

(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2011-102300

(P2011-102300A)

(43) 公開日 平成23年5月26日(2011.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 5/06 (2006.01)	C07K 5/06	4B018
C12N 9/99 (2006.01)	C12N 9/99 ZNA	4B050
A61K 36/899 (2006.01)	A61K 35/78 U	4C088
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4H045
A61P 9/12 (2006.01)	A61P 9/12	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-264688 (P2010-264688)
 (22) 出願日 平成22年11月29日(2010.11.29)
 (62) 分割の表示 特願2008-132814 (P2008-132814) の分割
 原出願日 平成20年5月21日(2008.5.21)
 (11) 特許番号 特許第4686792号 (P4686792)
 (45) 特許公報発行日 平成23年5月25日(2011.5.25)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-196206 (P2007-196206)
 (32) 優先日 平成19年7月27日(2007.7.27)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(71) 出願人 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (74) 代理人 100086221
 弁理士 矢野 裕也
 (72) 発明者 野方 洋一
 広島県福山市西深津町六丁目12番1号
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター内
 Fターム(参考) 4B018 MD49 ME14 MF01 MF12 MF14
 4B050 CC07 DD11 GG02 KK11 LL01
 4C088 AB74 AC04 CA14 CA30 MA52
 NA14 ZA42

特許法第30条第1項適用申請有り 平成20年3月5日 社団法人 日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会2008年度(平成20年度)大会講演要旨集」に発表

最終頁に続く

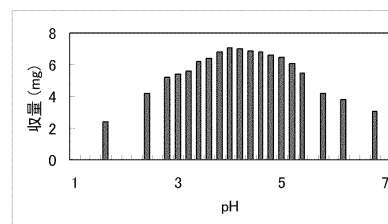
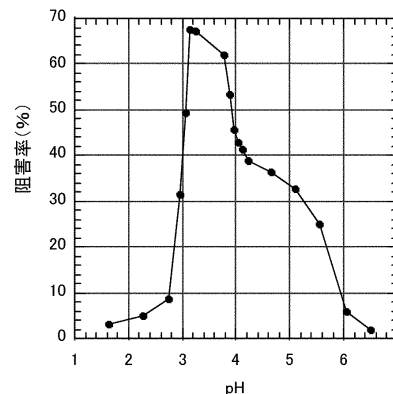
(54) 【発明の名称】 小麦ふすま、大麦糠、米糠からのアンジオテンシンI変換酵素阻害剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】小麦ふすま、大麦糠、米糠から、プロテアーゼやアミラーゼを添加することなく、しかも人体に有害な物質を添加することなく、しかも経済的、且つ効率よく、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性、並びに、血圧降下機能を有する有効成分を提供する。

【解決手段】小麦ふすまを含む小麦種子粉末、少なくとも大麦糠を含む大麦種子粉末、及び少なくとも米糠を含む米種子粉末よりなる群から選ばれた少なくとも1種の粉末原料を；水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の当該水又は緩衝液のpHを3.05~3.95とし、30~45の温度で、少なくとも4時間以上内在性プロテアーゼの作用により貯蔵タンパク質を分解反応させ、；得られた反応物を有効成分として含有してなることを特徴とする、アンジオテンシンI変換酵素阻害剤、並びに、前記アンジオテンシンI変換酵素阻害剤を含有してなる血圧降下作用を有する医薬を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも小麦ふすまを含む小麦種子粉末、少なくとも大麦糠を含む大麦種子粉末、及び少なくとも米糠を含む米種子粉末よりなる群から選ばれた少なくとも 1 種の粉末原料を、
 ; 水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の当該水又は緩衝液の pH を 3.05 ~ 3.95 とし、30 ~ 45 の温度で、少なくとも 4 時間以上内在性プロテアーゼの作用により貯蔵タンパク質を分解反応させ、
 ; 得られた反応物を有効成分として含有してなることを特徴とする、アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

【請求項 2】

前記小麦種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない小麦ふすま粉末であり、且つ、前記大麦種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない大麦糠粉末であり、且つ、前記米種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない米糠粉末である、請求項 1 に記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

10

【請求項 3】

前記添加混合前に、ヘキサンを用いて前記粉末原料を脱脂処理する、請求項 1 又は 2 に記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

【請求項 4】

前記粉末原料として、予め水又は緩衝液からなる洗浄液に添加混合し、当該添加混合後の洗浄液の pH を 3.0 ~ 7.0 とし、0 ~ 28 の温度で 5 ~ 30 分間浸漬した後に上清を除去したものをを用いる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

20

【請求項 5】

前記反応後、得られた反応液を、ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィにより精製処理する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィによる精製処理において、前記反応液を ODS カラムに通液し吸着させた後、10 ~ 25 % エタノールもしくは 10 ~ 25 % アセトニトリルで溶出し回収する、請求項 5 に記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 に記載のアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤を含有してなることを特徴とする、血圧降下作用を有する医薬。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、小麦ふすま、大麦糠、米糠からの新規血圧降下ペプチドとその製造方法に関し、詳しくは血圧上昇に関与するアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有すると共に、血圧降下機能を有する、新規ポリペプチドとその製造方法とに関する。

【背景技術】

【0002】

食品加工廃棄物の処理は、食品産業の抱える大きな問題である。廃棄物のうち有用なものの再利用を求めるために、「食品循環資源の再利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）」が制定された（2000年6月公布、2001年5月施行）。

40

これに応じて、各食品メーカーは、食品廃棄物からメタンガス、液肥、化粧品、食品添加剤、機能性食品等、商品性のある素材の生産に着手している。

小麦ふすまや米糠は、一次加工の副産物であり、ふすまは年間およそ 130 万トン、米糠は 80 ~ 90 万トンもの生産量がある。

これらは家畜飼料、米油、キノコの苗床等の利用に留まり、多くは廃棄されることから、有効な利用法の開発が求められている。

最近、ホールグレイン（全粒穀物）の価値が見直され、従来は廃棄の対象であったふすまや糠の部分を含む全粒穀物が食材として注目されるようになった。その背景には胚芽や

50

種皮に含まれる機能性因子の摂取による生活習慣病の予防効果への期待がある。

【0003】

生活習慣病の代表的なものの一つとしては、高血圧症が挙げられる。高血圧症は脳出血、クモ膜下出血、脳梗塞、心筋梗塞、狭心症、腎硬化症など様々な合併症を引き起こすことが知られている。

血圧の調節において、重要な役割を果たしている酵素の一つはアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）である。血圧の調節系は、昇圧に関するレニン・アンジオテンシン系と降圧に関するカリクレイン・キニン系とが重要な役割を果たしている。昇圧に関するレニン・アンジオテンシン系では、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンが腎臓で生成されるレニンによって、アンジオテンシンⅠとなり、更に「アンジオテンシンⅠ変換酵素」により、アンジオテンシンⅠⅠに変換される。アンジオテンシンⅠⅠは、血管を収縮させ、血圧を上昇させる。降圧に関するカリクレイン・キニン系では、カリクレインがキニンノーゲンに作用して生成されるブラジキニンが、血管を弛緩させて血圧を下降させる。「アンジオテンシンⅠ変換酵素」は、ブラジキニンを分解する活性も有する。

従って、「アンジオテンシンⅠ変換酵素」の酵素活性を抑制もしくは阻害することによって血圧の上昇を抑制し、さらには血圧を降下させることが可能となる。

【0004】

アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有する物質としては、特定の配列を有するポリペプチドがアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を示すことが知られており、食用タンパク質にプロテアーゼを添加し、分解物の中から該酵素の阻害活性の強いポリペプチドを分離、精製できることが知られている。

アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを分離精製することのできる食用タンパク質としては、魚肉であるイワシ（例えば、特許文献1および非特許文献1参照）、カツオ（例えば、特許文献2および非特許文献2, 3参照）およびツナ（例えば、非特許文献4参照）、乳タンパク質であるカゼイン（例えば、特許文献3および非特許文献5参照）およびラクトグロブリン（例えば、特許文献4および非特許文献6参照）、さらに穀類である、トウモロコシタンパク質（例えば、非特許文献7参照）、ソバ全粒粉（例えば、非特許文献8参照）、小麦胚芽（例えば、非特許文献9参照）、大豆タンパク質（例えば、非特許文献10参照）を挙げることができる。

上記食用タンパク質から分離精製されたペプチドのうち、ラクトペプチド、カゼインペプチド、イワシペプチド、カツオ節ペプチドは、特定保健用食品に登録され、健康食品として販売されている。

【0005】

しかし、上記のようにプロテアーゼを添加する従来の方法では、食用タンパク質を分解させるために十分な濃度である、1%（w/v）以上のプロテアーゼの添加を必要とする。また、デンプンを多く含む穀類を原材料とする場合には、反応効率を増加させるためにアミラーゼの添加（約1%（w/v））も必要になる。

これらの酵素剤は、いずれも極めて高価であるため、大量製造や商品化の上での大きな障害になっている。

また、魚肉から製造する場合、臭気成分、色素成分、タンパク質など夾雑成分が多量に存在するため、精製効率が悪く、また、これら夾雑物の除去に大量の精製材料を必要とし、劣化も早いため、製造コストも悪い。なお、前記特定保健用食品で市販されているイワシペプチド（バリルチロシン（Val-Tyr））の濃度は、約1mg/gタンパク質であり、高純度とは言いがたい精製度である。さらに、日本近海において、マイワシは殆ど漁獲されず、カタクチイワシ、ウルメイワシも漁獲が減少し、値段が高騰している。世界的にも水産資源の消費が増加しつつあり、遠洋のカツオ、ツナなど水産資源は高騰しつつある。

さらに、上記の方法のいずれにおいても、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性が顕著に高いポリペプチド複数種類を有するものを製造することはできない。

【0006】

なお、ポリペプチドの人工合成によって機能性ポリペプチドを合成することも可能であるが（例えば、非特許文献 1 1 参照）、合成工程自体のコストに加えて、合成工程で用いる薬品を人が摂取できる程度まで除去精製する必要があるため、前記の方法以上に製造量およびコストの点で困難であるのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】特開 2006 - 56805 号公報

【特許文献 2】特開 2001 - 112470 号公報

【特許文献 3】WO95 / 28425 号公報

【特許文献 4】特開平 11 - 98978 号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Agricultural and Biological Chemistry, 55, 2169-2170.(1991)

【非特許文献 2】Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 56, 1541-1545.(1992)

【非特許文献 3】Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 57, 695-697.(1993)

【非特許文献 4】Agricultural and Biological Chemistry, 55, 2169-2170.(1991)

【非特許文献 5】Agricultural and Biological Chemistry, 51, 1581-1586.(1987)

【非特許文献 6】FEBS letters, 402, 99-101.(1997)

【非特許文献 7】Agricultural and Biological Chemistry, 55, 1313-1318.(1991)

【非特許文献 8】Journal of Peptide Science, 8, 267-274.(2002)

【非特許文献 9】Journal of Peptide Science, 5, 289-297.(1999)

【非特許文献 10】大豆たん白質研究、6, 73-77.(2003)

【非特許文献 11】The Journal of Biological Chemistry, 25, 401-407.(1980)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有する新規ポリペプチドを提供することを目的とするものである。

次に、本発明は、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、プロテアーゼやアミラーゼを添加することなく、しかも人体に有害な物質を添加することなく、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを製造しうる方法を提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを、経済的、且つ効率よく製造しうる方法を提供することを目的とするものである。

【0010】

また、本発明は、血圧降下機能を有する新規ポリペプチドを提供することを目的とするものである。

次に、本発明は、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、プロテアーゼやアミラーゼを添加することなく、しかも人体に有害な物質を添加することなく、血圧降下機能を有するポリペプチドを製造しうる方法を提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、血圧降下機能を有するポリペプチドを、経済的、且つ効率よく製造しうる方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、上記従来課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来は廃棄の対象であった、澱粉を多く含まない小麦ふすま、大麦糠、米糠の粉末原料を、水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の水又は緩衝液の pH を 3.05 ~ 3.95 とし、30 ~ 45 の温度で、少なくとも 4 時間以上反応させることによって、前記小麦ふすま、大麦糠、米糠

10

20

30

40

50

の粉末原料中の内在性プロテアーゼの作用により貯蔵タンパク質が分解され、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を有するポリペプチドが製造されることを見出した。

さらに、本発明者は、前記方法により、小麦ふすま、大麦糠、米糠の貯蔵タンパク質由来の7種類のアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドが得られることを見出し、しかもその中に新規のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を有するポリペプチドである、I l e - G l n - P r oのアミノ酸配列からなるトリペプチドが存在していることを見出した。

また、本発明者は、前記ポリペプチドが、血圧降下機能を有することを見出した。

本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

【0012】

即ち、請求項1に係る本発明は、少なくとも小麦ふすまを含む小麦種子粉末、少なくとも大麦糠を含む大麦種子粉末、及び少なくとも米糠を含む米種子粉末よりなる群から選ばれた少なくとも1種の粉末原料を、；水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の当該水又は緩衝液のpHを3.05～3.95とし、30～45の温度で、少なくとも4時間以上内在性プロテアーゼの作用により貯蔵タンパク質を分解反応させ、；得られた反応物を有効成分として含有してなることを特徴とする、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項2に係る本発明は、前記小麦種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない小麦ふすま粉末であり、且つ、前記大麦種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない大麦糠粉末であり、且つ、前記米種子粉末が澱粉貯蔵部を含まない米糠粉末である、請求項1に記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項3に係る本発明は、前記添加混合前に、ヘキサソを用いて前記粉末原料を脱脂処理する、請求項1又は2に記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項4に係る本発明は、前記粉末原料として、予め水又は緩衝液からなる洗浄液に添加混合し、当該添加混合後の洗浄液のpHを3.0～7.0とし、0～28の温度で5～30分間浸漬した後に上清を除去したものをを用いる、請求項1～3のいずれかに記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項5に係る本発明は、前記反応後、得られた反応液を、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィにより精製処理する、請求項1～4のいずれかに記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項6に係る本発明は、請求項5に記載のODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィによる精製処理において、前記反応液をODSカラムに通液し吸着させた後、10～25%エタノールもしくは10～25%アセトニトリルで溶出し回収する、請求項5に記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供するものである。

請求項7に係る本発明は、請求項1～6に記載のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を含有してなることを特徴とする、血圧降下作用を有する医薬を提供するものである。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有する新規ポリペプチドが提供される。

次に、本発明によれば、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、プロテアーゼやアミラーゼを添加することなく、しかも人体に有害な物質を添加することなく、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを製造しうる方法が提供される。

さらに、本発明によれば、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有する複数種類のポリペプチドを、経済的、且つ効率よく製造しうる方法が提供される。

【0014】

また、本発明によれば、血圧降下機能を有する新規ポリペプチドが提供される。

次に、本発明によれば、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、プロテアーゼやアミラーゼを

10

20

30

40

50

添加することなく、しかも人体に有害な物質を添加することなく、血圧降下機能を有するポリペプチドを製造しうる方法が提供される。

さらに、本発明によれば、小麦ふすま、大麦糠、米糠から、血圧降下機能を有する複数種類のポリペプチドを、経済的、且つ効率よく製造しうる方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実施例2において、酵素反応液のpH値と粗精製物の阻害率との関係、および酵素反応液のpH値と粗精製物の収量との関係をそれぞれ示した図である。

【図2】実施例3において、酵素反応の温度と粗精製物の阻害率との関係、および酵素反応の温度と粗精製物の収量との関係をそれぞれ示した図である。

【図3】実施例4において、酵素反応の反応時間と粗精製物の阻害率との関係を示した図である。

【図4】実施例8において、各種プロテアーゼ阻害剤とアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性の抑制率との関係を示した図である。

【図5】実施例10において、ゲル濾過HPLCによって分離された画分F-1からF-11のピークを示した図である。

【図6】実施例10において、画分F-3から逆相HPLCによって分離された各成分のピークを示した図である。

【図7】実施例10において、画分F-7から逆相HPLCによって分離された各成分のピークを示した図である。

【図8】実施例15において、ODSカラム処理粗精製物の単回投与が、高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響を示した図である。

【図9】実施例16において、Ile-Gln-Proの単回投与が、高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響を示した図である。

【図10】実施例17において、ODSカラム処理粗精製物の長期投与が、高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、「アンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチド」とは、アンジオテンシンI変換酵素の活性を、阻害もしくは抑制する機能を有するポリペプチドを指す。

当該ポリペプチドは、「アンジオテンシンI変換酵素」の酵素活性を、抑制もしくは阻害することによって、アンジオテンシンIから血圧を上昇させるアンジオテンシンIIへの変換および血圧を下降させるブラジキニンの分解を抑制し、血圧の上昇を抑制し、最終的に「血圧を降下させる機能」を有するポリペプチドである。

【0017】

本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチド、および、血圧降下機能を有するポリペプチドは、特定の配列を有するトリペプチド及びジペプチドであり、具体的にはIle-Gln-Pro、Leu-Gln-Pro、Leu-Arg-Pro、Ile-Arg-Pro、Val-Tyr、Thr-Phe及びIle-Tyrのアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

上記のうち、Ile-Gln-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチドは、これまでに報告のない、新規のアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドであり、血圧降下機能を有するポリペプチドである。

【0018】

なお、Ile-Gln-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチド以外のポリペプチド、即ちLeu-Gln-Proのアミノ酸配列からなるポリペプチドおよびLeu-Arg-Proのアミノ酸配列からなるポリペプチドはトウモロコシから（例えば、非特許文献7参照）、Ile-Arg-Proのアミノ酸配列からなるポリペプチドはカツオか

10

20

30

40

50

ら（例えば、非特許文献3参照）、Val-Tyrのアミノ酸配列からなるポリペプチドはイワシ（例えば、非特許文献1参照）および大豆（例えば、非特許文献10参照）から、Thr-Pheのアミノ酸配列からなるポリペプチドは小麦胚芽（例えば、非特許文献9参照）から、Ile-Tyrのアミノ酸配列からなるポリペプチドはイワシ（例えば、非特許文献1参照）、カツオ（例えば、非特許文献2参照）および小麦胚芽（例えば、非特許文献9参照）から、それぞれ報告があるポリペプチドである。

【0019】

本発明のアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドにおいて、「アンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有する」とは、 IC_{50} の値が、 1.0 (mg/mL)以下、好ましく 0.5 (mg/mL)以下のものを指す。

10

本発明の血圧降下機能を有するポリペプチドにおいて、「血圧降下機能を有する」とは、 IC_{50} の値が、 1.0 (mg/mL)以下、好ましく 0.5 (mg/mL)以下のものを指す。

本発明における IC_{50} の値とは、アンジオテンシンI変換酵素の活性を50%阻害した時のサンプルの終濃度 (mg/mL)の値であり、値が低いほど阻害活性の力価が高いことを示している。

なお、前記 IC_{50} の値が 1 mg/mLより高い場合、成分を精製しても力価の上昇が期待できないため、好ましくない。

【0020】

なお、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性の測定は、Lieberman変法 (D.W. Cushman and H.S. Cheung, Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1648.(1971))、吉元らの方法 (日本食品科学工学会誌、54, 45-49.(2007))などによって行うことができるが、例えば、Lieberman変法に準じて行うことができる。

20

Lieberman変法では、疑似基質としてHip-His-Leu (HHL)を用い、アンジオテンシンI変換酵素によりHip-His-Leuから馬尿酸 (N-benzoylglycine)を遊離させ、次いで、遊離した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、 228 nmの吸光度を測定することで、遊離した馬尿酸の量を測定する。この反応において、阻害活性を測定したいサンプルを含有させておくと、サンプルが阻害活性を有する場合には、馬尿酸の遊離量が減少し、測定される 228 nmの吸光度も減少する。

当該方法では、測定された 228 nmの吸光度の変化に基づいて、各サンプルの有するアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を求めることができる。具体的には、以下の式(1)を用いて求めることができる。

30

【0021】

【数1】

$$\text{阻害率(\%)} = [(C-B) - (S-SB)] / (C-B) \times 100 \quad \dots(1)$$

【0022】

式(1)において、Cは水を添加したコントロールの 228 nmにおける吸光度を、Bは水を添加し、予め 0.5 M HClを入れて測定したブランクの 228 nmにおける吸光度を、Sはサンプルの 228 nmにおける吸光度を、SBはサンプルに予め 0.5 M HClを入れて測定したサンプルブランク 228 nmにおける吸光度をそれぞれ表す。

40

ここで、式(1)のアンジオテンシンI変換酵素の活性を50%阻害したときのサンプル終濃度が IC_{50} 値である。

【0023】

本発明の「アンジオテンシンI変換酵素阻害剤」および「血圧降下剤」とは、前記した特定の配列を有するポリペプチドを有効成分として含有するものである。

具体的には、Ile-Gln-Proのアミノ酸配列からなる新規トリペプチドを有効成分として含有するものと、このIle-Gln-Proのアミノ酸配列からなる新規トリペプチドと、Leu-Gln-Pro、Leu-Arg-Pro、Ile-Arg-Pro、Val-Tyr、Thr-Phe及びIle-Tyrからなる群より選ばれた1以

50

上のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、を有効成分として含有するもの、とがある。

【0024】

本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害剤および血圧降下剤は、 IC_{50} の値が 1.0 (mg/mL)以下、好ましく 0.5 (mg/mL)以下のものである。

なお、アンジオテンシンI変換酵素阻害剤および血圧降下剤の IC_{50} の値が $1mg/mL$ より高い場合、精製しても力価の上昇が期待できないため、好ましくない。

【0025】

本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害剤および血圧降下剤の投与量は、具体的には、 IC_{50} の値が約 $40\mu g/mL \sim 0.5mg/mL$ の粗精製物である場合、成人(成人の体重を $60kg$ として)1日当たり $0.6 \sim 7.0g$ 、好ましくは $1.3g \sim 7.0g$ である。ここで成人1日当たり $0.6g$ 未満の投与量では、十分な血圧降下機能を得ることができないため好ましくない。

また、 $Ile-Gln-Pro$ をペプチド単体として投与する場合、 $90 \sim 900mg$ で効果が期待される。

【0026】

本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害剤および血圧降下剤は、経口投与、非経口投与のいずれかによって投与することができる。

非経口投与は、例えば静注、直腸投与等が挙げられる。

一方、経口投与する場合の本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害剤および血圧降下剤の形状としては、特に限定されるものではないが、粉末状、砕粒状、顆粒状、カプセルに充填する形態の他、水やエタノールに分散した溶液の形態、賦形剤等と混和して得られる錠剤の形態などとして用いることができる。

【0027】

次に、本発明の「アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチド」の製造方法について説明する。

本発明におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害剤の製造方法は、少なくとも小麦ふすまを含む小麦粉末、少なくとも大麦糠を含む大麦粉末、及び少なくとも米糠を含む米粉よりなる群から選ばれた少なくとも1種の粉末原料を、水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の水又は緩衝液の pH を $3.05 \sim 3.95$ とし、 $30 \sim 45$ の温度で、少なくとも4時間以上反応させることを特徴とする。

本発明では、小麦ふすま、大麦糠、米糠を含む粉末原料を、水又は緩衝液に添加混合し、添加混合後の水又は緩衝液の pH を所定の範囲とし、所定の温度で所定の時間浸漬することによって、該原料自体に多量に含有される内在性のアスパラギン酸プロテアーゼ及びセリンプロテアーゼの活性によって原料中のタンパク質を分解し、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを製造する。

また、当該製造方法で得られるポリペプチドは、「血圧降下機能を有するポリペプチド」でもある。

【0028】

ここで小麦ふすま、大麦糠、米糠とは、詳細には、小麦、大麦、米の種子の澱粉貯蔵部を除いた組織である、胚、胚芽、胚軸、胚盤、子葉、根原体、種皮、果皮、糊粉層などの組織をさす。

本発明に用いることができる原料としては、少なくとも小麦ふすまを含む小麦粉末、少なくとも大麦糠を含む大麦粉末、及び少なくとも米糠を含む米粉よりなる群から選ばれた少なくとも1種の粉末を含むものであればよい。従って、本発明では、小麦、大麦、米の種子の全粒粉末も用いることもできるが、好ましくは、澱粉貯蔵部を含まない小麦ふすま、大麦糠、米糠を用いることが望ましい。

【0029】

また、本発明においては、前記小麦、大麦、米の種子の発生段階を問わず用いることができる。即ち、それらの未熟種子、未発芽種子、発芽種子などを用いることができる。特に、発芽種子は、胚の発生の過程で貯蔵澱粉を消費し、澱粉貯蔵部の割合が低いいため、本

10

20

30

40

50

発明の原料として用いるのに好適である。例えば、大麦の発芽種子（麦芽）の場合、発芽後0～3日のものを用いることが好ましい。小麦の発芽種子の場合、発芽後0～3日のものを用いることが好ましい。

【0030】

本発明の原料として、小麦ふすま、大麦糠、米糠を用いた場合、これらの原料中には澱粉貯蔵部が含まれないため、アミラーゼを添加することなく組織の分解が可能であるという利点がある。さらに、小麦ふすま、大麦糠、米糠は、従来は廃棄の対象であり、大量製造を想定した場合のコストの点で高い経済性を有する。また、廃棄物を減らし環境負担を軽減できる点でも望ましい。

また、本発明に用いる原料としては、上記した小麦ふすま、大麦糠、米糠に加えて、トウモロコシ胚芽、蕎麦、ライ麦、デュラム小麦などを用いることも可能である。

10

【0031】

本発明に用いる小麦ふすまとしては、大ぶすま、小ぶすま、末粉を用いることができるが、好ましくは、大ぶすま、小ぶすまを用いることが望ましい。

また、小麦ふすまを調製するために用いる小麦の種類としては、ふくさやか、農林61号、ナンブコムギ、キタノカオリ、ハルユタカなどを挙げることができるが、具体的には、ふくさやか、農林61号を用いることが望ましい。

次に、本発明に用いる大麦糠とは、玄麦重量の20～40搗精の部分をさす。また、大麦糠を調整するために用いる大麦の種類としては、二条大麦（スカイゴールド、ニシノチカラ、タカホゴールド、大系HP19）、六条大麦（中間母本農2、9551、マンテンボシ）などを挙げることができるが、具体的には、スカイゴールド、中間母本農2、9551を用いることが望ましい。

20

また、米糠は、イネから籾殻を除いた玄米の主に胚芽、外胚乳、糊粉層の総称で、外側から赤糠（表皮と胚芽）、中糠、白糠となるが、本発明に用いる米糠としては、これら赤糠、中糠、白糠を用いることができる。本発明に用いる米糠を得るための米の種類としては、ヒノヒカリ、コシヒカリ、はいみのり、めばえもち、春陽、LGCソフトなどを挙げることができるが、具体的には、ヒノヒカリ、コシヒカリ、はいみのり、春陽、LGCソフトを用いることが望ましい。

【0032】

本発明に用いる原料として、大麦の発芽種子、つまり麦芽を用いる場合、麦芽は通常の方法で調製することができる。一例を示すと、大麦の種子、具体的には、二条大麦の種子を、15～20で4日間程度水に浸漬し発芽させる。発芽後、35～45で、10～12時間乾燥した後、15分程度で55～65まで昇温し、その温度で2～4時間程度乾燥させる。その後、さらに15分程度で75～85に昇温し、その温度で4～5時間程度乾燥させ、乾燥麦芽として用いることができる。

30

また、本発明に用いる原料として、小麦の発芽種子を用いる場合、15～40で3日間程度水に浸漬し発芽させ、発芽後、40～50で一晩程度乾燥することによって調製することができる。

【0033】

本発明のポリペプチドの製造方法においては、原料を粉末にして用いる。本発明における原料の粉末化は、原料をパウダー状、サンド状、粒子状に破碎することを指し、約1mm以下、好ましくは約0.84mm以下の平均粒子径まで破碎したものを指す。

40

原料の粉末化は、公知技術のどのような方法で行うことができるが、ビューラーテストミル、ブラベンダーテストミル、堅型搗精機、小型精米機、研削式精米機、ブラシ式精米機、遠心ミル、粉碎機、石臼などを用いることができる。なお、粉末化していない原料を用いた場合、以下の工程における酵素分解の効率、抽出効率が減少するため、好ましくない。

【0034】

小麦ふすまを調製する場合、ビューラーテストミル、ブラベンダーテストミルなどを用いることができる。当該粉末化（製粉）工程において、小麦種子の全重量の約20%分を

50

製粉し回収したものを、大ぶすまとして得ることができる。具体的には、大ぶすまは断片化された薄い皮といった形状のものであって、400 μ m以上、大きいもので、長辺は数mm程度の粒度が不均一なものとなる。この大ぶすまは、そのまま用いてもよいが、遠心ミルでスクリーン〔500 μ m〕を用いて、粒径100~400 μ mに再粉碎することが好ましい。

当該粉末化（製粉）工程において、大ぶすまを製粉した後の残りの部分の種子から、小麦種子の全重量の約10%分を製粉し回収したものを、小ぶすまとして得ることができる。さらに、当該粉末化（製粉）工程において、小ぶすまを製粉した後の残りの部分の種子から、小麦種子の全重量の約10%分を製粉し回収したものを、末粉として得ることができる。具体的には、小ぶすまは、粒径120~500 μ m、末粉は、20~100 μ mの粉に粉碎される。

また、小麦種子の全粒粉を調製する場合は、遠心ミル、粉碎機、石臼などを用いることができる。例えば、小麦種子を粉碎機で破碎し、小麦の全粒粉を調製すると、560~840 μ mの全粒粉が得られる。

一方、遠心ミルで粉碎すると、粒径100~400 μ mの全粒粉が得られる。

【0035】

大麦糠を調製する場合、堅型搗精機、試験用搗精機（パーレスト）などを用いることができる。当該粉末化（研削）工程において、大麦種子の全重量の約40%分を研削し回収したものを、大麦糠として得ることができる。具体的には、粒径150~350 μ mの大麦糠を得ることができる。また、大麦種子の全粒粉を調製する場合は、遠心ミル、粉碎機などを用いることができる。例えば、大麦種子を粉碎機で破碎し、大麦の全粒粉を調製すると、560~840 μ mの全粒粉が得られる。

一方、遠心ミルで粉碎すると、粒径100~400 μ mの全粒粉が得られる。

【0036】

米糠を調製する場合、小型精米機、研削式精米機、ブラシ式精米機などを用いることができる。当該粉末化（研削）工程において、玄米の種子全重量の約10%分を研削し回収したものを、米糠として得ることができる。具体的には、粒径150~350 μ mの米糠を得ることができる。また、玄米の全粒粉を調製する場合は、遠心ミル、粉碎機などを用いることができる。例えば、玄米を粉碎機で破碎し、玄米の全粒粉を調製すると、560~840 μ mの全粒粉が得られる。

一方、遠心ミルで粉碎すると、粒径100~400 μ mの全粒粉が得られる。

【0037】

麦芽の粉末を調製する場合、遠心ミル、粉碎機、石臼などを用いることができる。

【0038】

本発明において、脂質が多く含有される原料、例えば、小麦ぶすま、米糠、大麦糠などを用いる場合には、前記粉末化工程の後に脱脂処理を行うことが望ましい。脂質を多く含有する原料を用いる場合には、以下の内在性プロテアーゼによりポリペプチドを生成する酵素反応工程において、脂質が当該内在性のプロテアーゼの活性を抑制する傾向がある。

【0039】

本脱脂処理に用いることができる溶媒としては、揮発性であり、プロテアーゼを失活させず、且つ人体に無害な無極性溶媒であればよいが、例えばヘキサン、アセトンなどを挙げることができる。好ましくは、ヘキサンをを用いることが望ましい。

【0040】

本脱脂処理工程においては、まず、前記粉末原料の全質量に対して、5~40質量部の前記無極性溶媒を加えて、10~40、好ましくは10~30程度、さらに好ましくは20程度の室温で、0.5~4時間、好ましくは1時間程度攪拌し、原料から脂質を溶出させる。

次いで、ブフナ漏斗、濾紙、ミラクロス、遠心分離濾過機などを用いて濾過、好ましくはブフナ漏斗を用いて吸引濾過することで、脂質が溶出した前記無極性溶媒を分離除去し、得られた残渣を6~18時間、10~25程度の室温に放置し乾燥させる。なお、乾

10

20

30

40

50

燥処理は、通風乾燥、窒素気流乾燥、減圧乾燥などの方法により行うこともできる。

乾燥後に得られる脱脂された粉末原料は、前記無極性溶媒が完全に揮発されていることが望ましい。

【0041】

さらに、本発明においては、次工程である酵素反応工程を行う前に、前記粉末原料に含まれる夾雑物となる可溶性のタンパク質および色素成分を洗浄処理により除去することが望ましい。

本原料洗浄処理工程においては、まず、前記粉末原料の全質量に対して、10～50質量部の水又は緩衝液を加えて混合後、添加混合後の水又は緩衝液のpH値を3.0～7.0、好ましくは3.2～6.9とし、温度を0～28程度、好ましくは4～28程度で、5～30分間、好ましくは10分間程度浸漬し、原料から可溶性タンパク質および色素成分を溶出させる。

本工程を経ることによって、例えば、小麦ふすま、大麦糠を原料に用いた場合、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するペプチド配列を含むグリアジン（プロラミンタイプのタンパク質の一種）以外の酸性又は中性溶液に可溶性タンパク質および色素成分を溶出除去することができる。

なお、本工程における「浸漬」とは、原料と水又は緩衝液とを混合後、静置、振盪、攪拌することを指す。好ましくは、100～200rpmで振盪することで、より洗浄効率を高めることができる。

【0042】

なお、本工程において、添加混合後の水又は緩衝液のpH値が3.0より低い場合、酵素が変性するので好ましくない。また、添加混合後の水又は緩衝液のpH値が7.0より高い場合、グリアジンが溶解するので好ましくない。

また、添加混合後の水又は緩衝液の温度が0より低い場合、可溶性タンパク質の溶解度が低下するので好ましくない。また、添加混合後の温度が30より高い場合、酵素反応が進みグリアジンの分解速度が高まるので好ましくない。

さらに、添加混合後の浸漬時間が30分より長い場合、グリアジンの分解量が増加するので好ましくない。添加混合後の浸漬時間が5分より短い場合、可溶性タンパク質が十分に溶解しないので好ましくない。

【0043】

本工程に用いる洗浄液は、前記原料を添加混合した後のpHが、前記所定の範囲のpHに調整されたものであれば、如何なる水もしくは水溶液でも用いることができるが、例えば、軟水、脱イオン水、蒸留水、もしくはリン酸ナトリウム水溶液、クエン酸ナトリウム水溶液、塩化ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、硫酸ナトリウム水溶液など、好ましくは、脱イオン水、蒸留水、クエン酸ナトリウム水溶液を用いて調整された水溶液を用いることができる。

また、当該洗浄液は、緩衝液であることが望ましく、例えば、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸-リン酸カリウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、トリス-HCl緩衝液、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、乳酸-乳酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液、ギ酸-リン酸カリウム緩衝液、ギ酸-リン酸ナトリウム緩衝液を用いることができる。特に、クエン酸-リン酸カリウム緩衝液、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸カリウム緩衝液を用いることがpH調整の簡便性、緩衝能、経済性の点で好適である。

なお、当該緩衝液の濃度は、例えば、クエン酸-リン酸ナトリウム、クエン酸-リン酸カリウムを用いた場合、5～50mMであることが望ましい。

【0044】

なお、当該洗浄液に殺菌効果を有する物質を含有させて洗浄殺菌を行うことによって、次工程である酵素反応処理における微生物汚染を防ぐ殺菌効果を得ることができる。

本工程の洗浄処理の効果を損なうことなく洗浄液に殺菌効果を付与しうる物質としては

10

20

30

40

50

、次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）、過酸化水素、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウムを挙げることができるが、具体的には、次亜塩素酸ナトリウムを用いることが好ましい。

次亜塩素酸ナトリウムは、一般的に、野菜、果実、飲料水、製造装置や器具の食品の殺菌剤として用いられる物質である。次亜塩素酸ナトリウムは、使用後は加熱により分解され、また、水洗浄で容易に除去されるため、加工助剤として表示は免除されている。現在、使用禁止食品は黒ゴマに限定される。

【0045】

当該洗浄液に殺菌効果を賦与する物質として次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合、当該洗浄液に含有させる次亜塩素酸ナトリウムの濃度としては、実効塩素濃度100～600ppmを含有させることが望ましい。100ppm未満であると、殺菌効果が期待できない。600ppmを超えると、サンプルの酸化の要因になり、反応収率の低下が懸念される。

10

なお、当該洗浄液に次亜塩素酸ナトリウムを含有させて本洗浄処理工程を行った場合においても、好適な温度条件および時間条件は、前記所定の範囲と同じであるが、洗浄処理の温度が60以上の高温では次亜塩素酸ナトリウムが分解するため、殺菌効果に関しては特に好ましくない。また、洗浄処理の時間が5分未満であると、殺菌が不十分であり好ましくない。

【0046】

上記洗浄液に可溶性タンパク質および色素成分を溶出させた後、2,000～10,000×gで10～20分間の遠心分離を行うことによって、酸性又は中性溶液に可溶性タンパク質および色素成分を溶出除去した粉末原料を沈殿として分離し回収することができる。

20

なお、得られた沈殿に再度水を加え水を遠心除去する処理を、1回、好ましくは2回行うことで、沈殿を洗浄してもよい。

【0047】

なお、本発明において、本洗浄処理工程は、前記した脱脂処理工程の前に行ってもよい。

【0048】

本発明においては、上記で得られた粉末原料（脱脂処理工程や原料洗浄処理工程などの前処理を行った粉末原料全てを含む、以下同じ）を水又は緩衝液に添加混合した後、添加混合後の水又は緩衝液のpHを所定の範囲とし、所定の温度で所定の時間反応させることによって、当該原料自体に多量に含有される内在性のアスパラギン酸プロテアーゼ及びセリンプロテアーゼの活性で当該原料中のタンパク質を分解し、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを生成することができる。

30

なお、当該酵素反応工程は、従来の技術とは異なり、プロテアーゼを一切添加することなく、酵素反応を行うことができる。

【0049】

本工程（本酵素反応工程）では、まず、上記で得られた粉末原料を、当該原料の質量に対して、5～20質量部、好ましくは10質量部程度の酵素反応液に浸漬することにより添加混合する。

40

本工程に用いる酵素反応液は、水又は緩衝液であり、この水又は緩衝液に前記原料を添加混合し、添加混合後の水又は緩衝液のpH値を、3.05～3.95、好ましくは3.15～3.87、さらに好ましくは3.15～3.77、最も好ましくは3.15～3.26とする。

なお、添加混合後の水又は緩衝液のpH値が3.05より低い場合や3.95より高い場合には、阻害率が、阻害活性の最高値を100とした時の65%（阻害率43.9%）を下回るようになることから好ましくない。

【0050】

当該酵素反応液は、前記粉末原料を添加混合後のpHが、前記所定の範囲のpHに調整

50

されたものであれば如何なる水溶液でも用いることができるが、例えば、リン酸、クエン酸、塩酸、酢酸、硫酸、乳酸、ギ酸など、好ましくは、リン酸、クエン酸、塩酸、酢酸、硫酸、ギ酸を用いて調整された水溶液を用いることができる。

また、当該酵素反応液は、緩衝液であることが望ましく、クエン酸 - リン酸カリウム緩衝液、クエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸 - クエン酸ナトリウム緩衝液、酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、乳酸 - 乳酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液、ギ酸 - リン酸カリウム緩衝液、ギ酸 - リン酸ナトリウム緩衝液などを用いることができる。特に、クエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸 - リン酸カリウム緩衝液を用いることがpH調整の簡便性、緩衝能の点で好適である。

当該酵素反応液に用いる緩衝液の濃度は、例えば、クエン酸 - リン酸ナトリウム、クエン酸 - リン酸カリウムを用いた場合、0.02 ~ 0.15 M、好ましくは0.05 ~ 0.1 Mであることが望ましい。

当該酵素反応液は、本工程の酵素反応を抑制しない限り、塩類を含有したものであってもよい。具体的には、ナトリウム塩の濃度が、100 mM以下、好ましくは50 mM以下とすることが望ましい。

なお、前記酵素反応液は、前記原料を添加混合する前に調製して用いることができるが、前記原料を添加混合した水に、直接前記pH調整成分、緩衝作用を有する成分を添加して調製することもできる。

【0051】

本酵素反応工程において、当該酵素反応液に殺菌効果を有する物質を含有させることによって、本工程における微生物汚染を防ぐ殺菌効果を得ることができる。

本工程の酵素反応処理の効果を損なうことなく洗浄液に殺菌効果を付与しうる物質としては、次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）、過酸化水素、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウムを挙げることができるが、具体的には、次亜塩素酸ナトリウムを用いることが好ましい。

当該酵素反応液に殺菌効果を賦与する物質として次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合、当該酵素反応液に含有させる次亜塩素酸ナトリウムの濃度としては、実効塩素濃度100 ~ 600 ppmを含有させることが望ましい。100 ppm未満であると、殺菌効果が期待できない。600 ppmを超えると、サンプルの酸化の要因になり、反応収率の低下が懸念される。

なお、前記洗浄処理工程で洗浄液に殺菌効果を有する物質を添加した場合においては、本工程で酵素反応液に殺菌効果を有する物質の添加を行わなくても、酵素反応液の微生物汚染を防ぐ十分な殺菌効果を得ることができる。

【0052】

本酵素反応工程において、内在性プロテアーゼの酵素反応は、30 ~ 45℃、好ましくは35 ~ 40℃、さらに好ましくは37 ~ 40℃の温度で行うことが望ましい。

なお、酵素反応の温度が45℃より高い場合には、阻害活性が最高値の65%を下回るようになることから好ましくない。また、酵素反応の温度が30℃より低い場合においても、阻害活性が最高値の65%下回るようになることから好ましくない。

本酵素反応工程において、前記原料を添加混合して浸漬した酵素反応液は、少なくとも4時間以上、好ましくは8時間以上、さらに好ましくは12時間以上、振盪もしくは静置することで、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを生成することができる。

なお、好ましくは、50 ~ 160 rpmで振盪することで、より反応効率を高めることができる。

酵素反応後の反応液は、沸騰水中に5分程度浸し酵素を失活させた後、4℃程度 ~ 室温程度、好ましくは4℃程度まで冷却した後、2,000 ~ 10,000 x gで10 ~ 20分間の遠心分離によって、「酵素反応処理液」を残渣から分離し回収することができる。

【0053】

次に、本発明においては、上記工程を経ることで得られた反応液（酵素反応処理液）は

10

20

30

40

50

、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィによって共存するタンパク質、低分子多糖（オリゴ糖）、極性脂質、色素成分、イオン類を除去し粗精製することができる。酵素反応処理液に共存するイオン類とは、ナトリウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオンなどである。これらのイオン類は、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性測定に影響を及ぼすため夾雑物として混入すると好ましくない。

なお、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィによる精製を行う前において、前記酵素反応処理液のpHを、5.0～7.0、好ましくは7.0程度に調整し、中和しておくことが望ましい。当該中和処理には、アンモニア水溶液、水酸化ナトリウム溶液、水酸化カリウムなどを用いることができる。好ましくは、1～10N程度のアンモニア水溶液を用いることができる。

10

当該中和処理を行った場合、5,000～10,000×gで20～30分間の遠心分離を行い、さらに、濾過、好ましくはブフナ漏斗を用いた吸引濾過を行い、残渣を完全に除去することが望ましい。

【0054】

また、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィによる精製を行う前において、酵素反応処理液を活性炭充填カラムに通液し、カラムを通過した液を回収することで、色素成分などの不純物を活性炭に吸着させ除去することができる。色素成分は、非特異的に精製の樹脂に吸着し、分離能を低下させるため夾雑物として混入すると好ましくない。

当該活性炭カラム処理には、液層吸着用の石炭系、ヤシ殻系、おがくず系などの破碎状、粉末状、円柱状活性炭素を用いることができる。具体的には、ナカライテスク製および和光純薬製の球状活性炭素、クラレコール（クラレ製）、サンプリフ（サンテスク製）などを用いることができる。

20

【0055】

本発明における、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィ工程に用いることができる、ODSカラムとしては、LiChroprep RP-18（Merck製）、YMC Gel ODS-AQ（ワイエムシイ製）Sep Pak（ミリポア製）、YMC Dispo SPE（ワイエムシイ製）などを用いることができる。具体的には、LiChroprep RP-18（Merck製）などを用いることができる。

なお、ODS樹脂を充填した任意のスケールのカラムを作成し、必要に応じてスケールアップすることができる。また、カラムを複数セット用意し、同時に精製操作を行うこともできる。

30

【0056】

本発明におけるODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィ工程においては、まず、エタノール、次いで水を通液し、ODS樹脂を活性化させる。その後、前記酵素反応処理液（以下、本工程において、前記中和した酵素反応処理液及び前記活性炭カラム処理した酵素反応処理液である場合も含むものである。）を、ODSカラムにアプライし吸着させる。この処理によって、アプライされた酵素反応処理液に含まれるポリペプチド、タンパク質、極性脂質、色素成分などは、ODS樹脂の吸着許容量の範囲でODS樹脂に吸着される。

本工程において、前記酵素反応処理液は、カラムに充填したODS樹脂の容量に応じた量をアプライすることができる。具体的には、100～200mLのODS樹脂を充填したカラムを用いた場合、2,000～4,000mLの前記酵素反応処理液をアプライすることができる。

40

【0057】

次に、水を通液させ、吸着カラムを洗浄することにより、ODS樹脂に吸着しなかった非吸着夾雑物を除去する。ここで用いる水は、蒸留水、水道水、脱イオン水、超純水など、如何なる水を用いることもできるが、蒸留水を用いることが好ましい。

非吸着夾雑物を洗浄除去した後、用いたODS樹脂容量の3～10倍容量、好ましくは5倍容量程度の溶出溶媒に溶出させて回収することができる。本工程に用いることができる溶出溶媒としては、エタノール、アセトニトリル、メタノールを挙げることができる。

50

本工程においては、抽出溶媒は水溶液の形で用い、具体的には、エタノールを用いる場合、5～30%程度、好ましくは10～25%程度、もっとも好ましくは10%程度のエタノールを含有する水溶液であることが望ましい。なお、エタノールの含有率が5%未満の水溶液または30%より大きい水溶液で溶出した場合、阻害成分が溶出しない、または非活性成分が混入するため好ましくない。

また、本工程においてアセトニトリルを用いる場合には、5～30%程度および65～99.5%程度、好ましくは10～20%程度および70～99%程度、さらに好ましくは、10～20%程度、もっとも好ましくは10%程度のアセトニトリルを含有する水溶液であることが望ましい。アセトニトリルの含有率が低い高極性画分と、アセトニトリルの含有率が高い低極性画分とでは、高極性画分の方がアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性が高く、その阻害活性を有するポリペプチドの含有量も多い。

なお、アセトニトリルの含有率が5%未満の水溶液、または30%より大きく65%未満の水溶液で溶出した場合、阻害成分が溶出しない、または非活性成分が混入するため好ましくない。

【0058】

本工程において、5～30%までのエタノールで溶出した場合と、5～30%までのアセトニトリルで溶出した場合とでは、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性およびその阻害活性を有するポリペプチドの含有量は同程度であり、両者を本工程の溶出液に用いることができるが、特に、人体への安全性や廃液処理コストの理由で、エタノールを用いることが望ましい。

【0059】

上記工程を経ることで、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する溶出液は、「ODSカラム処理粗精製液」として回収される。

ODSカラム処理粗精製液は、溶媒であるエタノール、アセトニトリル、メタノールを揮発させて乾燥させることによって、「アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する粗精製物」の乾燥粉末とすることができる。

なお、本乾燥工程は、自然乾燥、凍結乾燥、スプレードライ、窒素気流乾燥、減圧乾燥などの方法により得ることができるが、具体的には、凍結乾燥、減圧乾燥により溶媒を気化させることが望ましい。

【0060】

また、上記工程までの具体的な例として、100gの小麦ふすまを1.0Lの前記酵素反応液中で浸漬しプロテアーゼ反応を行った後、得られた酵素反応処理液をODSカラムに吸着させた場合を示す。

当該ODSカラムから10%エタノールで溶出した溶出液からは、1.5～3.0g、 IC_{50} の値が65～90 μ g/mLのアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する粗精製物の乾燥粉末が得られる。なお、該粗精製物は白色であり、水に可溶である。

また、当該ODSカラムから25%エタノールで溶出した溶出液からは、3.0～5.0g、 IC_{50} の値が90～110 μ g/mLのアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する粗精製物の乾燥粉末が得られる。なお、該粗精製物は淡黄色であり、水に可溶である。

なお、当該ODSカラムを10%エタノールで溶出した後、さらに25%エタノールで溶出することもできる。その場合、得られる溶出液からは、1.2～1.8g、 IC_{50} の値が280～360 μ g/mLのアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する粗精製物の乾燥粉末が得られる。なお、該粗精製物は淡黄色であり、水に可溶である。

【0061】

なお、上記工程で得られた前記粗精製物の乾燥粉末は、以下の工程を経ることで得られるアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドの含有率が高まった精製物や単離精製されたポリペプチドと同様に、食品、飲料、および製剤の材料として用いる

10

20

30

40

50

ことができる。上記工程は、大量製造が可能な工程のみで構成されており、加えて、本発明の技術的特徴の一つである、高価なプロテアーゼを添加する必要がないので、経済性の点でも顕著な効果を有する。

【0062】

また、本発明においては、前記ODSカラム処理粗精製液もしくは前記粗精製物を水に溶解した溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィにより精製することで、さらにアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドの含有率を高めることができる。

本発明に用いることができる陰イオン交換クロマトグラフィに用いるカラムとしては、強塩基性陰イオン交換体を充填したカラムであり、例えばAG MP-1 (BIO-RAD製)、アンバーライトIRA400J (オルガノ製)、アンバージェット4002 (オルガノ製) など一般的な陰イオン交換樹脂を充填したカラムを用いることができる。具体的には、AG MP-1、アンバーライトIRA400Jなどを用いることができる。

なお、陰イオン交換担体を充填した任意のスケールのカラムを作成し、必要に応じてスケールアップすることができる。また、カラムを複数セット用意し、同時に精製操作を行うこともできる。

【0063】

本発明における陰イオン交換クロマトグラフィ工程においては、まず、0.5～5N、好ましくは1N程度のアンモニア水溶液を通液し、樹脂容量の約5倍量の水で洗浄することで、陰イオン交換樹脂をアンモニア型にする。また、前記ODSカラム処理粗精製液もしくは前記粗精製物を水に溶解した溶液は、1～10N、好ましくは1N程度のアンモニア水溶液により、pHを7.0～12.0、好ましくは9.0程度に調整することが望ましい。

アンモニア水溶液によりpHを前記所定の値に調整した後のODSカラム処理粗精製液もしくは粗精製物を水に溶解した溶液は、前記アンモニア水溶液で平衡化後、約5倍量の水を通した陰イオン交換樹脂を充填したカラムにアプライすることができる。

【0064】

本工程においては、前記ODSカラム処理粗精製液もしくは粗精製物を水に溶解した溶液は、陰イオン交換カラムの容量に応じた量をアプライすることができる。具体的には、直径20～40mmで、長さ10～20cmのカラムを用いた場合、粗精製液100～1000mLをアプライすることができる。

次に、0.05Mアンモニアを送液し、陰イオン交換カラムを洗浄することにより、陰イオン交換担体に吸着しなかった非吸着画分を回収する。本工程において、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドは、陰イオン交換カラム非吸着画分として回収される。送液の条件としては、流速2～10mL/分、数時間以内で行うことが望ましい。

なお、本工程では、陰イオン交換担体に酸性タンパク質、酸性ペプチドなどを吸着することができる。除去することができる。

【0065】

上記工程で得られた「陰イオン交換カラム処理液」は、ゲル濾過HPLCによりアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドを含む画分を分離精製することができる。

本発明に用いることができるゲル濾過HPLCに用いるカラムとしては、Superdex 75 HR (アマシャム製)、Superdex Peptide HR (アマシャム製)、Bio-Gel P-6 (BIO-RAD製)を用いることができる。例えば、Superdex 75 HR (アマシャム製)を用いることができる。また、ゲル濾過HPLCを行うための装置としては、LC-10ADシステム (島津製)などを用いることができる。

なお、カラムは任意のスケールのものを用いることができる。また、カラムを複数セット用意し、同時に精製操作を行うこともできる。

本ゲル濾過HPLC工程においては、まず、0.05～1.0%、好ましくは0.1%

10

20

30

40

50

程度のトリフルオロ酢酸を含む、20～40%、好ましくは30%程度のアセトニトリルでカラムを平衡化しておくことが望ましい。

また、トリフルオロ酢酸の代わりに、0.5～2.0%、好ましくは1.0%程度の酢酸或いはギ酸を用いることもできる。

【0066】

本工程においては、前記陰イオン交換カラム処理液は、ゲル濾過HPLCに用いるカラムの容量に応じた量をアプライすることができる。具体的には、直径10～15mmで、長さ30～40cmのカラムを用いた場合、0.5～1.5mLをアプライすることができる。

次に、30%アセトニトリル水溶液を流速1.0～2.0mL/分、30～40分間の条件で通液し、吸光度、具体的には220nmの吸光度のピークをモニタし、ゲル濾過HPLCに用いたカラムから分子量の大きさに従って溶出する成分を各ピークごとに分画し回収する。

分画回収された画分の中から、アンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドを含む画分を得ることができる。具体的には、3番目(F-3)、7番目(F-7)のピークを含む画分を、アンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドを含む画分として得ることができる。

【0067】

上記工程を経ることで得られる「ゲル濾過HPLC画分」は、溶媒を揮発させ乾燥させることによって、「アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する粗精製物」の乾燥粉末とすることができる。

なお、本乾燥工程は、自然乾燥、凍結乾燥、スプレードライ、窒素気流乾燥、減圧乾燥などの方法により得ることができるが、具体的には、凍結乾燥、減圧乾燥により溶媒を気化させることが望ましい。

上記工程で得られた前記粗精製物の乾燥粉末は、前記粗精製物や以下の工程で得られる単離精製されたポリペプチドと同様に、食品、飲料、および製剤の材料として用いることができる。

【0068】

また、上記工程までの具体的な例として、100gの小麦ふすまを1.0Lの前記酵素反応液中で浸漬しプロテアーゼ反応を行った後、前記ODSカラムから10%エタノールで溶出したODSカラム処理粗精製液を用いた場合、画分F-3からは150～200mg、IC₅₀の値が40～50μg/mLのアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する精製物の乾燥粉末が得られる。また、画分F-7からは70～100mg、IC₅₀の値が70～80μg/mLのアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する精製物の乾燥粉末が得られる。

【0069】

さらに、本発明では、上記工程で得られたアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドを含有する「ゲル濾過HPLC画分」を、ブチル、フェニル、ODSなど逆相系カラムを用いた逆相HPLCで処理することによって、該阻害活性を有するポリペプチド単体として単離精製することができる。

本工程に用いることができる逆相系カラムとしては、Jupiter 5μC₄ 300Aカラム(Phenomenex製)、Cosmosil 5Ph-AR-300(ナカライテスク製)、μRPC C18 ST(アマシャム製)を用いることができる。例えば、Jupiter 5μC₄ 300Aカラム(Phenomenex製)を用いることができる。また、逆相HPLCを行うための装置としては、LC-10ADなどを用いることができる。

なお、カラムは任意のスケールのものを用いることができる。また、カラムを複数セット用意し、同時に精製操作を行うこともできる。本工程である逆相系カラムを用いた逆相HPLC工程においては、まず、30%アセトニトリル水溶液、0.1%トリフルオロ酢酸でカラムを平衡化しておくことが望ましい。

【0070】

本工程においては、前記ゲル濾過HPLC画分の溶出液は、逆相HPLCに用いるカラムの容量に応じた量をアプライすることができる。具体的には、直径4.6~10mmで、長さ15~20cmのカラムを用いた場合、0.05~0.20mLをアプライすることができる。

次に、平衡化に用いた溶媒を通液し、逆相HPLCに用いるカラムを洗浄することにより、カラムに吸着した成分をしなかった非吸着画分を洗浄し、次いで、流速1.0~2.0mL/分、30~50分間の条件で、アセトニトリル-水を直線勾配条件で通液する。

カラムからの溶出液は、吸光度、具体的には220nmの吸光度のピークをモニタし、各ピークごとに分画し回収することで、ポリペプチド単体として単離精製することができる

10

【0071】

また、上記工程を経た後に得られた画分の単離精製が不十分である場合には、Jupiter 5 μ C18、300A、(Phenomenex製)を用いた逆相HPLCを再度行うことによって、ポリペプチド単体を単離精製を行うことができる。具体的には、前記F-3画分からポリペプチド単体を単離精製する際には、本工程を行うことが望ましい。

なお、本工程のゲル濾過HPLCの手順は、Jupiter 5 μ C18、300A、(Phenomenex製)を用いること以外は、前工程の逆相HPLCと同様に行うことができる。

20

【0072】

上記工程で得られた単離精製された分子の画分は、分子量の測定およびN末端アミノ酸アナライザーで分析を行うことによって、ポリペプチドである分子画分を選別し、ポリペプチドのアミノ酸配列の決定によって行うことができる。

本工程において、分子量の測定は、MALDI-TOF MS (Applied Biosystems製、米国)、ESI-TOF MS (Mariner Biospectrometry、PerSeptive Biosystems製、米国)、LC MS (MAGIC 2002、Microm Bioresources製、米国)により行うことができるが、具体的にはMALDI-TOF MS (Voyager-DESTR、Applied Biosystems製、米国)により行うことができる。

30

また、本工程において、アミノ酸配列の決定は、アミノ酸シーケンサー (PPSQ-10、島津)、アミノ酸シーケンサー (ProCise 494 cLC、Applied Biosystems製、米国)により行うことができるが、具体的にはアミノ酸シーケンサー (PPSQ-10、島津)により行うことができる。

【0073】

上記解析によって、前記逆相HPLC工程によって単離精製された分子画分のうち、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有する特定のアミノ酸配列からなるポリペプチドを特定することができる。

本発明においては、具体的に、画分F-3からはIle-Gln-Pro、Leu-Gln-Pro、Leu-Arg-Pro、Ile-Arg-Pro、画分F-7からはVal-Tyr、Thr-Phe、Ile-Tyrのアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドとして単離精製することができる。

40

このうち、Ile-Gln-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチドは、これまでに報告のない、新規のアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドである。

なお、上記したように、上記工程で得られる“アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有する”ポリペプチドは、「血圧降下機能を有する」ポリペプチドでもある。

【0074】

上記工程で得られたポリペプチドの乾燥粉末は、前記粗精製物や精製物と同様に、食品

50

、飲料、および製剤の材料として用いることができる。

具体的には、清涼飲料水、粉末清涼飲料、炭酸飲料水、錠菓、ビスケット、スナック、シリアル、カップ麺、粉末スープ、ゼリーなどの食品や飲料に用いることができる。

製剤としては、粉末状、砕粒状、顆粒状、カプセルに充填する形態の他、水やエタノールに分散した溶液の形態、賦形剤等と混和して得られる錠剤の形態などとして用いることができる。

【実施例】

【0075】

以下、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

【0076】

製造例1（小麦ふすま、米糠、大麦糠の粉末等の製造）

小麦種子（ふくさやか）をビューラーテストミル（Beuhler Inc. 製、スイス）で製粉し、全粒粉を調製すると共に、これを大ぶすま、小ぶすま、末粉、60%粉に分離した。本発明において、大ぶすまは、果皮、種皮等の外皮を主体とし、小ぶすまは、子葉、根原体、胚軸等、胚盤等を含めた胚、および糊粉層を主体とし、末粉は、糊粉層および胚乳の一部を含む。なお、60%粉は、大ぶすま、小ぶすま、末粉を除いた胚乳からなる粉砕物である。

大ぶすまは、全粉量のおよそ20%を占め、小ぶすまは全粉量のおよそ10%、末粉は全粉量のおよそ10%を占めた。本実施例においては、大ぶすまと小ぶすまとを合わせたものを「小麦ふすま」とした。

小麦発芽種子は、小麦種子（ふくさやか）を20 の水に浸し、3日間保温して発芽させることにより調製した。これを40 で一晚乾燥後、遠心ミル（Retzsch、三田村理研工業）で粉砕することにより小麦発芽種子全粒粉を調製した。

また、小麦未熟種子は、出穂4週間後に収穫、脱穀し、40 で一晚乾燥することにより調製した。その後、遠心ミル（Retzsch、三田村理研工業）で粉砕することにより、小麦未熟種子全粒粉を調製した。

米糠は、米（ヒノヒカリ）を小型精米器（象印製）で調製した。全粒粉は遠心ミル（Retzsch、三田村理研工業製）で調製した。

大麦糠は、大麦種子（六条大麦である中間母本農2、9551、マンテンボシ）をパーレスト小型搗精機（Kett製）で搗精し、種子重量のおよそ40%の研削粉を大麦糠として用いた。全粒粉は遠心ミル（Retzsch、三田村理研工業製）で調製した。

麦芽は、二条大麦から通常の製造方法で調製した。即ち、二条大麦を15 - 20 で4日間水に浸漬し発芽後、41 で12時間乾燥後、15分間で61 に昇温し、61 で2時間45分乾燥後、15分間で83 に昇温し、83 で4時間45分乾燥させた。その後、遠心ミル（Retzsch、三田村理研工業）で粉砕することにより麦芽全粒粉を調製した。

【0077】

実施例1（ODSカラムからの粗精製物の溶出条件の検討）

酵素反応液である緩衝液として、0.1Mクエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0）を用い、その4mLに0.1gのふくさやか小麦ふすま（製造例1に記載の方法で調製）を浸漬し、40 で12時間振とう保温した。なお、原料を緩衝液に添加混合し浸漬した後の酵素反応液のpHは、3.2であった。

その後、4 の低温下で8000 × g、20分間遠心分離し、上清を回収し酵素反応処理液とした。

酵素反応処理液中の、色素成分や、共存イオンを取り除くため、以下に手法を示す手法で精製した粗精製物を阻害試験に供した。

エタノール、続いて水で活性化させたODS樹脂（0.5g）（Sep Pak（ミリポア製））に、酵素反応処理液（4mL）を通液し、アンジオテンシンI変換酵素の阻害成分を吸着させた。樹脂を5mLの水で洗浄後、5mLの10%、25%、50%、95%の

10

20

30

40

50

エタノール水溶液を順次通し、それぞれの溶出液を回収した。溶出液は遠心エバポレータ（C V E - 3 1 0 0（東京理化学器械製））でエタノールを除去後、凍結乾燥し、粗精製物とした。溶出に用いたエタノール濃度と阻害活性（阻害率（％））及び粗精製物の収量（m g）の関係を表 1 に示す。

なお、表 1 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害率（％）は、以下に示す測定方法において、サンプル（粗精製物）の濃度を 1 6 7 μ g / m L に調製したときの阻害率を示す。

【 0 0 7 8 】

アンジオテンシン I 変換酵素の阻害率の測定は、Lieberman 変法に準じて行った。疑似基質として H i p - H i s - L e u を用い、アンジオテンシン I 変換酵素により H i p - H i s - L e u から遊離した馬尿酸（N-benzoylglycine）を酢酸エチルで抽出し、2 2 8 n m での吸光度変化から阻害活性を評価した。

アンジオテンシン I 変換酵素は、2 5 m U / m L の濃度で 0 . 2 M ホウ酸緩衝液（p H 8 . 3）に溶解した。H i p - H i s - L e u は 1 2 . 5 m M の濃度で 1 M N a C l を含む 0 . 2 M ホウ酸緩衝液（p H 8 . 3）に溶解した。

馬尿酸遊離反応は、阻害活性を測定するサンプル（5 0 μ L）に前記アンジオテンシン I 変換酵素を含む溶液（1 0 0 μ L）を添加し、3 7 °C で 5 分間インキュベート後、前記 H i p - H i s - L e u を含む溶液（1 0 0 μ L）を添加し、3 7 °C で 6 0 分間インキュベートした。反応後、0 . 5 M H C l（2 5 0 μ L）を加えて反応を終了させた。

その後、馬尿酸遊離反応後の液に 1 . 5 m L の酢酸エチルを添加し、2 0 0 0 \times g で 1 0 分間遠心分離し、5 0 0 μ L の上層を回収し、蒸発乾固させた。これに 3 m L の 1 M N a C l 溶液を添加し、2 2 8 n m の吸光度を測定した。なお、アンジオテンシン I 変換酵素阻害率（％）は、前記した式（1）を用いて行った。

【 0 0 7 9 】

【表 1】

エタノール (%)	収量 (mg)	阻害率 (%)
10	3.2	62.3
25	2.4	38.2
50	5.0	0
95	0.4	0

【 0 0 8 0 】

表 1 が示すように、阻害成分はエタノール濃度 1 0 % 及び 2 5 % で全て溶出した。また、エタノール濃度 1 0 % で溶出した場合に、約 6 割が回収されることが示された。

【 0 0 8 1 】

次に、前記工程において、エタノールの代わりにアセトニトリルを溶出溶媒として用いたこと以外は同様にして行った。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 8 2 】

【表 2】

アセトニトリル (%)	収量 (mg)	阻害率 (%)
10	2.8	64.9
20	2.5	39.8
50	3.7	0
70	0.8	56.9
99	1.2	25.7

【 0 0 8 3 】

表 2 が示すように、阻害成分は 2 0 % までの低濃度で溶出する高極性画分と 7 0 % 以上

で溶出する低極性画分とに分かれた。低極性画分は、高極性画分と比較して収量が少なく、阻害活性も低かった。また、エタノールで20%までに溶出する画分と比較すると、アセトニトリルの高極性画分は、回収率および阻害活性は同水準であった。従って、粗精製物の調製には、エタノールまたはアセトニトリルを用いることができると判断された。

なお、エタノールは、アセトニトリルに比べて、人体への安全性および廃液処理コストの点で利点がある。

以後、本実施例においては、10%のエタノールで溶出する画分を粗精製画分とし、その乾燥物を粗精製物として用いた。

【0084】

実施例2（酵素反応における至適pH条件の検討）

酵素反応液である緩衝液として、0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液（表3に示す各pHのもの）を用い、各4mLに0.2gのふくさやか小麦ふすま（製造例1に記載の方法で調製したもの）を前記緩衝液に添加混合し、40℃で12時間振とう保温した。

添加混合後の前記緩衝液、即ち各酵素反応液のpHは、表3に示すとおりであった。

その後、実施例1と同様の方法でODSカラムクロマトグラフィを行い、10%エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

pH値と粗精製物の阻害活性（阻害率（%））との関係、およびpH値と粗精製物の収量（mg）との関係を、図1および表3にそれぞれ示す。

なお、図1および表3におけるアンジオテンシンI変換酵素の阻害率（%）は、実施例1に示す測定方法と同様に、サンプル（粗精製物）の濃度を167μg/mLに調製した時の阻害率を示す。

【0085】

【表3】

酵素反応液のpH	阻害率（%）	収量（mg）
1.64	3.1	2.4
2.28	5.0	4.2
2.75	8.6	5.2
2.96	31.5	5.4
3.05	49.3	5.6
3.15	67.6	6.2
3.26	67.2	6.4
3.77	62.1	7.1
3.87	53.4	7.0
3.95	45.7	6.9
4.04	42.8	6.8
4.11	41.2	6.6
4.22	38.9	6.1
4.64	36.4	5.5
5.10	32.6	4.2
5.56	25.0	3.8
6.04	6.3	3.1
6.51	1.8	2.9

【0086】

図1および表3が示すように、アンジオテンシンI変換酵素の阻害率（%）は、原料混合後の酵素反応液のpH値が3.15、3.26のときが最も高く、阻害率が67%を超える活性を示す。次いで、pH3.77のときに阻害率62.1%の活性を示し、pH3

． 77 のときに阻害率 62.1% の活性を示し、pH 3.05 のときに阻害率 49.3% の活性を示し、pH 3.95 のときに阻害率 45.7% の活性を示した。

また、粗精製物の収量は、pH 3.77 のときに 7.1 mg と最も多く、pH 2.75 ~ 4.64 のときに 5 mg を超える収量が得られることが示され、前記の高い阻害率を示す pH で反応を行った場合には十分な収量が得られることが示された。

これらの結果、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害成分の生成反応に好適な pH の範囲は、pH 3.05 ~ 3.95、好ましくは pH 3.15 ~ 3.87、さらに好ましくは pH 3.15 ~ 3.77、最も好ましくは 3.15 ~ 3.26 と判断された。

【0087】

実施例 3 (酵素反応における至適温度条件の検討)

図 2 に示す各温度で酵素反応を行ったことを除いては、実施例 1 と同様の方法で酵素反応 (pH 3.2 で 12 時間振とう) を行った後、実施例 1 と同様の方法で ODS カラムクロマトグラフィを行い、10% エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

温度と粗精製物の阻害活性 (阻害率 (%)) との関係、および温度と粗精製物の収量 (mg) との関係を、それぞれ図 2 に示す。

なお、図 2 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害率 (%) は、実施例 1 に示す測定方法と同様に、サンプル (粗精製物) の濃度を 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したときの阻害率を示す。

【0088】

図 2 が示すように、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害率 (%) は、40 が最も高く、順に 35、30、45 と続いた。粗精製物の収量は、35 が最も高く、順に 40、30、45 と続いた。これらの結果、阻害成分の製造反応に好適な温度の範囲は、阻害率および収量の両方の点から、30 ~ 45 であり、より好ましくは 35 ~ 40 と判断された。

【0089】

実施例 4 (酵素反応における至適反応時間の検討)

図 3 に示す各 pH で酵素反応を行い、反応時間を 4, 8, 12, 16, 20, 24 時間の各時間としたことを除いては、実施例 1 と同様の方法で酵素反応 (温度 40 で振とう) を行った後、実施例 1 と同様の方法で ODS カラムクロマトグラフィを行い、10% エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

反応時間と粗精製物の阻害活性 (阻害率 (%)) との関係を図 3 に示す。

なお、図 3 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害率 (%) は、実施例 1 に示す測定方法と同様に、サンプル (粗精製物) の濃度を 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したときの阻害率を示す。

【0090】

図 3 が示すように、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害率 (%) は、いずれの pH 条件においても、阻害活性は反応開始 12 時間後まで増加し、その後 24 時間までほぼ一定水準で推移した。また、pH 2.7 で酵素反応を行った場合を除いて、反応開始 4 時間後までに大幅に増加が見られた。この結果、反応時間は 4 時間以上、好ましくは 12 時間以上が好適であると判断された。

【0091】

実施例 5 (ヘキサンによる脱脂処理の効果)

小麦ふすまは脂質を多量に含有し、これがタンパク質分解反応に影響を及ぼす可能性がある。そこで、ふすま 0.2 g を表 4 で示す各温度条件のヘキサン 5.0 mL 中に 1 時間浸漬した後、プフナ漏斗 (アズワン製) で吸引濾過し、20 で一晩乾燥して、脱脂小麦ふすまを調製した。

この脱脂小麦ふすま全量にクエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 4.0 mL を加え、実施例 1 と同様の方法で、酵素反応 (温度 40 で 12 時間振とう) を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液の pH は 3.2 であった。

その後、実施例 1 と同様の方法で ODS カラムクロマトグラフィを行い、10% エタノ

10

20

30

40

50

ール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

ヘキサン浸漬時の温度と粗精製物の阻害活性（阻害率（％））及び粗精製物の収量（mg）との関係を表4に示す。

なお、表4におけるアンジオテンシンI変換酵素の阻害率（％）は、実施例1に示す測定方法と同様に、サンプル（粗精製物）の濃度を167 μ g/mLに調製したときの阻害率を示す。また、表4において括弧内の数値は、ヘキサンによる脱脂処理を行わない未処理の原料を用いた場合に対する、阻害率の増加率（％）と収量の増加率（％）をそれぞれ示す。

【0092】

【表4】

ヘキサンによる脱脂処理温度	阻害率(%)	収量(mg)
未処理	56.4	5.51
10℃	63.3 (12.2%)	7.03 (27.6%)
20℃	63.8 (13.1%)	7.03 (27.6%)
30℃	63.6 (12.7%)	7.03 (27.6%)
40℃	62.3 (10.4%)	6.84 (24.1%)
50℃	60.7 (7.1%)	6.46 (17.2%)
60℃	58.8 (4.2%)	6.08 (10.3%)

10

【0093】

表4に示すように、小麦ふすまをヘキサンによる脱脂処理を行うことにより、粗精製物のアンジオテンシンI変換酵素の阻害率（％）および収量が増加することが示された。このうち、10～40で脱脂処理を行った場合、阻害率および収量の増加率が高く、これらの中でも10～30での脱脂処理区の増加率が高かった。また、特に20での脱脂処理区の増加率が最も高く、阻害効果の増加率は13.1％、収量は27.6％それぞれ増加した。

20

【0094】

実施例6（酵素反応におけるpH調整試薬の検討）

前述の実施例1～5では、前記酵素反応に0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液を用いた。そこで、本例では、他のpH調整試薬が適用可能か否かを検討した。試薬として、0.5N塩酸、5N酢酸、0.5Nギ酸、0.5Nリン酸、0.5N硫酸、クエン酸粉末を選定し、0.1gの小ぶすま（中国155号）に4mLの水を添加後、それぞれの試薬でpH3.2に調整した。

30

また、50mMクエン酸-リン酸カリウム緩衝液（pH3.0）を用いたものをコントロールとして用いた。なお、原料を該緩衝液に添加混合し浸漬した後の酵素反応液のpHは、3.2であった。

次いで、実施例1と同様の方法で、酵素反応（温度40で12時間振とう）を行った後、実施例1と同様の方法でODSカラムクロマトグラフィを行い、10％エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

なお、アンジオテンシンI変換酵素の阻害率（％）の測定は、実施例1に示す測定方法と同様に、サンプル（粗精製物）の濃度を167 μ g/mLに調製したときの阻害率を示す。その結果を表2に示す。

40

【0095】

【表 5】

	収量 (mg)	阻害率 (%)
0.5N 塩酸	3.4	49.1
5N 酢酸	3.3	48.5
0.5N ギ酸	3.2	47.6
0.5N 硫酸	3.4	46.6
クエン酸	3.3	50.2
50mMクエン酸-リン酸カリウム pH3.0 (酵素反応液のpHは3.2)	3.3	56.5

10

【0096】

この結果、クエン酸-リン酸緩衝液を用いたサンプルと比較して、阻害率および収量に大きな相違は認められなかった。従って、これらのpH調整試薬は、いずれもアンジオテンシンI変換酵素の阻害成分の製造に用いることができると判断された。

【0097】

実施例7 (酵素反応における塩濃度の影響の検討)

アンジオテンシンI変換酵素の阻害成分の製造反応における塩濃度の影響を調べるために、NaClを含む緩衝液を用いて製造反応を行った。

0.2gのふすまに、塩化ナトリウムを50mM、100mM、200mM、400mM含有するようにそれぞれ添加した0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)4.0mLを調整した後、実施例1と同様の方法で、酵素反応(温度40で12時間振盪)を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液のpHは3.2であった。

20

その後、実施例1と同様の方法でODSカラムクロマトグラフィを行い、10%エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

なお、アンジオテンシンI変換酵素の阻害率(%)の測定は、実施例1に示す測定方法と同様に行った。

【0098】

その結果、50mM以下では影響が無かったが、100、200、400mMの阻害率は、それぞれコントロール(塩化ナトリウム未添加)の80%、50%、40%に低下した。従って、アンジオテンシンI変換酵素の阻害成分の製造反応は、100mM以下の塩濃度で実施することが好ましいと判断された。

30

【0099】

実施例8 (小麦ふすまプロテアーゼの性質)

小麦ふすまタンパク質からアンジオテンシンI変換酵素の阻害ペプチドを生成するプロテアーゼの性質を調べるために、各種プロテアーゼインヒビター(プロテアーゼ阻害剤)を添加した場合の酵素反応への影響を調べた。

EDTAを1mM含有するように添加した0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)、PMSFを1mM含有するように添加した0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)、Pepstatin Aを20μM含有するように添加した0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)、E-64を4.4μM含有するように添加した0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)をそれぞれ調整した後、実施例1と同様の方法で、酵素反応(温度40で12時間振盪)を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液のpHは3.2であった。

40

その後、実施例1と同様の方法でODSカラムクロマトグラフィを行い、10%エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

ここで、EDTAはメタロプロテアーゼ、PMSFはセリンプロテアーゼ、Pepstatin Aはアスパラギン酸プロテアーゼ、E-64はシステインプロテアーゼのそれぞれインヒビターである。上記プロテアーゼインヒビターの添加濃度は、インヒビターとして通常用いる濃度である。

50

なお、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害率 (%) の測定は、実施例 1 に示す測定方法と同様に行った。

図 4 に、各種プロテアーゼ阻害剤とアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性の抑制率との関係を示す。図 4 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性の抑制率 (%) は、値が高いほど原料タンパク質からアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドが生成されにくくなっていることを示している。

【 0 1 0 0 】

図 4 が示すように、アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドを生成する酵素反応に対して、PMSF に約 15%、Pepstatin A に 100% の阻害がそれぞれ認められた。従って、アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの製造には、アスパラギン酸プロテアーゼが主要な役割を果たし、セリンプロテアーゼも共同で関与することが明らかになった。

アスパラギン酸プロテアーゼは、ペプシンに代表される酸性プロテアーゼであり、至適 pH は酸性側にある。

図 1 および表 3 が示すように、本発明におけるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドを生成する酵素反応の至適 pH が、酸性にあることからアスパラギン酸プロテアーゼがアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの生成に主要な働きをしていることが補足される。一方、種子の発芽の際には、システインプロテアーゼ活性が増加して、グルテンを分解することが知られているが (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 6271-6279. (2000))、システインプロテアーゼはアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの生成に関与しないことが、本実施例の結果より示された。

【 0 1 0 1 】

実施例 9 (小麦、大麦、米の種子からの粗精製物のアンジオテンシン I 変換酵素阻害効果)

製造例 1 に記載の方法で製造した、小麦、大麦、米の種子の各組織を原料に用いて粗精製物を製造し、アンジオテンシン I 変換酵素阻害効果を調べた。

小麦種子 (ふくさやか) からは、全粒粉、大ぶすま、小ぶすま、ぶすま、末粉、60% 粉、発芽種子の全粒粉、出穂 4 週後の未熟種子の全粒粉を用いた。なお、大ぶすま、小ぶすま、を合わせたものをぶすまとした。大麦種子からは、六条大麦である中間母本農 2 の糠、9551 の糠、マンテンボシの糠、二条大麦であるスカイゴールドの糠、スカイゴールドの全粒粉、スカイゴールドの麦芽全粒粉を用いた。米種子からは、ヒノヒカリの米糠を用いた。

上記の原料の粉 (0.2 g) を 0.1 M クエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 4.0 mL に加え、実施例 1 と同様の方法で、酵素反応 (温度 40 で 12 時間振とう) を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液の pH は 3.2 であった。

その後、実施例 1 と同様の方法で ODS カラムクロマトグラフィを行い、10% エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。

各粗精製物のアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 IC_{50} (mg/mL) を表 6 に示す。

なお、表 6 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 IC_{50} (mg/mL) の値は、アンジオテンシン I 変換酵素の活性の阻害率が 50% のときのサンプル (粗精製物) の終濃度の値を示す。阻害率 (%) は、実施例 1 に示す測定方法と同様に測定した。

【 0 1 0 2 】

10

20

30

40

【表 6】

		IC ₅₀ (mg/mL)
小麦 (ふくさやか)	全粒粉	0.32
	ふすま	0.08
	大ぶすま	0.1
	小ぶすま	0.07
	末粉	0.24
	60%粉	> 1.0
	発芽種子全粒粉	0.3
	未熟種子全粒粉	0.74
米 (ヒノヒカリ)	米糠	0.34
六条大麦	中間母本農2の糠	0.29
	9551の糠	0.38
	マンテンボシの糠	0.51
二条大麦	スカイゴールデンの糠	0.32
	スカイゴールデンの全粒粉	0.83
	スカイゴールデンの麦芽全粒粉	0.27

10

20

【0103】

表 6 が示すように、小麦種子 60% 粉を除き、いずれのサンプルもアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を示した。なかでも、小麦ふすま、大ぶすま、及び小ぶすまは、強い阻害活性を示した。

【0104】

実施例 10 (アンジオテンシン I 変換酵素の阻害ペプチドの精製)

小麦ふすまからアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性を示す成分 (ペプチド) を精製した。表 7 に示す工程の順に精製を行い、各工程での収量、阻害活性の測定を行った。阻害活性の測定は、実施例 9 と同様にして行った。

【0105】

まず、小麦ふすま (ふくさやか) 100 g を 500 mL の 0.1 M クエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) に懸濁し、実施例 1 と同様の酵素反応条件 (温度 40 °C で 12 時間振とう) で反応した。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の酵素反応液の pH は 3.2 であった。

その後、8000 × g で 20 分遠心分離し、上清 (酵素反応処理液) を回収した。なお、この上清を乾燥させた時に得られる酵素反応処理物の収量は、は 20.25 g で、IC₅₀ の値は 1040 μg/mL (1.04 mg/mL) であった。

次いで、この酵素処理反応液を、ODS 樹脂を充填したカラム (5 × 25 cm) YMC Gel ODS-AQ (ワイエムシィ製) に添加し、1000 mL の水でカラム洗浄を行った後、各 500 mL の 10%、25%、50%、95% のエタノール水溶液を通液し吸着成分を溶出した。この工程において、10% エタノール水溶液画分からは、他のエタノール水溶液画分に比べて阻害活性の顕著に強い、IC₅₀ の値が 86 μg/mL (0.086 mg/mL) を示す 2100 mg の粗精製物が得られた。

この 10% エタノール水溶液画分からエバポレーターを用いてエタノールを除去後、1 N アンモニア水溶液により pH 9.0 に調整し、1 N のアンモニア水溶液及び水で平衡化した陰イオン交換樹脂 (3 × 20 cm) アンバーライト AG MP-1 (BIO-RAD 製) に通液し、非吸着画分を回収した。なお、この画分から IC₅₀ の値が 45 μg/mL を示す 1200 mg の乾燥物が得られた。

【0106】

続いて、この陰イオン交換樹脂の非吸着画分の溶液を、ゲル濾過 HPLC を行うことで

30

40

50

、阻害活性を示す画分を分離精製した。まず、陰イオン交換樹脂の非吸着画分の溶液を、0.1%トリフルオロ酢酸を含む30%アセトニトリルで平衡化したSuperdex 75 HRカラム(1×30cm)(アマシャム製)に添加し、1mL/minの流速で流し、220nmでモニターした。装置としては、LC-10AD HPLCシステム(島津製)を用いて行った。吸光度のピークに基づき、F-1からF-11まで11のピークを回収した。結果を図5に示す。各ピークは、エバポレータで濃縮後、凍結乾燥し、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を測定した。このうち、強い阻害活性を示すF-3(IC₅₀:44μg/mL)及びF-7(IC₅₀:76μg/mL)について精製を進めた。

【0107】

上記の強い阻害活性を示したF-3とF-7の画分溶液を、C4カラムを用いた逆相HPLCを行うことで活性成分を分離精製した。F-3とF-7の画分溶液をC4カラム(1×25cm)(Jupiter 5μ C4、300A、Phenomenex製)に添加し、2mL/minの流速で流し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを直線勾配条件で通液し、活性成分を分離した。なお、F-3画分から得られた活性成分は、さらにODSカラム(1×25cm)(Jupiter 5μ C18、300A、Phenomenex製)で精製した。F-3の画分溶液からの溶出パターンを図6に、F-7の画分溶液からの溶出パターンを図7に示す。

各ピークはエバポレータで濃縮後、凍結乾燥し、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を測定した。このうち、F-3画分からは強い阻害活性を示す4成分、F-7画分からは3成分を単離した。

【0108】

単離した阻害成分の構造は、MALDI-TOF MS((Applied Biosystems製、米国)で分子量を分析し、アミノ酸シーケンサー(PPSQ-10、島津)でアミノ酸配列を分析した。結果を表8に示す。

その結果、F-3画分から単離されたアンジオテンシンI変換酵素の阻害成分は、Leu-Gln-Pro(ロイシルグルタミルプロリン; LQP)、Ile-Gln-Pro(イソロイシルグルタミルプロリン; IQP)、Leu-Arg-Pro(ロイシルアルギニルプロリン; LRP)、Ile-Arg-Pro(イソロイシルアルギニルプロリン; IRP)のアミノ酸配列からなるポリペプチドであることが明らかになった。また、F-7画分から単離されたアンジオテンシンI変換酵素の阻害成分は、Val-Tyr(バリルチロシン; VY)、Thr-Phe(スレオニルフェニルアラニン; TF)、Ile-Tyr(イソロイシルチロシン; IY)のアミノ酸配列からなるポリペプチドであることが明らかになった。

これらのうち、Ile-Gln-Proのアミノ酸配列からなるトリペプチド(イソロイシルグルタミルプロリン; IQP)は、これまでに報告のない新規のアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するポリペプチドである。

なお、これらはいずれも -または -グリアジンの部分配列であり、ふすまに含まれるグリアジンの分解物が内在性のプロテアーゼにより分解されることによって、アンジオテンシンI変換酵素の活性阻害を示すことが示唆された。

【0109】

本実施例により小麦ふすまから単離精製された阻害ペプチドは、特定保健用食品として認可されているVal-Tyr(バリルチロシン)を含めて、これと同等以上のアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性(IC₅₀)を有する7種類のポリペプチドを含むことが示された。この結果は、従来技術のように外来酵素を添加し、他の素材(イワシ、カツオ、ツナ、カゼイン、ラクトグロブリン、トウモロコシ、小麦グルテンなど)を用いる方法からは到達しえない顕著な効果である。

【0110】

10

20

30

40

【表 7】

工程	収量(mg)	IC ₅₀ (μg/mL)
酵素反応処理		
酵素反応処理液	20250	1040
逆相クロマトグラフィー (ODS)		
水	13300	> 1000
10% エタノール	2100	86
25% エタノール	1500	320
50% エタノール	2800	> 1000
95% エタノール	250	> 1000
陰イオン交換クロマトグラフィー (AG MP-1)		
非吸着画分	1200	45
ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 75)		
F-1	3	> 1000
F-2	475	130
F-3	178	44
F-4	117	112
F-5	75	580
F-6	68	620
F-7	87	76
F-8	9	> 1000
F-9	14	> 1000
F-10	8	> 1000
F-11	3	> 1000

10

20

【0111】

【表 8】

ペプチド	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μg/mL)	収量(mg)	報告の有無 (文献)
Val-Tyr (VY)	21.0	5.9	19.2	イワシ、大豆、合成ペ プチド
Thr-Phe (TF)	18.0	4.8	3.1	小麦胚芽
Ile-Tyr (IY)	3.4	1.0	5.8	イワシ、カツオ、小麦 胚芽
Leu-Gln-Pro (LQP)	2.2	0.78	15.0	トウモロコシ
Ile-Gln-Pro (IQP)	3.8	1.4	15.1	無
Leu-Arg-Pro (LRP)	0.21	0.08	12.5	トウモロコシ
Ile-Arg-Pro (IRP)	1.2	0.46	11.8	カツオ

30

40

【0112】

実施例 11 (粗精製物の大量調製)

ふくさやか小麦ふすま 1 kg に 5 L のヘキサンを加え、20 で 1 時間攪拌し、小麦ふすまを脱脂した。その後、ブフナー漏斗 (アズワン製) を用いて 2 L のヘキサンで洗浄し

50

ながら濾過した。脱脂したふすまは一晩室温で乾燥させた。

乾燥したふすまに10Lの水を加え、2NのHClでpH3.0に調整した。40で攪拌しながら12時間の内在性プロテアーゼによる酵素反応を行った。

酵素反応処理液を4に冷却し、10NアンモニアでpH7.0に調整した。その後、8000×gで20分遠心分離し、上清を回収し、プフナー漏斗で濾過した。次いで、活性炭を充填したカラム(5×30cm)(ヤシ殻系、粒状(ナカライテスク製))に濾液を通し、色素成分を除去した。

得られた濾液をODS樹脂を充填したカラム(5×40cm)(LiChroprep RP-18(Merck製))に通し、カラムを3Lの水で洗浄した。

アンジオテンシンI変換酵素の阻害成分は3Lの10%のエタノール水溶液、3Lの25%エタノール水溶液で溶離させ、エバポレータで濃縮し、凍結乾燥した。

10

【0113】

10%エタノール溶出画分から24.68g(IC₅₀:52μg/mL)の粗精製物Iが、25%エタノール溶出画分から16.91g(IC₅₀:193μg/mL)の粗精製物IIが、それぞれ得られた。これらはアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性をもつ粗精製物として食品に用いることができる。なお、上述のように陰イオン交換樹脂でさらに精製し、阻害活性を高めた製造物も同様に用いることができる。

【0114】

なお、粗精製物Iは白色であり、粗精製物IIは淡黄色であり、共に水に可溶である。血圧降下作用をもつ機能性食品材料として、加工食品などへの添加が可能である。例えば、固形物は、錠剤タイプの錠薬、粉末スープ等、溶解物は、茶、ジュース、清涼飲料等の飲料、ゼリー等として利用することができる。また、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで阻害活性を高めた製造物も同様に適用することができる。

20

【0115】

実施例12(酵素反応前の小麦ふすま洗浄処理の効果)

上記の実験結果から、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するペプチドは、グリアジンに含まれる配列であることが判明した。小麦グリアジンはプロラミンタイプの単純タンパク質の一種で60~90%エタノールに可溶であるが、水、酸性溶液、中性溶液に不溶のタンパク質である。なお、酵素処理反応においては、グリアジン以外の可溶性タンパク質が溶解し、夾雑物として共存する。そこで、酵素活性を保持したまま反応前に可溶性タンパク質を除去できれば、粗精製物の製造が簡便化できると予想される。

30

そこで、試行錯誤の結果、小ぶすま(中国155号)0.2gに、表9で示す各洗浄液4mLを添加し、室温(26)で攪拌後10分間振とうした。2000rpmで遠心分離し上清を除去し、沈殿である洗浄処理したふすまを得た。そこへ水を4mL添加し、10分間攪振とうし、同様に遠心後上清を除去した。この操作をもう一度繰り返した。

この洗浄ふすま全量に、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)4.0mLを加え、実施例1と同様の方法で、酵素反応(温度40で12時間振とう)を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液のpHは3.2であった。

その後、実施例1と同様の方法でODSカラムクロマトグラフィを行い、10%エタノール粗精製画分を乾燥させた粗精製物を調製した。結果を表9に示す。

40

なお、表9におけるアンジオテンシンI変換酵素の阻害活性IC₅₀(μg/mL)の値は、アンジオテンシンI変換酵素の活性の阻害率が50%のときのサンプル(粗精製物)の終濃度の値を示す。阻害率(%)は、実施例1に示す測定方法と同様に測定した。

【0116】

【表 9】

試料	洗浄液	原料混合後 洗浄液の pH	収量 (mg)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	水	pH6.7	1.7	60
2	50mMクエン酸-リン酸ナトリウム、pH3.0	pH3.2	2.2	58
3	50mMリン酸ナトリウム、pH7.0	pH6.9	1.6	56
4	50mMトリス-HCl、pH7.5	pH7.4	1.4	78
5	50mMホウ酸-四ホウ酸ナトリウム、pH8.3	pH8.2	1.3	82
6	コントロール（洗浄無し）	-	3.8	84

10

【0117】

表 9 が示すように、小麦ふすまに水を加えた懸濁後の pH は約 6.7 であった。従って、弱酸性の水（試料 1）、酸性の緩衝液（試料 2）および中性の緩衝液（試料 3）で洗浄後に製造した粗精製物は、洗浄処理を行わなかったコントロール（試料 6）に比べて、顕著に強いアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性（IC₅₀）を有することが明らかになり、高純度の粗製造物が得られることが示された。

それに対して、アルカリ性の緩衝液（試料 4, 5）で洗浄し製造した粗精製物の阻害活性は、コントロール（試料 6）との差が小さく、プロテアーゼの一部が溶出または失活したことが示された。

20

収量をみると、弱酸性の水（試料 1）、酸性の緩衝液（試料 2）および中性の緩衝液（試料 3）で洗浄後に製造した組成物は、はコントロール（試料 6）の 42 ~ 58% であった。洗浄することによる IC₅₀ 値の増加量を鑑みると、粗精製物の収量の低下を補うレベルであった。なお、アルカリ性の緩衝液（試料 4, 5）で洗浄後に製造した粗精製物は、34 ~ 37% であり、グリアジンの一部が溶出したことが示された。

また、反応物の色調はコントロール（試料 6）は薄褐色であるのに対し、各洗浄物（試料 1 ~ 5）は白色であり、色素成分が除去されたことが示された。

【0118】

この結果から、酸性 ~ 中性条件でふすまを洗浄処理することによって不要な夾雑タンパク質や色素成分を除去することができ、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害成分の含有率を高めることができることが明らかになった。

30

【0119】

実施例 13（洗浄処理において、次亜塩素酸ナトリウムがアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性に及ぼす影響）

前記小麦ふすまの酵素反応処理は 4 時間以上におよぶため、反応中の微生物汚染が懸念される。そこで、食品加工で一般的に使用される次亜塩素酸ナトリウムを含有する水溶液を用いてふすまを洗浄し、殺菌処理の影響を検討した。

【0120】

「洗浄殺菌処理」は、次亜塩素酸ナトリウムを含む水溶液を用いたこと以外は、実施例 12 の「洗浄処理」と同様の方法で行った。

まず、中国 155 号の小ぶすま 0.2 g に、実効塩素濃度 100 ppm（試料 8）および 600 ppm（試料 9）に希釈した次亜塩素酸ナトリウム（実効塩素濃度 6%（和光純薬製））を含む水溶液を 4 mL 添加し、室温（26℃）で 10 分間攪拌後、遠心分離で上清を除去した。得られた洗浄殺菌をした沈殿に、水 4 mL 添加し、室温（26℃）で 10 分間攪拌後、遠心分離で上清を除去した。さらに、この操作をもう一度繰り返し、次亜塩素酸ナトリウムを除去した。なお、上記工程において、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いずに、水のみで洗浄処理を行ったものを未殺菌のコントロール（試料 7）とした。

40

次いで、この洗浄殺菌したふすま沈殿に、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液（pH 3

50

． 0) 4 . 0 m L を加え、実施例 1 と同様の方法で、酵素反応 (温度 4 0 で 1 2 時間振とう) を行った。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液の p H は 3 . 2 であった。

その後、S e p P a k (ミリポア製) を用いて粗精製を行い、粗精製物を調製した。結果を表 1 0 に示す。

なお、表 1 0 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 IC_{50} ($\mu g / m L$) の値は、アンジオテンシン I 変換酵素の活性の阻害率が 5 0 % のときのサンプル (粗精製物) の終濃度の値を示す。阻害率 (%) は、実施例 1 に示す測定方法と同様に測定した。

【 0 1 2 1 】

【 表 1 0 】

試料	洗浄液	収量 (m g)	IC_{50} ($\mu g / m L$)
7	コントロール (水)	1.7	57
8	100 ppm 次亜塩素酸ナトリウム水溶液	1.6	58
9	600 ppm 次亜塩素酸ナトリウム水溶液	1.7	56

10

【 0 1 2 2 】

表 1 0 が示すように、洗浄処理において、実効塩素濃度 1 0 0 ~ 6 0 0 p p m に希釈した次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて小ぶすまを「洗浄殺菌処理」を行った場合 (試料 8 , 9) においても、水のみで洗浄処理を行ったコントロール (試料 7 : 未殺菌) に比べて、製造した粗精製物のアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 (IC_{50}) に差が見られないことが明らかになった。

20

この結果、実効塩素濃度 1 0 0 ~ 6 0 0 p p m に希釈した次亜塩素酸の使用による洗浄殺菌処理は、当該酵素反応に影響を及ぼさず、酵素反応液中の微生物の増殖が防止できることが明らかになった。

【 0 1 2 3 】

実施例 1 4 (酵素反応処理において、次亜塩素酸ナトリウムがアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性に及ぼす影響)

30

実施例 1 3 と同様の趣旨により、酵素反応中の微生物汚染を防ぐために、次亜塩素酸ナトリウムを含有する酵素反応液を用いた場合のアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性に及ぼす影響を検討した。

まず、中国 1 5 5 号の小ぶすま 0 . 2 g に、実効塩素濃度 1 0 0 p p m (試料 1 1) もしくは 6 0 0 p p m (試料 1 2) の次亜塩素酸ナトリウムを含む 5 0 m M クエン酸 - リン酸ナトリウム (p H 3 . 0) 各 4 m L を添加し、実施例 1 と同様の方法で、4 0 で 1 2 時間の酵素反応を行った。また、上記反応において、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いずに、5 0 m M クエン酸 - リン酸ナトリウム (p H 3 . 0) のみで酵素反応処理を行ったものをコントロール (試料 1 0) とした。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の各酵素反応液の p H は 3 . 2 であった。

40

その後、S e p P a k (ミリポア製) を用いて粗精製を行い、粗精製物を調製した。結果を表 1 1 に示す。

なお、表 1 1 におけるアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 IC_{50} ($\mu g / m L$) の値は、アンジオテンシン I 変換酵素の活性の阻害率が 5 0 % のときのサンプル (粗精製物) の終濃度の値を示す。阻害率 (%) は、実施例 1 に示す測定方法と同様に測定した。

【 0 1 2 4 】

【表 1 1】

試料	酵素反応液	収量 (mg)	IC ₅₀ (μg/mL)
10	コントロール (次亜塩素酸ナトリウム未含有)	3.9	84
11	100 ppm 次亜塩素酸ナトリウム含有	4.0	83
12	600 ppm 次亜塩素酸ナトリウム含有	4.0	84

10

【0125】

表 1 1 が示すように、酵素反応処理において、実効塩素濃度 100 ~ 600 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを含有する酵素反応液を用いた場合 (試料 11, 12) においても、酵素反応液のみで酵素処理を行ったコントロール (試料 10: 次亜塩素酸ナトリウム未含有) に比べて、製造した粗精製物のアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性 (IC₅₀) に差が見られないことが明らかになった。

この結果、実効塩素濃度 100 ~ 600 ppm を含有するように添加された次亜塩素酸ナトリウムは、当該酵素反応に影響を及ぼさず、酵素反応液中の微生物の増殖が防止できることが明らかになった。

なお、残存する次亜塩素酸ナトリウムは、反応後、60 以上の加熱、又は Sep Pak による粗精製操作で完全に除去することができる。

20

【0126】

実施例 15 (ODS カラム処理粗精製物の高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響)

小麦ふすまの ODS カラム吸着後の 10% エタノール溶出粗精製物 (ODS カラム処理粗精製物) を、高血圧自然発症ラットに“単回投与”し、血圧に及ぼす影響を調べた。

まず、小麦ふすま (ふくさやか) 100 g を 500 mL の 0.1 M クエン酸 - リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) に懸濁し、実施例 1 と同様の酵素反応条件 (温度 40 で 12 時間振とう) で反応した。なお、原料を緩衝液に添加混合した後の酵素反応液の pH は 3.2 であった。

その後、8000 × g で 20 分遠心分離し、上清 (酵素反応処理液) を回収した。次いで、この酵素処理反応液を、ODS 樹脂を充填したカラム (5 × 25 cm) YMC Gel ODS - AQ (ワイエムシ製) に添加し、1000 mL の水でカラム洗浄を行った後、500 mL の 10% エタノール水溶液を通液し吸着成分を溶出した。

30

この 10% エタノール水溶液画分からは、IC₅₀ の値が 86 μg/mL (0.086 mg/mL) を示す 2100 mg の粗精製物が得られた。これを“ODS カラム処理粗精製物”として、以下の試験に用いた。

【0127】

動物実験には、11 週齢の雄性ラット (SHR/NCrlCr1j) を日本チャールス・リバー社より入手して使用した。ラットは、室温 21 ± 3、相対湿度 50 ± 20%、照射時間 12 時間/日 (7:00 ~ 19:00)、喚起回数 10 - 15 回/時間の条件下で、オリエンタル酵母社の精製固形飼料 AIN - 93 M を与え、飲料水は水道水を自由に摂取できる環境で予備飼育して馴化した。

40

馴化後、16 週齢で収縮時血圧が 180 mmHg 以上を示すものを選抜し、血圧と体重 (340 - 370 g) が各群で平均化するように以下の 4 群 (各群 6 匹ずつ)、すなわち、“ODS カラム処理粗精製物”を 10 mg/体重 kg 投与する群、50 mg/体重 kg 投与する群、200 mg/体重 kg 投与する群、投与しない群 (0 mg/kg 投与する群: コントロール群) に分け、当該粗精製物の投与を行った。

当該粗精製物の投与は、各群で規定された前記所定量を投与できるように蒸留水で溶解した各被験液を、午前 10 - 12 時に、ゾンデによる強制経口投与することで行った。コントロール群には、同量の蒸留水を投与した。なお、投与は“1 回のみ”行った (単回投

50

与)。

そして、各群について、投与前および投与後2、4、6および8時間後、測定前に15分間の前保温(38℃)を施した後、非観血式血圧心拍測定装置(ソフトロン社、BP-98A)を用いて尾静脈圧を測定した。

また、投与前と投与後との値の統計学的な差の検定はStudent's paired t-testで行った。また、コントロール群および各投与群間の検定はStudent's t-testにより行った。すべての値は平均値±標準誤差で表記し、両検定で有意水準は5%とした。結果を図8に示す。

なお、図8における各測定値において、投与前との有意確率Pが0.05より小さい場合には“*”で、0.01より小さい場合には“**”で記した。また、各時間の測定値において、コントロールとの有意確率Pが0.05より小さい場合には“#”で、0.01より小さい場合には“##”で記した。なお、以下の図9、10においてもこれらの記号は同様の意味を有するものである。

【0128】

その結果、“ODSカラム処理粗精製物”10mg/体重kgを投与した群は、投与前214.4±13.2mmHgから投与2時間後195.9±12.1mmHgに血圧が有意に低下した(投与前に対して降圧値-18.4mmHg; P<0.05)。その後血圧は若干増加するものの投与後6時間まで投与前との有意な降圧作用が認められた。

また、50mg/体重kgおよび200mg/体重kgを投与した群においても、同様に投与2時間後に血圧の有意な低下が認められ(P<0.05)、その後降圧は持続し、投与8時間後も有意な降圧作用が認められた。“ODSカラム処理粗精製物”の降圧作用は10-200mg/kg投与量の範囲では用量依存的であった。

それに対して、コントロール群の投与前の血圧は215.8±11.0mmHgであったが、コントロール群の投与2-8時間後に血圧の有意な低下は認められなかった。

【0129】

実施例16(Ile-Gln-Proの高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響)

Ile-Gln-Proを高血圧自然発症ラットに“単回投与”し、血圧に及ぼす影響を調べた。

まず、ふすまから単離された新規なACE阻害ペプチドIle-Gln-Pro(イソロイシルグルタミルプロリン; IQP)は、純度95%以上の合成ペプチドを(株)ペプチド研究所に依頼合成した。これを以下の試験に用いた。

動物実験には、11週齢の雄性ラット(SHR/NCr1Cr1j)を日本チャールス・リバー社より入手し、実施例15と同様の環境で予備飼育して馴化した。

馴化後、13週齢で収縮時血圧が180mmHg以上を示すものを選抜し、血圧と体重(300-320g)が各群で平均化するように以下の3群(各群6匹ずつ)、すなわち、“Ile-Gln-Pro”を1.5mg/体重kg投与する群、15mg/体重kg投与する群、投与しない群(0mg/体重kg投与する群:コントロール群)に分け、“Ile-Gln-Pro”の投与を行った。

Ile-Gln-Proの投与は、各群で規定された前記所定量を投与できるように蒸留水で溶解した各被験液を、午前10-12時に、ゾンデによる強制経口投与することで行った。コントロール群には、同量の蒸留水を投与した。なお、投与は1回のみ行った(単回投与)。

そして、各群について、投与前および投与後2、4、6および8時間後、測定前に15分間の前保温(38℃)を施した後、非観血式血圧心拍測定装置(ソフトロン社、BP-98A)を用いて尾静脈圧を測定した。

また、投与前と投与後との値の統計学的な差の検定、コントロール群および各投与群間の検定は、実施例15と同様にして行った。結果を図9に示す。

【0130】

その結果、“Ile-Gln-Pro”を1.5mg/体重kgおよび15mg/体重kg投与した群では、血圧は用量依存的な低下を示し、それぞれ投与前194.4±13

10

20

30

40

50

・3 mmHg および 194.5 ± 16.2 mmHg から投与4時間後 181.6 ± 6.7 mmHg および 172.2 ± 10.0 mmHg (降圧値 - 12.8 mmHg および - 22.3 mmHg ; $P < 0.05$) に血圧は有意に低下した。

さらに投与8時間後には 181.4 ± 6.2 mmHg および 166.9 ± 10.1 mmHg まで血圧は低下し (降圧値 - 13.0 mmHg および - 27.6 mmHg ; $P < 0.05$)、コントロール群に比してそれぞれ有意な降圧が認められた (コントロール群の投与8時間後の血圧 191.1 ± 4.1 mmHg に対して ; $P < 0.05$)。

それに対して、コントロール群の投与前の血圧は 193.3 ± 13.2 mmHg であり、試験開始後も血圧の変動はなかった。

【0131】

10

実施例17 (ODSカラム処理粗精製物の高血圧自然発症ラットへの長期投与試験)

小麦ふすまのODSカラム吸着後の10%エタノール溶出粗精製物 (ODSカラム処理粗精製物) を、高血圧自然発症ラットに“長期投与”し、血圧に及ぼす影響を調べた。

“ODSカラム処理粗精製物”は、実施例15で得られたものを以下の試験に用いた。

動物実験には、11週齢の雄性ラット (SHR/NCrlCr1j) を日本チャールス・リバー社より入手し、実施例15と同様の環境で予備飼育して馴化した。

馴化後、14週齢で収縮時血圧が180 mmHg以上を示すものを選抜し、血圧と体重 (300 - 330 g) が各群で平均化するよう以下に以下の3群 (各群6匹ずつ)、すなわち、“ODSカラム処理粗精製物”を0.02%含有する水を投与する群、0.1%含有する水を投与する群、含まない水を投与する群 (0%含有する水を投与する群 : コントロール群)、に分け、当該粗精製物の投与を行った。

20

当該粗精製物の投与は、各群で規定された前記所定濃度になるように蒸留水で溶解した各被験液を飲料水として与え、“長期間にわたり自由に”摂取させた。コントロール群には蒸留水を与えた。

そして、各群について、それぞれ投与前と投与開始から5、10、15、20および25日後の午前10 - 12時に、測定前に15分間の前保温 (38℃) を施した後、非観血式血圧心拍測定装置 (ソフトロン社、BP-98A) を用いて尾静脈圧を測定した。

また、投与前と投与後との値の統計学的な差の検定、コントロール群および各投与群間の検定は、実施例15と同様にして行った。結果を図10に示す。

【0132】

30

その結果、0.02%含有する水を投与した群は、投与開始から10日後にコントロールと比して血圧が有意に低下した (コントロール群の10日後の血圧 200.5 ± 5.4 mmHg、投与前 198.6 ± 4.8 mmHg、投与10日後 193.4 ± 5.2 mmHg ; $P < 0.05$)。さらに連続投与により投与後15日後まで作用が継続され、コントロール群に比して有意な降圧値 - 11.1 mmHg (コントロール群の投与15日後の血圧 204.2 ± 5.2 mmHg に対して $P < 0.05$) を示した。その後、降圧作用は減少するものの、コントロールと比して投与25日後まで有意に降圧を持続した (コントロール群に対して ; $P < 0.05$)。

また、0.1%含有する水を投与した群は、投与開始から5日後にコントロールおよび投与前と比して血圧が有意に低下した (コントロール群の5日後の血圧 201 ± 6.7 mmHg、投与前 197.1 ± 4.9 mmHg、投与5日後 185.0 ± 5.2 mmHg ; $P < 0.01$)。その後、降圧作用は10日後まで増強された (コントロール群の10日後の血圧 200.5 ± 5.4 mmHg、投与前 197.1 ± 4.9 mmHg、投与10日後 183.0 ± 5.6 mmHg ; $P < 0.01$)。降圧作用は15日後以降に減少するものの、20日後まで投与前との有意差を保った (20日後の投与前に対して ; $P < 0.05$ 、コントロール群に対して ; $P < 0.01$)。その後、コントロールと比して投与25日後まで有意に降圧作用を持続した (コントロール群に対して ; $P < 0.01$)。

40

【産業上の利用可能性】

【0133】

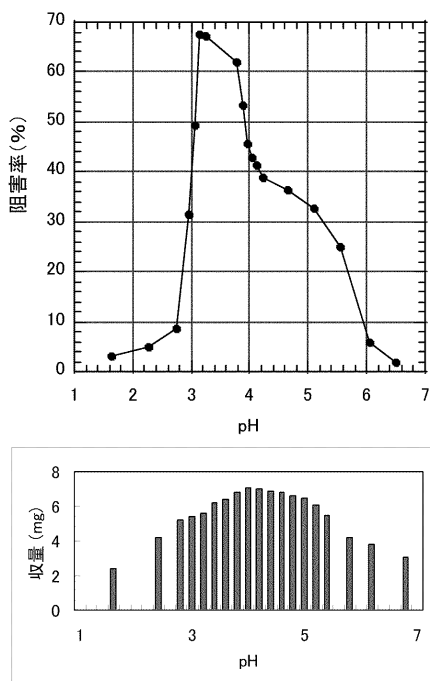
本発明によれば、従来は廃棄の対象であった小麦ふすま、大麦糠、米糠を有効利用し、

50

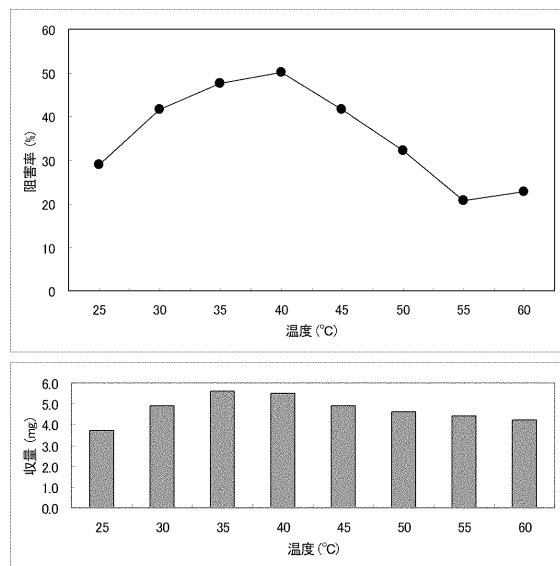
医薬品、機能性食品などとして有用なアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有するポリペプチドが提供される。

従って、本発明は食品分野、医薬品分野等において、有効に利用することができる。

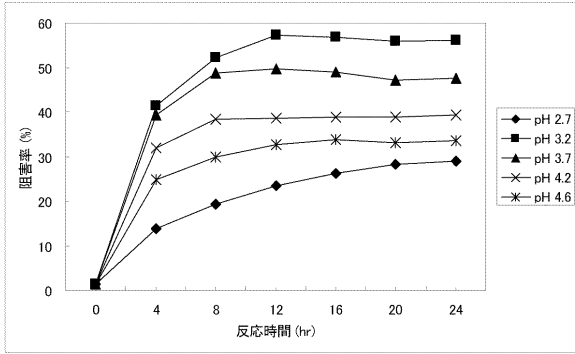
【 図 1 】



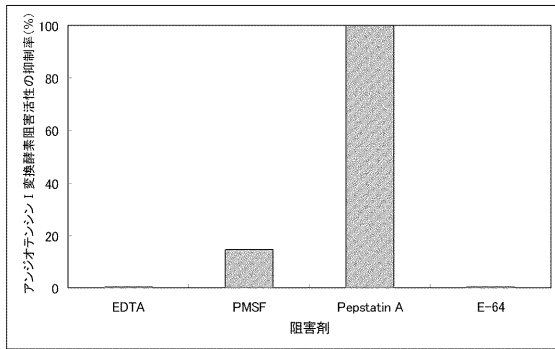
【 図 2 】



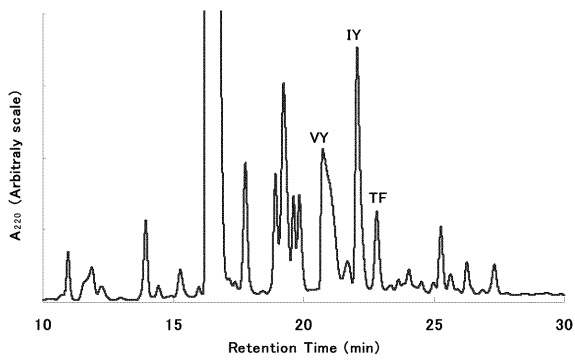
【 図 3 】



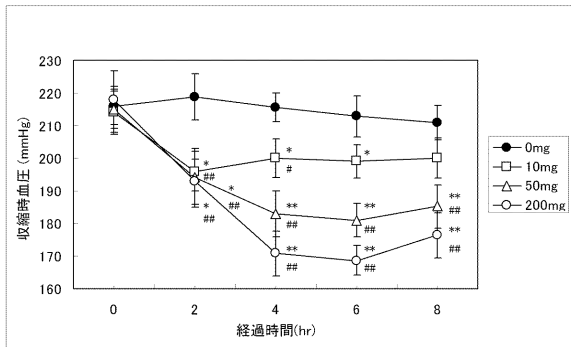
【 図 4 】



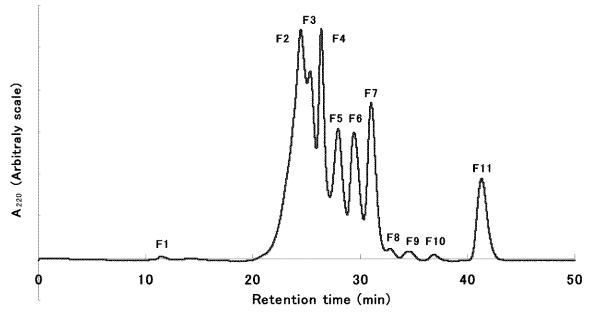
【 図 7 】



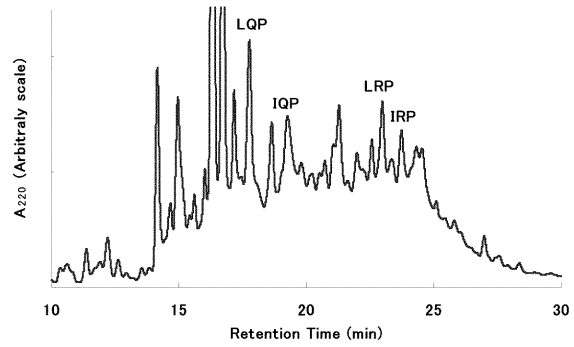
【 図 8 】



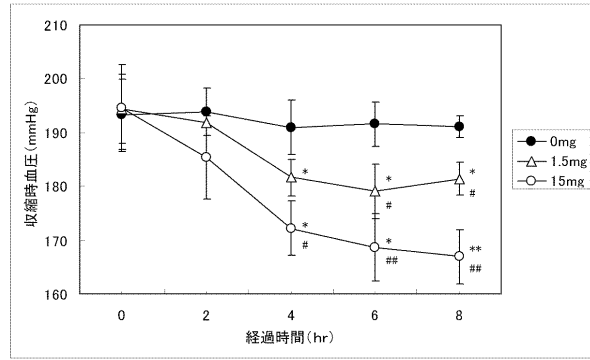
【 図 5 】



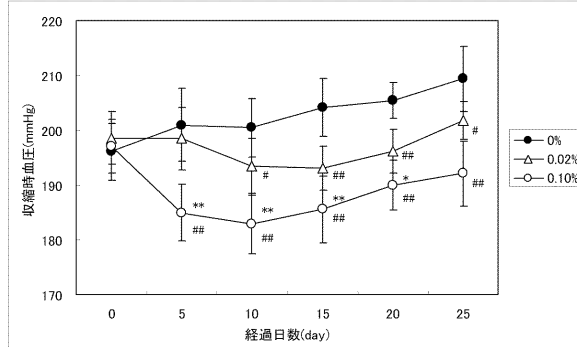
【 図 6 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	C 0 7 K	5/08		
A 2 3 L	1/305	(2006.01)	A 2 3 L	1/305		
C 1 2 N	9/48	(2006.01)	C 1 2 N	9/48		

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA11 BA12 CA31 CA32 DA57 EA23 EA24
FA16 FA70 GA25