

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104027 A1

(51) 国際特許分類: C07K 5/083, 14/415,
A61K 38/06, A61P 9/12, A23L 1/305

(YONEKURA, Masami) [JP/JP]; 〒3000331 茨城県稲
敷郡阿見町阿見 3 9 9 8 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006527

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 14 日 (14.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-144045 2003 年 5 月 21 日 (21.05.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 不二製
油株式会社 (FUJI OIL COMPANY, LIMITED) [JP/JP];
〒5420086 大阪府大阪市中央区西心斎橋 2 丁目 1 番
5 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 佐本 将彦
(SAMOTO, Masahiko) [JP/JP]; 〒3002436 茨城県筑
波郡谷和原村絹の台 4 丁目 3 番地 不二製油株式会
社 つくば研究開発センター内 Ibaraki (JP). 釘宮 渉
(KUGIMIYA, Wataru) [JP/JP]; 〒3002436 茨城県筑波
郡谷和原村絹の台 4 丁目 3 番地 不二製油株式会
社 つくば研究開発センター内 Ibaraki (JP). 米倉 政実

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDE

(54) 発明の名称: アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a peptide having an excellent ACE-inhibiting activity and a process for producing the same from a natural material. It is found out that a peptide superior in ACE-inhibiting activity to peptides obtained by using β -conglycin and glycinin (i.e., major stored proteins in soybean) can be obtained by employing soybean whey protein which is a protein contained in a trace amount in soybean as a substrate and decomposing it with a protease.

(57) 要約: 天然原料より ACE 阻害活性に優れたペプチド及びその製造法を提供する。大豆中の微量蛋白質である大豆ホエー蛋白質を基質にしてプロテアーゼで分解することにより、大豆の主要な貯蔵蛋白質である β -コングリシニンやグリシニンを基質としたペプチドよりも ACE 阻害活性が高いペプチドを得られることを見出し、これに基づき本発明を完成するに至った。



WO 2004/104027 A1

明 細 書

アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物

技術分野

- [0001] 本発明は、血圧降下剤または高血圧予防食品等への利用に有用な、アンジオテンシン変換酵素(Angiotensin Converting Enzyme、以下「ACE」と称する)阻害ペプチド含有組成物に関する。

背景技術

- [0002] 代表的な成人病とされている高血圧症は、年々その患者数が増加しており、以前からその原因究明および有効な対策について研究がなされて来た。高血圧症の発症には、レニン・アンジオテンシン系と呼ばれる昇圧酵素系(非特許文献1)とカリクイン・キニン系と呼ばれる降圧酵素系が重要な役割を果たしている。
- [0003] それによると、その酵素系において、ACEは、アンジオテンシンIを強力な昇圧ペプチドであるアンジオテンシンIIに変換するとともに、降圧ペプチドであるブラジキニンを不活性化する作用を示し、血圧上昇に深く関与する。
- [0004] 従って、ACEの活性を阻害することは血圧上昇を抑制する作用と密接な相関があり、この認識に立って、これまでACE阻害活性を有する種々の物質が検索され、報告されてきた。
- [0005] 例えば、ゼラチンのコラギナーゼ消化物〔特許文献1〕、牛由来カゼインのトリプシン分解物〔特許文献2〜4〕、ゼイン(γ -ゼイン)のサーモライシン分解物〔特許文献5〕、分離大豆蛋白質のサーモライシン分解物〔特許文献6〕、イワシ筋肉のペプシン分解物〔特許文献7〕、あるいはカツオのサーモライシン分解物〔特許文献8〕に含まれるACE阻害物質などが報告されている。
- [0006] また大豆蛋白質を酵素加水分解した大豆ペプチドがACE阻害活性を高めることも知られている〔特許文献6〕。この大豆ペプチドは大豆の主要な蛋白質である7Sグロブリン(β -コングリシニン)や11Sグロブリン(グリシニン)が加水分解されたものを主成分とするものである。
- [0007] 特許文献1:特開昭52-148631号公報

特許文献2:特開昭57-15435号公報

特許文献3:特公昭60-23086号公報

特許文献4:特公昭60-23087号公報

特許文献5:特開平2-36127号公報

特許文献6:特開昭62-169732号公報

特許文献7:特開平3-11097号公報

特許文献8:特開平4-144696号公報

非特許文献1:Itoh H, et al., J. Clin Invest, 91, 2268(1993).

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] このように、これまでACE阻害活性を有するペプチドは、多くの食品素材を原料に使用して検索され活性があることが報告されているが、高い活性のものを低コストで調製することを考えた場合、従来の高コストの食品素材では実用化にあたり課題も多いと考えられる。そこで本発明は、食品製造において排出される副産物のような安価な原料から高活性のACE阻害物質を工業的に大量に提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 上記課題に鑑みて、本発明者らはより高活性のACE阻害物質を得るための基質を大豆の特定の画分の中に求めたところ、画分によってACE阻害活性に差異がある知見が得られた。そしてさらに鋭意研究を行った結果、大豆中の微量蛋白質である大豆ホエー蛋白を基質にしてプロテアーゼで分解することにより、大豆の主要な貯蔵蛋白質である β -コングリシニンやグリシニンを基質とした加水分解物よりもACE阻害活性が高い加水分解物を得られることを見出した。そしてさらに、該加水分解物中に存在するACE阻害ペプチドがレクチン由来のLeu-Ala-Proからなるトリペプチドであることを見出し、本発明を完成するに至ったものである。

- [0010] すなわち本発明は、
(1)大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白にプロテアーゼを作用させた加水分解物又はその分画物からなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物、
(2)アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドがLeu-Ala-Proのアミノ酸配列からなるト

- リペプチドである上記(1)に記載の組成物、
- (3)大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全固形分あたりの粗蛋白質含量が40重量%以上である上記(1)に記載の組成物、
- (4)大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全蛋白質あたりのレクチン含量が10重量%以上である上記(1)に記載の組成物、
- (5)加水分解物又はその分画物中に含まれるペプチドの分子量が100〜2000である上記(1)に記載の組成物、
- (6)大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全蛋白質1gあたりのLeu-Ala-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチドの含量が、0.2mg以上である上記(2)に記載の組成物。
- (7)上記(1)に記載の組成物を含有するアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する
血圧降下剤。
- (8)上記(1)に記載の組成物を含有するアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する
血圧降下用健康食品。
- (9)上記(1)に記載の組成物の、血圧降下剤又は血圧降下用健康食品製造における
使用。
- (10)高血圧の改善に有効量の上記(1)に記載の組成物を、高血圧の改善が必要な哺乳動物に与えることを特徴とする高血圧の改善方法。
- (11)大豆ホエーを加熱して生ずる加熱凝集物、又は該加熱凝集物をpH4以下にさらして可溶物を除去したものにプロテアーゼを作用させ、不溶物を除去して大豆ホエー蛋白加水分解物を得ることを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物の製造法、
- (12)大豆ホエー蛋白加水分解物からさらに分子量200〜1000のペプチドを分画する上記(11)に記載の組成物の製造法、を提供するものである。

発明の効果

- [0011] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白を加水分解することにより、分離大豆蛋白を加水分解するよりもACE阻害活性の高い、食品由来のペプチド含有組成物を得ることが可能となった。また本発明のペプチドの中に比較的多く認められるACE阻害活性

の高いトリペプチドLeu-Ala-Proは、天然由来であるので、安全性が高く、食品として使用しても何ら問題ない。さらに本発明には各種大豆製品の副産物を有効利用することができるので、低コストでの製造が可能であり、環境の側面においても非常に有益なものである。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明は、大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白にプロテアーゼを作用させた加水分解物又はその分画物からなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物である。以下本発明について、その実施態様を示す。
- [0013] 本発明において大豆ホエーは、脱脂大豆や大豆から水抽出時又は水抽出後に、大豆の主要貯蔵蛋白質の大部分が除去され、他の微量蛋白質が濃縮されたものである。具体的には各種大豆加工製品の製造時に発生する副産物、すなわち分離大豆蛋白の酸沈殿後の上清や、濃縮大豆蛋白〔酸コンセントレート等〕の洗浄液、豆腐やしょうゆの製造時に生ずる廃液などが含まれる。以下に大豆ホエーの一般的な製造例であるが、大豆の主要貯蔵蛋白質の大部分が除去され、他の微量蛋白質が濃縮される方法であれば、特に限定されるものではない。
- [0014] (分離大豆蛋白ホエー)
- 脱脂大豆フレークを水又は希アルカリ水溶液(約pH8〜9)で抽出し、遠心分離により残渣を除去し、上清を回収して脱脂豆乳を得る。これに塩酸を加えてpH4.5前後に調整し、遠心分離によりホエー画分と酸沈殿画分に分離する。得られた酸沈殿画分を水分散させ、アルカリ水溶液で中和後、噴霧乾燥して分離大豆蛋白を得る。副産物としてホエー画分である分離大豆蛋白ホエーを得る。
- [0015] (濃縮大豆蛋白ホエー)
- 脱脂大豆に水を加え、塩酸でpH4.5前後に調整しつつ洗浄し、不溶性画分を回収して中和後、乾燥粉碎し、希酸洗浄による濃縮大豆蛋白(酸コンセントレート)を得る。副産物として可溶性画分である濃縮大豆蛋白ホエーを得る。
- [0016] 上記大豆ホエーには、調製方法にもよるが、通常は粗蛋白質が全固形分あたり約15〜30重量%程度含まれる。その組成は大豆の主要な貯蔵蛋白質とは異なり、全蛋白質中レクチンが10〜20%、クニッツ型トリプシンインヒビターが30〜50%、その他

β アミラーゼ、リポキシゲナーゼなどの微量蛋白質が主成分となっている。そして大豆の主要な貯蔵蛋白質である β -コングリシニン及びグリシニンの組成は全蛋白質中10%にも満たないものである。

- [0017] 本発明のACE変換酵素阻害ペプチド含有組成物を得るための原料としては、上記大豆ホエーをそのまま用いるか、又は蛋白質を濃縮した大豆ホエー蛋白を用いることができる。大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全固形分あたり粗蛋白質は多いほど好ましく、少なくとも15重量%以上、より好ましくは45重量%以上、さらに好ましくは75重量%以上含有することが適当である。粗蛋白質が15重量%未満になるとACE阻害ペプチドを多く含有する組成物が得られない。また大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中には、ACE阻害ペプチドの主要な供給源であるレクチンの含量が多いほど好ましく、大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全蛋白質あたり少なくとも10重量%以上、より好ましくは15重量%以上、さらに好ましくは20重量%以上含有することが適当である。
- [0018] 上記大豆ホエー蛋白を得る方法については特に限定されず、大豆ホエーから低分子の糖などをさらに除去したもの、さらにそれらの中の灰分を除いたもの、または非蛋白質を大部分除いたものなど、目的に合わせて精製度を変えることができる。例えば下記のように加熱して変性した加熱凝集物を回収する方法やさらに加熱凝集物を酸性下にさらし、不純物を洗浄して蛋白質を濃縮する方法を用いることが好ましい。
- [0019] 以下に大豆ホエー蛋白の好ましい調製方法を示す。例えば大豆ホエーを加熱し、加熱凝集する大豆ホエー蛋白を回収する。加熱温度は大豆ホエー蛋白が変性するに十分な温度とし、好ましくは80〜120℃、より好ましくは85〜100℃で行う。加熱温度が80度未満であると凝集塊への成長が不十分であり、加熱温度が120℃を超えると褐変などによる着色が出やすくなる。加熱時間は凝集物の形成に十分な時間とすればよく、温度により異なるが、5〜60分の範囲で行えば十分である。また大豆ホエーを加熱する際に、予めカルシウムやマグネシウム等のアルカリ土類金属イオンを大豆ホエー量に対して0.02〜1重量%共存させると大豆ホエー蛋白の沈殿が促進される。加熱を行う際の大豆ホエーのpHは2〜9、好ましくはpH5〜6とすることが適当である。得られた大豆ホエー蛋白は全固形分あたり粗蛋白質が45〜55重量%程度

、灰分が30重量%程度含有するものである。

- [0020] またさらに、上記の加熱凝集させた大豆ホエー蛋白に加水し、塩酸等の酸を用いてpH4以下、より好ましくはpH3以下にさらすことによって、可溶化した灰分等の不純物を除去する。次にpH6.5～9、好ましくはpH7～8に中和後、100～150℃、好ましくは110～120℃で加熱することによって可溶化させることにより、さらに高純度の大豆ホエー蛋白を得ることができる。得られた大豆ホエー蛋白は全固形分あたり粗蛋白質が75～85重量%も含有し、灰分が10重量%以下に低減されたものである。
- [0021] 本発明のACE阻害ペプチド含有組成物は、上記大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白にプロテアーゼを作用させ、加水分解物としたものである。またさらに該加水分解物をゲルろ過、膜ろ過等の手段により分子量で分画する手段、あるいは吸着樹脂やイオン交換樹脂などの吸着特性を利用した分画手段を使用して分画し、特定の画分を分取することによって、分画物としたものである。
- [0022] 該加水分解物又はその分画物に含まれるペプチドの分子量は100～2000、好ましくは200～1000、さらに好ましくは200～500であることが適当である。そして、該ペプチドにおいて、ACE阻害活性を示すペプチドは、アミノ酸シーケンサーによる分析の結果、「Leu-Ala-Pro」なるアミノ酸配列からなるトリペプチドであり、ACE阻害率のIC₅₀値は0.13 μ Mである。該トリペプチドは、大豆ホエー蛋白質の内、レクチンに由来するものであり、大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白の加水分解物又はその分画物中の全蛋白質1gあたり、0.2mg以上、好ましくは0.2～10mg含まれる。
- [0023] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白にプロテアーゼを作用させ、加水分解物を得る方法としては、プロテアーゼを作用させた後、pHを酸性(好ましくはpH4～5)にして加熱し、不溶画分を取り除いて、可溶画分を回収する方法が好ましい。使用するプロテアーゼとしては特に限定されないが、より高いACE阻害活性を得るために、微生物由来、植物由来又は動物由来のエンド型プロテアーゼが好ましく、具体的には金属プロテアーゼ(サーモライシンなど)、セリンプロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、トロンビン、プラスミン、エラスターゼ、ズブチリシンなど)、チオールプロテアーゼ(パパン、フィシン、ブロメライン、カテプシンBなど)、アスパラギン酸プロテアーゼ(ペプシン、キモシン、カテプシンDなど)などを用いることができる。特にサーモライシン、ズ

ブリチシン、パパイン、ブロメラインが好ましい。

- [0024] 上記により得られた加水分解物をさらにゲルろ過、膜ろ過等の手段により分子量で分画する手段、あるいは吸着樹脂やイオン交換樹脂などの吸着特性を利用した分画手段を使用し、分子量200～1000、より好ましくは200～500の分画物として得ることもできる。
- [0025] 本発明のACE阻害ペプチド含有組成物は、例えば分離大豆蛋白のように大豆グロブリンを主要成分とするものから調製した加水分解物に比べ、極めて高いACE阻害活性を示す。したがって少量の添加であっても強いACE阻害効果を発揮することが可能である。
- [0026] 本発明のACE阻害ペプチド含有組成物を基礎原料として使用し、その他公知の原材料を使用して、公知の製法により、錠剤・液剤・顆粒剤・粉剤などに製剤化してACE阻害作用を有する血圧降下剤とすることができる。この血圧降下剤は高血圧症のヒトに対して投与することが血圧降下に有効である。
- [0027] 本発明のACE阻害ペプチド含有組成物を基礎原料として使用し、その他公知の原材料を使用して、公知の製法により、焼き菓子、キャンデー、ガム、スナック、タブレット、飲料、ゼリー等の種々の食品を製造して、ACE阻害作用を有する血圧降下用途の特定保健用食品、保健機能食品等の健康食品とすることができる。この健康食品は高血圧症のヒトや血圧が高い傾向にあるヒトに摂取させることが高血圧の改善に有効である。

実施例

- [0028] 以下に本発明の実施例を記載するが、本発明は、この実施例にのみ限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内において種々変更を加え得ることは勿論である。
- [0029] ◎実施例1 (大豆ホエー蛋白加水分解物の調製)

脱脂大豆2kgに10倍の水(20L)を加え、攪拌しながら塩酸にてpHを4.3に調整後、遠心分離して不溶物を除き、上清16Lを回収した。

次に消石灰を加えて、pHを5.3に調整し、95℃に加熱して不溶化凝集する蛋白質分を遠心分離にて回収した。得られた沈澱物に水を2L添加し、塩酸を加えてpH

を2.0に調整し、遠心分離(1000g×5分)で酸可溶性成分を除去した。さらに沈澱物に0.2Lの水を加え、pHを水酸化ナトリウムで8.5に調整後、120℃、10分の加熱を行い、蛋白質を可溶化し、大豆ホエー蛋白を得た。該蛋白の全固形分中の粗蛋白質含量は81重量%であった。電気泳動によれば大豆の主要な貯蔵蛋白質である大豆グロブリン(グリシニンや β -コングリシニン)はほとんど存在せず、主に大豆レクチンとクニッツ型トリプシンインヒビターが存在した。そのうち、レクチン含量はアミノ酸組成分析から、全蛋白質あたり16〜20重量%と推測された。

[0030] 得られたホエー蛋白質粗精製物に粗蛋白質含量あたり1%のサーモライシンを添加し、pHを7.5以上8.5以下に保ちつつ50℃で4時間反応させた。反応液は、塩酸でpHを4.5に調整し、95℃、20分加熱して反応を止め、遠心分離(1000g×5分)を行い、上澄みを回収し、大豆ホエー蛋白加水分解物(ACE阻害ペプチド含有組成物)を得た。

[0031] ◎比較例1(分離大豆蛋白加水分解物の調製)

脱脂大豆2kgに10倍の水(20L)を加え、攪拌しながら水酸化ナトリウムにてpHを7.5に調整後、遠心分離(1000g×5分)して不溶物を除き、脱脂豆乳17Lを回収した。

次に塩酸を加えて、pHを4.5に調整し、不溶化凝集する大豆グロブリン蛋白質を遠心分離(1000g×5分)にて回収した。得られた沈澱物に水を16L添加し、水酸化ナトリウムを加えてpHを8.0に調整して溶解した。その後、120℃、10分の加熱を行い、分離大豆蛋白質(主に大豆グロブリン)の溶液とした。電気泳動によれば、ホエー蛋白質は除去されており、主にグリシニン、 β -コングリシニンのほか、微量蛋白質として、 γ -コングリシニン、膜タンパク質、リポキシゲナーゼなどが認められた。該蛋白の全固形分中の粗蛋白質含量は86重量%であった。

[0032] 分離大豆蛋白溶液に粗蛋白質量あたり1%のサーモライシンを添加し、pHを7.5以上8.5以下に保ちつつ50℃で4時間反応させた。反応液を塩酸でpH4.5に調整し、95℃、20分加熱して反応を止め、遠心分離(1000g×5分)を行い、上澄みを回収し、分離大豆蛋白加水分解物を得た。

[0033] 実施例1、比較例1で得られた各加水分解物のACE阻害活性を公知の測定法(

Cushman-cheung法)に準じて測定した。ラビット由来ACE(シグマ社製)を50mMホウ酸緩衝液(pH8.3)に溶解し、0.1Unit/mlになるように調製した。一方、基質としては、Bz-Gly-His-Leu(シグマ社製)を4.2mMになるようにNaClを含む50mMホウ酸緩衝液(pH8.3)で溶解した。また、阻害活性を測定するサンプルは、ローリー法でタンパク分解物の濃度を測定し、濃度が既知のものを用意した。それぞれ基質溶液150 μ l、サンプル溶液50 μ l、ACE溶液50 μ lを混合し、37°C、30分反応させた。この反応液中の最終濃度は、基質2.5mM、NaCl300mMである。次いで1規定の塩酸を250 μ l加えて、反応を停止し、1.5mlの酢酸エチルを加えて10秒間攪拌し、さらに3000G×2分間遠心し、酢酸エチル層を1ml採取した。そしてブロックヒーターにより、120°C、30分加熱し、蒸発乾固させ、これに1mlの蒸留水を加えて、抽出されたヒプリル酸の吸収(228nmの吸光度)を測定した。アンジオテンシン変換酵素阻害率は下記の〔1〕式によって求めるようにした。但し、ODsは上記のようにしてサンプルを加えて測定したときの吸光度、ODsbは上記の混合溶液を反応させる前に1規定の塩酸を250 μ l添加させて測定した時の吸光度、ODcは上記の混合溶液にサンプルを加えずに測定した時の吸光度、ODcbは上記の混合溶液にサンプルを加えずに反応させる前に1規定の塩酸を250 μ l添加させて測定した時の吸光度である。

[0034] (数1)

$$1 - \frac{ODs - ODsb}{ODc - ODcb} \times 100 \quad [1]$$

[0035] そして求められた阻害率から、各サンプルの阻害活性を確認すべく、その分解物のACE阻害率が50%となる濃度(IC50)を求めた。得られた結果を表1に示す。

[0036] (表1)各蛋白加水分解物のACE阻害活性

	酵素基質	主要蛋白質	A C E 阻害活性 (IC ₅₀)
実施例 1	大豆ホエー 蛋白	レクチン トリプシンインヒビター	28 μ g/ml
比較例 1	分離大豆 蛋白	グリシニン β -コングリシニン	50 μ g/ml

[0037] 実験結果より、プロテアーゼは両者ともサーモライシン(対蛋白質当り1%を添加、50℃、4時間)を使用した、IC₅₀は比較例1の分離大豆蛋白加水分解物が50 μ g/mlであるのに対し、実施例1の大豆ホエー蛋白加水分解物は28 μ g/mlであり、大豆ホエー蛋白加水分解物は、分離大豆蛋白加水分解物に比べて低濃度においても、顕著にACE阻害活性が高いことがわかった。このように明らかに酵素分解の基質として大豆ホエー蛋白を使用した加水分解物の方が高いACE阻害活性を示した。

[0038] ◎実施例2(大豆ホエー蛋白加水分解物のゲル濾過による分画)

実施例1で得られた大豆ホエー蛋白加水分解物について、表2の条件にてゲル濾過(FPLC)による分画を行い、画分I:Fr. 6-9、画分II:Fr. 10-15、画分III:Fr.16-20、画分IV:Fr.21-25の4画分に分画した。各画分を回収し、80～100℃で蒸発乾固し、1.5mlの水で溶解した。このFPLCによる溶出パターンを図1に示した。

[0039] (表2)

 ゲル濾過分析条件

分析システム：ファルマシアFPLCシステム

カラム : Sephadex-LH20 (サイズ：φ2.2×80mm)

溶 媒 : 10mMリン酸バッファー (pH6.8) にEtOHを50%v/vで加えたもの

流 速 : 2ml/分

検 出 : 吸光度280nm、感度レンジ0.2

 フラクション容量：6ml

[0040] 得られた画分I〜IVのローリー法による回収率を表3に、また、各画分のACE阻害率を表4に示した。その結果、多くの活性が画分III:Fr.16-20に認められ、この画分の分子量は1500以下であると推測された。

[0041] (表3)画分I〜IVの蛋白質濃度測定

		蛋白質濃度	回収率
反応液上澄(チャージ量 5ml)		2.31% (総蛋白質量 116mg)	
I	: Fr. 6-9 (1.5ml)	1.32%	17%
II	: Fr. 10-15 (1.5ml)	3.32%	43%
III	: Fr. 16-20 (1.5ml)	1.33%	17%
IV	: Fr. 21-25 (1.5ml)	0.86%	11%

[0042] (表4)画分I〜IVの20 μg/mlの濃度におけるACE阻害率(%)

画分	I	II	III	IV
	Fr. 6-9	Fr. 10-15	Fr. 16-20	Fr. 21-25
ACE阻害率 (%)	0.4	16.0	55.7	39.2

[0043] ◎実施例3(画分IIIのゲル濾過による再分画)

実施例2で得られた画分IIIについて実施例2と同じ条件にて再度ゲル濾過(FPLC)を行い、画分III-1:Fr. 13-15、III-2:Fr. 16-18、III-3:Fr. 19-21、III-4:Fr. 22-24の4画分に分画した。各画分を収集し、80〜100℃で蒸発乾固し、1.0mlの水で溶解した。実施例1で得られた酵素分解物上澄みのFPLCによる溶出パターンを図2に示した。

[0044] 得られたIII-1〜III-4画分のローリー法による回収率を表5に、また、各画分のACE阻害活性を表6に示した。その結果、多くの活性が画分III-3:Fr. 19-21に認められた。

[0045] (表5)画分III-1〜III-4の蛋白質濃度測定

	蛋白質濃度	回収率
III : (チャージ量 1.5ml)	1.33%	(総蛋白質量 20mg)
III-1 : Fr. 13-15 (1.0ml)	0.35%	18%
III-2 : Fr. 16-18 (1.0ml)	0.68%	34%
III-3 : Fr. 19-21 (1.0ml)	0.90%	45%
III-4 : Fr. 22-24 (1.0ml)	0.26%	13%

[0046] (表6)画分III-1〜III-4の20 μ g/mlの濃度におけるACE阻害率%

画分	III-1	III-2	III-3	III-4
阻害率 (%)	19.6	49.7	73.1	53.2

[0047] ◎実施例4(III-3画分の逆相クロマトによる分画)

実施例3にて得られたACE阻害活性の強いIII-3画分から、逆相カラムを用いたHPLCにてACE阻害関与ペプチドを精製した。

まず、III-3画分の0.1%溶液を50 μ lを表7の条件にてHPLCに供し、図3の溶出パターンに示す通り、O.D.220nmで検出した。この中で14.48分のピークに高いACE阻害活性を認めたので、このピークを分取した。

[0048] (表7)

HPLC 分析条件
カラム：ODS-80TM / TSKgel (ϕ 4.6 $\times$ 250mm)/40℃
溶 媒：A：TFA0.1%水、B：アセトニトリル
グラジエント：0分から45分でB溶媒5%から90%、その後55分まで90%
流 速：0.8ml/分
検 出：O.D.220nm

[0049] ◎実施例5(14.48分ピーク物質の逆相クロマトによる精製)

次に、14.48分のピークを採取後、表8の条件にてさらにHPLCに供し、図4の溶出パターンに示す通り、ピーク1〜3が検出され、ピーク1にACE阻害活性が認められた。このピークを分取し、表9に示す条件にてゲルろ過に供したところ、図5の溶出パターンに示す通り、分子量300の単一ピークが得られた。このピーク1について、アミノ酸シーケンサーでアミノ酸配列を調べた結果、Leu-Ala-Pro(以下、「LAP」と略する。)の配列からなるトリペプチドであることが判明した。

[0050] (表8)

HPLC 分析条件

カラム : ODS-80TM / TSKgel ($\phi 4.6 \times 250\text{mm}$) / 40°C

溶 媒 : A : TFA0.1%水、B : アセトニトリル

グラジエント : B溶媒 5%で一定

流 速 : 0.8ml/分

検 出 : 0. D. 220nm

[0051] (表9)

HPLC 分析条件

カラム : Superdex Peptide PE ($\phi 7.5 \times 300\text{mm}$) / 20°C

溶 媒 : 1%SDS・10mM リン酸バッファーpH6.8

流 速 : 0.5ml/分

検 出 : 0. D. 220nm

[0052] 精製されたLAPの濃度をTNBS法で測定し、濃度当りの逆相HPLCのピーク面積を求めると $1\ \mu\text{M}$ の溶液を $50\ \mu\text{l}$ 注入した場合、ピーク面積は約28000を示した。これをもとに各画分の回収率及びピーク面積から分解物中に含まれるLeu-Ala-Proトリペプチドの量を計算した。

[0053] III-3画分:0.1%液 $50\ \mu\text{l}$ 注入でピーク面積116万であるので、0.1%液の本トリペプチドの濃度は、 $116\text{万} \times 0.7(\text{純度}) \div 2.8\text{万} = 29\ \mu\text{M} = 8.7\ \mu\text{g/ml}$ となり、蛋白質固形分当りの含有量は、 $8.7\text{mg/g}(\text{III-3画分})$ となる。III-3画分の分解物上澄中の含有量は、7.7%なので、III-3画分由来の本トリペプチドの分解物上澄中の蛋白質固形分当りの含有量は、 $0.67\text{mg/g}(\text{分解物上澄})$ となる。また、IV画分もLeu-Ala-Proトリペプチドが認め

られた。

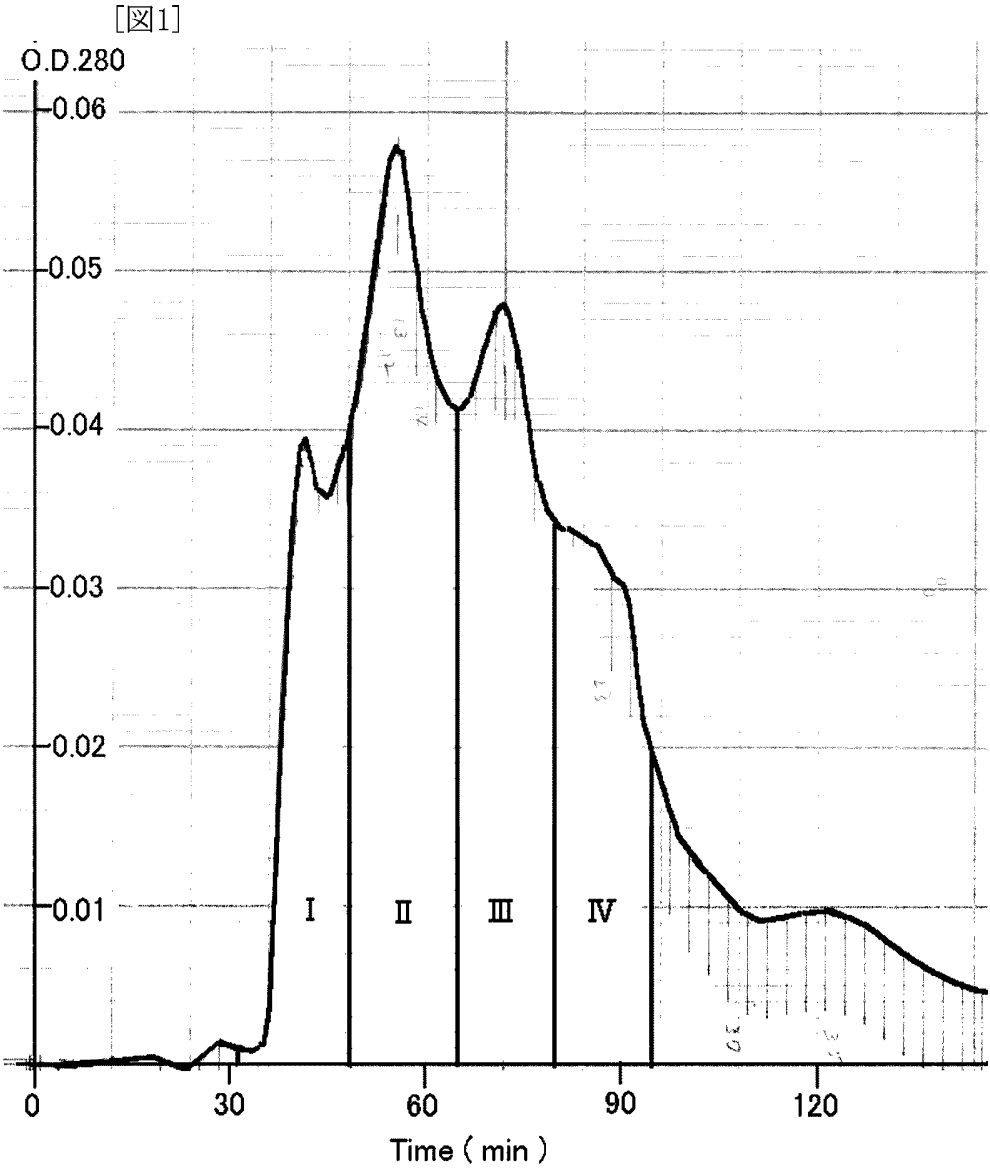
- [0054] IV画分:0.1%液50 μ l注入でピーク面積110万であるので、0.1%液の本トリペプチドの濃度は、 $110万 \times 0.3(純度) \div 2.8万 = 12 \mu M = 3.5 \mu g/ml$ となり、蛋白質固形分当りの含有量は、3.5mg/g(IV画分)となる。IV画分の分解物上澄中の含有量は、11%なので、IV画分由来の本トリペプチドの分解物上澄中の蛋白質固形分当りの含有量は、0.39mg/g(分解物上澄)となる。この2画分由来のものを合わせると少なくとも分解物上澄中の蛋白質固形分1g当りの本トリペプチドの含有量は、1.06mgとなる。

図面の簡単な説明

- [0055] [図1]実施例2の蛋白質加水分解物上澄のゲルろ過(FPLC)による溶出パターンである。
- [図2]実施例3の画分IIIのゲルろ過(FPLC)による溶出パターンである。
- [図3]実施例4の画分III-3の 逆相HPLCによる溶出パターンである。
- [図4]実施例5のピーク14.48分の逆相 HPLCによる溶出パターンである。
- [図5]実施例6のピーク1の ゲルろ過HPLCによる溶出パターンである。

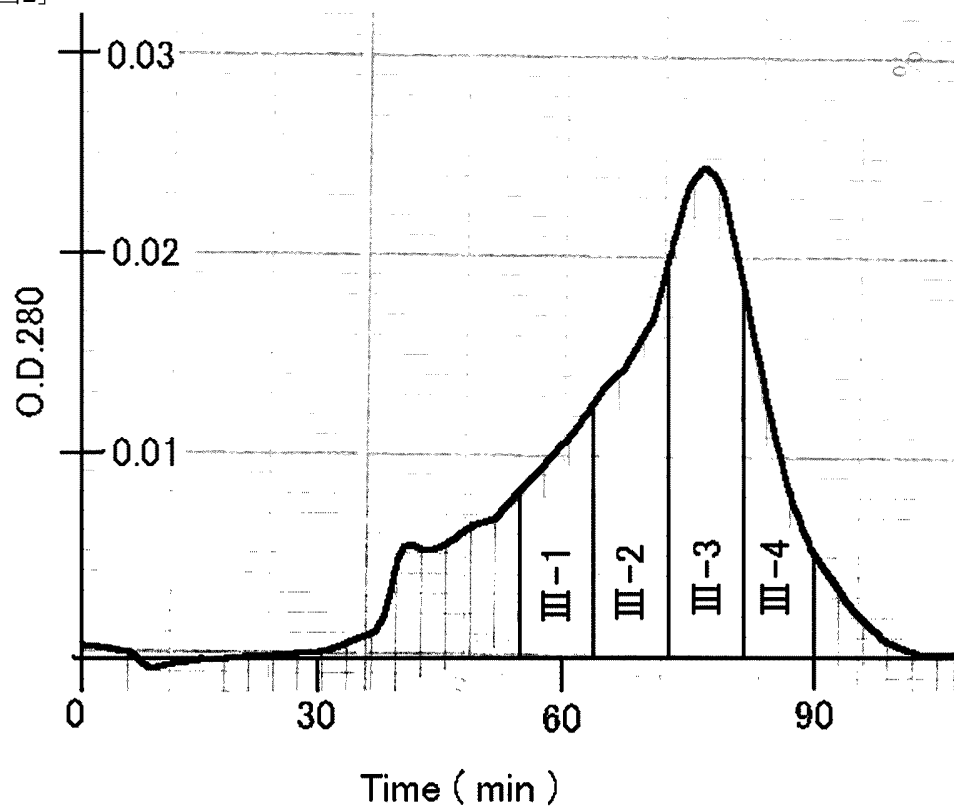
請求の範囲

- [1] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白にプロテアーゼを作用させた加水分解物又はその分画物からなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物。
- [2] アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドがLeu-Ala-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチドである請求項1に記載の組成物。
- [3] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全固形分あたりの粗蛋白質含量が40重量%以上である請求項1に記載の組成物。
- [4] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全蛋白質あたりのレクチン含量が10重量%以上である請求項1に記載の組成物。
- [5] 加水分解物又はその分画物中に含まれるペプチドの分子量が100〜2000である請求項1に記載の組成物。
- [6] 大豆ホエーもしくは大豆ホエー蛋白中の全蛋白質1gあたりのLeu-Ala-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチドの含量が、0.2mg以上である請求項2に記載の組成物。
- [7] 請求項1に記載の組成物を含有するアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する血压降下剤。
- [8] 請求項1に記載の組成物を含有するアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する血压降下用健康食品。
- [9] 請求項1に記載の組成物の、血压降下剤又は血压降下用健康食品製造における使用。
- [10] 高血圧の改善に有効量の請求項1に記載の組成物を、高血圧の改善が必要な哺乳動物に与えることを特徴とする高血圧の改善方法。
- [11] 大豆ホエーを加熱して生ずる加熱凝集物、又は該加熱凝集物をpH4以下にさらして可溶物を除去したものにプロテアーゼを作用させ、不溶物を除去して大豆ホエー蛋白加水分解物を得ることを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有組成物の製造法。
- [12] 大豆ホエー蛋白加水分解物からさらに分子量200〜1000のペプチドを分画する請求項11に記載の組成物の製造法。

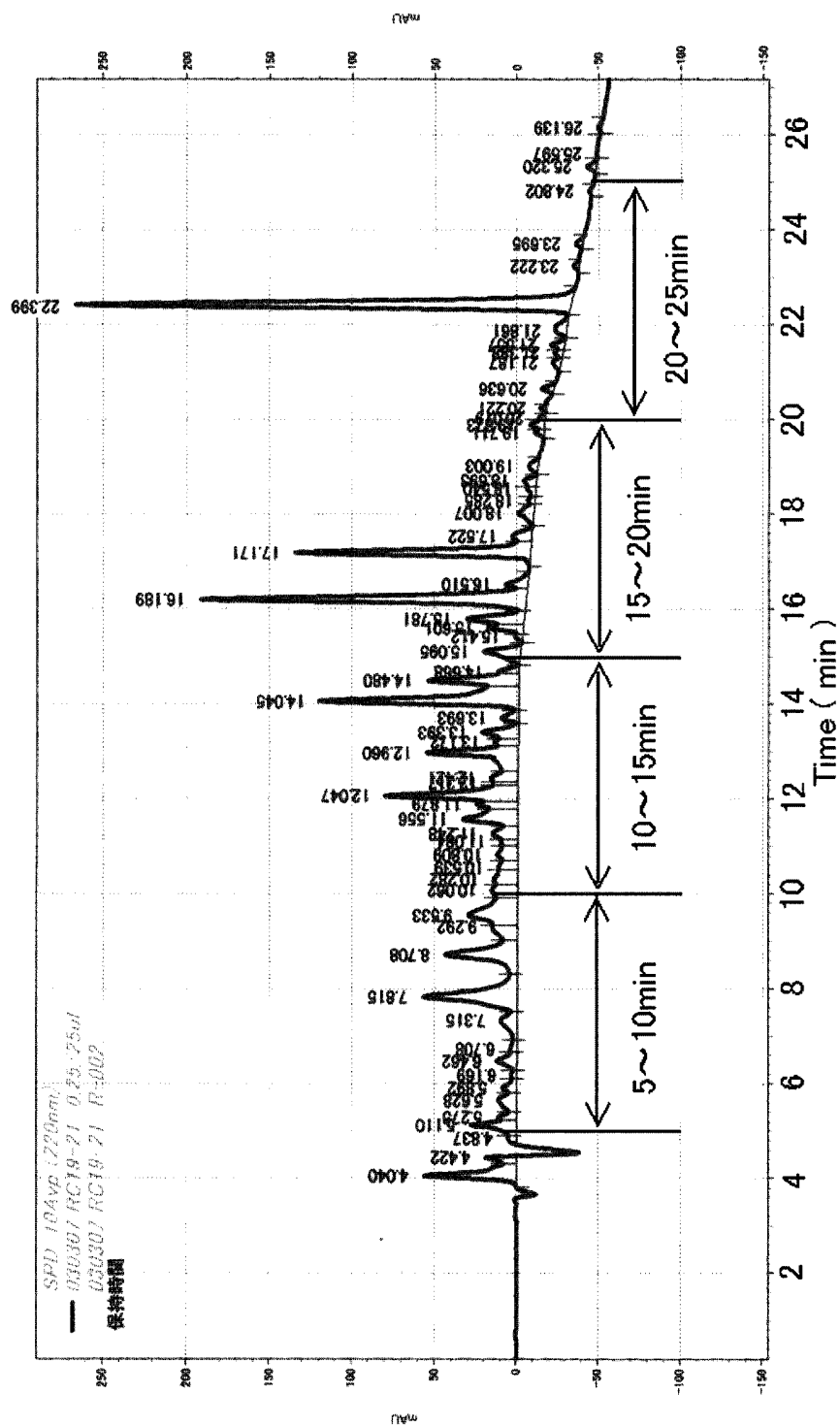


2/5

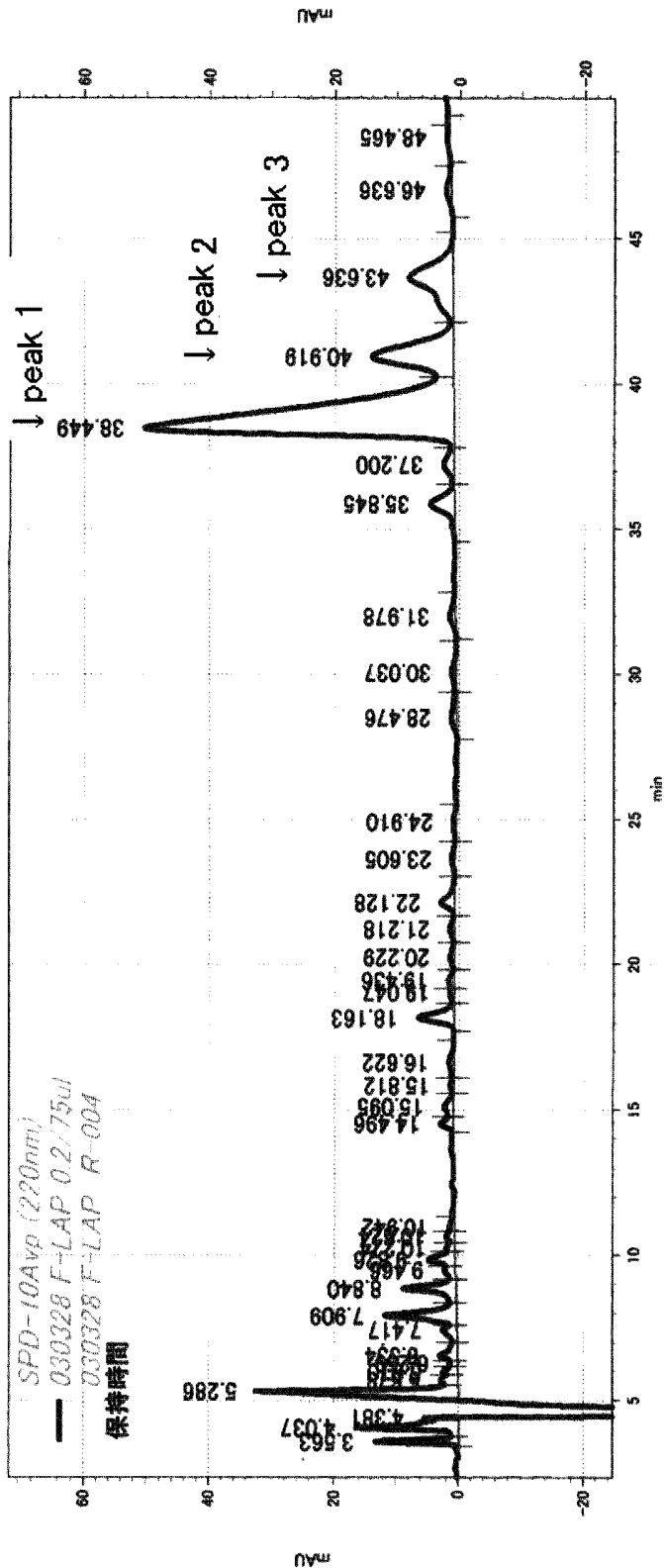
[図2]

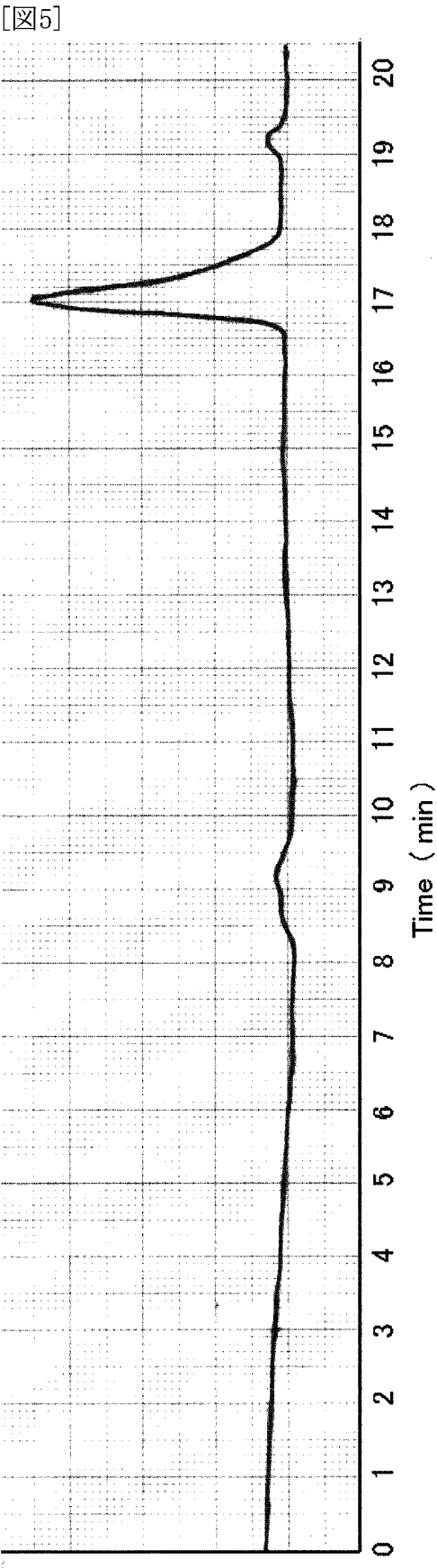


[図3]



4





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K5/083, C07K14/415, A61K38/06, A61P9/12, A23L1/305

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K5/083, C07K14/415, A61K38/06, A61P9/12, A23L1/305

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN),
JSTPLUS FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-53595 A (Kenji ABO), 29 February, 2002 (29.02.02), Claim 3; Par. Nos. [0018], [0030] (Family: none)	1-4, 7-9, 11 5, 6, 12
Y	FUJITA, H. et al., Classification and anti hypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins., J.Food.Sci., 2000, Vol.65, pages 564 to 569	6
Y	JP 7-188282 A (Yoko SUETSUNA), 25 July, 1995 (25.07.95), (Family: none)	5, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 June, 2004 (11.06.04)Date of mailing of the international search report
29 June, 2004 (29.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-179647 A (Kikkoman Corp.), 26 June, 2002 (26.06.02), (Family: none)	1
P,X	Masami YONEKURA et al., 'Daizu Hoei oyobi Okara Tanpakushitsu karano Seiri Kinosei Peputido no Tanri to Oyo', Soy protein research, Japan, 2003, Vol.6, pages 88 to 93	1-9,11,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006527

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 10 pertains to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006527

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

of the PCT and Rule 39.1 (iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C07K5/083, C07K14/415, A61K38/06, A61P9/12, A23L1/305		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C07K5/083, C07K14/415, A61K38/06, A61P9/12, A23L1/305		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-53595 A (阿保 建司) 2002. 02. 19 (ファミリーなし) 請求項3、段落【0018】、【0030】参照	1-4, 7-9, 11 5, 6, 12
Y	FUJITA H. et al., Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins., J. Food. Sci., 2000, Vol. 65, p. 564-569	6
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11. 06. 2004	国際調査報告の発送日 29. 6. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬	4 B 3 0 3 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 7-188282 A (末綱 陽子) 1995. 07. 25 (ファミリーなし)	5, 12
A	JP 2002-179647 A (キッコーマン株式会社) 2002. 06. 26 (ファミリーなし)	1
P, X	米倉政実他、「大豆ホエイおよびオカラたん白質からの生理機能性 ペプチドの単離と応用」、 大豆たん白質研究、2003, Vol. 6, p. 88-93	1-9, 11, 12

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 10 に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。