

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/019939

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年2月12日 (2015.2.12)

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)
C 1 2 P	19/44	(2006.01)	C 1 2 P	19/44	4 B 0 1 8
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00	4 B 0 5 0
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	4 B 0 6 4
C 0 7 H	3/04	(2006.01)	C 0 7 H	3/04	4 C 0 5 7
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 2 3 L	1/30	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

出願番号 特願2015-530848 (P2015-530848)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2014/070210
 (22) 国際出願日 平成26年7月31日 (2014.7.31)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-163801 (P2013-163801)
 (32) 優先日 平成25年8月7日 (2013.8.7)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

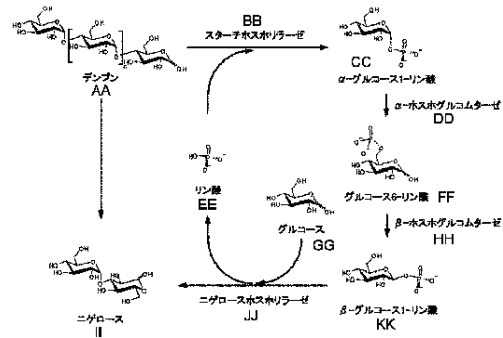
(71) 出願人 304027279
 国立大学法人 新潟大学
 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
 (74) 代理人 100080089
 弁理士 牛木 護
 (74) 代理人 100161665
 弁理士 高橋 知之
 (74) 代理人 100121153
 弁理士 守屋 嘉高
 (74) 代理人 100178445
 弁理士 田中 淳二
 (74) 代理人 100133639
 弁理士 矢野 卓哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-グルコシドの製造方法

(57) 【要約】

安価でかつ選択的に α-グルコシドを製造する汎用的方法を提供する。リン酸、α-ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、β-ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α-グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに (ii) α-グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α-グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させる。



- AA Starch
- BB Starch phosphorylase
- CC α-glucose-1-phosphoric acid
- DD α-phosphoglucomutase
- EE Phosphoric acid
- FF Glucose-6-phosphoric acid
- GG Glucose
- HH β-phosphoglucomutase
- II Nigerose
- JJ Nigerose phosphorylase
- KK β-glucose-1-phosphoric acid

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リン酸、 α -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 β -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、

(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに

(ii) α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させることを特徴とする、 α -グルコシドの製造方法。

【請求項 2】

(i) の糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せが、スクロースとスクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) との組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) との組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.49) 及びセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) 及び/若しくは α -1,3オリゴグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.30) との組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは α -1,2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、並びにトレハロースとトレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.231) との組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(ii) の α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せが、ニゲロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロースとの組合せ、コージビオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル- α -1,2-グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN-アセチルグルコサミンとの組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素法を用いて α -グルコシドを選択的に製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

日本の伝統食品である清酒や味噌、味醂に微量に含まれるニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖は、免疫賦活作用・腸内細菌叢改善作用・抗う蝕作用などヒトの健康保持に有益な機能性を有することが報告されており、食品や医薬品素材としての利用が期待されている。このように近年栄養面からだけでなく、オリゴ糖の機能性が注目されているが、その高純度調製の困難さ・高コストが当該オリゴ糖の産業応用を妨げている。そこで現在、食品・医薬品産業界での利用が高く見込まれる機能性ニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖を含む各種 α -グルコシドを選択的かつ低コストで大量製造する方法の確立が強く望まれている。

【0003】

ニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖などの α -グルコシドの選択的な製造方法として、 α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解する酵素の逆反応触媒活性を利用し、 α -グルコース-1-リン酸と糖アクセプターを原料とした α -グルコシドの選択的合成が可能である

10

20

30

40

50

と示唆されているが（非特許文献1～4）、 α -グルコース-1-リン酸が高価であるため、コストの問題から実用性を欠いていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Belocopitow E. and Marechal L. R., (1970) Biochim. Biophys. Acta, 198, pp. 151-154

【非特許文献2】Chaen H. et al., (1999) J. Appl. Glycosci., 46, pp. 423-429

10

【非特許文献3】Nihira T. et al., (2012) Appl. Microbiol. Biotechnol., 93, pp. 1513-1522

【非特許文献4】Fitting C. and Doudoroff M., (1952) J. Biol. Chem., 199, pp. 153-163

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、安価でかつ選択的に α -グルコシドを製造する汎用的方法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】

20

【0006】

本発明者らは、上記課題を達成するため鋭意検討した結果、酵素法により安価な糖質原料から選択的に α -グルコシドを生産する汎用的製造法を完成させた。

【0007】

すなわち、本発明は以下を包含する。

【0008】

(1) リン酸、 α -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 β -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、

(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに

30

(ii) α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させることを特徴とする、 α -グルコシドの製造方法。

【0009】

(2) (i) の糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せが、スクロースとスクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) との組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) との組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.49) 及びセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) 及び/若しくは α -1,3オリゴグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.30) との組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは α -1,2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、並びにトレハロースとトレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.231) との組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、上記(1)に記載の方法。

40

【0010】

(3) (ii) の α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せが、ニゲロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシ

50

ロースとの組合せ、コージビオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル - 1, 2 - グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN - アセチルグルコサミンとの組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、上記(1)に記載の方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、安価でかつ選択的に - グルコシドを製造する汎用的方法が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】デンプンからのニゲロースの製造の概略図である。

【図2】デンプンからのグルコシル - 1, 3 - ガラクトースの製造の概略図である。

【図3】デンプンからのコージビオースの製造の概略図である。

【図4】デンプンからのトレハロースの製造の概略図である。

【図5】デンプンからのグルコシル - 1, 1 - ガラクトースの製造の概略図である。

【図6】デンプンからのグルコシル - 1, 1 - キシロースの製造の概略図である。

【図7】デンプンからのグルコシル - 1, 1 - L - アラビノースの製造の概略図である。

20

【図8】デンプンからのグルコシル - 1, 1 - L - フコースの製造の概略図である。

【図9】デンプンからのマルトースの製造の概略図である。

【図10】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - マンノースの製造の概略図である。

【図11】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - キシロースの製造の概略図である。

【図12】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - L - フコースの製造の概略図である。

【図13】スクロースからのニゲロースの製造の概略図である。

【図14】セロビオースからのニゲロースの製造の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、酵素法による、 - グルコシドの製造方法に関する。

30

【0014】

本発明の - グルコシドの製造方法は、リン酸、 - ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 - ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素の組合せ; 並びに (ii) - グルコシドを可逆的に加リン酸分解して - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させるものである。

【0015】

本発明の酵素法は、主に以下の3つの酵素反応からなる: (A) 糖質原料の加リン酸分解反応; (B) - グルコース - 1 - リン酸の - グルコース - 1 - リン酸への変換反応、(C) 糖アクセプターからの - グルコシドの合成反応。

40

【0016】

(A) の糖質原料の加リン酸分解反応は、糖質原料と該糖質原料を加リン酸分解して - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素 (G1P生成酵素) との組合せが、リン酸の存在下で反応して、 - グルコース - 1 - リン酸及び還元末糖が生じる反応である。

【0017】

糖質原料とG1P生成酵素の組合せは、これに限定されるものではないが、スクロースとスクロースホスホリラーゼとの組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼとの組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼとの組合せ、セロデキストリ

50

ンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロピオースホスホリラーゼとの組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリオースホスホリラーゼ及び/若しくは - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは - 1, 2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、トレハロースとトレハロースホスホリラーゼとの組合せ、のいずれか一つ、あるいはそれらの組合せを含む。より好ましい組合せは、スクロースとスクロースホスホリラーゼとの組合せ、セロピオースとセロピオースホスホリラーゼとの組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロピオースホスホリラーゼとの組合せ、デンプン又はデキストリンとホスホリラーゼとの組合せ、のいずれ一つ、あるいはそれらの組合せである。

【0018】

糖質原料の使用濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは1 ~ 1000 g / Lであり、より好ましくは10 ~ 1000 g / Lである。

【0019】

G1P生成酵素は、いかなる起源の酵素を用いることも可能であり、その使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料1 gあたり0.1 ~ 1000 mgのG1P生成酵素を使用することができる。

【0020】

また、この反応に関わるリン酸は、いかなる起源のものであっても良い。反応系に加えるリン酸濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは0.1 ~ 1000 mM、より好ましくは1 ~ 100 mMである。

【0021】

上記(B)の - グルコース - 1 - リン酸の - グルコース - 1 - リン酸への変換反応は、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ及びそれらの補因子の組合せによって、上記(1)の糖質原料の加リン酸分解反応で生じた - グルコース - 1 - リン酸をグルコース6 - リン酸に、グルコース - 6 - リン酸を - グルコース - 1 - リン酸へ変換する反応である。

【0022】

これらの酵素は、特定のものに限定されるものではなく、いかなる起源の酵素を用いることも可能である。これらの酵素の使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料1 gあたり0.1 ~ 1000 mgの酵素を使用することができる。また、補因子としては、塩化マグネシウム、グルコース - 1, 6 - ビスリン酸などが用いられる。補因子の使用濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.001 ~ 100 mM、より好ましくは0.01 ~ 100 mMである。

【0023】

上記(C)の糖アクセプターからの - グルコシドの合成反応は、 - グルコシドを可逆的に加リン酸分解して - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素(- グルコシドホスホリラーゼ)の存在下で、糖アクセプターを出発原料として、上記(B)の - グルコース - 1 - リン酸の - グルコース - 1 - リン酸への変換反応によって生じた - グルコース - 1 - リン酸から - グルコシドを合成する反応である。

【0024】

- グルコシドホスホリラーゼと糖アクセプターの組合せは、これに限定されるものではないが、ニゲロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロースとの組合せ、コージピオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル - 1, 2 - グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN - アセチルグルコサミンとの組

10

20

30

40

50

合せ、のいずれか一つ、あるいはそれらの組合せである。

【0025】

- グルコシドホスホリラーゼは、いかなる起源の酵素を用いることも可能であり、その使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料 1 g あたり 0.1 ~ 1000 mg の - グルコシドホスホリラーゼを使用することができる。

【0026】

糖アクセプターの濃度は、特に限定されないが、好ましくは 10 mM ~ 2 M、より好ましくは 100 mM ~ 1 M である。

【0027】

上述した本発明において用いられる酵素は、任意の起源のものでよく、例えば細菌等の原核生物、酵母、菌類、動物等の真核生物由来のものであってもよく、組換え酵素であってもよい。また、上述した酵素は、市販のものを使用することができるほか、当業者に周知の方法、例えば天然からの精製や遺伝子組換え法によって取得することができる。

【0028】

例えば、上述した酵素は、文献に記載されている該酵素遺伝子の塩基配列、若しくは公知の核酸又はタンパク質配列データベースに登録されている該酵素遺伝子の塩基配列を基に作製したプライマーを用いた PCR によって、適当なライブラリー中の該酵素遺伝子に対応する mRNA から作製した cDNA を増幅した後に、該 cDNA を市販の遺伝子発現ベクターに組み込み、該発現ベクターで大腸菌等の菌体を形質転換することによって、菌体中で生成される。生成された酵素は、硫酸分画等の粗分画又は各種のカラムクロマトグラフィーなど、当業者に周知のタンパク質精製法によって精製できる。また、酵素を GST や His-tag との融合タンパク質として発現させることにより、その後の精製を容易にすることができる。

【0029】

また、上述した酵素は、上記の原核生物細胞又は真核生物細胞から直接精製してもよい。細胞破壊液を調製し、遠心分離、硫酸分画、透析、各種クロマトグラフィー（例えばゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなど）、電気泳動、限外ろ過、結晶化などの酵素精製のための一般的な技術を適宜組合せて、目的の酵素を精製することができる。本発明において使用可能な酵素の形態は、精製酵素の他に、粗製酵素（例えば菌体抽出液、凍結乾燥体など）でもよい。粗製酵素を使用する場合には、上記反応を妨害する因子を含むべきではない。

【0030】

反応形態は、特に限定されるものではないが、通常は水溶液又は緩衝液中で行われる。反応液の pH は、好ましくは 5 ~ 9 である。反応温度は、特に限定されるものではないが、好ましくは 5 ~ 80、より好ましくは 20 ~ 80 である。また、反応時間は、特に限定されるものではないが、0.1 ~ 3000 時間であることが好ましい。

【0031】

本発明の一つの利点は、上記全ての酵素反応を、一容器中で又はバイオリアクターを用いて簡便かつ容易に実施できる点にある。

【0032】

本発明により得られる - グルコシドは、任意の方法で精製することができる。例えば、本発明により得られる - グルコシドは、カラムクロマトグラフィーや結晶化により単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーとしては、これに限定されるものではないが、サイズ排除クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離が含まれる。結晶化方法としては、これに限定されるものではないが、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトンなど）が含まれる。

【0033】

10

20

30

40

50

なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の思想を逸脱しない範囲で種々の変形実施が可能である。

【0034】

次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【実施例1】

【0035】

デンプンを糖質原料としてニゲロース（グルコシル - 1, 3 - グルコース）への変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度100 mg/mL デンプン、0.5 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、75 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液（pH 7.0）、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30°C で216時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品27 mgを得た。（図1）

10

【実施例2】

20

【0036】

デンプンを糖質原料としてグルコシル - 1, 3 - ガラクトースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度100 mg/mL デンプン、0.5 M ガラクトース、10 mM 塩化マグネシウム、50 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液（pH 7.0）、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30°C で168時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品33 mgを得た。（図2）

30

【実施例3】

【0037】

デンプンを糖質原料としてコージビオース（グルコシル - 1, 2 - グルコース）への変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、1 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、25 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液（pH 7.0）、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、コージビオースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.27 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30°C で240時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりコージビオース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりコージビオース標品12 mgを得た。（図3）

40

【実施例4】

【0038】

デンプンを糖質原料としてトレハロース（グルコシル - 1, 1 - グルコース）への

50

変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、1 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で240時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりトレハロース標品18 mgを得た。(図4)

10

【実施例5】**【0039】**

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,1-ガラクトースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M ガラクトース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で264時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,1-ガラクトース標品34 mgを得た。(図5)

20

【実施例6】**【0040】**

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,1-キシロースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M キシロース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で216時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,1-キシロース標品37 mgを得た。(図6)

30

【実施例7】**【0041】**

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,1-L-アラビノースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M L-アラビノース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で120時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応

40

50

液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,1-L-アラビノース標品38mgを得た。(図7)

【実施例8】

【0042】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,1-L-フコースへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度50mg/mL デンプン、0.5M L-フコース、10mM 塩化マグネシウム、100mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH7.0)、59μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96mg、0.21mg、0.0085mg、0.208mg、0.33μg加え、30℃で72時間反応を行った。反応を0.15mLの6N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,1-L-フコース標品21mgを得た。(図8)

10

【実施例9】

【0043】

デンプンを糖質原料としてマルトース(グルコシル-1,4-グルコース)への変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度50mg/mL デンプン、1M グルコース、10mM 塩化マグネシウム、100mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH6.0)、59μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96mg、0.13mg、0.0085mg、0.21mg、0.33μg加え、30℃で240時間反応を行った。反応を0.15mLの6N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマルトース標品9mgを得た。(図9)

20

30

【実施例10】

【0044】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,4-マンノースへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度50mg/mL デンプン、0.5M マンノース、10mM 塩化マグネシウム、100mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH6.0)、59μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96mg、0.13mg、0.0085mg、0.21mg、0.33μg加え、30℃で216時間反応を行った。反応を0.15mLの6N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,4-マンノース標品44mgを得た。(図10)

40

【実施例11】

【0045】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,4-キシロースへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度50mg/mL デンプン、0.5M キシロース、10mM 塩化マグネシウム、100mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH6.0)、5

50

9 μ M グルコース - 1 , 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μ g 加え、30 $^{\circ}$ C で72時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル - 1 , 4 - キシロース標品23 mgを得た。(図11)

【実施例12】

【0046】

デンプンを糖質原料としてグルコシル - 1 , 4 - L - フコースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M L - フコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)、59 μ M グルコース - 1 , 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μ g 加え、30 $^{\circ}$ C で24時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル - 1 , 4 - L - フコース標品11 mgを得た。(図12)

【実施例13】

【0047】

スクロースを糖質原料としてニゲロースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度0.5 M スクロース、10 mM 塩化マグネシウム、25 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μ M グルコース - 1 , 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにスクロースホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼ、キシロースイソメラーゼを1ミリリットル当たり0.033 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 mg 加え、30 $^{\circ}$ C で216時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを4.5に調整後、インペルターゼ処理を行うことにより残存スクロースを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品79 mgを得た。(図13)

【実施例14】

【0048】

セロビオースを糖質原料としてニゲロースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度0.25 M セロビオース、10 mM 塩化マグネシウム、25 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μ M グルコース - 1 , 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにセロビオースホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、 β -ホスホグルコムターゼを1ミリリットル当たり2.3 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg 加え、30 $^{\circ}$ C で216時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを5.0に調整後、 α -グルコシダーゼ処理を行うことにより残存セロビオースを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品26 mgを得た。(図14)

【産業上の利用可能性】

10

20

30

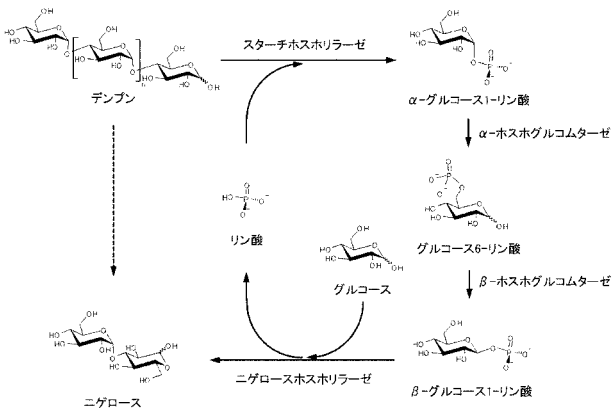
40

50

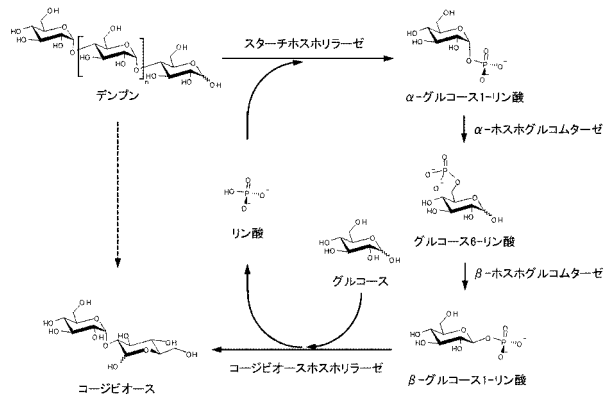
【0049】

本発明は、食品・医薬品・研究試薬産業で利用できる。

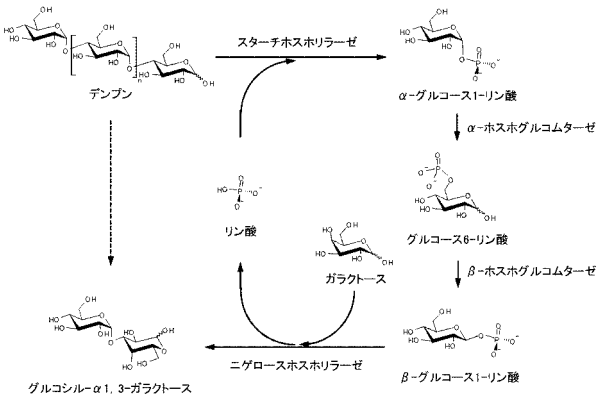
【図1】



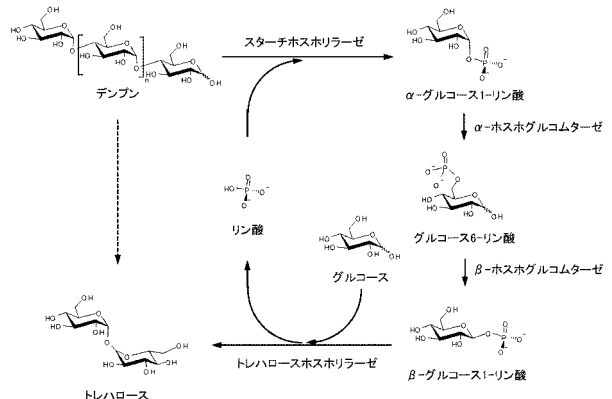
【図3】



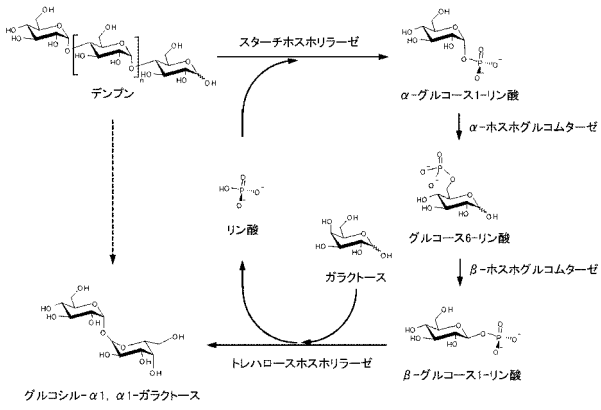
【図2】



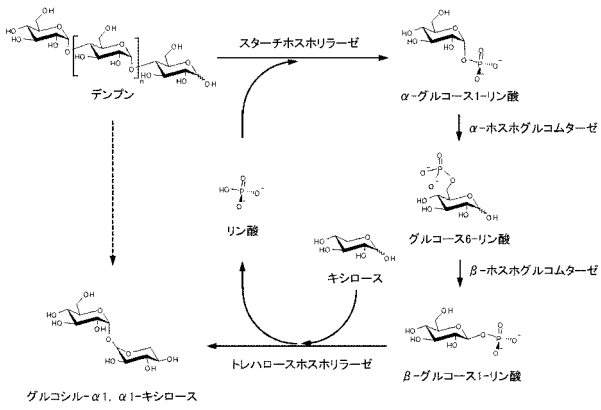
【図4】



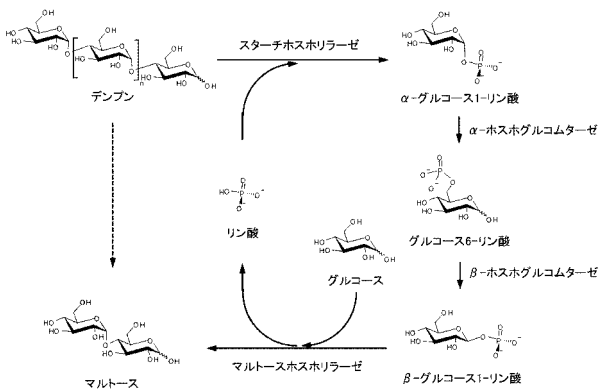
【 図 5 】



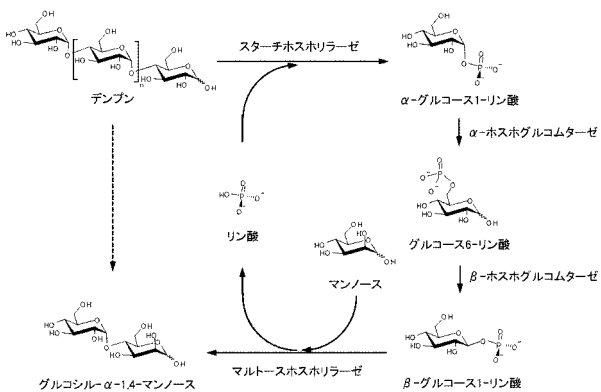
【 図 6 】



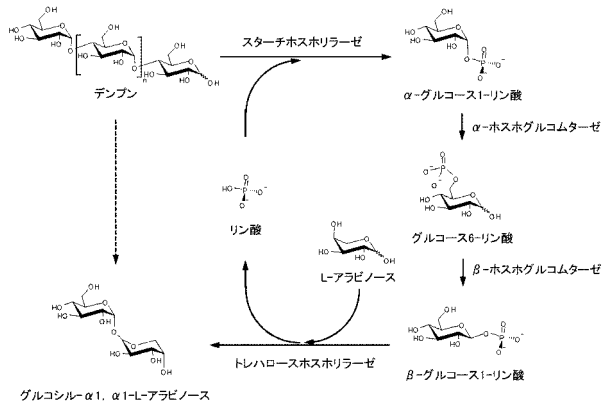
【 図 9 】



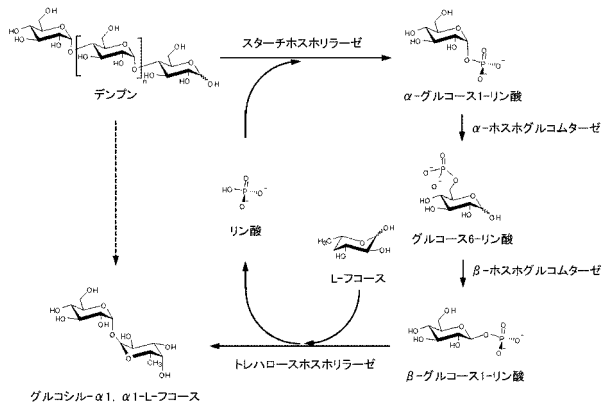
【 図 10 】



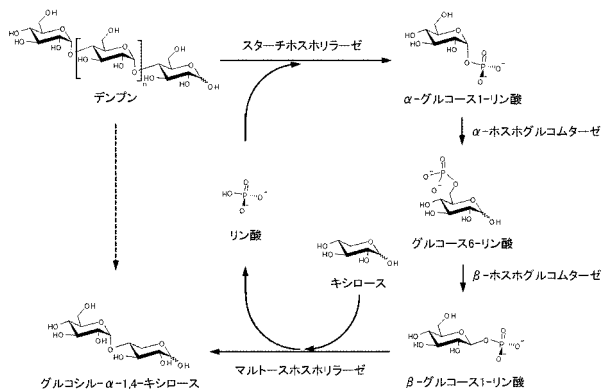
【 図 7 】



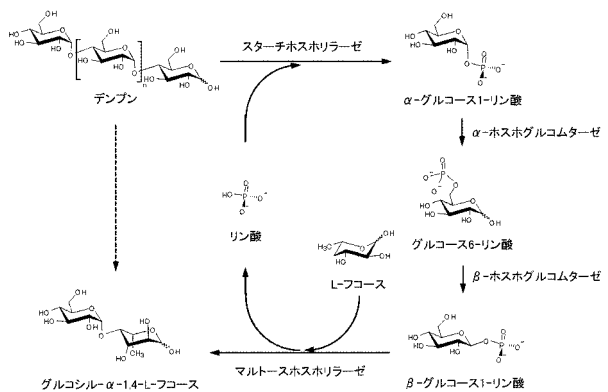
【 図 8 】



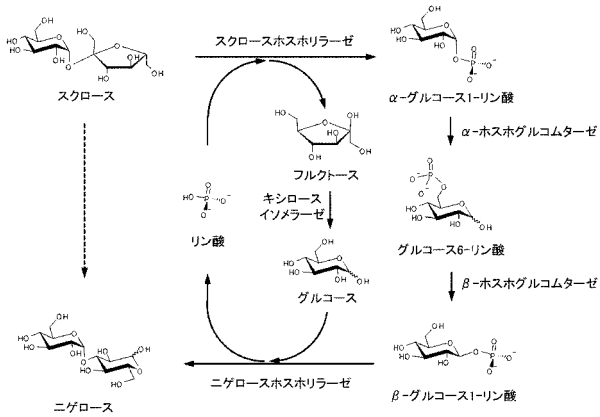
【 図 11 】



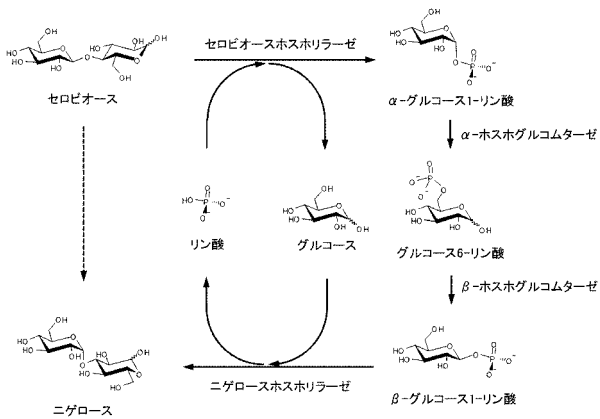
【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年12月15日 (2014.12.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

リン酸、 α -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 β -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、

(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに

(ii) α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させる α -グルコシドの製造方法であって、

(ii)の α -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せが、グルコシル- α -1,2-グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せであることを特徴とする、 α -グルコシドの製造方法。

【 請求項 2 】

(i)の糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せが、スクロースとスクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7)との組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1)との組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.2

0)との組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ(EC 2.4.1.49)及びセロピオースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.20)との組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリピオースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.31)及び/若しくは - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼ(EC 2.4.1.30)との組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは - 1, 2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、並びにトレハロースとトレハロースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.231)との組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、請求項1に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/070210
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P19/44(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) C12P19/44 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-148502 A (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 08 July 2010 (08.07.2010), claims 9 to 10; experiments 6 to 7 (Family: none)	1-3
Y	Seikagaku Jiten, 3rd edition, Kabushiki Kaisha Tokyo Kagaku Dojin, 1998, pages 1307, 1316	1-3
Y	JP 7-99988 A (Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), 18 April 1995 (18.04.1995), claims 5, 9; paragraphs [0012] to [0014] & US 5565341 A & EP 639645 A1	1-3
Y	Charlotte Fitting, et al, J.Biol.Chem, 1952, No.199, p.153-163, p.161, fig. 2	1-3
<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 14 October, 2014 (14.10.14)		Date of mailing of the international search report 28 October, 2014 (28.10.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-254061 A (National Agriculture and Food Research Organization), 27 December 2012 (27.12.2012), claims 6 to 8 (Family: none)	1-3
Y	JP 10-304882 A (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 17 November 1998 (17.11.1998), claims 17 to 21 & US 5965412 A & EP 841398 A2	1-3
Y	JP 10-304881 A (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 17 November 1998 (17.11.1998), claims 17 to 21 & US 5843748 A & US 5876975 A & US 5910436 A & US 5993889 A & EP 841397 A2	1-3
P,X	Takanori Nihira, et al, J.Appl.Glycosci., 2014.04.11, Vol.61, p.75-80, entire text	1-3

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/070210									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P19/44(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. C12P19/44											
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>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014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	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
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									
Y	JP 2010-148502 A (株式会社林原生物化学研究所) 2010.07.08, 請求項9-10、実験6-7 (ファミリーなし)	1-3									
Y	生化学辞典, 第3版, 株式会社 東京化学同人, 1998, 第1307、1316頁	1-3									
Y	JP 7-99988 A (呉羽化学工業株式会社) 1995.04.18, 請求項5、9、【0012】 - 【0014】段落 & US 5565341 A & EP 639645 A1	1-3									
<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、一般的技術水準を示すもの 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 14.10.2014		国際調査報告の発送日 28.10.2014									
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) 吉門 沙央里	4N 5081								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 0 2 1 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
Y	Charlotte Fitting, et al, J. Biol. Chem, 1952, No. 199, p. 153-163, p. 161 Fig. 2	1-3
Y	JP 2012-254061 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2012. 12. 27, 請求項 6 - 8 (ファミリーなし)	1-3
Y	JP 10-304882 A (株式会社林原生物化学研究所) 1998. 11. 17, 請求項 1 7 - 2 1 & US 5965412 A & EP 841398 A2	1-3
Y	JP 10-304881 A (株式会社林原生物化学研究所) 1998. 11. 17, 請求項 1 7 - 2 1 & US 5843748 A & US 5876975 A & US 5910436 A & US 5993889 A & EP 841397 A2	1-3
PX	Takanori Nihira, et al, J. Appl. Glycosci., 2014. 04. 11, Vol. 61, p. 75-80, 全文	1-3

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, UA, UG, US

(74)代理人 100188994

弁理士 加藤 裕介

(72)発明者 中井 博之

新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 新潟大学農学部内

(72)発明者 仁平 高則

新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 新潟大学農学部内

(72)発明者 斉藤 由華

新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 新潟大学大学院自然科学研究科内

(72)発明者 宮嶋 双葉

新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 新潟大学農学部内

Fターム(参考) 4B018 MD27 ME01 ME03 MF12 MF13

4B050 CC03 DD02 KK08 LL05

4B064 AF41 BJ10 CA21 CB07 CB27 CC01 CD01 CD09 DA20

4C057 AA02 BB03

(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。