～5.0(mg/ml)のアンジオテンシン-変換酵素(ACE)阻害活性(DL50)を有するペプチドを産生することを可能にするタンパク質分解活性を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の乳酸菌の取得方法。

#### 【0195】

請求項6.

前記乳酸菌が、発酵菌(Firmicutes)門、より好ましくは、バチルス(Bacilli)綱、さらにより好ましくは、ラクトバチルス(Lactobacillales)目の細菌である、請求項1～5のいずれか1項に記載の乳酸菌の取得方法。

#### 【0196】

請求項7.

前記ラクトバチルス(Lactobacillales)目の細菌が、乳酸桿菌(Lactobacillaceae)科、より好ましくは、ラクトバチルス(Lactobacillus)属の細菌、そしてさらに好ましくはラ

10

20

30

40

50

クトパチルス・ヘルベチカス菌である、請求項 6 に記載の乳酸菌の取得方法。

【0197】

請求項 8 .

前記細菌が、受託番号 D S M 1 4 9 9 8 を有するラクトパチルス・ヘルベチカス菌又はその突然変異体である、請求項 7 に記載の乳酸菌の取得方法。

【0198】

請求項 9 .

抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法であって、該方法が、動物乳タンパク質又は植物タンパク質を含む食材を乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を得ることを含み、該乳酸菌が、(prtH200 と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含むことを特徴とし、ここで該遺伝子配列は、以下の配列[センス配列(S); アンチセンス配列(A)]:

10

【化10】

PrtH200: (a): (S): 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC3',

(A): 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3';

(b): (S): 5' GCCAAGACGCCTCTGGTA 3',

(A): 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'; 及び

(c): (S): 5' AARGTWCCWTAYGGYYWYAAAYTA 3',

(A): 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3'.

20

からなる群から選ばれる PCR プライマー・セットを使用して、乳酸菌のゲノム DNA を PCR 増幅することにより同定できる、前記方法。

【0199】

請求項 10 .

前記乳酸菌がまた、(orfF3 と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列が、以下の配列:[センス配列(S); アンチセンス配列(A)]:

30

【化11】

orfF3: (a): (S): 5' CGAAGGCGATAAGTCAAACCTTGATAATGC 3',

(A): 5' CCCGGTTCTGTAAAGATAATTTGGATCG 3'; 及び

(b): (S): 5' ASTCWRRYTTYGATRATGCW 3',

(A): 5' BHKYAMSAWARTTTGGATCR 3'.

40

からなる群から選ばれる PCR プライマー・セットを使用して乳酸菌のゲノム DNA を PCR 増幅することにより同定できる、請求項 10 に記載の抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法。

【0200】

請求項 11 .

抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法であって、該方法が、動物乳タンパク質又は

50

野菜タンパク質を含む食材を乳酸菌で発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を得ることを含み、上記乳酸菌が、(prtH200と名付けられる)細胞壁プロテイナーゼをコードする遺伝子配列を含むことを特徴とし、ここで該遺伝子配列は以下の：

prtH200が、細胞壁プロテイナーゼ活性を示す酵素をコードするDNA配列であり、該DNA配列が以下の：

(a) 配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列；

(b) (a)で定義されるDNA配列の対応する断片に少なくとも50%同一である、少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列；

(c) 細胞壁プロテイナーゼ活性を示すポリペプチドであって、配列番号2の1～1849位で表されるポリペプチドの対応する断片に少なくとも30%同一である、少なくとも200個のアミノ酸の断片を含むポリペプチドをコードするDNA配列；

(d) 配列番号1の1～5550位で表されるDNA配列を含む二重鎖DNAプローブと低い厳密度でハイブリダイズするDNA配列；

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定されるDNA配列の断片であるDNA配列

からなる群から選ばれるように定義される、前記方法。

#### 【0201】

請求項12.

前記乳酸菌がまた、(orfF3と名付けられる)オープン・リーディング・フレームをコードする遺伝子配列を含み、ここで該遺伝子配列は以下の、

orfF3がオープン・リーディング・フレームをコードするDNA配列であり、該DNA配列は以下の：

(a) 配列番号3の1～2679位で表されるDNA配列；

(b) (a)で定義されるDNA配列の対応する断片に少なくとも40%同一である、少なくとも75塩基対(bp)の断片を含むDNA配列；

(c) 配列番号4の1～893位で表されるポリペプチド配列の対応する断片に少なくとも30%同一である少なくとも200個のアミノ酸(aa)の断片を含むポリペプチドをコードするDNA配列；

(d) 配列番号3の1～2679位で表されるDNA配列を含む二重鎖DNAプローブと、低い厳密度でハイブリダイズするDNA配列；並びに

(e) (a)、(b)、(c)、又は(d)で特定されるDNA配列の断片であるDNA配列を含む群から選ばれるように定義される、請求項11に記載の抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法。

#### 【0202】

請求項13.

ペプチドの製造方法であって、以下のステップ：

(i) 請求項1～8のいずれか1項に記載の乳酸菌取得方法により乳酸菌を取得し

；

(ii) (i)において獲得される乳酸菌でタンパク質を含む材料を発酵して、上記ペプチドを含む発酵材料を取得するステップ

を含む前記方法。

#### 【0203】

請求項14.

前記方法が、抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法であり、以下のステップ：

(i) 請求項1～8のいずれか1項に記載の乳酸菌取得方法により乳酸菌を取得し

；

(ii) (i)で取得される乳酸菌で、動物乳タンパク質又は野菜タンパク質を含む食材を発酵して、抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材を取得する

ステップを含む、請求項13に記載のペプチドの製造方法。

#### 【0204】

10

20

30

40

50

- 請求項 15 .  
前記食材が、動物乳タンパク質を含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。
- 【0205】  
請求項 16 .  
前記動物乳タンパク質が、カゼインである、請求項 15 に記載のペプチドの製造方法。
- 【0206】  
17 .  
前記食材が、乳汁又は乳汁に基く材料である、請求項 15 に記載のペプチドの製造方法。
- 【0207】  
請求項 18 .  
前記乳酸菌が、以下のステップ：  
(iv) 200 ml の食材を該乳酸菌で発酵し  
(v) 産生されたペプチドを抽出し、そして  
(vi) ACE 活性(DL50)の50%を阻害するために必要とされるペプチドの濃度を計測するアッセイにより、抽出されたペプチドの抗高血圧特性を計測するステップを含むプロトコルにおいて、0.25 ~ 5.0 (mg/ml) のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性(DL50)を有するペプチドを産生することを可能にするタンパク質分解活性を有する、請求項 9 ~ 17 のいずれか 1 項のペプチドの製造方法。
- 【0208】  
請求項 19 .  
前記乳酸菌が、発酵菌(Firmicutes)門、より好ましくは、パチルス(Bacilli)綱、さらにより好ましくは、ラクトパチルス(Lactobacillales)目の細菌である、請求項 9 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。
- 【0209】  
請求項 20 .  
前記ラクトパチルス(Lactobacillales)目の細菌が、乳酸桿菌(Lactobacillaceae)科、より好ましくは、ラクトパチルス(Lactobacillus)属の細菌、及びさらに好ましくはラクトパチルス・ヘルペチカス菌である、請求項 19 に記載のペプチドの製造方法。
- 【0210】  
請求項 21 .  
前記細菌が、受託番号 DSM 14998 を有するラクトパチルス・ヘルペチカス菌又はその突然変異体である、請求項 20 に記載のペプチドの製造方法。
- 【0211】  
請求項 22 .  
前記食材の発酵が、100 ml の食材あたり、0.5 ~ 25 mg の抗高血圧特性を有するペプチドを産生する条件下で行われる、請求項 9 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。
- 【0212】  
請求項 23 .  
前記食材の発酵が、20 ~ 50 で、3 ~ 48 時間行われる、請求項 9 ~ 22 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。
- 【0213】  
請求項 24 .  
前記食材の発酵が、pH が、pH 3.5 ~ 7 の範囲である条件下で行われる、請求項 9 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。
- 【0214】  
請求項 25 .  
前記発酵食材が、抗高血圧特性を有するペプチドを精製又は濃縮する方法でさらに処理

10

20

30

40

50

される、請求項 9 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のペプチドの製造方法。

【0215】

請求項 26 .

前記発酵食材が遠心され、そして得られた上清であって、抗高血圧特性を有する前記ペプチドを含む上清を単離する、請求項 25 に記載のペプチドの製造方法。

【0216】

請求項 27 .

前記ペプチドが、逆相レジンをを用いて上清から精製される、請求項 26 に記載のペプチドの製造方法。

【0217】

請求項 28 .

発酵食材についてナノろ過を行う、請求項 25 に記載のペプチドの製造方法。

【0218】

請求項 29 .

抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の製造方法であって、該方法が、以下のステップ：

(i) 請求項 9 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法に従って、発酵食材を製造し、そして

(ii) 該発酵食材を適切な方法でパッキングして、機能性食品を得るステップを含む、前記方法。

【0219】

請求項 30 .

前記製造方法が、以下のさらなる中間ステップ：

(ia) 請求項 20 のステップ(i)に記載の発酵食材を、請求項 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法に従って、抗高血圧特性を有するペプチドを精製又は濃縮する方法でさらに処理し；

(ib) ステップ(ia)に記載の精製又は濃縮されたペプチドを、次に食材に加えるステップ

をステップ(i)と(ii)との間に含む、請求項 29 に記載の機能性食材の製造方法。

【0220】

請求項 31 .

請求項 21 のステップ(ib)の食材が、請求項 9 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法に従って製造される発酵食材である、請求項 30 に記載の機能性食品の製造方法。

【0221】

請求項 32 .

請求項 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載される抗高血圧特性を有するペプチドの製造方法により得ることができる、抗高血圧特性を有するペプチド。

【0222】

請求項 33 .

請求項 29 ~ 31 のいずれか 1 項の機能性食品の製造方法により得ることができる、抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品。

【0223】

請求項 34 .

高血圧治療用医薬の製造のための、請求項 32 に記載される抗高血圧特性を有するペプチドの使用。

【0224】

請求項 35 .

高血圧治療用医薬の製造のための、請求項 33 に記載される抗高血圧特性を有するペプチドを含む機能性食品の使用。

【0225】

10

20

30

40

50

請求項 36.

受託番号 D S M 1 4 9 9 8 を有するラクトバチルス・ヘルベチカス菌又はその突然変異体。

【0226】

他に記載がない限り、それぞれのステップは、標準的な方法、例えば一般的な教科書(Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 著 "Molecular Cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratories, 第二版三巻, 1989; Ausubel, F. M., et al. (eds.) "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley 及び Sons 著, 1995) において記載される方法を使用して行われる。

【実施例】

10

【0227】

実施例 1 : PCR 増幅反応

鋳型 DNA を、以前に記載されたフェノール-クロロホルム抽出(Marmur (1961, Journal of Molecular Biology, 3, 208-218) により得た。最終調製品は、TE 緩衝液 + RNAse 中のゲノム鋳型 DNA であった。

【0228】

PCR 反応を、以下の通りに行った：

(i)

1.0 $\mu$ l	鋳型 DNA	
1.0 $\mu$ l	フォワード・プライマー (5 pmol / $\mu$ l)	20
1.0 $\mu$ l	リバーズ・プライマー (5 pmol / $\mu$ l)	
1.0 $\mu$ l	2.5 mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP の混合体)	
5.0 $\mu$ l	Mg 緩衝液 (20 mM MgSO <sub>4</sub> )	
0.5 $\mu$ l	DNA ポリメラーゼ (Pwo 100 U)	
10.5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	

(ii)

PCR 増幅の熱プログラムは、94 で 1 分、(プライマーの T<sub>m</sub> が 55 付近のとき) 50、(プライマーの T<sub>m</sub> が 62 付近のとき) 55、(プライマーの T<sub>m</sub> が 50 付近のとき) 45 で 90 秒、72 で 1 分を 30 サイクルであった。

30

該サンプルは、30 サイクルが完了した後に 4 に冷却された。

(iii)

PCR 産物を、1.5% アガロースゲル上で 60 V で流し、UV 光の下でゲルを切り出し、そして QIAquick Gel Extraction KIT (Qiagen, カタログ番号 28704) を、製品取扱説明書に従い使用して精製した。

実施例 2 : タンパク質分解 (ACE) 活性アッセイ

ストック・カルチャーの調製

ラクトバチルス株を、MRS 寒天にストリークし、そして嫌氣的に 48 時間 37 でインキュベーションした。単一コロニーを拾い、MRS 培養液中に植菌し、そして 37 で一晩成長させた。ラクトコッカス株は、M17 寒天にストリークし、そして 30 で好氣的に 48 時間インキュベーションした。単一コロニーを拾い、M17 培養液中に植菌し、そして 30 で一晩成長させた。これらの一晩培養したものからストックカルチャーを調製し、20% グリセロール中に -80 で貯蔵した。

40

【0229】

発酵乳の製造及びペプチドの抽出

200 ml の新鮮な乳汁に、実施例 1 の一晩培養したストックカルチャー (1% v/v) を植菌し、そして使用される菌によって 37 又は 30 で一晩維持することにより、発酵を行った。

【0230】

以下のプロトコル：

50

- 3000 gで10分間室温で遠心し、  
 - 上清をとり、そしてNaOHでpH 8.3 (ACE活性試験の最適pH)に調節し、  
 - 得られた上清を、3000 gで10分間、室温で遠心し、  
 - ペプチドを含む上清(乳清)をとり、  
 - ローリー試験(Lowry et al., 1951. J. Bio. Chem., 193: 265-275)により、乳清中のペプチドの濃度(ペプチドmg / 乳性ml)を測定するプロトコルを使用して、発酵乳からペプチドの抽出を達成した。

## 【0231】

乳清は、直接ACEアッセイに使用されるか、又は-20 で凍結される。ペプチドを含む乳清は、実施例3において「ペプチド溶液」と名付けられる。

10

## 【0232】

ACE活性アッセイ

発酵乳のペプチド・プールは、in vitroでACE活性を試験される。DL50 (mg / ml)は、ACE活性の50%を阻害するペプチド濃度である。この値が低くなればなるほど、発酵乳の抗高血圧効果は高くなる。抽出されたペプチドのACE活性は、以下のプロトコルにより計測される：

## 【0233】

このアッセイの本質は、ACEがヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン(HHL)基質を分解し、そして着色剤を加えて着色することである。もしペプチドが存在し、このペプチドがACEを阻害し、そしてHHL基質があまり分解されないなら、着色剤を加えた後の着色が少なくなる。

20

## 【0234】

溶液調製

インキュベーション緩衝液： ほう酸188 mmol/l、塩化ナトリウム1.375 mmol/l、pH 8.3。(2.91 gのほう酸と25.63 gの塩化カリウムを200 mlの蒸留水中に溶解した。1 mol/l水酸化カリウムでpHを8.3に調節し、そして蒸留水で250 mlに希釈した。室温で貯蔵した。)

基質溶液： ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン(HHL)5.8 mmol/l

(約90 mlのインキュベーション緩衝液中に250 mgのヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン(HHL)を溶解し、そして同緩衝液で100 mlにフィルアップした。40

30

で貯蔵し、該基質溶液は、少なくとも2週間使用できる。)

ストップ溶液： 100 mmol/l HEPES、2.5 mmol EDTA、pH 9

(23.83 gのHEPESと0.93 gのEDTAを800 mlの蒸留水中に溶解した。1 mol/l水酸化ナトリウムでpHを9に調節し、そして蒸留水で1 Lに希釈した。室温で保存した。)

## 【0235】

着色剤： 1,4-ジオキサン中の136 mmol/lの塩化シアヌル

(12.50 gの塩化シアヌルを、約400 mlの1,4-ジオキサン中に溶解し、そして1,4-ジオキサンで500 mlにフィルアップした。暗茶色ガラスビン中に室温で貯蔵した)

40

## 【0236】

アッセイ：(全ての溶液は室温に平衡化した)

- ペプチド溶液の希釈系列を、インキュベーション緩衝液を用いて作る。希釈系列は、未希釈ペプチド溶液~ブランク(インキュベーション溶液のみ)の6個の希釈液からなつた。

- 各希釈液について、10 µlのペプチド溶液、40 µlの基質(HHL)溶液(2.5 g/l)、及び2.5 µlのACE(0.25ユニット/ml)をガラス製チューブ内に配置した。

- ポジティブコントロールは、2.5 µl ACE、10 µl インキュベーション緩衝液、40 µlの基質(HHL)を含んだ。

- ネガティブコントロールは、12 µlのインキュベーション緩衝液及び40 µlの基

50

質(HHL)を含んだ。

- 37 で1時間インキュベーションした。

- 300 μlのストップ溶液を加えることにより、反応を止め、続いて150 μlの着色剤を加えて、激しく攪拌した。

- 5分間静置し、そして3300 gで30分間室温で遠心し、解離したタンパク質及び過剰量の塩化シアヌルを取り除いた。

- 各サンプルの上清300 μlを、マイクロタイター・プレートの穴に移した。

- ブランクとしての水に対する405 nmの吸光度を計測した。

【0237】

ACE阻害割合は、以下の数式：

10

【数1】

$$\text{ACE阻害活性} = \frac{\text{OD405nmポジティブコントロール} - \text{OD405nmサンプル}}{\text{OD405nmポジティブコントロール} - \text{OD405nmネガティブコントロール}}$$

により表される。

【0238】

各希釈は、各自のACE阻害割合を有し、それにより乳性のペプチド濃度に対するACE阻害割合を示す曲線が与えられる。DL50(ACE活性の50%を阻害するペプチド濃度)は、この曲線と軸上の50%ACE阻害点に一致する線との間の交点を読むことにより得られる。

20

【0239】

実施例3：異なる細菌における、prtH200、orfF3、及びorfF4遺伝子配列の存在の調査

異なる乳酸菌株を、prtH200、orfF3、及びorfF4遺伝子配列の存在について調べた。PCR反応を実施例1に記載されるように行った。表1aは、プロテナーゼをコードするprtH200遺伝子の存在について調べるために使用されたPCRプライマーのセットを示す。表1bは、orfF3遺伝子の存在について調べるために使用されたPCRプライマーのセットを示す。表1cは、orfF4遺伝子の存在について調べるために使用されたPCRプライマーのセットを示す。

30

【0240】

これらの表において、増幅されたPCR断片の見積もりの長さが与えられる。見積もりの長さは、prtH200では配列番号1、orfF3では配列番号3、及びorfF4では配列番号5に基いて決定された。

【0241】

## 【表 1】

表1 a (prth200 プロテイナーゼ)

プライマーセット 番号	配列	PCR 断片の見積りの 長さ
(a)	(S) : 5' CGATGATAATCCTAGCGAGC3', (A) : 5' TGGCAGAACCTGTGCCTA 3'	620bp
(b)	(S) : 5' GCCAAGACGCCCTCTGGTA 3', (A) : 5' TAGGTATAGTTTCCATCAGGA 3'	313bp
(c)	(S) : 5' AARGTWCCWTA YGGYYWYAAYTA 3', (A) : 5' GCCATDSWDGTRCCDSWCATDTK 3'	624bp

10

## 【 0 2 4 2 】

## 【表 2】

20

表1 b (orfF3 プロテイナーゼ)

プライマーセット 番号	配列	PCR 断片の見積りの 長さ
(a)	(S) : 5' CGAAGGCGATAAGTCAAACCTTTGATAATGC 3', (A) : 5' CCCGGTTCTGTAAGATAATTTGGATCG 3'	1605bp
(b)	(S) : 5' ASTCWRRYTTYGATRATGCW 3', (A) : 5' BHKYAMSAWARTTTGGATCR 3'.	1587bp

30

センス配列 (S), アンチセンス配列 (A)

## 【 0 2 4 3 】

## 【表 3】

表 1 c (orfF4 プロテイナーゼ)

プライマーセット 番号	配列	PCR 断片の見積りの 長さ
(a)	(S) : 5' GGTGTTGCTCCTGAAGC 3' (A) : 5' ACTCTAGCACCAGCTAATTGAACATCATG 3'	950

10

センス配列 (S), アンチセンス配列 (A)

## 【 0 2 4 4 】

表 2 は、P C R に基く調査の結果を示す。

## 【 0 2 4 5 】

## 【表 4】

20

表 2 :

生物種	Ref (CHCC)	p: (a)	p: (b)	p: (c)	o3: (a)	o3: (b)	o4 (a)
Lb. ヘルベチカス	5951	+	+	+	+	+	+
Lb. ヘルベチカス	4080	-	-	-	-	-	-
Lb. ヘルベチカス	3610	+	+	+	-	-	?
Lb. ヘルベチカス	637	-	-	-	+	?	+
Lb. ヘルベチカス	3552	-	-	-	-	?	+
Lb. ヘルベチカス	DSM 13137	-	-	?	+	?	+

30

“p:” はprth200プライマーセットである。“o3:” はorfF3プライマーセットである。

“o4:” はorfF4プライマーセットである。“+” は所望のPCR断片が存在することを示す。

“-” は、PCR断片が存在しないか、又は所望のPCR断片が存在しないことを示す。

40

“?” は、未試験であることを示す。

“Lb. ヘルベチカス DSM 13137” はW001/32836 (Valio Ltd) において記載される。

## 【 0 2 4 6 】

表 2 の所望の P C R 断片は、表 1 で与えられる予期された大きさの範囲内であった。それらは、全て D N A 配列であり、そして予期される D N A 配列に対応する D N A 配列を含むことが確認された。

50

## 【0247】

ref 番号 5951 で特定される株は、本発明に従った prtH200、orfF3、及び orfF4 遺伝子配列を含む。

## 【0248】

実施例 4 : ACE 活性

実施例 3 で記載された株は、実施例 2 で記載されるタンパク質分解 (ACE) 活性試験で試験された。表 3 は、その結果を示す。

## 【0249】

## 【表 5】

10

表 3

使用した培養株	DL50での抗高血圧効果 (mg/ml) 3回の測定の平均
Lb. ヘルベチカス 5951	2.99
Lb. ヘルベチカス 4080	2.34
Lb. ヘルベチカス 637	3.32

20

## 【0250】

実施例 5 : 抗高血圧特性の in vivo 試験材料と方法菌株と培養

菌株を MRS 寒天培地上に画線し、そして嫌氣的に 48 時間 37 °C でインキュベーションした。単一コロニーを拾い上げ、MRS 培養液中に植菌し、そして 37 °C で一晩成長させた。この一晩培養した培養液からストックカルチャーを調製し、そして 20% グリセロール中で -80 °C で貯蔵した。この菌株を乳汁中で一晩前培養し、そして発酵用の新鮮な乳汁中に植菌した (1% (v/v))。

30

## 【0251】

サンプルの調製濃縮発酵乳 :

乳汁を、単一の菌株又は混合カルチャーを用いて、1% (v/v) の植菌レベルで 16 時間発酵させた。産物の全てを凍結乾燥した。最初の発酵条件と同じ条件を用いて得た第二発酵産物を遠心した。ペレットを取り除き、そして乳清を 0.45 mm フィルターに通し、そして凍結させた。ラットに与える前に、乳性を使用して凍結乾燥粉末を溶解し、係数 5 になるように濃縮した。

40

## 【0252】

自然発症高血圧ラット :

自然発症高血圧ラット (SHR) を、IFFA CREDO (Charles River 社)、リヨン、フランスから購入した。

全ての処置物質 (発酵産物) を、9:00 ~ 9:15 の間に、産物の投与量 2 ml で強制飼養により投与した。

## 【0253】

実験デザイン :

3つの群を作った :

群 1 (n = 16) : 処置 1 を受けた (乳汁 ; n = 16)

50

群 2 (n = 12) : 連続的な処置 2 ~ 7 を受けた、各投与は、3 日の休薬期間をあけた。

群 3 (n = 12) : 連続的な処置 8 ~ 12 を受けた、各投与は、3 日間の休薬期間をあけた。

【0254】

調べられるパラメーター：

以下に記載される異なった時間において、強制飼養前、強制飼養後 5 時間及び 24 時間で、目覚めている SHR の最大血圧をプレチスモグラフィーにより測定した。

【0255】

実験前に、全ての SHR を動物施設に 9 週間順応させた。さらに、最初の強制飼養の 3 日前に、全ての動物を強制飼養と最大血圧の計測に慣れさせた。

10

【0256】

群 1 の最大血圧を、群 2 及び 3 の最大血圧と平行して測定し、そしてコントロールとした。

【0257】

強制飼養の日に、強制飼養前、並びに強制飼養後 6 時間及び 24 時間で、血圧を測定した。

【0258】

結果

異なる物質の投与後 5 時間及び 24 時間において、測定された最大血圧の変動が、表 4 で示される。

20

## 【表 6】

表 4 :

	乳汁	水道水	エナラプリル	カルピス商品	CHCC 4080	CHCC 5951	CHCC 637
5 時間	-4	-4	-30	-13	-14	-18	-8
24 時間	-4	-2	-17	+2	-1	-19	-8

乳汁：このサンプルは、発酵乳ではなく、9.5%還元粉乳である。

エナラプリル：エナラプリルは、高血圧を患う患者を治療するために通常使用される薬である。エナラプリルは、20mg/kgの高濃度でミルク中に加えられて、抗高血圧化合物に应答するラットの限度能力を試験する。

カルピス商品：これはカルピス食品工業の商品である。この商品の名前はカルピスと呼ばれる。カルピスは、Lb. ヘルベチカスとサッカロミセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の混合株で発酵された液体の発酵乳である。

CHCC4080：CHCC4080で発酵された濃縮発酵乳である。

CHCC5951：CHCC5951で発酵された濃縮発酵乳である。

CHCC637：CHCC637で発酵された濃縮発酵乳である。

## 【0259】

CHCC5951が、最良の抗高血圧特性を有するペプチドを作ることができる乳酸菌株であるということの結果が示す。(上記)表2は、本明細書中に記載されるprtH200、orfF3、及びorfF4遺伝子を含むということを示す。24時間では、CHCC5951株の使用により産生されたペプチドは、エナラプリル薬に匹敵する効果を有した。

## 【0260】

CHCC4080は、遺伝子のどれも含まない。CHCC637は、orfF3とorfF4を含むが、prtH200を含まない。

## 【0261】

上で記載されるように、カルピス食品工業の商品は、CP790乳酸菌を使用することにより製造され、そして該菌は、prtH200を含まない [Yamamoto et al (2000)]。

## 【0262】

実施例6：CHCC5951株を使用するさらなるin vivo試験

菌株及び培養並びにSHRラット：実施例5と同じ

サンプル調製

発酵乳：

乳汁を、単一菌株又は混合菌株を用いて植菌レベル1%(v/v)で、16時間発酵させた。産物全体を凍結乾燥させた。最初と同じ条件で発酵させた第二発酵産物を遠心した。

ペレットを取り除き、そして乳清を0.45mmフィルターを通してろ過し、そして凍結させた。この乳清は、凍結乾燥粉末を溶解するために使用され、ラットに与える前に異なる係数で濃縮した。

【0263】

実験デザイン：

動物：自然発症高血圧ラット(22週齢)

群： 1)偽薬(乳汁)

2)サンプル1(3の用量で濃縮された異なる3の乳清で投与される発酵乳。用量1：係数1、用量2：係数2.5、用量3：係数5)

3)サンプル2(中性pHの乳汁中に懸濁される凍結乾燥発酵乳)

4)サンプル3(発酵乳産物のみ)

5)サンプル4(発酵後に熱処理された発酵乳)

6)サンプル5(発酵されていないが、生菌を含む乳汁)

10

【0264】

すべての処置物質を、2mlの投与量で、強制飼養により10:00~10:05に投与した。

【0265】

調べられたパラメーター：最大血圧は、テレメトリー(Data Sciences Int.)により、強制飼養後24時間異なる時間点で、目覚めているSHRにおいて測定した。要するに、(一分間に渡る)最大血圧の平均と最低血圧の平均を、投与の24時間前と投与の48時間後において15分間毎に記録した。

20

【0266】

これらの追跡調査から、24時間の最大血圧の平均と最低血圧の平均は、各群において計算された。さらに、各物質により誘導されて偽薬の同じパラメーターに対する変化量が、強制飼養後24時間、及び強制飼養後3~6、12~15、及び21~24時間の間で計算された。

【0267】

実験に先立って、全てのSHRは、9週間動物施設に順応させた。さらに、全ての動物を、物質の初回投与の3日前に、強制飼養に慣れさせた。

【0268】

統計

全ての結果は、平均値±標準誤差として表される。

30

【0269】

結果表



【表 8】

表 2. 強制飼養後の最低血圧

群	期間				偽薬に対する変化量			
	0-24	3-6	12-15	21-24	0-24	3-6	12-15	21-24
未処置	126±	127±	124±	129±				
サンプル1								
用量 1	120±	118±	118±	124±	-	-	-	-5.3±2.4
用量 2	122±	120±	120±	129±	-	-	-	-0.3±2.3
用量 3	123±	120±	121±	128±	-	-	-	-1.4±1.6
未処置	131±5	125±5	134±5	125±5				
サンプル2	123±	119±	125±	119±	-	-	-	-5.7±3.3
サンプル3	126±	127±	125±	121±	-	2.7±2.6	-	-4.1±2.3
サンプル4	127±	126±	128±	123±	-	1.2±3.5	-	-2.5±2.6
サンプル5	133±	135±	133±	130±	3.2±2.3	9.7±5.5	-	4.8±3.3

\* : 偽薬に対して  $p < 0.05$

未処置 1 及び未処置 2 は研究 1 及び研究 2 のコントロールである。

## 【0271】

結果は、発酵乳産物を濃縮する必要がないことを示す。サンプル 3 は、発酵乳産物のみであり、そしてこの発酵乳産物は、凍結乾燥された濃縮発酵サンプル 1 (用量 1, 2, 3) 及びサンプル 2 に匹敵する血圧減少効果を有する。

## 【0272】

サンプル 2 は、中性 pH 乳汁中に懸濁される凍結乾燥発酵乳汁である。このサンプルは、血圧を低下させる。このことは、本明細書中に記載される発酵産物の幅広い用途を示す。なぜなら、凍結乾燥発酵乳汁は、様々な液体中に溶解して、所望される最終的な適切な使用形態を得ることができるからである。pH の違いなどの性質は、産物の血圧低減活性に影響を与えない。

## 【0273】

発酵後の熱処理を行ったサンプル 4 もまた、血圧を低下させた。このサンプル中の全ての細菌は、実質的に死滅している。従って、このことは、最終製品中に生菌を有する必要性がないことを示す。

## 【0274】

サンプル 5 は、発酵されていないが、生菌を含む。サンプル 5 は、血圧を低下させなかった。このことにより、発酵ステップが必要であることが示された。

## 【0275】

## 実施例7：パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)フィンガープリント

(受託番号DSM14998で寄託される)ラクトバチルス・ヘルベチカスCHCC5951株を標準MRS培地中で一晩37℃で成長させた。クロモソームDNAを、QiagenKitを使用することにより単離した。単離クロモソームDNAを完全に制限酵素SmaIで切断した(製品説明書に従って行った)。

## 【0276】

切断したDNAについての電気泳動条件は：

CHEF Mapper XA Systemを使用し、パルス時間2～30秒、直線勾配(linearly ramped)、5.3 V/cmで24時間、1.1%アガロース、1/2×TBE、14℃であった。

10

ゲルを泳動するために使用したプログラムは以下のとおりである。

## 【0277】

## 【表9】

パラメーター	PFGEプログラム番号						
	1	2	3	4	5	6	
イニシャル・スイッチ 時間(秒) (Initial switch time)	2	3	2	2	3	1	20
ファイナル・スイッチ 時間(秒) (final switch time)	30	80	60	40	18	10	30
勾配因子	直線	-1.53	-1.24	直線	直線	直線	
泳動時間(時間)	24	24	24	24	24	21	

## 【0278】

バンドをGel Compar IIプログラムを使用することによりコンピューター上で比較した。

40

## 【0279】

バンドサイズは、三回の独立したパルス・フィールド電気泳動におけるバンドの移動距離を計測し、そして既知のバンドサイズを有する標準バンドの移動に対して、距離を補正することにより測定される。バンドサイズは、三回計測された値の平均である(±5 kbp)。

得られたアガロースゲルは、図1に示される。12個のバンドのサイズは：

バンド番号1：283 kbp

バンド番号2：259 kbp

バンド番号3：219 kbp

バンド番号4：138 kbp

50

バンド番号 5 : 1 2 7 K b p  
バンド番号 6 : 1 1 9 k b p  
バンド番号 7 : 1 0 6 k b p  
バンド番号 8 : 8 8 k b p  
バンド番号 9 : 7 1 k b p  
バンド番号 10 : 5 9 k b p  
バンド番号 11 : 5 4 K b p  
バンド番号 12 : 4 6 k b p  
である。

【 0 2 8 0 】

10

参考文献：

本発明に関して関連があると考えられる参照分権を以下に記載する。

Yamamoto et al, (1994), J Dairy Sci., 77: 917-922

Gobbetti M. et al(2000), Appl Environ Microbiol, 66 (9), 3898-3904

EP821968

EP1016709

WO01/32836

Pederson et al (1999), J. of Bacteriology, 181: 4592-4597

Yamamoto et al (2000), Biosci. Biotechnol. Biochem., 64(6): 1217-1222

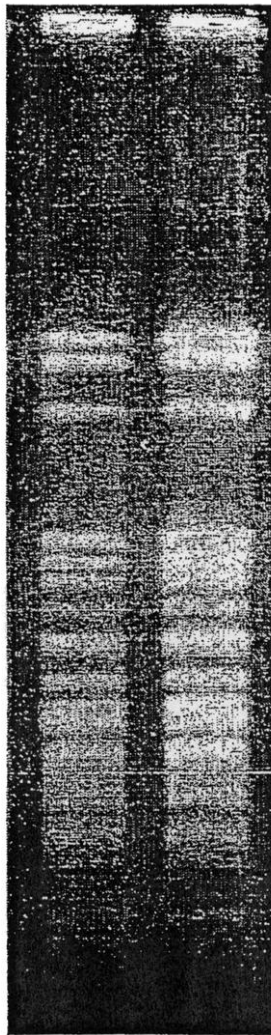
EP058074

20

【図1】

図1

CHCC5951



Smal

【配列表】

2010142231000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月25日(2010.1.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物乳タンパク質又は植物タンパク質を含む食材を、受託番号14998を有するラク  
トバチルス・ヘルベチカス株で発酵することにより得られる抗高血圧特性を有するペプチ  
ドを含む、高血圧治療用の医薬組成物。

## 【請求項 2】

前記食材が動物乳タンパク質を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記動物乳タンパク質がカゼインである、請求項 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記食材が、乳汁又は乳汁に基く材料である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

高血圧の治療用の医薬の製造のための、抗高血圧特性を有するペプチドであって、動物乳タンパク質又は植物タンパク質を含む食材を、受託番号 1 4 9 9 8 を有するラクトバチルス・ヘルベチカス株で発酵することにより得られる抗高血圧特性を有するペプチドを含む発酵食材の使用。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/74 (2006.01)		A 6 1 K 35/74	G	4 C 0 8 7
A 6 1 K 36/00 (2006.01)		A 6 1 K 35/78	X	4 C 0 8 8
A 6 1 K 38/17 (2006.01)		A 6 1 K 37/16		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		
A 6 1 P 9/12 (2006.01)		A 6 1 P 9/12		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 フラムバール, ベネディクト

デンマーク国, デーコー - 1 9 6 4 フレデリクスベルウ, 3 . テーバー . , インイエマンズバイ  
3 0

F ターム(参考) 4B018 LB07 MD16 MD20 MD71 MD86 ME04 MF13  
 4B024 AA05 BA14 BA79 CA09 CA20 HA14  
 4B064 AG01 CA02 CD21 DA10  
 4B065 AA30X AC14 BA22 BB24 BB26 CA24 CA42  
 4C084 AA02 BA44 CA04 CA14 CA15 CA38 DC50 NA14 ZA42 ZC20  
 4C087 AA01 AA02 AA04 BB39 BC56 CA10 CA11 CA16 NA14 ZA42  
 ZC20  
 4C088 AB61 AB73 AB78 AC16 BA08 CA25 NA14 ZA42 ZC20