

(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12月16日(16.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/143539 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/415 (2006.01) A23L 3/36 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/059005
 - (22) 国際出願日: 2010年5月27日(27.05.2010)
 - (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 2009-138459 2009年6月9日(09.06.2009) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka (JP).
 - (72) 発明者; および
 - (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 毛笠 秀昭 (KEGASA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 荒井 直樹 (ARAI, Naoki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 友野 潤 (TOMONO, Jun) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 横田 真一 (YOKOTA, Shinichi) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 河原 秀久 (KAWAHARA, Hidehisa) [JP/JP]; 〒5648680 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学 化学生命工学部内 Osaka (JP).
 - (74) 代理人: 植木 久一, 外 (UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (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, 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, LR, 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 (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, 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))



WO 2010/143539 A1

(54) Title: ANTIFREEZE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 氷結晶化阻害物質

(57) Abstract: Provided is an antifreeze substance which has such a good antifreeze activity as being available for practical use and can be easily, efficiently and economically produced through safe steps that are usable in food manufacturing. Further provided are a method for producing said antifreeze substance, a polypeptide that is the active part of said antifreeze substance, and an antifreeze composition, a food, a biological sample-protecting agent and a cosmetic each containing said antifreeze substance or polypeptide. The aforesaid antifreeze substance is characterized by originating in a plant and having a molecular weight, measured by gel filtration chromatography, of 400 kDa or greater.

(57) 要約: 本発明は、実用になう優れた氷結晶化阻害活性を有し、食品製造に利用できる安全な工程で、簡単に、効率良く、安価に製造できる氷結晶化阻害物質を提供することを目的とする。また、本発明は、当該氷結晶化阻害物質の製造方法、当該氷結晶化阻害物質の活性部分であるポリペプチド、並びに当該氷結晶化阻害物質またはポリペプチドを含む氷結晶化阻害組成物、食品、生体試料保護剤および化粧品を提供することも目的とする。本発明に係る氷結晶化阻害物質は、植物に由来し、かつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量が400kDa以上であることを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：氷結晶化阻害物質

技術分野

[0001] 本発明は、氷結晶化阻害物質、当該氷結晶化阻害物質の製造方法、当該氷結晶化阻害物質の活性部分であるポリペプチド、並びに当該氷結晶化阻害物質またはポリペプチドを含む氷結晶化阻害組成物、食品、生体試料保護剤および化粧品に関するものである。

背景技術

[0002] 低温時の生体防御物質の1つとして、氷結晶化阻害タンパク質が知られている。氷結晶化阻害タンパク質は、「不凍タンパク質」や「Anti-Freeze Protein」とも呼ばれている。以下、これらを「AFP」と略記する。AFPは、水が凍ってしまう氷点下の温度域において、細胞内に生成する氷結晶の表面に吸着してその成長を食い止め、細胞の凍結を妨げる働きを持つ。このようなAFPは、例えば、魚類、昆虫、植物、菌類、微生物などから見出されている。

[0003] 魚類や昆虫由来のAFPは研究が進んでおり、数種類の異なるタイプのAFPが知られている。I型AFPは、例えばカレイ科やカジカ科の魚類などに見出されている。I型AFPとしては、連続したAla残基を含む一本鎖 α -らせん構造をとる、分子量が3.3~5.0kDaのものが報告されている（非特許文献1）。

[0004] II型AFPは、例えばキュウリウオやタイセイヨウニシンに見出されている。II型AFPとしては、S-S結合を有し、カルシウム依存型レクチンの糖認識領域と高い相同性を有する、分子量が14kDa以上のものが報告されている（非特許文献1）。

[0005] III型AFPは、三次元構造情報が多く得られている球状タンパク質であり、陰イオン交換樹脂に結合するものと陽イオン交換樹脂に結合するものとに分類される。例えば、マクロゾアルケルスアメリカヌスに見出されてい

る。III型AFPとしては、分子量が6~7kDaのものが報告されている（非特許文献1）。

[0006] IV型AFPは、GluとGlnに富み、アポリポロテインE3と高い相同性を示し、 α ヘリックス構造を多く含む。IV型AFPの存在下で形成される氷結晶は、特徴的な六方偏四角面体型である。IV型AFPとしては、例えば、108残基からなる、分子量が12kDaのカジカ科のミオクソケファルスオコトデケンスピノス由来のものが報告されている（非特許文献1）。

[0007] β ヘリックス型AFPは、-Thr-Xaa-Thr-（式中、「Xaa」は任意のアミノ酸を示す）とCysを特定の位置に含む12残基から13残基の繰り返しアミノ酸配列から構成され、高い熱ヒステリシスを示すことが報告されている。例えばチャイロコメノゴミムシダマシの幼虫や穀物害虫の幼虫などに見出されている。 β ヘリックス型AFPとしては、分子量が約9kDaのものが報告されている（非特許文献1）。

[0008] 不凍糖タンパク質（AFGP）は、主として-Ala-Ala-Thr-の繰り返しから構成され、Thrの側鎖が氷結晶結合に関わる二糖で修飾されていることが知られている。例えばノトセニア科の魚類に見出されている。不凍糖タンパク質としては、分子量が2.2~33kDaのものが報告されている（非特許文献1）。

[0009] 植物由来のAFPとしては、冬ライ麦やニンジン由来のものなどが知られている。例えば、冬ライ麦由来のAFPはグルカナーゼ、キチナーゼ、ソーマチン様タンパク質を含んでおり、複合体を形成し、サブユニットの分子量は16~35kDaであることが知られている（非特許文献2）。ニンジン由来のAFPは、分子量36kDaの単量体として存在することが知られている（非特許文献3）。

[0010] 菌類由来のAFPとしては、例えばイシカリガマノホタケや南極エノキ（*Flammulina velutipes* KUAF-1）などの担子菌類由来のものが知られている。これらのAFPは細胞外分泌タンパク質であ

る。イシカリガマノホタケ由来のものは、分子量が15～30kDaであることが報告されている（特許文献1、2）。

[0011] 微生物由来のAFPとしては、例えばフラボバクテリウム（*Flavobacterium*）属由来のものが知られている。分子量は19kDaで、0.5℃以上という高い熱ヒステリシス活性を示すことが報告されている（特許文献3）。*Pseudomonas putida* GR12-2から分泌される不凍タンパク質は、分子量164kDaの新規なリポ糖タンパク質であることが知られている（非特許文献4）。

[0012] しかしながら、これまでに報告されているAFPを含む魚類、植物、昆虫、菌類、細菌などを利用する場合、その生体内にAFPを微量しか含まないことから抽出効率が悪かったり、或いはAFPがその生体内に多量に含まれていても、これら生物の捕獲や培養が難しいという問題があった。よって、これら従来生物の中で、食品用途のAFPの工業的生産に利用できるものはない。

[0013] 魚類または昆虫類のAFPについては、遺伝子組み換え技術を用いて生産性を高めている報告もある（特許文献4、5）。しかしながら、そのような組換え技術を利用しなくとも、より簡便な方法で効率良く、安価にAFPを提供し得る方法が求められているのが現状である。このような事情に鑑みると、従来公知の氷結晶化阻害物質のみで十分ということはなく、新規でより有用な氷結晶化阻害物質の開発が強く求められている。

先行技術文献

特許文献

- [0014] 特許文献1：特開2004-24237号公報
特許文献2：特開2004-275008号公報
特許文献3：特開2004-161761号公報
特許文献4：国際公開WO92/16618号パンフレット
特許文献5：国際公開WO97/28260号パンフレット

非特許文献

[0015] 非特許文献1：生物物理，2003，Vol. 43，No. 3，pp. 130-135

非特許文献2：Plant Physiology，1999，Vol. 119，pp. 1361-1369

非特許文献3：Biochem. J.，1999，Vol. 340，pp. 385-391

非特許文献4：Can. J. Microbiol.，1998，Vol. 44，p. 64

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明は、実用になう優れた氷結晶化阻害活性を有し、食品製造に利用できる安全な工程で、簡単に、効率良く、安価に製造できる氷結晶化阻害物質を提供することを目的とする。また、本発明は、当該氷結晶化阻害物質の製造方法、当該氷結晶化阻害物質の活性部分であるポリペプチド、並びに当該氷結晶化阻害物質またはポリペプチドを含む氷結晶化阻害組成物、食品、生体試料保護剤および化粧品を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行なった。その結果、植物から容易に得ることができ、工業的に極めて簡便な方法で効率よく製造できる氷結晶化阻害物質を見出し、本願発明を完成させるに至った。

[0018] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、植物に由来し、かつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量が400kDa以上であることを特徴とする。

[0019] 本発明に係る上記氷結晶化阻害物質の製造方法は、分画分子量5,000以上の分離膜を用いて植物から氷結晶化阻害物質を分離する工程を含むことを特徴とする。

[0020] 本発明に係るポリペプチドは、上記氷結晶化阻害物質の一部であり、かつ氷結晶化阻害活性を有することを特徴とする。

[0021] 本発明に係る氷結晶化阻害組成物、食品、生体試料保護剤および化粧品は、上記氷結晶化阻害物質および／または上記ポリペプチドを含むことを特徴とする。

発明を実施するための形態

- [0022] 本発明の一実施形態について説明すると、以下の通りである。
- [0023] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、植物に由来し、かつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量が400kDa以上であることを特徴とする。
- [0024] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、氷結晶の成長を阻害する機能を有するタンパク質である。AFP（不凍タンパク質）は、一般的に、初期氷結晶の表面に作用してその成長を妨げたり、或いは氷結晶の形状を制御してその成長を抑制する。よって、本発明における氷結晶化阻害活性は、氷結晶構造の観察により確認することができる。勿論、氷結晶の成長の阻害を直接測定してもよい。
- [0025] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、植物に由来するものであり、植物から抽出することができる。本発明に係る氷結晶化阻害物質を含む植物は特に限定されないが、例えば、アブラナ科、セリ科、ユリ科およびキク科に属する植物からなる群から選ばれる1以上の植物、並びにこれらの類縁品種および改良品種を挙げることができる。アブラナ科に属する植物としては、ハクサイ、ダイコン、ブロッコリー、チンゲンサイ、コマツナ、カブ、シロナ、野沢菜、広島菜、ミズナおよびマスタード (*Brassica juncea*) からなる群から選ばれる1以上の植物、並びにこれらの類縁品種および改良品種を挙げることができる。セリ科に属する植物はニンジン等が、ユリ科に属する植物はネギ等が、キク科に属する植物は春菊等が挙げられる。
- [0026] アブラナ科植物としては、マスタード (*Brassica juncea*)、並びにこれらの類縁品種および改良品種が好適である。上記 *Brassica juncea* 種の植物としては、特に限定されるものではないが、例えば、マスタードグリーン (*Brassica juncea mustard greens*)、タカナ (*Brassica juncea integrifolia*)、ザーサイ (*Brassica juncea tumida*)、和がらし (ブラウンマスタード, *Brassica juncea*)

ea) が例示できる。Brassica juncea種の植物はいずれも入手が容易であり、また、Brassica juncea種の植物を用いれば、本発明に係る氷結晶化阻害物質を効率よく得ることができる。

[0027] 例示した上記Brassica juncea種の植物の中でも、Brassica junceaが好ましい。Brassica junceaは、さらに容易に入手できる。また、Brassica junceaは、植物体の単位重量あたりから得られる抽出物が有する氷結晶化阻害活性が、さらに優れている。

[0028] 本発明において、「類縁品種」とは、例えば、科の類縁品種は、同じ属に属する植物でも学術上の分類において近い科の品種をいい、具体的な植物の類縁品種は、同じ科に属する植物でも学術上の分類において近い品種をいう。また、「改良品種」とは、人為的な選択、交雑、突然変異、遺伝子組み換えなどにより改良した植物をいうものとする。

[0029] これらの植物は、低温馴化するなど公知の方法によって植物中の氷結晶化阻害物質を誘導した状態で使用してもよい。低温馴化の温度としては、とくに限定されるものではないが、下限温度は0°C以上が好ましく、上限温度は20°C以下が好ましい。また低温馴化の期間としては、特に限定されるものではないが、3日間以上行うことが好ましい。

[0030] 以下、本発明に係る氷結晶化阻害物質の性状について詳細に説明する。本発明者らが実際に得た植物由来氷結晶化阻害物質は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量が400kDa以上であり、 34000 ± 5000 Daまたは 71000 ± 10000 Daの分子量を有する低分子のサブユニットを少なくとも一つ以上含んでなる複合体である。ここでサブユニットは、上記の分子量400kDa以上の氷結晶化阻害物質を、例えばジチオスレイトールなどの還元剤の存在下、SDS-PAGEで分析した際に低分子のバンドとして認められ、分子量400kDa以上の氷結晶化阻害物質から分離して得られうるポリペプチドである。本発明の氷結晶化阻害物質は、これらのサブユニットからなる単量体か、サブユニットを2以上含んでなる複合

体であってもよいし、複合体の一部を含んでもよい。複合体の一部としては例えば、 $34000 \pm 5000 \text{ Da}$ および $71000 \pm 10000 \text{ Da}$ のサブユニットが挙げられるが、氷結晶化阻害活性を有する限り、特に限定されるものではない。

[0031] なお、上記氷結晶化阻害物質の一部であり、かつ氷結晶化阻害活性を有することを特徴とするポリペプチドとしては、上記の $34000 \pm 5000 \text{ Da}$ および $71000 \pm 10000 \text{ Da}$ のサブユニットを挙げることができる。即ち、本発明に係る氷結晶化阻害ポリペプチドは、上記氷結晶化阻害物質を分離することにより製造することができる。

[0032] さらに、本発明の氷結晶化阻害物質としては、以下の性質を有するものが好適である：

- ・ pH 8.0 の条件で、各種の陰イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーにより吸着画分として得られる

- ・ pH 6.0 の条件で、各種の陽イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーにより非吸着画分として得られる

- ・ pH 7.4 の条件で、各種糖結合タンパク質と結合、吸着しない。

[0033] ここで陰イオン交換体としては、特に限定されるものではないが、例えば、DEAE (Diethylaminoethyl) や Q (Quaternary Ammonium) などが挙げられる。また、陽イオン交換体としては、特に限定されるものではないが、例えば、CM (Carboxymethyl) や SP (Sulphopropyl) などが挙げられる。また、糖結合タンパク質 (レクチン) とは、糖鎖を特異的に認識して結合し、架橋を形成するタンパク質の総称であり、そのような糖結合タンパク質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ConA (タチナタマメレクチン)、RCA120 (ヒママメレクチン)、WGA (小麦胚芽レクチン) などが挙げられる。

[0034] 上記の氷結晶化阻害剤は、氷結晶の結晶面に結合して、氷結晶の成長を抑制する。また、その結合は、氷結晶への自由水の更なる結合を阻止すること

によって氷結晶の成長を阻害する。

- [0035] このような性質を有する氷結晶化阻害物質を、例えば冷凍食品に添加して用いれば、食品に含まれる水の氷結晶化を抑制することで、当該食品の味の劣化などを防ぐことができる。例えば、澱粉老化を防止したり、食品中の水が氷結晶化してタンパク質や油脂成分などを物理的に圧迫し、その構造を変化させることによる味や品質などの劣化を抑制することができる。
- [0036] 本発明に係る上記氷結晶化阻害物質の製造方法は、分画分子量5,000以上の分離膜を用いて植物から氷結晶化阻害物質を分離する工程を含むことを特徴とする。
- [0037] 本発明の氷結晶化阻害物質は、抽出等によって植物から得られる氷結晶化阻害物質含有溶液を分離する工程を経て好適に回収することができるし、さらに、分離した溶液から氷結晶化阻害物質を精製する精製工程を経て好適に回収することもできる。
- [0038] 本発明に係る氷結晶化阻害物質を含んだ溶液を得る方法としては、特に限定されるものではないが、*Brassica juncea*種などの植物から、水または有機溶媒を用いて抽出することが好ましい。抽出に用いる植物の形態は、特に限定されるものではなく、植物体の全体でもよく、或いは、例えば、芽、葉、葉柄など、その一部分でもよい。
- [0039] 氷結晶化阻害物質を抽出するための溶媒は特に限定されるものではないが、水、親水性有機溶媒、超臨界二酸化炭素、亜臨界水などからなる群より選ばれる1以上の溶媒を好適に組み合わせて使用できる。親水性有機溶媒としては、例えば、メタノールやエタノール等が挙げられるが、食品加工に使用可能なものであることが好ましく、エタノール等が例示される。これらの溶媒の中でも、水およびエタノールが好ましい。また、水と有機溶媒を混合して用いることも可能である。水を用いる場合は、加温した水、特に、熱水を用いることが好ましく、有機溶媒を用いる場合は、加温した有機溶媒を用いることが好ましい。加温した水または有機溶媒の温度は、特に限定されない。下限は、0℃以上が好ましく、20℃以上がさらに好ましい。上限は、1

60°C以下が好ましく、120°C以下がさらに好ましい。その他、水性溶媒としては酢酸ナトリウム緩衝液などの種々の緩衝液や、アルコールと水との混合溶媒などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。抽出溶媒の種類や量は、抽出に処する植物体の種類や量により適宜選択することができる。

[0040] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、高分子の複合体であることから、植物から上記の手段によって分離した後、種々の限外濾過膜や透析膜などを用いた膜分離により容易に精製、回収することが可能である。その精製方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、逆浸透、限外濾過、精密濾過などを好適に組み合わせて用いることができる。膜分離の分画分子量は、特に限定されるものではない。目的物を膜非透過物の中に回収する場合の分画分子量の下限は5000以上が好ましく、10000以上がさらに好ましく、50000以上が極めて好ましく、100000以上が最も好ましく、上限が400000を超えない限り好適に用いることができる。膜分離法では分子量の小さい成分が選択的に膜を透過し、その結果、溶液中の分子量の大きい成分の精製、濃縮が達成されるが、実際には溶液中の溶質の膜表面付近への蓄積（濃度分極）や膜表面や細孔内への吸着などにより経時的にその透過性能は低下する。本発明の氷結晶化阻害物質を高分子側に回収する場合、使用する膜の分画分子量が5000未満では溶液中の夾雑成分の除去が不十分であり、また膜が目詰まりを起こしやすくなるため好ましくない。また、分画分子量が400000を超えると、分子量が400kDa以上である当該氷結晶化阻害物質の精製、回収が実質的に困難となるので、400000以下が好ましい。

[0041] 本発明の氷結晶化阻害物質は、必要に応じてさらに精製してもよい。例えば、デカンテーション、濾過、遠心分離などを好適に組み合わせて夾雑成分を除去してもよい。また、例えば、塩析や有機溶媒による沈殿や、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過などによる精製、透析や限外濾過などによる濃縮を好適に組み合わせて行

ってもよい。

- [0042] さらに必要により、粉末状または顆粒状など任意の形態に固形化してもよい。固形化の方法は特に限定されないが、例えば、上記の抽出物を噴霧乾燥や凍結乾燥などの常法に従って粉末化する方法や、抽出物を賦形剤に吸着、担持させて粉末または顆粒状に固形化する方法などを挙げることができる。これらの操作は当業者に公知のものであり、用途に応じて適宜選択して用いることができる。
- [0043] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、水が氷結晶化することで障害が生じる様々な分野において、この障害を抑制する目的で利用可能である。例えば、食品分野、機械分野、土木分野、化粧品分野、生体試料を用いる医療分野などで利用可能である。
- [0044] 食品分野では、食品に含まれる水の氷結晶化を抑制することで、当該食品の味の劣化などを防ぐことができる。例えば、澱粉老化を防止したり、食品中の水が氷結晶化して、タンパク質や油脂成分などを物理的に圧迫して、その構造を変化させることによる味や品質などの劣化を、抑制したりすることができる。
- [0045] 機械分野や土木分野では、機械の可動部、道路、地盤等の凍結防止剤として利用できる。
- [0046] 化粧品分野では、化粧品の品質の劣化などを防ぐための添加剤や皮膚の保護剤として利用できる。例えば、油脂成分を含む化粧品を凍結させると、当該化粧品に含まれる水が氷結晶化して、当該油脂成分を物理的に圧迫してその構造を壊すことがあり、品質や使用感が劣化する。本発明に係る氷結晶化阻害物質を用いれば、水の氷結晶化を防ぐことで油脂成分の構造が保持されるため、品質の劣化などを抑制することができる。
- [0047] 医療分野では、生体試料を凍結保存する際の保護剤として用いることができる。例えば、細胞、血液、血小板、臓器などの組織などの生体試料を従来公知の保存液に入れて凍結保存すると、保存液中の水分が凍結して氷結晶を生じ、当該氷結晶により生体試料が損傷することがある。しかし、本発明に

係る氷結晶化阻害物質を添加すれば、氷結晶の発生、成長を抑制することができるので、生体試料を氷結晶による損傷から保護することができる。

[0048] 本発明の氷結晶化阻害物質の形態は、その用途に応じて様々であり、そのまま、溶液、濃縮液、懸濁液、凍結乾燥物、粉末、顆粒、錠剤などであってもよい。

[0049] 次に、本発明に係る抽出物の活性測定法とタンパク質量の測定法について説明する。

[0050] 本発明の氷結晶化阻害物質の氷結晶化阻害活性の測定方法は、植物の種類などに応じて適宜適したものをを用いる。例えば、氷結晶構造の観察や氷結晶化阻害の直接の測定などの公知の方法にて行うことができ、何れかの方法で氷結晶化阻害活性の向上が認められる場合は、本発明範囲に含まれるものとする。氷結晶化阻害活性の測定は、例えば、ショ糖を30w/v%含む植物抽出物溶液を-40°Cに冷却した後、-6°Cまで温度を上げ、顕微鏡により観察した氷結晶の平均面積を測定することにより行うことができる。氷結晶化阻害活性が強いほどこの氷結晶の平均面積は小さくなることから、この数値を指標として、植物抽出物の氷結晶化阻害活性を定量的に評価することができる。対照に比べて、氷結晶化阻害物質を添加したときに氷結晶の形成が少しでも阻害されれば、氷結晶化抑制活性を有すると判断する。

[0051] 本発明の抽出物のタンパク質量の測定方法は、特に限定されるものではないが、例えばLowry法やビシンコニン酸（BCA）法、Bradford法（Coomassie法）などの公知の方法にて行うことができる。標準タンパク質としては、特に限定されないが、例えばウシ血清アルブミン（BSA）を好適に用いることができる。

[0052] 本発明に係る氷結晶化阻害物質は、植物から容易に得ることが可能である。このため、本発明に係る氷結晶化阻害物質は、生体にとって非常に安全性が高い。また、本発明に係る氷結晶化阻害物質は、精製も容易であり、工業上極めて簡便に製造することができる。さらに、本発明の氷結晶化阻害物質を食品に添加することにより、冷凍食品の品質維持などに役立てることがで

きる。また、本発明の氷結晶化阻害物質は、臓器や細胞、血液、血小板などの生体試料の凍結保存における生体試料保護剤や化粧品（皮膚の保護剤）などにも有効に用いることができる。

[0053] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された特許文献及び非特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

実施例

[0054] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された特許文献及び非特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。なお、実施例および比較例における部および%は特に規定しない限り重量基準である。

実施例 1

[0055] 市販のマスタード芽（湿重量：500g、村上農園製）を15℃で10日間冷却し、氷結晶化阻害タンパク質を馴化誘導した。次に、1000gの脱イオン水を加え、105℃で20分間抽出した。減圧濾過により抽出液を分離した後、これをエバポレーター（ロータリーエバポレーター；EYELA社製）にて濃縮し、抽出液（135mL）を得た。

実施例 2

[0056] 実施例1で得られた抽出液(50mL, タンパク質含量: 400mg)に活性炭(500mg)を加え、150rpmで30分間振とうした。次に、 $10,000 \times g$ で30分間遠心分離することにより活性炭を除去し、溶液(45mL)を回収した。

実施例 3

[0057] 実施例2で得られた溶液を限外濾過膜(Amicon Ultra-15, MILLIPORE社製)にて濃縮した。分子量10kDa以下のタンパク質を除去し、液量が10mLになったところで限外濾過処理を終了し、濾液(35mL)を得た。さらに、脱イオン水(6mL)で濾過膜洗浄し、濃縮液(16mL)を回収した。

実施例 4

[0058] 実施例1~3のそれぞれの溶液について、タンパク質濃度と氷結晶化阻害活性を測定した。タンパク質濃度の測定はBCA法により行った。

[0059] 氷結晶化阻害活性は、以下のとおり測定した。実施例1~3のそれぞれの溶液を、60w/v%のショ糖溶液と1:1(v/v)の割合で混合した。当該混合物(1 μ L)をカバーガラスで挟み込んだ。加熱冷却載物台(LINKAM社製, LK-600PM)を備えた光学顕微鏡(OLYMPUS社製, BX50)のガラスシャーレを20°Cに保ち、その上に上記カバーガラスを載せて、100°C/minの速度で-40°Cまで冷却した。次に、100°C/minの速度で-6°Cまで温度を上げた。-6°Cになった時を0分として、その後、光学顕微鏡をそのままの状態に保ち、30分後の画像を取り込んだ。また、対照として、30w/v%のショ糖溶液につき、同様に測定した。得られた画像中に存在する氷結晶の平均面積を算出し、これを氷結晶化阻害活性の指標とした。この結果を表1に示す。表1中、氷結晶の平均面積が小さいほど、氷結晶化阻害活性が強いことを示している。

[0060]

[表1]

	液量 (mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質量 (mg)	氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)
実施例1	135	8.0	1080	279
実施例2	45	1.5	68	264
実施例3濃縮液	16	1.0	16	214
実施例3濾液	35	1.3	46	566
対照	—	—	—	438

[0061] 表1から分かるように、マスタード芽抽出液の氷結晶化阻害活性は、活性炭処理の前後で維持されており、当該活性炭処理による精製は極めて有効であった。また、限外濾過による限外濾過濃縮液に氷結晶化阻害活性が認められる一方で、限外濾過後の濾液には活性は認められなかったことから、当該限外濾過による精製は極めて有効であった。

実施例 5

[0062] 実施例3で得られた濃縮液の溶媒を10mM Tris-HCl緩衝液(100mL, pH8.0)に置換した。この溶液(50mL)を、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラムであるDEAEカラム(1.6×10cm, GEヘルスケア社製)にチャージした後、1M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で溶出した。溶出液の流速は、5.0mL/minとした。また、溶出液におけるNaCl濃度を0Mから1Mまで徐々に高めた。その結果、NaCl濃度が約100mMおよび約150mMにおいてピークが得られた。以下、NaCl濃度:約100mMで得られた画分をDEAEピーク1、約150mMで得られた画分をDEAEピーク2という。それぞれの画分について、実施例4に記載の方法で氷結晶化阻害活性を測定した。対照として、30w/v%のショ糖溶液につき、同様に測定した。その結果を表2に示した。

[0063] [表2]

	DEAEピーク1	DEAEピーク2	対照
氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)	321	172	425

[0064] 表2の結果から、本条件下においてマスタード芽由来の水結晶化阻害物質がDEAEに吸着することは明らかである。また、強い水結晶化阻害活性が認められたピーク2のDEAEカラム吸着画分を、活性画分として回収した。

実施例 6

[0065] 実施例5で得られたDEAE吸着の活性画分（DEAEピーク2，100 μ L）を、氷温下にてアセトンで10倍に希釈し、溶液中に現れた析出物を10,000 \times gで15分間遠心分離することにより回収した。上清を除去し、析出物に50v/v%アセトン水溶液を添加し、攪拌した後、10,000 \times gで15分間遠心分離を行い、上清を回収した。液を乾固した後、固形分を蒸留水（100 μ L）で再溶解し、これをアセトン沈殿活性画分とした。このアセトン沈殿活性画分の水結晶化阻害活性を、実施例4に記載の方法で測定した。対照として、30w/v%のショ糖溶液につき、同様に測定した。その結果を表3に示した。

[0066] [表3]

	水結晶化阻害活性 (水結晶平均面積)
実施例6	87
対照	412

実施例 7

[0067] 実施例5で得られたDEAE吸着の活性画分（DEAEピーク2，1mL）の溶媒を、0.15M NaClを含む50mMリン酸緩衝液（pH7.0，500 μ L）に置換した。この溶液をゲル濾過カラム（Superdex 200，GEヘルスケア社製）にチャージし、流速0.3mL/minの条件で溶出した。その結果、440kDa以上の画分、158kDa以上440kDa未満の画分、43kDa未満の画分にそれぞれピークが得られた。以下、440kDa以上の画分をゲル濾過ピーク1、158kDa以上440kDa未満の画分をゲル濾過ピーク2、43kDa未満の画分をゲル濾過

ピーク3という。それぞれの画分について、実施例4に記載の方法で氷結晶化阻害活性を測定した。その結果を表4に示した。

[0068] [表4]

	ゲル濾過ピーク1	ゲル濾過ピーク2	ゲル濾過ピーク3	対照
氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)	178	367	258	430

[0069] 表4の結果から、分子量が440kDa以上のゲル濾過ピーク1に氷結晶化阻害活性が認められた。ゲル濾過ピーク1を、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー活性画分とした。マスタード芽由来の氷結晶化阻害物質の分子量が400kDa以上であることは明らかである。

実施例 8

[0070] 実施例1と同様の方法で調製したマスタード芽抽出液(700mL, タンパク質濃度8.0mg/mL)を、実施例3の方法に従って活性炭処理した上で濃縮し、溶液(50mL)を得た。この溶液の溶媒を10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0, 800mL)に置換した後、平衡化したDEAE担体(Bed volume: 180mL)と混合し、250rpmで1時間低速撹拌することで、バッチ操作により氷結晶化阻害物質を吸着させた。減圧濾過により非吸着画分を除去した後、180mL(1Bed volume分)の緩衝液で担体を洗浄した。さらに1M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で吸着画分を溶出し、溶液(200mL)を得た。この溶液を、脱イオン水(5L)で8時間ずつ3回透析し、限外濾過でさらに脱塩した後、脱イオン水を加えてその総量を200mLとした。

実施例 9

[0071] 実施例8で得られた氷結晶化阻害物質の脱イオン水溶液を、以下に示す氷結合物質濃縮操作に供した。すなわち、氷結晶化阻害物質を含んだ実施例8の脱イオン水溶液を循環冷却装置(ネスラブ社製)で低速循環させつつ、24時間で-0.5°Cから-2.0°Cまで冷却した。24時間後、生成した氷

結晶化阻害物質が吸着した氷を回収した。回収した氷を溶解させ、これを氷結晶化阻害物質濃縮液とした。

実施例 10

[0072] 実施例 8 および実施例 9 で得られたそれぞれの溶液について、実施例 4 と同様の方法でタンパク質濃度と氷結晶化阻害活性を測定した。対照として、30 w/v %のショ糖溶液につき、同様に測定した。その結果を表 5 に示した。

[0073] [表5]

	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質量 (mg)	氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)
実施例8 DEAE処理前	3.2	655	168
実施例8 DEAE処理後	0.7	45	156
実施例9 濃縮後	0.7	4.6	116
対照	—	—	440

[0074] 表 5 の結果から、実施例 9 の氷結合物質の濃縮操作によりタンパク質濃度あたりの氷結晶化阻害活性が顕著に増大していることが確認された。氷結晶化阻害物質が濃縮されたのは明らかである。また、透析工程で活性が安定に維持されていることから、当該氷結晶化阻害物質が透析膜を通過できないのは明らかであり、溶媒の置換や低分子物質の除去が極めて容易である。

実施例 11

[0075] 実施例 9 で得られた氷結晶化阻害物質濃縮液について、実施例 5 と同様の方法で DEAE カラム処理した。得られた吸着画分と非吸着画分について、実施例 4 に記載の方法で氷結晶化阻害活性を測定した。その結果を表 6 に示した。

[0076] [表6]

	氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)
実施例11 吸着画分	38
実施例11 非吸着画分	391
対照	412

[0077] 比較例 1

市販のマスタード芽（湿重量で400g）を馴化誘導せずに、実施例1と同様にして脱イオン水（800g）で抽出した。得られた抽出液を実施例1～6と同様の操作により、氷結晶化阻害物質が得られる画分に対応する画分を濃縮、精製し、比較例1の精製画分を得た。

実施例 12

[0078] 実施例6のアセトン沈殿活性画分、実施例7のゲル濾過カラムクロマトグラフィー活性画分、実施例11の吸着画分と非吸着画分、および比較例1の精製画分を、それぞれSDS-ポリアクリルアミドゲル（10-20%グラジエントゲル、アトー社製）にて、20mAで85分電気泳動した。電気泳動後のゲルを銀染色により染色し、タンパク質のバンドを視覚化した。ゲルの染色結果から、氷結晶化阻害活性物質が濃縮されている実施例6および実施例7の活性画分に、見掛けの分子量が34kDaのバンドが確認された。この34kDaのバンドは比較例1の精製画分には認められなかったことから、氷結晶化阻害活性を示す画分に特異的に含まれるタンパク質であることは明らかである。また、実施例11において、強い活性を示す吸着画分に71kDaの位置にバンドが確認された。このバンドは同実施例において、活性の殆ど見られない非吸着画分には存在しないことから、氷結晶化阻害活性を示す画分に特異的に含まれるタンパク質であることは明らかである。

[0079] また、実施例7のゲルろ過クロマトグラフィーで得られた活性画分は、分子量が400kDa以上の画分であることから、当該氷結晶化阻害物質が34kDaの分子量を有するサブユニットまたは71kDaの分子量を有するサブユニットを少なくとも一つ以上含んでなる複合体を形成していることは明らかである。

実施例 13

[0080] 実施例5で得られたDEAEカラム吸着画分（1mL）の溶媒を10mM Tris-HCl緩衝液（1mL, pH8.0）に置換した。この溶液（0.5mL）を同緩衝液で平衡化した、陰イオン交換カラムであるQカラム

(0.7 × 2.5 cm, GEヘルスケア社製) にチャージすると、氷結晶化阻害活性を有する画分はQカラムに吸着した。続いて1M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で溶出させると、氷結晶化阻害活性を有する画分はQカラムから溶出した。なお、この際、溶出液の流速を1.0 mL/minとした。本条件下で活性画分がQカラムに吸着することは明らかである。

実施例 14

[0081] 実施例5で得られたDEAEカラム吸着画分(1 mL)の溶媒を、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液(1 mL, pH6.0)に置換した。この溶液(0.5 mL)を、同緩衝液で平衡化したSPカラム(0.7 × 2.5 cm, GEヘルスケア社製)にチャージすると、氷結晶化阻害活性を有する画分はSPカラムに吸着しなかった。本条件下では、活性画分がSPカラムに吸着しないことは明らかである。

実施例 15

[0082] 実施例8で得られた氷結晶化阻害物質の脱イオン水溶液(5 mL)の溶媒を20mM Tris-HCl緩衝液(50 mL, pH7.4, 0.5M NaCl含む)に置換した後、平衡化したConAセファローズ担体(Bed vol: 5 mL)と混合し、スターラーにて200 rpmで1時間低速攪拌した。減圧濾過により非吸着画分を回収した後、280 nmの吸光度が0.05を下回るまで同緩衝液で洗浄を繰り返し、2Mグルコースを含むTris-HCl緩衝液(20mM, pH7.4, 0.5M NaCl含む)で吸着画分を溶出、回収した。得られた画分について実施例4と同様の方法で氷結晶化阻害活性を測定した結果を表7に示した。

[0083] [表7]

	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質量 (mg)	氷結晶化阻害活性 (氷結晶平均面積)
実施例11 ConA吸着画分	0.43	3.4	430
実施例11 ConA非吸着画分	0.4	0.4	348
対照	—	—	419

[0084] 表7の結果から、糖結合タンパク質であるConAの吸着画分に氷結晶化阻害活性が認められず、ConA非吸着画分に活性が認められたことから、当該氷結晶化阻害物質がConAセファロースに吸着しないことは明らかである。

請求の範囲

- [請求項1] 植物に由来し、かつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量が400kDa以上であることを特徴とする氷結晶化阻害物質。
- [請求項2] 複数のサブユニットから構成されるものである請求項1に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項3] 少なくとも1つのサブユニットの分子量が、SDS-PAGEで34000±500Daまたは71000±1000Daである請求項2に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項4] 植物が、アブラナ科、セリ科、ユリ科およびキク科に属する植物からなる群から選ばれる1以上の植物、または、これらの類縁品種もしくは改良品種である請求項1～3のいずれか1項に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項5] アブラナ科に属する植物が、ハクサイ、ダイコン、ブロッコリー、チンゲンサイ、コマツナ、カブ、シロナ、野沢菜、広島菜、ミズナ、および、マスタードからなる群から選ばれる1以上の植物、または、これらの類縁品種もしくは改良品種である請求項4に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項6] アブラナ科に属する植物が、マスタード (*Brassica juncea* 種)、または、これの類縁品種もしくは改良品種である請求項5に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項7] pH8において、陰イオン交換カラムに吸着するものである請求項1～6のいずれか1項に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項8] 陰イオン交換カラムがDEAEカラムである請求項7に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項9] 陰イオン交換カラムがQカラムである請求項7に記載の氷結晶化阻害物質。
- [請求項10] pH6において、陽イオン交換カラムに吸着しないものである請求

項 1～9 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質。

[請求項11] 陽イオン交換カラムがS Pカラムである請求項 1 0 に記載の氷結晶化阻害物質。

[請求項12] p H 7 . 4 において、糖結合タンパク質に吸着しないものである請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質。

[請求項13] 糖結合タンパク質がC o n Aである請求項 1 2 に記載の氷結晶化阻害物質。

[請求項14] 分画分子量 5 , 0 0 0 以上の分離膜を用いて植物から氷結晶化阻害物質を分離する工程を含むことを特徴とする、請求項1～13のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質の製造方法。

[請求項15] 限外濾過または逆浸透により分離する請求項 1 4 に記載の製造方法。

[請求項16] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質の一部であり、かつ氷結晶化阻害活性を有することを特徴とするポリペプチド。

[請求項17] S D S - P A G E で測定される分子量が 3 4 0 0 0 ± 5 0 0 D a または 7 1 0 0 0 ± 1 0 0 0 D a である請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

[請求項18] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質、および／または、請求項 1 6 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする氷結晶化阻害組成物。

[請求項19] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質、および／または、請求項 1 6 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする食品。

[請求項20] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質、および／または、請求項 1 6 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする生体試料保護剤。

[請求項21] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の氷結晶化阻害物質、および

／または、請求項 16～17のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする化粧品。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/059005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/415(2006.01) i, A23L1/03(2006.01) i, A23L3/36(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/415, A23L1/03, A23L3/36

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/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-153834 A (Kansai University), 21 June 2007 (21.06.2007), a whole article; example 1; fig. 4, 5; paragraphs [0015], [0018], [0019], [0026] (Family: none)	1-5, 16, 18-21 /1-21
Y	JP 2007-169246 A (Kansai University), 05 July 2007 (05.07.2007), a whole article; example 1; paragraph [0024] (Family: none)	1-21
Y	JP 2001-245659 A (Hitoshi OBATA), 11 September 2001 (11.09.2001), example 1 (Family: none)	1-21

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
14 July, 2010 (14.07.10)

Date of mailing of the international search report
27 July, 2010 (27.07.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/059005

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRIFFITH, M. and Mahmoud W. F. YAISH, Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities., Trends in Plant Science, 2004, Vol. 9, No. 8, p. 399-405	1-21
A	ORR, W. et al., Complementary DNA Sequence of a Low Temperature-Induced Brassica napus Gene with Homology to the Arabidopsis thaliana kin1 Gene., Plant Physiol., 1992, Vol. 98, p. 1532-1534	1-21
A	BOOTH, J. G. et al., Expression of a Low- Temperature-Induced Protein in Brassica napus., Plant Physiol., 1995, Vol. 108, p. 795-803	1-21
P,A	JP 2009-296902 A (Kaneka Corp.), 24 December 2009 (24.12.2009), (Family: none)	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K14/415 (2006.01)i, A23L1/03 (2006.01)i, A23L3/36 (2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K14/415, A23L1/03, A23L3/36

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/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (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 /Y	JP 2007-153834 A (学校法人 関西大学) 2007.06.21, 全体、実施例1、図4、図5、【0015】、【0018】、【0019】、【0026】段落 (ファミリーなし)	1-5, 16, 18-21/1-21
Y	JP 2007-169246 A (学校法人 関西大学) 2007.07.05, 全体、実施例1、【0024】段落 (ファミリーなし)	1-21
Y	JP 2001-245659 A (小幡 斉) 2001.09.11, 実施例1 (ファミリーなし)	1-21

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、一般的な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日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 14.07.2010	国際調査報告の発送日 27.07.2010
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) 濱田 光浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B 3763

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
A	GRIFFITH, M. and Mahmoud W. F. YAISH, Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities., Trends in Plant Science, 2004, Vol. 9, No. 8, p. 399-405	1-21
A	ORR, W. et al., Complementary DNA Sequence of a Low Temperature-Induced Brassica napus Gene with Homology to the Arabidopsis thaliana kin1 Gene., Plant Physiol., 1992, Vol. 98, p. 1532-1534	1-21
A	B00TH, J. G. et al., Expression of a Low-Temperature-Induced Protein in Brassica napus., Plant Physiol., 1995, Vol. 108, p. 795-803	1-21
P. A	JP 2009-296902 A (株式会社カネカ) 2009.12.24, (ファミリーなし)	1-21