

(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2014-239651

(P2014-239651A)

(43) 公開日 平成26年12月25日(2014.12.25)

(51) Int.Cl.
C12P 19/12 (2006.01)F1
C12P 19/12テーマコード (参考)
4B064

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2013-122333 (P2013-122333)	(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
(22) 出願日	平成25年6月11日 (2013.6.11)	(71) 出願人	501203344 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 茨城県つくば市観音台3-1-1
		(74) 代理人	100080089 弁理士 牛木 護
		(74) 代理人	100161665 弁理士 高橋 知之
		(72) 発明者	中井 博之 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地 国立大学法人新潟大学 農学部内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β -マンノシドの製造方法

(57) 【要約】

【課題】安価でかつ簡便に β -マンノシドを製造する方法を提供する。

【解決手段】リン酸、 α -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.9)、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.8)、 α -ホスホマンノムターゼ (EC 5.4.2.8) 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) β -マンノシドを可逆的に加リン酸分解して β -マンノース-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、 β -マンノシドの製造方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リン酸、 α -D-ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.9)、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.8)、 α -D-ホスホマンノムターゼ (EC 5.4.2.8) 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 -D-グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに

(ii) α -D-マンノシドを可逆的に加リン酸分解して α -D-マンノース-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 -D-マンノシドの製造方法。

10

【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 -D-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オリゴ糖ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) 及び/若しくは α -D-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オリゴ糖ホスホリラーゼ及び/若しくは α -D-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。

20

【請求項 3】

(ii) の α -D-マンノシドを可逆的に加リン酸分解して α -D-マンノース-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、マンノシル- α -D-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼと N-アセチルグルコサミン及び/若しくは N,N'-ジアセチルキトビオースとの組合せ、 α -D-1,2-マンノビオースホスホリラーゼとマンノース及び/若しくはフルクトースとの組合せ、マンノシル- α -D-1,4-グルコースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、並びに α -D-1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼとマンノース及び/若しくは α -D-1,4-マンノオリゴ糖との組合せ、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。

30

【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 -D-マンノシドを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の鎖といわれ、生体認識（細胞接着・抗原抗体反応・情報伝達・ウイルス感染など）の重要性について近年注目を集めており、急速にその機能解明が進められている。その中で、アスパラギン結合型糖鎖やリポ多糖のコア構造である α -D-マンノシドは、細胞分化、老化、免疫応答といった生命現象や、癌、ウイルス感染、炎症などの疾患に深く関与していることが知られており、分子レベルでの糖鎖機能の解明、さらには糖タンパク質製剤・免疫賦活剤・病原性ウイルス感染阻害剤などとしての糖鎖医療産業界への応用が期待されている。

40

【0003】

生体内での発現量が微量な α -D-マンノシドの調製は、現在煩雑な多段階反応を要する有機合成法に頼らざるを得ず（特許文献 1）、効率的な大量調製が困難であるため、非常に

50

高額であるという問題点から糖鎖工学研究分野や糖鎖医療産業の進展を妨げている。

【0004】

- マンノ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、- マンノース-1-リン酸を原料として、- マンノシドを合成可能であることが示唆されているが(特許文献2及び3、非特許文献1)、- マンノース-1-リン酸が高価であるため、コストの問題から实用性を欠いていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第4778315号明細書

10

【特許文献2】特願2012-190474号明細書

【特許文献3】特願2012-203891号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kawahara R.ら、The Journal of Biological Chemistry 287(50):42389-42399(2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

20

したがって、安価でかつ簡便に- マンノシドを製造する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】

【0008】

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- マンノシドを安価に製造する方法を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明は以下を包含する。

(1)リン酸、- ホスホグルコムターゼ(EC 5.4.2.2)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.9)、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.8)、- ホスホマンノムターゼ(EC 5.4.2.8)及びそれらの補因子の存在下で、

30

(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)- マンノシドを可逆的に加リン酸分解して- マンノース-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、- マンノシドの製造方法。

【0010】

(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- 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、セロピオースとセロピ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、上記(1)に記載の方法。

40

50

【0011】

(3)(ii)の - マンノシドを可逆的に加リン酸分解して - マンノース - 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、マンノシル - - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンホスホリラーゼとN - アセチルグルコサミン及び/若しくはN, N' - ジアセチルキトビオースとの組合せ、 - 1, 2 - マンノビオースホスホリラーゼとマンノース及び/若しくはフルクトースとの組合せ、マンノシル - - 1, 4 - グルコースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、並びに - 1, 4 - マンノオリゴ糖ホスホリラーゼとマンノース及び/若しくは - 1, 4 - マンノオリゴ糖との組合せ、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。

10

【0012】

(4)酵素が担体に固定化されている、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、安価でかつ簡便に - マンノシドを製造する方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、スクロースからのマンノシル - - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンの製造の概略図を示す。

【図2】図2は、スクロースからの - 1, 2 - マンノビオースの製造の概略図を示す。

20

【図3】図3は、スクロースからのマンノシル - - 1, 4 - グルコースの製造の概略図を示す。

【図4】図4は、セロビオースからのマンノシル - - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンの製造の概略図を示す。

【図5】図5は、セロビオースからの - 1, 2 - マンノビオースの製造の概略図を示す。

【図6】図6は、セロビオースからのマンノシル - - 1, 4 - グルコースの製造の概略図を示す。

【図7】図7は、デンプンからのマンノシル - - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンの製造の概略図を示す。

30

【図8】図8は、デンプンからの - 1, 2 - マンノビオースの製造の概略図を示す。

【図9】図9は、デンプンからのマンノシル - - 1, 4 - グルコースの製造の概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、酵素法による、 - マンノシドの製造方法に関する。

【0016】

本発明の酵素法は、主に以下の3つの酵素反応からなる：(1)糖質原料の加リン酸分解反応；(2) - グルコース - 1 - リン酸の - マンノース - 1 - リン酸への変換反応、(3)糖アクセプターからの - マンノシドの合成反応。

40

【0017】

(1)の糖質原料の加リン酸分解反応は、上記要素(i)に含まれる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。上記要素(i)で用いられる糖質原料と係る酵素の組合せは、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、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロビ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ビ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

50

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、あるいは二つ以上の組合せを含む。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、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロビ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か一つ、あるいは二つ以上の組合せであり、最も好ましい組合せは、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、好ましくは約 1 ~ 約 1000 g / L であり、より好ましくは約 10 ~ 約 1000 g / L である。 10

【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、その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料 1 g あたり約 0.1 mg ~ 約 1000 mg で使用し得る。

【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、好ましくは約 0.1 mM ~ 約 1000 mM、より好ましくは約 1 mM ~ 約 100 mM 程度である。 20

【0021】

上記(2)の - グルコース - 1 - リン酸の - マンノース - 1 - リン酸への変換反応は、 - ホスホグルコムターゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 - ホスホマンノ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 - リン酸をフルクトース - 6 - リン酸に、フルクトース - 6 - リン酸をマンノース - 6 - リン酸に、マンノース - 6 - リン酸を - マンノース - 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、その酵素の使用量(活性で表す)も特に限定されないが、例えば糖質原料 1 g あたり約 1 mg ~ 約 1000 mg で使用し得る。補因子の使用濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは約 0.01 mM ~ 約 100 mM、より好ましくは約 0.02 mM ~ 約 50 mM である。 30

【0023】

上記(3)の糖アクセプターからの - マンノシドの合成反応は、 - マンノシドを可逆的に加リン酸分解して - マンノース - 1 - リン酸を生じる酵素(- マンノ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(2)の - グルコース - 1 - リン酸の - マンノース - 1 - リン酸への変換反応によって生じた - マンノース - 1 - リン酸から - マンノシドを合成する反応である。出発原料として用いる糖アクセプターの濃度は特に限定されないが、好ましくは約 10 mM ~ 約 2 M、より好ましくは約 100 mM ~ 約 1 M である。 - マンノシドホスホリラーゼは特に限定されるものではなく、またいかなる起源の酵素を用いることも可能である。好ましくはマンノシル - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、 - 1, 2 - マンノビオースホスホリラーゼ、マンノシル - 1, 4 - グルコースホスホリラーゼ、 - 1, 4 - マンノオリゴ糖ホスホリラーゼを用いる。 - マンノシドホスホリラーゼ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。 - マンノシドホスホリラーゼの使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料 1 g あたり約 0.1 mg ~ 約 1000 mg で使用し得る。 40 50

【0024】

上述した本発明の酵素は、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いずれの酵素であってもよく、また組換え酵素であってもよい。そのような酵素は市販のものを使用し得るか、または当業者に周知の方法、例えば天然から精製してもよいし、あるいは遺伝子組換え法によって取得し得る。例えば、遺伝子組換えによる方法では、本発明の酵素は、文献に記載されている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。

10

【0025】

本発明の酵素はまた、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、本発明の上記反応を妨害する因子を含むべきではない。

20

【0026】

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20～60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。

【0027】

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クターを用いて簡便かつ容易に実施できる点にある。

30

【0028】

本発明により得られるマンノ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マンノシドは、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、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。

【0029】

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。

40

【0030】

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】

【0031】

スクロースを糖質原料としてマンノシル - 1, 4 - N - アセチルグルコサミンへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度0.25Mスクロース、0.25M N - アセチルグルコサミン、10mM塩化マグネシウム、25mMリン酸 - ナトリ

50

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、そこにスクロースホスホリラーゼ、マンノシル-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、-ホスホマンノムターゼを1ミリリットル当たり0.033 mg、0.083 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で120時間反応を行った。反応を0.13 mLの6N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、ゲル濾過によりマンノシル-1, 4-N-アセチルグルコサミン画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル-1, 4-N-アセチルグルコサミン標品20 mgを得た。

10

【実施例2】

【0032】

スクロースを糖質原料として-1, 2-マンノピオ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 スクロース、0.25 M マンノース、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、そこにスクロースホスホリラーゼ、-1, 2-マンノピオースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、-ホスホマンノムターゼを1ミリリットル当たり0.033 mg、0.050 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で120時間反応を行った。反応を0.13 mLの6N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-1, 2-マンノピオース画分を単離、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-1, 2-マンノピオース標品39 mgを得た。

20

【実施例3】

【0033】

スクロースを糖質原料としてマンノシル-1, 4-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0.25 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 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、そこにスクロースホスホリラーゼ、マンノシル-1, 4-グルコースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、-ホスホマンノムターゼ、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、0.76 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg、0.33 mg 加え、30 で120時間反応を行った。反応を0.13 mLの6N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、ゲル濾過によりマンノシル-1, 4-グルコース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル-1, 4-グルコース標品28 mgを得た。

30

40

【実施例4】

【0034】

セロピオースを糖質原料としてマンノシル-1, 4-N-アセチルグルコサミン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 セロピオース、0.25 M N-アセチルグルコサミン、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、そこにセロピオースホスホリラーゼ、マンノシル-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、グルコース-6-リン

50

酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 α -ホスホマンノムターゼを 1 ミリリットル当たり 2.3 mg、0.083 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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 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、ゲル濾過によりマンノシル - 1,4-N-アセチルグルコサミン画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル - 1,4-N-アセチルグルコサミン標品 12 mg を得た。

【実施例 5】

【0035】

セロビオースを糖質原料として α -1,2-マンノビオ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、0.25 M マンノース、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、 α -1,2-マンノビオースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 α -ホスホマンノムターゼを 1 ミリリットル当たり 2.3 mg、0.050 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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 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 α -1,2-マンノ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 α -1,2-マンノビオース標品 15 mg を得た。

【実施例 6】

【0036】

セロビオースを糖質原料としてマンノシル - 1,4-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 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、マンノシル - 1,4-グルコースホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 α -ホスホマンノムターゼを 1 ミリリットル当たり 0.083 mg、0.033 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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 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、ゲル濾過によりマンノシル - 1,4-グルコース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル - 1,4-グルコース標品 46 mg を得た。

【実施例 7】

【0037】

デンプンを糖質原料としてマンノシル - 1,4-N-アセチルグルコサミン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、0.25 M N-アセチルグルコサミン、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、そこにホスホリラーゼ、マンノシル - 1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、 α -ホスホグルコムターゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 α -ホスホマンノムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.083 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg、0.3 μ g 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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、

10

20

30

40

50

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、ゲル濾過によりマンノシル - 1, 4 - N - アセチルグルコサミン画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル - 1, 4 - N - アセチルグルコサミン標品 6 mg を得た。

【実施例 8】

【0038】

デンプンを糖質原料として - 1, 2 - マンノピオ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、0.25 M マンノース、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、
- 1, 2 - マンノピオースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、グルコース - 6
- リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 - ホスホマンノムター
ゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.050 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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、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 - 1, 2 - マンノピオース画分を単離、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 - 1, 2 - マンノピオース標品 11 mg を得た。

10

【実施例 9】

【0039】

デンプンを糖質原料としてマンノシル - 1, 4 - 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、0.25 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、
マンノシル - 1, 4 - グルコースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、
グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、マンノース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 - ホス
ホマンノムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.76 mg、0.34 mg、0.37 mg、0.23 mg、2.4 mg、0.33 μg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.13 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、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
よりマンノシル - 1, 4 - グルコース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポ
レーターで濃縮し、凍結乾燥によりマンノシル - 1, 4 - グルコース標品 11 mg を
得た。

20

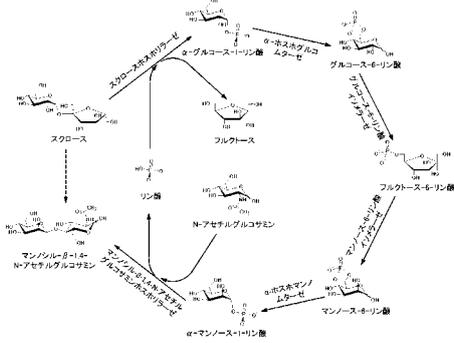
30

【産業上の利用可能性】

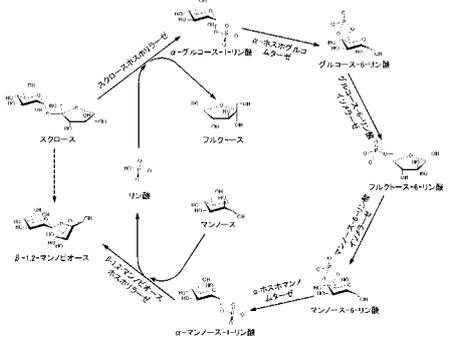
【0040】

以上のように本発明は、医薬品・食品・研究試薬産業で利用できる。

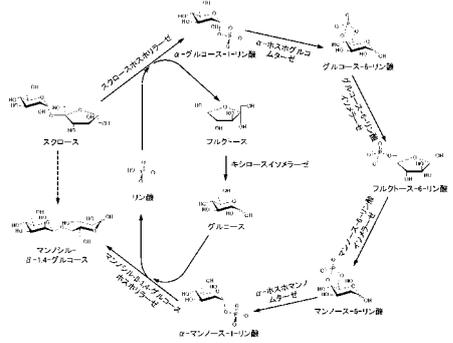
【 図 1 】



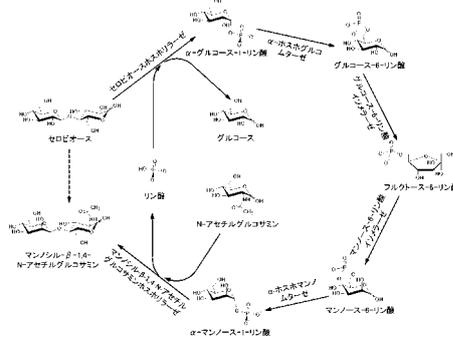
【 図 2 】



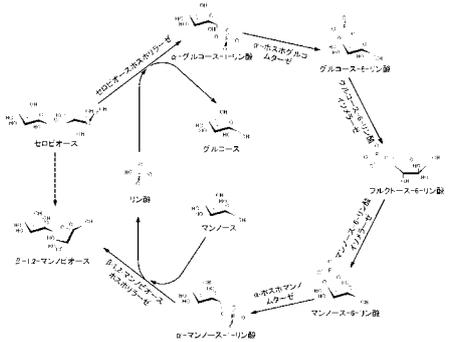
【 図 3 】



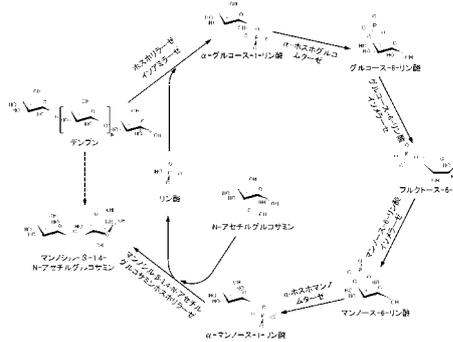
【 図 4 】



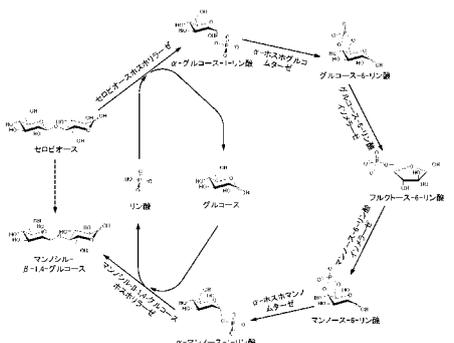
【 図 5 】



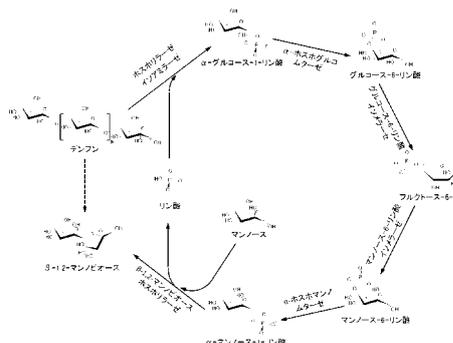
【 図 7 】



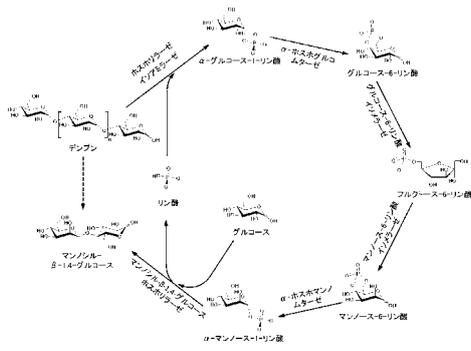
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(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 国立大学法人新潟大学 農学部内

(72)発明者 大坪 研一

新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8 0 5 0 番地 国立大学法人新潟大学 農学部内

(72)発明者 北岡 本光

茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 1 2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研
究所内

Fターム(参考) 4B064 AF03 AF21 CA21 DA01 DA10