

(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2005-220091

(P2005-220091A)

(43) 公開日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int.Cl.⁷**C07K 7/06****A23J 1/02****A23L 1/30****A61K 35/34****A61K 38/55**

F I

C O 7 K 7/06

A 2 3 J 1/02

A 2 3 L 1/30

A 6 1 K 35/34

A 6 1 P 9/12

Z N A

A

テーマコード (参考)

4 B O 1 8

4 C O 8 4

4 C O 8 7

4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-30816 (P2004-30816)

(22) 出願日 平成16年2月6日(2004.2.6)

(71) 出願人 591105801

丸大食品株式会社

大阪府高槻市緑町2-1-3

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74) 代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74) 代理人 100086427

弁理士 小原 健志

(74) 代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

(74) 代理人 100105821

弁理士 藤井 淳

(74) 代理人 100099911

弁理士 関 仁士

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、豚肉由来の機能性成分として、高血圧予防効果が期待されるアンギオテンシン変換酵素(A C E)阻害ペプチドを提供することである。

【解決手段】豚肉由来のタンパク質から抽出したミオシンBをペプシンで加水分解し、アンギオテンシン変換酵素(A C E)阻害ペプチドを得る。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式で示されるポリペプチド：

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r 。

【請求項 2】

以下の 4 種のペプチドのいずれかからなるアンギオテンシン変換酵素阻害剤：

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r 。

10

【請求項 3】

食肉由来のミオシン B 素材をペプシンで加水分解することを特徴とするアンギオテンシン変換酵素阻害剤の製造法。

【請求項 4】

アンギオテンシン変換酵素阻害剤が L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r である請求項 3 の製造法。

【請求項 5】

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r

20

からなる群より選択される少なくとも 1 種のペプチドを含む高血圧予防用食品。

【請求項 6】

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r

からなる群より選択される少なくとも 1 種のペプチドを含む降圧剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、アンギオテンシン変換酵素阻害剤等として有用なペプチド、さらに該ペプチドを含む高血圧予防用食品および降圧剤に関する。

【背景技術】

【0002】

アンギオテンシン変換酵素（ACE）は主にヒトの血管の内皮細胞、肺、腎臓及び脳に存在する。この酵素は、血管の収縮を引き起こし、血圧を上昇させるために、C 末端から 2 つのアミノ酸（His - Leu）を切断することにより、不活性なアンギオテンシン I を活性なアンギオテンシン II に変換し得る。したがって、ACE は血圧を上昇させることができる。

40

【0003】

アンギオテンシン変換酵素阻害剤（ACEI）の ACE への結合はアンギオテンシン II の生成を減少し得る。ACEI を食品に加えると、高血圧症状を減少させるのにプラスの効果を引き起こすであろう。現在のところ、多くのペプチドが ACE の阻害についての効果を有することが知られている（特許文献 1 ～ 6）。それらは異なったアミノ酸配列と長さを有する。

【特許文献 1】特開 2001 - 233898 号公報

【特許文献 2】特開 2001 - 233895 号公報

【特許文献 3】特許第 3465922 号

【特許文献 4】特許第 3474610 号

50

【特許文献5】特開平5 - 238946号公報

【特許文献6】特開平4 - 95099号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、本発明は、食肉（特に豚肉）由来の機能性成分として、高血圧予防効果が期待されるアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドを提供することを主な課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

10

本発明は、食肉由来の新規なアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドを見出した。

【0006】

本発明は、以下の項1～6の活性ペプチド、アンギオテンシン変換酵素阻害剤ならびにその製造法、高血圧予防用食品および降圧剤に関する。

項1． 下記式で示されるポリペプチド：

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r 。

項2． 以下の4種のペプチドのいずれかからなるアンギオテンシン変換酵素阻害剤：

L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

20

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r 。

項3． 食肉由来のミオシンB素材をペプシンで加水分解することを特徴とするアンギオテンシン変換酵素阻害剤の製造法。

項4． アンギオテンシン変換酵素阻害剤が L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r である項3の製造法。

項5． L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r

30

からなる群より選択される少なくとも1種のペプチドを含む高血圧予防用食品。

項6． L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r ；

V a l - I l e - G l n - T y r ；

I l e - G l n - T y r ；及び

G l n - T y r

からなる群より選択される少なくとも1種のペプチドを含む降圧剤。

【0007】

本発明のペプチドは、食肉由来の安全なタンパク質（ミオシンB）をペプシンで分解したペプチドなので、長期摂取しても安定性の高いものである。

【0008】

40

本発明のペプチド L y s - A r g - V a l - I l e - G l n - T y r （KRVIQY）は、食肉由来のタンパク質から抽出したミオシンBをペプシンで加水分解することによって得られる。また、ペプチドKRVIQYの部分構造ペプチドは、Fmoc固相合成などの公知の方法に従い合成できる。

【0009】

以下、食肉として豚肉を例にとり説明するが、豚肉以外の食肉（牛肉、馬肉、魚肉、鶏肉など）についても同様に実施することができる。

【0010】

本発明のペプチドKRVIQYは、ミオシンBのペプシン加水分解生成物を、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相HPLCなどを組み合わせて精製するこ

50

とにより得られる。

【0011】

本発明のペプチドとしては、ブタミオシンBのペプシン分解物またはその分画もしくは濃縮分画が使用され得る。

【0012】

本発明の製造法において、豚肉由来のタンパク質から抽出することができるミオシンBをペプシンで加水分解すると、ACE阻害活性を有するペプチドLys - Arg - Val - Ile - Gln - Tyr (KRVIQY)が生成することが見出された。このペプチドは、骨格筋ミオシン重鎖の190-195位由来と認められた。

【0013】

本発明の製造法において、ミオシンBは、肉の3倍量の高濃度塩溶液(0.6M KClなど)で豚肉由来のタンパク質から0~20で抽出され得る。また、ミオシンBの抽出時間は、5分~120時間であり得る。ミオシンBは、ミオシン、アクチン、トロポミオシン、トロポニンの複合体であり得る。

【0014】

本発明の製造法において、本発明のペプチドは、ペプシンを用いて、ミオシンBをpH1~4で25~45で5分~72時間加水分解することによって生成され得る。使用されるペプシンとしては、ブタペプシン、ウシペプシン、ヒトペプシンなどが挙げられ得る。

【0015】

本発明の製造法において、ペプシンによるミオシンBのタンパク分解混合物を使用可能とするために、脱塩処理が行われ得る。脱塩処理は、ゲルろ過クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーなどによって行われ得る。

【0016】

本発明のペプチドは、高血圧予防用食品または降圧剤中に含まれ得る。

【0017】

本発明のペプチドを含む高血圧予防用食品または降圧剤は、高血圧を予防するために投与され得る。

【0018】

本発明のペプチドを含む高血圧予防用食品または降圧剤は、投与される場合、血圧を穏やかに低下させ得る。

【0019】

本発明のペプチドを含む高血圧予防用食品または降圧剤は、投与される場合、血圧の低下を長期間、好ましくは48時間、維持し得る。

【0020】

本発明のペプチドを含む高血圧予防用食品または降圧剤は、投与される場合、乾咳などの副作用が実質的にないことが期待される。

【0021】

本発明の降圧剤の形態としては、経口製剤、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、丸剤等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの製剤には、有効成分(ブタミオシンBのペプシン分解物またはその分画もしくは濃縮分画)の他に医薬の分野で通常使用される賦形剤、希釈剤、担体などが適宜含まれ得る。

【0022】

本発明の降圧剤の用法用量は、患者の症状、年齢、体重などによって異なるが、例えばポリペプチドとして成人1日当たり乾燥重量で0.1mg~10g、好ましくは1mg~100mgを1回もしくは2回以上に分けて投与する。

【0023】

本発明の高血圧予防用食品は、固形または半固形状であってもよいし、液状(飲料)であってもよい。該食品には、上記有効成分(ブタミオシンBのペプシン分解物またはその分画もしくは濃縮分画)が配合される。高血圧予防用食品に対する本発明のペプチドの配

10

20

30

40

50

合割合は、高血圧予防用食品の形態、素材によって異なり、通常 0.0001 ~ 50 重量 % 程度を含有する。本発明のペプチドの 1 日の摂取量としてトータルで、成人 1 日当たり、乾燥重量で 0.1 mg ~ 10 g、好ましくは 1 mg ~ 100 mg である。

【0024】

本発明の高血圧予防用食品は、本発明のペプチドのみから構成されていてもよいが、通常は他の食品とともに既存の食品の形態で製造される。具体的な食品としては、ハム、ウインナー、惣菜、粉末飲料、キャンディー、老人用食品等が挙げられる。

【0025】

本発明の高血圧予防用食品は、正常高値（収縮期血圧 130 ~ 139 mmHg、拡張期血圧 85 ~ 89 mmHg）、軽症高血圧（収縮期血圧 140 ~ 159 mmHg、拡張期血圧 90 ~ 99 mmHg）のヒトに投与したときに、有効に血圧を低下させることができる。

10

【発明の効果】

【0026】

本発明により、豚肉タンパク質由来の新規なアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドを提供することができる。

【0027】

KRVIQYは有原らが報告したミオシン由来ペプチド（Meat Science, 57: 319-324, 2001）よりも強いACE阻害活性を示し、これまでに報告されている動物筋肉食品由来のACE阻害ペプチドの中で最も強い活性を示した。

20

【0028】

一般的にジペプチドもしくはトリペプチドなどの小さなペプチドのみが、腸管から吸収される（Adibi et al. Clinical research, 17: 376, 1969）とされているが、一方では、Pappenheimer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 1942-1945, 1994) はオクタペプチドが細胞間隙経路で腸管から吸収されることを示している。Shimizu et al. (Peptides, 18: 681-687, 1997) は疎水性ノナペプチドが経細胞輸送により上皮細胞を通過することを明らかにしている。さらにSatake et al. (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66: 378-384, 2002)は消化酵素に対する耐性が高く腸管内に長時間滞留するペプチドの場合は、なんらかのトランスポート機能を利用して吸収される可能性を示唆している。これらのことから、本発明による新規ACE阻害ペプチドKRVIQYも腸管から吸収される可能性があると考えられる。すなわち、KRVIQYが腸管から吸収されて、ACE阻害剤として有効に機能する可能性が期待される。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

下記実施例において、より具体的に本発明を説明する。

【0030】

以下実施例において測定されたACEに対する50%阻害活性（IC₅₀）は、ウサギ肺由来のACEに対するもので、Cushman -Cheungの方法（Biochemical Pharmacology, 20: 1637-1648, 1971）で測定した。

40

【0031】

実施例 1

国産の豚ロース肉からWeber-Edsall溶液（0.6 M KCl、0.04 M 炭酸水素ナトリウム、0.01 M 炭酸ナトリウム）で抽出したミオシンBをブタペプシンで、pH 2で37℃で6時間加水分解した。このミオシンBのペプシン加水分解物のウサギ肺由来のACEに対するIC₅₀は19.3 μg/mlであった。未加水分解ミオシンBにはACE阻害活性が認められなかったことから、活性の発現はペプシン分解で生じたペプチドに由来することが分かった。そこで、この加水分解物からのACE阻害ペプチドの単離を検討した。

【0032】

該加水分解物をまず、Superdex30 prep grade（アマシャムバイオサイエンス社製）を

50

用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供した。すなわち、バッファー（20 mM 酢酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 6）で該加水分解物をアプライし、同バッファーで溶出した（図 1）。流速は0.45 ml/分とし、6分毎(2.7 ml)に分画した。得られた画分をそれぞれ濃縮して、その活性を測定した。ここで得られた最も活性の高い画分（画分No.56）をInertsil ODS-2（ジーエルサイエンス社製）を用いる逆相HPLCに供し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含むアセトニトリルの0-50%のグラジエント溶出(流速0.5 ml/分)で分画した。これ以降のHPLCでは225 nmの吸光度をモニターした。活性画分はさらに、同じカラムで0.1%TFAを含むアセトニトリルの10-24%のグラジエント溶出(流速0.5 ml/分)で分画した。ここで得られた活性画分をCOSMOSIL 5PE-MS（ナカライテスク社製）を用いる逆相HPLCに供して、精製を数回行った。溶出は、まず0.1%TFAを含むアセトニトリル濃度13%のイソクラティック溶出（流速0.1 ml/min）で行った（図 2）。ここで得られた活性の高い画分をさらに、アセトニトリル濃度10%（流速0.1 ml/min）、8%（流速0.3 ml/min）、7%（流速0.5 ml/min）、6%（流速0.5 ml/min）と段階的に低い濃度でイソクラティック溶出を行い、単一と思われる画分を得た。

10

【0033】

精製で得られた画分のアミノ酸配列を、G1000A型プロテインシーケンサー（Hewlett Packard社製）でシーケンス解析した。得られたペプチドは骨格筋ミオシン重鎖の190位から195位にあたるKRVIQYであると認められた。これはこれまでに報告のない、新規なACE阻害ペプチドであった。KRVIQYのACE阻害活性は6.1 μ Mであり、これまでに報告されている豚肉タンパク質由来ペプチドの中で最も強いACE阻害活性を示した。

20

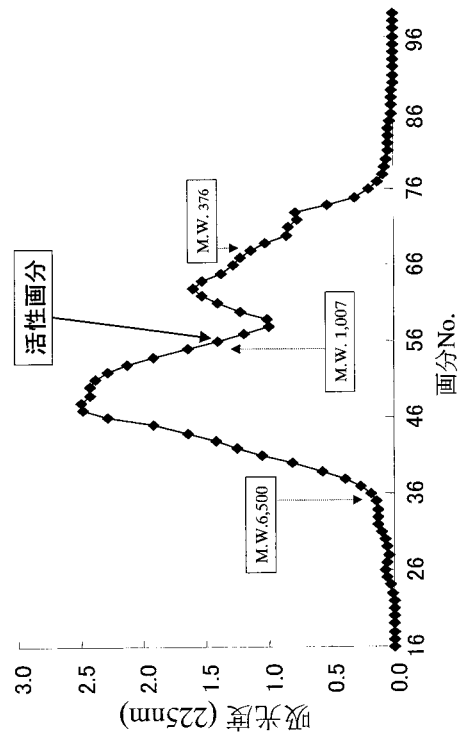
【図面の簡単な説明】

【0034】

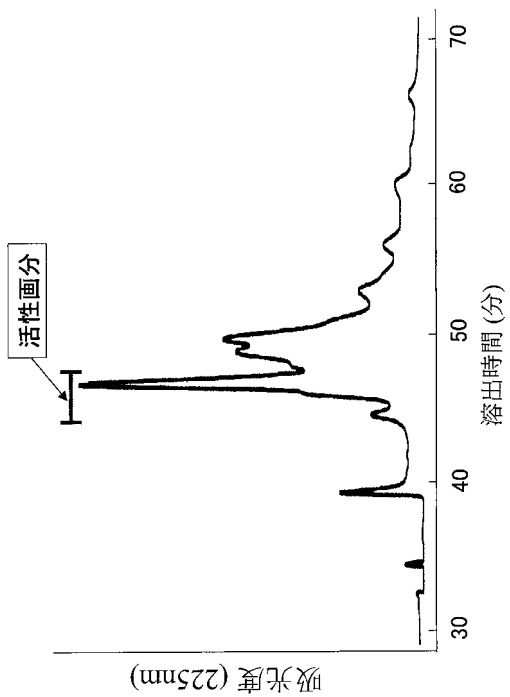
【図 1】豚ミオシン B のペプシン加水分解物を試料とするゲル濾過クロマトグラフィーを行った際に得られたクロマトグラムを示す図である。

【図 2】図 1 に示される活性画分をInertsil ODS-2を用いる逆相HPLCに二度供して得られた活性画分を、更にCOSMOSIL 5PE-MSを用いる逆相HPLCに供した際のクロマトグラムを示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2005220091000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 5/083	
C 0 7 K 5/083	C 0 7 K 5/103	
C 0 7 K 5/103	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 N 9/99	A 6 1 K 37/64	

(74)代理人 100108084

弁理士 中野 睦子

(72)発明者 片山 員典

大阪府高槻市緑町 2 1 - 3 丸大食品株式会社中央研究所内

(72)発明者 府中 英孝

大阪府高槻市緑町 2 1 - 3 丸大食品株式会社中央研究所内

(72)発明者 杉山 雅昭

大阪府高槻市緑町 2 1 - 3 丸大食品株式会社中央研究所内

(72)発明者 六車 三治男

宮崎県宮崎郡清武町木原 5 6 0 0 番地 宮崎医科大学宿舎 E - 4 0 5

F ターム(参考) 4B018 MD20 MD70 ME04 MF12

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA14 BA15 BA16 BA17 BA23 CA21

DC40 MA01 NA14 ZA422 ZC202

4C087 BB47 CA06 CA16 MA01 NA14 ZA42 ZC20

4H045 AA10 AA20 AA30 BA12 BA13 CA40 DA57 EA23 FA70