

(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2010-207211

(P2010-207211A)

(43) 公開日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 17/04 (2006.01)	C 1 2 P 17/04	4 B 0 5 0
C 0 7 D 307/58 (2006.01)	C 0 7 D 307/58	4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	4 C 0 3 7

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2009-178453 (P2009-178453)	(71) 出願人	000236920
(22) 出願日	平成21年7月30日 (2009.7.30)		富山県
(31) 優先権主張番号	特願2009-30548 (P2009-30548)		富山県富山市新総曲輪1番7号
(32) 優先日	平成21年2月12日 (2009.2.12)	(74) 代理人	100114074
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 大谷 嘉一
		(72) 発明者	加藤 康夫
			富山県射水市黒河5180 富山県立大学内
		(72) 発明者	中島 範行
			富山県射水市黒河5180 富山県立大学内
		(72) 発明者	荻田 信二郎
			富山県射水市黒河5180 富山県立大学内

最終頁に続く

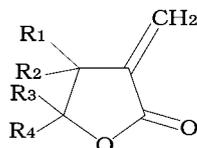
(54) 【発明の名称】 α-メチレン-γ-ブチロラクトン類の製造方法

(57) 【要約】

【課題】植物中に多種の形態で存在するチュールリッポシド類を酵素反応を用いて α-メチレン-γ-ブチロラクトン類を製造する方法の提供を目的とする。

【解決手段】下記一般式(5)で示される α-メチレン-γ-ブチロラクトン類の製造方法は、植物組織内に存在するチュールリッポシド類に植物組織から抽出したチュールリッポシド変換酵素を用いて酵素反応をさせることを特徴とする。

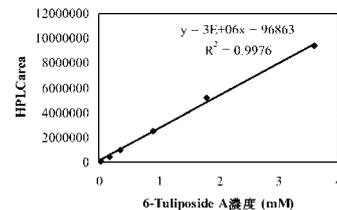
【化1】



..... (5)

(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は独立して水素、水酸基又は炭素数1～8のアルキル基を示し、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>は独立して水素又は炭素数1～8のアルキル基を示す。)

【選択図】 図1

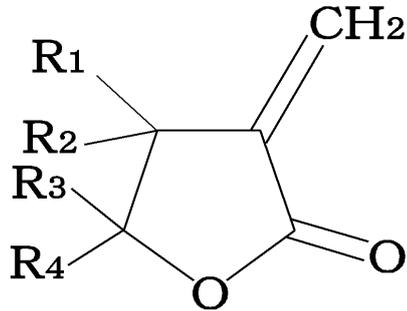


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

植物組織内に存在するチューリップポシド類に植物組織から抽出したチューリップポシド変換酵素を用いて酵素反応をさせることを特徴とする下記一般式(5)で示される -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法。

## 【化 1】



10

..... (5)

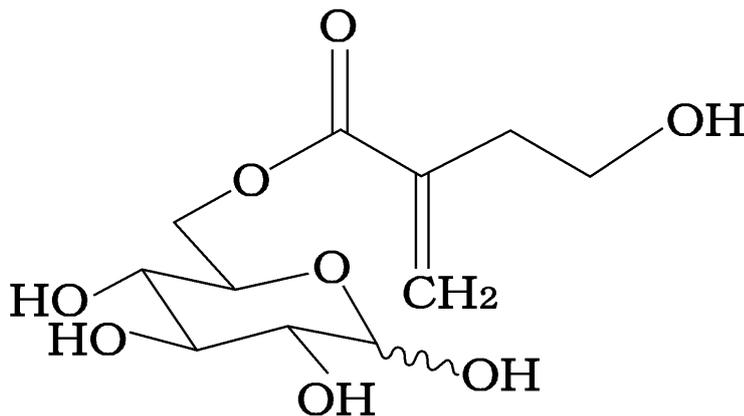
(式中、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> は独立して水素、水酸基又は炭素数 1 ~ 8 のアルキル基を示し、R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> は独立して水素又は炭素数 1 ~ 8 のアルキル基を示す。)

## 【請求項 2】

植物組織内に存在するチューリップポシド - A [化学式(1)] 及びその類縁体又はチューリップポシド - B [化学式(2)] 及びその類縁体を植物組織から抽出したチューリップポシド変換酵素を用いて -メチレン- -ブチロラクトン [化学式(3)] 及び -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラクトン [化学式(4)] を生成し、分別抽出することを特徴とする -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法。

20

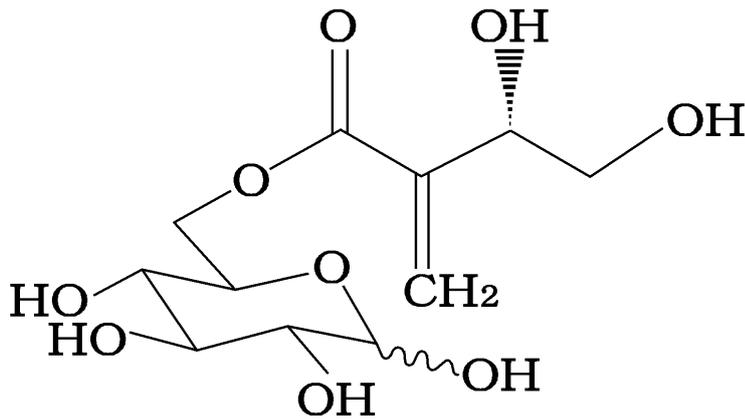
## 【化 2】



30

..... (1)

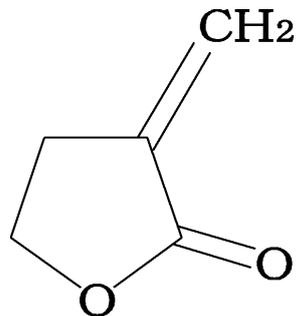
## 【化 3】



..... (2)

10

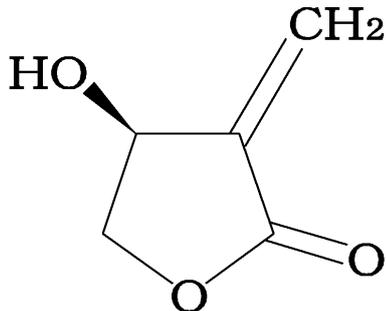
## 【化 4】



..... (3)

20

## 【化 5】



..... (4)

30

## 【請求項 3】

-メチレン- -ブチロラクトン類を製造する原料が、チューリップ (*Tulipa* spp.) であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法。

40

## 【請求項 4】

組織内にチューリップポシド - A 及びその類縁体を有する植物体に、植物組織から抽出したチューリップポシド変換酵素を用いて酵素反応させ、 -メチレン- -ブチロラクトンを製造することを特徴とする -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法。

## 【請求項 5】

植物体は、チューリップ (*Tulipa* spp.)、アルストロメリア (*Alstroemeria* spp.)、セリバオウレン (*Coptis japonica*)、ユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、シジミバナ (*Spiraea unifolia*)、ピンクユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、カ

50

タクリ (*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ (*Erythronium grandiflorum* Pursh.) のうち、いずれかの植物体であることを特徴とする請求項 4 記載の -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法。

【請求項 6】

組織内にチューリップシド - B 及びその類縁体を有する植物体に、植物組織から抽出したチューリップシド変換酵素を用いて酵素反応をさせ、 -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラクTONを製造することを特徴とする -メチレン- -ブチロラクTON類の製造方法。

【請求項 7】

植物体は、チューリップ (*Tulipa* spp.)、シジミバナ (*Spiraea prunifolia*)、ユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、ピンクユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、カタクリ (*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ (*Erythronium grandiflorum* Pursh.) のうち、いずれかの植物体であることを特徴とする請求項 6 記載の -メチレン- -ブチロラクTON類の製造方法。

【請求項 8】

分子量約 70,200、サブユニット分子量約 34,900、至適温度 25~30、至適 pH 6.5~7.0、エステラーゼやフォスファターゼの阻害剤である重金属、NaF、PMSF により阻害され、チューリップシド - A 及び B に基質特異性を有することを特徴とする請求項 1~7 のいずれかに用いるチューリップシド変換酵素。

【請求項 9】

チューリップシド変換酵素を抽出する植物組織が、チューリップ (*Tulipa* spp.)、アルストロメリア (*Alstromeria* spp.)、カタクリ (*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ (*Erythronium grandiflorum* Pursh.) のうち、いずれかに由来する植物組織であることを特徴とする請求項 8 記載のチューリップシド変換酵素。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素反応を活用した -メチレン- -ブチロラクTON類の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

-メチレン- -ブチロラクTON類は、耐熱性透明樹脂の原材料、各種生理活性物質の中間体、害虫忌避剤及び抗変異原性剤等の多くの利用価値がある。

従来、-メチレン- -ブチロラクTON類は、化学合成にて製造されていた (特許文献 1)。

しかし、化学合成による製造方法は、専用設備が必要となるだけでなく、多大なエネルギーを消費するものであり、環境負荷が大きいものであった。

【0003】

本願発明者らは、これまでに植物中には下記化学式 (1) に示すチューリップシド - A (*Tuliposide* - A) 及びその類縁体又は化学式 (2) に示すチューリップシド - B (*Tuliposide* - B) 及びその類縁体等の多量のチューリップシド類が存在し、これらのチューリップシド類は抗菌性を有するが、チューリップ組織の中にはチューリップシド類よりさらに抗菌性の強い化学式 (3) 及び化学式 (4) に示す -メチレン- -ブチロラクTON類に変換する酵素を見出し、本発明に至った。

本明細書では、この酵素をチューリップシド変換酵素と称し、その後の研究でチューリップ以外の植物組織にも存在することが明らかになった。

なお、化学式 (3) に示す -メチレン- -ブチロラクTONは、チューリップリン -

10

20

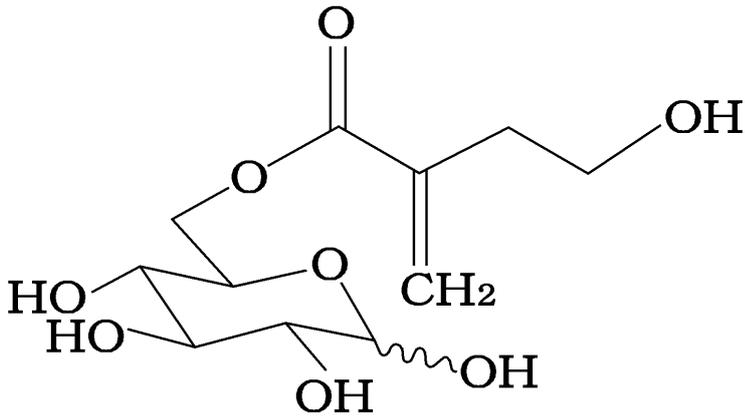
30

40

50

Aとも称され、化学式(4)に示す -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラクトン  
は、チューリップリン-Bとも称される。

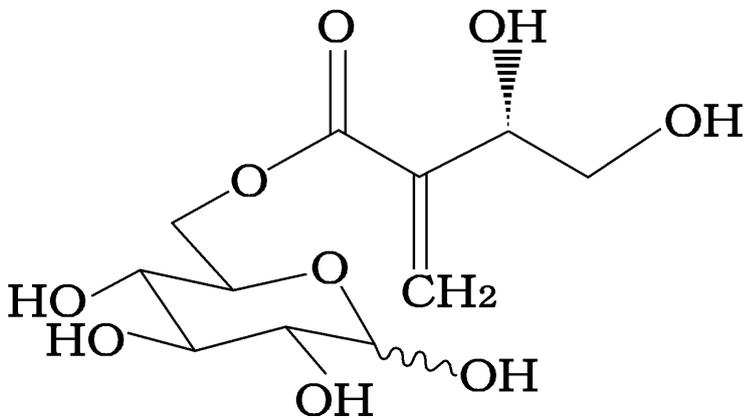
【化1】



10

..... (1)

【化2】

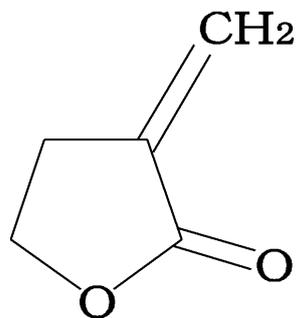


20

..... (2)

30

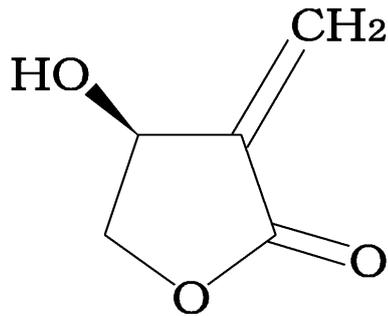
【化3】



40

..... (3)

【化 4】



..... (4)

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平10-298172号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、植物中に多種の形態で存在するチューリップポシド類を植物組織に存在する酵素による酵素反応を用いて -メチレン- -ブチロラクトン類を製造する方法の提供を目的とする。

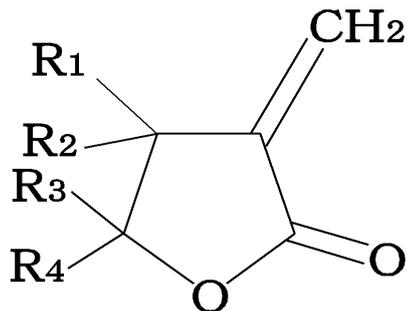
20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明に係る下記一般式(5)で示される -メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法は、植物組織内に存在するチューリップポシド類に植物組織から抽出したチューリップポシド変換酵素を用いて酵素反応をさせることを特徴とする。

【化 5】



..... (5)

30

(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ は独立して水素、水酸基又は炭素数1~8のアルキル基を示し、 $R_3$ 、 $R_4$ は独立して水素又は炭素数1~8のアルキル基を示す。)

-メチレン- -ブチロラクトン類の製造方法としては、植物組織内に存在するチューリップポシド-A [化学式(1)]及びその類縁体又はチューリップポシド-B [化学式(2)]及びその類縁体を植物組織から抽出したチューリップポシド変換酵素を用いて -メチレン- -ブチロラクトン [化学式(3)]及び -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラクトン [化学式(4)]を生成し、分別抽出してもよい。

40

原材料となる植物体は、組織内にチューリップポシド-A及びその類縁体が存在すると、-メチレン- -ブチロラクトンが得られ、チューリップポシド-B及びその類縁体が存在すると -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラクトンが得られる。

そのような植物体としては、チューリップ (*Tulipa* spp.) が好ましく、-メチレン- -ブチロラクトンを製造するには、アルストロメリア (*Alstroemeria* spp.)、セリバオウレン (*Coptis japonica*)、ユキヤナギ

50

(*Spiraea thunbergii*)、シジミバナ(*Spiraea prunifolia*)、ピンクユキヤナギ(*Spiraea thunbergii*)、カタクリ(*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ(*Erythronium grandiflorum* Pursh.)のうち、いずれかの植物体にチューリップシド変換酵素を用いた酵素反応により製造することができる。

また、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを製造するには、植物体は、チューリップ(*Tulipa* spp.)、シジミバナ(*Spiraea prunifolia*)、ユキヤナギ(*Spiraea thunbergii*)、ピンクユキヤナギ(*Spiraea thunbergii*)、カタクリ(*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ(*Erythronium grandiflorum* Pursh.)のうち、いずれかの植物体にチューリップシド変換酵素を用いて酵素反応させるのがよい。

チューリップシド変換酵素は、分子量約70,200、サブユニット分子量約34,900、至適温度25~30、至適pH6.5~7.0、エステラーゼやフォスファターゼの阻害剤である重金属、NaF、PMSFにより阻害され、チューリップシド-A及びBに基質特異性を有することを特徴とする。

ここで、チューリップシド変換酵素を抽出する植物組織が、チューリップ(*Tulipa* spp.)、アルストロメリア(*Alstroemeria* spp.)、カタクリ(*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ(*Erythronium grandiflorum* Pursh.)のうち、いずれかに由来する植物組織であってよい。

【発明の効果】

【0007】

本発明に係る $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ブチロラクトン類の製造方法においては、チューリップ等の植物体を原材料とし、酵素反応により製造するものであることから従来の化学合成に比較して、エネルギー消費が少なく、安全である。

これまでは、チューリップの花弁等が富山県内分推定で約100トン/年強も廃棄されている現状からすると、石油に依存しない優れた製造方法となる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】チューリップシド-Aの検量線を示す。

【図2】チューリップシド-Bの検量線を示す。

【図3】 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ブチロラクトンの検量線を示す。

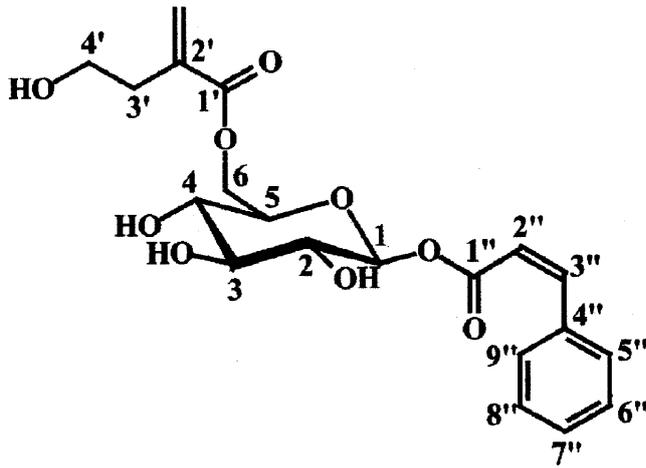
【図4】 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンの検量線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、植物体に有するチューリップシド-A又はB及びその類縁体から、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ブチロラクトン又は $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを製造する点に特徴があり、類縁体には例えば化学式(6)(*Phytochemistry* 65(2004)731-739; *Plant Growth Regulation* (2005)46:125-131)、化学式(7)(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(1), 152-154, 1999)、化学式(8)(*Natural Medicines* 51(3), 244-248(1997))、化学式(9)及び(10)(*Phytochemistry*, Vol. 40 No. 1 49-51(1995))等が例として挙げられる。

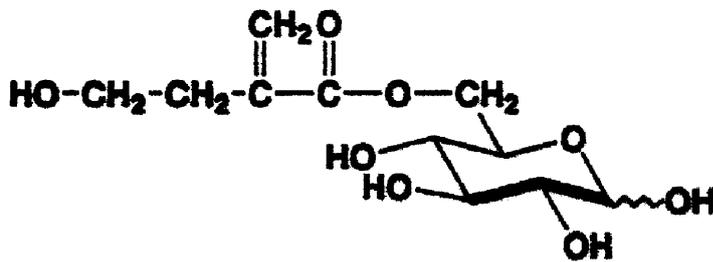
【化 6】



..... (6)

10

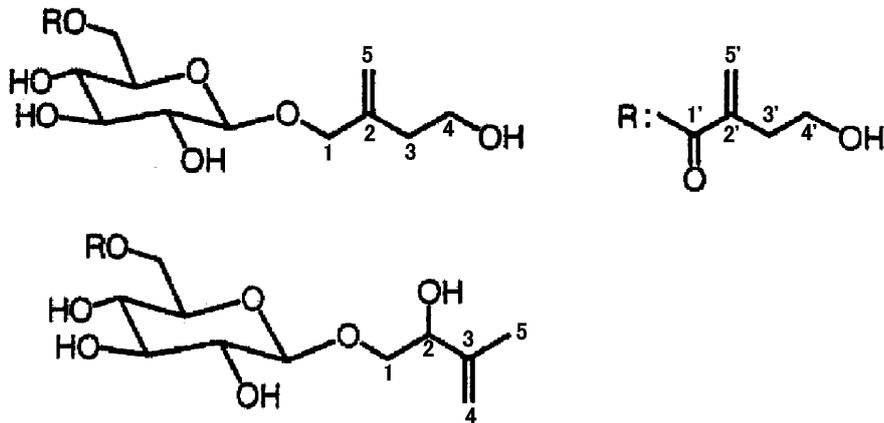
【化 7】



..... (7)

20

【化 8】

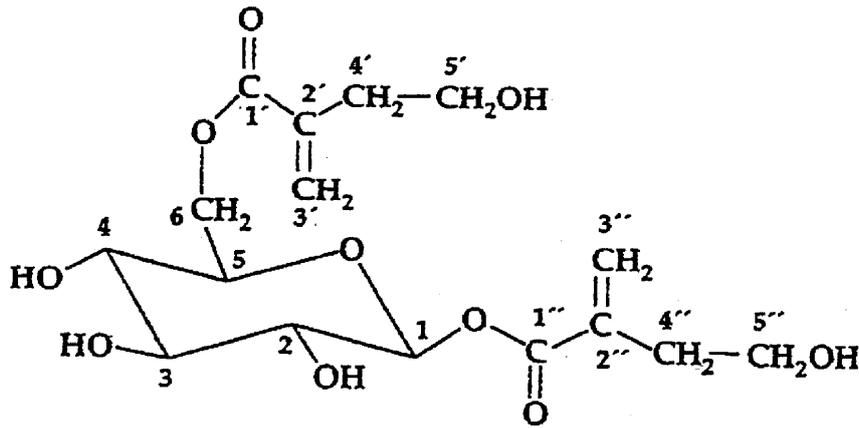


..... (8)

30

40

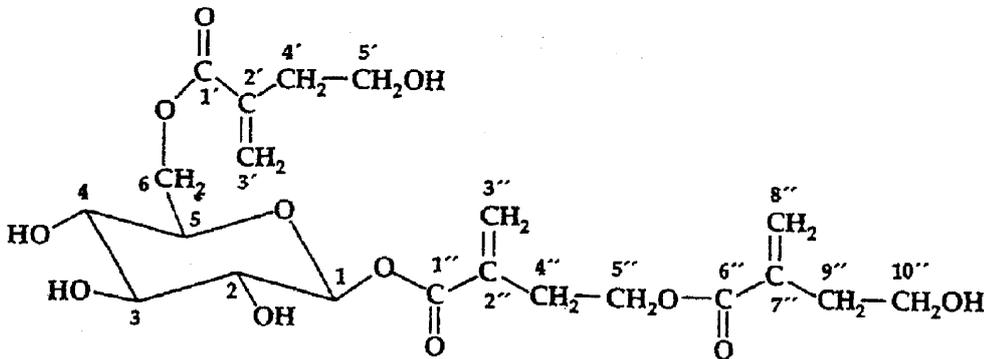
## 【化9】



..... (9)

10

## 【化10】



..... (10)

20

## 【実施例1】

## 【0010】

(チューリップ球根粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ (*Tulipa* spp.) : 「紫水晶」の球根 2 g (生重量) をビーズショッカーにて破碎し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 7.0) を 20 ml 加えてボルテックスで攪拌後、低温室にて 1 時間静置した。

遠心分離 (21, 500 × g, 15 min, 4) 後、上清を 10 mM KPB にて平衡化した DEAE-Toyopearl カラム (ゲル 3 ml) にかき、10 mM KPB 及び 100 mM KPB (0.1 M NaCl) で溶出し、活性のあるフラクションを回収後、セントリプレップにて濃縮 (4, 000 × g, 40 min, 4) した。

これにより、100 U/mg の比活性を有する粗酵素 500 U を得ることができた。

酵素活性の測定法は以下に示す手法にて行った。

0.5 M KPB (pH 6.5) を 5 μl、酵素液を 10 μl、H<sub>2</sub>O を 30 μl、基質として 6-Tuliposide A (10 mg/ml) 5 μl を加え、全量を 50 μl とし、室温にて 10 分間静置、酵素反応を行った。

10 分後、メタノール 100 μl、0.5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 μl、H<sub>2</sub>O 300 μl を加えて反応を停止し、25 μl を HPLC にインジェクションして活性を測定した。

HPLC 分析は、流速: 0.65 ml/min、検出: 208 nm、カラム: RP-18 GP 250 × 4.6 (関東化学製)、溶媒: 20% メタノール (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) の条件で行った。

タンパク量は、ブラッドフォード法 (Bio Rad Protein Assay

30

40

50

K i t ) を用いて定量した。

タンパク溶液 10  $\mu$  l にブラッドフォード試薬 250  $\mu$  l を加え、30 分後、595 nm の吸光度を測定した。

規定濃度溶液 ( 1 . 44 mg / ml ) の B S A を用いて各々の濃度と吸光度の検量線を作成した。

これを元に、球根無細胞抽出液中のタンパク含量を定量した。

【実施例 2】

【0011】

( チューリップ花弁組織からの  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類の抽出 )

チューリップ：「紫水晶」の花弁 100 mg ( 生重量 ) に 1 ml の冷水を加え、ピーズシヨッカー ( 2500 rpm、4 、30 秒  $\times$  10 回 ) で破碎抽出した。 10

綿ろ過後、抽出液 490  $\mu$  l を量りとり、10 mM K P B ( pH 7 . 0 ) 5  $\mu$  l、実施例 1 にて得られた粗酵素液 ( 3100 U / ml ) 5  $\mu$  l を各々添加し、常温にて 2 時間静置した。

このものに NaCl を飽和量添加し、各溶媒 ( トルエン、酢酸ブチル、酢酸プロピル、ヘキサン、キシレン ) 200  $\mu$  l で 2 回、100  $\mu$  l で 1 回の計 3 回で溶媒抽出して H P L C 分析にて抽出効率を求めた。

なお、H P L C 分析については、流速：0 . 35 ml / min、検出：208 nm、カラム：T S K g e l O D S - 100 V 5 mm 4 . 6 mm  $\times$  15 cm ( 東ソー株式会社製 )、溶媒：10%メタノール ( 10 mM H<sub>3</sub>P O<sub>4</sub> )、イソクラティックの条件で行った。 20

ここで抽出効率は、図 1 ~ 4 にそれぞれ示すような既知の濃度に基づいて検量線を作成し、チューリップシド - A 又は B が  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン又は  $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンに変換後、酵素反応液から溶媒抽出できた割合を示す。

【表 1】

溶媒	抽出効率 (%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
トルエン	92.7	14.3
酢酸ブチル	> 99.0	33.6
酢酸プロピル	> 99.0	49.0
ヘキサン	26.9	24.4
キシレン	83.8	12.7

30

抽出溶媒として非極性溶媒を用いたので、ヒドロキシ基を有する  $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンの抽出効率が低かった。

【実施例 3】

【0012】

( チューリップ花弁組織からの  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類の分別抽出 )

チューリップ：「紫水晶」花弁 100 mg ( 生重量 ) に 1 ml の冷水を加え、ピーズシヨッカー ( 2500 rpm、4 、30 秒  $\times$  10 ) で破碎抽出した。 40

綿ろ過後、抽出液 490  $\mu$  l を量りとり、10 mM K P B ( pH 7 . 0 ) 5  $\mu$  l、実施例 1 にて得られた粗酵素液 ( 580 U / ml ) 5  $\mu$  l を各々添加し、常温にて 2 時間静置した。

このものに NaCl を飽和量添加し、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンをトルエン 200  $\mu$  l で 2 回、100  $\mu$  l で 1 回溶媒抽出した。

残りの水層より、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを各溶媒 ( ブタノール、酢酸エチル、2-プロパノール、酢酸プロピル、イソアミルアルコール ) にて 200  $\mu$  l で 2 回、100  $\mu$  l で 1 回溶媒抽出、H P L C 分析にて抽出効率を算出した。 50

【表 2】

$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン 抽出溶媒	抽出効率 (%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
ブタノール	93	71.1
2-プロパノール	93	73.3
イソアミルアルコール	93	46.6
ブタノール:アセトン(1:1)	93	79.5
酢酸プロピル	93	66.4

10

- メチレン -  $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを非極性溶媒で抽出した後に極性溶媒を用いて  $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを抽出したので抽出効率が向上した。

## 【実施例 4】

## 【0013】

(チューリップ根粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ:「紫水晶」の根 1.3 g (乾燥重量) を乳鉢にて破碎し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 7.0) を 150 ml 加えて低温室にて 1 時間攪拌した。

ガーゼにて組織を濾別後、遠心分離 (21,500 × g, 15 min, 4℃) した上清に 10 mM KPB にて平衡化した DEAE-Toyopearl 4 g を加え、低温室にて 1.5 時間攪拌した。懸濁液を 25 ml の注射筒に流し入れゲルを回収した。

20

このゲルより各 20 ml の 10 mM KPB、100 mM KPB、100 mM KPB (0.1 M NaCl) にて順次酵素を溶出し、活性のあるフラクションを回収後、セントリプレップ (4,000 × g, 40 min, 4℃) 及びセントリコン (10,000 × g, 20 min, 4℃) にて濃縮した。

これにより、18.7 U/mg の比活性を有する粗酵素約 17 U を得ることができた。

## 【実施例 5】

## 【0014】

(チューリップ茎粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ:「紫水晶」の茎 2.2 g (乾燥重量) から実施例 4 と同様の手法で精製を行い、11.1 U/mg の比活性を有する粗酵素約 12 U を得ることができた。

30

## 【実施例 6】

## 【0015】

(チューリップ葉粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ:「紫水晶」の葉 2.2 g (乾燥重量) から実施例 4 と同様の手法で精製を行い、15.4 U/mg の比活性を有する粗酵素約 63 U を得ることができた。

## 【実施例 7】

## 【0016】

(チューリップ花卉粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ:「紫水晶」の花弁 1.2 g (乾燥重量) から実施例 4 と同様の手法で精製を行い、68.0 U/mg の比活性を有する粗酵素約 60 U を得ることができた。

40

## 【実施例 8】

## 【0017】

(チューリップ薬粗酵素液の調製)

凍結乾燥した「紫水晶」の薬 2.0 g (乾燥重量) から実施例 B-1 と同様の手法で精製を行い、42.1 U/mg の比活性を有する粗酵素約 72 U を得ることができた。

## 【実施例 9】

50

## 【0018】

(チューリップ雌しべ粗酵素液の調製)

凍結乾燥したチューリップ：「紫水晶」の雌しべ1.2g(乾燥重量)から実施例4と同様の手法で精製を行い、11.4U/mgの比活性を有する粗酵素約17Uを得ることができた。

## 【実施例10】

## 【0019】

(チューリップ各組織由来粗酵素を用いた  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類の調製)

チューリップ：「紫水晶」の花弁(乾重量1g)を乳鉢で破碎し、冷メタノール50mlを加え低温室(4℃)にて30分間攪拌抽出した。

ろ過後、ろ液をシロップ状になるまで減圧濃縮し、メタノールと同量の冷水(4℃)に再溶解して抽出液とした。

このものを均等に分け、酵素反応に供した。

抽出液490 $\mu$ lを量りとり、1M KPB(pH7.0)5 $\mu$ l、各組織由来粗酵素液(球根1000U/ml、葉630U/ml、茎123U/ml、根171U/ml、薬719U/ml、花弁601U/ml、雌しべ167U/ml)5 $\mu$ lを各々添加し、常温にて2時間静置した。

このものにNaClを飽和量添加し、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンをトルエン(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンをブタノール/アセトン=1/1(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)にて分別抽出し、HPLCにて $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン及び $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンの濃度を求めた。

酵素による変換率と抽出効率を表3に示す。

ここで変換率は、チューリップシド-A又はBが $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン又は $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンに変換した割合を示し、抽出効率は酵素反応液から溶媒抽出できた割合を示す。

## 【表3】

酵素由来	酵素変換率(%)		抽出効率(%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
無添加	4.03	26.6	56.2	82.8
球根	91.5	88.3	90.2	84.5
葉	93.5	67.3	90.4	83.4
茎	91.7	47.8	90.2	83.9
根	86.7	98.8	89.9	83.5
薬	92.2	79.1	90.2	83.0
花弁	92.6	79.1	89.7	84.7
雌しべ	90.9	87.0	90.2	84.0

## 【0020】

(比較例1)

(市販リパーゼを用いた  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類の調製)

実施例10同様の抽出液を用い、このものを均等に分け、酵素反応に供した。

抽出液490 $\mu$ lを量りとり、1M KPB(pH7.0)5 $\mu$ l、各種リパーゼ10mgを各々添加し、常温にて2時間静置した。

このものにNaClを飽和量添加し、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンをトルエン(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンをブタノール/アセトン=1/1(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)にて分

別抽出し、HPLCにて  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン及び  $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンの濃度を求めた。

酵素による変換率と抽出効率を表4に示す。

【表4】

リパーゼ由来(種)	酵素変換率(%)		抽出効率(%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
無添加	3.93	33.4	76.0	80.7
<i>Aspergillus niger</i> (カビ)	45.4	39.1	78.7	80.3
<i>Klebsiella oxytoca</i> (細菌)	5.31	33.1	82.8	73.8
<i>Pseudomonas sp.</i> (細菌)	5.47	36.2	81.3	81.2
ブタ膵臓(動物)Lipase	12.5	28.6	81.0	85.7
コムギ麦芽(植物)	5.35	36.2	81.3	81.2

10

この結果、チューリップ組織から抽出したチューリップシド変換酵素の方が市販のリパーゼよりも優れていることが明らかになった。

【実施例11】

20

【0021】

(チューリップ各組織中からの  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類の調製)

チューリップ:「紫水晶」の各組織(球根250mg、葉100mg、茎100mg、根100mg、薬50mg、花卉100mgいずれも生重量)に冷水1mlを加え、ビーズショッカー(2500rpm、4、30秒×10回)で破碎抽出した。

綿る過後、抽出液490 $\mu$ lを量りとり、10mM KPB(pH7.0)5 $\mu$ l、粗酵素液(1000U/ml)5 $\mu$ lを各々添加し、常温にて2時間静置した。

このものにNaClを飽和量添加し、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンをトルエン(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンをブタノール/アセトン=1/1(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)にて

30

別抽出し、HPLCにて  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン及び  $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンの濃度を求めた。

酵素による変換率と抽出効率を表5に示す。

【表5】

組織	酵素変換率(%)		抽出効率(%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
球根	95.0	ND	90.0	-
葉	93.3	>99	90.3	82.1
茎	90.6	ND	90.8	-
根	94.8	72.6	92.2	82.5
薬	85.0	48.7	87.4	99.0
花卉	94.2	77.8	91.2	80.1
雌しべ	93.1	74.4	92.4	80.7

40

ND:組織中にTuliposideが存在しないため検出不可能であった。

【実施例12】

【0022】

(アルストロメリア抽出液の調製)

アルストロメリア(*Alstromeria spp.*)植物体60mg(乾燥重量)

50

より冷メタノール 3 ml にて、ビーズショッカー ( 2 5 0 0 r p m、4 、 3 0 秒 × 1 0 ) で破碎することで抽出物を得た。

綿ろ過後、ろ液を集め減圧濃縮し、ろ液と同量の冷水に再溶解して抽出液とした。

このものを均等に分け、酵素反応に供した。

なお、抽出にはラピッドスター、マリレーン、エラの 3 栽培品種を用いた。

【 0 0 2 3 】

( セリバオウレン抽出液の調製 )

セリバオウレン ( *Coptis japonica* ) 植物体 6 0 0 m g ( 乾燥重量 ) を乳鉢で破碎後冷メタノール 3 0 m l を加え、室温にて 3 0 分間撹拌した。

ろ過後、ろ液をシロップ状になるまで減圧濃縮し、冷水 3 m l に再溶解して抽出液とした。このものを均等に分け、酵素反応に供した。

10

【 0 0 2 4 】

( 各植物体からの - メチレン - - ブチロラクトン類の生成及び抽出 )

上記で調製した抽出液 4 9 0  $\mu$  l を量りとり、1 M K P B ( p H 7 . 0 ) 5 m l、球根粗酵素液 ( 1 , 0 6 3 U / m l ) 5 m l または H<sub>2</sub>O を各々添加し、常温にて 2 時間静置した。

このものに NaCl を飽和量添加し、- メチレン - - ブチロラクトンをトルエン ( 2 0 0  $\mu$  l 2 回、1 0 0  $\mu$  l 1 回 ) にて抽出し、HPLC にて - メチレン - - ブチロラクトンの濃度を求めた。

酵素変換により生成した - メチレン - - ブチロラクトンの濃度及び抽出効率を表 6 に示す。

20

【 表 6 】

植物体	濃度(mM)	抽出効率(%)
ラピッドスター	2.22	91.9
マリレーン	1.36	89.1
エラ	2.35	90.4
セリバオウレン	4.77	92.2

【 実施例 1 3 】

30

【 0 0 2 5 】

紫水晶の各組織 ( 球根、葉、茎、根、薬、花弁、雌しべ ) 1 0 0 m g ( 生重量、但し球根は 2 5 0 m g、薬は 5 0 m g ) に 1 m l のメタノールを加え、ビーズショッカー ( 2 5 0 0 r p m、4 、 3 0 秒 × 1 0 ) で破碎し、綿ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、1 m l の冷水 ( 4 ) に再溶解して抽出液とした。

抽出液 4 9 0  $\mu$  l を量りとり、1 M K P B ( p H 7 . 0 ) 5  $\mu$  l、球根粗酵素液 ( 1 , 0 6 3 U / m l ) 5  $\mu$  l を添加し、常温にて 2 時間静置した。

このものに NaCl を飽和量添加し、- メチレン - - ブチロラクトンをトルエン 2 0 0  $\mu$  l で 2 回、1 0 0  $\mu$  l で 1 回溶媒抽出した。

残りの水層より、- メチレン - - ヒドロキシ - - ブチロラクトンをブタノール : アセトン = 1 : 1 にて 2 0 0  $\mu$  l で 2 回、1 0 0  $\mu$  l で 1 回溶媒抽出した。

40

4 つの段階 ( 抽出直後、2 時間反応後、トルエン抽出後の水層、混合溶媒抽出後の水層 ) に分け、HPLC 分析を行った。

なお、HPLC 分析条件は実施例 2 と同条件である。

分析結果を表 7 に示す。

ここで濃度は、酵素反応液における両化合物の濃度を、変換率は、チューリップシド - A 又は B が - メチレン - - ブチロラクトン又は - メチレン - - ヒドロキシ - - ブチロラクトンに変換した割合を示し、抽出効率は酵素反応液から溶媒抽出できた割合を示す。

【表 7】

組織	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン			$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン		
	濃度 (mM)	変換率 (%)	抽出効率 (%)	濃度 (mM)	変換率 (%)	抽出効率 (%)
根	1.38	97.5	93.4	2.43	> 99.5	83.2
球根	3.64	92.7	87.2	<0.01	N.D.	N.D.
茎	2.73	91.1	91.5	0.16	67.1	90.9
葉	3.99	89.7	89.9	2.29	> 99.5	82.9
花卉	2.26	96.2	91.8	3.47	88.2	80.8
薬	0.4	92.8	> 99.5	5.37	80.2	72.3
雌しべ	10.4	85.4	91.0	4.33	> 99.5	85.4

(N. D. 測定できず)

## 【0026】

これにより、植物体の各組織からの破碎抽出にメタノールを用いても  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類を効率よく得られることが明らかになった。

## 【実施例 14】

## 【0027】

チューリップの各品種（アーリーグローリー、ありさ、アルビノ、ウエディングベールエンパイアステート、カーニバルデリオ、黄小町、クインオブナイト、グリーンランド、ゲリットファンデルボルク、ゴールドエンパイアステート、ゴールドメロディー、コンプリメント、白雪姫、紫雲、ジュディレスター、スターファイター、デザインインプレッション、初桜、ハミルトン、春乙女、春万葉、パレリーナ、ピンクダイヤモンド、ピンククレディパーロット、ファンシーフリル、フライアウェイ、フランソワーズ、紫水晶、フレーミングパーロット、メセアポゼラン、ラリベラ、ランバダ、レーンファンデルマーク、レッドウィング、レッドファボリット、ワシントン）の花弁 100 mg（生重量）に 1 mL のメタノールを加え、ピーズショッカー（2500 rpm、4 分、30 秒 × 10）で破碎し、綿ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、1 mL の冷水（4℃）に再溶解して抽出液とした。

上記、抽出液 490  $\mu$ l を量りとり、実施例 13 と同様に反応を行い、抽出、定量を行った結果を表 8 に示す。

なお、濃度、変換率、抽出効率の定義は、実施例 13 と同様である。

10

20

30

【表 8】

品 種	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン			$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン		
	濃度 (mM)	変換率 (%)	抽出効率 (%)	濃度 (mM)	変換率 (%)	抽出効率 (%)
アーリーグローリー	1.7	94.1	92.3	3.3	85.8	88.2
ありさ	2.7	97.8	90.2	7.16	96.8	90.3
アルビノ	1.06	88.7	90.6	2.35	92.8	91.2
ウエディングベール	3.03	97.4	93.6	2.19	97.7	91.1
エンパイヤステート	0.25	> 99.5	93.3	3.24	93.8	82.8
カーニバルデリオ	0.92	95.7	91.3	2.65	95.1	89.3
黄小町	0.71	98.6	93.8	0.76	85.0	88.8
クインオブナイト	1.77	76.5	91.9	3.53	97.5	80.4
グリーンランド	5.73	97.2	90.6	10.0	94.7	89.6
ゲリットファンデルボルク	0.72	98.6	92.7	2.45	83.7	88.8
ゴールデンエンパイヤステート	0.13	> 99.5	86.3	2.55	98.5	81.3
ゴールデンメロディー	1.23	96.4	92.0	3.29	90.8	80.9
コンプリメント	0.5	82.0	95.8	5.30	96.6	82.6
紫雲	1.83	89.0	91.0	3.96	85.1	79.0
白雪姫	0.06	0.0	26.8	3.12	78.3	79.9
ジュディレスター	0.24	81.1	81.9	2.90	89.0	83.9
スターファイター	0.96	96.9	97.1	7.35	93.9	90.6
デザインインプレッション	<0.01	0	0	2.46	87.0	87.3
初桜	0.48	97.9	97.2	3.27	95.1	90.7
ハミルトン	2.28	93.4	95.0	2.12	92.9	80.5
春乙女	2.81	99.6	93.6	4.91	96.3	84.2
春万葉	1.7	91.8	91.8	4.35	93.6	85.3
バレリーナ	1.41	99.3	92.8	8.44	95.3	90.2
ピンクダイヤモンド	0.6	93.3	90.9	5.46	89.0	90.6
ピンクレディパーロット	3.56	91.6	94.8	7.84	92.6	91.1
ファンシーフリル	1.48	89.2	98.6	3.99	97.5	88.7
フライアウェイ	0.36	83.3	92.9	5.02	96.4	91.1
フランソワーズ	<0.01	0	0	1.83	98.9	89.8
フレーミングパーロット	2.83	95.8	96.6	8.52	98.5	88.0
紫水晶	2.2	93.5	92.5	4.78	92.9	82.8
メセアボゼラン	1.04	85.1	89.1	3.68	77	75.8
ラリベラ	<0.01	0	0	2.23	97.8	91.6
ランバダ	2.93	97.6	94.5	6.21	99.5	93.2
レーンファンデルマーク	5.08	94.5	92.6	3.03	99.7	89.6
レッドウイング	0.911	96.5	93.8	1.93	92.7	89.9
レッドファボリット	<0.01	0	0	2.16	97.7	90.3
ワシントン	1.7	88.3	92.9	8.62	86.4	79.9

## 【0028】

これにより、チューリップの品種によらずに  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類が得られることが明らかになった。

## 【実施例 15】

## 【0029】

シジミバナ (*Spiraea prunifolia*)、ユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、ピンクユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*)、カタクリ (*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカタクリ (*Erythronium grandiflorum* Pursh.) 植物体 50 mg (乾燥重量) に冷メタノール 1 ml を加え、ビーズショッカー (2500 rpm、4、30 秒 × 10) で破碎し、綿ろ過後、ろ液を集め減圧濃縮し、ろ液と同量の冷水に再溶解して抽出液とした。

植物抽出液 490  $\mu$ l を量りとり、実施例 13 と同様に反応を行い、抽出、定量を行った結果を表 9 に示す。

なお、濃度、抽出効率の定義は、実施例 13 と同様である。

10

20

30

40

【表 9】

植物種	$\alpha$ -メチレン - $\gamma$ -ブチロラクトン		$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ - $\gamma$ -ブチロラクトン	
	濃度 (mM)	抽出効率 (%)	濃度 (mM)	抽出効率 (%)
シジミバナ	0.08	76.9	1.45	76.8
ユキヤナギ	1.08	67.7	1.19	74.1
ピンクユキヤナギ	0.78	69.8	0.81	84.9
カタクリ	3.16	71.1	0.21	93.0
キバナカタクリ	6.71	71.2	0.61	29.7

10

## 【0030】

これにより、植物組織中にチューリップシド - 及びその類縁体が存在すると、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトンを得ることができることも明らかになった。

## 【実施例 16】

## 【0031】

実施例 10 で調製した紫水晶花卉抽出液 490  $\mu$ l に、10 mM KPB (pH 7.0) 5  $\mu$ l、実施例 1 にて得られた粗酵素液 (580 U/ml) 5  $\mu$ l を各々添加し、常温にて 2 時間静置した。

このものに NaCl を飽和量添加、無添加下で、各種溶媒にて 200  $\mu$ l で各回数抽出することで、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン類を溶媒抽出した。

HPLC 分析にて抽出効率を算出した結果を表 10 に示す。

20

## 【表 10】

溶媒	NaCl 添加	抽出 回数	抽出効率 (%)	
			$\alpha$ -メチレン - $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ - $\gamma$ -ブチロラクトン
トルエン	飽和	3	95.7	14.3
1,4-ビス(トリフルオロメチル) ベンゼン	飽和	3	89.2	18.6
ヘキサフルオロベンゼン	飽和	3	90.6	18.2
(トリフルオロメトキシ)ベンゼン	飽和	3	90.8	16.3
ベンゾトリフルオリド	飽和	3	94.0	15.3
トルエン	無添加	3	75.0	5.4
トルエン	無添加	5	89.9	3.0
ベンゾトリフルオリド	無添加	3	84.7	<0.01
ベンゾトリフルオリド	無添加	5	96.4	1.3

30

40

## 【実施例 17】

## 【0032】

実施例 13 と同様の酵素反応後、ベンゾトリフルオリドにて  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンを抽出 (NaCl 無添加、200  $\mu$ l  $\times$  5 回抽出) した残りの水層に NaCl を飽和量添加し、2, 2, 2-トリフルオロエタノールまたは 2, 2, 3, 3-テトラフル

50

オロ - 1 - プロパノールにて 200  $\mu$ l で 2 回、100  $\mu$ l で 1 回溶媒抽出したところ、  
 - メチレン - - ヒドロキシ - - ブチロラク톤を 94.7 及び 95.8 % の効率で  
 抽出できた。

【実施例 18】

【0033】

アルストロメリア (*Alstromeria* spp.) 植物体 200 mg (乾燥重量)  
 ) を乳鉢にて破碎し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 7.0) を 15 ml  
 加えて低温室にて 1 時間攪拌した。

ガーゼにて組織を濾別後、遠心分離 (21,500  $\times$  g, 15 min, 4 ) した上清  
 に 10 mM KPB にて平衡化した DEAE-Toyopearl 1 g を加え、低温室  
 にて 1.5 時間攪拌した。

10

懸濁液を 10 ml の注射筒に流し入れゲルを回収した。

このゲルより各 5 ml の 10 mM KPB、100 mM KPB、100 mM KPB  
 (0.1 M NaCl) にて順次酵素を溶出し、活性のあるフラクションを回収後、セン  
 トリプレップ (4,000  $\times$  g, 40 min, 4 ) 及びセトリコン (10,000  $\times$   
 g, 20 min, 4 ) にて濃縮した。

これにより、8.9 U/mg の比活性を有する「エラ」粗酵素約 5.6 U、7.5 U/  
 mg の比活性を有する「マリレーン」粗酵素約 2.3 U、3.5 U/mg の比活性を有  
 する「ラピッドスター」粗酵素約 1.2 U を得ることができた。

20

【実施例 19】

【0034】

カタクリ (*Erythronium japonicum* Decne.)、キバナカ  
 タクリ (*Erythronium grandiflorum* Pursh.) 植物体 5  
 0 mg (乾燥重量) に 1 ml の 10 mM KPB を加え、ビーズショッカー (2500 r  
 pm、4 、30 秒  $\times$  10 回) で破碎抽出した。

綿ろ過後、得られた酵素液をマイクロコン (8,000  $\times$  g, 20 min, 4 ) にて  
 濃縮した。

これにより、85.3 U/mg の比活性を有するカタクリ粗酵素約 4.9 U、126 U  
 /mg の比活性を有するキバナカタクリ粗酵素約 7.7 U を得ることができた。

30

【実施例 20】

【0035】

実施例 10 に用いた抽出液 490  $\mu$ l を量りとり、1 M KPB (pH 7.0) 5  $\mu$ l  
 、各植物由来粗酵素液 (アルストロメリア「エラ」112 U/ml、アルストロメリア「  
 マリレーン」47 U/ml、アルストロメリア「ラピッドスター」24 U/ml、カタク  
 リ 92 U/ml、キバナカタクリ 153 U/ml) 5  $\mu$ l を各々添加し、常温にて 2 時間  
 静置した。

このものに NaCl を飽和量添加し、-メチレン- -ブチロラク톤をトルエン (200  $\mu$ l 2 回、100  $\mu$ l 1 回)、  
 -メチレン- -ヒドロキシ- -ブチロラク  
 トンをブタノール/アセトン = 1/1 (200  $\mu$ l 2 回、100  $\mu$ l 1 回) にて分  
 別抽出し、HPLC にて -メチレン- -ブチロラクトン及び -メチレン- -ヒド  
 ロキシ- -ブチロラクトンの濃度を求めた。

40

酵素による変換率と抽出効率を表 11 に示す。

【表 1 1】

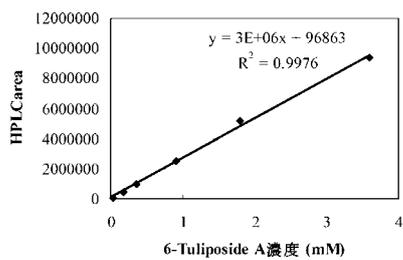
酵素由来	抽出効率(%)		抽出効率(%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトン	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン
エラ	41.1	0	97.6	0
マリレーン	17.4	0	98.8	0
ラピッドスター	8.86	0	97.7	0
カタクリ	>99.9	42.2	94.6	84.3
キバナカタクリ	>99.9	42.3	95.8	88.3

10

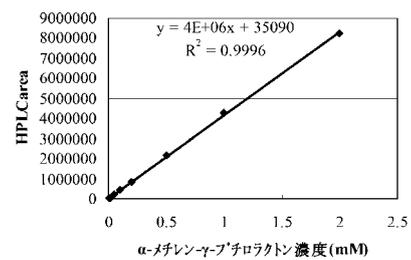
## 【 0 0 3 6 】

これにより、チューリップシド変換酵素はチューリップのみならず、アルストロメリア、カタクリ、キバナカタクリ等の植物組織にも存在することが明らかになった。

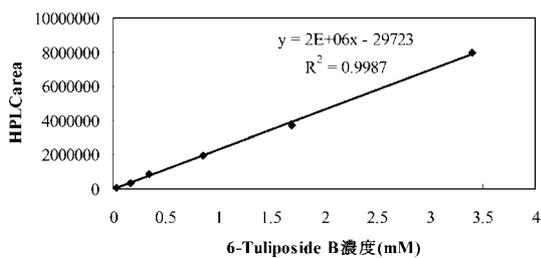
【 図 1 】



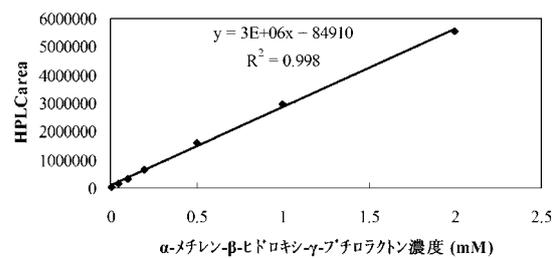
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



【手続補正書】

【提出日】平成21年8月4日(2009.8.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

実施例10に用いた抽出液490 $\mu$ lを量りとり、1M KPB(pH7.0)5 $\mu$ l、各植物由来粗酵素液(アルストロメリア「エラ」112U/ml、アルストロメリア「マリレーン」47U/ml、アルストロメリア「ラピッドスター」24U/ml、カタクリ92U/ml、キバナカタクリ153U/ml)5 $\mu$ lを各々添加し、常温にて2時間静置した。

このものにNaClを飽和量添加し、 $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラク톤をトルエン(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)、 $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラク톤をブタノール/アセトン=1/1(200 $\mu$ l 2回、100 $\mu$ l 1回)にて分別抽出し、HPLCにて $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラク톤及び $\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラク톤の濃度を求めた。

酵素による変換率と抽出効率を表11に示す。

【表11】

酵素由来	変換率(%)		抽出効率(%)	
	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラク톤	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラク톤	$\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラク톤	$\alpha$ -メチレン- $\beta$ -ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラク톤
エラ	41.1	0	97.6	0
マリレーン	17.4	0	98.8	0
ラピッドスター	8.86	0	97.7	0
カタクリ	>99.9	42.2	94.6	84.3
キバナカタクリ	>99.9	42.3	95.8	88.3

---

フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 幸生

富山県射水市黒河5 1 8 0 富山県立大学内

(72)発明者 荘司 和明

富山県富山市吉岡1 1 2 4 - 1 富山県農林水産総合技術センター内

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD13 EE10 FF11E LL05

4B064 AE45 BH20 CA21 CC21 CD09 DA02

4C037 JA03