

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年8月19日(19.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/092997 A1

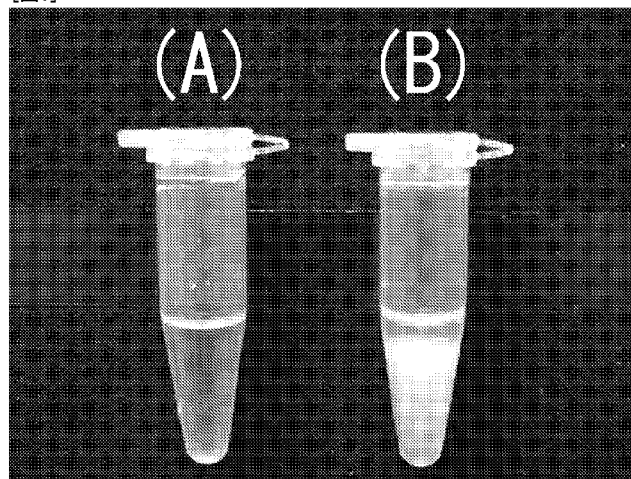
- (51) 国際特許分類:
C12P 19/04 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/052001
- (22) 国際出願日: 2010年2月11日(11.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-029185 2009年2月11日(11.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人三重大学(MIE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町1577 Mie (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 磯野 直人 (ISONO, Naoto) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学法人三重大学大学院生物資源学研究所内 Mie (JP). 山本 豊(YAMAMOTO, Yutaka) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学法人三重大学大学院生物資源学研究所内 Mie (JP). 佐分利 亘(SABURI, Wataru) [JP/JP]; 〒4178530 静岡県富
- (74) 代理人: 小林 洋平(KOBAYASHI, Youhei); 〒5110068 三重県桑名市中央町4丁目44番地ウインズビル2階ケーワイ国際特許事務所 Mie (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

[続葉有]

(54) Title: B-1,3-GLUCAN MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称: β1,3-グルカンの製造方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a method whereby β-1,3-glucan, in which several tens of glucose molecules are polymerized, can be easily manufactured. Manufacture is achieved with a polymerization reaction using β-1,3-glucan phosphorylase from Ochramonas sp. in a glucose-1-phosphoric acid matrix. It is preferable here that the species of Ochramonas is Ochramonas danica, that the pH during the polymerization reaction is pH 4-8, and that the temperature is 20-50°C. It is also preferable that the β-1,3-glucan phosphorylase is extracted from Ochramonas sp. cells, and has sufficient crude refinement that it is not necessary to add a laminin oligosaccharide as a primer when manufacturing β-1,3-glucan.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/092997 A1



CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, 添付公開書類:
TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

【課題】 数十個のグルコースが重合した β 1,3-グルカンを簡易に製造できる方法を提供すること。【解決手段】 オクロモナス (Ochromonas) 属由来の β 1,3-グルカンホスホリラーゼを用いて、グルコース-1-リン酸を基質とした重合反応により達成される。このとき、オクロモナス属が、オクロモナス・ダニカ (Ochromonas danica) であることが好ましく、重合反応時の pH が 4~8 であることが好ましく、温度が 20°C~50°C であることが好ましい。また、 β 1,3-グルカンホスホリラーゼは、オクロモナス属の細胞から抽出されたものであり、 β 1,3-グルカンの製造に際してプライマーであるラミナリオリゴ糖の添加が不要である程度の粗精製度であることが好ましい。

明 細 書

発明の名称： β 1,3-グルカンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、 β 1,3-グルカンの製造方法に関する。

背景技術

[0002] β 1,3-グルカンは、グルコースが β 1,3-型の結合で連なった多糖を意味している。 β 1,3-グルカンは、菌類、藻類、高等植物、細菌などにより合成され、その分子量は数千から数百万まで広く分布している。この物質には、抗菌・抗ウイルス作用、血液凝固作用、抗ガン作用、免疫調節作用などが認められることから、研究開発が進んでいる。 β 1,3-グルカンの作用の強さは、構造や分子量によって異なることが知られており、菌類などから抽出される β 1,3-グルカンは、そのままでは目的とする作用を発揮させられないことがある。

[0003] このため、適当な分子量の β 1,3-グルカンやラミナリオリゴ糖を製造するための研究開発が行われている。例えば後者については、特許文献1に、ミドリムシ属由来の細胞から抽出された酵素を用いてラミナリオリゴ糖（2~20個の重合物）を製造する方法が開示されている。特許文献2には、バチルス属由来の菌から抽出された酵素を用いて、グルコースと、グルコース-1-リン酸（G1P）を反応させることにより、ラミナリオリゴ糖（高々、数個の重合物）を製造する方法が開示されている。特許文献3には水可溶性 β -1,3-グルカンにユーグレナ藻体および／またはユーグレナ藻体抽出物を作用させることを特徴とするラミナリオリゴ糖の製造方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平4-066092号公報

特許文献2：特開2001-299338号公報

特許文献3：特開平6-113874号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : The Plant Journal, 1995, Vol. 8(2), pp. 213-225

非特許文献2 : The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, No. 33, Issue of August 16, pp. 30102-30111 (2002)

非特許文献3 : Cancer research, 38, 379-383 (1978)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 非特許文献1には、 β 1,3-グルカンシンターゼを用いた β 1,3-グルカン（重合度1,500）の製造方法が開示されている。この方法は、天然の β 1,3-グルカンの製造工程を模したものであるが、基質として用いるUDPグルコースが高価であり、 β 1,3-グルカンシンターゼが膜タンパクであるため、扱いが難しいという欠点がある。

また、非特許文献2には、有機化学反応と加水分解酵素を利用したグライコシンターゼ反応による β 1,3-グルカン（重合度30~34）の合成方法が開示されている。しかし、原料となるラミナリビオース（グルコース2分子が β 1,3結合した二糖類の一種）は高価であることに加え、重合反応に用いるフッ化ラミナリビオースを得るために煩雑な手順を要するという欠点がある。

一方、非特許文献3には、重合度50~120の直鎖 β -1,3グルカンは重合度30以下のラミナリオリゴ糖や、土壤細菌 *Agrobacterium* が産生するカードランと比較して、抗腫瘍活性が高いというデータが報告されている。しかしながら、重合度50~120の直鎖 β -1,3グルカンは天然には存在せず、カードランを加水分解するなどの方法では、これらの β -1,3グルカンを大量に調製することは困難である。

本発明は、上記した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、数十個のグルコースが重合した β 1,3-グルカンを簡易に製造できる方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、オクロモナス (*Ochromonas*) 属由来の β 1,3-グルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.97) を用いて、グルコース-1-リン酸 (G1P) を基質とした重合反応により、 β 1,3-グルカンを製造できることを見出し、基本的には本発明を完成するに至った。

こうして、本発明に係る β 1,3-グルカンの製造方法は、オクロモナス (*Ochromonas*) 属由来の β 1,3-グルカンホスホリラーゼを用いて、G1Pを基質とした重合反応を行うことを特徴とする。

上記発明においては、オクロモナス属が、オクロモナス・ダニカ (*Ochromonas danica*) であることが好ましい。

また、重合反応時のpHが、4~8であることが好ましい。

また、重合反応時のG1Pの濃度が、0.01 M~0.6 M (好ましくは、0.1 M~0.5 M) であることが好ましい。

また、 β 1,3-グルカンホスホリラーゼは、オクロモナス属の細胞から抽出されたものであり、 β 1,3-グルカンの製造に際してプライマーの添加が不要である程度の粗精製度であることが好ましい。プライマーとは、 β 1,3-グルカンホスホリラーゼが、G1Pを基質とした重合反応により β 1,3-グルカンを製造する際に最初に用いられる物質であり、例えばラミナリビオースをはじめとするラミナリオリゴ糖などが使用できる。

また、重合反応時の温度が、20°C~45°Cであることが好ましい。本発明の方法では、反応時の温度を制御することにより、生成物のグルコース重合度を適当に変化させられる。例えば、グルコース重合度は、低温域 (20°C~25°C) では50~60、中間域 (26°C~37°C) では60~70、高温域 (38°C~45°C) では40~60程度となる。このため、反応時の温度を制御することにより、適当な重合度の生成物を得られる。

[0008] オクロモナスは、不等毛植物門・黄金色藻綱に属する微細藻類であり、1本または2本の不等長の鞭毛を持ち単独で遊泳する。形は、球形、卵形、楕円形などであり、細胞表面には剛毛などの目立つ構造は認められない。また、細胞は殻を持たず、黄色・黄褐色・褐色・暗黄緑色などの葉緑体を持って

いる。オクロモナス属には、オクロモナス・ダニカ (*Ochromonas danica*) , オクロモナス・ツベルクラタ (*Ochromonas tuberculata*) , オクロモナス・マルハメンシス (*Ochromonas malhamensis*) などの種が存在する。本発明では、いずれの種を用いることもできるが、オクロモナス・ダニカを用いることが好ましい。

[0009] β 1,3-グルカンホスホリラーゼは、 β 1,3-グルカンの非還元末端から、 β -(1 \rightarrow 3)結合で結合したグルコース残基 (G1P) を遊離させる加リン酸分解反応を触媒する酵素である。この反応は、可逆的であることから、G1Pの濃度が一定以上であると、 β 1,3-グルカンが製造され得る。但し、供給源となる生物が生産する β 1,3-グルカンホスホリラーゼの特性により、G1Pから β 1,3-グルカンを製造する際の至適条件 (pH, 温度, G1P濃度など) は異なるので、個々に検討することが必要である。

[0010] 本発明に用いる β 1,3-グルカンホスホリラーゼは、(1)細胞を破砕した懸濁液の状態 (無細胞抽出液) , (2)細胞を破砕した後、酵素を粗精製した状態 (粗精製酵素) , 更に(3)高度に精製した状態 (高純度酵素) , のいずれの状態でも用いることができる。このうち、上記(2)または(3)の状態の酵素を用いることが好ましい。酵素を精製するには、(A)細胞を破砕する細胞破砕工程, (B)細胞片などを沈殿させて取り除く遠心分離工程, (C)上清に含まれるタンパク質に塩 (例えば、硫酸アンモニウム) を加えて沈殿させ、この沈殿を適当な緩衝液で溶解した後、透析処理するタンパク精製工程, (D)透析後の溶液を適当なクロマトグラフィー (カラムクロマトグラフィー, 薄層クロマトグラフィー, HPLC, 超臨界流体クロマトグラフィー, イオン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, ペーパークロマトグラフィー など; 分配クロマトグラフィー, 吸着クロマトグラフィー, 分子排斥クロマトグラフィー, イオン交換クロマトグラフィー, ゲル濾過など) により分離精製するクロマトグラフィー工程を行うことが好ましい。

[0011] 本発明で得られる β 1,3-グルカンホスホリラーゼが、上記(2)粗精製したものの (粗精製酵素) を用いる場合には、G1Pを基質とした合成反応のプライマー

となるラミナリオリゴ糖を添加しなくても β 1,3-グルカンを生成できる程度
の状態とすることが好ましい。粗精製酵素にはG1Pと混合した際にプライマー
を合成する成分が含まれると考えられるため、予めこの物質を含むことによ
り、プライマーとしてラミナリオリゴ糖を添加せずに、容易に β 1,3-グルカ
ンを製造できる。但し、粗精製酵素を用いる場合には、他の夾雑物により、
 β 1,3-グルカンが着色する（褐変化）ことがある。このため、粗精製酵素を
用いる場合には、適当な還元剤を用いることが好ましい。そのような還元剤
として、例えばジチオスレイトール（DTT）、2-メルカプトエタノール、Tris
（2-carboxyethyl）phosphine（TCEP）、グルタチオン、アスコルビン酸などが
例示される。

また、 β 1,3-グルカンホスホリラーゼが、上記(3)高度に精製したもの（高
純度酵素）を用いる場合には、重合反応時にプライマーとして、ラミナリビ
オースをはじめとするラミナリオリゴ糖などを用いることが好ましい。

[0012] また、重合反応に用いられる緩衝液としては、限定されず、例えば、ク
エン酸緩衝液、酢酸緩衝液、MES-水酸化ナトリウム緩衝液、PIPES-
水酸化ナトリウム緩衝液、MOPS-水酸化ナトリウム緩衝液、HEPES-
水酸化ナトリウム緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、などから適当に選択でき
る。これらのうち、好ましくは、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、MES-水
酸化ナトリウム緩衝液を用いることができる。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、数十個（約30個～70個程度）のグルコースが重合した β 1
,3-グルカンを容易に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]粗精製酵素を用いたときに沈殿が形成される様子を確認したときの写真
図である。左側(A)は、反応前の反応液を示し、右側(B)は、24時間経過後の
反応液を示す。(B)では、多糖類の沈殿が観察された。

[図2]部分メチル化アルジトールアセテートのGC-MSクロマトグラムである。
メチル化した糖質を酸加水分解した後、アセチル化し、GC-MSに供したときの

結果を示した。上側(A)は、標準品としてのラミナリビオースの結果を、下側(B)は、沈殿物の結果を示す。

[図3]部分メチル化アルジトールアセテートのマススペクトルである。最上段(A)は、標準品としての1,3,5-トリ-O-アセチル-2,4,6-トリ-O-メチルヘキシトール(GC-MSライブラリ)のスペクトルを、中段(B)は、図2(A)の22.0分のピーク(ラミナリビオースをメチル化分析した試料)のスペクトルを、下段(C)は、図2(B)の22.0分のピーク(沈殿物をメチル化分析した試料)のスペクトルを示す。

[図4] ^{13}C -NMR スペクトルである。上段(A)は、カードラン(β -1,3-グルコシド結合を有する多糖)の結果を、下段(B)は、沈殿物の結果を示す。

[図5]高純度酵素を用いたときに沈殿が形成される様子を確認したときの写真図である。左側(A)は、プライマー(ラミナリペンタオース)非添加の反応液を示し、右側(B)は、プライマー(ラミナリペンタオース)添加の反応液を示す。(B)では、多糖類の沈殿が観察された。

[図6]酵素量の変化が生成物収率に与える影響を確認した結果を示すグラフである。酵素量が少量の場合には、プライマー非添加(O)では沈殿が得られなかったが、プライマー添加(●)では沈殿の形成が確認された。

[図7]プライマー濃度の変化が生成物収率に与える影響を確認した結果を示すグラフである。0.1 mg/mL(終濃度)以上のプライマーを添加することで、少量の酵素でも高収率で沈殿の形成が確認された。

[図8]プライマー添加時にG1P濃度が与える影響を確認した結果を示すグラフである。0.05 M~0.6 M G1P の範囲内で、 β -1,3グルカンの合成が観察され、とくに0.1 M~0.5 M G1P の範囲内で β -1,3グルカンの合成収率が高いことが確認された。

発明を実施するための形態

[0015] 次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施することができる。また、本発

明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

[0016] <実験材料および方法>

1. *Ochromonas danica*の培養

*Ochromonas danica*は国立環境研究所の微生物系統保存施設から分譲された。

1 g/L ポリペプトン（ナカライテスク），1 g/L 乾燥酵母エキス（ナカライテスク），0.5 g/L 肉エキス（Remel），1 g/L グルコースを含む培地250 mLに，*O. danica*の懸濁液を加え，静置下，22°C，12時間明期/12時間暗期のサイクルで種培養を行った。この培養液（250 mL）を5 g/L ペプトン（ミクニ化学産業），2 g/L 乾燥酵母エキス，15 g/L グルコースを含む培地 5.0 Lに加え，30°C，120 rpmで3日間振とう培養した。光照射は行わなかった。

培養後，遠心分離（6,000×g，10分間，4°C）を行い，細胞を回収した。これを250 mLの蒸留水（4°C）で懸濁したのち，遠心分離（6,000×g，10分間，4°C）を行い，上清を除去した。この洗浄操作をさらに3回繰り返した後，使用するまで-30°Cで保存した。

[0017] 2. β -1,3グルカンホスホリラーゼの精製

上記1で得られた細胞を，250 mLの緩衝液A（20 mM Tris，1 mM EDTA，1 mM DTT，pH 8.0）で懸濁したのち，超音波発生機（UD-201，トミー精工）を用いて破碎した。OUTPUT 4，DUTY 40，5分間の条件で，氷水で冷却しながら破碎を行った（菌体破碎工程）。その後，遠心分離（40,000×g，30分間，4°C）を行い，上清を回収した（遠心分離工程）。

得られた上清に対して，30% 飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加えた。4°Cで1時間放置し，遠心分離（10,000×g，15分，4°C）を行い，上清を回収した。これに対して70% 飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加えた。4°Cで1時間放置し，遠心分離（10,000×g，15分，4°C）を行い，上清を取り除いた。得られた沈殿を 10 mLの緩衝液Aで溶解したのち，1 Lの緩衝液Aで4°C，16時間透析を行った（タンパク精製工程）。

[0018] 透析後の溶液を緩衝液Aで平衡化したQ Sepharose Fast Flow（ ϕ 1.6 cm×2

0 cm, GEヘルスケア) に供した。試料添加後, 緩衝液Aで十分に洗浄したのち, 0 M - 1 M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (120分) でタンパク質を溶出した。操作は全て流速5 mL/分で行い, 5 mLずつ分画した (クロマトグラフィ工程)。得られた画分の一部を用いて活性測定を行った。活性の高い画分を回収し, 粗精製酵素と定義した。粗精製酵素は液体窒素で凍結し, 使用するまで -80°C で保存した。

精製度の高い酵素を得るために, さらに以下の精製操作を行った。粗精製酵素に対して30%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加えた。この溶液を30% 飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したHiTrap Phenyl HP (5 mL, GEヘルスケア) に供した。試料添加後, カラムを同緩衝液で十分に洗浄したのち, 30-0% 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配 (250 mL) および50 mLの緩衝液Aでタンパク質を溶出した。操作は全て流速5 mL/分で行い, 5 mLずつ分画した。

酵素活性の高い画分を回収し, 2 L の緩衝液B (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5) を用いて 4°C , 16時間透析を行った。透析後の溶液を緩衝液Bで平衡化したRESOURCE Q (1 mL, GEヘルスケア) に供した。試料添加後, カラムを緩衝液Bで十分に洗浄したのち, 0-190 mM 塩化ナトリウム (10 mL) および190-230 mM 塩化ナトリウム (200 mL) の直線濃度勾配でタンパク質を溶出した。操作は全て流速1 mL/分で行い, 1 mLずつ分画した。酵素活性の高い画分を回収し, 高純度酵素と定義した。高純度酵素は使用するまで 4°C で保存した。

[0019] 3. β -1, 3-グルカンホスホリラーゼの活性測定

50 μL 0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5), 10 μL 100 mM グルコース-1-リン酸 (G1P, 和光純薬工業), 20 μL 5 mM ラミナリペンタオース (生化学バイオビジネス) を混合した。 30°C で10分間予備保温した後, 20 μL 酵素溶液を添加し, 30°C で10分間保持した。生じた無機リン酸量を調べるために, この反応液に対して, 1000 μL モリブデン試薬 [15 mM モリブデン酸アンモニウム, 100 mM 酢酸亜鉛 (pH 5.0)] と250 μL アスコルビン酸試薬 [10% (w/v) アスコルビン酸 (pH 5.0)] を加え, 30°C で15分保持した後, 分

光光度計でOD850 を測定した。1分間に1 μmol の無機リン酸を生成する酵素量を1 U と定義した。また、タンパク質濃度をBradford, Analytical Biochemistry, 72, 248-254 (1976) の方法にしたがって決定した。

[0020] 4. 多糖の酵素合成

250 μL 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5), 100 μL 0.5 M G1P, 150 μL 粗精製酵素 (3.45 U/mg, 2.13 U/mL), 0.5 μL 1 M ジチオスレイトールを混合し, 30°C, 24時間保持した。この際, ラミノリオリゴ糖等のプライマーは添加しなかった。反応終了後, 遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い, 沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち, 遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い, 上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返したのち, 凍結乾燥によって水分を除去した。

[0021] 5. 沈殿物の解析

全糖量の測定はフェノール硫酸法 (Dubois et al., Analytical Chemistry, 28, 350-356 (1956)) にしたがって行った。

生成沈殿物の分子量分布はサイズ排除クロマトグラフィーにより解析した。カラムはTSKgel α -3000 (ϕ 0.78 cm \times 30 cm, 東ソー) を用いた。80% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した沈殿試料をカラムに供した。溶離液は10 mM硝酸ナトリウムを含む80% DMSOを使用し, 流速0.3 mL/分, カラム温度40°Cで分離を行い, 示差屈折検出器によって検出を行った。HPLCシステムはAgilent 1100 (アジレント・テクノロジー) を使用した。また, 分子量スタンダードとしてプルラン (昭和電工) を用いた。

[0022] 沈殿物の糖組成分析はBlakeney et al., Carbohydrate Research, 113, 291-299 (1983) の方法にしたがって行った。

単糖間の結合様式はメチル化分析と核磁気共鳴分析 (NMR分析) によって決定した。メチル化分析はCiucanu and Kerek, Carbohydrate Research, 131, 209-217 (1984) とHarris et al., Carbohydrate Research, 127, 59-73 (1984) の方法にしたがって行った。部分メチル化アルジトールアセテートの分離・分析には, GC-MS (GCMS-QP2010, 島津製作所) を使用した。カラムはSP-23

80 (30 m×0.25 mm×0.2 μm, SUPELCO) を使用した。ヘリウムをキャリアガスとして用い、圧力を150 kPa, スプリット比を100とした。気化室温度を275 °Cとし、1 μLの試料を注入した。カラムオープン温度を70°Cで4分間保持した後、25°C/分の勾配で150°Cまで上昇させた。その後、4°C/分の勾配で220°Cまで上昇させ、220°Cで5分間保持した。続いて、25°C/分の勾配で270°Cまで上昇させ、270°Cで5分間保持した。マススペクトルはEIモードで記録した。イオン源温度を200°C, インターフェイス温度を250°C, スキャン開始時間を10分, 終了時間を34.7分, m/zのスクリーン範囲を35から350とした。また、10 mg/mLとなるように沈殿をDMSO-d₆に溶解させ、核磁気共鳴装置 (日本電子, JNM-A500) で¹³Cの核磁気共鳴スペクトルを観測した。積算回数は15,000回とし、内部標準にDMSO-d₆ (39.5 ppm)を用いた。また、β-1,3グルコシド結合を有するカードランの核磁気共鳴スペクトルも同様の方法で観測した。

[0023] 6. 高純度酵素を用いたβ-1,3グルカンの合成

200 μL 1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5), 100 μL 0.5 M G1P, 600 μL 高純度酵素 (15.3 U/mg, 0.46 U/mL), 5 μL 1 M ジチオスレイトールを混合した。さらに、100 μLの蒸留水あるいは10 mM ラミナリペンタオース (プライマー) を加え、30°C, 24時間保持した。

7. 反応温度が与える影響に関する解析

250 μL 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5), 100 μL 0.5 M G1P, 150 μL 粗精製酵素 (4.82 U/mg, 1.35 U/mL), 2.5 μL 1 M ジチオスレイトールを混合し、20°C~55°Cの範囲内の適当な温度で24時間保持した。この際、ラミナリオリゴ糖等のプライマーは添加しなかった。反応終了後、遠心分離 (5000×g, 5分間) を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離 (5000×g, 5分間) を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られたβ-1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

また、生成したβ-1,3-グルカンサイズ排除クロマトグラフィーに供し、溶出ピークの位置から分子量を推定した。なお、サイズ排除クロマトグラフ

ィーの条件は、<5. 沈殿物の解析>に記載のものと同様とした。

[0024] 8. pHが与える影響に関する解析

250 μ L の0.2 M クエン酸緩衝液 (3.9~7.3の範囲内の適当なpHに調整したもの)、100 μ L 0.5 M G1P、150 μ L 粗精製酵素 (4.82 U/mg, 1.35 U/mL)、2.5 μ L 1 M ジチオスレイトールを混合し、30°Cで24時間保持した。この際、ラミナリオリゴ糖等のプライマーは添加しなかった。反応終了後、遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られた β 1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

また、生成した β -1,3-グルカンサイズ排除クロマトグラフィーに供し、溶出ピークの位置から分子量を推定した。なお、サイズ排除クロマトグラフィーの条件は、<5. 沈殿物の解析>に記載されたものと同様とした。

[0025] 9. G1P濃度が与える影響に関する解析

50 μ L 1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5)、250 μ L のG1P (20 mM~800 mMの範囲内の適当な濃度)、150 μ L 粗精製酵素 (4.82 U/mg, 1.35 U/mL)、2.5 μ L 1 M ジチオスレイトールを混合し、30°C、24時間保持した。この際、ラミナリオリゴ糖等のプライマーは添加しなかった。反応終了後、遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離 (5000 \times g, 5分間) を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られた β 1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

また、生成した β -1,3-グルカンサイズ排除クロマトグラフィーに供し、溶出ピークの位置から分子量を推定した。なお、サイズ排除クロマトグラフィーの条件は、<5. 沈殿物の解析>に記載のものと同様とした。

[0026] 10. 酵素量が与える影響に関する解析

100 μ L 1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、100 μ L 0.5 M G1P、粗精製酵素 (2.56 U/mg, 1.28 U/mLを0.02 U ~1.0 U の範囲内の適当量) を混合した。さら

に、10 μ Lの蒸留水あるいは50 mg/mL ラミナリオリゴ糖（プライマー）を加え、蒸留水で総量が500 μ Lとなるように調整した。ラミナリオリゴ糖はラミナリン（ナカライテスク）を Zymolyase 20T（生化学バイオビジネス）を用いて加水分解することにより調製した。上記の反応液を30°Cで48時間保持した。反応終了後、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られた β 1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

[0027] 11. プライマー量が与える影響に関する解析

100 μ L 1 M 酢酸緩衝液（pH 5.5）、100 μ L 0.5 M G1Pおよび0.02 Uの粗精製酵素（2.56 U/mg, 1.28 U/mL）を混合した。さらに、0~2 mg/mL の範囲内の適当量のラミナリオリゴ糖（プライマー）を加え、蒸留水で総量が500 μ Lとなるように調整した。上記の反応液を30°Cで48時間保持した。反応終了後、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られた β 1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

12. プライマー添加時にG1P濃度が与える影響に関する解析

1 mg/mL ラミナリオリゴ糖（プライマー）と0.05 M~0.6 Mの範囲内の適当量のG1Pおよび1 U/g-ds の粗精製酵素（2.56 U/mg, 1.28 U/mL）を混合し、0.25 M酢酸緩衝液（pH 5.5）で総量が500 μ Lとなるように調整した。この反応液を30°Cで48時間保持した。反応終了後、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、沈殿を回収した。これを1 mLの蒸留水で懸濁したのち、遠心分離（5000 \times g, 5分間）を行い、上清を除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。沈殿として得られた β 1,3-グルカンの重量をフェノール硫酸法で決定し、生成物の収率を計算した。

[0028] <実験結果>

1. 沈殿物の生成

クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で粗精製酵素とG1Pを反応させたところ、図1に示すように、沈殿が形成された。酵素あるいはG1Pのいずれかを除いて同様の反応を行ったところ、沈殿は形成されなかった。また、あらかじめ100°Cで5分間加熱し、失活させた酵素を用いて同様の反応を行っても沈殿は形成されなかった。したがって、この沈殿形成の現象はG1Pに依存した酵素反応であることが推察された。

[0029] 2. 沈殿の性質

沈殿は冷水、エタノール、アセトン、1 M 塩酸には溶解しなかった。また、目視観察によれば、1 M 水酸化ナトリウムや80% DMSOには溶解した。熱水(100°C)には溶解したが、冷却すると、再び沈殿が生じた。これらのことから、沈殿は水不溶の多糖によく見られる性質があることが明らかとなった。

0.5 mLの系で反応を行った際、沈殿の重量は 6.1 ± 0.2 mgであった。また、フェノール硫酸法で測定した沈殿の全糖量は 6.0 ± 0.2 mg (グルコース換算)であった。このことから、沈殿の大部分は糖質で構成されていることが明らかとなった。また、反応系に加えた糖質は9.0 mg (グルコース換算)であるため、沈殿の収率は60%以上であると計算された。

[0030] 3. 沈殿の分子量分布

沈殿を80% DMSOに溶解させ、サイズ排除クロマトグラフィーで分析したところ、溶出位置はプルラン P-10 (推定分子量12,200) とP-5 (推定分子量5,800) の間であった (表1)。分子量と溶出時間の近似式から、沈殿を構成する試料は分子量約11,400付近 (グルコース重合度約70) をピークとする分子量分布であると推定された。したがって、沈殿の主成分は多糖であると考えられた。

[0031]

[表1]

サイズ排除クロマトグラフィーによる沈殿物の分子量分布の解析

| | 分子量 | 溶出時間 (分) | グルコース重合度 |
|--------|--------|----------|----------|
| P-20 | 23,700 | 22.6 | 150 |
| P-10 | 12,200 | 24.3 | 75 |
| P-5 | 5,800 | 26.6 | 35 |
| 沈殿溶解試料 | 11,400 | 24.7 | 70 |

[0032] 4. 糖組成と結合様式

沈殿物の糖組成分析を行ったところ、多糖を構成する単糖はグルコースのみであった。したがって、沈殿物はグルコースのポリマーであることが明らかとなった。

沈殿物（酵素合成多糖）の単糖間の結合様式を決定するため、メチル化分析を行った。沈殿物から得られた部分メチル化アルジトールアセテートをGC-MSに供したところ、保持時間22.0分の位置にピークが観察された（図2）。また、 β -1,3結合を有し、構成糖をグルコースとするラミノリビオースから得られた部分メチル化アルジトールアセテートをGC-MSに供したところ、同じ保持時間にピークが観察された。これらのマススペクトルはGC-MSライブラリの1,3,5-トリ-O-アセチル-2,4,6-トリ-O-メチルヘキシトールと一致した（図3）。したがって、沈殿物には1,3グルコシド結合が存在していることが明らかとなった。沈殿物から得られた試料では、上記の22.0分のピーク以外には、大きなピークは観察されなかった。ラミノリビオースで検出された非還元末端由来の1,5-ジ-O-アセチル-2,3,4,6-テトラ-O-メチルヘキシトール（保持時間 18.8分）についても沈殿物由来試料ではほとんど検出されなかった。したがって、沈殿物は直鎖、かつ高重合度の1,3-グルカンであると考えられた。

また、沈殿物と β -1,3グルコシド結合を有する多糖であるカードランの ^{13}C -NMRスペクトルは同一であった（図4）。したがって、沈殿物は直鎖の β -1,3

グルカンであることが明らかとなった。

[0033] 5. 高純度酵素を用いた β -1,3グルカンの合成

図5には、高純度酵素を用いた β -1,3グルカンの合成試験の結果を示した。上述のように、粗精製酵素を用いた場合はプライマーを添加することなく、 β -1,3グルカンが合成することが可能である。しかし、図5に示すように、高純度酵素を用いた場合は、プライマー非添加では β -1,3グルカンが合成されなかった。一方、プライマー（この場合、ラミナリペンタオース）を添加した反応液では、 β -1,3グルカンの合成が観察された。このように、高度に精製した β 1,3-グルカンホスホリラーゼを用いる場合は、反応時にプライマーを添加することが必要であると考えられた。

6. 反応温度が与える影響

表2に示すように、反応温度20°Cから50°Cの間で β 1,3グルカンの合成が確認された。沈殿収率は温度によって異なったが、45°C以下では、30%から60%の間であった。反応温度によって、分子量の分布が異なり、40°C以上の高温では比較的分子量6,000から6,500の間（グルコース重合度は35から40程度）にピークが観察された。

[0034] [表2]

反応温度と生成物収率および分子量の関係

| 反応温度 (°C) | 沈殿収率 (%) | 分子量 (ピーク) | グルコース重合度 |
|-----------|----------|-----------|----------|
| 20 | 53.1 | 8,900 | 55 |
| 25 | 57.3 | 9,900 | 60 |
| 30 | 55.2 | 11,000 | 70 |
| 35 | 45.9 | 11,000 | 70 |
| 40 | 36.4 | 6,200 | 40 |
| 45 | 32.4 | 6,400 | 40 |
| 50 | 2.4 | 未分析 | 未分析 |
| 55 | 0.0 | 未分析 | 未分析 |

[0035] 7. pHが与える影響

表3に示すように、反応終了時のpHが4.4から7.8の間で β 1,3グルカンの合成が確認された。沈殿収率はpHによって異なったが、pH5~7で高収率であった。反応pHによって、分子量の分布が異なり、低pHでは比較的低分子の位置にピークが観察された。

[0036] [表3]

反応 pH と生成物収率および分子量の関係

| 反応開始時 pH | 反応終了時 pH | 沈殿収率 (%) | 分子量 (ピーク) | グルコース重合度 |
|-------------|-------------|----------|-----------|----------|
| 3.9 | 3.9 | 0.0 | 未分析 | 未分析 |
| 4.4 | 4.4 | 29.3 | 5,800 | 35 |
| 5.1 | 5.3 | 63.2 | 10,600 | 65 |
| 5.8 | 6.2 | 61.2 | 10,600 | 65 |
| 6.6 | 7.1 | 49.3 | 11,000 | 70 |
| 7.3 | 7.8 | 41.5 | 11,000 | 70 |

[0037] 8. G1P濃度が与える影響

表4に示すように、終濃度10 mM以上のG1Pを基質とした時、 β 1,3グルカンの合成が確認された。沈殿収率はG1P濃度によって異なったが、分子量の分布はほぼ同一であった。

[0038] [表4]

G1P 濃度と生成物収率および分子量の関係

| G1P 終濃度 (mM) | 沈殿収率 (%) | 分子量 (ピーク) | グルコース重合度 |
|-----------------|----------|-----------|----------|
| 10 | 4.9 | 未分析 | 未分析 |
| 25 | 15.1 | 10,600 | 65 |
| 50 | 34.3 | 11,000 | 70 |
| 100 | 48.1 | 11,000 | 70 |
| 200 | 56.5 | 11,000 | 70 |
| 400 | 38.1 | 10,600 | 65 |

[0039] 9. 酵素量が与える影響

酵素量が与える影響に関する解析結果を図6に示した。ラミナリオリゴ糖（プライマー）非添加の場合、酵素量 0.1 U/mL（終濃度）以上で沈殿の形成が観察された。このように、粗精製酵素を用いた場合、プライマーを添加することなく β -1,3グルカンを合成することが可能であった。酵素量 0.04 U/mL以下では沈殿の形成が見られなかった。一方、少量のラミナリオリゴ糖（プライマー）を添加した場合、酵素量 0.04 U/mLでも高収率で沈殿が生成されることが観察された。また、さらに低い濃度の酵素を用いた場合でも沈殿の形成が認められた。このように、ラミナリオリゴ糖（プライマー）を添加した場合、少ない酵素量でも β -1,3グルカンを合成できることが明らかとなった。

[0040] 10. プライマー量が与える影響

プライマー量が与える影響に関する解析結果を図7に示した。反応系には少量の酵素しか加えていないため、<9. 酵素量と与える影響>の結果に示すように、プライマー非添加では沈殿物は生じなかった。一方、0.1 mg/mL（終濃度）のプライマーを添加することにより、高収率で沈殿が生成されることが確認された。このように、少量の酵素を用いた場合、少量のプライマーの添加で β -1,3グルカンの収率が飛躍的に増加することが明らかとなった。

11. プライマー添加時にG1P濃度が与える影響

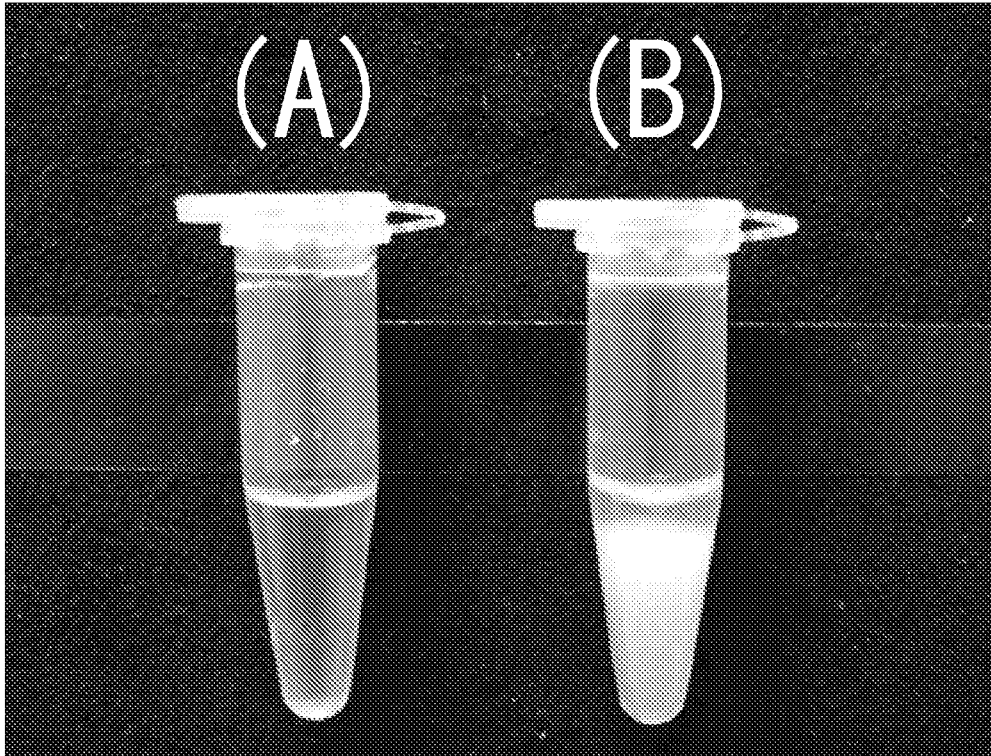
プライマー添加時にG1P濃度が与える影響に関する解析結果を図8に示した。少量のラミナリオリゴ糖（プライマー）の存在下、G1Pの濃度を変化させて β -1,3グルカンの合成を行った。0.05 M~0.6 M G1P の範囲内で、 β -1,3グルカンの合成が観察された。とくに、0.1 M~0.5 M G1P の範囲内で β -1,3グルカンの合成収率が高いことが明らかとなった。

このように、本実施形態によれば、重合度が数十個（30から70程度）の β -1,3グルカンが簡易に製造できることが分かった。

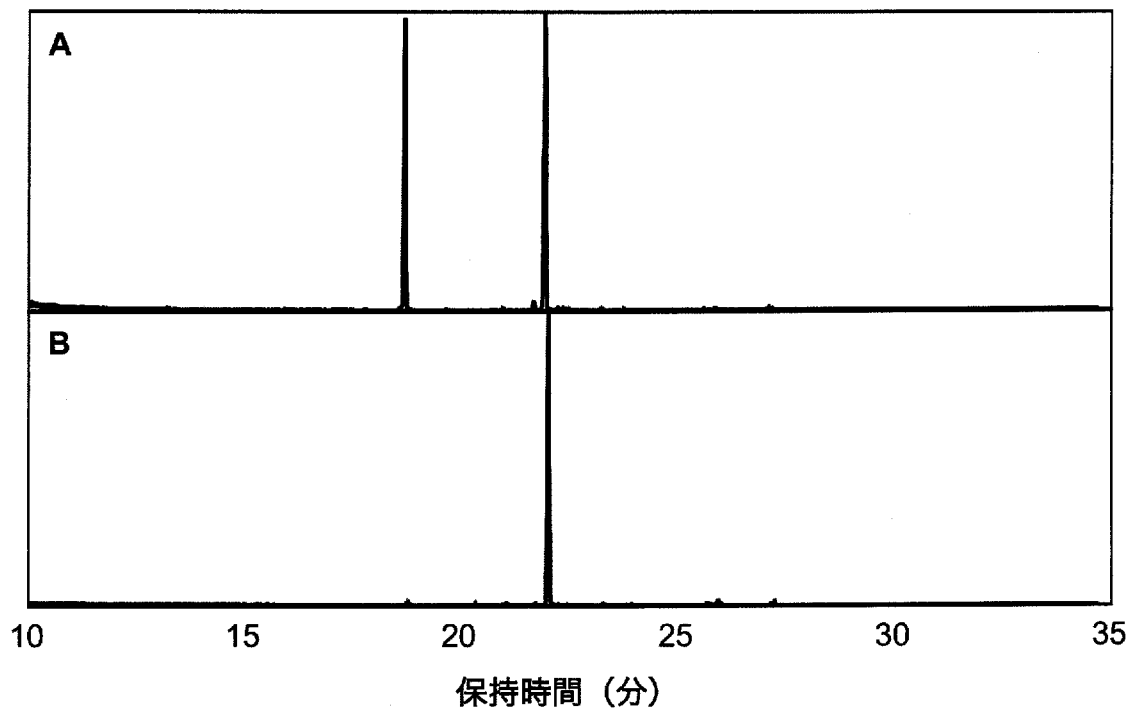
請求の範囲

- [請求項1] オクロモナス (Ochromonas) 属由来の β 1, 3-グルカンホスホリラーゼを用いて、グルコース-1-リン酸を基質とした重合反応を行うことを特徴とする β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項2] オクロモナス属が、オクロモナス・ダニカ (Ochromonas danica) であることを特徴とする請求項 1 に記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項3] 重合反応時の pH が、4~8 であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項4] 重合反応時のグルコース-1-リン酸の濃度が、0.01M~0.6 M であることを特徴とする請求項 1~3 のいずれか一つに記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項5] β 1, 3-グルカンホスホリラーゼは、オクロモナス属の無細胞抽出液または、当該抽出液から粗精製若しくは高純度精製されたものであることを特徴とする請求項 1~4 のいずれか一つに記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項6] 前記 β 1, 3-グルカンホスホリラーゼは、 β 1, 3-グルカンの製造に際してプライマー不要の程度の粗精製の β 1, 3-グルカンホスホリラーゼを使用することによりプライマーとしてラミナリオリゴ糖を添加せずにグルコース-1-リン酸のみを原料とすることを特徴とする請求項 5 に記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項7] 重合反応時の温度が、20°C~45°C であることを特徴とする請求項 1~6 のいずれか一つに記載の β 1, 3-グルカンの製造方法。
- [請求項8] オクロモナス属由来の β 1, 3-グルカンホスホリラーゼであって高純度精製されたものを用いて、グルコース-1-リン酸とラミナリオリゴ糖 (プライマー) を原料とした反応を行うことを特徴とする β 1, 3-グルカンの製造方法。

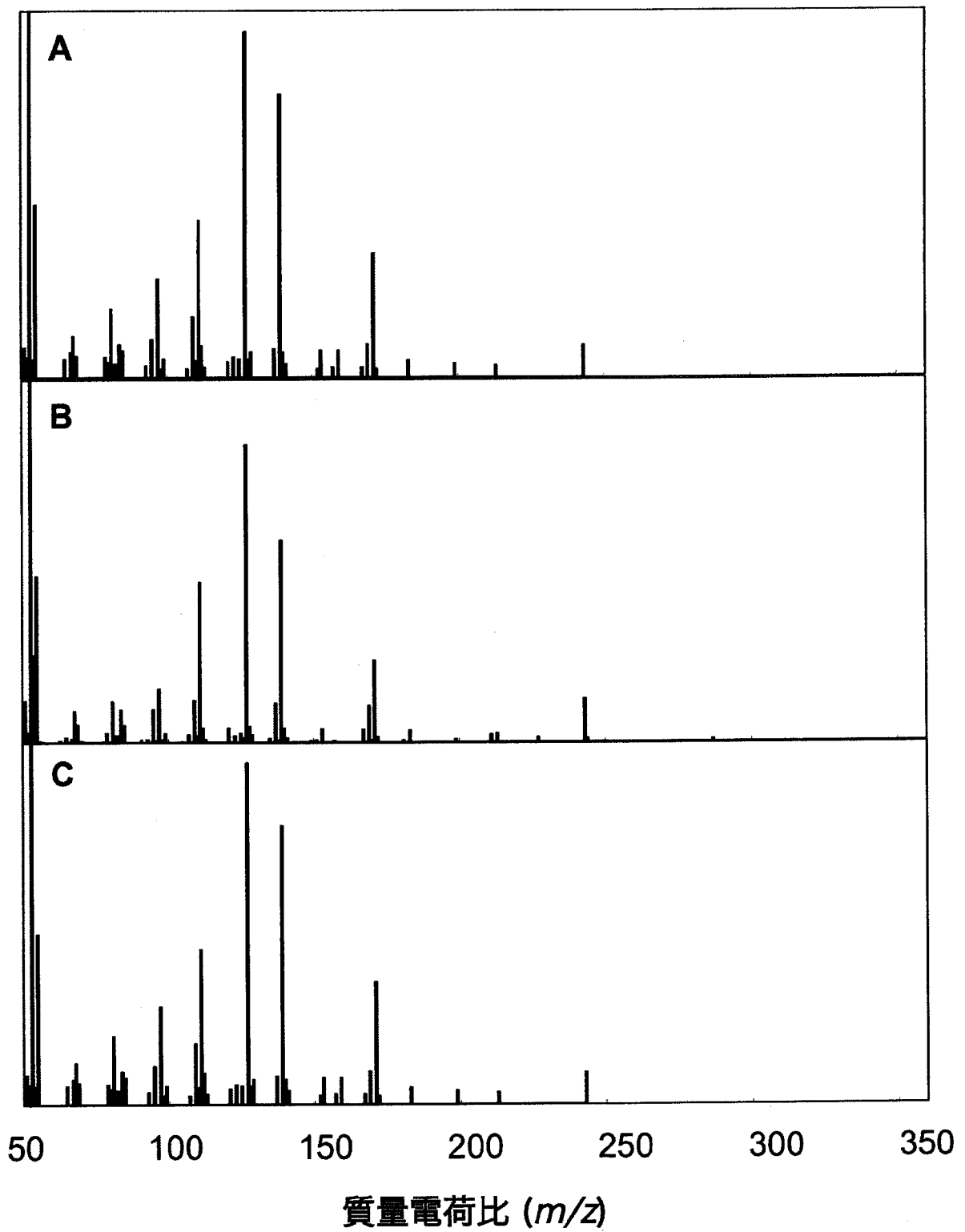
[図1]



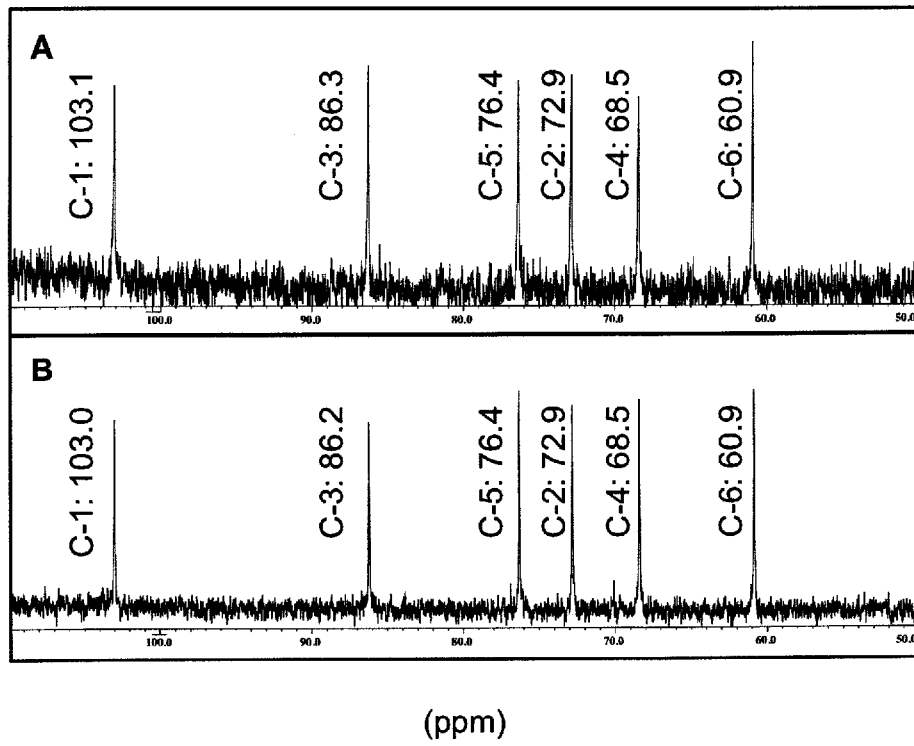
[図2]



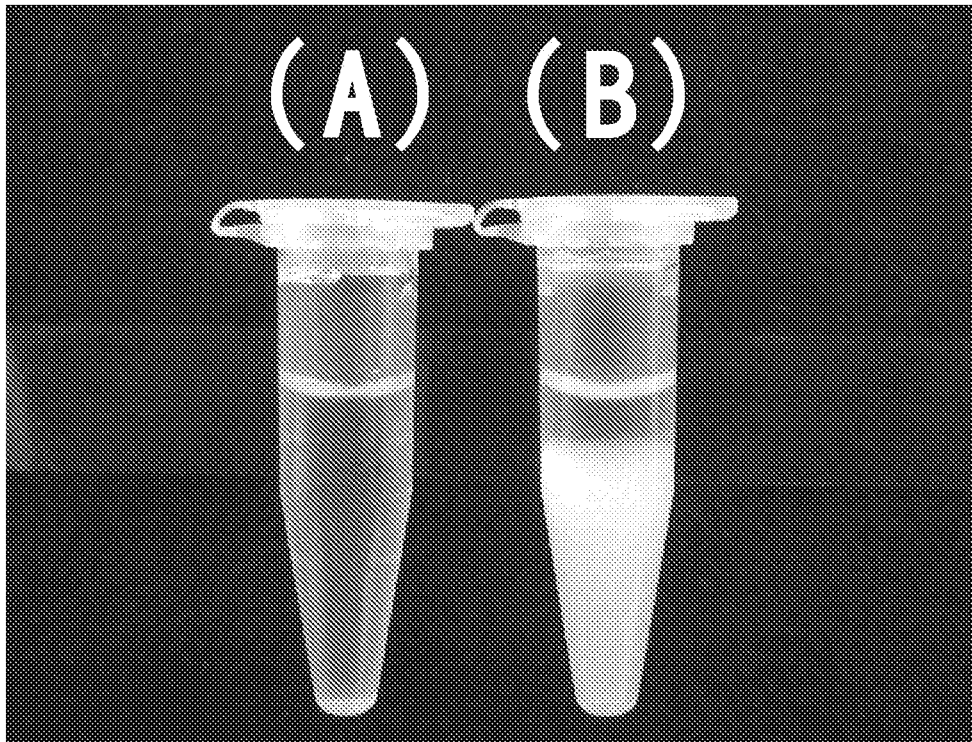
[図3]



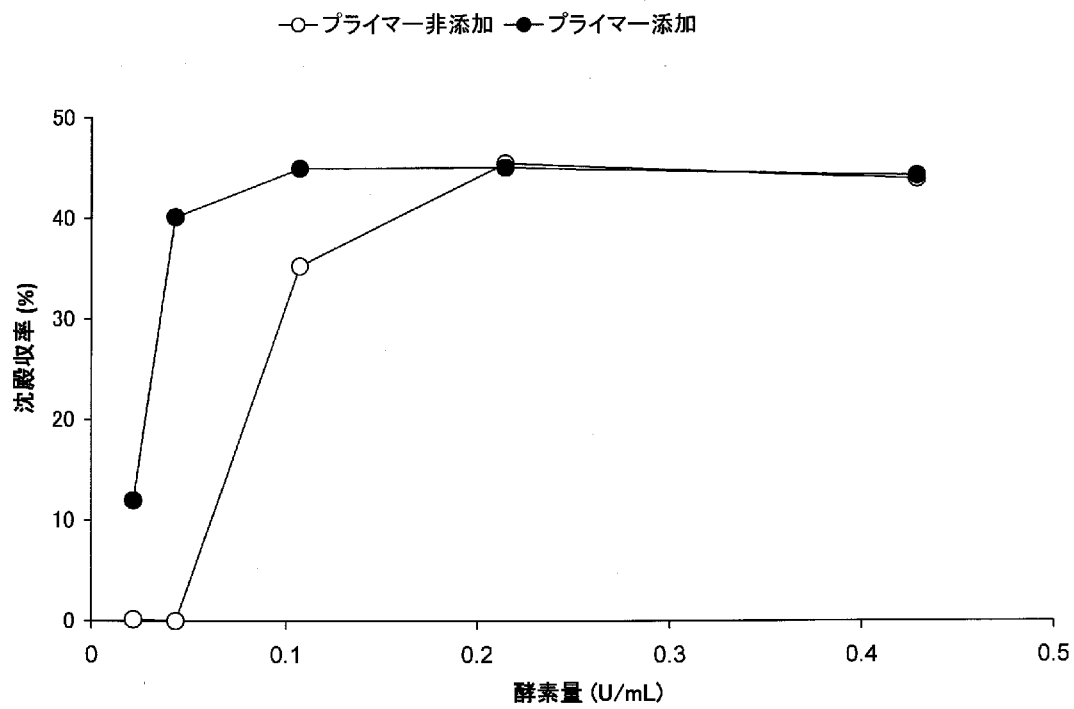
[圖4]



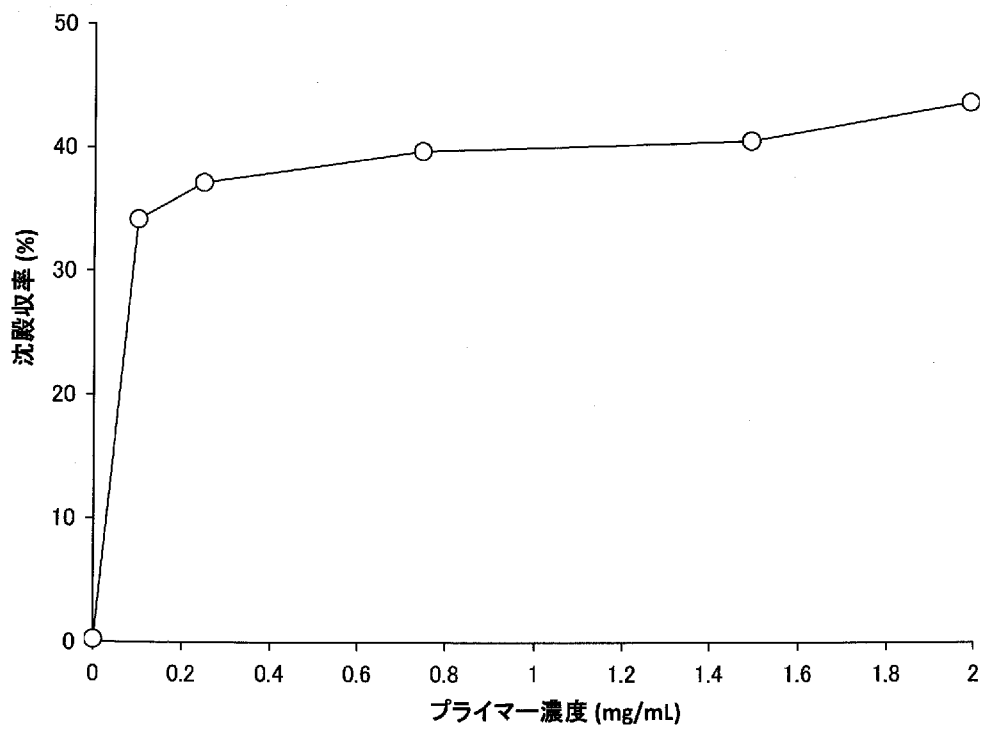
[圖5]



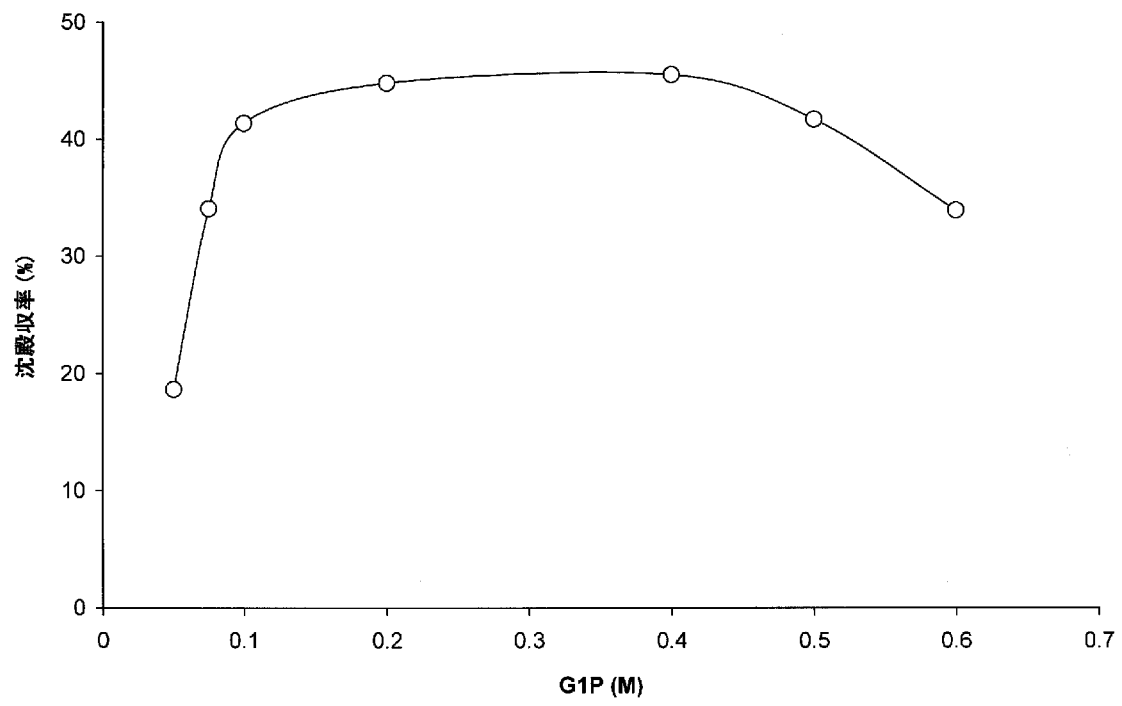
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/04(2006.01) i, C12R1/89(2006.01) n

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)

C12P19/04

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 | 1996-2010 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2010 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2010 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | KAUSS, H. et al., Demonstration and partial purification of a β -(1 \rightarrow 3)-glucan phosphorylase, Biochem.Biophys.Res.Commun., 1969, Vol.35, No.6, p.926-930, entire text | 1-8 |
| X | ALBRECHT, G.J. et al., Purification, crystallization, and properties of a β -(1 \rightarrow 3)-glucan phosphorylase from Ochromonas malhamensis, Phytochemistry, 1971, Vol.10, No.6, p.1293-1298, entire text | 1-8 |
| P, X | Yutaka YAMAMOTO et al., "Ochromonas danica Yurai β -1,3-glucan phosphorylase no Seisei to Shoseishitsu Kaiseki", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2009 (05.03.2009), vol.2009, page 48 | 1-8 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
10 May, 2010 (10.05.10)Date of mailing of the international search report
18 May, 2010 (18.05.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P,X | Yutaka YAMAMOTO et al., " β -1,3-glucan phosphorylase no Seisei to Shoseishitsu", J.Appl.Glycosci., 20 July 2009 (20.07.2009), vol.56, no.Suppl., page 41 | 1-8 |
| P,X | Naoto ISONO et al., "Phosphorylase o Mochiita β -1,3-glucan no Gosei", J.Appl.Glycosci., 20 July 2009 (20.07.2009), vol.56, no.Suppl., page 41 | 1-8 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P19/04(2006.01)i, C12R1/89(2006.01)n

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. C12P19/04

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

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2010年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2010年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2010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)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)

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 | KAUSS, H. et al., Demonstration and partial purification of a β -(1 \rightarrow 3)-glucan phosphorylase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, Vol. 35, No. 6, p. 926-930, 全文 | 1-8 |
| X | ALBRECHT, G. J. et al., Purification, crystallization, and properties of a β -(1 \rightarrow 3)-glucan phosphorylase from <i>Ochromonas malhamensis</i> , Phytochemistry, 1971, Vol. 10, No. 6, p. 1293-1298, 全文 | 1-8 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

10.05.2010

国際調査報告の発送日

18.05.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9281

| 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 |
| P, X | 山本 豊 他, <i>Ochromonas danica</i> 由来 β -1,3-glucan phosphorylase の精製と諸性質解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2009.03.05, Vol.2009, p.48 | 1-8 |
| P, X | 山本 豊 他, β -1,3-グルカンホスホリラーゼの精製と諸性質, <i>J. Appl. Glycosci.</i> , 2009.07.20, Vol.56, No. Suppl., p.41 | 1-8 |
| P, X | 磯野 直人 他, ホスホリラーゼを用いた β -1,3-グルカンの合成, <i>J. Appl. Glycosci.</i> , 2009.07.20, Vol.56, No. Suppl., p.41 | 1-8 |