

(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2017-149692

(P2017-149692A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/18	2 B 1 5 0
A 6 1 K 36/899 (2006.01)	A 6 1 K 36/899	4 B 0 1 8
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 3
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-34926 (P2016-34926)
 (22) 出願日 平成28年2月25日 (2016.2.25)

(71) 出願人 304027279
 国立大学法人 新潟大学
 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
 (71) 出願人 591066362
 築野食品工業株式会社
 和歌山県伊都郡かつらぎ町大字新田94番地
 (74) 代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍
 (72) 発明者 谷口 正之
 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地
 新潟大学工学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体防御用組成物及びその用途

(57) 【要約】

【課題】本発明は、優れた生体防御作用を有する新規な組成物を提供することを課題とする。

【解決手段】米糠タンパク質酵素加水分解物又は以下の(A)~(C)のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が600以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する生体防御用組成物。

(A) 配列番号1~24のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A)のアミノ酸配列において1個~数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記(A)又は(B)のアミノ酸配列において少なくとも4つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

米糠タンパク質酵素加水分解物を含有する生体防御用組成物。

【請求項 2】

米糠タンパク質酵素加水分解物が、分子量 1000 ~ 3000 であり、等電点が 10 以上のペプチドを含有する請求項 1 に記載の生体防御用組成物。

【請求項 3】

米糠タンパク質酵素加水分解物が、以下の (A) ~ (C) のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が 600 以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する請求項 1 又は 2 に記載の生体防御用組成物。

10

(A) 配列番号 1 ~ 24 のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A) のアミノ酸配列において 1 個 ~ 数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記 (A) 又は (B) のアミノ酸配列において少なくとも 4 つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

【請求項 4】

酵素がペプシン、トリプシン、キモトリプシン及びパパンからなる群より選択される 1 以上である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の生体防御用組成物。

【請求項 5】

以下の (A) ~ (C) のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が 600 以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する生体防御用組成物。

20

(A) 配列番号 1 ~ 24 のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A) のアミノ酸配列において 1 個 ~ 数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記 (A) 又は (B) のアミノ酸配列において少なくとも 4 つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

【請求項 6】

生体防御が抗菌、抗炎症及び創傷治癒からなる群より選択される 1 以上である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の生体防御用組成物。

【請求項 7】

30

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の生体防御用組成物を含有する飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品又は飼料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体防御用組成物及びこれを含有する飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品及び飼料に関する。

【背景技術】

【0002】

人は、加齢とともに発音、咀嚼、嚥下、唾液分泌などの口腔機能が低下する。なかでも唾液分泌が低下すると、歯周病や口内炎、齲蝕（虫歯）、口臭といった口腔疾患が増大する。また、皮膚の疾患や傷害によって皮膚のバリア機能や保湿機能が低下する。更に、乳幼児や高齢者の免疫機能は低いため、病原菌に感染しやすい。これらの機能の低下は、国民の健康の維持と増進にとって重大な課題である。

40

【0003】

これまで、口腔ケア用品等に添加される抗菌成分又は殺菌成分としては、エタノール等の有機溶剤や抗生物質などが提案されている（例えば、特許文献 1 参照）。しかしながら、前記有機溶剤を用いた口腔ケア用品は、体質的に受け入れられないという問題、乳幼児には使用できないという問題があり、前記抗生物質を用いた口腔ケア用品では、長期間使用により耐性菌が出現するという問題がある。

50

【0004】

一方、動物、植物、昆虫、微生物等の様々な生物には、外界からの病原微生物の侵入に対して自己防御するための自己生体防御機構が本来備っており、多糖分解酵素や溶菌酵素などのタンパク質やアミノ酸が約10個～約50個程度からなる抗菌ペプチドを生物自らが産生している。これらの抗菌成分は、前記抗生物質と比較して広範囲な抗菌活性を有し、耐性菌を生じさせにくいという特性を有することから、口腔用抗菌剤としての利用が期待されている。

【0005】

生物由来の抗菌剤として、例えば、イネ由来の抗菌タンパク質であるオリザシスタチンが知られている。しかしながら、オリザシスタチンは、歯周病原菌 (*Porphyromonas gingivalis*等)のジンジパインを阻害することが知られているものの、その菌体に対して直接抗菌活性を示すものではない。

イネゲノム中にはディフェンシンなど既知の抗菌タンパク質のホモログが存在するが、イネの生体防御に対する寄与は不明である。

【0006】

特定のタンパク質又はその一部からなるフラグメントが感染防御作用、生体防御作用等を有することが報告されている(例えば、特許文献1、2等)。

【0007】

しかしながら、未だ、植物由来であって、優れた生体防御作用を有する組成物の開発が望まれているのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2013-60416号公報

【特許文献2】特開2014-237626号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、優れた生体防御作用を有する新規な組成物を提供することを課題とする。本発明における組成物は、溶血活性を有しないため、安全に使用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

〔1〕米糠タンパク質酵素加水分解物を含有する生体防御用組成物。

〔2〕米糠タンパク質酵素加水分解物が、分子量1000～3000であり、等電点が10以上のペプチドを含有する前記〔1〕に記載の生体防御用組成物。

〔3〕米糠タンパク質酵素加水分解物が、以下の(A)～(C)のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が600以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する前記〔1〕又は〔2〕に記載の生体防御用組成物。

(A) 配列番号1～24のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A)のアミノ酸配列において1個～数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記(A)又は(B)のアミノ酸配列において少なくとも4つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

〔4〕酵素がペプシン、トリプシン、キモトリプシン及びパパンからなる群より選択される1以上である前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の生体防御用組成物。

〔5〕以下の(A)～(C)のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が600以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する生体防御用組成物。

(A) 配列番号1～24のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B)(A)のアミノ酸配列において1個～数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C)前記(A)又は(B)のアミノ酸配列において少なくとも4つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

〔6〕生体防御が抗菌、抗炎症及び創傷治癒からなる群より選択される1以上である前記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の生体防御用組成物。

〔7〕前記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の生体防御用組成物を含有する飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品又は飼料。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、優れた生体防御作用を有する新規な組成物及びその用途(飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品又は飼料等)を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、ペプシンを用いた米糠タンパク質の加水分解物の等電点電気泳動による分画を示す。

【図2】図2は、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いた米糠タンパク質の加水分解物の等電点電気泳動による分画を示す。

【図3】図3はペプシンを用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Porphyromonas gingivalis*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図4】図4は、ペプシンを用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Streptococcus mutans*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図5】図5は、ペプシンを用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Propionibacterium acnes*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図6】図6は、ペプシンを用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Candida albicans*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図7】図7は、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Porphyromonas gingivalis*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図8】図8は、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Streptococcus mutans*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図9】図9は、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Propionibacterium acnes*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図10】図10は、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いて米糠タンパク質を加水分解したサンプルを等電点電気泳動によって分画したフラクションの*Candida albicans*に対する抗菌活性を示すグラフである。

【図11】図11は、合成ペプチドの管腔形成促進活性を示すグラフである。

【図12】図12は、合成ペプチドの管腔形成促進活性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、米糠タンパク質酵素加水分解物を含有する生体防御用組成物を提供する。

【0014】

〔米糠タンパク質酵素加水分解物〕

米糠タンパク質酵素加水分解物は、米糠タンパク質を酵素により加水分解することによ

10

20

30

40

50

り得られる。

原料となる米糠は、玄米を精米することにより得ることができる。米糠は、白米部分の含量が少ないことが好ましい。好ましくは精米歩合が85%以上の精米により得られる米糠であり、より好ましくは精米歩合が90%以上の精米により得られる米糠であり、さらに好ましくは精米歩合が95%以上の精米により得られる米糠である。また、米糠には脱脂米糠が含まれ、米糠から米油を抽出した残渣である脱脂米糠は、本発明において米糠抽出物の原料として好適に用いることができる。

酵素として例えば、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン等が挙げられる。用いる酵素に応じた至適pH及び至適温度で米糠タンパク質を加水分解することが好ましい。米糠タンパク質酵素加水分解物は、分子量が例えば1000~3000であってもよく、1000~2000であってもよく、2000~3000であってもよく、1500~2500であってもよい。米糠タンパク質酵素加水分解物は、pH7における実効電荷が正であることが好ましく、+1~5であることがより好ましい。米糠タンパク質酵素加水分解物は、等電点が例えば10以上であることが好ましく、10.5以上であることがより好ましい。

【0015】

〔タンパク質又はペプチド〕

米糠タンパク質酵素加水分解物は、例えば、以下の(A)~(C)のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が600以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチド(以下、本発明におけるタンパク質又はペプチドともいう)を通常含有している。

(A) 配列番号1~24のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A)のアミノ酸配列において1個~数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記(A)又は(B)のアミノ酸配列において少なくとも4つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

【0016】

以下に、配列番号1~24を示す。なお、配列番号1~12の横の括弧書きにおいて「アメリカの国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information, NCBI)に登録されているタンパク質の遺伝子番号(Gene Identity)とタンパク質名」を示す。

【0017】

配列番号1 (gi|54290601 (hypothetical protein [*Oryza sativa* Japonica Group]))

1 Met Ser Gly Glu Gly Gly Leu Glu Glu Glu Pro Pro Leu Gly Ala 15
 16 Val Lys Leu Ala Arg Leu Ala Leu Ala Leu Val Ala Lys Asp Gly 30
 31 Arg Gly Asp Gly Cys Asp Asp Val Gly Thr Gly Lys Gly Asp Ala 45
 46 Ser Asp Asp Gly Gly Gly Arg Cys Gly Asp Arg Met Ala Gly Ala 60
 61 Asp Ser Gly Gly Asp Arg Ala Val Gly His His Ala Val Ala Arg 75
 76 Ile Gly Glu Arg Glu Arg Leu Pro Ala Ala Ile Gly Arg Ser Gly 90
 91 Leu Asn Ser Ser Met Ala Thr Ile Asn Arg Lys Met Thr Arg Arg 105
 106 Gly Ala Arg Val Asp Gly Gly Gly Ser Asp Trp Arg Ser Asn Arg 120
 121 Trp Val Gly Gln Phe Gly Arg Val Ala Arg Thr Phe His

(下線部分はペプチドの配列番号13に相当する。)

【0018】

配列番号 2 (gi|24414269 (Putative transaminase [*Oryza sativa* Japonica Group]))

1 Met Ala Thr Gly Gln Cys Met Gln Ala Leu Pro Met Glu Val Trp 15
 16 Asn Ser Trp Leu Leu Glu Lys Ala Val Leu Pro Ala Leu Asp Val 30
 31 Ala Pro Pro Val Lys Ile Gly Gly Pro Arg Arg Thr Ser Val Leu 45
 46 Arg Asn Pro Asn Met Glu Lys Leu Gln Lys Gly Tyr Leu Phe Pro 60
 61 Glu Ile Ser Ile Lys Arg Glu Glu His Leu Lys Lys Tyr Pro Asp 75
 76 Ala Lys Val Ile Ser Leu Gly Ile Gly Asp Thr Thr Glu Pro Ile 90 10
 91 Pro Ser Ile Val Thr Ser Ala Met Ala Glu Asp Val Pro Phe Pro 105
 105 Phe Cys Arg Tyr Ala Leu Ala Leu Ser Thr Pro Glu Gly Tyr Gln 120
 121 Gly Tyr Gly Pro Glu Gln Gly His Lys Asn Leu Arg Lys Glu Ile 135
 136 Ala Asp Lys Val Tyr Pro Asp Met Gly Ile Lys Glu Ser Glu Val 150
 151 Phe Ile Ser Asp Gly Ala Gln Cys Asp Ile Ala Arg Leu Gln Thr 165
 166 Leu Phe Gly Pro Asn Val Thr Ile Ala Val Gln Asp Pro Thr Phe 180
 181 Pro Gly Tyr Val Asp Asn Gly Val Ile Met Gly Gln Thr Gly Lys 195 20
 196 Ala Asp Asp Gly Gly Arg Tyr Ala Gly Ile Glu Tyr Met Arg Cys 210
 211 Ala Pro Glu Asn Ala Phe Phe Pro Asp Leu Ser Arg Val Arg Arg 225
 226 Thr Asp Val Ile Phe Phe Cys Ser Pro Asn Asn Pro Thr Gly His 240
 241 Ala Ala Ser Arg Glu Gln Leu Arg Gln Leu Val Glu Leu Ala Arg 255
 256 Arg Asn Gly Ser Ile Ile Val Phe Asp Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr 270
 271 Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Pro Arg Ser Ile Tyr Glu 285
 286 Ile Pro Gly Ala Arg Glu Val Ala Ile Glu Val Ser Ser Phe Ser 300 30
 301 Lys Phe Ala Gly Phe Thr Gly Val Arg Leu Gly Trp Ala Val Val 315
 316 Pro Asp Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Val Pro Val Ala Arg Asp 330
 331 Phe Asp Arg Val Val Cys Thr Cys Phe Asn Gly Ala Ser Gly Ile 345
 346 Ala Gln Ala Gly Gly Val Ala Cys Leu Ser Thr Glu Glu Gly Arg 360
 361 Gly Ala Val Ala Arg Val Val Gly Val Tyr Arg Glu Asn Ala Arg 375
 376 Val Leu Val Glu Thr Phe Arg Ser Leu Gly Lys Glu Val His Gly 390
 391 Gly Gly Asp Ala Pro Tyr Val Trp Val Arg Phe Pro Gly Arg Arg 405 40
 406 Ser Trp Asp Val Phe Ala Glu Ile Leu Glu Lys Thr His Val Ile 420
 421 Thr Val Pro Gly Ser Gly Phe Gly Pro Gly Gly Glu Gly Phe Ile 435
 436 Arg Val Ser Ala Phe Asn Ser Arg Asp Lys Val Leu Glu Ala Cys 450
 451 Gln Arg Leu Lys Ser Phe Leu Ala

(下線部分はペプチドの配列番号14に相当する。)

【 0 0 1 9 】

配列番号 3 (gi21741951 (OSJNBa0035B13.15 [Oryza sativa Japonica Group]))

1 Met Gly Asn Glu Met Val Ile Asp Leu Ser Leu Ser Gly Met Thr 15
16 Gly Val Gly Thr Ile Gln Ser Pro Val Leu His Pro His Ser Arg 30
31 Thr Pro Val Pro Ala Thr Thr Ile Val Arg Gln Ser Ala Glu Ser 45
46 Gln Ala Leu His Arg Ala Pro Pro Val Arg Gln Pro Pro Gly Ala 60
61 Pro Pro Leu Ala Ala Phe Ser Arg Thr Ala Trp Ala Arg Ala Leu 75
76 Ser Arg Pro Ser Val Asp Ala Ser Ser Gly Asp Ala Ile Tyr Gly 90
91 Ser Arg Arg Arg Arg Glu Pro Ser Ser Thr Arg Tyr Arg Glu Thr 105
106 Leu Pro Pro Asp Lys Ala Ile Asp Ala Pro Pro Asp Ala Ala Pro 120
121 Ala Ala Asp Val Thr Gly Ser Cys Ala Ala Arg Ser Arg Arg Arg 135
136 Arg Thr Ala Arg Ala Ser Ile Asp Phe Arg Gln Arg Pro Leu Pro 150
151 Ser Leu Arg Ala Thr Ile Gly Leu Ser Pro Ile Thr Asp Ser Asp 165
166 Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Thr Ser Arg Glu Met Val Asn Asn Ile 180
181 Arg Thr Ile Gln Tyr Gly Arg Gln Gln

10

20

(下線部分はペプチドの配列番号 15 に相当する。)

【 0 0 2 0 】

配列番号 4 (gil125575386 (hypothetical protein OsJ_32145 [Oryza sativa Japonica Group]))

1 Met Ala Ile Asp Ala Thr Gln Trp Leu Leu Leu Leu Val Val Phe 15
 16 Leu Val Ala Phe Leu Phe Thr Leu Leu Ala Lys His Gly Ala Val 30
 31 Lys Arg Lys His Gly Val Arg Val Pro Pro Gly Pro Leu Ala Val 45
 46 Pro Val Leu Gly Ser Leu Val Trp Leu Thr His Ser Ser Ser Ala 60
 61 Asn Leu Glu Pro Leu Leu Arg Arg Leu Ile Ala Arg His Gly Pro 75
 76 Val Val Ser Leu Arg Val Gly Ser Arg Leu Ser Ile Phe Val Ala 90
 91 Asp Arg Arg Val Ala His Ala Ala Leu Val Gly Arg Gly Ala Ala 105 10
 106 Leu Ala Asp Arg Pro Pro Asp Val Thr His Ser Leu Leu Gly Glu 120
 121 Ser Arg Asn Thr Ile Thr Arg Ser Gly Tyr Gly Pro Val Trp Arg 135
 136 Ser Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ser Arg Arg Arg Thr Arg Arg Ala 150
 151 Ser Ala Ser Ser Arg Pro Arg Ala Pro Gly Phe Ala Ala Cys Ser 165
 166 Ser Thr Ser Ser Ala Asp Ala Gly Ala His Pro Ala Ser Pro Pro 180
 181 Arg Val Leu Glu Val Phe Arg Tyr Ala Met Phe Ser Leu Leu Val 195
 196 Leu Met Cys Phe Gly Glu Arg Leu Asp Glu Ala Ala Val Arg Ala 210
 211 Ile Gly Ala Ala Gln His Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Gly Arg Lys 225 20
 226 Thr Ser Val Phe Met Phe Tyr Pro Ala Ile Thr Lys His Leu Phe 240
 241 Arg Gly Arg Val His Leu Gly Leu Ala Val Arg Arg Arg Gln Lys 255
 256 Glu Leu Phe Met Pro Leu Ile Asp Ala Arg Arg Glu Arg Lys Lys 270
 271 Gln Ile Gln Gln Ser Gly Asp Ser Ala Ala Ser Glu Lys Lys Lys 285
 286 Asp Asp Asn Thr Thr Phe Asn His Ser Tyr Val Asp Thr Leu Leu 300
 301 Thr Ile Arg Leu Gln Asp Val Asp Gly Asp Gly Asp Arg Ala Leu 315
 316 Thr Asp Asp Glu Met Val Ser Leu Cys Ser Glu Phe Leu Ser Ala 330
 331 Gly Thr Asp Thr Thr Ala Thr Ala Leu Gln Trp Ile Met Ala Glu 345 30
 346 Leu Val Lys Asn Pro Ser Ile Gln Ser Lys Leu Tyr Glu Glu Ile 360
 361 Lys Ala Thr Met Ser Gly Asp Asn Asp Asp Glu Ile Asn Glu Asp 375
 376 Asp Ala Arg Asn Asn Leu Pro Tyr Leu Lys Ala Val Ile Leu Glu 390
 391 Gly Leu Arg Lys His Pro Pro Met His Leu Leu Leu Pro His Lys 405
 406 Ala Ala Glu Asp Val Glu Val Gly Gly Tyr Leu Ile Pro Lys Gly 420
 421 Ala Thr Val Asn Phe Met Val Ala Glu Ile Gly Arg Asp Glu Lys 435
 436 Glu Trp Glu Lys Pro Thr Glu Phe Ile Pro Glu Arg Phe Met Ala 450
 451 Gly Gly Gly Asp Gly Glu Gly Val Asp Val Thr Gly Ser Arg Glu 465 40
 466 Ile Arg Met Met Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Ala 480
 481 Leu Ser Val Ala Met Leu His Leu Glu Tyr Phe Val Ala Asn Met 495
 496 Val Lys Glu Phe Glu Trp Lys Glu Val Ala Gly Asp Glu Val Asp 510
 511 Phe Ala Glu Arg Leu Glu Phe Thr Thr Val Met Ala Lys Ser Leu 525
 526 Arg Val Arg Leu Ile Lys Arg Ala

(下線部分はペプチドの配列番号16に相当する。)

【 0 0 2 1 】

配列番号 5 (gil115452875 (Os03g0336100 [Oryza sativa Japonica Group]))

1 Met His Lys Asp Glu Leu Val Glu Lys Asn Leu Lys Met Gly Asp 15
 16 Val Leu His Ile Asp Ala Gly Ser Thr Phe Tyr Met Val Asn Ser 30
 31 Gly Lys Gly Gln Arg Leu Lys Ile Ile Cys Ser Ile Asp Ala Ser 45
 46 Asp Asn Ile Gly Phe Gly Pro Tyr Gln Ala Phe Phe Leu Gly Gly 60
 61 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gln Trp Arg Pro Val Gly Arg Gly 75
 76 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Leu Val Val Asp Glu Ala 90 10
 91 Ser Ser Thr Trp Ser Trp Thr Lys Leu Val Gly Arg Leu Leu Gly 105
 106 Val Val Gly Gly Gly Ala Pro Ser Asn Ser Val Ala Ala Gln Pro 120
 121 Lys Lys Lys Lys Asp Lys Thr Val Arg Ala Pro Glu Pro Tyr Asn 135
 136 Leu Tyr Glu Gln Gly Thr Gly Phe Arg Asn Ala Tyr Gly Ser Ser 150
 151 Val Ala Val Asp Lys His Asp Tyr Glu Pro Leu Gly His Ser Asp 165
 166 Ile Gly Val Tyr Leu Val Asn Leu Thr Ala Gly Ser Met Met Ala 180
 181 Pro His Val Asn Pro Arg Ala Thr Glu Tyr Gly Val Val Leu Ser 195 20
 196 Gly Thr Gly Cys Ile Glu Val Val Phe Pro Asn Gly Ser Lys Ala 210
 211 Met Ser Ala Thr Val Arg Ala Gly Asp Val Phe Tyr Ile Pro Arg 225
 226 Tyr Phe Pro Phe Cys Gln Val Ala Ser Arg Gly Gly Pro Phe Val 240
 241 Phe Phe Gly Phe Thr Thr Ser Ala Arg Arg Asn His Pro Gln Phe 255
 256 Leu Val Gly Gly Ser Ser Val Leu Arg Ala Leu Leu Gly Thr Glu 270
 271 Leu Ala Ala Ala Phe Gly Val Pro Glu Lys Ala Met Arg Lys Leu 285
 286 Val Leu Ala Gln Asn Glu Ala Val Ile Leu Pro Ser Trp Pro Glu 300 30
 301 Lys Lys Lys Lys Lys Lys Trp Glu Glu Glu Pro Glu Asp Glu Arg 315
 316 Trp Glu Glu Lys Lys Lys Ala Ala Lys Gln Arg Lys Pro Trp Val 330
 331 Ile Glu Gln Val Pro Ala Lys

(下線部分はペプチドの配列番号 17 に相当する。)

【 0 0 2 2 】

配列番号 6 (gil297722421 (Os03g0663800 [Oryza sativa Japonica Group]))

1 Met Pro Thr His Thr Asp Ala His Cys Ile Cys Tyr Val Ala Gln 15
 16 Gly Glu Gly Val Val Ala Ile Ile Glu Asn Gly Glu Lys Trp Ser 30
 31 Tyr Ala Ile Arg Gln Gly Asp Val Phe Val Ala Pro Ala Gly Thr 45
 46 Ile Asn Tyr Leu Ala Asn Thr Asp Gly Arg Arg Lys Leu Ile Val 60
 61 Thr Lys Ile Leu His Thr Ile Ser Val Pro Gly Gln Ile Gln Phe 75
 76 Phe Phe Ala Pro Gly Gly Arg Asn Pro Glu Ser Phe Leu Ser Ser 90 10
 91 Phe Ser Lys Gly Val Gln Arg Ala Ala Phe Lys Ile Ser Glu Glu 105
 106 Lys Leu Glu Lys Leu Leu Gly Lys Gln Asp Lys Gly Val Ile Ile 120
 121 Arg Ala Ser Glu Glu Gln Val Arg Glu Leu Arg Arg His Ala Ser 135
 136 Glu Gly Gly His Gly Pro His Trp Pro Leu Pro Pro Phe Gly Glu 150
 151 Ser Ser Arg Gly Pro Phe Asn Ile Leu Glu Gln Arg Pro Arg Phe 165
 166 Ala Asn Arg His Gly Arg Leu Tyr Glu Ala Asp Ala Arg Ser Phe 180
 181 His Asp Leu Ala Glu His Asp Ile Arg Val Ala Val Val Asn Ile 195 20
 196 Thr Ala Gly Ser Met Asn Ala Pro Phe Tyr Asn Thr Arg Ser Val 210
 211 Lys Val Ala Tyr Val Leu Asp Gly Glu Gly Glu Ala Glu Ile Val 225
 226 Cys Pro His Leu Ser Arg Gly Gly Arg Gly Gly Glu Ser Glu Glu 240
 241 Arg Arg Arg Glu Arg Gly Lys Gly Lys Trp Arg Glu Glu Glu Glu 255
 256 Glu Glu Glu Glu Gln Gln Lys Gly Gln Glu Glu Glu Glu Glu 270
 271 Gln Val Gly Gln Gly Tyr Glu Thr Ile Arg Ala Arg Leu Ser Arg 285
 286 Gly Thr Val Phe Val Val Pro Ser Gly His Pro Ile Val Val Thr 300 30
 301 Ser Ser Arg Asp Ser Thr Leu Gln Ile Val Cys Phe Asp Val His 315
 316 Ala Asn Asn Asn Glu Arg Met Tyr Leu Ala Gly Met Asn Ser Val 330
 331 Leu Lys Lys Leu Asp Pro Gln Ala Lys Glu Leu Ala Phe Ala Ala 345
 346 Ser Ala Arg Glu Val Asp Glu Leu Leu Asn Ala Gln Gln Glu Ser 360
 361 Ala Phe Leu Ala Gly Pro Glu Lys Ser Gly Arg Arg Gly Glu Glu 375
 376 Ser Glu Asp Glu Asp Arg Arg Arg Arg Arg Ser His Arg Gly Arg 390
 391 Gly Asp Glu Ala Val Glu Thr Leu Leu Arg Met Ala Ala Ala Ala 405 40
 406 Val

(下線部分はペプチドの配列番号18と19にそれぞれ相当する。)

【 0 0 2 3 】

配列番号 7 (gil41469581 (putative globulin (with alternative splicing) [Oryza sativa Japonica Group]))

1 Met Ala Thr Arg Ala Arg Ala Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ala 15
 16 Val Leu Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Glu Asp Arg Arg 30
 31 Arg Glu Thr Ser Leu Arg Arg Cys Leu Gln Arg Cys Glu Gln Asp 45
 46 Arg Pro Pro Tyr Glu Arg Ala Arg Cys Val Gln Glu Cys Lys Asp 60
 61 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Arg Arg Arg Glu His Gly Gly His 75
 76 Asp Asp Asp Arg Arg Asp Arg Asp Arg Arg Gly Glu Gly Ser Ser 90
 91 Glu Glu Glu Asp Glu Gly Arg Glu Arg Gly Ser Arg Arg Arg Pro 105
 106 Tyr Val Phe Gly Arg Arg Ser Phe Arg Gln Val Val Arg Ser Asp 120
 121 Gln Gly Ser Val Arg Leu Leu Pro Pro Phe His Gln Ala Ser Ser 135
 136 Leu Leu Arg Gly Ile Lys Asn Tyr Arg Val Ala Val Leu Glu Ala 150
 151 Asn Pro Arg Ser Phe Val Met Pro Thr His Thr Asp Ala His Cys 165
 166 Ile Cys Tyr Val Ala Gln Gly Glu Gly Val Val Ala Ile Ile Glu 180
 181 Asn Gly Glu Lys Trp Ser Tyr Ala Ile Arg Gln Gly Asp Val Phe 195
 196 Val Ala Pro Ala Gly Thr Ile Asn Tyr Leu Ala Asn Thr Asp Gly 210
 211 Arg Arg Lys Leu Ile Val Thr Lys Ile Leu His Thr Ile Ser Val 225
 226 Pro Gly Gln Ile Gln Phe Phe Phe Ala Pro Gly Gly Arg Asn Pro 240
 241 Glu Ser Phe Leu Ser Ser Phe Ser Lys Gly Val Gln Arg Ala Ala 255
 256 Phe Lys Ile Ser Glu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Gly Lys Gln 270
 271 Asp Lys Gly Val Ile Ile Arg Ala Ser Glu Glu Gln Val Arg Glu 285
 286 Leu Arg Arg His Ala Ser Glu Gly Gly His Gly Pro His Trp Pro 300
 301 Leu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Ser Arg Gly Pro Phe Asn Ile Leu 315
 316 Glu Gln Arg Pro Arg Phe Ala Asn Arg His Gly Arg Leu Tyr Glu 330
 331 Ala Asp Ala Arg Ser Phe His Asp Leu Ala Glu His Asp Ile Arg 345
 346 Val Ala Val Val Asn Ile Thr Ala Gly Ser Met Asn Ala Pro Phe 360
 361 Tyr Asn Thr Arg Ser Val Lys Val Ala Tyr Val Leu Asp Gly Glu 375
 376 Gly Glu Ala Glu Ile Val Cys Pro His Leu Ser Arg Gly Gly Arg 390
 391 Gly Gly Glu Ser Glu Glu Arg Arg Arg Glu Arg Gly Lys Gly Lys 405
 406 Trp Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Gln Lys Gly Gln 420
 421 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Val Gly Gln Gly Tyr Glu Thr Ile 435
 436 Arg Ala Arg Leu Ser Arg Gly Thr Val Phe Val Val Pro Ser Gly 450
 451 His Pro Ile Val Val Thr Ser Ser Arg Asp Ser Thr Leu Gln Ile 465
 466 Val Cys Phe Asp Val His Ala Asn Asn Asn Glu Arg Met Tyr Leu 480
 481 Ala Gly Met Asn Ser Val Leu Lys Lys Leu Asp Pro Gln Ala Lys 495
 496 Glu Leu Ala Phe Ala Ala Ser Ala Arg Glu Val Asp Glu Leu Leu 510
 511 Asn Ala Gln Gln Glu Ser Ala Phe Leu Ala Gly Pro Glu Lys Ser 525
 526 Gly Arg Arg Gly Glu Glu Ser Glu Asp Glu Asp Arg Arg Arg Arg 540
 541 Arg Ser His Arg Gly Arg Gly Asp Glu Ala Val Glu Thr Leu Leu 555
 556 Arg Met Ala Ala Ala Ala Val

10

20

30

40

(下線部分はペプチドの配列番号 18 と 19 にそれぞれ相当する。)

【 0 0 2 4 】

配列番号 8 (gi|146393894 (putative NB-ARC domain-containing protein, partial [*Oryza sativa Japonica Group*]))

1 Gly His Ser Tyr Asn Ser Lys Asn Lys His Glu Glu Phe Leu Glu 15
 16 Lys Asp Glu Arg Arg Met Val Ile His Lys Leu Asp Lys Asp Val 30
 31 Asn Gln Ala Ile Ser Ser Glu Trp Ser Arg Leu Arg Ser Phe Val 45
 46 Thr Leu Glu Arg Asn Met Ser Ser Pro Asn Leu Leu Thr Leu Val 60
 61 Ala Gly Lys Cys Arg Tyr Met Ser Val Leu Glu Leu Ile Gly Leu 75
 76 Pro Lys Asp Asn Ile Pro Asn Val Ile Gly Asp Leu Phe Asn Leu 90
 91 Lys His Leu Ser Leu Arg Asp Ser Met Val Lys Phe Leu Pro Asn 105
 106 Ser Ile Glu Lys Leu Ser Asn Leu Met Thr Leu Asp Leu Cys Lys 120
 121 Ser Glu Ile Gln Glu Leu Pro Gly Gly Ile Val Lys Leu Lys Lys 135
 136 Leu Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Leu Asn Gly Lys Phe Trp Arg 150
 151 Asp Phe Gln Trp Ser Thr Val Gly Arg Tyr Phe Glu Asp Leu Cys 165
 166 Glu Ser Leu Cys Gln Met Glu Tyr Leu Ser Leu Leu Asn Ile Ala 180
 181 Ala Ser Asp Glu Glu Glu Val Leu Gln Leu Asn Gly Leu Lys Trp 195
 196 Leu His Pro Asn Val Lys Lys Leu Arg Leu Ile Gly Arg Leu Ala 210
 211 Gln Thr Gly Leu Leu Ser Cys Ala Pro Glu Ala Gly Ser His Ser 225
 226 Leu Cys Ser Leu Cys Leu Phe Trp Ser Gln Leu Ala Glu Asp Pro 240
 241 Leu Pro Ser Leu Ser Arg Trp Ser Asn Leu Thr Asp Phe Arg Leu 255
 256 Thr Arg Ala Tyr Leu

10

20

(下線部分はペプチドの配列番号20に相当する。)

【 0 0 2 5 】

配列番号 9 (gi|51535230 (Epstein-Barr virus EBNA-1-like protein [*Oryza sativa Japonica Group*]))

1 Met Thr Pro Ala Glu Glu Gly Lys Lys Glu Lys Gly Arg Lys Lys 15
 16 Gly Gly Leu Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Lys Glu Glu Glu Glu 30
 31 Arg Ala Thr Arg Gln Arg Gly Gly Ala Leu Pro Pro Ser Leu Gly 45
 46 Gly Thr Arg Gly Glu Arg Arg Gly Arg Val Asp Asp Asp Gly Asp 60
 61 Asp Gly Gly Ala Val Trp Ser Gly Ala Ala Thr Arg Ala Ala Asp 75
 76 Ala Gly Gln Ala Arg Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ala Thr Gly Arg 90
 91 Ser Ala Thr Thr Ala Arg Ala Arg Gly Arg Arg Gly Asp Leu Gly 105
 106 Gly Ile Gly Gly Asn Ser Arg Glu Ser Gly Glu Gly Glu Leu Asp 120
 121 Ala Ala His Gly Gln Ser Gly Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg 135
 136 Glu Ser Arg Gly Gly Arg Gly Arg Trp Ala Glu Arg Ser Ser Ala 150
 151 His Arg Thr Arg Gly Arg Leu Asn Arg Leu Leu Arg Arg Asp Leu 165
 166 Ile Trp Glu Gly Phe Gly Phe Gly Ile Glu Leu Gly Asn Arg Ser 180
 181 Gly Ile

30

40

(下線部分はペプチドの配列番号21に相当する。)

【 0 0 2 6 】

配列番号 1 0 (gi|57899479 (hypothetical protein [*Oryza sativa* Japonica Group]))

1 Met Ala Thr Leu Leu Ser Asp Ala Lys Arg Val Arg Val Leu Ala 15
 16 Glu Ser Leu Leu Leu Gly Pro Pro Gly Val Phe Pro Thr Arg Thr 30
 31 Pro Asn Leu Val Ser Thr Val Gly Phe Glu Val His Pro Trp Ala 45
 46 Ser Thr Val Trp Arg Ile Met Asp Gly Glu Lys Gln Arg Thr Val 60
 61 Glu Lys Gln Arg Asn Arg Val Pro Thr Pro Pro Ser Gly Ile Lys 75
 76 Thr Ser Gly Val Val Glu Asp Glu Ser Gln Glu

10

(下線部分はペプチドの配列番号 2 2 に相当する。)

【 0 0 2 7 】

配列番号 1 1 (gi|49388259 (hypothetical protein [*Oryza sativa* Japonica Group]))

1 Met Phe Thr Phe Arg Ser Arg Ser Phe Thr Phe Ala Phe Leu Leu 15
 16 Arg Ser Arg Phe Ile His Phe Thr Leu Ile Arg Ser Met Ser Trp 30
 31 Arg Gln Arg Ser Gly Gly Val Ala Ala Ala Gly Arg Arg Cys Gly 45
 46 Gly Ser Gly Arg Arg Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Trp Arg Arg 60
 61 Gly Ala Trp Pro Gly Gly Asp Val Ala Arg Arg Arg Arg Ser Ala 75
 76 Arg His Gly Ala Gly Val Ala Gln Arg Arg Cys Ser Ala Arg Arg 90
 91 Gly Gly Gly Val Ala Ala Trp Arg Cys Ala Ala Pro Val Pro Cys 105
 106 Arg Gly Gly Val Val Ala Ser Arg Arg Val Val Pro Pro Arg Arg 120
 121 His Val Val Thr Thr Ser Ala Ser Ala Ser Arg Arg Pro Ala Ala 135
 136 Thr Glu Arg Glu Arg Glu Arg Ser Arg Ser Glu Arg Glu Leu Met 150
 151 Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Ser Pro Gln Arg Cys Gly Gly Gly 165
 166 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asp Asp Glu Arg Glu Thr Thr 180
 181 Ala Arg Tyr Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Met Pro

20

30

(下線部分はペプチドの配列番号 2 3 に相当する。)

【 0 0 2 8 】

配列番号 1 2 (gi|34395140 (hypothetical protein [*Oryza sativa* Japonica Group]))

1 Met Gly Ala Val Gly Ala Asp Thr Cys Ile Pro Ser Pro Pro Pro 15
 16 Glu Ser Ser Thr Ser Pro Arg Ser Ser Gln Pro Pro Arg Ser Leu 30
 31 Ala Leu Asp Gly Ser Ile Pro Leu Ser Ala Ala Pro Ser Ala Thr 45
 46 Pro Gly Ile Gln Arg Ala Ser Ser Val Leu Ser Ser Pro Ser Pro 60
 61 Leu Arg Cys Leu Ala Glu Arg Arg Cys Pro His Ser Ser Ile Gln 75
 76 Gly Val Ile Val Val Arg Ser Cys Lys Pro Ala Thr Arg Cys Phe 90
 91 Gly Glu Pro Ala Ile Ala Asn Lys Arg Arg Arg Ala Gln Ser Trp 105
 106 Asn Ser Ser Arg Ala Pro Arg Trp Arg Ala Gly Glu Gln His Met 120
 121 Glu Ala Glu Gln Ala Arg Ala Gln Gly Thr Arg Arg Leu Gly Asn 135
 136 Glu Thr Ala Asp Ala Asp Ser Arg Ala Ala Ser Arg Leu Gly Gly 150
 151 Glu Gln Gln Gln Leu Glu Glu Gln Leu Ser Asn Arg Arg Arg Asp 165
 166 Ser Ala Ala His Gln Ala Ala Trp Phe Asp Gly Ala Gly Gly Arg 180
 181 Ala Gly Asp Glu Arg Gln Val Leu Ala Ala Gln Ala Ala Ala Arg 195
 196 Ala Lys Ser Ile Gly Gly Ala Ala Ala Thr Pro Gly Gly Ala Ala 210
 211 Ala Thr Pro Gly Trp Ala Ala Ala Thr Ala Gly Gly Thr Thr Val 225
 226 Thr Pro Arg Gly Ser Cys Gly Gly Glu

10

20

(下線部分はペプチドの配列番号 2 4 に相当する。)

【 0 0 2 9 】

本発明におけるタンパク質又はペプチドのアミノ酸の個数の下限値は、4個であり、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個であってもよい。本発明におけるタンパク質又はペプチドのアミノ酸の個数の上限値は、600個であり、550個、500個、450個、400個、350個、300個、250個、200個、150個、100個、50個、30個、20個であってもよい。

30

【 0 0 3 0 】

本発明において「1個～数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有する」の「数個」とは、例えば10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個等である。

【 0 0 3 1 】

本発明において「アミノ酸の保存的置換」とは、以下の表1の各群内におけるアミノ酸間の置換をいう。この中で、好ましいアミノ酸の保存的置換としては、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、グリシンとアラニンとの間での置換等が挙げられる。

40

【 0 0 3 2 】

【表 1】

酸性アミノ酸	アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)
塩基性アミノ酸	アルギニン (R)、リジン (K)、ヒスチジン (H)
親水性アミノ酸	セリン (S)、トレオニン (T)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)
疎水性アミノ酸	トリプトファン (W)、フェニルアラニン (F)、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、プロリン (P)、アラニン (A)
芳香族アミノ酸	チロシン (Y)、トリプトファン (W)、フェニルアラニン (F)
ヒドロキシアミノ酸	セリン (S)、トレオニン (T)
含硫アミノ酸	システイン (C)、シスチン、メチオニン (M)
小型アミノ酸	グリシン (G)、アラニン (A)、セリン (S)、メチオニン (M)、トレオニン (T)

10

20

【0033】

本発明におけるタンパク質又はペプチドは、誘導体であってもよい。誘導体は、特定のアミノ酸配列で示されるタンパク質又はペプチドのC末端が、カルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)又はエステル(-COOR)のいずれであってもよい。エステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが挙げられる。アミド体としては、アミド、C₁₋₆アルキル基の1つ又は2つで置換されたアミド、フェニル基で置換されたC₁₋₆のアルキル基の1つ又は2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

30

本発明のタンパク質又はペプチドがC末端以外にカルボキシル基又はカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化又はエステル化されているものも本発明のタンパク質又はペプチドに含まれる。本発明のタンパク質又はペプチドがN末端以外にアミノ基を有している場合、そのアミノ基がアミド化されているものも本発明のタンパク質又はペプチドに含まれる。

【0034】

誘導体には、N末端のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているものも含まれる。

40

【0035】

本発明のタンパク質又はペプチドの誘導体を構成するアミノ酸は、側鎖が任意の置換基で修飾されていてもよい。置換基は特に限定されないが、例えば、フッ素原子、塩素原子、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アルキル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ

50

基、リン酸基などが挙げられる。また、側鎖の置換基は、保護基で保護されていてもよい。

本発明におけるタンパク質又はペプチドは、元のタンパク質又はペプチドの特性が保持される限り、D-アミノ酸を含んでもよく、非天然アミノ酸を含んでもよい。また、本発明におけるタンパク質又はペプチドは、元のタンパク質又はペプチドの特性が保持される限り、タンパク質又はペプチドに他の物質を連結してもよい。タンパク質又はペプチドに連結可能な他の物質としては、例えば、他のタンパク質又はペプチド、脂質、糖又は糖鎖、アセチル基、天然又は合成のポリマー等が挙げられる。また、本発明におけるタンパク質又はペプチドは、元のタンパク質又はペプチドの特性が保持される限り、タンパク質又はペプチドに、糖鎖付加、側鎖酸化、リン酸化等の修飾を行ってもよい。

これらの技術は従来十分に確立されていて、本発明においてもそれらに従ってよい。また、本発明における保護基は保護される基の反応性を封止するものであればどのようなものであってもよく、本発明のタンパク質又はペプチドは保護基を有したまま生体に投与してもよい。

【0036】

本発明のタンパク質又はペプチドは塩を形成していてもよく、その塩としては、生理学的に許容される塩が好ましい。生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の、又はアルミニウムの水酸化物又は炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、t-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどの有機塩基との塩などが挙げられる。

【0037】

本発明におけるタンパク質又はペプチドは、米糠タンパク質を加水分解することによって製造されるのみならず、公知の一般的なタンパク質又はペプチド合成のプロトコールに従って、固相合成法（Fmoc法、Boc法）又は液相合成法によっても製造され得る。また、本発明におけるタンパク質又はペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターを導入した形質転換体を用いて製造することもできる。また、本発明のタンパク質又はペプチドを一部に含むタンパク質又はペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターを導入した形質転換体を用いてタンパク質又はペプチドを取得し、これを適当なプロテアーゼやペプチダーゼ等のタンパク質加水分解酵素で切断することによって製造することもできる。また、*in vitro* 転写・翻訳系を用いる方法により製造することもできる。

すなわち、本発明は以下の(A)～(C)のいずれかのアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基数が600以下であり、生体防御作用を有するタンパク質又はペプチドを含有する生体防御用組成物も包含する。

(A) 配列番号1～24のいずれかで示されるアミノ酸配列

(B) (A)のアミノ酸配列において1個～数個のアミノ酸の保存的置換又は欠失を有するアミノ酸配列

(C) 前記(A)又は(B)のアミノ酸配列において少なくとも4つの連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列

当該タンパク質又はペプチドについての説明としては、上記本発明の米糠タンパク質酵素加水分解物を含有する生体防御用組成物におけるタンパク質又はペプチドと同意義であってよい。

【0038】

〔生体防御作用〕

本発明において、生体防御とは特に限定されないが、例えば抗菌、抗炎症及び創傷治癒等が挙げられる。抗菌活性を有することは、例えばP. gingivalis ATCC 33277等のグラム陰性細菌、S. mutans JCM 5705、P. acnes JCM 6473等のグラム陽性細菌、C. albicans NBRC

10

20

30

40

50

1385等の真菌等の培養培地にサンプルを添加し、生菌に由来するアデノシン三リン酸(ATP)を定量し、コントロール群のそれと比較することにより得られる菌増殖阻害率(%)を算出することにより確認することができる。本発明において、上記菌のいずれか1以上の菌の増殖阻害率が10%以上であることが好ましく、20%以上であることがより好ましく、30%以上であることがより好ましく、40%以上であることがより好ましく、50%以上であることがより好ましく、60%以上であることがより好ましく、70%以上であることがより好ましく、80%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましい。

【0039】

抗炎症作用を有することは、例えば「エンドスペシーES-50Mセット」(生化学工業株式会社製)及び「エンドトキシン標準品CSE-Lセット」(生化学工業株式会社製)等を用いて、サンプルのエンドトキシン中和活性を評価し、コントロール群のそれと比較することにより得られるエンドトキシン中和活性(%)を算出することにより確認することができる。本発明において、エンドトキシン中和活性(%)が1%以上であることが好ましく、10%以上であることが好ましく、20%以上であることがより好ましく、30%以上であることがより好ましく、40%以上であることがより好ましく、50%以上であることがより好ましく、60%以上であることがより好ましく、70%以上であることがより好ましく、80%以上であることがさらに好ましく、90%以上であることが特に好ましい。

10

【0040】

創傷治癒作用を有することは、例えばHUVEC(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、倉敷紡績株式会社製、KE-4109)等の細胞に、サンプルを添加し、形成された管腔構造をした細胞の長さの合計値を測定し、コントロール群のそれと比較することにより得られる管腔形成促進活性(%)を算出することにより確認することができる。本発明において、管腔形成促進活性(%)が101%以上であることが好ましく、103%以上であることが好ましく、110%以上であることがより好ましく、120%以上であることがより好ましく、125%以上であることがより好ましく、130%以上であることがより好ましく、135%以上であることがさらに好ましく、140%以上であることが特に好ましい。

20

【0041】

本発明の組成物は、溶血活性を有しないため、安全に使用することができる。溶血活性を有しないことは、例えば赤血球に、サンプルを添加し、405nmにおける吸光度を測定し、下記式より溶血活性(%)を算出することにより確認することができる。本発明において、溶血活性(%)が10%以下であることが好ましく、8%以下であることが好ましく、7%以下であることがより好ましく、6%以下であることがより好ましく、5%以下であることがより好ましく、4%以下であることがさらに好ましく、3%以下であることが特に好ましい。

30

$$\text{溶血活性}(\%) = (A_s - A_0) \times 100 / (A_T - A_0)$$

(A_0 は無添加のときの吸光度、 A_s は各サンプルを添加したときの吸光度、及び A_T は0.1質量% Triton X-100を添加したときの吸光度をそれぞれ示す。)

40

【0042】

〔飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品又は飼料〕

本発明の飲食品、飲食品添加物、医薬品、医薬部外品、化粧品又は飼料は、前記生体防御用組成物を含有する。

【0043】

前記飲食品としては、特に制限はなく、例えば、各種の清涼飲料水、果汁飲料、和洋菓子、乳製品その他の畜産加工品、果実加工品、野菜加工品、穀物の加工品、水産加工品、調味料、ビタミンなどを主成分としたいわゆる各種の健康食品など数多くの飲食品が挙げられる。本発明の飲食品は、生体防御用飲食品として好適である。

飲食品には、健康食品、機能性食品、虫歯予防等を目的とする特定保健用食品、病者用

50

食品、サプリメントが含まれる。飲食品の形態は特に限定されない。例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料等の飲料、そば、うどん、中華麺、即席麺等の麺類、飴、のど保護、口臭除去、清涼感付与等の機能性を有するキャンディー、虫歯予防、口臭除去、清涼感、眠気防止等の機能性を有するガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子、パン等の菓子およびパン類、かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品、加工乳、発酵乳等の乳製品、サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂および油脂加工食品、ソース、たれ等の調味料、カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊等のレトルトパウチ食品、アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の冷菓などを挙げることができる。サプリメントは、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、ドリンク剤等の形態で提供することができる。飲食品添加物の形態は特に限定されないが、例えば、液状、ペースト状、粉末状、フレーク状、顆粒状等が挙げられる。本発明の飲食品添加物は、一般的な飲食品添加物の製造方法に従って製造することができる。

一般的に例えば、体重約60kgのヒトにおいては、本発明におけるタンパク質又はペプチドを1日当たり約0.01~1000mg、好ましくは約0.1~100mg、より好ましくは約0.5~50mg摂取してもよい。

【0044】

前記医薬品又は医薬部外品としては、特に制限はないが、歯周病治療剤、殺菌塗布剤、薬用のドスプレー、トローチ、薬用のど飴、口内炎治療剤、薬用トローチ、洗口液、歯磨き粉（歯周病予防用歯磨き粉、口臭予防用歯磨き粉等）、洗口液（マウスウォッシュ、デンタルリンス等）、義歯洗浄剤、絆創膏、ニキビの治療及び/又は予防剤、日和見感染症の予防及び/又は治療剤等が好適に挙げられる。

【0045】

本発明の医薬又は医薬部外品は、本発明におけるタンパク質又はペプチドを含有成分とし、医薬製剤の製造法として公知の方法（例えば、日本薬局方に記載の方法等）に従って、薬学的に許容される担体または添加剤を適宜配合して製剤化することができる。製剤としては、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠、舌下錠、口腔内崩壊錠、バツカル錠等を含む）、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、マイクロカプセル剤を含む）、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、放出制御製剤（例、速放性製剤、徐放性製剤、徐放性マイクロカプセル剤）、エアゾール剤、フィルム剤（例、口腔内崩壊フィルム、口腔粘膜貼付フィルム）、注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤）、点滴剤、経皮吸収型製剤、軟膏剤、ローション剤、貼付剤、坐剤（例、肛門坐剤、膣坐剤）、ペレット、経鼻剤、経肺剤（吸入剤）、点眼剤等の経口剤または非経口剤が挙げられる。担体または添加剤の配合割合については、医薬又は医薬部外品の分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体または添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性または油性基剤等の各種担体、賦形剤、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

【0046】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は通常製剤業務（例えば有効成分を注射用水、天然植物油等の溶媒に溶解または懸濁させる等）に従って調製することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール

10

20

30

40

50

、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80TM、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。

【0047】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

本発明の医薬は、剤型、投与方法、担体等により異なるが、本発明におけるタンパク質又はペプチドを製剤全量に対して通常0.01~100%(w/w)、好ましくは0.1~95%(w/w)の割合で添加することにより、常法に従って製造することができる。

投与量は、投与対象、症状、投与ルートなどにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、体重約60kgのヒトにおいては、1日当たり約0.01~1000mg、好ましくは約0.1~100mg、より好ましくは約0.5~50mgである。1日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であってもよい。本発明の医薬又は医薬部外品は、他の有効成分(例えば、オリザスタチン等の生体防御剤として公知の有効成分等)を含有していてもよい。

【0048】

前記化粧品としては、例えば、洗顔料、クレンジング、化粧水、乳液、美容液、スポットケア、モイスチャー、マッサージパック、メイクアップベース、ファンデーション、フェイスパウダー、ボディクリーム、ボディローション、ボディマッサージケアクリーム、サンタン、サンスクリーン、バスプロダクト、ボディシャンプー、リップクリーム、散布、リンス、コンディショナー、リンスインシャンプー、インバストリートメント、アウトバストリートメント、エアゾール製品、消臭剤、芳香剤、脱臭剤、入浴剤、アンチエイジング剤、アクネ対応製品、ホワイティング剤などを挙げることができる。本発明の化粧品は、本発明におけるタンパク質又はペプチド以外に化粧品として一般に使用されている成分、例えば、界面活性剤、保湿剤、動植物由来油脂、シリコーン類、高級アルコール、低級アルコール、動植物由来抽出エキス、紫外線吸収剤、消炎剤、金属封鎖剤、ビタミン類、酸化防止剤、増粘剤、防腐剤、殺菌剤、pH調整剤、着色剤、各種香料などを目的に応じて適宜配合することができる。

【実施例】

【0049】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0050】

〔実施例1：米糠タンパク質酵素加水分解物の調製と精製およびペプチドの同定〕

1. 米糠タンパク質由来ペプチドの調製

ビーカーに3.00gの米糠タンパク質(Tsuno-RBPTM 55、築野食品工業株式会社)を秤量し、60mLの超純水を加え、ホモジナイザーPOLYTRON(KINEMATICA)を用いて懸濁液を均質化した。次に、Spectra/Por(登録商標) Dialysis Membrane, MWCO: 6,000-8,000 Da(132655: Spectrum Laboratories, Inc.)を用いて均質化した懸濁液を一晚の間透析を行うことによって、低分子成分を除去した。その後、透析した懸濁液を三角フラスコに取り出し、トリプシン(T0303-1G: Sigma-Aldrich)とキモトリプシン(C4129-1G: Sigma-Aldrich)の等質量混合物、ペプシン(P7012-1G: Sigma-Aldrich)、又はパパイン(164-00172: 和光純薬工業)を米糠タンパク質との重量比が2%(w/w)となるように加えた。得られた懸濁液の温度を、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物は37℃、ペプシンは37℃、又はパパインは50℃になるように恒温槽を用いて調節し、3~6時間加水分解反応を行っ

10

20

30

40

50

た。反応終了後、反応を停止させるため、90 ℃にて10分間の熱処理を行い、プロテアーゼを失活させた。ただし、ペプシンを用いた場合には加熱による失活操作を行わずに、5M NaOHを添加しpHを上昇させることによって失活させた。プロテアーゼを失活させた後、懸濁液を遠心分離用チューブに分注し、10,000 ×g、4 ℃の条件にて30分間遠心分離を行った。遠心分離によって得られた上澄液は、Spectra/Por (登録商標) Dialysis Membrane, MWCO: 500~1,000 (131096, Spectrum Laboratories, Inc.) を用いて、再度透析を行うことによって、遊離アミノ酸などの低分子成分を除去した。この透析液をアシストチューブに回収し、-80 ℃で凍結した後、凍結乾燥機 (FDU-2100、EYELA) を用いて凍結乾燥を行った。

【0051】

2. 等電点電気泳動による米糠タンパク質由来ペプチドの分画

前記のようにして調製した200 mgの米糠タンパク質の酵素加水分解物を、分取用等電点電気泳動装置 (Rotofor (登録商標) 170-2950、Bio-Rad) を用いて20のフラクションに分画した。すなわち、200 mgの加水分解物を50 mLの超純水に溶解して、サンプル溶液とした。分離は12Wにて150分間行った。電気泳動泳動が終了した後、各フラクションを回収し、pHを測定した後、-80 ℃において凍結し、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥し、回収された重量を測定した。

【0052】

3. 逆相クロマトグラフィーによる米糠タンパク質由来ペプチドの精製

逆相クロマトグラフィーは、ポンプ(LC-10ATvp: 島津製作所)、オンラインデガッサー(DGU-12A: 島津製作所)、カラムオープン(CTO-10Avp: 島津製作所)、検出器(SPD-10AVvp: 島津製作所)、フラクションコレクター(FRC-10A: 島津製作所)、システムコントローラー(SCL-10Avp: 島津製作所)を連結した高速液体クロマトグラフィー装置を使用した。クロマトグラフィー操作とデータ解析にはソフトウェア(LabSolutions、島津製作所)を用いた。分離カラムはCAPCELL PAK C-18 (カラム: 直径10mm × 長さ150 mm、粒子径 5 μm, SHISEIDO: 90603) およびInertsil WP300 C8 (カラム: 直径10 × 長さ150 mm、粒子径5 μm, GL Science Inc.: 5020-85735) を用いた。溶出液はアセトニトリル (カタログ番号: 1.00030.4000、メルク株式会社)、トリフルオロ酢酸 (34833-92: ナカライテスク) および超純水を使用し、調製した。溶出液Aとして0.1 % (v/v) トリフルオロ酢酸、及び溶出液Bとして0.1 % (v/v) トリフルオロ酢酸を含む 80 % (v/v) アセトニトリルを用いた。

溶出液Bの濃度を、初期濃度0 % (v/v) から毎分1 % (v/v) の速度で直線的に高めて、70分後に70 % (v/v) となるように、さらに70~90分の間は100 % (v/v) となるようにタイムプログラムを設定し、溶出した。流速は2.0 mL/minとして、溶出開始7分後から30秒ごとに溶出液を分取し、波長210 nmにおける吸光度を測定し、ピークを検出した。各ピーク画分は、-80 ℃において凍結し、凍結乾燥機 (FDU-2100、EYELA) を用いて凍結乾燥した。

各ピークのフラクションを再度、同じ分離カラムを用いて、精製し、単一ピークを得た。

【0053】

4. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いた米糠タンパク質酵素加水分解物 (ペプチド) の同定

ペプチドの質量 (MS) 解析を行うために、マトリックスとして *p*-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [HCCA] (#201344: Bruker Daltonics社)、キャリアレーション試薬としてPeptide calibration standard II (#222570: Bruker Daltonics社) を使用した。500 μLのTA溶液 (100 % (v/v) アセトニトリル: 0.1 % (v/v) トリフルオロ酢酸 = 1:2 [v/v] の割合で混合した緩衝液) にHCCAを耳かき1杯程度混ぜた後、10分間の超音波処理によって溶解させ、HCCA飽和溶液 (マトリックス溶液) を調製した。調製したマトリックス溶液を9,000 ×gにて10分間遠心分離し、MS用サンプルチューブ (Eppendorf) 内において、2 mLの80 % (v/v) アセトニトリルで溶解した1 μLのサンプル溶液と4 μLのマトリックス溶液の上澄液を混合した。調製した5 μLのマトリックス混合サンプルのうち1 μLを質量分析専用プレート (MTP 384 target plate ground steel T F; Bruker Daltonics社) にスポ

10

20

30

40

50

ットし、乾燥するまで静置した。また、分子量のキャリブレーションのため、キャリブレーション試薬をサンプルと同様に調製して、スポットした。

スポットしたサンプルおよびキャリブレーション試薬が乾燥した後、Auto Flex-III (登録商標) (Bruker Daltonics社) を用いてMALDI-TOF/MSおよびMS/MS解析を行った。MS-Rangeはm/z 800 ~ 43,000の範囲で調節し、検出器の電位は1300 ~ 1800 Vとして走査した。得られたMS又はMS/MSのスペクトルは、処理ソフトflexAnalysis (登録商標) (Bruker Daltonics社) およびbiotools (登録商標) (Bruker Daltonics社) を用いてデータを処理した後、解析ソフトMascot search (登録商標) (Matrix Science Ltd.) を用いて、NCBIのデータベース (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/fasta.shtml, 2015年1月27日付) と照合し、候補ペプチドの検索を行った。このとき、サンプルの消化酵素として特定の酵素を選択しない "none" を選択して検索した。表2は、酵素としてペプシンを用いた場合の米糖タンパク質加水分解物 (ペプチド) を示す。表3は、酵素として、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いた場合の米糖タンパク質加水分解物 (ペプチド) を示す。

10

20

30

40

50

【0054】

【表2】

Fraction	Observed mass	Calculated mass	Sequence	Protein score	Protein source	Position	pI	Net charge
RBP-Pepsin No.20	1360.6788	1359.7153	KMTRRGARVDGGG	39	hypothetical protein	101-113	11.71	+3
	1003.5326	1002.5206	VGRRSGAATE	25	hypothetical protein	305-314	9.57	+1
	1002.5409	1001.1150	DEDRRRR	42	Putative globulin (with alternative splicing)	534-540	9.45	+1
	1192.6215	1191.6261	RGAYRGAAWKG	23	Os09g042590	263-273	11.00	+3
	1872.2424	1871.0602	RGAVARVVGVIYREARV	22	Putative transaminase	360-376	11.54	+3
	2001.3247	2000.0664	RRREPSSTRYRETLPP	26	OSJNBa0035B13.15	93-108	11.42	+3
	1147.7211	1146.7461	LLRRLIARH	33	hypothetical protein OsJ_32145	65-73	12.30	+3
	1461.7550	1460.7273	FTTSARRNHQPQ	a	Os03g0336100	244-255	12.00	+2
	1637.9384	1636.9624	ALSPIRNAARELLTL	23	Os03g0379500, partial	1-15	9.64	+1
	1181.6762	1180.6175	VVPRFHPMAQ	27	Cupin family protein, expressed	436-445	9.73	+1
RBP-Pepsin No.19	1266.5133	1265.6517	YVHSGRQKVTY	b	Cupin family protein, expressed	152-162	9.70	+2
	1636.6635	1635.8818	EQRPRFANRHGRL	c	Os03g0663800	160-172	12.00	+3
	963.8384	962.5298	SKGVQRAAF	d	globulin-like protein	136-144	11.00	+2
	991.7906	990.5247	LANTARQAF	e	Oleosin 18 kDa	109-117	9.75	+1
	1110.6876	1109.5982	FSKGVQRAAF	d	globulin-like protein	135-144	11.00	+2
	1284.5777	1283.6622	SSFSKGVQRAAF	d	globulin-like protein	133-144	11.00	+2
	1226.6081	1225.5719	VLRPGFGVPRE	26	Cupin family protein, expressed	240-250	9.57	+1
	1148.6701	1147.6574	EAAPPVRRRP	40	Os04g0638800	47-56	11.70	+2
	1030.4647	1029.5567	SNILRLGGGGS	28	hypothetical protein LOC_Os12g26680	29-39	9.47	+1
	1266.6357	1265.6517	YVHSGRQKVTY	b	Cupin family protein, expressed	152-162	9.70	+2
RBP-Pepsin No.18	1330.8073	1329.8608	LHPNVKLRLLI	39	Putative NB-ARC domain containing protein	196-206	11.17	+3
	878.3867	877.4406	ANTARQAF	e	Oleosin 18 kDa	110-117	9.75	+1
	1636.9370	1635.8818	EQRPRFANRHGRL	c	Os03g0663800	160-172	12.00	+3
	963.6005	962.5298	SKGVQRAAF	d	globulin-like protein	136-144	11.00	+2
	1597.0156	1595.7818	LRRHASEGGHGPWH	81	Os03g0663800	130-143	9.62	+1
	1461.5762	1460.7273	FTTSARRNHQPQ	a	Os03g0336100	244-255	12.00	+2
	1110.4941	1109.5982	FSKGVQRAAF	d	globulin-like protein	135-144	11.00	+2
	1667.8685	1667.0094	EKLLGKQDKGVIIRA	86	globulin-like protein	152-166	9.70	+2
	1284.7872	1283.6622	SSFSKGVQRAAF	d	globulin-like protein	133-144	11.00	+2
	1351.9734	1350.7731	AARALGALVHKASS	29	Os05g0519800	4-17	11.00	+2
1106.5746	1105.6396	VRLPPFHQ	59	Putative globulin (with alternative splicing)	124-132	9.73	+1	

上記表においてSequence欄の右端のアルファベットは、そのペプチドが同じタンパク質から得られたことを示す (Protein sourceの欄を参照)。

【0055】

【表3】

Fraction	Observed mass	Calculated mass	Sequence	Protein score	Protein source	Position	pI	Net charge
RBP-Mixture No.20	1001.7904	1000.7831	KKEKGRKK	33	Epstein-Barr virus EBNA-1-like protein	8-15	10.58	+5
	1169.6806	1168.6353	APAPQPPPPAAR	f	Os02g0754500	65-76	9.79	+1
	1245.6591	1244.6011	GGGGGDHPGPKPR	g	Cupin family protein, expressed	56-69	8.75	+1
	857.4164	856.4515	RASPVDGR	25	hypothetical protein	290-297	9.60	+1
	928.5071	927.4199	QFYSSNR	21	hypothetical protein OsJ_01232	57-63	8.75	+1
	1125.5459	1124.5839	GLNPPHTPR	52	germin-like protein 3, partial	77-86	9.76	+1
	1025.5735	1024.5777	NILEQRP	35	globulin-like protein	200-207	9.60	+1
RBP-Mixture No.19	1260.7886	1259.7271	IIRTISMAVEK	31	Os01g0223200	217-227	8.75	+1
	1044.5512	1043.5836	QRTVEKQR	39	hypothetical protein	57-64	10.84	+2
	1137.7280	1136.6275	RFSARHGAGVA	20	hypothetical protein	72-82	12.30	+3
	1363.8545	1362.7017	RAPRWAGEQH	16	hypothetical protein	109-119	11.70	+2
	1169.6321	1168.6353	APAPQPPPPAAR	f	Os02g0754500	65-76	9.79	+1
	1245.6393	1244.6011	GGGGGDHPGPKPR	g	Cupin family protein, expressed	56-69	8.75	+1
	1478.8285	1477.8405	LLPPFHQASSLLR	38	Putative globulin (with alternative splicing)	116-128	9.76	+1

上記表においてSequence欄の右端のアルファベットは、そのペプチドが同じタンパク質

から得られたことを示す (Protein sourceの欄を参照)。

【0056】

〔実施例2：抗菌活性〕

1. 抗菌試験

等電点電気泳動によって分画した各フラクション又は表2と表3に示すフラクションに含まれる同定したペプチドを培地に添加し、表4に示す被験菌を培養した。

【0057】

【表4】

分類	ヒト病原微生物	関連する疾患
グラム陰性細菌	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC33277	歯周病
グラム陽性細菌	<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705	う蝕(虫歯)
	<i>Propionibacterium acnes</i> JCM 6473	ニキビ(アクネ)
真菌	<i>Candida albicans</i> NBRC1385	日和見感染症(真菌)

10

【0058】

P. gingivalis ATCC 33277は、変法GAM培地(1L中、ペプトン5.0g、ダイズペプトン3.0g、プロテオーゼペプトン5.0g、消化血清末10.0g、酵母エキス末2.5g、肉エキス末2.2g、肝臓エキス末1.2g、ブドウ糖0.5g、溶性デンプン5.0g、L-トリプトファン0.2g、L-システイン塩酸塩0.3g、チオグリコール酸ナトリウム0.3g、L-アルギニン1.0g、ビタミンK10.005g、ヘミン0.01g、リン酸二水素カリウム2.5g、塩化ナトリウム3.0g、pH7.3)を用いて絶対嫌気条件下、37℃で48時間静置培養した。

20

S. mutans JCM 5705は、BHI培地(1L中、豚脳エキス末4.0g、豚ハートエキス末4.0g、ペプトン17.5g、ブドウ糖2.0g、塩化ナトリウム5.0g、リン酸水素二ナトリウム2.5g、pH7.2)を用いて、通性嫌気条件下、37℃で6時間静置培養した。

30

P. acnes JCM 6473は、GAM培地(1L中、ペプトン10.0g、ダイズペプトン3.0g、プロテオーゼペプトン10.0g、消化血清末13.5g、酵母エキス5.0g、肉エキス2.2g、肝臓エキス1.2g、ブドウ糖3.0g、リン酸二水素カリウム2.5g、塩化ナトリウム3.0g、溶性デンプン5.0g、L-システイン塩酸塩0.3g、チオグリコール酸ナトリウム0.3g、pH7.1)を用いて、通性嫌気条件下、37℃で24時間静置培養した。

C. albicans NBRC 1385の培地は、YM培地(1L中、グルコース10.0g、ペプトン5.0g、酵母エキス3.0g、麦芽エキス1.0g、pH6.2)を用いて、通性嫌気条件下、25℃で24時間静置培養した。

被験菌に対する抗菌活性試験は、以下の手順で行った。被験菌の培養に用いたものと同じ培地に、80μLの各被験菌の培養液を播種した後、所定の温度に設定したインキュベーターに入れて所定の時間培養した。その後、新たな培地に植え継いで、さらに所定の時間培養した。得られた前培養液を段階希釈することで $OD_{650} = 5.0 \times 10^{-5}$ の菌液を調製した。

40

次に、リザーバーを用意して、各レーンに300μLの1.33倍濃度の培地、100μLの各ペプチド溶液(等電点電気泳動によって分画した各フラクションの濃度は3mg/mLに調節した。また化学合成したペプチドの濃度は、300μM又は500μMに調節した。)、100μLの前記菌液を添加してよく混合した。

コントロールとブランクには、ペプチド溶液の代わりに同量の滅菌水を添加し、更にブランクには菌液の代わりに1倍濃度の各培地を同量添加した。ペプチド溶液を添加したも

50

の、コントロール及びブランクのそれぞれを96ウェル培養プレート(#3595、Corning社製)のウェルに100 μ Lずつ分注し、前記各被験菌の培養条件と同じ条件で培養を行った。

【0059】

2. 抗菌活性の評価方法

各ペプチドの抗菌活性は、生菌に由来するATPを定量することによって評価した。

生菌に由来するATPの定量は、Bactiter・Glo(登録商標)Microbial Cell Viability Assay Kit(Promega社製)を用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ発光法により行った。以下のように微生物からATPを抽出し、ATP量に応じた発光強度から微生物量を測定した。

具体的には、まず、培養プレートの各ウェルに分注した100 μ L被験菌培養液に対して10 μ LのルシフェールATP消去試薬(キッコーマン株式会社製)を添加し、10分間攪拌することによって生菌体外に存在するATPを分解消去させてサンプルとした。

次に、あらかじめ96穴プレート(OptiPlate-96、PerkinElmer社製)の各ウェルに分注した50 μ LのATP発光試薬に対して、前記サンプルを50 μ L添加した。各ウェルの生菌に由来するATP発光強度(発光波長560nm)を、マイクロプレートリーダー1420(Multilabel Counter Arvo(登録商標)MX、PerkinElmer社製)を用い、Relative Light Unit(RLU)として測定した。1サンプルについて3回測定を行い、測定は、各菌の対数増殖初期において行った。抗菌活性は、抗菌成分を含まないコントロールのRLUを100%とし、それぞれの濃度におけるRLUを求め、増殖阻害率を算出した。

【0060】

3. 同定したペプチドの化学合成とその抗菌活性の測定

各フラクションに含まれる同定したペプチドのうち、12種類のペプチド(配列番号13~24)を化学合成した。各ペプチドは、ペプチド合成装置(PSSM-8、株式会社島津製作所製)を用いて合成し、カラム(Cadenza CD-C18、インタクト株式会社製)を装着したHPLC(10A system、株式会社島津製作所製)にて以下の精製条件で精製した。これらのペプチドの抗菌活性を上記と同じ方法で測定した。

<精製条件>

- ・溶媒A：0.1%(w/v)トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル
- ・溶媒B：0.1%(w/v)トリフルオロ酢酸を含む水
- ・流速：1.0 mL/分間
- ・波長：220 nm
- ・インジェクション容量：20 μ L
- ・グラジエント条件：0.01分間(溶媒A 10体積%、溶媒B 90体積%) 25.0分間(溶媒A 35体積%、溶媒B 65体積%) 25.1分間(溶媒A 100体積%、溶媒B 0体積%) 30分間(停止)

【0061】

〔実施例3：合成ペプチドのエンドトキシン中和活性の測定〕

「エンドスペシーES-50Mセット」(生化学工業株式会社製)及び「エンドトキシン標準品CSE-Lセット」(生化学工業株式会社製)を用いてエンドトキシン中和活性を評価した。

12種類の合成ペプチド(配列番号13~24)を用いた。96ウェルプレート(#3595 マルチプルウェルプレート(平底)、Corning社製)の各ウェルにエンドトキシン標準品(0.10EU/mL)25 μ L及びペプチド溶液(最終濃度1 μ M及び10 μ M)を加えて、37にて30分間又は35分間振盪しながらインキュベーションした。次に、50 μ Lの前記セットに含まれていたLAL試薬を各ウェルに添加し、37で10分間振盪しながらインキュベーションした。その後、マイクロプレートリーダー(2030 Arvo X、PerkinElmer社製)を用いて、波長405nmの吸光度を測定した。ペプチド溶液の代わりに蒸留水(エンドトキシンフリー)を添加した

ものをコントロールとし、コントロール (0 μM) の吸光度を 100% とした時の相対値をエンドトキシン中和活性とした。

【0062】

〔実施例 4：合成ペプチドの創傷治癒活性の測定〕

合成ペプチドの創傷治癒作用を、HUV EC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、倉敷紡績株式会社製、KE-4109) の管腔形成促進作用に基づいて評価した。

96穴プレート (#3595, Corning社製) を用いて、HUV EC を 3~4 日間コンフルエントになるまで培養した後、HEPES 緩衝液 (倉敷紡績株式会社製、HK-3320) を用いて洗浄し、不純物を取り除いた。次に、トリプシン/EDTA (倉敷紡績株式会社製、HK-3120) で 3 分間処理し、剥がれてきた HUV EC を回収し、トリプシン中和液 (倉敷紡績株式会社製、HK-3220) に添加した。この細胞懸濁液を 800 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、HuMedia-EG2 (倉敷紡績株式会社製、KE-2150S) を加えて細胞濃度を 2.0×10^5 cells/mL に調整した。得られた細胞懸濁液と各ペプチドとを 1:1 (v/v) の割合で混合した。

本実験では、ヒト由来の創傷治癒作用を有する生体防御ペプチドとして知られている LL-37 (Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser: ペプチド配列番号 25 / 株式会社ペプチド研究所製、4445-s) をポジティブコントロールとして用いて、合成ペプチドの管腔形成促進作用を評価した。なお、LL-37 がヒト由来の創傷治癒作用を有する生体防御ペプチドであることは、例えば、1) M. Carretero, M. J. Escamez, M. Garcia, B. Duarte, A. Holguin, L. Retamosa, J. L. Jorcano, M. del Rio, and F. Larcher: *In vitro and in vivo wound healing promoting activity of human cathelicidin LL-37*. *Journal of Investigative Dermatology*, (2008) Vol. 128, pp. 233-236.、2) R. Ramos, J. P. Silva, A. C. Rodrigues, R. Costa, L. Guardao, F. Schmitt, R. Soares, M. Vilanova, L. Domingues, and M. Gama: *Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37*. *Peptides*, (2011) Vol. 32, pp. 1469-1476. などに記載されている。

【0063】

マトリゲル (Becton Dickinson and Company, 354234) は常温では固まり、4 で液体状態になるため、はじめに 40 μL のマトリゲルを氷上で 96 穴プレート (#3595, Corning社製) に添加した。添加したマトリゲルを 37 で 30 分間インキュベートした後、予め準備しておいた細胞懸濁液と各ペプチド、又は LL-37 との混合液 (100 μL) を添加し、15 時間培養した。

マトリゲル内で HUV EC が形成した管腔構造を、顕微鏡を用いて 40 倍の倍率で観察し、写真撮影を行った。また、得られた画像から 300 x 400 pixel の範囲を抽出し、形成された管腔構造をした細胞の長さの合計値を測定し、各ペプチドの創傷治癒作用を評価した。

【0064】

〔実施例 5：合成ペプチドの溶血活性の測定〕

綿羊脱繊維無菌血液 (0102-1、株式会社日本バイオテスト研究所製、以下「赤血球」とも称する) を用いて、前記ペプチドの溶血活性を試験した。

マイクロチューブ中にて、40 µlの赤血球を960 µlの生理的食塩を含むリン酸緩衝液(PBS: pH 7.2)に4体積%になるように懸濁して懸濁液とした。前記懸濁液を5,000 rpmにて、5分間遠心分離した後、上清液を除き、新たに960 µlのPBSを加えて赤血球を再懸濁した。この操作を3回繰り返した後、得られた赤血球をサンプルとして用いた。任意の濃度に希釈された12種類のペプチド(配列番号13~24)溶液、又は0.1質量% Triton X-100(595-13135、和光純薬工業株式会社製)を96穴プレート(#3595、Corning社製)の各ウェルに50 µlずつ分注した。次に、4体積%の赤血球懸濁液を各ウェルに50 µlずつ分注した後、37 °Cにて1時間インキュベーションした。その後、4,000 rpmにて10分間遠心分離を行った。遠心分離によって得られた50 µlの上清液を、あらかじめ50 µlのPBS又は水を分注しておいたウェルに添加した。マイクロプレートリーダー(2030 Arvo™ X、PerkinElmer社製)を用いて、各ウェルの405 nmにおける吸光を測定した。前記ペプチドを添加しないときの吸光度を0%、及び前記ペプチドの代わりに0.1質量% Triton X-100を添加したときの吸光度を100%として、次の式を用いて溶血活性を評価した。

$$\text{溶血活性(\%)} = (A_{\text{peptide}} - A_0) \times 100 / (A_{\text{Triton X-100}} - A_0)$$

ここで、 A_0 は無添加のときの吸光度、 A_{peptide} は各ペプチドを添加したときの吸光度、及び $A_{\text{Triton X-100}}$ は0.1質量% Triton X-100を添加したときの吸光度をそれぞれ示す。

【0065】

結果を図3~12及び表5に示した。なお、表5中、「N.D.」は、「検出されなかった」ことを示し、「-」は、「測定していない」または「測定しなかった」ことを示す。

< 抗菌活性 >

【0066】

フラクシオン(図3~10)

図3~6から明らかのように、ペプシンを用いた米糠タンパク質加水分解物(フラクシオン)は、等電点が高いフラクシオンに抗菌活性を検出した。すなわち、No.18~20のフラクシオンは*P. gingivalis* ATCC 33277と*P. acnes* JCM 6473に対して強い抗菌活性を示した。また、No.20のフラクシオンは、グラム陽性菌の*S. mutans* JCM 5705、及び日和見感染真菌の*C. albicans* NBRC 1385に対しても、強い抗菌活性を示した。

一方、図7~10から明らかのように、トリプシンとキモトリプシンの等質量混合物を用いた米糠タンパク質加水分解物(フラクシオン)は、等電点が高いNo.20のフラクシオンは*P. gingivalis* ATCC 33277と*P. acnes* JCM 6473に対して強い抗菌活性を示した。

合成ペプチド(表5)

表5から明らかのように、いずれのペプチドも*P. gingivalis* ATCC 33277に対して抗菌活性を示した。また、配列番号16のペプチドは、グラム陽性菌の*S. mutans* JCM 5705、及び*P. acnes* JCM 6473、並びに真菌の*C. albicans* NBRC 1385に対して、すべて抗菌活性を示した。

前記配列番号20のペプチドは、特に代表的な歯周病である*P. gingivalis* ATCC 33277、ニキビ原因菌である*P. acnes* JCM 6473、及び日和見感染真菌の*C. albicans* NBRC 1385に対して抗菌活性を示した。

【0067】

< 抗炎症作用 >

表5から明らかのように、配列番号13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,

10

20

30

40

50

24の10種類のペプチドは濃度依存的にエンドトキシンを中和することが示された。特に、配列番号15、16、20の中和活性は、ポリミキシンB（P1004-1、Sigma社製；医療用の抗菌薬であり、0.1 μ Mにおいて約50%の中和活性を示す。）と同等であった。

【0068】

< 損傷治癒作用 >

各ペプチド及びLL-37のHUVECに対する管腔形成促進作用を図11及び12に示した。また、ペプチドを添加したときの細胞の長さのペプチドを添加していないコントロールの細胞長さに対する割合を表5にまとめた。図11及び12並びに表5から明らかのように、12種類のうち8種類のペプチド（配列番号13、14、16、17、18、19、22及び24）は、LL-37と同じ濃度範囲において管腔形成促進作用を示し、その作用は濃度に依存していた。また、顕微鏡観察した結果から、10 μ Mのペプチドを添加したときに、10 μ MのLL-37を添加したときと同じように、無添加の場合に比べて細胞の増殖が促進され、管腔構造をした細胞の長さが増加していることがわかった。したがって、8種類のペプチド（配列番号13、14、16、17、18、19、22及び24）は、LL-37と同じようにHUVECの管腔形成促進作用を有することから、創傷治癒作用があることがわかった。

10

【0069】

< 溶血活性 >

強い抗菌活性を有するが、同時に強い溶血活性を持つハチ毒中の抗菌ペプチドであるMelittin（511-97531、Serva Electrophoresis社製）は、10 μ Mにおいても94%の溶血活性を示した。一方、前記ペプチドは、表5から明らかのように、500 μ Mの濃度においてほとんど溶血活性を示さなかった。したがって、前記ペプチドは、抗菌活性、抗炎症活性、及び創傷治癒作用を示す濃度範囲において、溶血活性を示さないことが確認された。

20

【0070】

【表 5】

フラクションNo.	タンパク質の配列番号	ペプチドの位置	ペプチドの配列番号	ペプチドの配列	抗菌活性 増殖阻害率[%]				損傷治癒作用		抗炎症作用			
					添加濃度 [μM]	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	添加濃度 [μM]	管腔形成促進 進活性 [%]	添加濃度 [μM]	エンドキシン 中和活性 (%)	溶血活性[%]
1	101-113	13	KMTRRGARVDGGG		300	27.2	-	-	-	1	115.8	0.1	-	2.7
					500	54.6	ND	N.D.	N.D.	10	126.1	1	83	
2	360-376	14	RGAVARVGVYRENARV		300	93.6	12.4	-	-	1	121.4	0.1	-	2.7
					500	N.D.	28.7	-	N.D.	10	128.3	1	97.7	
PBP-P-20	3	93-108	RRREPSSTRYRETLPP		300	53.8	-	-	-	1	94	0.1	-	3.5
					500	N.D.	ND	N.D.	N.D.	10	102.2	1	98.9	
4	65-73	16	LLRRLIARH		300	99.2	66.7	69.7	71.5	1	125.5	0.1	13.3	2.6
					500	ND	ND	ND	N.D.	10	140.2	1	85.8	
5	244-255	17	FTTSARRHPQF		300	-	-	-	-	1	110.4	0.1	-	4
					500	ND	ND	N.D.	N.D.	10	124.1	1	65.2	
6,7	160-172	18	EQRPFRANRHGRL		300	15.9	-	-	68.2	1	123.4	0.1	-	7.7
					500	29.7	-	ND	N.D.	10	132.5	1	89.7	
PBP-P-19	6,7	89-100	SSFSKGVGRAAF		300	53.4	-	-	-	1	134.9	0.1	13.7	2
					500	N.D.	-	ND	-	10	140.4	1	72	
PBP-P-18	8	196-206	LHPNVKLRLLI		300	64.6	37.8	-	34.9	1	57.9	0.1	10.5	0
					500	N.D.	55.7	ND	67.1	10	63	1	99.6	
PBP-T/C-20	9	8-15	KKEKGRKK		300	-	28.1	-	86.2	1	98.5	0.1	-	3.9
					500	N.D.	46.5	N.D.	N.D.	10	103	1	65.8	
10	57-64	22	QRTVEKQR		300	-	-	-	-	1	129.3	0.1	7.6	2.6
					500	N.D.	ND	N.D.	-	10	126.8	1	12.1	
PBP-T/C-19	11	72-82	RRSARHGAGVA		300	35.9	-	-	30.9	1	85.3	0.1	-	2.6
					500	62.6	-	N.D.	44.7	10	63.9	1	5.1	
12	109-119	24	RAPRWAGEQH		300	-	-	-	16.7	1	121.7	0.1	4.8	6.4
					500	N.D.	-	N.D.	40.2	10	137.2	1	86.1	
LL-37					0.1	104.7				0.1	104.7			
					1	117.4				1	117.4			
					10	128.2				10	128.2			

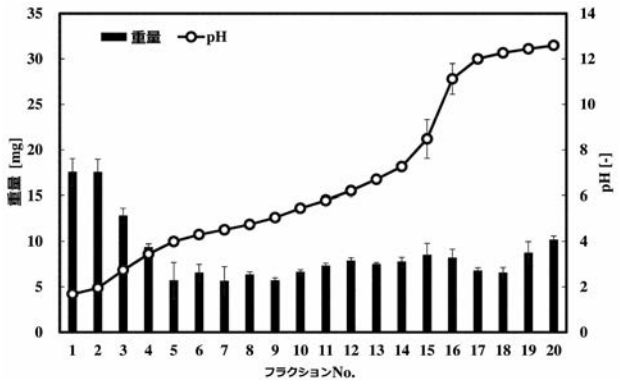
10

20

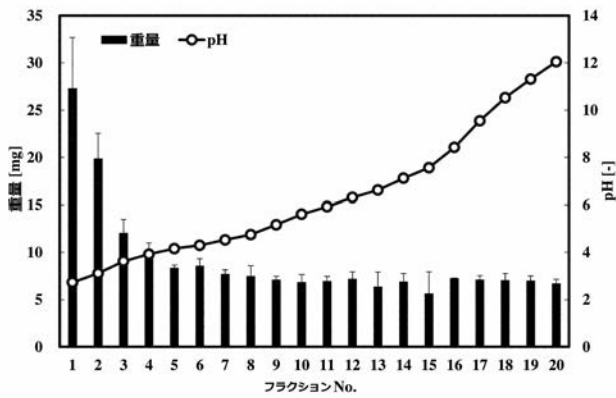
30

40

【 図 1 】

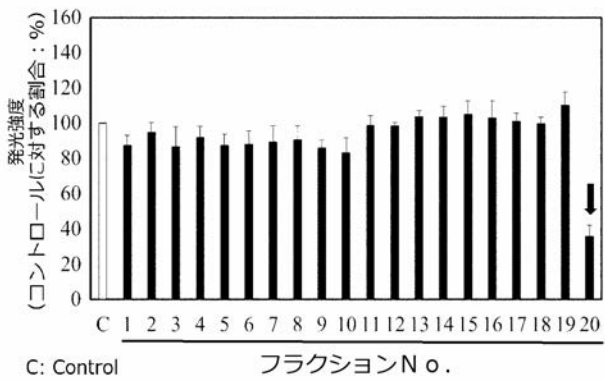


【 図 2 】



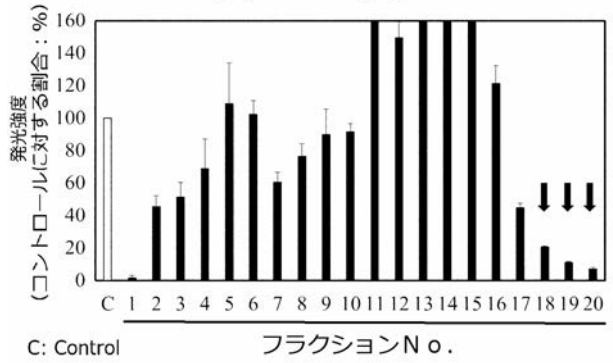
【 図 4 】

B. Streptococcus mutans



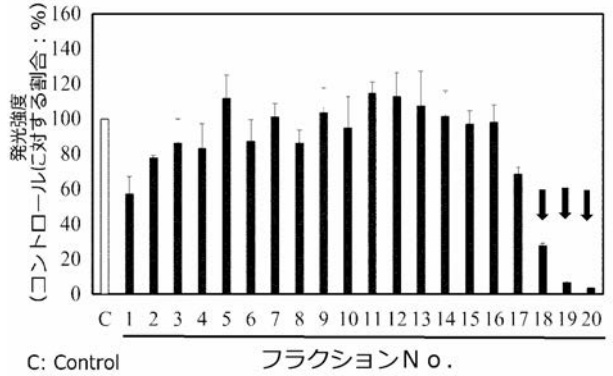
【 図 3 】

A. Porphyromonas gingivalis

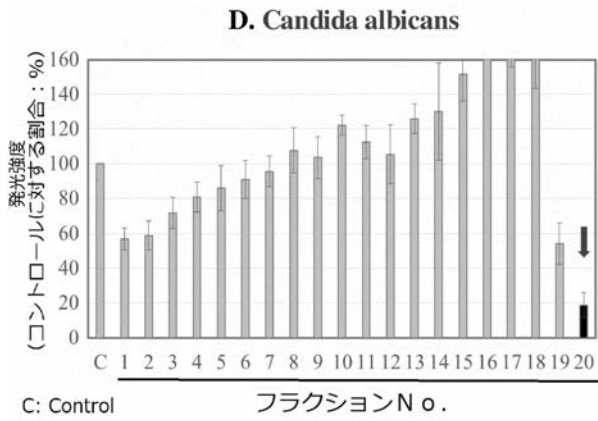


【 図 5 】

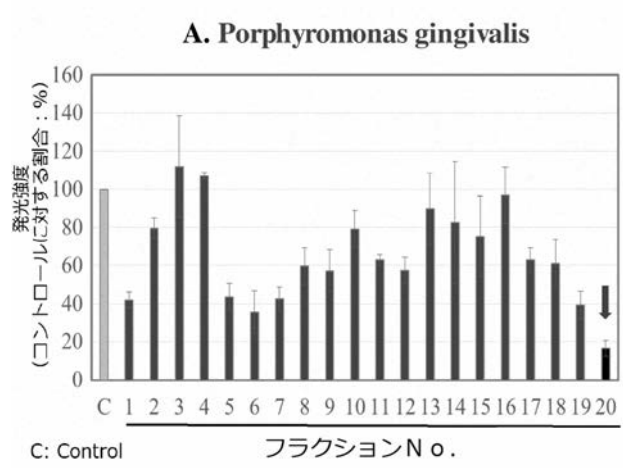
C. Propionibacterium acnes



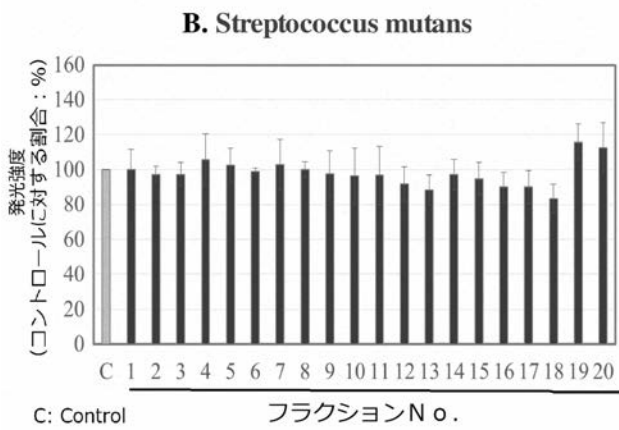
【 図 6 】



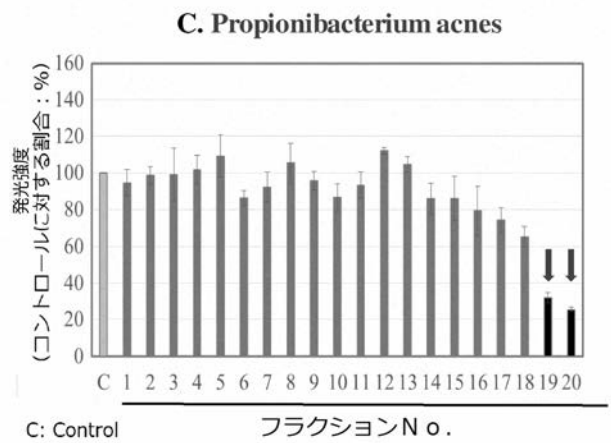
【 図 7 】



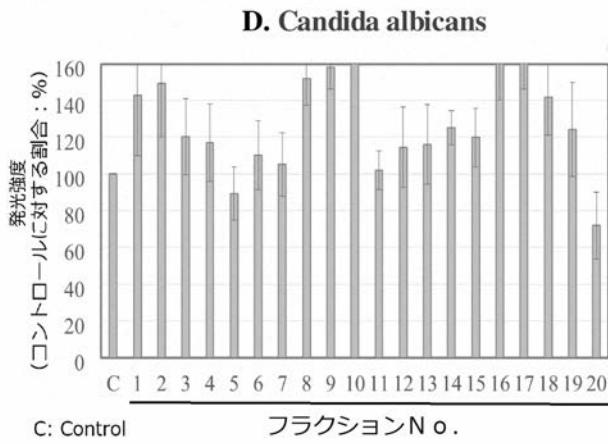
【 図 8 】



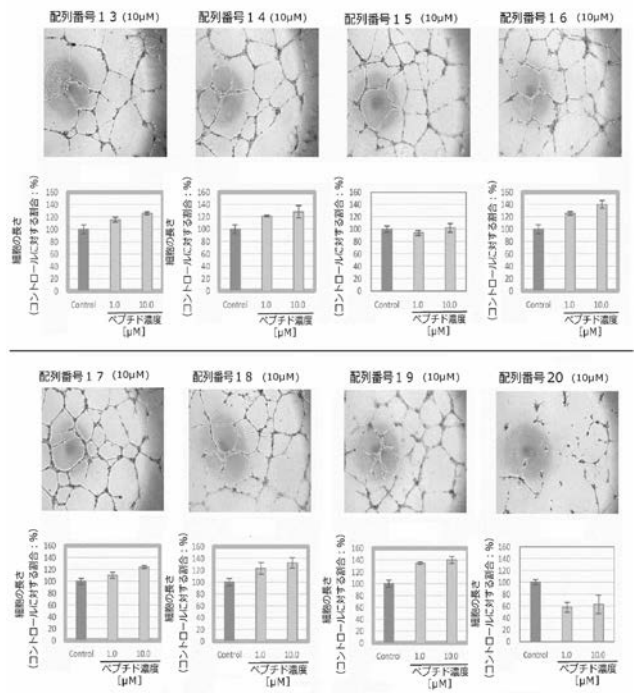
【 図 9 】



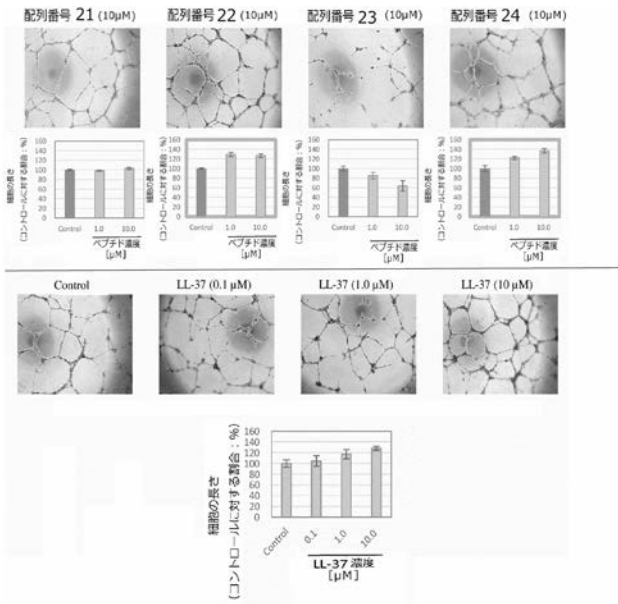
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2017149692000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 Q 17/00 (2006.01)	A 6 1 Q 17/00	4 H 0 4 5
A 2 3 L 33/185 (2016.01)	A 2 3 L 33/185 Z N A	
A 2 3 K 10/37 (2016.01)	A 2 3 K 10/37	
A 2 3 K 20/147 (2016.01)	A 2 3 K 20/147	
A 2 3 K 10/14 (2016.01)	A 2 3 K 10/14	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	

(72)発明者 落合 秋人
新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 新潟大学工学部内

(72)発明者 築野 卓夫
和歌山県伊都郡かつらぎ町大字新田 9 4 番地 築野食品工業株式会社内

(72)発明者 山中 崇
和歌山県伊都郡かつらぎ町大字新田 9 4 番地 築野食品工業株式会社内

F ターム(参考) 2B150 AB03 AB10 BA02 BB04 CA03 CE12 DC23 DD45 DD58
4B018 LB01 LB02 LB08 LB10 LE03 LE06 MD20 MD48 ME09 ME14
4C083 AA111 BB51 CC02 EE12
4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA20 BA21 BA22 BA23
BA43 CA14 NA14 ZB111 ZB351
4C088 AB74 BA16 BA35 CA25 NA14 ZB11 ZB35
4H045 AA30 BA15 BA16 BA17 CA31 EA20 EA22 EA29 FA70 GA10
GA15