(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2017-8104
(P2017-8104A)
(43)公開日　平成29年1月12日(2017.1.12)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	4B018
A61K 35/20	(2006.01)	A61K	37/18	4B027
A61P 25/28	(2006.01)	A61K	35/20	4B117
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	25/28	4C084
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	29/00	4C087

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-197482 (P2016-197482)
(22)出願日　平成28年10月5日 (2016.10.5)
(62)分割の表示　特願2016-522815 (P2016-522815)の分割
原出願日　平成27年6月16日 (2015.6.16)
(31)優先権主張番号　特願2014-123073 (P2014-123073)
(32)優先日　平成26年6月16日 (2014.6.16)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2014-228391 (P2014-228391)
(32)優先日　平成26年11月10日 (2014.11.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

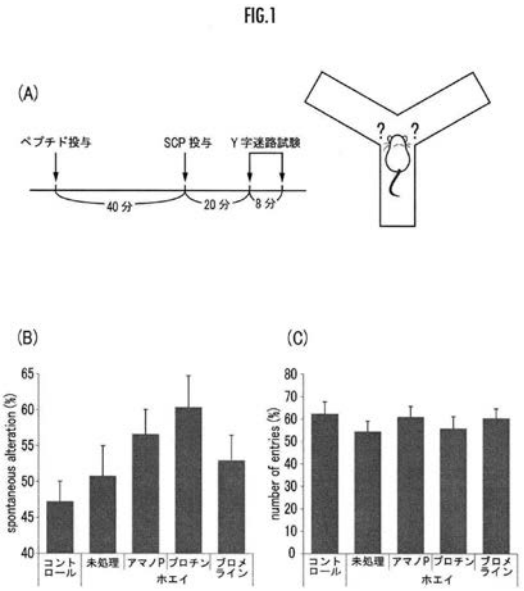
(71)出願人　311002447
キリン株式会社
東京都中野区中野四丁目１０番２号
(74)代理人　110000800
特許業務法人創成国際特許事務所
(72)発明者　阿野　泰久
東京都中野区中野四丁目１０番２号　キリン株式会社内
(72)発明者　沓掛　登志子
東京都中野区中野四丁目１０番２号　キリン株式会社内

Ｆターム(参考)　4B018 LB07 LB08 LB10 LE00 MD20 MD22 ME10 ME14 MF12
4B027 FB24 FC06 FK05 FK18 FQ19

最終頁に続く

(54)【発明の名称】記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物

(57)【要約】
【課題】記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物、食品、医薬を提供する。
【解決手段】配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とすることにより、脳機能の向上、特に記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物、食品、医薬を提供することが可能となる。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物であって、配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列に示されるペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする組成物。
【請求項２】
食品組成物である、請求項１記載の組成物。
【請求項３】
医薬組成物である、請求項１記載の組成物。
【請求項４】
健康食品、機能性食品、栄養補助食品、サプリメント、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能性食品、機能性表示食品、又は病者用食品である、請求項２記載の組成物。
【請求項５】
食品又は食品素材中に含まれるタンパク質の加水分解によって得られた配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列に示されるペプチドを、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物に含有せしめることを特徴とする該組成物の製造方法。
【請求項６】
前記ペプチドが、乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材を微生物由来の酵素剤で酵素処理することによって得られたものである、請求項５記載の組成物の製造方法。
【請求項７】
前記乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材が、ホエイ又はカゼインである請求項６記載の組成物の製造方法。
【請求項８】
前記酵素剤が、アスペルギルス属菌由来の酵素、バチルス属菌由来の酵素、及びリゾプス属菌由来の酵素からなる群から選ばれた１種又は２種以上の酵素を含むものである請求項６又は７記載の組成物の製造方法。
【請求項９】
ミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性を増強するための組成物であって、配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列に示されるペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする組成物。
【請求項１０】
配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列に示されるペプチドを有効成分とする記憶学習機能及び／又は認知機能の増強剤。
【請求項１１】
配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列に示されるペプチドを有効成分とするミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性の増強剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強する活性を有するペプチドに関し、該ペプチドを含有する組成物、食品及び医薬に関する。
【背景技術】
【０００２】
脳機能の維持、向上、改善は、若年層から老年層まで幅広い世代で求められている。記憶力や学習能力の維持、向上、改善は、受験、資格試験等に備えて勉強する学生や社会人だけではなく、日々の仕事や生活を行う上でも重要である。また、老年層では記憶力の低下、認知機能の低下は生活の質に関わるため、脳機能の低下を予防し、これを維持、向上、改善させることが求められている。

【０００３】
さらに、老年期においては、老化に伴う脳機能の低下に起因する精神障害の増加が高齢者の増加とともに社会問題となっている。脳機能の低下に起因する疾患としては、アルツハイマー病に代表される認知症だけではなく、うつ病、せん妄等の精神疾患も脳機能の低下が原因であることが報告されている（非特許文献１～３）。
【０００４】
脳機能の解明が進むにつれ、脳機能を増強させる物質の探索が盛んに行われている。特に、副作用を心配することがないことから、食品成分中に脳機能を向上させる物質が含まれていないか解析が行われている。
【０００５】
例えば、オーストラリアで行われた３９歳～６５歳の年齢層での疫学調査によれば、発酵乳製品を日常的に摂取すると、記憶力を増強するという結果が得られている（非特許文献４）。また、アメリカ合衆国においても、発酵乳製品の摂取により認知機能障害の有病率が低下するという結果が得られている（非特許文献５）。それらの結果から、発酵乳製品には、記憶学習機能や認知機能を増強する物質が含まれていると考えられるが、前記研究成果は疫学調査にとどまり、実際の有効成分やその作用機序については不明である。
【０００６】
記憶学習機能、認知機能の維持、向上、改善といった脳機能を増強する成分を、日常的に摂取し得る食品の成分中に特定することができれば、幅広い世代において有用なものとなる。上述のように発酵乳製品には、記憶学習機能や認知機能を増強する成分が含まれていると考えられることから、該成分を特定し、医薬、食品として利用することにより、若年層から老年層まで幅広い層で利用可能な製品を開発することができる。
【０００７】
一方、脳内で唯一の免疫細胞として存在するミクログリアは、脳内における老廃物の貪食除去、損傷を受けた組織の修復等、脳内の恒常性の維持に不可欠な機能を有していることが明らかとなっている。ミクログリアによる脳内での老廃物除去、シナプス新生の促進は、認知機能の維持、向上、及び改善に貢献する一方、ミクログリアの過剰な活性化は、炎症状態を惹起し、認知機能の低下を引き起こす可能性があることも報告されている（非特許文献６～９）。過剰に活性化したミクログリアが産生するＴＮＦ-α等の炎症性サイトカイン、ケモカインは、疼痛、うつ病、慢性疲労の病態と密接に関係していると報告されている（非特許文献１０～１６）。そのため、ミクログリアの活性を制御することは、脳に関連する様々な疾患を予防、及び治療するうえで重要である。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】西村　健（1996）日本老年医学会雑誌、第３３巻第１号、１～３頁
【非特許文献２】服部　英幸（2013)日本臨床、第７１巻第６号、９８１～９８７頁
【非特許文献３】田中　稔久、武田　雅俊（2011）日本臨床、増刊号、５２～５６頁
【非特許文献４】Crichton, G.E., et al., 2010 Asia. Pac. J. Clin. Nutr., Vol.19(2), pp.161-171
【非特許文献５】Rahman, A., et al., 2007, J. Nutr. Health Aging, Vol.11(1), pp.49-54
【非特許文献６】Wake, H., et al., 2009, J. Neurosci., Vol.29(13), pp.3974-3980
【非特許文献７】米山　雅紀、萩田　喜代一、2013年、日薬理誌、142巻、17-21頁
【非特許文献８】Welberg, L., 2014, Nat. Rev. Neurosci., Vol.15, pp.68-69
【非特許文献９】Brown, G.C. & Neher, J.J., 2014, Nat. Rev. Neurosci. Vol.15, pp.209-216
【非特許文献１０】Berta, T., et al., 2014, J. Clin.Invest., Vol.124(3), pp.1173-1186
【非特許文献１１】Riazi, K., et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.105(4

4), pp.17151-17156
【非特許文献１２】Grinberg, Y.Y., et al., 2013, J. Neurochem., Vol.126(5), pp.662-672
【非特許文献１３】Couch, Y., et al., 2013, Brain Behav. Immun., Vol.29, pp.139-146
【非特許文献１４】Yasui, M., et al., 2014, Glia, doi: 10.1002/glia.22687
【非特許文献１５】Nakatomi, Y., et al., 2014, J. Nucl. Med., Vol.55, pp.945-950
【非特許文献１６】Perry, V.H., et al., 2010, Nat. Rev. Neurol. Vol.6, pp.193-201

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明の目的は、脳機能の向上、特に記憶学習機能及び／又は認知機能を増強する効果に優れたペプチドを見出し、その知見に基づき、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物、食品、医薬を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
上記目的を達成するため、本発明者らは、疫学的に示されている発酵乳製品の中に脳機能を向上させる成分が含まれていると考え、健忘モデルマウスのＹ字路迷路試験における評価、あるいは単離した脳内ミクログリアの活性試験における評価を指標として、乳タンパク質由来のペプチドのスクリーニングを行った。その結果、乳タンパク質由来の特定のペプチドが、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強し得ること、更には、ミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性を増強し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。
【００１１】
即ち、本発明は、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物であって、配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする。
【００１２】
本発明においては、前記ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列であることが好ましい。
【００１３】
また、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための食品であることが好ましい。
【００１４】
また、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための医薬であることが好ましい。
【００１５】
また、前記ペプチドが、食品又は食品素材中に含まれるタンパク質の加水分解によって生成したものであることが好ましい。
【００１６】
また、前記ペプチドが、乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材を微生物由来の酵素剤で酵素処理することによって得られたものであることが好ましい。
【００１７】
また、前記乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材が、ホエイ若しくはカゼイン又はそれらを含有する粉乳、脱脂粉乳、調製粉乳であることが好ましい。製造コストの観点からはホエイがより好ましい。
【００１８】
また、前記酵素剤が、アスペルギルス属（Asperugillus）菌由来の酵素、バチルス属（Bacillus）菌由来の酵素、及びリゾプス属（Rhizopus）菌由来の酵素からなる群から選ばれた１種又は２種以上の酵素を含むものであることが好ましい。
【００１９】
一方、本発明の他の観点は、ミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性を増強する

ための組成物であって、配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする。

【００２０】

上記発明においては、前記ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列であることが好ましい。

【発明の効果】

【００２１】

本発明によれば、脳機能の向上、特に記憶学習機能及び／又は認知機能を増強する効果に優れたペプチドが見出され、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物、食品、医薬を提供することができる。

【００２２】

より詳細には、例えば、若年層から壮年層では記憶力や学習能力の向上を図り、また、老年層では記憶力や学習能力の向上とともに、認知機能の低下を予防するのに有用な、組成物、食品、医薬を提供することができる。

【００２３】

また、脳内における認知機能の低下に繋がる老廃物を、ミクログリアによって除去する活性を増強し、併せてミクログリアの有する抗炎症活性を増強することにより、認知機能を維持、向上、及び改善するのに有用な、組成物、食品、医薬を提供することができる。

【００２４】

本発明は、日常的に摂取し得る食品に含まれるペプチド成分を有効成分とするので、副作用の少ない組成物、食品、医薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】ホエイをタンパク質分解酵素で処理した組成物の記憶学習機能、認知機能の増強効果をＹ字迷路試験により検討した結果を示す図。

【図２】種々の酵素で処理したホエイペプチドエキスによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図３】プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ又はサモアーゼＣ１００で処理したホエイペプチドエキスのＨＰＬＣプロファイルを示す図。

【図４】ホエイ由来ペプチドの合成ペプチドによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図５】ホエイ由来ペプチドの合成ペプチドによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図６】ジペプチドＷＸによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図７】カゼイン由来ペプチドの合成ペプチドによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図８】ペプチドＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰのコア配列解析を示す図。

【図９】ホエイペプチドエキスおよび再構成サンプルによる記憶学習機能、認知機能の増強効果を示す図。

【図１０】ペプチドのミクログリアの貪食作用への効果を示す図。

【図１１】ペプチドのミクログリアの抗炎症作用への効果を示す図。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

本発明で、記憶学習機能の増強とは記憶学習機能の維持、向上及び／又は改善を含む。記憶学習機能の維持とは、例えば、老年層等において、加齢に伴って生じる記憶力や学習能力の低下を防止することなどを含む。また、記憶学習機能の向上とは、例えば、一過的な記憶学習機能の向上や、中長期的な記憶の定着を促進、ひいては、脳の発育を促進させることなどを含む。さらに、記憶学習機能の改善とは、例えば、加齢その他の要因により一旦低下した機能や低下の兆しがある機能について回復することなどを含む。

【００２７】
本発明で、認知機能の増強とは認知機能の維持、向上及び／又は改善を含む。認知機能の維持とは、例えば、理解、判断、論理などの知的機能、すなわち認知能力の低下を予防することなどを含む。また、認知機能の向上とは、例えば、認知能力を現状より高めることなどを含む。さらに、認知機能の改善とは、例えば、いったん低下した認知能力や低下の兆しがある症状が回復することなどを含む。
【００２８】
本発明に用いるペプチドの作用機序については今後の研究の成果を待つことになるが、神経伝達物質の産生を促すなどの脳の仕組みを補強する結果として、認知機能を向上させる、記憶の定着を向上させる、加齢に伴う記憶の低下を抑制する等の記憶学習機能及び／又は認知機能の増強につながるものと考えられる。
【００２９】
なお、本発明による知見によれば、上記ペプチド又は上記ペプチドを含む組成物を有効成分とする記憶学習機能及び／又は認知機能の増強剤や、上記ペプチド又は上記ペプチドを含む組成物をヒト又は動物に摂取させる記憶学習機能及び／又は認知機能を増強する方法や、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための上記ペプチド又は上記ペプチドを含む組成物の用途なども提供される。
【００３０】
本発明に用いるペプチドは、化学合成によって得られたものを用いてもよく、乳、大豆、小麦、卵、畜肉、魚肉、魚介などに由来するタンパク質やポリペプチド原料等から化学的もしくは酵素的に分解して得られたものを用いてもよい。具体的には、例えば、本発明に用いるペプチドの配列は、少なくとも、乳のホエイのカゼイン、牛血清アルブミン（ＢＳＡ）、大豆のグリシニン、小麦のグルテニン、卵黄のリボビテリン、卵白のオボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチウム、チキン蛋白のコラーゲンなどに含まれているから、それらや、それらを含有する食品もしくは食品素材を酸加水分解やプロテアーゼによる酵素処理、又は微生物発酵等に供して、上記ペプチドを生成させることができる。本発明の組成物としてはその調製物をそのまま用いてもよいし、濃縮したり、スプレードライや凍結乾燥等により乾燥粉末として用いてもよい。また、必要に応じて不純物、塩、酵素等の除去など、任意の程度の精製を施して用いてもよい。
【００３１】
本発明に用いるペプチドを構成するアミノ酸は、Ｌ型のアミノ酸のみから構成されていてもよいし、Ｄ型のアミノ酸のみから構成されていてもよいし、あるいは両者が混在したペプチドのいずれであってもよい。また、天然に存在するアミノ酸のみから構成されていてもよいし、アミノ酸にリン酸化やグリコシル化等、任意の官能基が結合した修飾アミノ酸のみから構成されていてもよいし、あるいは両者が混在したペプチドのいずれであってもよい。また、ペプチドが２以上の不斉炭素を含む場合には、エナンチオマー、ジアステレオマー、あるいは両者が混在したペプチドのいずれであってもよい。
【００３２】
さらに、本発明に用いるペプチドは、その薬学上許容される塩もしくは溶媒和物であってもよい。例えば、薬学上許容される酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸塩などが挙げられる。また、薬学上許容される金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩などが挙げられる。また、薬学上許容されるアンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられる。また、薬学上許容される有機アミン付加塩としては、モルホリン、ピペリジン等の付加塩が挙げられる。
【００３３】
本発明の使用形態については特に制限はない。例えば、医薬、その医薬に配合するために用いられる添加物、あるいは食品、その食品に配合するために用いられる添加物などとして使用することができる。また、ヒトだけでなくペットや家畜など動物に用いてもよい

。ヒトや動物に上記ペプチドを有効に作用させるためには、上記ペプチドを０．００００１～１００質量％含有する形態であることが好ましく、０．０００１～１００質量％含有する形態であることがより好ましく、０．００１～１００質量％含有する形態であることが最も好ましい。また、本発明の組成物は、上記ペプチド以外に更に１種以上の有効成分と共に含有させたり、併用して投与もしくは摂取するようにしてもよい。例えば、認知機能の維持、向上等の効果を有することが既知である化合物又は組成物として、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）やイチョウ葉エキスなどが挙げられる。また、アミロイドβを減少させる成分として、抗アミロイドβ抗体などが挙げられる。

【００３４】

本発明の一使用形態として例えば医薬である場合、例えば上記ペプチドのうち少なくともいずれか一つを有効成分として含み、担体、賦形剤、結合剤、希釈剤等を混合することにより、医薬用組成物を製造することができ、これを経口的又は非経口的に投与することが可能である。経口用の投与形態としては、顆粒剤、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、シロップ剤等が挙げられ、また、非経口用の投与形態としては、注射剤、点滴剤、経鼻投与製剤、外用剤等が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【００３５】

その投与量としては、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度等により異なるが、通常の経口投与の、成人１人１日当たりの好ましい投与量の範囲を挙げるならば、第１には上記ペプチド０．００２～４０ｇであり、第２には上記ペプチド０．００２～２０ｇであり、第３には上記ペプチド０．００２～２ｇであり、第４には上記ペプチド０．０２～４０ｇであり、第５には上記ペプチド０．０２～２０ｇであり、第６には上記ペプチド０．０２～２ｇであり、第７には上記ペプチド０．２～４０ｇであり、第８には上記ペプチド０．２～２０ｇであり、第９には上記ペプチド０．２～２ｇである。また、たとえば静脈内投与等の非経口投与の場合、通常の静脈内投与の、成人１人１日当たりの好ましい投与量の範囲を挙げるならば、第１には上記ペプチド０．０００２～４ｇであり、第２には上記ペプチド０．０００２～２ｇであり、第３には上記ペプチド０．０００２～０．２ｇであり、第４には上記ペプチド０．００２～４ｇであり、第５には上記ペプチド０．００２～２ｇであり、第６には上記ペプチド０．００２～０．２ｇであり、第７には上記ペプチド０．０２～４ｇであり、第８には上記ペプチド０．０２～２ｇであり、第９には上記ペプチド０．０２～０．２ｇである。なお、これら投与量に関しては、種々の条件により、適宜最適な形態を選択すればよいことは勿論である。

【００３６】

本発明の一使用形態としては、例えば食品であってもよく、その形態に特に制限はない。液状、半液体状、固体状のいずれであってもよく、飲料のような形態も包含する。また、いわゆる健康食品、機能性食品、栄養補助食品、サプリメントを包含し、疾病リスク低減表示を付した食品などの保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能性食品、機能性表示食品）、病者用食品も包含される。例えば、乳や大豆等の食品素材を微生物発酵に供することにより上記ペプチドを生成させたヨーグルト、チーズなどの乳製品、麹発酵食品としても良い。また、サプリメントとしては、上記ペプチドの乾燥粉末に賦形剤、結合剤等を加え練り合わせた後に打錠することにより製造された錠剤の形態などが挙げられる。

【００３７】

本発明を飲料に適用する場合、非アルコール飲料として、例えば、ミネラルウォーター、ニア・ウォーター、スポーツドリンク、茶飲料、乳飲料、コーヒー飲料、果汁入り飲料、野菜汁入り飲料、果汁および野菜汁飲料、炭酸飲料などが挙げられるが、これらに限定はされない。ノンアルコールビール等、アルコール含有量が１％未満のビール飲料であってもよい。ミネラルウォーターは、発泡性および非発泡性のミネラルウォーターのいずれもが包含される。

【００３８】

上記非アルコール飲料における茶飲料とは、ツバキ科の常緑樹である茶樹の葉（茶葉）、又は茶樹以外の植物の葉若しくは穀類等を煎じて飲むための飲料をいい、発酵茶、半発

酵茶、及び不発酵茶のいずれもが包含される。茶飲料の具体例としては、日本茶（例えば、緑茶、麦茶）、紅茶、ハーブ茶（例えば、ジャスミン茶）、中国茶（例えば、中国緑茶、烏龍茶）、ほうじ茶等が挙げられる。乳飲料とは、生乳、牛乳等またはこれらを原料として製造した食品を主原料とした飲料をいい、牛乳等そのものを材料とするものの他に、例えば、栄養素強化乳、フレーバー添加乳、加糖分解乳等の加工乳を原料とするものも包含される。

【００３９】

果汁入り飲料や果汁および野菜汁入り飲料に用いられる果物としては、例えば、リンゴ、ミカン、ブドウ、バナナ、ナシ、モモ、マンゴー、アサイー、ブルーベリーなどが挙げられる。また、野菜汁入り飲料や果汁および野菜汁入り飲料に用いられる野菜としては、例えば、トマト、ニンジン、セロリ、カボチャ、セロリ、キュウリなどが挙げられる。

【００４０】

食品の場合の、通常の摂取形態における成人１人１日当たりの好ましい摂取量の範囲を挙げるならば、第１には上記ペプチド０．００２～４０ｇであり、第２には上記ペプチド０．００２～２０ｇであり、第３には上記ペプチド０．００２～２ｇであり、第４には上記ペプチド０．０２～４０ｇであり、第５には上記ペプチド０．０２～２０ｇであり、第６には上記ペプチド０．０２～２ｇであり、第７には上記ペプチド０．２～４０ｇであり、第８には上記ペプチド０．２～２０ｇであり、第９には上記ペプチド０．２～２ｇである。また、上記ペプチドを有効に作用させるためには、上記ペプチドを０．００００１～１００質量％含有する形態であることが好ましく、０．０００１～１００質量％含有する形態であることがより好ましく、０．００１～１００質量％含有する形態であることがさらに好ましく、０．０１～９０質量％含有する形態であることがなお一層好ましく、０．１～８０質量％含有する形態であることが最も好ましい。また、１食分ないしは１食分として小分けされた容器中に、上記ペプチドを含有せしめる場合、通常の配合形態における含量の範囲を挙げるならば、第１には上記ペプチド０．００２～４０ｇであり、第２には上記ペプチド０．００２～２０ｇであり、第３には上記ペプチド０．００２～２ｇであり、第４には上記ペプチド０．０２～４０ｇであり、第５には上記ペプチド０．０２～２０ｇであり、第６には上記ペプチド０．０２～２ｇであり、第７には上記ペプチド０．２～４０ｇであり、第８には上記ペプチド０．２～２０ｇであり、第９には上記ペプチド０．２～２ｇである。飲料として用いる場合には、上記ペプチドを０．００００１～１０質量％含有する形態であることが好ましく、０．０００１～５質量％含有する形態であることがより好ましく、０．００１～５質量％含有する形態であることがさらに好ましく、０．０１～５質量％含有する形態であることがなお一層好ましく、０．１～１質量％含有する形態であることが最も好ましい。

【００４１】

なお、本発明により提供されるペプチドは、その分子量が比較的小さいことから、体内への吸収性や脳関門の通過性に優れ、脳内でその効果を発揮しやすい。

【実施例】

【００４２】

本発明を以下の例によって詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【００４３】

［ホエイペプチドエキスの調製］

ホエイペプチドエキスは以下のようにして調製した。５％（ｗ/ｖ）のホエイ（第一化成社製）水溶液に０．１２５％（ｗ/ｖ）の食品添加プロテアーゼ、又はペプチダーゼを混合し、５０℃で４時間反応を行った。得られた酵素反応液を分画分子量（Molecular Weight Cut-off）１０ＫＤａの限外濾過膜を用い濾過し、濾液（以下、ホエイペプチドエキスともいう。）を回収し、実験に供した。

【００４４】

［記憶学習機能・認知機能の評価方法］

図１（Ａ）に記憶学習機能・認知機能の評価方法の概要を示す。６週齢雄のＣＤ－１マウスに、ペプチドエキスを用いた場合には、１ｍｇ/ｋｇ、合成ペプチドの場合には０．１～３μmol／ｋｇの量で胃内へ強制経口投与を行い、４０分後に記憶障害を誘発するために０．８０ｍｇ/ｋｇのスコポラミン塩酸塩を腹腔内投与した。スコポラミンの腹腔内投与２０分後に自発的交替行動を評価するＹ字迷路試験を実施した。

【００４５】

マウスは本来、直前に選択したルートとは異なるルートを選択する性質がある。そのため、幅、長さ等が等価の３本のアームを持つＹ字迷路にマウスを入れた場合、通常は直前に進入したアームとは異なるアームに進入する。Ｙ字迷路試験は、マウスのその性質を利用し、短期記憶の評価に利用する試験である。

【００４６】

Ｙ字迷路試験では、一本のアームの長さが２５ｃｍ、壁の高さが２０ｃｍ、床の幅が５ｃｍの３本のアームが各々１２０度の角度で接続されたＹ字迷路を実験装置として使用した。

【００４７】

マウスをＹ字迷路のいずれかのアームの先端へ入れて自由に８分間探索させた際の移動したアームの順を記録した。３回連続で異なるアームを選択し、進入した場合を自発的交替行動と呼ぶ。時間内のアームへの総進入数及び、自発的交替行動数をカウントし、式（１）で自発的交替行動変動率（％）を算出した。

自発的交替行動変動率（％）＝自発的交替行動数／（総進入数－２）×１００
・・・・式（１）

自発的交替行動変動率が高いほど、短期記憶が保持されていることを示す。なお、一群１０匹で実験を行い、平均、標準誤差を求めた。

【００４８】

［酵素剤の検討］

乳タンパク質が豊富なホエイ中に脳機能を増強させるペプチドが含まれているか解析するため、ホエイをアスペルギルス（Asperugillus）属菌、バチルス（Bacillus）属菌、植物由来の酵素剤で処理し、Ｙ字迷路試験を行い、脳機能を増強させる効果があるか検討した。

【００４９】

具体的には、食品添加プロテアーゼであるプロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ（アマノＰと略記することもある。天野エンザイム株式会社製）、プロチンＳＤ－ＮＹ１０（プロチンと略記することもある。天野エンザイム株式会社製）、ブロメライン（天野エンザイム株式会社製）を用いてホエイを処理し、得られたホエイペプチドエキスをマウスに経口投与して、脳機能評価を行った。結果を図１（Ｂ）、（Ｃ）に示す。

【００５０】

図１（Ｂ）は自発的交替行動変動率（spontaneous alteration）、（Ｃ）は総進入数（number of entries）を示す。スコポラミン（ＳＣＰ）投与では、総進入数（図１（Ｃ））に有意な変動は生じず、ホエイ、ホエイペプチドエキス投与によっても、行動量に変化はない。なお、コントロールはスコポラミン投与のみを行ったマウス群を示す。

【００５１】

一方、図１（Ｂ）に示すように、スコポラミンのみを投与した群（コントロール）に比べて、アスペルギルス属菌由来のプロテアーゼであるアマノＰ、バチルス属菌由来のプロテアーゼであるプロチン処理したホエイペプチドエキス投与群では脳機能が改善する効果が見られた。しかしながら、プロテアーゼ処理していないホエイ投与群（未処理）や、植物由来のプロテアーゼであるブロメライン処理したペプチドエキス投与群では脳機能の改善は見られなかった。

【００５２】

そこで、脳機能の改善の効果が見られたアスペルギルス及びバチルス由来酵素剤とリゾプス属菌由来酵素剤を含めた表１に示す１０種類の酵素剤（いずれも天野エンザイム株式

会社製）を用いてホエイを処理し、上記と同様にスコポラミン健忘モデルを用いて、記憶学習機能・認知機能の評価を行った（図２）。なお、溶媒(vehicle)としては、蒸留水を用いている。

【００５３】

【表１】

酵素番号	製品名	起源
＃１	ニューラーゼＦ３	Rhizopus niveus
＃２	プロテアーゼＭ「アマノ」ＳＤ	Asperugillus oryzae
＃３	プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ	Asperugillus melleus
＃４	プロチンＳＤ－ＮＹ１０	Bacillus amiloliquefeciens
＃５	サモアーゼＰＣ１０Ｆ	Bacillus stearothermophilus
＃６	プロチンＳＤ－ＡＹ１０	Bacillus licheniformis
＃７	プロテアックス	Asperugillus oryzae
＃８	ペプチダーゼＲ	Rhizopus oryzae
＃９	プロチンＮＹ１００	Bacillus amiloliquefeciens
＃１０	サモアーゼＣ１００	Bacillus stearothermophilus

【００５４】

図２（Ａ）は自発的交替行動変動率（spontaneous alteration）、（Ｂ）は総進入数（number of entries）を示す。いずれの酵素で処理したペプチドエキスもスコポラミン健忘モデルにおいて、脳機能改善効果を示した。

【００５５】

特に、アスペルギルス属菌由来の酵素プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ(アマノＰ、図２の３)と、バチルス属菌由来の酵素サモアーゼＣ１００（図２の１０）で活性が強かったことから、これら酵素処理したペプチド中に、脳機能を改善する効果の高いペプチドが含まれていると考えられるので、これら酵素処理したホエイ中の活性ペプチドの探索を行った。

【００５６】

［ペプチドの分画方法］

脳機能改善効果の高い、アマノＰ、又はサモアーゼＣ１００で処理したホエイペプチドエキスは、Ｃ１８固相抽出カラムに供した後、水、メタノールを各２０、４０、６０、８０％含む水溶液で段階的に溶出を行った。

【００５７】

得られた分画物は濃縮後、分取用ＨＰＬＣにてさらに分画を行った。分離カラムにはＣ１８カラム（内径１０ｍｍ、長さ２５０ｍｍ、粒子径５μｍ）を用い、移動相にはＡ液；５％メタノール、Ｂ液；１００％メタノールを用いて、流速５ｍｌ／ｍｉｎで、０分でＢ液０％、４０分でＢ液８０％のグラジエントによる溶出を行った。

【００５８】

溶出液を幾つかの画分に分け、それぞれを濃縮、乾固した。各分画物を少量のメタノールを含む溶液に再溶解させた後、分析用ＨＰＬＣに供して、再分画を行った。Ｃ１８分離カラム（内径４．６ｍｍ、長さ２５０ｍｍ、粒子径５μｍ）を用い、カラム温度は７０℃とした。

【００５９】

移動相にはＡ液；０．１％ＴＦＡ、Ｂ液；０．１％ＴＦＡ／アセトニトリルを用い、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、０分でＢ液５％、３０分でＢ液２０％、４０分でＢ液２０％、または０分でＢ液５％、３０分でＢ液８０％のグラジエントによる溶出を行った。検出はＵＶ２２０ｎｍで行った。

【００６０】

分析によって得られたピークは幾つかの画分に分け、繰り返し分取を行い回収した。得

られたそれぞれの画分は濃縮、乾固によってＴＦＡを除去し、少量のメタノールを含む溶液に再溶解させた。

【００６１】

これらの分画物の記憶学習機能・認知機能の増強効果を評価し、活性化能の高い分画物中に含まれるペプチドをさらに精製した。得られた精製ペプチドについて、Ｎ末端アミノ酸配列分析を行い、アミノ酸配列を取得した。

【００６２】

図３にホエイをプロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ（アマノＰ）又はサモアーゼＣ１００で分解したペプチドエキスのＨＰＬＣプロファイルを示す。また、各ピークのＮ末端アミノ酸配列分析により得られたアミノ酸配列を示す。

【００６３】

得られたアミノ酸配列情報より、ペプチド固相合成法によりペプチドを合成し、合成ペプチドを得て、合成ペプチドを用いて記憶学習機能・認知機能の増強効果について調べた。

【００６４】

［合成ペプチドによる記憶学習機能・認知機能の増強効果の検討］

ホエイをAspergillus melleus由来のタンパク質分解酵素プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤで処理し、記憶学習機能・認知機能の増強活性のある分画中に含まれるペプチド配列を解析した結果、ＧＴＷＹ（配列番号７）、ＧＹＧＧＶＳＬＰ（配列番号３）、ＫＰＴＰＥＧＤＬＥＩ（配列番号２）の３つのペプチドの配列情報が得られた（下記表２配列表参照）。

【００６５】

そこで、得られたアミノ酸配列情報に基づいて、ペプチド固相合成法によってペプチドを合成した。次に、合成ペプチドを用いて記憶学習機能・認知機能が増強されるかＹ迷路試験により解析を行った。図４に結果を示す。

【００６６】

ＧＴＷＹ、ＧＹＧＧＶＳＬＰ、ＫＰＴＰＥＧＤＬＥＩいずれのペプチドにも、濃度依存的に記憶学習機能・認知機能の増強活性が見られた。特にＧＴＷＹは図３に示すように、ホエイをプロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤで処理することにより得られるメジャー成分である。

【００６７】

次に、ホエイをバチルス由来のタンパク質分解酵素サモアーゼＣ１００で処理し、記憶学習機能・認知機能の増強活性のある分画中に含まれるペプチド配列を解析した。その結果、ＴＷＹ（配列番号１１）、ＴＷＹＳ（配列番号８）、ＶＡＧＴＷＹＳ（配列番号４）、ＶＳＬＰＥＷ（配列番号５）の４つのペプチドの配列情報が得られた。

【００６８】

アミノ酸配列情報からペプチド固相合成法によって合成ペプチドを得て、合成ペプチドを用いて記憶学習機能・認知機能が増強されるかＹ迷路試験により解析を行った。結果を図５に示す。

【００６９】

ＴＷＹ、ＴＷＹＳ、ＶＡＧＴＷＹＳ、ＶＳＬＰＥＷの４つのペプチドとも、濃度依存的に記憶学習機能・認知機能の増強活性が見られた。特に、ＴＷＹＳ、ＴＷＹ、ＶＳＬＰＥＷは図３に示すように、ホエイをサモアーゼＣ１００で処理することにより得られるメジャー成分である。

【００７０】

［ジペプチドＷＸの記憶学習機能・認知機能に対する効果］

上記解析から、脳機能の増強効果があることが明らかとなった７つのペプチドのうち４つのペプチド、ＶＡＧＴＷＹＳ（配列番号４）、ＧＴＷＹ（配列番号７）、ＴＷＹＳ（配列番号８）、ＴＷＹ（配列番号１１）にトリプトファン-チロシン（ＷＹ）の配列が含まれることが明らかとなった。ＷＹ配列が含まれる種々のペプチドで記憶学習機能・認知機

能に対する効果が見られたことから、ジペプチドＷＹはコア配列として作用するものと考えられる。実際にＷＹを含む８アミノ酸からなるペプチドに記憶学習機能・認知機能を増強する効果が見られることを確認している。したがって、少なくともＷＹをコア配列として含む２から８アミノ酸の長さのペプチド、また、本発明で効果が得られている最長のペプチドが１２アミノ酸からなるペプチドであることを鑑みると、ＷＹ配列を含む１２残基程度までの長さのペプチドであれば、記憶学習機能・認知機能の増強効果があるものと考えられる。

【００７１】

また、ＷＹというジペプチドがコア配列であると考えられることから、トリプトファンをＮ末に含むジペプチドに脳機能を増強する作用がある可能性がある。そこで、トリプトファンをＮ末に含むジペプチドを合成し、Ｙ字迷路試験を行い、脳機能への効果について調べた。

【００７２】

その結果、乳タンパク質に配列として含まれるトリプトファン‐チロシン（ＷＹ、配列番号１３）、トリプトファン－メチオニン（ＷＭ、配列番号１４）、トリプトファン－ロイシン（ＷＬ、配列番号１５）、トリプトファン‐バリン（ＷＶ、配列番号１６）の４つのジペプチドで濃度依存的な記憶学習機能・認知機能に対し増強効果があることが明らかとなった（図６）。

【００７３】

これに対し、配列番号１３、配列番号１４と同じアミノ酸組成であるものの、配列の異なるジペプチドであるチロシン-トリプトファン（ＹＷ）、メチオニン-トリプトファン（ＭＷ）には、記憶学習機能・認知機能に対して増強効果は見られなかった。また、トリプトファン単独（Ｗ）でも効果は見られなかった。

【００７４】

したがって、ＷＹ、ＷＭ、ＷＬ、ＷＶといったＮ末側にトリプトファンを含みＣ末側に疎水性アミノ酸が結合したジペプチドに記憶学習機能・認知機能増強効果が見られるものと考えられる。

【００７５】

ＷＹと同様に、合成ペプチドで記憶学習機能・認知機能増強効果が確認された他のジペプチドＷＭ、ＷＬ、ＷＶについてもＷＹ同様、コア配列として作用し、記憶学習機能・認知機能の増強効果があるものと考えられる。したがって、これらジペプチドを配列に含む２から１２アミノ酸の長さのペプチド、より典型的には２から８アミノ酸の長さのペプチドは、記憶学習機能・認知機能を増強するものと考えられる。

【００７６】

なお、Genbank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank）での検索によって、ホエイを構成するタンパク質中の上記ジペプチド配列の存在を確認したところ、β‐Lactoglobulin中にはＷＹ配列が１箇所、α‐Lactalbumin中にはＷＬ配列が２箇所、ＷＶ配列が１箇所存在し、ウシ、ヒツジ、ヤギの乳由来ホエイで共通であった。

【００７７】

[ホエイペプチドエキス中での各種ペプチドの脳機能効果への寄与率]

ホエイペプチドエキス中で各種ペプチドがどの程度効果発揮に寄与しているか以下の方法で確認した。

【００７８】

まず、１０％（ｗ/ｖ）のホエイタンパク質(フォンテラ社WPC472)水溶液に０．２％（ｗ/ｖ）の酵素剤(プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ)を添加して消化処理（５０度、５時間）した後、８０℃で３０分間酵素失活して、ホエイペプチドエキスを調製した。また、このホエイペプチドエキス中に含まれる各種ペプチドの濃度を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析装置（LC/MS/MS）で定量し、得られた濃度の情報をもとに合成ペプチドを用いてエキス組成物を再構成した。具体的には、表２に示す各配列のペプチドについて、ホエイペプチドエキス中の濃度と同濃度となるようにそれぞれに対応する合成ペプチドを

用い、それらを混合して、再構成エキス組成物を調製した。

【００７９】

このホエイペプチドエキスのマウスへの経口投与を１０ｍｇ／ｋｇとした以外は上記と同様にして、記憶学習機能・認知機能が増強されるかＹ迷路試験により解析を行った（エキス区）。また、再構成エキス組成物について、同様にして、記憶学習機能・認知機能が増強されるかＹ迷路試験により解析を行った（再構成区）。

【００８０】

【表２】

	ペプチド配列と濃度（mM）						
試験区	GTWY	KPTPEGDLEI	GYGGVSLP	WY	WE	WV	WL
エキス	0.62	0.11	0.3	0.19	0.05	0.08	0.14
再構成	0.63	0.15	0.26	0.19	0.02	0.08	0.15

【００８１】

その結果、図７に示すように、再構成区の場合もエキス区と同程度の効果がみられた。よって、これらペプチドがホエイペプチドエキスにおける主要な有効成分であると考えられた。

【００８２】

［カゼインペプチドエキスに含まれる記憶学習機能・認知機能の増強活性のあるペプチド］

乳に含まれるホエイ以外のタンパク質として、カゼインが含まれることが良く知られている。そこで、カゼイン（和光純薬工業株式会社製）を、上記表１に示した酵素剤のうち、アスペルギルス属菌由来の酵素剤であるプロテアーゼＭ「アマノ」ＳＤ（アマノＭと略記することもある。）で消化し、記憶学習機能・認知機能増強活性を有するペプチドの解析を行った。ホエイの場合と同様にして、カゼインをアマノＭで分解したペプチドエキスを、ＨＰＬＣで分画し、活性のある分画のアミノ酸配列を決定した。その結果、記憶学習機能・認知機能増強活性のあるペプチドとして、ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰ（配列番号１）、ＡＶＰＹＰ（配列番号６）、ＳＬＰＱ（配列番号９）、ＹＰＥ（配列番号１２）、ＷＹ（配列番号１３）、ＷＭ（配列番号１４）の６つの配列情報を得ることができた。

【００８３】

なお、カゼインをアスペルギルス属菌由来の酵素アマノＭで処理して得られるペプチドエキス中のジペプチドＷＭ、ＷＹは、上記で検討したトリプトファンをＮ末に有するジペプチドである。

【００８４】

そこで、これら配列情報からペプチドを合成し、合成ペプチドを用いてＹ字迷路試験により、記憶学習機能・認知機能の評価を行った。結果を図８に示す。いずれのペプチドも記憶学習機能・認知機能に対し増強効果があることが示された。なお、２つのジペプチドＷＹ、ＷＭについては、すでに解析結果を図６に示している。

【００８５】

次に、カゼイン分解産物より得られた配列番号１で表すペプチドＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰは、１２アミノ酸と比較的長いペプチドであることから、さらにトリプシン、キモトリプシンで切断される配列であるＥＭＰＦ、ＰＫ、ＰＶＥＰの３つのペプチドを合成し、各ペプチドを１μmol／ｋｇの量でマウスに投与しＹ字迷路試験を行った。

【００８６】

図９に示すように、ＥＭＰＦ、ＰＫ、ＰＶＥＰの３つのペプチドのうち、ＰＶＥＰに、もとのアミノ酸配列、ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰと同等の記憶学習機能に対する増強効果があったことから、ＰＶＥＰがコア配列であり、アミノ酸配列ＰＶＥＰを有する１２残基程度のペプチドは同等の効果を有すると推認される。以上、記憶学習機能・認知機能に増強効果のあるペプチドについて表３にまとめる。

【００８７】
【表３】

配列番号	アミノ酸配列
＃１	ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰ
＃２	ＫＰＴＰＥＧＤＬＥＩ
＃３	ＧＹＧＧＶＳＬＰ
＃４	ＶＡＧＴＷＹＳ
＃５	ＶＳＬＰＥＷ
＃６	ＡＶＰＹＰ
＃７	ＧＴＷＹ
＃８	ＴＷＹＳ
＃９	ＳＬＰＱ
＃１０	ＰＶＥＰ
＃１１	ＴＷＹ
＃１２	ＹＰＥ
＃１３	ＷＹ
＃１４	ＷＭ
＃１５	ＷＬ
＃１６	ＷＶ

【００８８】
以上のとおり、ホエイやカゼインのタンパク質加水分解物から、記憶学習機能及び／又は認知機能を増強する効果のある新規のペプチドの配列情報を得ることができた（配列番号１～１６）。そして、合成ペプチドを用いて、その効果を確認することができた。
【００８９】
［ミクログリアの貪食活性および抗炎症活性を増強するペプチドのスクリーニング方法］
以下の方法でミクログリアの貪食活性および抗炎症活性を増強するカゼインペプチドを単離同定した。
【００９０】
《ペプチド単離方法》
カゼインナトリウム（和光純薬工業社製）を食品添加プロテアーゼ、ペプチダーゼを用いて処理した。プロテアーゼ剤としては、ニューラーゼＦ３、プロテアーゼＭ「アマノ」ＳＤ、プロテアーゼＡ「アマノ」ＳＤ、プロテアーゼＰ「アマノ」３ＳＤ、プロチンＳＤ－ＮＹ１０，サモアーゼＰＣ１０Ｆ，プロチンＳＤ－ＡＹ１０、パパインＷ－４０、ブロメラインＦ、ペプチダーゼ剤としては、プロテアックス、ペプチダーゼＲ（天野エンザイム株式会社）を用いた。
【００９１】
カゼインナトリウムを上記の酵素で処理して得られた酵素反応液をＣ１８固相抽出カラムに供した。メタノール２０、４０、６０、８０％水溶液で段階的に溶出を行い、得られた分画を濃縮後、分取用ＨＰＬＣに供した。分離カラムにはＣ１８カラム（内径１０ｍｍ、長さ２５０ｍｍ、粒子系５μｍ）を用い、移動相にはＡ液；５％メタノール、Ｂ液；メタノールを用いて、流速５ｍｌ/ｍｉｎで、０分でＢ液０％、４０分でＢ液８０％のグラジエントによる溶出を行った。溶出液を複数の画分に分け、それぞれを濃縮、乾固した。各分画を少量のメタノールを含む溶液に再溶解させた後、分析用ＨＰＬＣに供して、細分画を行った。分離カラムにはＣ１８カラム（内径４．６ｍｍ、長さ２５０ｍｍ、粒子系５μｍ）を用い、移動相にはＡ液；０．１％ＴＦＡ、Ｂ液；０．１％ＴＦＡ、アセトニトリルを用いて、流速１ｍｌ/ｍｉｎで、０分でＢ液５％、３０分でＢ液２０％、４０分で２０

％、または０分でＢ液５％、３０分でＢ液８０％のグラジエントによる溶出を行った。検出はＵＶ２２０ｎｍで行った。分析によって得られた複数のピークを繰り返し分取することによって回収した。得られたそれぞれの画分は濃縮、乾固によってＴＦＡを除去し、少量のメタノールを含む溶液に再溶解させた。

【００９２】

これらのサンプルを、ミクログリアの貪食活性、抗炎症活性を指標とした評価系へ供し、活性の高い酵素処理品を得た。ミクログリアの単離、貪食活性、抗炎症活性の評価方法は以下の方法による。

【００９３】

《ミクログリアの単離》

マウスより摘出した脳をパパイン処理することにより、脳組織分散液を得る。酵素反応を停止後、ミクログリアはマイクロビーズによって磁性標識された汎ミクログリアマーカーであるＣＤ１１ｂ抗体（Miltenyi Biotec社製）と反応させ、ＭＡＣＳ法によって単離した。

【００９４】

《貪食活性の評価》

単離したミクログリアを種々のペプチドを添加した培地で１２時間培養する。その後、蛍光色素フルオレセイン（ＦＡＭ）で標識したアミロイドβ１－４２（AnaSpec社製）を培地に５００ｎＭの濃度で添加し、５時間培養後に上清を除き、トリパンブルーで細胞外の蛍光を消光させ、マイクロプレートリーダーでミクログリア内に取り込まれたアミロイドβの量を蛍光量として測定し、貪食活性の増強を評価した。

【００９５】

《抗炎症活性の評価》

単離したミクログリアを種々のペプチドを添加した培地で１２時間培養する。その後、５ｎｇ／ｍｌリポポリサッカライド(ＬＰＳ、SIGMA-ALDRICH社)及び０．５ｎｇ／ｍｌインターフェロンγ(ＩＦＮ-γ、R&D systems社)を添加して１２時間培養し、培養上清中に含まれるＴＮＦ－αをELISAキット(eBiosceince社)により定量した。

【００９６】

［ミクログリアの活性を増強するペプチドの単離、同定］

上記方法によって、ミクログリアの貪食活性の増強作用、抗炎症活性の増強作用を有する７種のペプチドを得た。すべての精製ペプチドについて、Ｎ末端アミノ酸配列分析を行い、アミノ酸配列を取得した。表４に取得したペプチドのアミノ酸配列を１文字表記で示す。

【００９７】

【表４】

配列番号	アミノ酸配列	図９，１０での表記
＃１	ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰ	ＣＭ１
＃１７	ＳＭＫＥＧＩＨＡＱＱ	ＣＭ２
＃６	ＡＶＰＹＰ	ＣＭ３
＃９	ＳＬＰＱ	ＣＭ４
＃１２	ＹＰＥ	ＣＭ５
＃１４	ＷＭ	ＣＭ６
＃１３	ＷＹ	ＣＭ７

【００９８】

［合成ペプチドによるミクログリアのアミロイドβ貪食活性］

次に、取得したアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し、ミクログリアの貪食活性を評価した。

【００９９】

単離したミクログリアは、０，１．２５，２．５μＭの合成ペプチド（ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰ、ＳＭＫＥＧＩＨＡＱＱ、ＡＶＰＹＰ、ＳＬＰＱ、ＹＰＥ、ＷＭ、ＷＹ）を添加した培地で１２時間前処理する。

【０１００】

上記と同様に前処理後、ＦＡＭで標識したアミロイドβ１－４２を培地に添加し細胞に取り込ませ、取り込まれたアミロイドβの量を蛍光量として測定し、貪食活性の増強を評価した。ミクログリアのアミロイドβ貪食を測定した結果を図１０に示す。なお、図１０では「ＣＭ１」がＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰの結果を示し、「ＣＭ２」がＳＭＫＥＧＩＨＡＱＱの結果を示し、「ＣＭ３」がＡＶＰＹＰの結果を示し、「ＣＭ４」がＳＬＰＱの結果を示し、「ＣＭ５」がＹＰＥの結果を示し、「ＣＭ６」がＷＭの結果を示し、「ＣＭ７」がＷＹの結果を示す。

【０１０１】

図１０から明らかなように、いずれのペプチドも１．２５μＭから濃度依存的にミクログリアの貪食活性を増強することが示された。

【０１０２】

［合成ペプチドによる抗炎症活性］

取得したアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し、抗炎症作用について評価した。単離したミクログリアを、０、２５、５０、１００μＭの合成ペプチド（ＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰ、ＳＭＫＥＧＩＨＡＱＱ、ＡＶＰＹＰ、ＳＬＰＱ、ＹＰＥ、ＷＭ、ＷＹ）を添加した培地で１２時間前処理する。その後は上記と同様に、ＬＰＳ及びＩＦＮ-γを培地に添加して、１２時間培養し、培養上清中に含まれるＴＮＦ－αをＥＬＩＳＡにより測定した。結果を図１１に示す。なお、図１１では「ＣＭ１」がＫＥＭＰＦＰＫＹＰＶＥＰの結果を示し、「ＣＭ２」がＳＭＫＥＧＩＨＡＱＱの結果を示し、「ＣＭ３」がＡＶＰＹＰの結果を示し、「ＣＭ４」がＳＬＰＱの結果を示し、「ＣＭ５」がＹＰＥの結果を示し、「ＣＭ６」がＷＭの結果を示し、「ＣＭ７」がＷＹの結果を示す。

【０１０３】

図１１に示すようにいずれのペプチドも２５μＭから濃度依存的に炎症性サイトカインであるＴＮＦ－αの産生を抑制することが確認でき、抗炎症作用の増強が認められ、特に配列番号１３のペプチド（図１１中「ＣＭ７」）、ＷＹは抗炎症作用が高いことが示された。

【０１０４】

以上のとおり、ホエイやカゼインのタンパク質加水分解物から、ミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性を増強する効果のある新規のペプチドの配列情報を得ることができた（配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７）。そして、合成ペプチドを用いて、その効果を確認することができた。

【０１０５】

なお、以上の試験では、脳内での蓄積がアルツハイマー病の原因とされているアミロイドβに対するミクログリアの貪食活性の増強を示したが、ミクログリアによる貪食対象物質はアミロイドβに限られるものではなく、古くなったシナプスや死細胞等の除去により、シナプス新生を促すことによる、認知機能の改善も期待することができると考えられた。

【０１０６】

また、ＬＰＳ刺激に対する応答としてのミクログリアによるＴＮＦ-αの産生抑制を示したが、炎症シグナルはＬＰＳに限定されるものではなく、内因性の炎症性因子、外来性の病原性因子などに起因する様々な炎症状態の緩和が期待できると考えられた。

【０１０７】

加齢に伴い脳内でアミロイドβなどの老廃物が沈着すると、脳内ではミクログリアによって炎症状態が惹起される。炎症により産生された活性酸素種や炎症性サイトカインは神経細胞にとってストレス因子となるため、一般的に脳内で生じる炎症状態は認知機能の低下が伴うことが知られている（非特許文献１６）。また神経組織における炎症状態は、認

知症に留まらず、うつ病、疼痛、慢性疲労とも密接に関連している。

【０１０８】

上記のように本発明によるペプチドは、ミクログリアの貪食活性を増強するとともに、抗炎症作用も備えていることから、脳内でミクログリアが炎症を惹起することなく、脳内の老廃物を除去して、認知機能の維持、向上及び改善に寄与することが期待される。

【０１０９】

[各種食品または食品素材に含まれるタンパク質のアミノ酸配列中での本発明ペプチド配列の有無]

配列番号１２～１６のペプチド配列が各種食品または食品素材に含まれるタンパク質のアミノ酸配列中に存在するか調べた。具体的には、下記表５に示す３４種類のタンパク質のアミノ酸配列中にそれらペプチドの配列が現れるかを調べた。

【０１１０】

【表５】

由来		タンパク質	配列番号
乳	カゼイン	α-S-1 Casein 214 aa protein	18
		β-Casein 224 aa protein	19
		κ-Casein 190 aa protein	20
		γ-Casein→β-Caseinの分解産物	—
		proteose peptone→β-Caseinの分解産物	—
	ホエイ	β-Lactoglobulin 178 aa protein	21
		α-Lactalbumin 142 aa protein	22
		LP: Lactoperoxidase 712 aa protein	23
		LF: Lactoferrin 708 aa protein	24
		免疫グロブリンH鎖→一部の配列のみ (Ig: Immunoglobulin) 164 aa protein	25
		免疫グロブリンL鎖一部の配列のみ (Ig: Immunoglobulin) 101 aa protein	26
	BSA	BOVIN Serum albumin 607 aa protein	27
大豆	グリシニン	SOYBN Glycinin 563 aa protein	28
	β-コングリシニン	Beta-conglycinin, alpha' chain 639 aa protein	29
		SOYBN Beta-conglycinin alpha-subunit 623 aa protein	30
		SOYBN Beta-conglycinin, beta chain 439 aa protein	31
小麦	グリアジン	WHEAT Alpha-gliadin (Fragment) 288 aa protein	32
		WHEAT Gamma-gliadin 302 aa protein	33
		WHEAT Alpha/beta-gliadin 331 aa protein	34
		WHEAT Omega-5 gliadin 439 aa protein	35
	グルテニン	WHEAT High-molecular-weight glutenin subunit 2.6 OS 1025 aa protein	36
		WHEAT Low molecular weight glutenin subunit OS 392 aa protein	37
卵黄	リポビテリン	Vitellogenin-1 (Minor vitellogenin) (Vitellogenin I) 1,912 aa protein	38
		Vitellogenin-2 (Major vitellogenin) 1850 aa protein	39
卵白	オボアルブミン	Ovalbumin (Allergen Gal d II) (Egg albumin) 386 aa protein	40
	オボトランスフェリン	Ovotransferrin (Gallus gallus, Chicken) 738 aa protein	41
	オボムコイド	Ovomucoid (Allergen Gal d I) (allergen Gal d 1) 210 aa protein	42
	オボムチン	Mucin-5B (Ovomucin, alpha-subunit) 2108 aa protein	43
	オボムチン	Mucin-6 (Ovomucin, beta-subunit) Gallus gallus (Chicken) 1185 aa protein	44
	リゾチウム	Lysozyme g Gallus gallus (Chicken) 211 aa protein	45
		Lysozyme C 147 aa protein	46
チキン	コラーゲン	Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen) chicken 1453 aa protein	47
		CHICK Collagen alpha-1(II) chain (Fragment) 369 aa protein	48
		CHICK Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) 1362 aa protein	49

【０１１１】

表６～表８に、各種食品または食品素材に含まれるタンパク質のアミノ酸配列中での本発明ペプチド配列の出現有無の結果を示す。なお、γ-Casein及びproteose peptoneはβ-Caseinの分解産物であることから、β-Caseinに出現が確認されたジペプチドについてはγ-Casein及びproteose peptoneにおいても出現している可能性があると考えられる。

【０１１２】

【表６】

配列番号	ペプチド	由来	乳											
			カゼイン					ホエイ						BSA
		タンパク質名	α-S-1 Casein 214 aa protein	β-Casein 224 aa protein	κ-Casein 190 aa protein	γ-Casein →β-Casein の分解産物	proteose peptone →β-Casein の分解産物	β-Lactoglobulin 178 aa protein	α-Lactalbumin 142 aa protein	LP: Lactoperoxidase 712 aa protein	LF: Lactoferrin 708 aa protein	免疫グロブリンH鎖→一部の配列のみ (Ig: Immunoglobulin) 164 aa protein	免疫グロブリンL鎖一部の配列のみ (Ig: Immunoglobulin) 101 aa protein	BOVIN Serum albumin 607 aa protein
12	YPE		○	−	−			−	−	−	−	−	−	−
13	WY		○	−	−			○	−	−	−	−	○	−
14	WM		−	○	−			−	−	−	−	−	−	−
15	WL		−	−	−			−	○	○	−	−	−	−
16	WV		−	−	−			−	○	○	○	○	−	○

【０１１３】

【表７】

配列番号	ペプチド	由来	大豆				小麦					
			グリシニン	β-コングリシニン			グリアジン				グルテニン	
		タンパク質名	SOYBN Glycinin 563 aa protein	Beta-conglycinin, alpha' chain 639 aa protein	SOYBN Beta-conglycinin alpha-subunit 623 aa protein	SOYBN Beta-conglycinin, beta chain 439 aa protein	WHEAT Alpha-gliadin (Fragment) 288 aa protein	WHEAT Gamma-gliadin 302 aa protein	WHEAT Alpha/beta-gliadin 331 aa protein	WHEAT Omega-5 gliadin 439 aa protein	WHEAT High-molecular-weight glutenin subunit 2.6 OS 1025 aa protein	WHEAT Low molecular weight glutenin subunit OS 392 aa protein
12	YPE		○	−	−	−	−	−	−	−	−	−
13	WY		−	−	−	−	−	−	−	−	○	−
14	WM		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
15	WL		−	−	−	−	−	−	−	−	○	−
16	WV		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

【０１１４】

【表８】

配列番号	ペプチド	由来	卵黄		卵白						チキン		
			リポビテリン		オボアルブミン	オボトランスフェリン	オボムコイド	オボムチン	オボムチン	リゾチウム	コラーゲン		
		タンパク質名	Vitellogenin-1 (Minor vitellogenin) (Vitellogenin I) 1,912 aa protein	Vitellogenin-2 (Major vitellogenin) 1850 aa protein	Ovalbumin (Allergen Gal d II) (Egg albumin) 386 aa protein	Ovotransferrin (Gallus gallus, Chicken) 738 aa protein	Ovomucoid (Allergen Gal d I) (allergen Gal d 1) 210 aa protein	Mucin-5B (Ovomucin, alpha-subunit) 2108 aa protein	Mucin-6 (Ovomucin, beta-subunit) Gallus gallus (Chicken) 1185 aa protein	Lysozyme g Gallus gallus (Chicken) 211 aa protein	Lysozyme C 147 aa protein	Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen) chicken 1453 aa protein	CHICK Collagen alpha-1(II) chain (Fragment) 369 aa protein	CHICK Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) 1362 aa protein
12	YPE		−	−	−	−	−	○	−	−	−	○	−	−
13	WY		○	−	−	−	−	−	−	−	−	○	−	○
14	WM		○	○	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
15	WL		−	○	−	○	−	−	−	−	−	−	−	−
16	WV		○	−	○	−	−	−	−	−	○	−	−	−

【０１１５】

その結果、配列番号１２～１６のペプチド配列のうち少なくとも１種が、上記６種類の食品中に含まれるタンパク質のうち少なくとも１種に含まれることがわかり、それらタン

パク質や、それらを含む食品や食品素材を酸加水分解やプロテアーゼによる酵素処理、又は微生物発酵等に供することで、上記ペプチドが生成することが確認された。

【０１１６】

[本発明の組成物を含有する飲料の製造]

上記同様に調製したホエイペプチドエキスを用いてコーヒー飲料および果汁飲料を製造した。各飲料組成および製法は表９及び表１０に示す。

【０１１７】

【表９】

コーヒー飲料	100gあたり
ホエイペプチドエキス	100mg
コーヒー抽出液(中挽きのコーヒー豆100gを95℃の湯１Ｌで抽出して得られたもの)	80mL
砂糖	10g
炭酸水素ナトリウム	100mg
イオン交換水	適量
※250mlスチール缶に分注し窒素充填後、121℃・10分間殺菌を行う。	

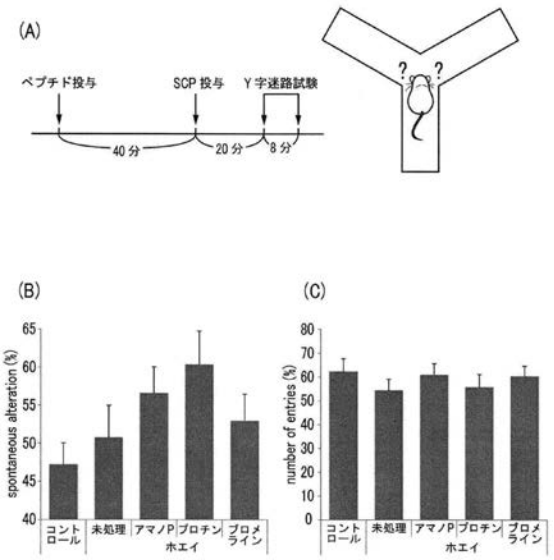
【０１１８】

【表１０】

果汁飲料	100gあたり
ホエイペプチドエキス	100mg
5倍濃縮みかん果汁	20g
イオン交換水	適量
※容器詰めし、65℃・10分間殺菌を行う。	

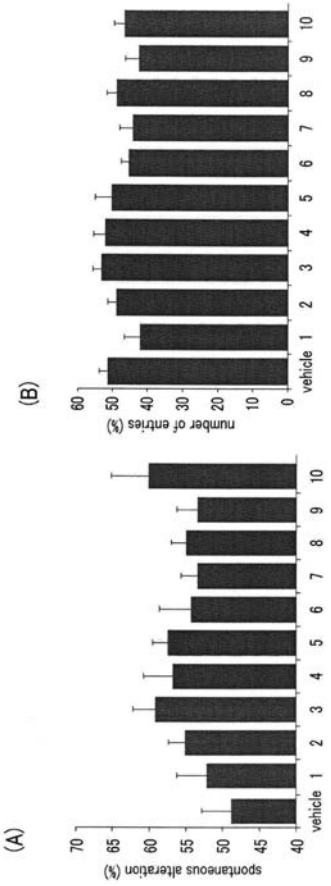
【図１】

FIG.1



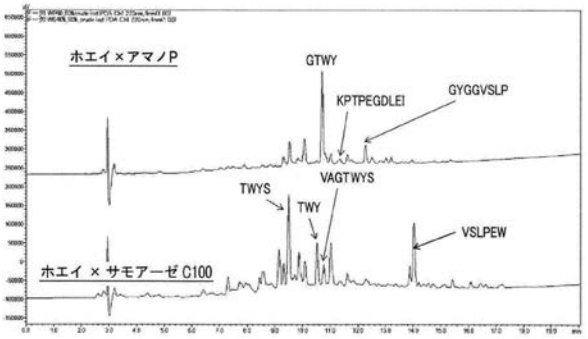
【図２】

FIG.2



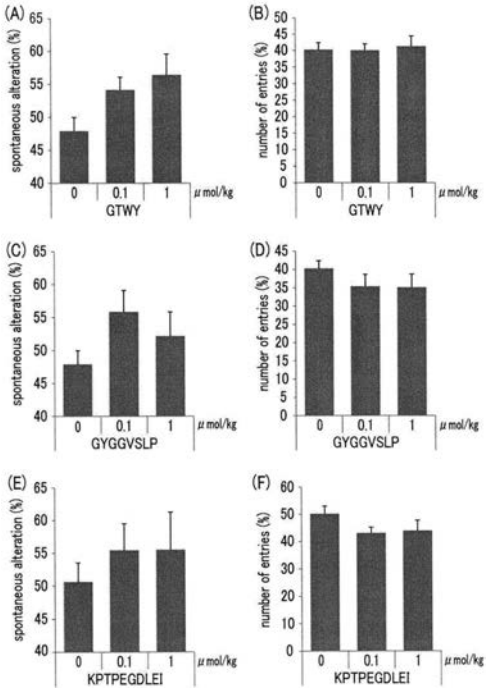
【図３】

FIG.3

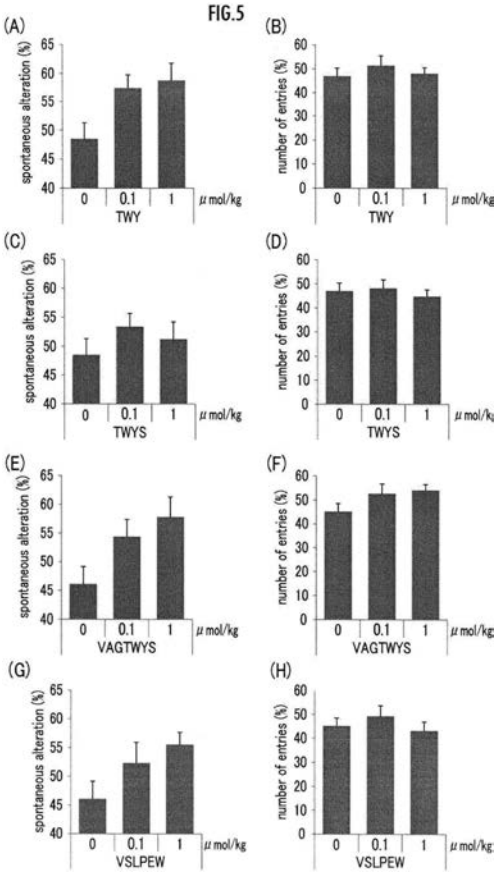


【図４】

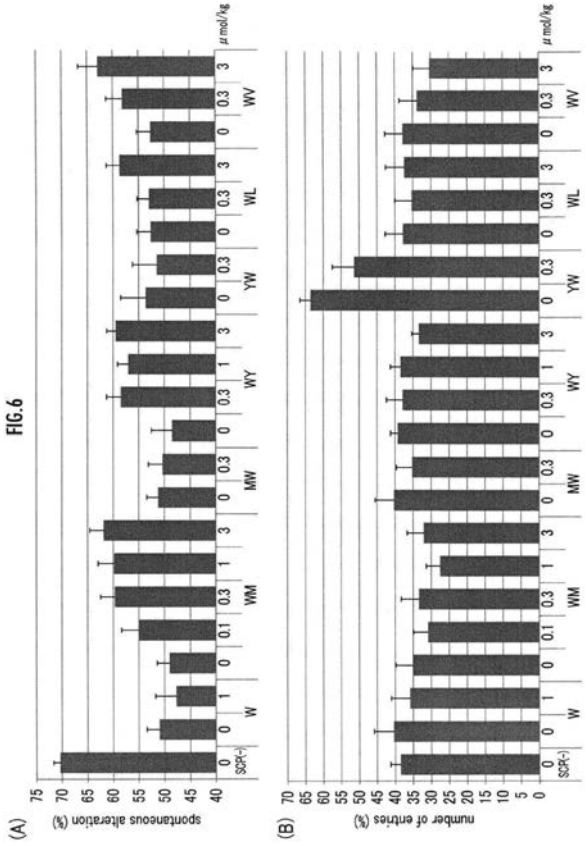
FIG.4



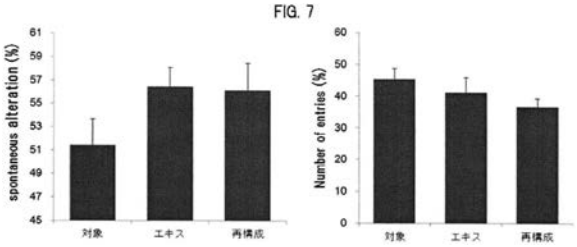
【図５】


FIG.5
(A)
spontaneous alteration (%)
TWY
(B)
number of entries (%)
TWY
(C)
TWYS
(D)
TWYS
(E)
VAGTWYS
(F)
VAGTWYS
(G)
VSLPEW
(H)
VSLPEW
μmol/kg

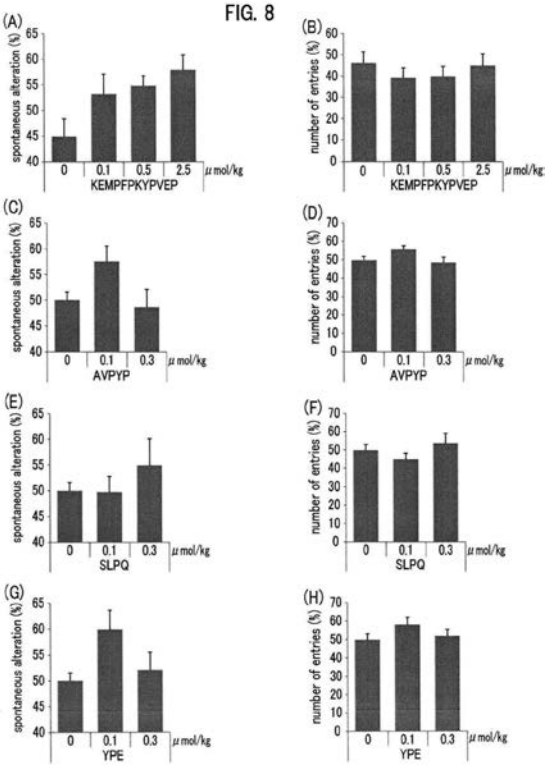
【図６】


FIG.6
(A)
spontaneous alteration (%)
(B)
number of entries (%)
μmol/kg
WV
WL
YW
WY
MW
WM
W
SCR(-)

【図７】

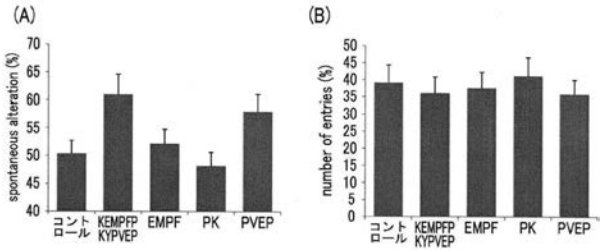

FIG. 7
spontaneous alteration (%)
Number of entries (%)
対象
エキス
再構成

【図８】


FIG. 8
(A)
spontaneous alteration (%)
KEMPFPKYPVEP
(B)
number of entries (%)
KEMPFPKYPVEP
(C)
AVPYP
(D)
AVPYP
(E)
SLPQ
(F)
SLPQ
(G)
YPE
(H)
YPE
μmol/kg

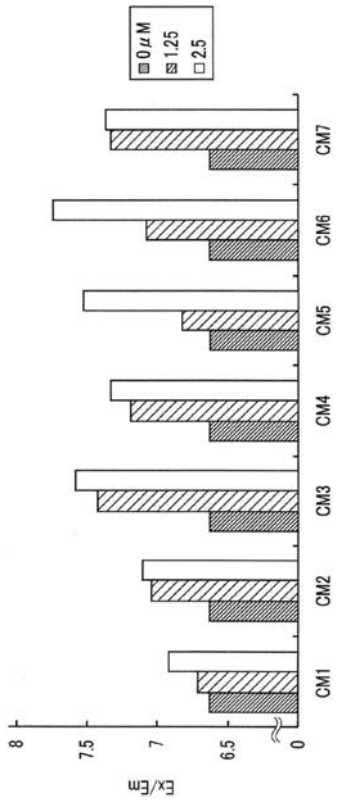
【図９】

FIG. 9



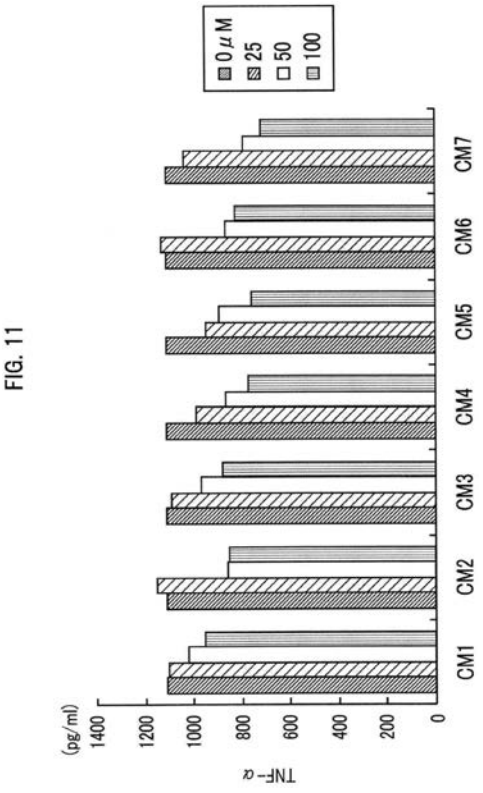
【図１０】

FIG. 10



【図１１】

FIG. 11



【配列表】
2017008104000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年10月5日(2016.10.5)
【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】
記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための組成物であって、配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする組成物。
【請求項２】
前記ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１～１６のいずれか一つのアミノ酸配列である請求項１記載の組成物。
【請求項３】
記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための食品である、請求項１又は２記載の組成物。
【請求項４】
記憶学習機能及び／又は認知機能を増強するための医薬である、請求項１又は２記載の組成物。
【請求項５】
前記ペプチドが、食品又は食品素材中に含まれるタンパク質の加水分解によって生成したものである、請求項１～４のいずれか１つに記載の組成物
【請求項６】
前記ペプチドが、乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材を微生物由来の酵素剤で酵素処理することによって得られたものである、請求項１～５のいずれか１つに記載の組成物。
【請求項７】
前記乳タンパク質又はそれを含有する食品もしくは食品素材が、ホエイ又はカゼインである請求項６記載の組成物。
【請求項８】
前記酵素剤が、アスペルギルス属菌由来の酵素、バチルス属菌由来の酵素、及びリゾプス属菌由来の酵素からなる群から選ばれた１種又は２種以上の酵素を含むものである請求項６又は７記載の組成物。
【請求項９】
ミクログリアの貪食活性及び／又は抗炎症活性を増強するための組成物であって、配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらの薬学上許容される塩もしくは溶媒和物を含有することを特徴とする組成物。
【請求項１０】
前記ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１、６、９、１２、１３、１４、１７のいずれか一つのアミノ酸配列である請求項９記載の組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A23L	*33/18*	*(2016.01)*	A61P	43/00	105	4H045
A23L	*2/66*	*(2006.01)*	A23L	33/18		
A23L	*2/02*	*(2006.01)*	A23L	2/00	J	
A23L	*2/52*	*(2006.01)*	A23L	2/02	B	
A23F	*5/24*	*(2006.01)*	A23L	2/00	F	
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	A23F	5/24		
C07K	*7/08*	*(2006.01)*	C07K	7/06	ZNA	
C07K	*5/10*	*(2006.01)*	C07K	7/08		
C07K	*5/117*	*(2006.01)*	C07K	5/10		
C07K	*5/08*	*(2006.01)*	C07K	5/117		
C07K	*5/087*	*(2006.01)*	C07K	5/08		
C07K	*5/06*	*(2006.01)*	C07K	5/087		
C07K	*5/12*	*(2006.01)*	C07K	5/06		
			C07K	5/12		

Fターム(参考) 4B117 LC04 LG02 LG05 LK15 LK18 LP06
4C084 AA02 AA03 AA06 BA01 BA08 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18
BA43 CA38 DC50 MA01 NA14 ZA15 ZB11 ZB21
4C087 AA01 AA02 AA03 BB39 CA07 CA46 MA01 NA14 ZA15 ZB11
ZB21
4H045 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 CA43 EA01 EA20
FA16 FA70 GA25