

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成18年8月10日(2006.8.10)

【公開番号】特開2001-316400(P2001-316400A)

【公開日】平成13年11月13日(2001.11.13)

【出願番号】特願2000-326370(P2000-326370)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

A 2 3 L 1/076 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/435 Z N A

A 2 3 L 1/076

【手続補正書】

【提出日】平成18年6月22日(2006.6.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ローヤルゼリーに含まれる分子量57キロダルトンタンパク質。

【請求項2】

下記に示す性質を有するものであることを特徴とする、請求項1記載の分子量57キロダルトンタンパク質。

1)還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が約57キロダルトンである。

2)配列番号1のアミノ酸番号1~8のアミノ酸配列を含む。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の分子量57キロダルトンタンパク質のローヤルゼリー中に於ける含有量をローヤルゼリー中の総蛋白量で除した値、又は前記除した値に100を乗してなる値を指標とするローヤルゼリーの鮮度の評価法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

【技術分野】

本発明は、ローヤルゼリーに含まれる分子量57キロダルトンタンパク質に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

何故なら、天然成分であるため、内容成分の構成にバラツキがある場合があり、その有効成分が正確に配合されているかどうか問題となっている。特に、ローヤルゼリーの様に

、その有効性が如実に認められ、それ自身が複数の成分からなるものは、どの物質が鮮度の指標として、有効性や品質を分析・評価するかを決めるのが困難である。従って、製剤や品質の安定性の面で特に、健康食品などに配合されるローヤルゼリーについて、ロット毎の有効性の度合いや自身の劣化の基準となる鮮度の指標用の物質の策定が望まれていた。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況をふまえて為されたものであり、ローヤルゼリーに含まれる分子量57キロダルトンタンパク質を提供することを課題とする。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

【課題を解決するための手段】

この様な状況に鑑みて、本発明者らは鋭意研究努力を重ねた結果、ローヤルゼリー中の鮮度の指標用の物質が分子量57キロダルトンタンパク質であり、且つ該タンパク質が生理活性物質であることを見出し、発明を完成させるに至った。該タンパク質について、以後、単に「57キロダルトンのタンパク質」或いは「分子量57キロダルトンタンパク質」と表現することがある。即ち、本発明は、次に示す技術に関するものである。

(1) ローヤルゼリーに含まれる分子量57キロダルトンタンパク質。

(2) 下記に示す性質を有するものであることを特徴とする、(1)記載の分子量57キロダルトンタンパク質。

1) 還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量が約57キロダルトンである。

2) 配列番号1のアミノ酸番号1～8のアミノ酸配列を含む。

(3) (1)又は(2)に記載の分子量57キロダルトンタンパク質のローヤルゼリー中に於ける含有量をローヤルゼリー中の総蛋白量で除した値、又は前記除した値に100を乗してなる値を指標とするローヤルゼリーの鮮度の評価法。

以下、本発明について、実施の形態を中心に説明を加える。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

【発明の実施の形態】

(1) 本発明の分子量57キロダルトンタンパク質

ローヤルゼリーの化学的組成は、生産地により、多少の差異はあるが、水分65～70%、タンパク質15～20%、炭水化物10～15%、脂肪1.7～6%、灰分0.7～2%含むとされている。ローヤルゼリーの生物学的・薬理学的作用については、老化予防作用、酵素作用、抗菌作用、抗腫瘍作用、血液・循環器に対する作用などが知られている。本発明の分子量57キロダルトンタンパク質は、ローヤルゼリーに含まれることを特徴とする。このタンパク質は本発明者らによって、はじめてローヤルゼリーの活性本体である

ことが確認された成分であり、限界運動量増強作用、肝細胞増殖促進作用、血中アンモニウム濃度抑制作用、血中乳酸蓄積抑制作用などの活性を発現することを見出している。ここで、このタンパク質の含有量であるが、前記効果を十分に発揮する為には、少なくともローヤルゼリー中の総タンパク質量に対して、9重量%以上を含んでいることが好ましい。このタンパク質はGPCカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって定量することができる。即ち、該分子量57キロダルトンタンパク質の多少により、ローヤルゼリーの効果の程度がわかる。更に、ローヤルゼリーを採取直後より、経時的に保存し、このタンパク質を定量した場合、このタンパク質の含有量は単調に減少し、それに伴い、上記に示した効果も同様に減少するため、上記タンパク質はローヤルゼリーの鮮度の指標用の物質であることがわかる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

(2) 高速液体クロマトグラフィーによるローヤルゼリー中の分子量57キロダルトンタンパク質分析

上記のタンパク質は、高速液体クロマトグラフィーによるゲル濾過でも識別・定量することが出来る。従って、この様な分析結果をもって、品質管理や効果の鑑別・評価に使用することもできる。かかるゲル濾過分析は、通常に知られている方法に従って行えば良く、この様な好ましい例としては、例えば、トソー株式会社製TSKゲルG3000SWをカラムとして用いて、0.3M塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウム含有0.1M燐酸緩衝液(pH7.0)を展開液とし、流速を0.3ml/min、カラム温度を35に設定し、280nmの吸光度で検出した結果、上記タンパク質を求めることが挙げられる。この分析条件下では上記タンパク質は、保持時間25分~30分にピークとして現れる。(電気泳動にて同一蛋白質を確認)また、既知分子量のゲル濾過分析の結果より、上記タンパク質は、57キロダルトンと確定された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

(4) 電気泳動によるローヤルゼリー中の分子量57キロダルトンのタンパク質の定性方法

本発明のローヤルゼリー中の分子量57キロダルトンのタンパク質は、電気泳動によりタンパク質の構成を分析し、有効成分であるタンパク質の分子量を特定することにより分析できる。まず非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の方法としては、特に限定されないが、好ましい方法としては、水溶性ローヤルゼリータンパク質(10%ローヤルゼリー水溶液(W/V))をポリアクリルアミドゲル(10%均一)にて、電流20mAで電気泳動し、クマシーブリリアントブルーにより染色して、タンパク質を特定する方法である。上記の条件でローヤルゼリー中の蛋白質の電気泳動を行うと、上記分子量57キロダルトンの蛋白質は、単一バンドを形成する。この点で、電気泳動により上記蛋白質の分解を調べるには、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動が好ましい。分子量マーカーとしてLMW kit E(ファルマシアバイオテク社)を用いた場合、上記蛋白質の分子量は約51キロダルトンである。また、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliらの方法(Laemmli, U. K. et al., J. Biol. Chem. 252, 1102-1106 (1977))によって行うことができる。この様な電気泳動に於ける本発明の蛋白質の分子量は、分子量マーカーとしてLMW kit E(ファルマシアバイオテク社)を用いた場合、57キロダルトンと

決定された。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

<実施例 1> ローヤルゼリー中のタンパク質を電気泳動にて分析した。結果、ローヤルゼリー劣化品に減少しているタンパク質がみられた。これが鮮度の指標用の物質になり、分子量 57 キロダルトンタンパク質と決定した。各サンプル 1 ~ 4 は以下に示す。1 : 台湾産で採集後 48 時間に処理したもの (10 mg / ml, W / V ; サンプル 1)、2 : 中国杭州産で採集後 48 時間に処理したもの (10 mg / ml, W / V ; サンプル 2)、3 : 中国杭州産で採取後 72 時間に処理したもの (10 mg / ml, W / V ; サンプル 3)、4 : サンプル 3 の劣化品 (10 mg / ml, W / V ; サンプル 4)。尚、劣化品は、40 で 1 週間放置したものである。これより、サンプル 1 ~ 3 には明確に 57 キロダルトンのタンパク質が認められたが、劣化品にはこのタンパク質が殆ど認められなかった。この分子量 57 キロダルトンタンパク質の含有量は、当該バンドの染色強度を測定することにより定量することもできる。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

<実施例 2> 実施例 1 のサンプル 1 ~ 4 をト・ソー株式会社製 TSK ゲル G3000SW をカラムとして用いて、0.3 M 塩化ナトリウム、0.05 % アジ化ナトリウム含有 0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) を展開液とし、流速を 0.3 ml / min、カラム温度を 35 に設定した GCP により、分子量 57 キロダルトンタンパク質の含有率を分析した。劣化品は約 5 % 減少している様に、強制劣化により変動していることが判明した。即ち、この分子量 57 キロダルトンタンパク質は鮮度の指標用の物質となりうるタンパク質であることがわかる。含有率 (鮮度指標蛋白質含有率) を表 1 に示す。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

【発明の効果】

本発明によれば、ローヤルゼリーに含まれる分子量 57 キロダルトンタンパク質を提供することができる。