

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/150548

発行日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)

(43) 国際公開日 平成29年9月8日 (2017. 9. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06 Z N A	4 B O 1 8
A23L 33/18 (2016.01)	A 2 3 L 33/18	4 C O 8 4
C07K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415	4 H O 4 5
A23J 3/34 (2006.01)	A 2 3 J 3/34	
A23J 3/16 (2006.01)	A 2 3 J 3/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

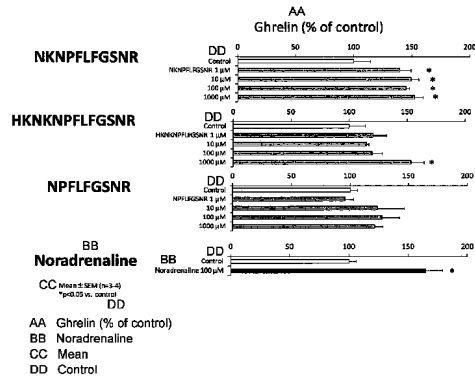
出願番号 特願2018-503338 (P2018-503338)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/007870	
(22) 国際出願日 平成29年2月28日 (2017. 2. 28)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-36599 (P2016-36599)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(32) 優先日 平成28年2月29日 (2016. 2. 29)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 大日向 耕作 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 中戸 絢也 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 青木 隼人 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド

(57) 【要約】

N末端にアミノ酸配列NKNPFLFGSNR (配列番号1) を有するペプチド。



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
N末端にアミノ酸配列NKNPFLFGSNR（配列番号1）を有するペプチド。
- 【請求項 2】
大豆のベータコングリシニンタンパク質のトリプシン消化物に由来する、請求項1に記載のペプチド。
- 【請求項 3】
請求項1または2に記載のペプチドを有効成分とする医薬組成物。
- 【請求項 4】
請求項1または2に記載のペプチドを有効成分とするグレリン分泌促進剤。 10
- 【請求項 5】
請求項1または2に記載のペプチドを含有する食品。
- 【請求項 6】
請求項1または2に記載のペプチドを添加することを特徴とする食品。
- 【請求項 7】
食欲促進及び/または成長ホルモンの分泌促進のための、請求項5または6に記載の食品。
- 【請求項 8】
請求項1または2に記載のペプチドを必要とする患者または予備群に投与する工程を含む、食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進する方法。 20
- 【請求項 9】
食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進するための、請求項1または2に記載のペプチド。
- 【請求項 10】
食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬または食品を製造するための、請求項1または2に記載のペプチドの使用。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
本発明は、新規なペプチドに関する。 30
- 【背景技術】
- 【0002】
グレリンは、食欲促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を有する消化管ホルモンである。超高齢化社会を迎える我が国では、加齢に伴う食欲不振や成長ホルモン分泌減少の改善に寄与する、グレリン分泌促進物質の開発が望まれている。
- 【0003】
特許文献1には、グレリン受容体を活性化する低分子ペプチドが記載されている。特許文献2には、大豆タンパク質由来の成長ホルモン分泌促進組成物が記載されている。しかしながら、グレリンの分泌を促進する食品由来のペプチドは知られていなかった。
- 【先行技術文献】 40
- 【特許文献】
- 【0004】
- 【特許文献1】特開2005-082489
- 【特許文献2】特開2006-347946
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0005】
本発明は、グレリンの分泌促進作用を有する新規なペプチド、並びに、該ペプチドを含む医薬及び食品を提供することを目的とする。
- 【課題を解決するための手段】 50

【0006】

本発明者は、上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねてきた。その結果、ベータコングリシニンタンパク質のトリプシン消化物中に、グレリンの分泌促進作用を有するペプチドを見出した。本発明はかかる知見に基づいて、さらに検討を重ねて完成されたものである。

【0007】

すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

【0008】

項1、N末端にアミノ酸配列NKNPFLFGSNR（配列番号1）を有するペプチド。

【0009】

項2、大豆のベータコングリシニンタンパク質のトリプシン消化物に由来する、項1に記載のペプチド。

【0010】

項3、項1または2に記載のペプチドを有効成分とする医薬組成物。

【0011】

項4、項1または2に記載のペプチドを有効成分とするグレリン分泌促進剤。

【0012】

項5、項1または2に記載のペプチドを含有する食品。

【0013】

項6、項1または2に記載のペプチドを添加することを特徴とする食品。

【0014】

項7、食欲促進及び/または成長ホルモンの分泌促進のための、項5または6に記載の食品。

【0015】

項8、項1または2に記載のペプチドを必要とする患者または予備群に投与する工程を含む、食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進する方法。

【0016】

項9、食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進するための、項1または2に記載のペプチド。

【0017】

項10、食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬または食品を製造するための、項1または2に記載のペプチドの使用。

【発明の効果】

【0018】

本発明のペプチドを有効成分とする医薬組成物、食品は、グレリンの分泌促進作用に基づき、食欲促進や成長ホルモンの分泌促進の作用を発揮する。これらの作用に基づき、食欲不振、筋肉量低下、ロコモティブシンドロームの予防や治療に好適に使用することができる。本発明のペプチドは、副作用が低く長期の服用に適したものである。また、本発明の医薬組成物、食品は、経口投与で有効である。

【0019】

本発明のペプチドは、大豆ベータコングリシニンタンパク質の酵素消化物であるので、副作用は問題にならない。また、大豆ベータコングリシニンタンパク質は、大豆中に多量に含まれるので、低コストで製造できる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】酵素消化物がグレリン分泌に与える影響。

【図2】ペプチドがグレリン分泌に与える影響。

【図3】ペプチドがグレリン分泌に与える影響。

【図4】グレリン分泌量増加の作用機構の検証結果。

【図5】グレリン分泌促進の作用機序の検証結果。

10

20

30

40

50

【図6】経口投与による摂食行動への影響。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明のペプチドは、N末端にNKNPFLFGSNR（配列番号1）の11残基のアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0022】

本発明のペプチドは、好ましくは11～50アミノ酸残基、より好ましくは11～25アミノ酸残基、さらに好ましくは11～15アミノ酸残基、特に好ましくは11、12、13若しくは14アミノ酸残基を有する。配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、1～10番目のアミノ酸配列、1～9番目のアミノ酸配列、1～8番目のアミノ酸配列、1～7番目のアミノ酸配列、1～6番目のアミノ酸配列、1～5番目のアミノ酸配列、1～4番目のアミノ酸配列及び1～3番目のアミノ酸配列からなるペプチドも本発明の別の態様として挙げられる。

10

【0023】

本発明のペプチドとしては、NKNPFLFGSNR（配列番号1）のアミノ酸配列を有するペプチド、NKNPFLFGSNRFETLFGKQYGR（配列番号2）のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

【0024】

ペプチドを構成するアミノ酸は、L体のアミノ酸、D体のアミノ酸或いはDL体のアミノ酸（D体とL体が混合されたアミノ酸であればラセミ体といずれか一方のエナンチオマーが過剰なアミノ酸のいずれも含まれる）のいずれを使用することができる。好ましくはL体のアミノ酸のみ、或いはD体のアミノ酸のみからなるペプチド、特にL体のアミノ酸のみからなるペプチドが好ましい。

20

【0025】

また、本発明で使用するペプチドが2以上の不斉炭素を含む場合、各エナンチオマーないしジアステレオマー或いはこれらの任意の比率の混合物のいずれの形態でもあり得る。エナンチオマーまたはジアステレオマーの分離は、通常のカラムで行う方法、光学活性カラムを使用したり、光学活性基を導入して誘導体の形態で光学分割した後、その光学活性基を除去する方法や、光学活性の酸または塩基との塩を形成して光学分割する方法などの公知のいずれの方法を用いることができる。

30

【0026】

ペプチドは、修飾を有することができる。ペプチドのアミノ末端（N末端）は、遊離のアミノ基（ NH_2 -）であっても、アセチル基（ CH_3CO -）などの修飾を有するものであってもよい。ペプチドのカルボキシ末端（C末端）は、遊離のカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）であっても、アミド基などの修飾を有するものであってもよい。ペプチドのアミノ酸残基は、無修飾ものであっても、リン酸基、糖鎖などの修飾を有するものであってもよい。

【0027】

本発明のペプチドは、塩（酸付加塩又は塩基塩）であってもよい。酸付加塩としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、臭化水素酸、過塩素酸などの無機塩、クエン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸の塩が挙げられる。塩基塩としては、ナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩などが挙げられる。

40

【0028】

本発明のペプチドは、溶媒和物であってもよい。溶媒和物としては、水（水和物の場合）、メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸、テトラヒドロフラン、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド、アセトアミド、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジメトキシエタンなどの溶媒和物が挙げられる。

50

【0029】

本発明のペプチドは、天然のタンパク質ないしポリペプチドの加水分解により得ることもでき、化学合成により得ることもできる。

【0030】

例えば、本発明のペプチドは、大豆の主要貯蔵タンパク質ベータコングリシニン（ β -conglycinin、 β -CG）タンパク質の、トリプシンの加水分解により得ることができる。

【0031】

トリプシンは、ヒトなどの哺乳類の場合は膵臓由来の酵素であり、公知のタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）である（EC3.4.21.4）。トリプシンは、我が国において食品添加物として使用することができる。トリプシンは、試薬グレード、食品添加物グレードなどの市販されているものを使用することができる。

10

【0032】

トリプシンにより加水分解をする基質は、大豆 β -CGタンパク質を含むものであればとくに限定されない。例えば、大豆それ自体、大豆から大豆油を抽出した搾りかす（ミール、脱脂大豆ともいう。）、精製したベータコングリシニンタンパク質などが挙げられる。

【0033】

トリプシンによる加水分解は、本発明のペプチドが得られる条件で行う。反応温度は30～70℃、30～40℃、40～70℃、50～65℃などから適宜選択することができる。反応時間は、30分～48時間程度、1～10時間程度、2～8時間程度などから適宜選択することができる。反応を行うpHは、pH6.5～8.5程度、pH7～8程度から適宜選択することができる。一つの好適な態様においては、30～40℃程度の温度、pH6.5～8.5（特に、pH7.5程度）の条件下で、2～8時間程度反応させることができる。

20

【0034】

加水分解が過度に行われる条件下では、本発明のペプチドが得られない場合がある。

【0035】

必要に応じて、トリプシンが失活する温度に加熱（例えば、80℃を超える温度で5～60分程度での加熱）することで、トリプシンを失活させる。

【0036】

加水分解の反応生成物は、そのまま使用してもよく、精製により有効成分のペプチドを分離して使用してもよい。

30

【0037】

また本発明のペプチドは、ペプチド合成法で取得することもできる。即ち、ペプチド合成に通常用いられる方法である液相法または固相法で、反応性カルボキシル基を有する原料と、反応性アミノ基を有する原料とをHBTU等の活性エステルを用いた方法や、カルボジイミドなどのカップリング剤を用いた方法等のペプチド合成において通常の方法により縮合させることができる。生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去することによっても製造し得る。

【0038】

この反応工程において反応に関与すべきでない官能基は、保護基により保護される。アミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル（CBZ）、*t*-ブチルオキシカルボニル（Boc）、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）等が挙げられる。カルボキシル基の保護剤としては例えばアルキルエステル、ベンジルエステル等を形成し得る基が挙げられるが、固相法の場合は、C末端のカルボキシル基はクロロトリチル樹脂、クロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、*p*-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合している。縮合反応は、カルボジイミド等の縮合剤の存在下にあるいはN-保護アミノ酸活性エステルまたはペプチド活性エステルを用いて実施する。

40

【0039】

縮合反応終了後、保護基は除去されるが、固相法の場合はさらにペプチドのC末端と樹脂との結合を切断する。更に、本発明のペプチドは通常の方法に従い精製される。例えば

50

イオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。合成したペプチドの合成はエドマン分解法でC-末端からアミノ酸配列を読み取るプロテインシーケンサー、GC-MS等で分析される。

【0040】

本発明のペプチドは、酵素法によっても合成することが可能である（W02003/010307参照）。

【0041】

本発明のペプチドは、グレリンの分泌を促進する作用を有する。グレリンは、下記の構造を有する生体由来のペプチドである。具体的には、アミノ酸残基28基からなり、3番目のセリン残基がn-オクタン酸で修飾されている。グレリンは、食欲促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を示す。

【0042】

【化1】



【0043】

従って、グレリンの分泌を促進する本発明のペプチドは、食欲促進作用（摂食促進作用）、成長ホルモンの分泌促進作用等のグレリンの分泌促進に基づく作用をも有する。食欲促進作用（摂食促進作用）に基づいて、本発明のペプチドは、高齢者における食欲不振の治療のためなどに使用することができる。成長ホルモンの分泌促進作用に基づいて、筋肉量低下の予防、ロコモティブシンドローム（ロコモ）の予防若しくは治療のためなどに使用することができる。

【0044】

本発明のペプチドがグレリンの分泌量を促進することは、当業者に公知の手法で評価することができる。例えば、文献：Iwakura H et.al. Endocrinology. 2010 Jun;151(6):2940-5に記載のグレリン分泌細胞MGN3-1に試験物質を添加して、所定時間培養後に回収した培地中のグレリンを定量することで、グレリンの分泌量を測定することができる。グレリンの定量は、ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbentAssay）などの免疫化学的手法により行うことができる。

【0045】

本発明のペプチドは、医薬組成物または食品（食品組成物）として提供されうる。

【0046】

本発明のペプチドまたはこれを含有する製品の投与経路は特に限定されるものではなく、経口投与、非経口投与、直腸内投与のいずれを採用することも可能であり、経口的あるいは非経口的に投与することができる。中でも、効果が高いとの観点から、経口投与が好ましい。

【0047】

本ペプチドの投与量は、投与方法、投与される者の状態や年齢等により異なるが、成人1日あたり通常は0.01mg/kg～500mg/kg、好ましくは0.05mg/kg～100mg/kg、より好ましくは0.1～30mg/kgである。本発明のペプチド（有効成分）は、製剤用担体と混合して調製した医薬組成物の形で投与することができる。製剤用担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドと反応しない物質が用いられる。

【0048】

本発明のペプチドはそれ自体医薬または食品として利用することができ、或いは単独で、もしくは適当な無毒性の経口摂取用担体、希釈剤または賦形剤とともに、タブレット（素錠、糖衣錠、発泡錠、フィルムコート錠、チュアブル錠など）、カプセル、トローチ、

10

20

30

40

50

粉末、細粒剤、顆粒剤、液剤、懸濁液、乳濁液、ペースト、クリーム、注射剤（アミノ酸輸液、電解質輸液等の輸液に配合する場合を含む）、或いは腸溶性の錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの徐放性製剤などの食品用もしくは医薬用の製剤にすることが可能である。食品中のペプチドの含有量は適宜選択が可能であるが一般に、0.01～100重量%の範囲である。

【0049】

具体的には、医薬または食品に加えることができる製剤用担体ないし経口摂取用担体、希釈剤または賦形剤のような物質の例として乳糖、ブドウ糖、マンニット、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン性界面活性剤、プロピレングルコール、水等が挙げられる。

10

【0050】

剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。尚、液体製剤にあつては、用時、水又は他の適当な溶媒に溶解または懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドを水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。

20

【0051】

これらの製剤は、本発明のペプチドを0.01%～100重量%、好ましくは1～90重量%の割合で含有することができる。これらの製剤はまた、治療上価値のある他の成分を含有していてもよい。

【0052】

経口投与用の固形製剤を製造するには、有効成分と賦形剤成分例えば乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、無水ケイ酸などと混合して散剤とするか、さらに必要に応じて白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを加えて湿式又は乾式造粒して顆粒剤とする。錠剤を製造するには、これらの散剤及び顆粒剤をそのまま或いはステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤を加えて打錠すればよい。これらの顆粒又は錠剤はヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸-メタクリル酸メチルポリマーなどの腸溶剤基剤で被覆して腸溶剤製剤、あるいはエチルセルロース、カルナウバロウ、硬化油などで被覆して持続性製剤とすることもできる。また、カプセル剤を製造するには、散剤又は顆粒剤を硬カプセルに充填するか、有効成分をそのまま或いはグリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油、オリーブ油などに溶解した後ゼラチン膜で被覆し軟カプセルとすることができる。

30

40

【0053】

経口投与用の液状製剤を製造するには、有効成分と白糖、ソルビトール、グリセリンなどの甘味剤とを水に溶解して透明なシロップ剤、更に精油、エタノールなどを加えてエリキシル剤とするか、アラビアゴム、トラガント、ポリソルベート80、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを加えて乳剤又は懸濁剤としてもよい。これらの液状製剤には所望により矯味剤、着色剤、保存剤などを加えてもよい。

【0054】

本発明に係るペプチドを添加、配合して調製しうる食品の具体的形態としては、例えば

50

、飲料類（コーヒー、ココア、ジュース、清涼飲料、ミネラル飲料、茶飲料、緑茶、紅茶、烏龍茶、乳飲料、乳酸菌飲料、ヨーグルト飲料、炭酸飲料、その他ノンアルコール飲料、アルコール飲料など）、菓子類（ハードキャンディー、ガム、グミ、ゼリー、プディング、ムース、ケーキ、キャンデー、クッキー、クラッカー、ビスケット、チョコレート、氷菓（アイスクリーム、アイスキャンディ、シャーベット、かき氷など）など）、ふりかけ、ドレッシング、調味料、大豆加工食品（豆腐、味噌、醤油、湯葉、きな粉、納豆など）、食肉加工食品（ハンバーグ、ミートローフ、ミートボール、つくねなど）、魚肉加工食品（かまぼこ、ちくわなど）、レトルト食品、ゼリー状食品（ゼリー、寒天、ゼリー状飲料等）、等を挙げることができる。本発明のペプチドを添加・配合して調製しうる食品としては、いわゆる健康食品、機能性食品、機能性表示食品、栄養補助食品、サプリメント、特定保健用食品、病者用食品・病者用組合せ食品（厚生労働省、特別用途食品の一種）又は高齢者用食品（厚生労働省、特別用途食品の一種）としてもよく、素錠、フィルムコート錠、糖衣錠、顆粒、粉末、タブレット、カプセル（ハードカプセルとソフトカプセルとのいずれも含む。）、チュアブルタイプ、シロップタイプ、ドリンクタイプ等とすることもできる。本発明に係るペプチドを添加・配合した食品の調製は、それ自体公知の方法で行うことができる。

10

【実施例】

【0055】

次に実施例により本発明を更に具体的に説明する。しかし下記の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

20

【0056】

<方法>

（グレリン分泌活性の評価）

グレリン分泌細胞MGN3-1を96ウェルプレートに 1×10^5 cells/well播種し、培地中24時間培養した。培養後、細胞をDPBSで洗浄し、試験物質100 μ L（Buffer：50 μ M sodium octanoate/DMEM）を添加した。なお、試験物質を添加しないBufferのみをcontrolとした。さらに4時間培養をした後に、培地を回収し遠心分離処理により上清（supernatant）を得た。上清に1N HClを10 μ L添加し、-80 で保存をした。

【0057】

試料中のグレリンの濃度をELISA法（Bertin Pharma社製、Ghrelin (Acylated) EIAKit A05117）により評価した。

30

【0058】

<製造例>

（酵素消化物）

精製した コングリシニン（-CG）タンパク質と消化酵素とを、酵素：-CG = 1：100（重量比、-CGの終濃度：20 mg/ml）で混合し、添付のバッファー中で反応を行った。

【0059】

使用した酵素と反応条件は以下の通りとした：

（i）トリプシン（SIGMA社製、T1426）；反応温度：37、反応時間：5時間、反応pH：7.5。

40

【0060】

上記の反応時間の経過後、試料をボイル（100、10分間）し、酵素反応を停止した。

【0061】

（ペプチド）

定法により、ペプチドNKNPFLFGSNR（配列番号1；実施例1）、ペプチドNKNPFLFGSNRFE TLFKNQYGR（配列番号2；実施例2）、ペプチドFETLTKNQYGR（配列番号3；比較例1）ペプチドHKKNPFLFGSNR（配列番号4；比較例2）及びNPFLFGSNR（配列番号5；比較例3）を合成した。

【0062】

50

(統計解析)

試験により得られたデータを、試行数 n の平均 (Mean) と標準誤差 (Standard error of the mean、SEM) との和 (Mean ± SEM) で表した。2群間の比較には t 検定を用いた。3群間以上の比較には、データを 1 方向 ANOVA により解析し、引き続いて多重比較のための Tukey-Kramer 試験を行った。p < 0.05 の場合 (図中、 " * ") に、有意差ありと判定した。

【 0 0 6 3 】

< 試験例 >

試験例 1 : -CG のトリプシン消化物

-CG のトリプシン消化物 (-CG Trypsin Digest) について、グレリン分泌細胞 MGN3-1 を用いて、グレリン分泌に与える影響を評価した。

10

【 0 0 6 4 】

結果を図 1 に示す。図中、横軸「Ghrelin (% of control)」は、対照 (Control, 試験物質を添加しない Buffer のみ) を MGN3-1 に添加した場合のグレリン分泌量の測定値に対する割合 (質量百分率) を示す。

【 0 0 6 5 】

-CG のトリプシン消化物 (-CG Trypsin Digest) は、グレリン分泌量を増加させる、グレリン分泌を促進する活性を有することが明らかとなった。

【 0 0 6 6 】

試験例 2 : ペプチド (1)

-CG のトリプシン消化物に含まれるペプチド NKNPFLFGSNRFETLFGKQYGR (配列番号 2) について、試験例 1 と同様にしてグレリン分泌に与える影響を評価した。

20

【 0 0 6 7 】

さらに、ペプチド NKNPFLFGSNRFETLFGKQYGR の N 末端側及び C 末端側のそれぞれに対応する、ペプチド NKNPFLFGSNR (配列番号 1) 及びペプチド FETLFGKQYGR (配列番号 3) についても、グレリン分泌に与える影響を評価した。

【 0 0 6 8 】

結果を図 2 に示す (n=3-4)。ペプチド NKNPFLFGSNRFETLFGKQYGR (配列番号 2) は、100 μM で強力なグレリン分泌を促進する活性を有することが明らかとなった。また、ペプチド NKNPFLFGSNR (配列番号 1) は、1 μM 以上で強力なグレリン分泌を促進する活性を有することが明らかとなった。

30

【 0 0 6 9 】

試験例 3 : ペプチド (2)

ペプチド HKNKNPFLFGSNR (配列番号 4) 及び NPFLFGSNR (配列番号 5) についても、グレリン分泌に与える影響を評価した。また、対象としてグレリンの分泌を促進することが知られている 100 μM ノルアドレナリン (Noradrenaline) についても試験を行った。

【 0 0 7 0 】

結果を図 3 に示す (n=3-4)。ペプチド NKNPFLFGSNR (配列番号 1) の結果との対比から、NKNPFLFGSNR の 11 残基がグレリンの分泌促進において特に重要であることが明らかとなった。

【 0 0 7 1 】

参考試験例

試験例 2 及び 3 で用いた各ペプチドが、-CG のトリプシン消化物に含まれることを質量分析法により確認した。結果を表 1 に示す。表中、RT は保持時間 (retention time) を示す。

40

【 0 0 7 2 】

【表 1】

ペプチド	RT (min)	アミノ酸 残基数	生成率 (mol%)
NKNPFLFGSNRFETLFGKNQYGR	38.5	22	14.2
FETLFGKNQYGR	32.0	11	2.7
NKNPFLFGSNR	32.5	11	7.2
HKKNPFLFGSNR	30.5	13	3.4
NPFLFGSNR	34.0	9	2.6

10

【0073】

試験例 4：グレリン分泌量増加の作用機構

本発明のペプチドによる作用が、グレリンの合成を促進するか、すでに合成されたグレリンの分泌を促進するのかを検証した。試験物質としては、-CGのトリプシン消化物及びペプチドNKNPFLFGSNR（配列番号1）を用いた。

20

【0074】

培養液中のグレリンについては、試験例1及び2と同様にして評価した。

【0075】

細胞中のグレリンについては、培地を除去した後、グレリン分泌細胞MGN3-1にRIPA Buffer（ナカライテスク社製）を添加して溶解し、溶解液を遠心分離することにより上清（supernatant）を得た。上清に1N HClを10 μ L添加し、-80 で保存をした。試料中のグレリンの濃度は試験例1及び2と同様にして評価した。

30

【0076】

結果を図4に示す（n=4-5）。図4Aには培養液中のグレリンの定量結果を示す。図4Bには細胞中のグレリンの定量結果を示す。細胞中のグレリンは増加していないため、本発明のペプチドはグレリン合成促進ではなく分泌を亢進する作用を有することが明らかとなった。

【0077】

試験例 5：作用機構

グレリンの分泌促進に至る作用機構を検証した。ペプチドNKNPFLFGSNR（配列番号1）が、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度（[Ca²⁺]）に与える影響を評価した。

【0078】

細胞内cAMP濃度の測定については、グレリン分泌細胞MGN3-1を96ウェルプレートに1 x 10⁵ cells/well播種し、培地中で24時間培養した。培養後、細胞をDPBSで洗浄し、試験物質45 μ L（Buffer：0.5 mM IBMXを含むKrebs-Ringer-HEPES buffer）を添加した。さらに30分間培養をした後に、細胞内のcAMPをHitHunter cAMP Assay for small molecules（DiscoverX社製）を用いて定量した。

40

【0079】

細胞内カルシウムイオン濃度については、文献：Kagebayashi T et.al. Mol. Nutr. Food Res. 2012 Sep;56(9):1456-63に記載の方法に従って測定した。

【0080】

結果を図5に示す。図5Aは、細胞内のcAMPの定量結果を示す。図5Bは、細胞内カルシウムイオン濃度の変化（[Ca²⁺]i）を示す。ノルアドレナリンは、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度の増加を介して、グレリンの分泌を促進することが知られている。Gs型の三量体Gタンパク質の関与が知られている。これに対して、本発明のペ

50

プチドは、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度の変化を介さずにグレリンの分泌を促進するため、既知の経路とは異なる経路を介していると考えられる。

【0081】

試験例6：生体への投与

マウス (ddYマウス、雄、34~42g) に β -CGのトリプシン消化物 (30 mg/kg) 及びペプチドNKNPFLFGSNR (配列番号1) (0.3 mg/kg) を投与して、摂食行動への影響を評価した。

【0082】

単回投与については、生理食塩水に溶解した β -CGのトリプシン消化物及びペプチドNKNPFLFGSNR (配列番号1) をマウスに経口投与した後、予め秤量した飼料 (CE-2、日本クレア社製) を与え、6時間後に飼料重量を測定することにより摂食量 (Food intake (g/6 hrs)) を算出した。

10

【0083】

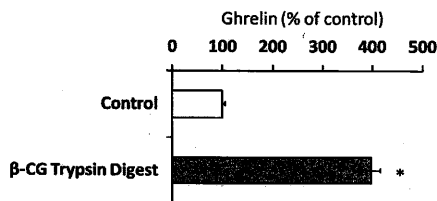
混餌投与については、粉末飼料 (CE-2、日本クレア社製) にペプチドNKNPFLFGSNR (配列番号1) を混合した (飼料中0.0003%, 0.0003% of diet)。予め秤量しておいた混合飼料をマウスに与え、24時間後に飼料重量を測定することにより摂食量 (Food intake (g/24 hrs)) を算出した。

【0084】

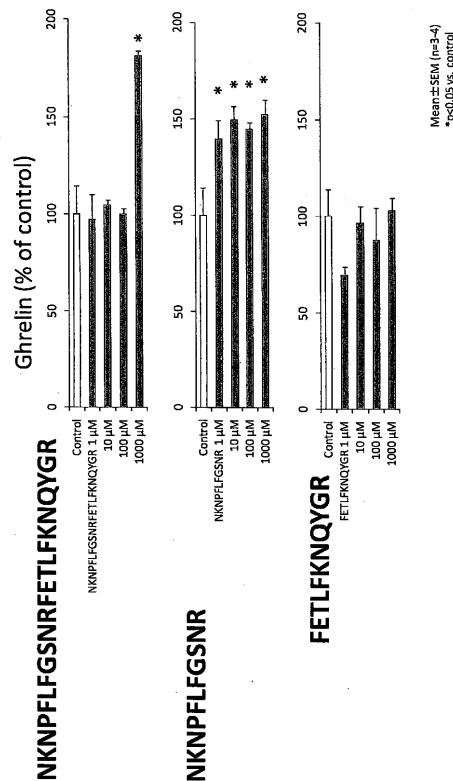
結果を図6に示す。図6Aは単回投与の結果を示す (n=5-6又はn=10-12)。図6Bは混餌投与の結果を示す (n=5-6又はn=10-12)。 β -CGのトリプシン消化物及びペプチドNKNPFLFGSNR (配列番号1) は、経口投与によりマウスの摂食を促進することが明らかとなった。

20

【図1】

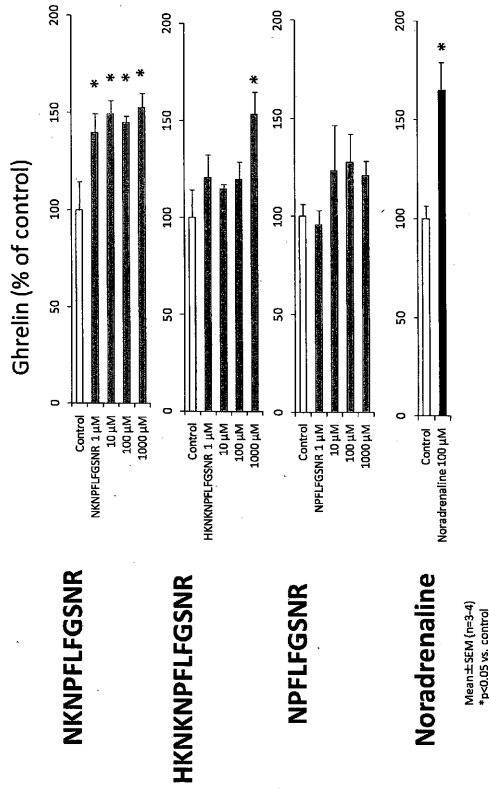


【図2】

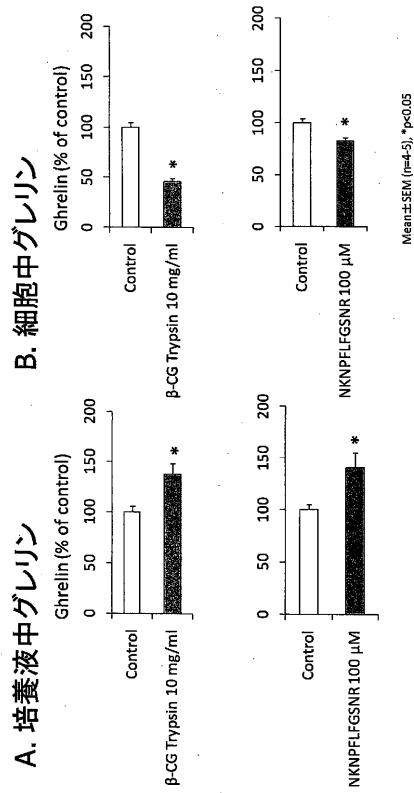


Mean \pm SEM (n=3-4)
*p<0.05 vs. control

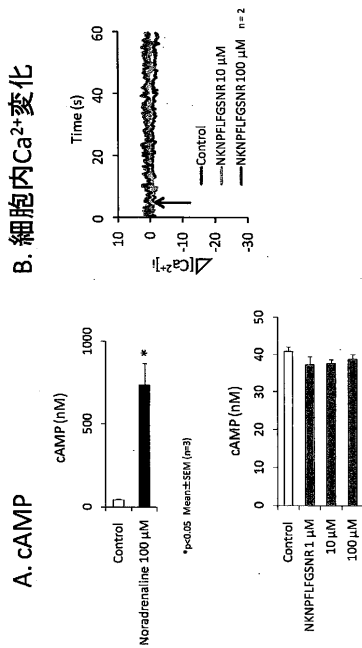
【 図 3 】



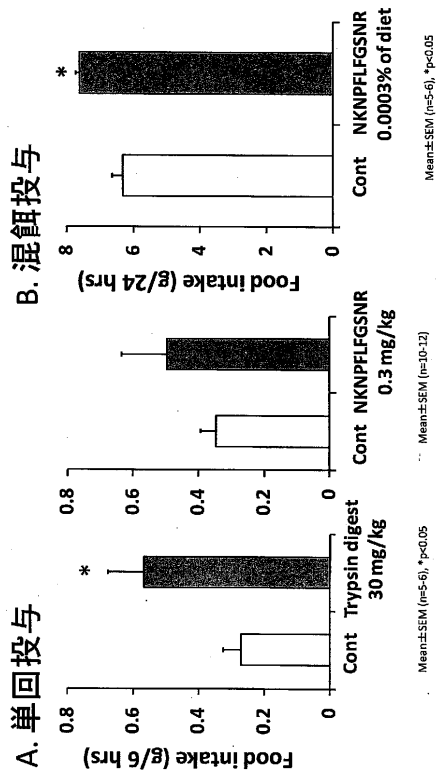
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2017150548000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/007870
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/47(2006.01)i, A23L33/105(2016.01)i, A23L33/18(2016.01)i, A23L33/185(2016.01)i, A61K36/48(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P1/14 (2006.01)i, A61P5/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/47, A23L33/105, A23L33/18, A23L33/185, A61K36/48, A61K38/00, A61P1/14, A61P5/06, A61P43/00, C07K7/06 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2012-502666 A (Solae L.L.C.), 02 February 2012 (02.02.2012), example 13; sequence no.108; claim 1; examples 24, 25 & WO 2010/033985 A1 example 13; sequence no.108; claim 1; examples 24, 25 & US 2011/0171360 A1 & US 2014/0030416 A1 & EP 2328422 A1	1, 2, 5-10/3, 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 March 2017 (30.03.17)		Date of mailing of the international search report 11 April 2017 (11.04.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/007870

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2010-524471 A (Solae L.L.C.), 22 July 2010 (22.07.2010), example 13; sequence no.108; claim 37; example 21 & WO 2008/131008 A2 example 13; sequence no.108; claim 37; example 21 & WO 2008/125685 A2 & US 2008/0305212 A1 & US 2008/0254505 A1 & EP 2146586 A1 & EP 2146589 A1	1, 2, 5-10/3, 4
A	WO 2013/129642 A1 (Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.), 06 September 2013 (06.09.2013), entire text & US 2015/0025147 A1 entire text & EP 2821069 A1	1-10
A	JP 2005-082489 A (Kyoto University), 31 March 2005 (31.03.2005), entire text (Family: none)	1-10
A	YAMADA, Y., et al, Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice, 2012, American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, Vol.302, E433- E440	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 7 8 7 0									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C07K14/47(2006.01)i, A23L33/105(2016.01)i, A23L33/18(2016.01)i, A23L33/185(2016.01)i, A61K36/48(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P5/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i											
B. 調査を行った分野											
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C07K14/47, A23L33/105, A23L33/18, A23L33/185, A61K36/48, A61K38/00, A61P1/14, A61P5/06, A61P43/00, C07K7/06											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X / A	JP 2012-502666 A (ソレイ リミテッド ライアビリティ カンパニー) 2012.02.02, 実施例 1 3、配列番号 1 0 8、請求項 1、実施例 2 4、実施例 2 5 & WO 2010/033985 A1, 実施例 1 3、配列番号 1 0 8、請求項 1、実施例 2 4、実施例 2 5 & US 2011/0171360 A1 & US 2014/0030416 A1 & EP 2328422 A1	1, 2, 5-10 / 3, 4									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー											
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献									
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 30.03.2017		国際調査報告の発送日 11.04.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光	4 B 3 9 6 3								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 7 8 7 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / A	JP 2010-524471 A (ソレイ リミテッド ライアビリティ カンパニー) 2010.07.22, 実施例 1 3、配列番号 1 0 8、請求項 3 7、実施例 2 1 & WO 2008/131008 A2, 実施例 1 3、配列番号 1 0 8、請求項 3 7、実施 例 2 1 & WO 2008/125685 A2 & US 2008/0305212 A1 & US 2008/0254505 A1 & EP 2146586 A1 & EP 2146589 A1	1, 2, 5-10 / 3, 4
A	WO 2013/129642 A1 (協和発酵バイオ株式会社) 2013.09.06, 全文 & US 2015/0025147 A1, 全文 & EP 2821069 A1	1-10
A	JP 2005-082489 A (国立大学法人京都大学) 2005.03.31, 全文 (ファミリーなし)	1-10
A	YAMADA, Y., et al, Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice, 2012, American Journal of Physiology · Endocrinology and Metabolism, Vol.302, E433-E440	1-10

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 2 3 L 33/185 (2016.01)	A 2 3 L 33/185	
A 6 1 K 38/03 (2006.01)	A 6 1 K 38/03	
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(出願人による申告)平成27年度、農林水産省、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業、産業技術力強化法第19条に係る特許出願。

(72) 発明者 岩倉 浩

京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4B018 MD15 MD20 MD58 ME02 MF12

4C084 AA02 AA07 BA02 BA08 BA18 BA19 BA23 BA43 CA15 MA52

NA14 ZA661 ZA691

4H045 AA10 AA30 BA16 CA33 DA46 EA01 EA20 FA10 FA70

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。