

(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
2012 年 11 月 1 日(01.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/147905 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/061324
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 27 日(27.04.2012)
- (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 2011-100940 2011 年 4 月 28 日(28.04.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 一新 (TANAKA, Isshin). 新家 一男 (SHINYA, Kazuo). 高木 基樹 (TAKAGI, Motoki).
- (74) 代理人: 石橋 公樹, 外 (ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

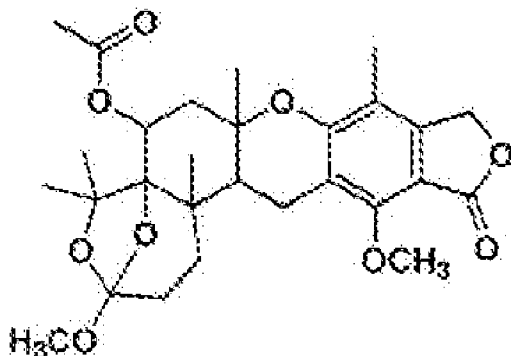
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: PROMOTER ACTIVITY ENHANCER

(54) 発明の名称: プロモーター活性促進剤

(I)



(57) Abstract: Provided is a promoter activity enhancer. A promoter activity enhancer comprising a compound represented by formula (I).

(57) 要約: プロモーター活性促進剤を提供する。下記式 (I) で表わされる化合物を含有してなるプロモーター活性促進剤。

WO 2012/147905 A1



-
- | | |
|---|----------------------------------|
| — 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii) | — 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a) |
|---|----------------------------------|

明 細 書

発明の名称：プロモーター活性促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子のプロモーター活性を促進する作用を有する化合物又はその塩、該化合物の製造方法、該化合物を含有してなる遺伝子プロモーター活性促進剤、該化合物を含有してなる幹細胞誘導剤、該化合物を生産する微生物等に関する。

背景技術

[0002] 山中らは、Oct 3／4、Sox 2、Klf 4、および、c-Mycの各遺伝子をヒト体細胞に導入することにより、ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：以下「iPS細胞」という。）を作製した（非特許文献1）。

[0003] 山中らのiPS細胞誘導法はレトロウイルスを用いて外来遺伝子を細胞に導入する工程を含むため、該iPS細胞を特定の細胞に分化させた後も、該遺伝子は細胞内に残って何らかの作用を発揮し、細胞移植等の後における該遺伝子の作用が懸念される。

[0004] 細胞内に取り込まれ易い低分子化合物で体細胞を刺激し、遺伝子導入せずにiPS細胞を作製する技術の確立が望まれていた。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：K. タカハシ他、セル、131巻、861－872ページ、2007年刊行（Takahashi, K., et al., Cell, 131, pp861-872, 2007）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

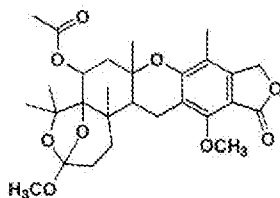
[0006] 本発明者らは、Klf 4等の遺伝子のプロモーター活性を促進する作用を有する化合物を見出すべく鋭意探索を行なった結果、微生物培養物中に該活性を有する化合物を見出し、本発明を完成した。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、特許請求の範囲

(1) 下記式(1)

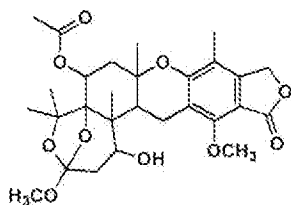
[0008] [化1]



で表わされる化合物を含有してなるプロモーター活性促進剤、

(2) 下記式(11)

[0009] [化2]

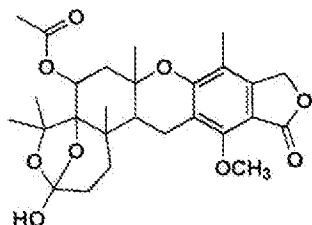


で表わされる化合物を含有してなるプロモーター活性促進剤、

(3)

下記式(111)

[0010] [化3]



で表わされる化合物又はその塩を含有してなるプロモーター活性促進剤、

(4) 下記の物理化学的性状を有する化合物又はその塩を含有してなるプロモーター活性促進剤：

1) 物質の性状：無色不定形の固体

2) 分子式： $C_{27}H_{34}O_9$

3) 高分解能エレクトロスプレーイオン化マスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：503.2276

計算値：503.2281

4) 紫外吸収スペクトル：メタノール中で測定した紫外吸収スペクトルは、次のとおり極大吸収を示す：221 nm (ϵ 34800)、266 (ϵ 18400)。

5) 旋光度：メタノール中で測定した旋光度は、以下に示す値を示す：

$[\alpha]_D^{25}$ ： -103° (c 0.1)

6) 赤外吸収スペクトル：クロロホルム中で測定した赤外吸収スペクトルは以下のとおり極大吸収を示す：

3420, 1743, 1612 cm^{-1}

[0011] 7) 1H -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でクロロホルムのシグナルを7.26 ppmとして測定した、 1H -核磁気共鳴スペクトルは、以下に示す通りである：

0.98 (3H, s)、1.21 (3H, s)、1.30 (3H, s)、1.52 (3H, s)、1.79 (1H, m)、1.91 (1H, m)、1.93 (1H, m)、1.93 (1H, m)、1.98 (3H, s)、2.05 (3H, s)、2.15 (1H, dd, $J=4.4, 15.7$ Hz)、2.41 (1H, d, $J=8.1$ Hz)、2.55 (1H, dd, $J=1.5, 16.1$ Hz)、2.85 (1H, dd, $H=8.1, 18.5$ Hz)、2.96 (1H, d, $J=18.5$ Hz)、4.11 (3H, s)、5.08 (1H, br. s)、5.11 (2H, s) ppm

8) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でクロロホルムのシグナルを77.0 ppmとして測定した、 ^{13}C -核磁気共鳴スペクトルは、以下に示すとおりである：10.6 (q)、18.0 (t)、18.1 (d)、

21. 2 (q)、25. 5 (q)、27. 5 (q)、29. 4 (q)、29. 7 (t)、31. 0 (t)、35. 4 (d)、38. 0 (t)、40. 2 (s)、62. 0 (q)、68. 2 (t)、70. 8 (d)、75. 6 (s)、85. 1 (s)、86. 2 (s)、107. 4 (s)、113. 9 (s)、115. 7 (s)、117. 8 (s)、145. 6 (s)、155. 4 (s)、157. 9 (s)、169. 4 (s)、169. 5 (s)、

[0012] (5) プロモーター活性促進が i P S 細胞化因子遺伝子のプロモーター活性促進である、(1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載のプロモーター活性促進剤、

(6) i P S 細胞化因子遺伝子が、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、n - M y c、N A N O G、L I N 2 8、h T E R T 及び S V 4 0 L a r g e T からなる群から選択される一つ又は二つ以上の遺伝子である、(5) に記載のプロモーター活性促進剤、

[0013] (7) i P S 細胞化因子遺伝子が、O c t 3 / 4、S o x 2 及び K l f 4 である、(5) 又は (6) に記載のプロモーター活性促進剤、

(8) アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する、(1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の化合物の生産菌を培養する工程、並びに、その培養物より (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の化合物を採取する工程を含んでなる、(1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の化合物の製造方法、

(9) アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する、(1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の化合物の生産菌がアスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) S A N K 1 1 1 0 9 株 (F E R M B P - 1 1 2 6 8) 株である、(8) に記載の製造方法、

(10) アスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) S A N K 1 1 1 0 9 株 (F E R M B P - 1 1 2 6 8) 株、

(11) (1) もしくは (2) 記載の化合物、又は、(3) もしくは (4) 又はその塩と、遺伝子プロモーターとを接触させる工程を含んでなる、プロモーター活性促進方法、

(12) 遺伝子が iPS 細胞化因子遺伝子である、(11) に記載の方法、
[0014] (13) iPS 細胞化因子遺伝子が、Oct 3/4、Sox 2、Klf 4、
c-Myc、n-Myc、NANOG、LIN28、hTERT 及び SV40 Large T、Tbx 1、L-Myc 及び UTF 1 からなる群から選
択される一つ又は二つ以上の遺伝子である、(12) に記載の方法、及び、
(14) iPS 細胞化因子遺伝子が、Oct 3/4、Sox 2 及び Klf 4
である、(12) 又は (13) に記載の方法、
等に関する。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、各種遺伝子のプロモーター活性を促進することにより、
安全な幹細胞を効率よく提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 図1は、Klf 4 プロモーター活性に及ぼすアウスタリド (Austalide) 類縁物質の影響を示した図で、DMSO 処理した細胞のルシフェラーゼ活性の値を1として、それぞれの相対活性を算出してプロットしたものである。

[図2] 図2は、Oct 4 プロモーター活性に及ぼすアウスタリド (Austalide) 類縁物質の影響を示した図で、DMSO 処理した細胞のルシフェラーゼ活性の値を1として、それぞれの相対活性を算出してプロットしたものである。

[図3] 図3は、Sox 2 プロモーター活性に及ぼすアウスタリド (Austalide) 類縁物質の影響を示した図で、DMSO 処理した細胞のルシフェラーゼ活性の値を1として、それぞれの相対活性を算出してプロットしたものである。

[図4] 図4は、CMV プロモーター活性に及ぼすアウスタリド (Austalide) A の影響を示した図で、DMSO 処理した細胞のルシフェラーゼ活性の値を1として、それぞれの相対活性を算出してプロットしたものである。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明においては、上記（１）乃至（４）にいずれか一つに記載の化合物等を、アウスタリド（Austalide）類縁物質と総称する。

アウスタリド A（Austalide A）は、上記式（Ⅰ）で示される。

アウスタリド E（Austalide E）は、上記式（ⅠⅠ）で示される。

J B I R - 6 2 は、上記式（ⅠⅠⅠ）で示されるか、または（４）記載の物理化学的性状を有する。

J B I R - 6 2 は、常法に従って塩にすることができる。

J B I R - 6 2 の塩としては、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属の塩、カルシウム塩、バリウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属の塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属の塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N*'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニア塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機アミン塩；及びグリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、アスパラギン塩のようなアミノ酸塩等を挙げることができる。

また、アウスタリド E および J B I R - 6 2 は、常法に従ってエステルとすることができる。

アウスタリド類縁物質のエステルとしては、例えば、炭素数 1 乃至 6 個からなるアルキル基で形成されるエステル等を挙げることができる。

[0018] そのようなエステルとしては、例えば、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、イソプロピルエステル、ブチルエステル、イソブチルエステル、*s*-ブチルエステル、*t*-ブチルエステル、ペンチルエステル、

イソペンチルエステル、ネオペンチルエステル等を例示することができる。

さらに、アウスタリド類縁物質は、種々の異性体を有する。

本発明においては、これらの異性体及びこれらの異性体の混合物がすべて単一の式で示される。

[0019] 本発明においては、これらの異性体及びこれらの異性体の混合物をもすべて包含される。

また、アウスタリド類縁物質及びその塩は、溶剤和物となることがある。

例えば、大気中での放置又は再結晶等により水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物となる場合があるが、そのような溶剤和物も本発明に包含される。

本発明においては、細胞内又は生体内において代謝されてアウスタリド類縁物質に変換される化合物、いわゆる前駆体もすべて含まれるものである。

アウスタリド類縁物質は、アウスタリド類縁物質を生産する微生物の培養物中に存在する。

[0020] 1. 生産菌

本発明のアウスタリド類縁物質の製造方法において用いられる微生物は、アウスタリド類縁物質を生産する微生物であれば特に限定されるものではないが、好適にはアウスタリド類縁物質を生産する真菌であり、より好適にはアウスタリド類縁物質を生産するアスペルギルス属 (*Aspergillus*) に属する真菌である。かかるアスペルギルス属 (*Aspergillus*) に属する真菌としては、例えば、アスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) SANK 11109株 (以下、単に「SANK 11109株」と称する) をあげることができる。SANK 11109株は、鹿児島県沿岸において、海水より分離された。

[0021] SANK 11109株をクリックの文献(Klich M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht)に従い、4種類の培地 (CYA培地、MEA培地、CY20S培地、CZ培地) に接種して、菌学的性状を観察した。4種類の培地 (

CYA培地、MEA培地、CY2OS培地、CZ培地)の組成は以下の通りである。

[0022] CYA培地 {Czapek Yeast Extract Agar 培地} (K_2HPO_4 1g、*ザベック濃縮液 10ml、イーストエキス 5g、シュクロース 30g、寒天 15g、蒸留水 1000ml)

[0023] *ザベック濃縮液 ($NaNO_3$ 30g、 KCl 5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g、蒸留水 100ml)

[0024] MEA培地 {Malt Extract Agar 培地} (モルトエキス 20g、ペプトン 1g、グルコース 20g、寒天 20g、蒸留水 1000ml)

[0025] CY2OS培地 {Czapek Yeast Extract Agar with 20% Sucrose 培地} (K_2HPO_4 1g、*ザベック濃縮液 10ml、イーストエキス 5g、シュクロース 200g、寒天 15g、蒸留水 1000ml)

[0026] CZ培地 {Czapek Yeast Extract Agar 培地} (K_2HPO_4 1g、*ザベック濃縮液 10ml、シュクロース 30g、寒天 17.5g、蒸留水 1000ml)

[0027] 色調の表示は「メチューン・ハンドブック・オブ・カラー」 (Kornerup A. & Wanscher J. H. 1978. Methuen handbook of colour(3rd. edition). Erye Methuen, London) に従った。

[0028] SANK 11109株の菌学的性状は次の通りである。

CYA培地上でのコロニーは、25℃、7日の培養で直径18乃至22mmである。菌糸体は白色を呈する。分生子形成は旺盛で、分生子形成部はダークグリーン(25F6)を呈する。コロニーは平面でビロード状、中心部で綿毛状。裏面はオレンジイエロー(4B8-4A8)を呈する。

[0029] MEA培地上でのコロニーは、25℃、7日の培養で直径15乃至16mmである。分生子形成は旺盛で、分生子形成部はダークグリーン(26F7

）を呈する。コロニーは平面でビロード状、中心部で綿毛状。裏面はダークオレンジ（5 A 8）またはブラウニッシュイエロー（5 C 8）を呈する。

[0030] CY20S培地上でのコロニーは、25℃、7日の培養で直径22乃至24 mmである。分生子形成は旺盛で、分生子形成部はグレイッシュグリーン（26 E 7）を呈する。コロニーは平面でビロード状、中心部で綿毛状。裏面はディープオレンジ（6 A 8－5 A 8）を呈する。

[0031] CZ培地上のコロニーは、7日の培養で直径12乃至13 mmである。菌糸は疎であり、孢子形成はまばらである。コロニーは平面。裏面はブラウニッシュオレンジ（5 C 3）またはグレイッシュブラウン（5 C 3）を呈する。

37℃では生育しない。可溶性色素や浸出液は観察されない。

分生子頭は、放射状またはゆるやかな円柱状である。分生子柄は20乃至250 μm $\times$ 2.5乃至6（乃至9） μm 、平滑、褐色を呈する。頂のうは幅6乃至13（乃至15） μm 、球形または洋梨形である。アスペルジラは二列である。メトレは、4乃至6 μm $\times$ 3乃至5 μm で、頂のうの上部3分の2からほぼ全体に形成される。フィアライドは4乃至9 μm $\times$ 3乃至4 μm である。分生子は直径4乃至5 μm 、球形から亜球形、表面は粗面である。しばしば、頂のうを形成せずに栄養菌糸より直接フィアライド形成して分生子を形成するなど、退化型の分生子形成が観察される。ヒュールセルは観察されない。

[0032] 以上の菌学的性状より、本菌に該当する菌を検索したところ、クリックの文献(Klich M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht)に記載されているアスペルギルス属に一致した。よって、SANK 11109株をアスペルギルス エスピー (*Aspergillus* sp.) と同定した。

[0033] なお、SANK 11109株はアスペルギルス エスピー SANK 11109株として、平成22年8月31日付けで日本国茨城県つくば市東1-1-1の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（平成2

4年4月1日より独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター（I P O D、N I T E）に業務承継された）に国際寄託され、受託番号 F E R M B P - 1 1 2 6 8 を付与された。

[0034] 周知の通り、真菌類は自然界において、又は人工的な操作（例えば、紫外線照射、放射線照射、化学薬品処理等）により、変異を起こしやすく、本発明の S A N K 1 1 1 0 9 株もその点は同様である。本発明にいう S A N K 1 1 1 0 9 株はその全ての変異株を包含する。

[0035] また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組み換え、形質導入、形質転換等によりえられたものも包含される。即ち、アウスタリド類縁化合物を生産する S A N K 1 1 1 0 9 株、それらの変異株およびそれらと明確に区別されない菌株は全て S A N K 1 1 1 0 9 株に包含される。

[0036] 2. 培養法及び精製法

本発明のアウスタリド類縁化合物を得るため、これらの微生物の培養は一般に他の発酵生成物を生産するために用いられる培地と同様の培地を用いて行なわれる。このような培地は、微生物が資化出来る炭素源、窒素源および無機塩を含有する。

[0037] 炭素源としては、例えば、グルコース、フラクトース、マルトース、シュエクロース、マンニトール、グリセリン、デキストリン、オート麦、ライ麦、大麦、玄米、可溶性デンプン、トウモロコシデンプン、ジャガイモ、トウモロコシ粉、大豆油、綿実油、糖蜜、クエン酸、酒石酸等をあげることができる。これらの炭素源は単独または組み合わせて用いることができる。

[0038] 培地に加える炭素源の量は、培地中の他の成分により異なるが、通常、培地量の1乃至10重量%である。

[0039] 窒素源としては、例えば、大豆粉、フスマ、落下生粉、綿実粉、カゼイン加水分解物、ファーマミン、コーンスチープリカー、ペプトン、ゼラチン、肉エキス、イースト、イーストエキス、マルトエキス、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、L-グルタミン酸ナトリウム等をあげることができる。これらの炭素源は単独または組み合わせて用いることができる。

きる。

[0040] 培地に加える窒素源の量は、培地中の他の成分により異なるが、通常、0.2乃至6重量%である。

[0041] 炭素源および窒素源は、一般に組み合わせて用いるが、純粋な形態である必要はなく、微量の生育因子、ビタミンおよび無機栄養を含むより純度の低いものを用いてもよい。

無機塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、アンモニウム、カルシウム、リン酸、硫酸、塩酸、炭酸等のイオンを生じる塩類をあげることができる。

[0042] また、菌の資化しうるビタミンB₁、ビオチンのようなビタミン類、チアミンのような菌体増殖促進物質等も必要に応じて添加してもよい。

更に、マンガン、モリブデン、その他の金属塩を必要に応じて添加してもよい。

栄養培地が泡立つ場合など、必要に応じて、シリコンオイル、ポリアルキレングリコールエーテル、植物油、動物油、界面活性剤のような消泡剤を培地に添加してもよい。

[0043] 特に、液体培養に際しては、これらの消泡剤を添加することが好適である。

培地のpHは、培地の成分、生育温度等により異なるが、通常発酵生成物を生産するために用いられるpHであればよい。

[0044] 菌の生育温度は、培地の成分、pH等により異なるが、通常、10℃乃至32℃であり、16乃至30℃の範囲が生育に良好である。アウスタリド類縁化合物の生産には、20乃至28℃が好適である。

[0045] 培養方法としては、特に制限はなく、微生物一般に用いられる培養法であればよく、固形培地を用いた培養法、攪拌培養法、振とう培養法、通気培養法、通気攪拌培養法等を使用することができ、好適には、固形培地を用いた培養である。

[0046] 培養においては、好適には20乃至26℃、より好適には、23℃で10

日以上固体培養を行なう。培養は三角フラスコ中で、1または2段階の種の発育工程により開始させる。種の発育段階の培地には、炭素源、窒素源、微量の生育因子、無機塩類および微量金属類を併用できる。種培養用三角フラスコはロータリー振とう培養機中で20乃至26℃（好適には23℃）、5乃至10日間（好適には7日間）振とうするか、又は十分に生育するまで振とうする。生育した種培養液は、第二の種培養培地又は生産培養培地に接種するために用いられる。中間の発育工程を用いる場合には、本質的に第一の種培養と同様の方法で生育させ、その種培養液を三角フラスコなどの固体培地培養容器中の生産培養培地に接種する。接種した固体培地培養容器を一定温度で静置して、生産培養を行なう。

[0047] 本培養をより大きなスケールで行なう場合には、攪拌装置及び通気装置を備えたジャーファーマンター又はタンクを使用する。その場合、培地はジャーファーマンター又はタンク中で調製することができる。培地は、例えば、121℃にて20分間滅菌し、冷却した後、種培養液を接種することができる。培養は、例えば、23℃にて通気攪拌法により行なうことができる。

[0048] 培養液中のアウスタリド類縁物質のモニタリングは、プロモーター活性促進作用を指標として行うことができるが、高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography：以下、「HPLC」という。）分析等の手法により行うこともできる。

[0049] アウスタリド類縁物質の生産量は、通常、培養開始から240乃至360時間後に最高値に達する。

培養終了後、得られた培養物、その中に含まれる菌体及び／又はその培養上清から、アウスタリド類縁物質を抽出することができる。

[0050] 菌体及びその他の固形分と培養上清とを分離するためには、遠心分離法又は珪藻土をろ過助剤とするろ過法を使用することができる。

アウスタリド類縁物質の抽出には該化合物の物理化学的性状を利用することができる。

[0051] 培養ろ液又は培養上清中に存在するアウスタリド類縁物質は、酸性又は中性条件下で水と混和しない有機溶剤、例えば、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレン、ブタノール、それら2つ以上の混合溶媒等により抽出することができる。

[0052] 菌体内に存在するアウスタリド類縁物質は、50乃至90%の含水アセトン又は含水メタノールを用いて菌体から抽出し、有機溶媒を留去した後、培養ろ液又は培養上清中に存在する場合と同様に抽出することができる。

[0053] 全培養物中に存在するアウスタリド類縁物質は、全培養物にアセトン又はメタノールを20乃至80%、好適には40乃至60%、より好適には50%添加し、抽出することができる。

[0054] 抽出終了後、珪藻土をろ過助剤としてろ過し、得られた可溶物から、培養ろ液又は培養上清中に存在する場合と同様に抽出することができる。

上述の抽出物からのアウスタリド類縁物質を単離するための精製は、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、HPLC等の精製手段により行なうことができる。これらの精製手段を単独で、又は適宜組み合わせることにより、アウスタリド類縁物質を単離することができる。必要に応じて、同一の精製手段を反復して用いることができる。

[0055] アウスタリド類縁物質又はその塩は遺伝子のプロモーター活性を促進する作用を有する。本発明は、アウスタリド類縁物質又はその塩を含有してなるプロモーター活性促進剤を提供する。かかるプロモーター活性促進剤が適用され得る遺伝子としては、タンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではない。かかる遺伝子は真核生物の細胞のゲノム、ミトコンドリアDNA、その他の内在性遺伝子（プラスミド等）、感染性生物（ウイルス等）のいずれにあってもよい。かかる遺伝子は導入された外来遺伝子であってもよい。また、原核生物にある内在性又は外来性遺伝子であってもよい。

[0056] アウスタリド類縁物質又はその塩は、分化細胞を様々な細胞への分化能を

有する未分化細胞（多能性幹細胞とも呼ばれる）へと誘導する因子（初期化因子とも呼ばれる）をコードする遺伝子のプロモーター活性を促進する作用を有する。

[0057] 特に、アウスタリド類縁物質又はその塩は、体細胞から i P S 細胞を誘導する遺伝子（i P S 細胞化因子遺伝子）のプロモーター活性を促進する作用を有しており、体細胞から i P S 細胞を誘導（調製）するのに有用である。本発明は、アウスタリド類縁物質又はその塩を含有してなる初期化因子遺伝子プロモーター活性促進剤、i P S 細胞化因子遺伝子プロモーター活性促進剤を提供する。

[0058] i P S 細胞化因子遺伝子としては、単独で又は他の因子（をコードする遺伝子）とともに、体細胞から i P S 細胞等の多能性幹細胞を誘導し得る因子（をコードする遺伝子）であれば特に限定されるものではないが、例えば、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、n - M y c、N A N O G、L I N 2 8、h T E R T、S V 4 0 L a r g e T、T b x 1、L - M y c、U T F 1等を挙げることができ、好適にはO c t 3 / 4、S o x 2及びK l f 4である。

[0059] 本発明は、アウスタリド類縁物質又はその塩を含有してなるO c t 3 / 4プロモーター活性促進剤、S o x 2プロモーター活性促進剤、および、K l f 4プロモーター活性促進剤を提供する。かかるプロモーター活性促進剤は他の遺伝子（ヌクレオチド）、化合物、それらの誘導体等を含有していてもよい。

[0060] また、本発明は、アウスタリド類縁物質を含有するi P S細胞誘導剤を提供する。かかるi P S細胞誘導剤は他の遺伝子（ヌクレオチド）、化合物、それらの誘導体等を含有していてもよい。

[0061] さらに、本発明は、アウスタリド類縁物質と体細胞とを接触させる工程を含んでなるi P S細胞の誘導方法を提供する。かかるi P S細胞の誘導方法は、他の遺伝子（ヌクレオチド）、化合物、それらの誘導体等と体細胞とを接触させる工程を含んでいてもよい。かかる方法に供される体細胞としては

、例えば、ヒト若しくは非ヒト哺乳動物由来の細胞、又はその他の脊椎動物由来の体細胞を挙げることができる。

[0062] また、本発明は、アウスタリド類縁物質と、iPS細胞化因子遺伝子等の各種遺伝子のプロモーターとを接触させる工程を含む、プロモーター活性促進方法を提供する。かかる方法は、細胞系及び無細胞系のいずれであってもよい。

[0063] 本発明のプロモーター活性促進剤、iPS細胞誘導剤に含まれるアウスタリド類縁物質の量（濃度）、本発明のiPS細胞の誘導方法、および、本発明のプロモーター活性促進方法、に使用するアウスタリド類縁物質の量（濃度）、細胞との接触時間、接触頻度（回数）ならびにその他の接触条件は、該プロモーター活性促進剤、該iPS細胞誘導剤又は該方法に使用される細胞等に依存して変動し得るものであり、特に限定されないが、例えば、その濃度は0.01 μ M乃至100 μ Mであってよい。

実施例

[0064] 次に、実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0065] 実施例1. SANK 11109株の培養

SANK 11109株のスラントより菌糸片をかきとり、あらかじめ滅菌（121℃、20分間）した後述の組成からなる種培養培地30mlを含む100ml容三角フラスコに接種した。同様の操作を行い、計10本の種培養フラスコを用意した。23℃で210rpmのロータリー振とう培養機中で7日間培養した。このようにして得られた種培養液を、滅菌（121℃、40分間）した後述の生産培養培地の培地組成を含む500ml容固体培地培養容器（アグリフレックス、藤森工業（株）社製）10本にそれぞれ20ml接種し、23℃で静置して14日間培養した。

[0066] （表1）種培養培地の培地組成

可溶性デンプン	20g
---------	-----

グリセリン	30 g
グルコース	30 g
大豆粉	10 g
ゼラチン	2.5 g
イーストエキス	2.5 g
NH_4NO_3	2.5 g
寒天	3 g
消泡剤*	0.05 ml
蒸留水	1000 ml

*ニッサン・ディスフォームCB-442（登録商標、日本油脂（株）社製）

[0067]（表2）生産培養培地の培地組成（500 ml 容固体培地培養容器1本あたり）

押麦	64 g
マンニトール	1 g
Ｌ－グルタミン酸ナトリウム一水和物	0.5 g
イーストエキス（Difco）	0.5 g
KH_2PO_4	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
蒸留水	100 ml

[0068] 実施例2．培養物の抽出

実施例1に記載の培養終了後、培養物に40%アセトン水を1000 ml 加え、培養物を破碎した。1昼夜5℃で放置した後、3Mグリシン－塩酸緩衝液（pH2.5）160 ml とn－ブタノール1000 ml を加え、5分間

振とうした。この懸濁物を 3000 rpm で 5 分間遠心して、分離された上層を別容器に移した。得られた n-ブタノール層に飽和食塩水を 1000 ml 加え、5 分間振とうした後、3000 rpm で 5 分間遠心して得られた上層を分画後、濃縮乾固し、残渣 2.3 g を得た。

[0069] 実施例 3. 化合物の精製・単離

実施例 2 で得られた乾燥残渣を出発材料として、プロモーター活性促進作用を指標としてアウスタリド類縁物質を精製、単離した。

[0070] 該乾燥残渣のうち 0.4 g を逆相中圧液体クロマトグラフィー (MPLC; Purif-Pack ODS-100, size:20, Moritex, Tokyo, Japan) に供し、メタノール-水のグラジエント (60-100%) で溶出した。60 乃至 80% 及び 80 乃至 100% のメタノール溶出液中に活性フラクションを得た。

[0071] 上記 MPLC により得られた 60 乃至 80% メタノール溶出画分の乾燥残渣 42.1 mg を、60% メタノール-水を展開した L-column2 column (20 i.d. × 150 mm; CERI, Tokyo, Japan) を用いた分取逆相 HPLC (流速: 10 ml/分) により精製し、保持時間 21.7 分に溶出されるピーク画分からアウスタリド E 0.72 mg を、保持時間 15.2 分に溶出されるピーク画分から JBIR-62 化合物 5.2 mg を、それぞれ得た。

[0072] 同様に、上記 MPLC により得られた 80 乃至 100% メタノール溶出画分の乾燥残渣 12.8 mg を、70% メタノール-水を展開した L-column2 column (前記) を用いた分取逆相 HPLC (流速: 10 ml/分) により精製し、保持時間 20.7 分に溶出されるピーク画分からアウスタリド A 1.53 mg を得た。

[0073] アウスタリド類縁物質のうちアウスタリド A (Austalide A) 及びアウスタリド E (Austalide E) は、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトラムにより得られたそれぞれのプロトン付加分子の精密質量 [アウスタリド A (m/z 517.2437, $C_{28}H_{37}O_9$ の理論値: 517.2438、アウスタリド E (m/z 533.2375, $C_{28}H_{37}O_{10}$ の理論値: 533.2387)] より、それぞれの分子式を $C_{28}H_{36}O_9$ および $C_{28}H_{36}O_{10}$ と決定した。さらに、それぞれの 1H NMR スペクトルは、アウスタリ

ドA及びアウスタリドEの論文報告(J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1981, 1265 - 1267)と一致した。

[0074] アウスタリド類縁物質のうちJ B I R - 6 2は無色不定形の固体として得られ ($[\alpha]_D^{25} -103^\circ$ (c 0.1, in MeOH) ; UV $\lambda_{\max} (\epsilon)$ 221 (34,800), 266 (18,400), in MeOH; IR $\nu_{\max}$ 3420, 1743, 1612 cm^{-1} , in CHCl_3)、高分解能エレクトロスプレーイオン化マスペクトラムにより得られたプロトン付加分子の精密質量 (m/z 503.2276, $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{O}_9$ の理論値 : 503.2281) より、その分子式は $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_9$ と決定された。各プロトンおよび炭素間の直接結合性を、異核単一量子相関 (HSQC) スペクトルより決定した。

[0075] NMRスペクトルは、ヴァリアンNMRシステム500NB CL (Varian NMR System 500 NB CL) を用い、重クロロホルム (chloroform-d) 中で、該溶媒ピークを内部標準 (δ_c 77.0, δ_H 7.26) として測定された。

[0076] 実施例4. リポーター遺伝子発現系の構築

K I f 4 遺伝子のプロモーター配列は、ヒトゲノムDNAをテンプレートとして、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するB1-SalI-P(hKLF4)-Fw及び配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するB5r-EcoRI-P(hKLF4)-Rvをプライマーとして用いたPCR法により増幅した。得られたDNA断片は、Gene bankのNT_008470の塩基番号39420850番から39415849番までに相当するヒトK I f 4 プロモーターを含む。

[0077] O c t 4 遺伝子のプロモーター配列は、ヒトゲノムDNAをテンプレートとして、配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するh0-For及び配列表の配列番号4に記載の塩基配列を有するh0-Revをプライマーとして用いたPCR法により増幅した。得られたDNA断片は、Gene bankのNT_007592の塩基番号31081601番から31078398番までに相当するヒトO c t 3 / 4 プロモーターである。

[0078] S o x 2 遺伝子のプロモーター配列は、ヒトゲノムDNAをテンプレートとして、配列表の配列番号5に記載の塩基配列を有するB1-SalI-P(hSOX2)-Fw及び配列表の配列番号6に記載の塩基配列を有するB5r-EcoRI-P(hSOX2)-Rvをプラ

イマーとして用いたPCR法により増幅した。得られたDNA断片は、GenebankのNT_005612の塩基番号87920274番から87925274番までに相当するヒトSox2プロモーターである。

[0079] 増幅されたDNA断片を、Gatewayシステム（インビトロジェン社製）を用いて、予めCMVプロモーターを除去したpLenti6/V5ベクターにクローニングした。次いで、pMetLuc2-Reporter Vector（クローンテック社製）にある分泌型Metridialルシフェラーゼ遺伝子をクローニングし、前記プロモーター配列の下流に連結した。

[0080] 得られた組換えベクターを、hTert遺伝子(ヒトテロメラーゼ遺伝子)により不死化したヒト正常二倍体胎児線維芽細胞に、レンチウイルスを用いて導入し、安定株を樹立した。

レンチウイルス感染は、ViraPower™ Lentiviral Expression Systems（インビトロジェン社製）を用い、そのプロトコールに従い行った。細胞の培養は、10%牛胎児血清とペニシリン(100 units/ml)とストレプトマイシン(100 µg/ml)を含むDMEM培地を使用し、37度、5%CO₂濃度のインキュベーター内で培養を行った。

[0081] 実施例5. プロモーター活性促進活性の評価

実施例4で得られた安定株は、 0.5×10^5 cells/mlの濃度に調整し、384-well plateに25 µlずつ分注した。一晚培養後、1ウエルあたり、0.2 µlのサンプルDMSOに溶解させたものを添加し、48時間培養を行った。Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assayキット（クローンテック社製）及び2103 EnVision Multilabel Reader（パーキンエルマー社製）を用いて、ルシフェラーゼ活性を検出した。

アウスタリド類縁物質は、Klf4遺伝子のプロモーターの活性を上昇させるだけでなく、Oct4遺伝子及びSox2遺伝子のプロモーター活性も上昇させた（図1乃至3）。

[0082] 特に、アウスタリドAは、100 µMで細胞を処理した時に、Klf4遺伝子及びOct4遺伝子のプロモーター活性を8倍程度、Sox2遺伝子のプロ

モーター活性を3倍程度上昇させた（図1乃至3）。

[0083] アウスタリドAのプロモーター活性に対する選択性を評価するために、iPS細胞化因子以外の遺伝子プロモーターとして、サイトメガロウイルス（CMV）のプロモーターに対する活性を調べたところ、アウスタリドAはCMVプロモーターの活性化を引き起こさずに、むしろ阻害活性を示した（図4）。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明によれば、各種遺伝子プロモーター活性を促進することにより、安全な幹細胞を効率よく提供することができる。

受託番号

[0085] F E R M B P - 1 1 2 6 8

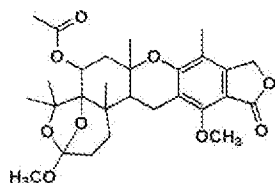
配列表フリーテキスト

[0086] 配列番号1 — P C R プライマー B1-SalI-P(hKLF4)-Fw
配列番号2 — P C R プライマー B5r-EcoRI-P(hKLF4)-Rv
配列番号3 — P C R プライマー h0-For
配列番号4 — P C R プライマー h0-Rev
配列番号5 — P C R プライマー B1-SalI-P(hSOX2)-Fw
配列番号6 — P C R プライマー B5r-EcoRI-P(hSOX2)-Rv

請求の範囲

[請求項1] 下記式 (I)

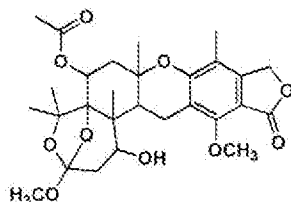
[化1]



で表わされる化合物を含有してなるプロモーター活性促進剤。

[請求項2] 下記式 (I I)

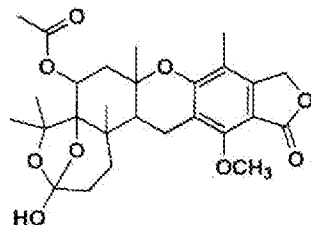
[化2]



で表わされる化合物を含有してなるプロモーター活性促進剤。

[請求項3] 下記式 (I I I)

[化3]



で表わされる化合物又はその塩を含有してなるプロモーター活性促進剤。

[請求項4] 下記の物理化学的性状を有する化合物又はその塩を含有してなるプロモーター活性促進剤：

1) 物質の性状：無色不定形の固体

2) 分子式: $C_{27}H_{34}O_9$

3) 高分解能エレクトロスプレーイオン化マスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値: 503.2276

計算値: 503.2281

4) 紫外吸収スペクトル: メタノール中で測定した紫外吸収スペクトルは、次のとおり極大吸収を示す: 221 nm (ϵ 34800)、266 (ϵ 18400)。

5) 旋光度: メタノール中で測定した旋光度は、以下に示す値を示す:

$[\alpha]_D^{25}: -103^\circ$ (c 0.1)

6) 赤外吸収スペクトル: クロロホルム中で測定した赤外吸収スペクトルは以下のとおり極大吸収を示す:

3420, 1743, 1612 cm^{-1}

7) 1H -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でクロロホルムのシグナルを7.26 ppmとして測定した、 1H -核磁気共鳴スペクトルは、以下に示す通りである:

0.98 (3H, s)、1.21 (3H, s)、1.30 (3H, s)、1.52 (3H, s)、1.79 (1H, m)、1.91 (1H, m)、1.93 (1H, m)、1.93 (1H, m)、1.98 (3H, s)、2.05 (3H, s)、2.15 (1H, dd, $J=4.4$, 15.7 Hz)、2.41 (1H, d, $J=8.1$ Hz)、2.55 (1H, dd, $J=1.5$, 16.1 Hz)、2.85 (1H, dd, $H=8.1$, 18.5 Hz)、2.96 (1H, d, $J=18.5$ Hz)、4.11 (3H, s)、5.08 (1H, br. S)、5.11 (2H, s) ppm

8) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でクロロホルムのシグナルを77.0 ppmとして測定した、 ^{13}C -核磁気共鳴ス

ペクトルは、以下に示すとおりである：10.6 (q)、18.0 (t)、18.1 (d)、21.2 (q)、25.5 (q)、27.5 (q)、29.4 (q)、29.7 (t)、31.0 (t)、35.4 (d)、38.0 (t)、40.2 (s)、62.0 (q)、68.2 (t)、70.8 (d)、75.6 (s)、85.1 (s)、86.2 (s)、107.4 (s)、113.9 (s)、115.7 (s)、117.8 (s)、145.6 (s)、155.4 (s)、157.9 (s)、169.4 (s)、169.5 (s)。

[請求項5] プロモーター活性促進がiPS細胞化因子遺伝子のプロモーター活性促進である、請求項1乃至4のいずれか一つに記載のプロモーター活性促進剤。

[請求項6] iPS細胞化因子遺伝子が、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、n-Myc、NANOG、LIN28、hTERT及びSV40 Large Tからなる群から選択される一つ又は二つ以上の遺伝子である、請求項5に記載のプロモーター活性促進剤。

[請求項7] iPS細胞化因子遺伝子が、Oct3/4、Sox2及びKlf4である、請求項5又は6に記載のプロモーター活性促進剤。

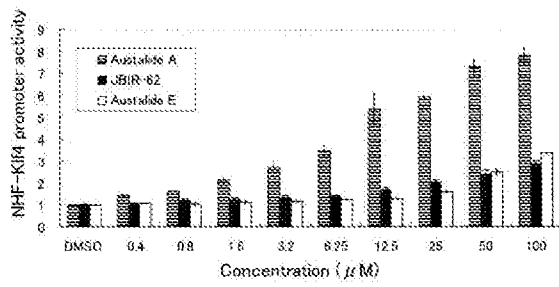
[請求項8] アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する、請求項1乃至4のいずれか一つに記載の化合物の生産菌を培養する工程、並びに、その培養物より請求項1乃至4のいずれか一つに記載の化合物を採取する工程を含んでなる、請求項1乃至4のいずれか一つに記載の化合物の製造方法。

[請求項9] アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する、請求項1乃至4のいずれか一つに記載の化合物の生産菌がアスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) SANK 11109株 (FERM BP-11268) 株である、請求項8に記載の製造方法。

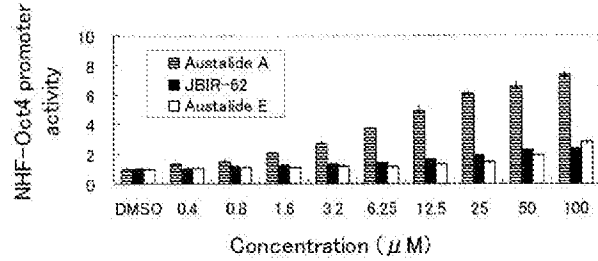
[請求項10] アスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) SANK 11109株 (FERM BP-11268) 株。

- [請求項11] 請求項1もしくは2記載の化合物、又は、請求項3もしくは4又はその塩と、遺伝子プロモーターとを接触させる工程を含んでなる、プロモーター活性促進方法。
- [請求項12] 遺伝子がi P S細胞化因子遺伝子である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] i P S細胞化因子遺伝子が、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、n - M y c、N A N O G、L I N 2 8、h T E R T及びS V 4 0 L a r g e T、T b x 1、L - M y c及びU T F 1からなる群から選択される一つ又は二つ以上の遺伝子である、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] i P S細胞化因子遺伝子が、O c t 3 / 4、S o x 2及びK l f 4である、請求項12又は13記載の方法。

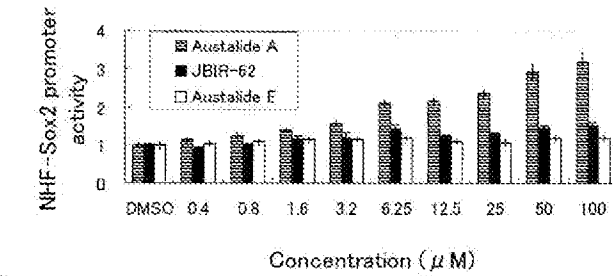
[図1]



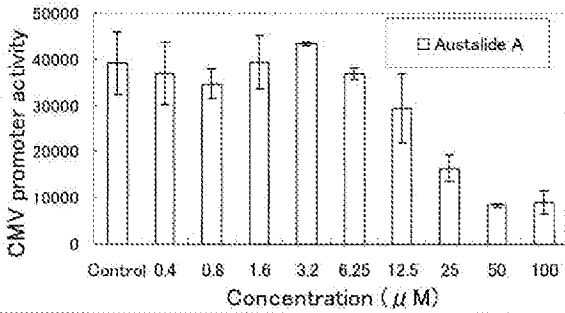
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/061324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12P7/24(2006.01)i, C12P17/18(2006.01)i, C12N15/09(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)

C12N5/071, C12N1/14, C12P7/24, C12P17/18, C12N15/09

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HORAK, R.M. et al., Structures of the Austalides A-E, Five Novel Toxic Metabolites from Aspergillus ustus., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, Issue 24, pp.1265-7	1-2, 5-8, 11-14 3-4, 9-10
X Y A	HORAK, R.M. et al., Metabolites of Aspergillus ustus. Part2. Stereoelectronic Control in the Acid-catalysed Hydrolysis of the Ortho Ester Moiety in Austalides A-F., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1985, Issue 2, pp.357-61	1-8 11-14 9-10



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
20 July, 2012 (20.07.12)

Date of mailing of the international search report
31 July, 2012 (31.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12P7/24(2006.01)i, C12P17/18(2006.01)i,
C12N15/09(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 (I P C))

Int.Cl. C12N5/071, C12N1/14, C12P7/24, C12P17/18, C12N15/09

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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/REGISTRY (STN)

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 A	HORAK, R. M. et al., Structures of the Austalides A-E, Five Novel Toxic Metabolites from Aspergillus ustus., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, Issue 24, pp.1265-7	1-2, 5-8, 11-14 3-4, 9-10
X Y A	HORAK, R. M. et al., Metabolites of Aspergillus ustus. Part2. Stereoelectronic Control in the Acid-catalysed Hydrolysis of the Ortho Ester Moiety in Austalides A-F., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1985, Issue 2, pp.357-61	1-8 11-14 9-10

☐ 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

2 0 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

3 1 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

幸田 俊希

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

4 6 7 1