

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6861422号  
(P6861422)

(45) 発行日 令和3年4月21日(2021.4.21)

(24) 登録日 令和3年4月1日(2021.4.1)

(51) Int. Cl.	F 1		
<b>A 6 1 K 36/07 (2006.01)</b>	A 6 1 K 36/07	Z N A	
<b>A 6 1 P 5/30 (2006.01)</b>	A 6 1 P 5/30		
<b>A 6 1 P 3/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/06		
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10	I O 1	
<b>A 6 1 P 13/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/00		
請求項の数 3 (全 34 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2019-506060 (P2019-506060)	(73) 特許権者	591173198 学校法人東京女子医科大学 東京都新宿区河田町8-1
(86) (22) 出願日	平成30年3月13日 (2018.3.13)	(73) 特許権者	500566567 株式会社インタートレード 東京都中央区新川一丁目17番21号 茅場町ファーストビル3F
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/009817	(73) 特許権者	301021533 国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(87) 国際公開番号	W02018/168879	(74) 代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
(87) 国際公開日	平成30年9月20日 (2018.9.20)	(72) 発明者	中西 敏雄 東京都新宿区河田町8-1 学校法人東京女子医科大学内
審査請求日	令和1年12月10日 (2019.12.10)		
(31) 優先権主張番号	特願2017-47723 (P2017-47723)		
(32) 優先日	平成29年3月13日 (2017.3.13)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロゲン様作用組成物と、これを含む医薬、飲食品、エストロゲン様作用組成物の製造方法およびハナピラタケのDNA塩基配列の利用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための医薬であって、ハナピラタケ菌系体の熱水抽出物を含むエストロゲン様作用組成物を含み、

前記障害および前記疾患は、更年期障害、泌尿生殖器障害、前立腺癌、前立腺肥大症、骨粗鬆症、動脈硬化、記憶障害、アルツハイマー病、血栓性疾患、内臓脂肪蓄積のうちの1種または2種以上であることを特徴とする医薬。

【請求項2】

エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための飲食品であって、ハナピラタケ菌系体の熱水抽出物を含むエストロゲン様作用組成物を含み、

前記障害および前記疾患は、更年期障害、泌尿生殖器障害、前立腺癌、前立腺肥大症、骨粗鬆症、動脈硬化、記憶障害、アルツハイマー病、血栓性疾患、内臓脂肪蓄積のうちの1種または2種以上であることを特徴とする飲食品。

【請求項3】

請求項1の医薬または請求項2の飲食品の製造方法であって、ハナピラタケ菌系体を熱水に接触させて熱水抽出物を得る工程を含むことを特徴とする製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、エストロゲン様作用組成物と、これを含む医薬、飲食品およびエストロゲン様作用組成物の製造方法およびハナビラタケのDNA塩基配列の利用法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

ハナビラタケ (*Sparassis crispa*) は、担子菌門ハラタケ綱タマシヨレイタケ目に属し、ハナビラタケ科のハナビラタケ属に分類されるキノコの一つである。ハナビラタケは、わが国では自生しているキノコを見つけることが難しいことから「幻のキノコ」と呼ばれて希少価値が高く、和食の食材として利用されており、海外では「カリフラワーマッシュルーム」と呼ばれておりフランス、中国では高級食材として利用されてきた。

10

## 【 0 0 0 3 】

また、天然のハナビラタケは漢方の素材として古くから利用されてきたが、最近では、我が国や中国では栽培品が市場に出てくるようになったが、品質管理が難しく、まだ十分に利用されているとは言い難い。例えば、ハナビラタケは子実体の外観が比較的単純であることから種レベルでの区別が簡単ではなく、二つ以上の分類群が混同されている場合がある。

## 【 0 0 0 4 】

ハナビラタケには、抗癌作用、抗菌作用、血管新生抑制作用、血糖降下作用、インスリン分泌促進作用、免疫活性などが報告されており（例えば、特許文献1など）、癌、感染症、糖尿病等に対する予防・改善効果が期待されている。

20

## 【 0 0 0 5 】

このため、ハナビラタケは、生または乾燥した子実体、あるいは子実体の抽出エキスが健康食品として食されている。その効果は、一般的には、ハナビラタケの子実体に含有される高分子多糖類である -D-グルカンなどや、フタリド化合物であるハナビラタケリド、セスキテルペノイド、スパラッソールなどの作用によるものと考えられている。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特開2006-117616号公報

## 【 非特許文献 】

30

## 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Chin, C.-S., Peluso, P., Sedlazeck, F. J., Nattestad, M., Concepcion, G. T., Clum, A., et al. (2016). Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing. *Nature Methods*, 13(12), 1050-1054. <http://doi.org/10.1038/nmeth.4035>

【 非特許文献 2 】 Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357-360. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.009>

【 非特許文献 3 】 Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290-295. <http://doi.org/10.1287/moor.16.2.351>

40

【 非特許文献 4 】 Stanke M, Morgenstern B (2005). AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Research* 33: W465-W467. pmid:15980513

【 非特許文献 5 】 Testa, A. C. (2015). CodingQuarry: highly accurate hidden Markov model gene prediction in fungal genomes using RNA-seq transcripts, 1-12. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1344-4>

【 非特許文献 6 】 Haas, B. J., Salzberg, S. L., Zhu, W., Pertea, M., Allen, J. E., Orvis, J., et al. (2008). Automated eukaryotic gene structure annotation using

50

EvidenceModeler and the Program to Assemble Spliced Alignments. *Genome Biology*, 9(1), R7. <http://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r7>

【非特許文献 7】Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. pmid:20003500

【非特許文献 8】Bairoch A, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E (2004) Swiss-Prot: juggling between evolution and stability. *Briefings in Bioinformatics* 5: 39-55. pmid:15153305

【非特許文献 9】Chen L, Gong Y, Cai Y, Liu W, Zhou Y, Xiao Y, et al. (2016). Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. *PLoS One* 11(8):e0160336. doi: 10.1371/journal.pone.0160336. 10

【非特許文献 10】Li L, Stoeckert CJ, Roos DS (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Research* 13: 2178-2189. pmid:12952885

【非特許文献 11】Kato K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780. pmid:23329690

【非特許文献 12】Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540-552. pmid:10742046 20

【非特許文献 13】Stamatakis A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313. pmid:24451623

【非特許文献 14】Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, et al. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715-1719. pmid:22745431

【非特許文献 15】Sanderson MJ (2003). r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19: 301-302. pmid:12538260 30

【非特許文献 16】Martinez D, Challacombe J, Morgenstern I, Hibbett D, Schmolli M, Kubicek CP, et al. (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):1954-1959. doi: 10.1073/pnas.0809575106

【非特許文献 17】Gaskell J, Kersten P, Larrondo LF, Canessa P, Martinez D, Hibbett D, et al. (2017). Draft genome sequence of a monokaryotic model brown-rot fungus *Postia* (*Rhodonina*) *placenta* SB12. *Genom Data* 14:21-23. doi: 10.1016/j.gdata.2017.08.003.

【非特許文献 18】Rong C, Zhao S, Li D, Wang L, Wang S, Ma K, et al. (2015). Cloning of the A Mating-Type Locus from *Lepista nuda* and Characterization of Its Genetic Structure. *Curr Microbiol.* 71(6):669-677. doi: 10.1007/s00284-015-0902-y. 40

【非特許文献 19】Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research* 40: W445-W451. pmid:22645317

【非特許文献 20】Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: D233-D238. pmid:18838391

【非特許文献 21】Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MD, Huang K, Chapman J, et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phaner* 50

ochaete chrysosporium strain RP78. Nat Biotechnol. 22(6):695-700.

【非特許文献22】Okada H, Abe M, Asakawa-Minemura M, Hirata A, Qadota H, Morishita K, et al. (2010). Multiple functional domains of the yeast 1,3-beta-glucan synthase subunit Fks1p revealed by quantitative phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants. Genetics 184(4):1013-1024. doi: 10.1534/genetics.109.109892

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

一方で、ハナビラタケの菌系体については、その培養の難しさから、その活性や有効成分についての報告はほとんどない。また、ゲノム解析の難しさからハナビラタケの全ゲノム解析データはまだ取得されていない。全ゲノム解析データを取得することができれば、有用遺伝子に関する情報だけでなく、近縁種や近縁株との区別や系統的な成分分析及び有効成分探索に利用するマーカーや多型情報などとして利用することが可能になる。

10

【0009】

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであり、ハナビラタケの菌系体の作用を明らかにし、ハナビラタケの菌系体由来の成分を含む組成物と、これを含む副作用の少ない医薬、飲食品などを安定的に提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明エストロゲン様作用組成物は、ハナビラタケ菌系体の熱水抽出物を含むことを特徴としている。

20

【0011】

本発明の医薬は、エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための医薬であって、前記エストロゲン様作用組成物を含むことを特徴としている。

【0012】

本発明の飲食品は、エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための飲食品であって、前記エストロゲン様作用組成物を含むことを特徴としている。

【0013】

本発明のエストロゲン様作用組成物の製造方法は、ハナビラタケ菌系体を熱水に接触させて熱水抽出物を得る工程を含むことを特徴としている。

30

【0014】

本発明のハナビラタケ菌系体の抽出物の品質管理、ハナビラタケの標準株の確立、エストロゲン様作用組成物の系統的な成分分析方法では、ハナビラタケ全ゲノム解析データを使用することを特徴としている。

【0015】

本発明のハナビラタケの有効性に関する利用法は、ハナビラタケのゲノムDNA塩基配列の情報を使用することを特徴とする。

【0016】

本発明のハナビラタケの有効性に関する利用法は、ハナビラタケの糖質関連酵素遺伝子のDNA塩基配列の情報を使用することを特徴としている。

40

【0017】

本発明のハナビラタケの有効性に関する利用法は、ハナビラタケのベータ-1,3-グルカン合成酵素遺伝子のDNA塩基配列の情報を使用することを特徴としている。

【0018】

本発明のエストロゲン様作用組成物は、エストロゲン様作用が、総コレステロール値、中性脂肪値および遊離脂肪酸値の低減による抗動脈硬化作用および内臓脂肪蓄積抑制であることが好ましい。

【発明の効果】

【0019】

50

本発明のエストロゲン様作用組成物、医薬および飲食品によれば、エストロゲン様作用によって、エストロゲンの欠乏による障害や疾患を治療または予防することができる。

【0020】

本発明のエストロゲン様作用組成物の製造方法によれば、エストロゲン様作用組成物を確実に得ることができる。

【0021】

本発明のハナビラタケ全ゲノム解析データの使用、ハナビラタケの有効性に関する利用法によれば、ハナビラタケ菌系体の抽出物の品質管理、ハナビラタケの標準株の確立、エストロゲン様作用組成物の系統的な成分分析などが可能である。これによって、エストロゲン様作用組成物の有効成分の安定供給が可能になり、また、有効成分の効果や量に関して品質管理を確実に行うことができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】ハナビラタケ (*S. crispa*) のゲノムの特徴を示す図である。(a)は、コンティグ、(b)はGC含量、(c)は遺伝子番号、(d)は遺伝子発現レベル、および(e)はセグメント重複部分を示す。GC含量は、20kbの重複しないウィンドウにおけるG + Cのパーセンテージとして計算した。遺伝子発現レベルは、赤色 (FPKM > = 100)、オレンジ色 (FPKM > = 10)、緑色 (FPKM > 0) および黒色 (FPKM = 0) で示されている。90%以上の配列類似性を有する大きなセグメントの複製は、オレンジ (配列長 > 5kb) および灰色 (配列長 > 2kb) の線で連結させている。

20

【図2】他の25種の菌類とハナビラタケ (*S. crispa*) の系統樹を示す図である。MYAは100万年前を示す。

【図3】ハナビラタケ (*S. crispa*) のmatAおよびmatB遺伝子座を示す図である。matAおよびmatB遺伝子座はそれぞれコンティグ1または10に位置している。

【図4】グリコシルトランスフェラーゼ (GT) の変異を示す図である。ハナビラタケ (*S. crispa*) (最も外側のリング)、*Phanerochaete chrysosporium* (外から2番目のリング)、*Postia placenta* (3番目のリング)、*Lentinula edodes* (最も内側のリング) の3つのグループを示す。

【図5】グリコシド加水分解酵素の多様性を示す図である。ハナビラタケ (*S. crispa*) (最も外側のリング)、*Phanerochaete chrysosporium* (外から2番目のリング)、*Postia placenta* (3番目のリング)、*Lentinula edodes* (最も内側のリング) の3つのグループを示す。

30

【図6】 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子およびタンパク質の構造を示す図である。(a)は、*S. crispa*におけるScrFKS1 (コンティグ5上) およびScrFKS2 (コンティグ4上) 遺伝子の構造を示している。イントロン-エクソン構造を上部に、トランスクリプトームマッピングの結果を下部に示す。転写の方向は矢印で示す。(b)は、ScrFKS1およびScrFKS2タンパク質の構造を示している。TMHMMによって予測された膜貫通ドメインは陰影を付けて示され、それらのクラスターはTM1およびTM2で表わされる。Pfamによって予測されるFKS1ドメイン (FKS1) およびグルカン合成酵素 (GS) に相同な領域は、それぞれオレンジ色または緑色で示されている。ScanPrositeによって予測されるN-グリコシル化部位は、白三角で示されている。エキソン-イントロン接合部は黒三角で示されている。

40

【図7】ハナビラタケ (*S. crispa*) の  $\alpha$ -グルカン合成酵素のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子ScrFKS1のヌクレオチド配列および推定されるアミノ酸配列が示されている。TMHMMによって予測された膜貫通ドメインは陰影付けて示されている。Pfamによって予測されるFKS1ドメインおよびグルカンシンターゼに相同な領域は、それぞれ、実線または斜線で示されている。ScanPrositeによって予測されるN-グリコシル化部位はボックス化されている。エキソン-イントロン接合部は、三角形 (aおよびb) で示されている。

【図8】ハナビラタケ (*S. crispa*) の  $\alpha$ -グルカン合成酵素のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子ScrFKS2のヌクレオチド配列

50

および推定されるアミノ酸配列が示されている。TMHMMによって予測された膜貫通ドメインは陰影付けて示されている。Pfamによって予測されるFKS1ドメインおよびグルカンシンターゼに相同な領域は、それぞれ、実線または斜線で示されている。ScanPrositeによって予測されるN-グリコシル化部位はボックス化されている。エクソン-イントロン接合部は、三角形で示されている。

【図9】ハナビラタケ菌糸体抽出物による細胞増殖効果を示した図である。

【図10】DNAマイクロアレイアッセイを用いて、E<sub>2</sub>とSCEおよびSCE-EtOAcサンプルの間で細胞を刺激した時のエストロゲン応答遺伝子の発現のプロファイルを示した図である。

【図11】E<sub>2</sub>、SCE10、SCE100、SCE-EtOAcについて、エストロゲン応答遺伝子を用いたクラーuster解析の結果を示した図である。

10

【図12】水分画に溶出したハナビラタケ菌糸体抽出物分画について逆相カラムを使用して得た溶出パターンを示す図である。

【図13】逆相カラムで分離した各分画のウェスタンブロット法によるリン酸化アッセイの結果を示した図である。

【図14】ハナビラタケ菌糸体培養乾燥物およびハナビラタケ菌糸体熱水抽出物SCE（抽出乾燥物）をマウスに単回経口投与した後の体重の推移を示した図である。

【図15】ハナビラタケ菌糸体培養乾燥物およびハナビラタケ菌糸体熱水抽出物SCE（抽出乾燥物）をマウスに単回経口投与した後の体重の推移を示した図である。

【図16】ハナビラタケ菌糸体培養乾燥物またはハナビラタケ菌糸体抽出乾燥物を6週間経口投与したApoE欠損マウスの血液生化学的検査の結果を示す図である。

20

【図17】ハナビラタケ菌糸体培養乾燥物またはハナビラタケ菌糸体抽出乾燥物を6週間経口投与したApoE欠損マウスの内臓脂肪の蓄積量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明者らは、ハナビラタケ菌糸体についての研究を進める中で、ハナビラタケ菌糸体の熱水抽出物がエストロゲン様作用を有しているという新規な知見を得た。したがって、ハナビラタケ菌糸体の熱水抽出物を含むエストロゲン様作用組成物を利用することで、エストロゲンの欠乏による障害や疾患の治療・予防のための医薬、飲食品を得ることができる。

【0024】

30

以下、本発明のエストロゲン様作用組成物と、これを含む医薬、飲食品およびエストロゲン様作用組成物の製造方法についてさらに詳しく説明する。

【0025】

本発明のエストロゲン様作用組成物は、ハナビラタケ菌糸体の熱水抽出物を含んでいる。「菌糸体」とは、菌糸の集合体であり、ここでは、いわゆるキノコと呼ばれるハナビラタケの「子実体」とは区別される。

【0026】

また、ハナビラタケ菌糸体は、菌糸体そのものであってもよいし、ハナビラタケの菌糸体の破砕物、磨砕物、組織破壊物、乾燥物、乾燥粉碎物などの処理物であってもよい。本発明で使用するハナビラタケ菌糸体は、その由来については特に制限はなく、自生したもの、人工培養物のいずれでもよいが、生産性を考慮すれば、人工培養物が好ましい。

40

【0027】

ハナビラタケ菌糸体の採取時期、生育年数、培養方法、培養期間などについても特に制限はない。ハナビラタケ菌糸体は培地成分の異なる生産方法により、活性の異なるものが得られるが、本発明においては、その中のいずれを用いてもよい。これは単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。活性が高いハナビラタケ菌糸体を組み合わせ使用すれば、より高い活性の発現が期待できる。

【0028】

なかでも、エストロゲン様作用組成物の品質を安定化させるためには、株式会社インタートレード社が培養し、標準化しているハナビラタケの菌糸体を使用することが好ましい

50

## 【0029】

本発明者らは、ハナビラタケ菌系体抽出物の品質管理の第一として、ハナビラタケ菌系体標準株を確立し、同株を用いることでハナビラタケ菌系体の安定供給や有効成分の効果や量に関して品質管理を容易にするために全ゲノム解析データを取得することに成功した。

## 【0030】

品質管理は、近年の食品や健康食品・医薬品の製造加工販売にとって重要な項目であり、信頼性のある科学的な手法を用いることが求められている。生物種・株に特有な性質はその遺伝子によって規定されることが多く、全ゲノム解析データを利用することにより多くの項目について迅速かつ簡便に比較を行うことが可能になる。

## 【0031】

そして、ハナビラタケの有効性に関する利用法として、本発明者らが初めて取得したハナビラタケのゲノムDNA塩基配列の情報、ハナビラタケの糖質関連酵素遺伝子のDNA塩基配列の情報、ハナビラタケのベータ-1,3-グルカン合成酵素遺伝子のDNA塩基配列の情報を使用することができる。このような情報を利用することにより、単に標準株を確立することの利点にとどまらず、高品質・高効能を有する生物種・株を探索し確立するための第1歩としても活用することができる。実際に、ハナビラタケには、種レベルでの区別が簡単ではないために二つ以上の分類群が混同されている場合があることから、例えば、後述する実施例で示されているハナビラタケの全ゲノム解析データは品質管理に利用することが有用である。このように、ハナビラタケ全ゲノム解析データなどは、ハナビラタケ菌系体の抽出物の品質管理、ハナビラタケの標準株の確立、エストロゲン様作用組成物の系統的な成分分析のために使用することができる。

## 【0032】

そして、ハナビラタケ菌系体を熱水に接触させて熱水抽出物を得ることができる。具体的には、熱水抽出条件は、室温以上、好ましくは60 以上の熱湯、あるいはアルコールなどを含む水（熱湯）であることが好ましく、例えば、ハナビラタケ菌系体を5分～20分程度煮沸する方法などを例示することができる。なお、本発明のエストロゲン様作用組成物の有効成分は水溶性であるため、有機溶媒を使用した抽出方法によっては溶出させることができない。

## 【0033】

例えば、このような熱水抽出条件で得られた抽出液を、適宜、乾燥、凍結処理などすることで熱水抽出物を得ることができる。

## 【0034】

本発明のエストロゲン様作用組成物は、エストロゲン様作用を有している。

## 【0035】

エストロゲンの欠乏は、女性の更年期障害や様々な疾患が引き起こされることが知られている。具体的には、例えば、女性は、閉経前はLDLコレステロールレベルが低い、閉経後はLDLコレステロールレベルが上昇するとともに動脈硬化が進むことが知られており、エストロゲンの欠乏がこれの主要な原因であることがわかっている。しかしながら、エストロゲン作用による悪影響として、発癌リスク、血栓リスクなどがあることが知られている。このため、女性の閉経後の動脈硬化の改善のためにエストロゲン治療を行うと、子宮内膜癌のリスクが増大するなどの副作用が報告されており、直接エストロゲンを投与することはむしろ危険であるとの指摘がなされている。このため、近年では、エストロゲンを直接治療に用いることに代えて、エストロゲンと同様の作用を示し、かつ、エストロゲンが示す強い発癌（癌細胞の増殖を含む）リスクが比較的少なく副作用の少ない大豆イソフラボンなどの植物由来のエストロゲン様物質を用いた動脈硬化の治療方法が注目されている。ただし、大豆イソフラボンは細胞増殖活性を有しているため、サイレントエストロゲンと同等ではない。

## 【0036】

例えば、厚生労働省の食品安全委員会報告「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方」（2006年5月：添付ファイル参照）には、「4.2.3.1 癌などのリスクに関する報告等」項で「なお、in vitro試験において大豆イソフラボンの摂取は、乳癌の発症に対しては抗エストロゲン作用を示すとの報告もある。」（35ページ）と記述がある一方で、厚生労働省の食品安全委員会新開発食品専門調査会による大豆イソフラボンの「1日の摂取量を30ミリグラム程度に抑えるべきだとする」（2006年1月31日）という発表もある。

【0037】

ここで、「エストロゲン様作用」とは、エストロゲンと同様の作用を意味し、例えば、抗動脈硬化作用などをいう。しかるに、本発明のエストロゲン様作用組成物は、エストロゲンの持つ良い作用を有している一方で、エストロゲンの持つ欠点を有していないことが本発明者らの研究により判明した。

10

【0038】

したがって、本発明のエストロゲン様作用組成物を含む医薬は、副作用の恐れがなく、エストロゲンの欠乏による障害、疾患の治療または予防に有効である。

【0039】

このように、エストロゲン活性を有するものの、癌細胞の増殖活性などのマイナスの活性を有していない化合物は、サイレントエストロゲンなどとも呼ばれている（Cell. Mol. Life Sci. 71:2065(2014)などを参照）。

【0040】

20

ここで、「エストロゲンの欠乏による障害」とは、例えば、更年期障害が挙げられ、本発明の医薬によれば、更年期障害による、自律神経失調症状（顔面紅潮、発汗、冷え性、睡眠障害、動悸、頭痛など）、精神症状（抑うつ、精神不安定、記憶力減退など）、その他の症状（肩こり、関節痛、腹痛、食欲不振、易疲労性など）（坂元正一他監修：プリンシプル産科婦人科学1．改訂版、メディカルビュー社、2001）を改善することができる。

【0041】

また、「エストロゲンの欠乏による疾患」には、例えば、萎縮性膀胱炎などの泌尿生殖器障害、前立腺癌、前立腺肥大症、骨粗鬆症、動脈硬化、記憶障害、アルツハイマー病、血栓性疾患などが含まれる。

【0042】

30

本発明の医薬は、エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための医薬であって、前述した本発明のエストロゲン様作用組成物と、薬学的に許容される成分とを含む。本発明の医薬を経口用固形製剤として調製する場合、本発明のエストロゲン様作用組成物に賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。

【0043】

そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものを用いることができる。

【0044】

40

賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ぶどう糖、でんぷん、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸などを例示することができる。

【0045】

結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ぶどう糖液、でんぷん液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどを例示することができる。

【0046】

崩壊剤としては、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、寒天末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖などを

50

例示することができる。

【0047】

滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ほう砂、ポリエチレングリコール等、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸などを例示することができる。

【0048】

また、経口用液体製剤を調製する場合は、本発明のエストロゲン様作用組成物に矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。この場合、矯味剤としては上記に挙げたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウムなどを例示することができ、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチンなどを例示することができる。

10

【0049】

本発明の医薬の投与量としては、患者の症状、体重、年齢等に応じて適宜設定することができる。

【0050】

また、本発明の飲食品は、エストロゲンの欠乏による障害または疾患を治療または予防するための飲食品であって、前述した本発明のエストロゲン様作用組成物と、各種の添加物を含む。

【0051】

飲食品としては、例えば、乳飲料、果汁加工飲料、栄養ドリンク、クッキー、キャンディーなどの各種食品、健康補助食品などを例示することができる。

20

【0052】

飲食品に配合される添加物としては、例えば、各種糖質、乳化剤、増粘剤、酸味料、果汁などを適宜添加することができる。

【0053】

具体的には、糖質としては、ショ糖、異性化糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール類、アスパルテーム、ステビア、アセスルファムカリウム、スクラロース等の高甘味度甘味料を例示することができる。

【0054】

乳化剤としては、例えば、グリセリン脂肪酸エステル、レシチンなどを例示することができる。

30

【0055】

増粘（安定）剤としては、例えば、カラギーナン、キサンタンガム、グァーガム、ペクチン、ローカストピーンガムなどを例示することができる。

【0056】

また、酸味料としては、クエン酸、乳酸、りんご酸などを例示することができ、果汁類としては、レモン果汁、オレンジ果汁、ベリー系果汁などを例示することができる。

【0057】

この他にも、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等のビタミン類やカルシウム、鉄、マンガン、亜鉛等のミネラル類など、各種の添加剤を添加することができる。

40

【0058】

また、本発明のエストロゲン様作用組成物の製造方法は、ハナピラタケ菌系体を熱水に接触させて熱水抽出物を得る工程を含む。

【0059】

この工程では、例えば、乾燥させたハナピラタケ菌系体を水に溶かし、室温以上、好ましくは60 以上の熱湯、あるいはアルコールなどを含む水（熱湯）で抽出することができる。より具体的には、例えば、ハナピラタケ菌系体を5分～20分程度煮沸する方法などを例示することができる。

50

## 【 0 0 6 0 】

また、本発明のエストロゲン様作用組成物の製造方法では、遠心処理によって分離する処理や、濾過処理、濃縮・乾固処理、凍結処理などを含むことができる。

## 【 0 0 6 1 】

本発明は、以上の実施形態に限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【 0 0 6 2 】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

## 【 0 0 6 3 】

<実施例 1> ゲノム構造と一般的特徴

ハナビラタケは未だ全ゲノム塩基配列の決定がされていない。ハナビラタケゲノムの標準化を図るためにハナビラタケの全ゲノム塩基配列の決定を行った。

## 【 0 0 6 4 】

ハナビラタケ全ゲノム解析データの使用例としては、系統樹による進化ゲノム解析、rRNA/tRNA/ncRNAおよびその遺伝子(DNA)を利用したDNA解析あるいはDNA鑑定、アロマ成分合成酵素類や グルカン合成酵素類など有用成分の合成酵素の変異・多型などを利用した有効成分解析、RNA-Seq法による包括的・網羅的な遺伝子解析、RNAi法あるいはゲノム編集による遺伝子のノックダウン・ノックアウトによる有用遺伝子(有効成分)の探索や有用成分の系統的な分類などが考えられる。これらの使用例およびその使用法は、本発明のエストロゲン様作用組成物に関して医薬品、飲食品およびエストロゲン様作用組成物の製造にとって優位性を与える。

## 【 0 0 6 5 】

( 1 ) ハナビラタケのDNA配列決定とゲノムアセンブリ

ハナビラタケ(*S. crispa*)の種菌株(Scrmy26株)の菌糸体の液体培養物はインタートレード社より提供を受けた。この菌糸体培養物よりゲノム抽出キット(Macherey-Nagel社: Nucleo Bond buffer set III)を用いてゲノムDNAを抽出した。*S. crispa*菌糸体(Scrmy26株)のゲノムは全ゲノムショットガン配列決定法を用いて配列決定した。

## 【 0 0 6 6 】

具体的には、P6-C4試薬、16 SMRT細胞を用いて、ハナビラタケ(*S. crispa*)ゲノムをPacBio RSIIプラットフォーム(Pacific Biosciences)で配列決定した(21.3Gbp (> 500 × coverage))。平均、N50、および生成されたデータの最長挿入リード長は、それぞれ9,616bp、13,871bp、および52,687bpであった。得られたリードのアセンブルは、Falconパイプラインを使用して、開発者によって作成された所定のパラメータセットをわずかに変更して行った(非特許文献1)。

## 【 0 0 6 7 】

アセンブリされたコンティグを、GenomicConsensusソフトウェアパッケージ(<https://github.com/PacificBiosciences/GenomicConsensus>)のArrowアルゴリズムを使用して得た。

## 【 0 0 6 8 】

ゲノム配列データは、Accession No. BFAD01000001-BFAD01000032 (PRJDB5582)として、DNA Database of Japan (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)のDDBJ BioProject Databaseに登録されている。

## 【 0 0 6 9 】

( 2 ) タンパク質をコードする遺伝子の予測と機能アノテーション

RNA-Seqリードは、最初にHISAT(非特許文献2)の参照ゲノムに整列させ、次いで転写配列を構築するためにStringTie(非特許文献3)によってアセンブルした。得られた15,184転写物を用いてハナビラタケ(*S. crispa*)の遺伝子モデルのパラメーターについてAUGUSTUS(非特許文献4)を使用し、RNA-seqマッピングデータから得られたエクソンおよびイントロンヒントを入力データとして実行した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 0 】

一方、真菌ゲノムの遺伝子を正確に予測するために開発されたCodingQuarry（非特許文献5）を使用して、上記のStringTie由来の転写配列を用いて遺伝子モデルを予測した。AUGUSTUS、CodingQuarry、およびStringTieによって予測された遺伝子モデルを組み合わせ、EvidenceModeler（非特許文献6）を用いて13,156のコンセンサス遺伝子モデルを構築した。全ての予測された遺伝子モデルは、アノテーションされた遺伝子との類似性に基づいて機能的にアノテートした。BLASTP（非特許文献7）を使用して、タンパク質配列をSwiss-Prot（非特許文献8）タンパク質データベースのNrおよび真菌の分類に、e-value <1e-5で整列させた。

## 【 0 0 7 1 】

## ( 3 ) 結果

約21.3Gbpのリード (> 500Xカバレッジ) をアセンブルすることによって、39.0Mbのゲノム配列が得られた (表 1)。

## 【 0 0 7 2 】

## 【表 1】

Number of Contigs	32	
Length of the genome assembly (Mb)	39.0	
GC content (%)	51.4	
Number of protein-coding genes	13,157	20
Average/Median gene length (bp)	1,648.1/1,308	
Average/Median protein-coding sequence size (bp)	1,326.1/1,044	
Average/Median number of exons per gene	5.7/4	
Average/Median exon size (bp)	233.6/137	
Average/Median intron size (bp)	73.4/55	

## 【 0 0 7 3 】

このゲノム配列アセンブリは、L50長が3.18Mbで、N50を示すコンティグが5つの、全部で32のコンティグから構成されていた (図 1、表 2)。

## 【 0 0 7 4 】

## 【表 2】

Contig total number	32	
Contig size (bp)	39,020,349	
Contig mean length (bp)	1,219,386	
Contig maximum length (bp)	4,666,114	
Contig minimum length (bp)	23,725	
Contig N50	5	
Contig L50 (bp)	3,179,637	40
Contig N90	15	
Contig L90 (bp)	1,017,009	

## 【 0 0 7 5 】

コンティグ数とキノコに予想される染色体の数に基づいて、ゲノムサイズが得られたサイズに近いと予測した。合計で、13,157のタンパク質コード遺伝子が予測され、遺伝子の平均長は1,669.3bpであり、平均エクソン数は5.7であった (表 3)。

## 【 0 0 7 6 】

【表3】

Genes Total	13,157
Average Gene length (bp)	1,669.3
Gene Size (bp)	17,446,980
Transcripts Total	13,157
Average Transcripts length (bp)	1,326.1
Exons per genes	5.7
Protein Total	13,157
Average Protein length (bp)	441.0

10

## 【0077】

ハナビラタケ (*S. crispa*) のゲノム中の遺伝子の数は、他の糸状菌のゲノムの遺伝子の数と同等であった (非特許文献9)。予測された遺伝子は、平均長が1.3kbの転写物および平均長が147アミノ酸のタンパク質を形成する。

## 【0078】

<実施例2>他の菌類ゲノムとの比較

予測されたハナビラタケ (*S. crispa*) のプロテオームを、配列決定されている25の糸状菌と比較した。

## 【0079】

20

(1) 系統樹の作成と遺伝子ファミリー発現解析

ハナビラタケ (*S. crispa*) とともに担子菌類 (Basidiomycota) または子囊菌類 (Ascomycota) に分類される26種の菌種を系統発生分析に用いた。これらの26種の菌類のタンパク質配列を、BLASTPにより、 $e$ 値 $<1e-5$ 、ヒット数 $<500$ と比較した。次いで、オーソログ遺伝子を得るためのデフォルトパラメータを用いてOrthoMCL (非特許文献10) によって、895のシングルコピーオーソログ遺伝子を決定した。これらの895の遺伝子のマルチ配列アラインメントをMAFFT v7.309 (非特許文献11) ソフトウェアによって計算し、それぞれの種についてひとつの長い配列にまとめた。次に、アラインメントされた配列の中で保存されたブロック領域を、デフォルトパラメータを用いてGblock 0.91b (非特許文献12) により選別し、最終アラインメント長として221,266aaが得られた。

30

## 【0080】

アラインメントを入力し、RAxML-8.2.9 (非特許文献13) ソフトウェアを用いて1000回のブートストラップ解析により系統樹を構築した。分子時計分析において3つのfossil較正点 (非特許文献14) を固定した。

## 【0081】

最も最近の共通祖先 (MRCA) *Coprinopsis cinerea*、*Laccaria bicolor*および*Schizophyllum commune*は122.74 MYAで分岐した。*Serpula lacrymans*と*Coniophora puteana*のMRCAは104.23 MYAで分岐した。*Pichia stipitis*、*Aspergillus niger*、*Cryphonectria parasitica*、*Stagonospora nodorum*および*Trichoderma reesei*のMRCAは517.55 MYAで分岐した。

40

## 【0082】

次に、他のノードの分岐時を、TNアルゴリズム、PL法、クロスバリデーションにより1.8に設定したr8s v1.81 (非特許文献15) ソフトウェアにより計算した。

## 【0083】

(2) 結果

ハナビラタケ (*S. crispa*) の進化の歴史は、OrthoMCL分析によって得られたこれらの26の菌類で保存された895の単一コピーオーソログ遺伝子を用いて構築された系統樹 (図2) で調べた。

## 【0084】

分子時計解析により、褐色腐朽菌である*Postia placenta* (非特許文献16、非特許文献1

50

7) が進化的にハナビラタケ (*S. crispa*) に最も近い菌類であり、それらの分岐は9400万年前 (94 MYA) であると推定された。

【0085】

<実施例3>交配型遺伝子座の解析

ハナビラタケ (*S. crispa*) のゲノム配列における2つの交配型遺伝子座A、Bが異なるコンティグ上に同定された。

【0086】

(1) matAおよびmatB遺伝子の同定。

【0087】

matA遺伝子は、*Coprinopsis cinerea*および*Schizophyllum commune*のmatAおよびMIP (ミトコンドリア中間体ペプチダーゼ) 遺伝子にゲノムタンパク質配列をマッピングすることによって同定された。フェロモン受容体遺伝子は、キーワード「フェロモン受容体」を有するSwiss-Protアノテーションによって同定された。フェロモン前駆体の長さは短く、通常は50~60aaであるため、通常のゲノムアノテーションの手順では予測できない。これらの配列は、Pfam検索 (<https://pfam.xfam.org/>) を用いたTransdecoder (<https://transdecoder.github.io/>) ソフトウェアによってフェロモン受容体遺伝子の約20kbフランキング領域で検索した。PF08015.9にアノテーションされたORF (open reading frame) はフェロモン前駆体遺伝子であった。

【0088】

(2) 結果

A型交配型遺伝子座は、HD1およびHD2ホメオドメイン転写因子および*Coprinopsis cinerea*および*Schizophyllum commune*のMIP遺伝子との相同性検索によって同定され、MIPについては相対的に高いタンパク質相同性 (66~67%同一性) が見い出され、HD1およびHD2については低い相同性 (28~34%同一性) が見出された (図3、表4)。

【0089】

【表4】

	Gene	ID	Scaffold	Strand	Start	End	Protein length (aa)
<i>matA</i> -related genes							
	HD1	evm_000000F arrow.597.2	000000F arrow	-	1768661	1770872	665
	HD2	evm_000000F arrow.598	000000F arrow	+	1771134	1773073	595
	mip	evm_000000F arrow.599	000000F arrow	-	1773895	1776400	776
<i>matB</i> genes							
	sc_pr1	evm_000009F arrow.285	000009F arrow	+	807358	808999	456
	sc_pr2	evm_000009F arrow.286	000009F arrow	-	809633	811247	467
	sc_pp1	pp1	000009F arrow	-	812739	812882	48
	sc_pr3	evm_000009F arrow.287	000009F arrow	-	813657	815134	405
	sc_pr4	evm_000009F arrow.288	000009F arrow	+	815483	816973	412
	sc_pr5	evm_000009F arrow.289	000009F arrow	-	817406	818732	334
	sc_pp2	pp2	000009F arrow	+	819334	819462	43
	sc_pp3	evm_000009F arrow.290	000009F arrow	+	821494	821676	61
	sc_pr6	evm_000009F arrow.293	000009F arrow	+	828813	830599	557
	sc_pr7	evm_000009F arrow.298	000009F arrow	+	844144	845807	466

【0090】

しかしながら、3つの遺伝子はすべて同じコンティグ上に近接して位置することが見出された (コンティグ1)。また、HD1およびHD2遺伝子 (異なる鎖上にあり、特徴的な外向きの転写方向を示す) の配置が類似しており (非特許文献18)、それらが機能的であることを示唆している。

【0091】

一方、コンティグ10 (図3、表4) 上にマップされたB型交配型遺伝子座について、合計7つのフェロモン受容体遺伝子および3つのフェロモン前駆体遺伝子が見出された。

【0092】

<実施例4> CAZymesおよびグリコシルトランスフェラーゼ

10

20

30

40

50

ハナビラタケ (*S. crispa*) のゲノムにおいて、合計246の糖質関連酵素 (CAZymes) が同定された。

【 0 0 9 3 】

( 1 ) CAZymesの特定

糖質関連酵素 (CAZymes) は、dbCAN HMM 5.0 (デフォルトカットオフ閾値の条件) によるHMM検索およびCAZyデータベースのBLASTP検索 (非特許文献20) (e値  $1e-6$ ; 分数比  $>= 0.2$ 、最大ヒット数 = 500) によってそれぞれ別々に分類された。

【 0 0 9 4 】

次に、*L. edodes* (非特許文献9) の研究で使用された閾値を用いてスクリーニングされたBLASTP結果を共通の結果に加えて、最終的なCAZymeアノテーションを得た。したがって、ここで使用された同定プロセスは、CAZyシステム (非特許文献20) によって採用された同定プロセスとは異なり、以前に公表された結果と時折矛盾する可能性を示唆している。

10

【 0 0 9 5 】

( 2 ) 結果

ハナビラタケ (*S. crispa*) のゲノム中に、131のグリコシド加水分解酵素 (GH)、10の炭水化物エステラーゼ (CE)、61のグリコシルトランスフェラーゼ (GT)、4の多糖リアーゼ、19の炭水化物結合モジュール (CBM) および31の補助活性酵素 (AA) を含む合計246個の糖質関連酵素遺伝子 (CAZymes) 候補が特定された。

【 0 0 9 6 】

ハナビラタケ (*S. crispa*) におけるCAZymesの分布を他の25種の真菌と比較した。

20

【 0 0 9 7 】

【表 5】

Gene distribution of *Calyx* In *Sporozoa* crops and the other 25 fungi

species	GH	GT	PL	CE	CMB	AA	Genes	GH0	GH1	GH2	GH3	GH5	GH6	GH7	GH8	GH9	GH10	GH11	GH12	GH13	GH15	GH16	GH17	GH18	GH20	GH23	GH24	GH25
leda	249	75	9	30	62	83	464	1	3	4	13	21	1	4	0	1	3	2	4	12	7	29	6	13	3	1	0	1
glax	323	87	14	49	101	153	672	0	3	4	15	27	1	7	0	1	5	4	3	12	4	33	4	26	5	1	0	4
mor	330	77	20	63	68	169	699	1	3	4	18	33	5	5	0	1	8	2	5	7	3	35	2	25	2	1	0	1
scorn	238	76	16	41	41	78	470	0	3	4	12	16	1	2	0	1	5	1	1	12	3	34	2	15	3	2	0	1
ccdm	192	74	13	48	90	122	493	0	2	2	7	25	5	6	0	1	6	6	1	8	3	29	3	9	2	1	6	0
fbuc	164	71	7	21	35	49	329	0	0	2	2	20	0	0	0	1	0	0	3	9	2	30	3	11	1	1	3	0
abls	176	55	9	37	47	93	387	0	1	2	7	19	1	1	0	1	2	2	2	6	2	24	3	13	4	1	1	4
wvol	222	62	25	34	86	114	476	0	3	2	11	20	5	11	0	1	18	0	2	9	3	22	3	14	1	1	1	3
post	237	66	23	32	84	132	528	0	3	3	12	21	3	15	0	1	3	2	2	9	3	25	1	12	2	1	3	2
cpnt	243	59	3	25	36	60	408	1	3	5	13	20	1	2	0	1	3	0	4	5	2	23	1	26	4	1	0	2
silac	169	66	6	20	34	45	321	0	3	2	10	20	1	0	0	1	1	0	2	6	2	19	1	11	2	1	0	1
dsqu	221	69	11	30	52	100	450	0	4	4	8	19	1	3	0	0	5	0	3	8	2	32	1	20	4	1	0	2
tver	222	83	9	24	56	103	456	0	2	5	12	22	1	4	0	1	6	0	5	6	4	29	1	20	5	1	0	1
scri	131	61	4	10	19	31	246	1	2	3	7	15	0	0	0	0	1	0	2	5	2	19	1	11	3	1	0	0
ppla	144	65	5	12	29	49	290	1	2	3	6	17	0	0	0	0	3	0	2	6	2	22	1	11	3	1	0	0
pchr	185	68	6	25	61	98	403	1	2	2	10	19	1	7	0	1	6	1	2	8	2	21	1	11	4	1	0	1
gtra	201	64	9	22	24	54	361	1	5	4	10	19	0	0	0	1	3	0	2	8	2	27	1	11	4	1	0	2
cneg	103	69	3	8	16	18	210	1	0	0	7	10	0	0	0	1	0	0	0	9	2	13	1	4	1	1	0	0
umay	110	61	1	19	15	30	228	0	0	1	3	12	0	0	1	1	2	1	0	4	1	22	2	4	2	1	0	1
cpar	294	92	10	47	41	99	551	1	3	6	16	15	2	5	0	0	4	4	5	11	2	17	6	10	2	0	1	0
ncra	183	80	4	25	53	65	370	2	1	5	10	6	3	5	0	0	4	2	1	9	2	15	5	12	1	0	0	1
tree	206	90	5	19	48	59	392	1	2	7	13	8	1	2	0	0	1	3	2	4	2	16	4	20	3	0	1	1
anig	257	116	8	29	55	109	536	1	3	6	18	11	2	2	0	0	1	4	4	17	2	13	5	13	3	0	0	0
snod	254	86	10	53	56	129	553	2	2	10	15	19	4	5	0	0	7	7	3	6	3	15	7	12	3	0	0	0
peti	78	81	0	5	9	14	182	3	0	3	8	7	0	0	0	0	1	0	0	6	1	6	5	4	1	0	0	0
scor	58	66	0	2	14	10	144	4	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	9	1	5	4	2	0	0	0	0

Note: apertures is marked by red color, and polyphenols is marked by green color.

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

【表 6】

	GH26	GH27	GH28	GH29	GH30	GH31	GH32	GH33	GH35	GH36	GH37	GH38	GH39	GH42	GH43	GH44	GH45	GH47	GH49	GH51	GH53	GH54	GH55	GH62	GH63	GH64	GH65	GH67
1	6	14	1	4	5	0	0	4	0	2	1	0	0	7	0	0	7	0	3	2	0	3	0	1	0	0	0	
0	6	19	1	6	10	0	0	5	0	2	1	1	0	11	1	0	10	0	5	1	1	2	1	2	0	0	0	
0	4	13	3	6	7	1	0	6	0	2	1	0	0	16	3	2	9	0	3	1	0	3	0	1	0	0	0	
1	1	3	2	5	4	1	0	4	0	2	1	0	0	18	0	1	6	0	2	1	0	2	1	1	0	0	0	
0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	4	1	0	8	0	1	1	0	1	3	2	0	0	0	
0	1	6	0	7	4	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	
0	4	5	1	3	6	0	0	1	0	2	1	0	0	4	1	0	7	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	
0	2	3	0	3	6	0	0	4	0	2	1	0	0	14	1	0	7	0	3	1	0	2	0	2	0	0	0	
0	6	6	0	2	8	1	0	4	0	2	1	0	0	8	1	2	9	0	3	1	0	2	1	1	0	0	0	
0	3	13	4	7	11	1	0	2	0	3	1	0	0	6	0	0	9	0	3	1	0	4	0	1	0	0	0	
0	3	7	1	2	5	0	0	3	0	2	1	0	0	2	0	0	5	0	1	1	0	5	0	2	0	0	0	
0	5	7	0	2	6	2	0	3	0	2	1	0	0	7	1	0	5	0	2	1	0	2	0	2	0	0	0	
0	3	10	0	4	5	3	0	2	0	2	1	0	0	3	0	1	5	0	2	1	0	2	0	1	0	0	0	
0	3	3	0	2	4	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	6	0	1	1	0	2	0	1	0	0	0	
0	3	8	0	3	4	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	5	0	1	1	0	3	0	1	0	0	0	
0	3	5	0	2	6	0	0	3	0	2	1	0	0	4	0	0	5	0	2	1	0	2	0	1	0	0	0	
0	3	10	1	3	5	1	0	2	0	2	1	0	0	5	0	0	4	0	3	2	0	2	0	1	0	0	0	
0	0	1	0	0	3	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	0	2	3	2	0	1	0	2	2	0	1	3	0	3	3	0	2	0	0	1	1	1	0	0	0	
1	4	21	3	3	5	1	1	5	1	1	1	0	1	19	0	0	9	1	2	2	1	3	0	1	4	1	1	
1	0	2	0	2	5	2	0	2	0	2	1	0	0	7	0	1	8	0	1	1	1	6	0	1	2	0	1	
0	5	4	0	5	4	0	0	1	1	2	1	1	0	2	0	1	8	0	0	0	0	2	6	1	2	3	2	
1	5	20	1	1	7	5	1	5	1	1	1	0	0	10	0	0	5	0	3	2	1	3	1	1	0	1	1	
0	2	4	0	2	10	4	0	4	1	2	1	0	0	13	0	2	9	0	2	1	1	3	3	2	1	1	1	
0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

【表 7】

	GH71	GH72	GH74	GH75	GH76	GH78	GH79	GH81	GH85	GH88	GH89	GH92	GH93	GH94	GH95	GH105	GH106	GH109	GH114	GH115	GH121	GH121	GH127	GH128	GH130	GH131	
8	1	1	1	1	4	2	6	0	1	1	0	5	1	0	2	4	2	6	0	1	0	1	2	5	0	2	
5	1	1	3	4	3	9	0	1	1	0	7	2	0	2	6	1	12	0	1	0	1	0	1	4	8	0	2
5	1	2	1	5	3	6	0	1	3	0	5	0	0	4	15	5	13	1	2	0	1	4	6	0	3		
10	1	1	0	6	3	2	1	1	1	0	5	2	0	2	8	0	5	1	3	0	1	3	5	0	2		
4	2	1	0	0	0	5	0	2	1	0	3	0	0	0	5	0	5	0	1	0	1	0	4	0	2		
4	5	0	0	1	0	10	0	1	1	0	2	0	0	1	9	0	2	0	0	0	0	0	6	0	1		
3	1	1	0	1	4	6	0	1	1	0	5	0	0	1	5	0	5	0	2	0	1	1	2	0	0		
2	1	1	0	0	0	5	0	3	1	0	4	0	0	2	5	0	6	0	3	0	1	0	4	0	2		
5	1	3	0	3	2	7	0	1	1	0	6	0	0	1	4	0	12	0	1	0	1	1	4	0	2		
6	1	0	0	6	2	4	1	1	1	2	4	1	0	1	2	0	4	1	2	0	1	2	10	0	2		
4	2	1	0	2	2	5	0	1	1	2	3	0	0	1	4	0	7	0	1	0	1	1	5	0	2		
4	1	1	0	1	4	13	0	1	1	1	5	1	0	1	3	0	7	0	2	0	1	1	4	0	3		
5	1	1	0	0	3	11	0	1	1	1	4	0	0	1	3	0	8	0	2	0	1	1	4	0	3		
3	2	0	0	0	0	3	0	1	1	2	2	0	0	1	2	0	7	0	1	0	1	0	3	0	0		
2	2	0	0	0	3	2	0	1	1	1	3	0	0	1	1	0	6	0	1	0	1	0	4	0	0		
3	1	4	0	0	1	7	0	1	1	2	4	0	0	1	4	0	7	0	1	0	1	1	4	0	3		
6	1	1	0	4	2	6	1	1	1	0	4	0	0	1	6	0	8	0	2	0	1	2	6	0	1		
4	1	0	0	0	3	4	0	0	2	0	1	0	0	0	3	1	12	1	1	0	0	0	6	0	0		
0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	2	0	5	0	1	0	1	0	5	0	0		
3	8	2	1	11	6	7	1	0	0	0	7	3	1	2	3	2	11	2	2	0	5	3	5	0	4		
6	5	1	1	10	1	2	1	0	0	0	2	2	1	0	2	0	9	1	1	1	3	0	4	0	3		
4	5	1	3	8	1	4	2	0	0	2	7	0	0	4	2	1	8	0	1	0	2	1	4	0	0		
7	7	1	2	11	7	3	1	0	1	0	5	0	0	2	2	2	14	2	0	0	1	1	2	0	1		
1	7	0	1	7	4	2	1	1	1	0	7	2	1	2	2	0	8	1	1	0	4	1	4	0	5		
0	5	0	0	5	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1	0	0	1	0	0		
0	5	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【表 8】

	GH13	GH139	GT1	GT2	GT3	GT4	GT5	GT8	GT15	GT17	GT18	GT20	GT21	GT22	GT24	GT25	GT28	GT31	GT32	GT33	GT34	GT35	GT39	GT41	GT47	GT48	GT49	GT50	GT54	GT55	
0	1	6	12	1	4	3	3	10	1	0	3	1	3	1	3	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	2	1	0	0	
0	1	9	13	1	4	4	7	11	1	0	3	1	4	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	
0	1	8	14	1	4	1	3	9	2	0	3	1	3	1	1	1	1	1	2	1	0	1	3	0	0	3	1	1	0	0	
0	1	5	13	1	4	2	4	6	1	1	3	1	3	1	2	1	1	1	3	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	0	
0	1	3	14	1	4	1	5	6	0	0	3	1	4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	0	
0	1	3	13	1	5	1	6	7	1	0	3	1	2	1	0	1	1	1	1	1	0	1	4	0	0	2	0	1	0	0	
0	1	2	11	1	3	1	2	3	1	0	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	0	
0	1	4	12	1	4	1	3	5	0	0	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	0	
0	1	1	12	1	4	1	7	4	1	2	3	1	3	1	1	1	1	1	0	1	0	1	3	0	0	2	1	1	0	0	
0	1	3	12	1	3	0	3	2	0	0	3	1	4	1	4	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	3	1	1	0	0	
0	1	2	16	1	4	1	3	3	0	0	3	1	3	1	1	1	1	1	2	1	0	1	3	1	0	2	1	1	0	0	
0	1	6	11	1	5	1	5	6	1	0	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	2	0	2	1	1	0	0	
0	1	18	15	2	4	1	5	5	1	0	3	1	4	1	1	0	1	1	1	1	0	1	3	1	0	2	1	1	0	0	
0	1	1	13	1	4	1	6	3	0	0	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	1	0	3	1	1	0	0	
0	1	1	15	1	4	1	7	3	0	0	3	1	4	1	0	1	1	1	1	1	0	1	3	1	0	2	1	1	0	0	
0	1	5	13	1	4	1	8	2	1	0	3	1	4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	3	1	0	2	1	1	0	0	
0	1	2	13	1	5	1	3	4	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	2	1	0	1	3	0	0	3	1	1	0	0	
0	1	3	10	1	5	1	5	1	0	0	2	1	4	1	0	0	3	8	1	0	1	3	0	1	1	0	1	0	0	0	
0	1	3	12	1	4	0	2	2	1	0	3	1	4	1	0	0	3	2	1	0	0	3	0	0	1	0	1	0	0	0	
2	1	7	11	1	5	3	4	3	2	0	3	1	4	1	2	1	4	5	1	2	1	3	1	0	1	0	1	0	1	0	
2	1	4	12	1	6	2	2	5	1	0	3	1	4	1	2	0	4	4	1	3	1	3	1	0	1	0	1	0	1	0	
2	1	5	11	1	5	0	3	4	1	0	4	1	4	1	1	1	5	11	1	2	1	3	1	0	1	0	1	0	0	0	
2	1	10	13	1	8	5	4	3	0	0	6	1	3	1	5	0	6	12	1	3	1	3	1	0	1	0	1	0	1	2	0
1	1	7	12	1	5	0	6	3	0	0	3	1	4	1	2	0	6	4	1	6	1	3	1	0	1	0	1	0	1	1	0
3	1	1	7	1	3	0	3	6	0	0	3	1	4	1	0	0	0	3	1	2	1	5	0	0	3	0	1	0	0	0	0
5	1	1	5	2	3	0	3	9	0	0	4	0	4	1	0	0	0	4	1	2	1	7	0	0	3	0	1	0	0	0	0

【 0 1 0 1 】

10

20

30

40

【表 9】

	GT57	GT58	GT59	GT62	GT64	GT66	GT69	GT71	GT76	GT90	GT91	PL1	PL3	PL4	PL7	PL8	PL9	PL14	PL20	PL22	CE0	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE8	CE9	CE12	CE14	CE15	CE16	
2	1	1	0	0	1	2	0	1	5	0	3	0	1	2	0	0	3	0	0	0	0	3	0	1	6	0	3	1	2	1	1	10	
2	1	1	0	0	1	2	0	1	6	0	4	1	2	3	1	0	3	0	0	0	0	6	1	0	15	3	6	1	3	0	2	12	
2	1	1	0	0	1	2	0	1	4	0	10	4	2	0	1	0	3	0	0	0	3	1	0	26	3	7	2	7	1	2	11		
2	1	1	0	0	1	3	0	1	6	0	5	4	3	0	1	1	2	0	0	0	11	0	0	9	2	2	1	2	1	2	11		
2	1	1	0	0	1	5	0	1	7	0	1	2	2	0	1	0	7	0	0	0	5	1	3	18	6	0	1	1	1	1	7	5	
2	1	1	0	0	1	2	0	1	7	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0	0	1	0	0	11	1	4	0	0	1	0	3		
2	1	1	0	0	1	2	0	0	3	0	2	1	1	0	1	0	4	0	0	0	2	0	0	11	6	2	1	2	1	1	11		
2	0	1	0	0	1	2	0	0	5	0	10	4	2	0	5	0	4	0	0	0	5	0	3	10	1	3	1	1	0	1	9		
2	1	1	0	0	1	2	0	1	5	0	10	3	2	0	4	0	4	0	0	0	3	1	0	12	0	2	1	2	1	1	9		
2	1	1	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	11	1	2	1	0	1	0	1	0	8	
2	1	1	0	0	1	3	0	1	4	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	1	2	0	8	0	2	1	0	1	0	1	0	5
2	1	1	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	1	0	3	0	7	0	0	0	1	1	0	6	0	3	1	2	1	2	13		
2	1	1	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0	6	0	0	0	4	1	0	5	0	2	1	0	1	2	8		
2	1	1	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	1	0	1	0	1	0	4		
2	1	1	0	0	1	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	3	0	2	1	0	0	1	0	1	4	
2	1	1	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	5	0	0	0	5	1	0	6	0	2	1	0	1	2	7		
2	1	1	0	0	1	2	0	1	2	0	0	0	2	0	1	0	6	0	0	0	3	1	0	8	0	2	1	0	1	1	5		
0	1	0	0	0	1	4	2	1	7	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	4	0	0	1	0	1	0	0	0	
2	1	1	0	0	1	3	2	1	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	8	4	1	1	0	1	0	0	0	
2	1	1	4	0	1	3	4	1	7	0	5	1	2	1	0	0	0	0	1	0	5	1	3	3	15	5	1	3	1	2	8		
2	1	1	3	0	1	2	1	1	4	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	7	1	3	5	3	1	1	1	1	0	1	2		
2	1	1	3	2	1	4	1	1	6	0	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0	3	0	2	4	4	0	1	0	2	1	2	2	
2	1	1	3	0	1	6	4	1	6	0	6	0	2	0	0	0	0	0	0	5	1	1	8	5	3	1	2	1	0	2	2		
2	1	1	2	0	1	3	1	1	3	0	4	2	4	0	0	0	0	0	0	13	1	3	14	10	3	2	3	1	1	2	2		
2	1	1	5	0	1	0	14	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
2	1	1	3	0	1	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

【表 10】

	CBM1	CBM5	CBM6	CBM8	CBM11	CBM13	CBM14	CBM18	CBM19	CBM21	CBM24	CBM32	CBM35	CBM38	CBM39	CBM42	CBM43	CBM44	CBM46	CBM48	CBM49	CBM50	
24	3	0	0	5	2	0	0	1	0	6	2	1	0	2	0	2	0	1	0	0	1	1	7
35	4	0	1	8	6	0	0	0	0	4	2	1	0	3	0	3	0	1	0	0	1	1	14
23	4	0	2	10	6	0	3	0	3	0	2	3	0	1	0	2	0	1	0	0	1	1	5
7	2	0	0	2	12	0	1	0	1	0	1	3	2	0	1	0	1	0	0	1	1	1	3
44	2	0	1	4	21	0	1	0	3	4	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	1	5
1	1	0	0	7	10	0	1	0	1	2	0	0	0	0	2	0	5	0	0	1	1	1	2
17	3	0	1	3	8	0	1	0	1	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	5
55	3	0	1	0	10	0	1	0	0	4	2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	6
35	0	0	1	4	20	0	1	0	3	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	6
5	8	0	0	8	4	0	0	0	2	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	3
7	3	0	0	3	4	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	1	8
19	4	0	1	4	9	0	1	0	2	2	0	0	1	0	3	0	1	0	0	1	0	0	4
25	5	0	0	4	1	0	1	0	4	2	0	0	1	0	3	0	1	0	0	1	1	1	6
0	3	0	0	3	1	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0	2	0	0	2	0	0	3
0	4	0	0	4	7	0	1	0	1	2	0	0	1	0	2	0	2	0	0	2	0	0	3
34	3	0	0	2	6	0	1	0	2	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	7
1	2	0	0	5	2	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	4
0	0	0	0	1	4	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	2
0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	1	0	4	0	1	0	0	2	0	0	2
17	0	0	0	1	1	0	2	0	2	1	2	1	1	0	0	1	2	0	0	2	0	0	2
21	0	0	0	2	1	0	5	0	3	1	4	1	0	1	1	1	1	0	0	3	0	0	6
14	0	0	0	2	4	0	7	0	2	1	2	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	8
10	0	0	0	2	1	1	8	0	4	1	4	0	1	0	0	1	4	0	0	2	0	0	11
13	0	1	0	1	1	0	13	0	3	1	0	1	2	0	1	1	2	0	1	3	0	0	4
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	0	0

10

20

30

40

【表 1 1】

CBM52	CBM56	CBM61	CBM65	CBM66	CBM67	CBM71	AA0	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8	AA9	AA10	AA11	AA12	AA13
0	0	1	0	0	3	0	0	14	7	25	2	5	2	15	1	12	0	0	0	0
6	0	0	0	0	11	0	0	19	12	66	3	10	2	27	1	13	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	26	10	58	4	7	1	55	2	25	0	0	1	0
0	0	1	1	0	1	0	0	3	2	21	2	2	4	13	1	22	0	8	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	16	3	34	0	6	3	18	1	34	0	0	7	0
1	0	0	0	0	0	0	0	12	3	10	0	10	2	7	0	5	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	13	5	33	1	9	4	15	1	11	0	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	11	10	31	2	4	1	21	1	30	0	0	3	0
0	1	0	0	0	7	0	0	12	10	40	1	15	2	21	1	29	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	21	3	6	2	7	2	10	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	13	3	3	2	10	2	5	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	13	14	34	3	9	1	10	1	15	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	10	27	23	3	9	1	10	2	18	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	11	1	3	1	6	0	2	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	26	2	2	1	10	0	2	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	3	17	36	1	7	4	11	2	16	0	0	1	0
0	0	1	0	0	0	0	0	5	1	23	3	2	3	12	1	4	0	0	0	0
0	0	0	0	0	3	0	0	5	2	2	1	3	2	1	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	5	3	10	1	4	1	5	0	0	1	0	0	0
0	2	1	1	0	1	0	1	15	6	21	5	0	1	31	3	12	0	3	2	0
1	0	1	0	0	0	0	0	10	2	6	3	2	1	17	2	14	0	4	3	1
0	0	0	0	1	0	0	0	7	4	13	4	1	1	22	0	3	0	3	1	0
0	0	1	1	0	3	0	0	16	3	31	4	0	2	41	2	7	0	3	0	0
0	0	1	1	0	3	0	3	5	6	29	3	3	1	42	4	28	0	4	3	1
0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	0	4	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

【 0 1 0 4】

Agaricalesのゲノムと比較して、Polyporalesは一般的にCAZymesの数が少なく、S. crispaはGHの数が最も少ない(表5~表11)。

【 0 1 0 5】

ハナビラタケ(S. crispa)のGT(図4)およびGH(図5)の多様性をPhanerochaete chrysosporium(非特許文献21)、Postia placenta(非特許文献16)およびLentinula edodes(非特許文献9)のものと比較した。他の真菌と比較して、S. crispaはCAZymesの各カテゴリーにおいて遺伝子の数が最も少なく、ハナビラタケ(S. crispa)またはハナビラタケ(S. crispa)を含むグループは、GT1、GT5、GT17、GT69およびGT90のGTファミリー

50

ー遺伝子の数が非常に少ない(表5～表11、図4)。

【0106】

一方、ハナビラタケ(*S. crista*)はGHファミリー遺伝子の数が非常に少なく(*Lentinula edodes*の約半分)、GHファミリーの多くが3つの他の真菌に比べて最も低かった(表5～表11、図5)従って、ハナビラタケ(*S. crista*)は、炭水化物利用能が乏しい真菌に分類されることが確認された。

【0107】

<実施例5> グルカン合成酵素の特定

報告されている遺伝子を用いたBLASTP検索によって、 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の同定を行った。

【0108】

(1)  $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の同定

$\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の同定は、I型およびII型遺伝子について報告されている遺伝子を用いたBLAST検索(非特許文献19)により行い、触媒ドメインおよび膜貫通領域のドメイン分析は、PfamまたはTMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) データベースによって行った。

(2) 結果

真菌細胞壁の多糖類のうち、 $\alpha$ -1,3-グルカン( $\alpha$ -グルカン)が最も多く、様々な薬理作用のために広く使用されている。 $\alpha$ -グルカンは、ウリジン5'-二リン酸(UDP)-グルコースから $\alpha$ -グルカン合成酵素により合成される。 $\alpha$ -グルカン合成酵素は、触媒ドメインおよび膜貫通ドメインからなる膜タンパク質である。*Saccharomyces cerevisiae*には、2つの独立した $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子(FKS1およびFKS2)が存在する。 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の同定は、報告されている遺伝子を用いたBLASTP検索によって実施した。ここで、2つの新規の $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子ScrFKS1およびScrFKS2が同定され、それぞれI型およびII型遺伝子に相同であることが判明した(表12、図6)。

【0109】

10

20

【表 1 2】

<i>S. crista</i> gene	Gene ID	Identity (matched nucleotide/all)	
ScrFKS1 (Type I)			
	EKM78523	79%(1415/1795)	
	XP_001878782	82%(1470/1794)	
	XP_001837755	79%(1417/1793)	
	XP_003031402	84%(1357/1623)	
	ADX07311	80%(1372/1709)	10
	EGO01123	82%(1466/1778)	
	EIW79670	80%(1430/1783)	
	EIM87404	81%(1444/1789)	
	EIN14554	81%(1457/1788)	
	EKM57278	87%(1553/1788)	
	EMD36733	88%(1563/1785)	
	CCM04495	90%(1598/1784)	
	EIW53177	86%(1543/1789)	
	EJF59836	87%(1552/1787)	20
	EJD01928	80%(1352/1700)	
	EJU00969	77%(1387/1802)	
ScrFKS2 (Type II)			
	EJD05928	80%(1368/1702)	
	KJ187309	92%(1536/1666)	
	EMD38542	90%(1486/1644)	
	CCL99114	85%(1501/1759)	
	EKM55441	84%(1483/1760)	30
	EIW60373	89%(1470/1643)	
	EJF65840	88%(1450/1643)	
	EIN07381	83%(1370/1646)	
	EIW85198	81%(1430/1769)	
	EIM90013	82%(1437/1763)	
	XP_003035758	79%(1402/1767)	
	XP_001833273	79%(1403/1766)	
	XP_001875386	77%(1271/1648)	
	EKM82691	85%(1394/1644)	40

## 【0 1 1 0】

これら2つの異なる型の存在は、寒天菌 (Agaricomycetes mushroom) の共通の特徴である (非特許文献19)。ScrFKS1およびScrFKS2は、以前に報告されたI型およびII型遺伝子とそれぞれ77-90%または77-92%相同であり (表 1 2)、これによりこれらが新しい遺伝子であることが判明した。FKS1の触媒ドメインに相同な領域 (非特許文献22) および - グルカン合成酵素に相同な領域は、両遺伝子においてPfamデータベース検索により同定され、Pfamデータベース検索およびトランスメンブランダメインはTMHMMデータベース検索 (図 6、図 7) によって同定された。2つの膜貫通ドメイン (TM1およびTM2) は同じ位置に存在するが、それらの間には差異がある。TM1とTM2との間の領域は、ScrFKS1の細胞の

外側であり、ScrFKS2の内部に局在していると予測される。さらに、いくつかのN-グリコシル化部位が存在し、そのいくつかはそれらの間で十分に保存されている（図6、図7）。

#### 【0111】

<実施例6> 同株を用いた抽出物の作成

ハナピラタケ有効成分の探索のために、菌体の抽出法の確立とその抽出法による抽出効率の評価を行った。

#### 【0112】

(1) 材料及び方法

- 1) 乾燥菌体（菌糸体）を水に溶かし、10分間煮沸した。 10
- 2) 遠心機で分離し、上清をフィルター濾過した。
- 3) 濃縮・乾固し、一部凍結保存した。
- 4) 乾固されたハナピラタケ菌糸体の熱水抽出物（以下、「SCE」と記載する）を滅菌水で10 mg/ml に調整した。
- 5) 調製した SCE と酢酸エチルを混合した。
- 6) 遠心分離し、酢酸エチル層（上清）を回収した。
- 7) 5) ~ 6) の操作を2回行った。
- 8) 酢酸エチル層を濃縮乾固し、SCEの酢酸エチル抽出物（以下、「SCE-EtOAc」と記載する）を得た。
- 9) SCE-EtOAc をメタノールに溶解した（10 mg/ml）。 20
- 10) リン酸化アッセイとHPLC 分析（資料2、3）。

#### 【0113】

(2) 結果

乾燥菌体100%に対し、SCEの抽出効率（回収率）は30%、SCE-EtOAcの抽出効率（回収率）は2.5%であった。

#### 【0114】

<実施例7> 細胞増殖アッセイによるエストロゲン活性の評価

ハナピラタケ菌糸体抽出物のHPLC分画による細胞増殖効果を評価した。方法は（「Brefeldin A is an estrogenic, Erk1/2-activating component in the extract of *Agaricus blazei* mycelia.」（J. Agri. Food Chem., 2013）に従った。 30

#### 【0115】

細胞増殖アッセイは、MCF-7細胞培養液にE<sub>2</sub>（10 nM）とSCE（各1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml に調整）を添加し、72時間培養後、スルフォロダミンB（SRB）アッセイ（Vichai V., Kirtikara K. Nat. Protoc. 2006）により、コントロールに対する相対的な細胞増殖率を算出し、各検体間で比較した。

#### 【0116】

具体的には、以下の材料と方法によって行った。

#### 【0117】

(1) 材料と方法

- 1) 細胞と刺激物質 40
  - 細胞：MCF-7 細胞
  - 刺激物質：ポジティブコントロール（10 nM エストロゲン（E<sub>2</sub>））、ネガティブコントロール（0.1 % DMSO）、SCE（1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml）を使用した。
- 2) 培養：MCF-7 細胞を、1ウェル当たり 0.5 × 10<sup>4</sup>細胞数になるように計測し、24 well プレートに接種した。培地は10 %のチャコールデキストラン処理をしたFBS（CD-FBS）を補充したフェノールレッドを含まないRPMI培地を使用した。細胞はCO<sub>2</sub>インキュベーター内で37 °Cで3日間培養した。
- 3) 刺激：細胞の接着、増殖を確認した後に、培地を除去し、各刺激物質の入った培地を各ウェルに添加し、細胞をさらに72 時間培養した。
- 4) 固定：培地を除去し、各ウェルをPBSで洗浄した。10 %トリクロル酢酸を加えて4 50

で30分間静置し、蒸留水で洗浄後、乾燥させた。

5) 染色：各ウェルに0.4% SRB/1%酢酸溶液を加えて細胞を20分間染色した。

6) 洗浄：1%酢酸で洗浄し、SRBを取り除き、一晚乾燥させた。

7) 測定：各ウェルに10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 10.4)を加え、細胞に取り込まれたSRBを溶出させた後に、細胞を96ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX190 Molecular Devices社)を用いて吸光度 ( $OD_{490}$ )を測定した。

#### 【0118】

##### (2) 結果

結果を図9に示す。細胞増殖アッセイは再現性を評価するため3回行った結果である。エストロゲン ( $E_2$ ) がコントロールに対して2倍以上の細胞増殖促進効果を示したのに対して、SCEは増殖活性を有していないことが確認された。この結果は、SCEを体内に摂取しても安全であること根拠になり得る。

10

#### 【0119】

<実施例8> エストロゲン活性評価用DNAチップを用いたエストロゲン活性の評価

エストロゲン応答遺伝子を用いて、化学物質のエストロゲン活性評価用オリゴDNAマイクロアレイ (DNAチップ) を作製し、エストロゲン活性の評価を行った。アッセイシステム (「DNA microarray-based gene expression profiling of estrogenic chemicals」 (Cell. Mol. Life Sci., 2014)) を利用して、 $E_2$  とSCEサンプル (SCE10、SCE100、SCE-EtOAc) の間で細胞刺激時のエストロゲン応答遺伝子の発現のプロファイルをそれぞれ比較し、ハナビラタケ抽出物のエストロゲン活性を評価した。

20

#### 【0120】

具体的には、以下の材料と方法によって行った。

#### 【0121】

##### (1) 材料および方法

##### 1) 細胞と刺激物質

細胞：ヒト由来MCF-7細胞

刺激物質：ポジティブコントロール (10 nM エストロゲン ( $E_2$ ))、ネガティブコントロール (0.1% DMSO)、SCE10 (SCE 10  $\mu$ g/ml)、SCE100 (SCE 100  $\mu$ g/ml)、SCE-EtOAc (ハナビラタケ酢酸エチル抽出分画、10  $\mu$ g/ml) を用いた。

30

#### 【0122】

培養：MCF-7細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS) を補充したRPMI培地中で増殖させた。細胞は、 $CO_2$ インキュベーターを用いて37°Cで3日間培養した。細胞は10%のチャコールデキストラン処理をしたFBS (CD-FBS) を補充したフェノールレッドを含まないRPMI培地を用いて継代培養した。このときシャーレ1枚当たり  $1 \times 10^6$  細胞数になるように計測し、シャーレに播種した。細胞がシャーレに接着したことを確認した後、それぞれ  $E_2$ 、DMSO、SCE10、SCE100、SCE-EtOAcを用いて細胞を刺激した。その後、細胞は37°Cで3日間さらに培養した。

#### 【0123】

2) 細胞の回収、3) RNAの抽出、4) RNAの増幅、5) cDNAの合成、6) cDNAの標識、の操作を、RNeasy Plus Micro and Mini Kits (QIAGEN社) を使用して行った。

40

#### 【0124】

##### 7) 蛍光強度の測定

マイクロアレイスキャナーFLA 8000 (FUJI社) を使用し、測定を行った。

#### 【0125】

##### 8) 統計解析

得られたマイクロアレイデータの統計解析は相関解析とクラスター解析により行った。相関解析は以下のように行った。まず、それぞれのエストロゲン応答遺伝子 (172 遺伝子) について、各化合物を添加したサンプル ( $E_2$  + あるいはSCE+) の蛍光強度と化合物を添加しないサンプル ( $E_2$  - あるいはSCE-) の蛍光強度の比を求めた。次いで、28個の内部コントロール遺伝子を用いて蛍光強度の比を補正した後 ( $(E_2 + / E_2 -)$  あるいは (SCE

50

+ /SCE - ) )、各補正值を $\log_2$ 値に変換して、それぞれのサンプルについて172 遺伝子の発現の全体像（遺伝子発現プロファイル）を得た。2つのプロファイル間の相関は散布図により示し、相関係数（R値）は直線回帰に基づいて計算した。

【 0 1 2 6 】

エストロゲン応答遺伝子を用いたクラスター解析は、8 ) で述べた各サンプルの補正值を用いて、クラスター解析ソフト Cluster 2.12 と Tree view (Eisen et al., 1998) を用いて行い、系統樹を作成して、解析を行った。

【 0 1 2 7 】

なお、クラスター解析とは、異なる性質のものが混ざり合った集団から、互いに似た性質を持つものを集め、クラスターを作ることによりそれぞれの集団を統計的に比較する方法である。

10

【 0 1 2 8 】

( 2 ) 結果

DNAマイクロアレイアッセイを用いて $E_2$ とSCEサンプルの間で細胞を刺激した時のエストロゲン応答遺伝子の発現のプロファイルをそれぞれ比較したところ、SCE10のR値が0.76、SCE100がR値0.62と、高いことが分かった（図 1 0 ）。

【 0 1 2 9 】

一方、SCE-EtOAcとの間のR値は0.04 と低かった。これは活性物質が水分画に抽出され、酢酸エチル抽出分画（EtOAc分画）にはほとんど溶出していないためと考えられる。

【 0 1 3 0 】

20

また、エストロゲン応答遺伝子を用いたクラスター解析の結果から、SCE10とSCE100はいずれも $E_2$ とよく似たプロファイルを示した（図 1 1 ）。

【 0 1 3 1 】

以上のことから、SCEは $E_2$ と似たエストロゲン活性を有していることが分かり、さらにその活性は水分画に溶出したと考えられる。

【 0 1 3 2 】

< 実施例 9 > シグナル伝達タンパク質によるエストロゲン活性の評価

DNAマイクロアレイアッセイの結果からSCEは $E_2$ と似たエストロゲン活性を有していることが分かり、さらにその活性は水分画に溶出されることが分かった。このことから、水分画に溶出されたハナビラタケ菌系体抽出物分画を逆相カラムを使用して分離し、分離された各分画についてはリン酸化アッセイを用いて活性評価を行った。

30

【 0 1 3 3 】

( 1 ) 方法

1 ) 逆相カラムによる分離

以下の条件で逆相カラムによる分離を行った。

【 0 1 3 4 】

溶出条件：SCE 10 mg/ml (  $H_2O$  ( 蒸留水 ) で溶解 ) を 2 ml 注入した。

a : 100%  $H_2O$       20% AcN : 0分      60分 ( 60分間 )

b : 20% AcN      100% AcN : 60分      75分 ( 15分間 )

c : 100% AcN      100%  $H_2O$  : 75分      80分 ( 5分間 )

40

カラム：CAPCELL PAK C18 MG II S5 ( 20 mm × 250 mm )

流速：10 ml/min

分離したサンプルは、濃縮・乾固し、重さを量り、滅菌した $H_2O$ で10 mg/mlに調製後、ウェスタンブロット法によるリン酸化アッセイに用いた。

【 0 1 3 5 】

2 ) ウェスタンブロット法によるSCE分画のリン酸化アッセイ

細胞：MCF-7 細胞

刺激物質：ポジティブコントロール ( 10 nM  $E_2$  )、SCE ( 10  $\mu$ g/ml )、逆相カラムで分離した26サンプル ( 10  $\mu$ g/ml ) を用いた。

【 0 1 3 6 】

50

刺激時間：0 (Control)、5、15、30、および60分間

リン酸化タンパク質を検出する抗体：Phospho-p44/42 MAPK(ERK)、Phospho-Akt(Ser473)を用いた。

【0137】

トータルタンパク質を検出する抗体：p44/42MAPK(ERK)、Akt抗体を用いた。

【0138】

方法：細胞は前述したように継代培養し、6ウェルシャーを用いて、1ウェル当たり1×10<sup>5</sup>細胞数になるように播種した。2日間の培養後、無血清のRPMI培地に交換して24時間さらに培養し、それぞれSCEの各分画を加えて、細胞を刺激した。刺激時間経過後は、速やかに細胞を溶解し、タンパク質変性処理を加えた後、ウェスタンブロット法を用いて、リン酸化タンパク質(P-ERKとP-Akt)量の変動を調べた。リン酸化タンパク質の量はトータルタンパク質(T-ERKとT-Akt)を用いて補正した。

10

【0139】

(2) 結果

1) 逆相カラムを用いて上記の溶出条件により、図12に示す溶出パターンを得た。それぞれ図に示すアセトニトリルの濃度の分画を回収した。

2) 逆相カラムを用いて2回の分離精製を行ったところ、計26の分画を得ることができた。それらを10 mg/mlに調製後、ウェスタンブロット法によるリン酸化アッセイにより活性評価を行ったところ、図13に示すように、P-ERKにおいては、ポジティブコントロールであるE<sub>2</sub>やSCEのように刺激後5分間から15分間で活性の上昇が認められた。顕著な例は6B3や6B4、6B6、6B7、6B10である。一方、6B5、6B8のように低い活性を示す分画も確認された。

20

【0140】

一方で、P-Aktにおいては、6B3や6B4、6B7分画に高い活性が認められた。1回の結果だけでは刺激時の細胞の状態や各分画に溶出される有効成分の量比などが活性の値に影響することから、独立して数回のリン酸化アッセイを行い、統計解析を行うことで、各分画における活性について再現性を評価した。

【0141】

<実施例10> 抽出物の安全性

生物学的安全性評価として、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物およびハナビラタケ菌系体熱水抽出物SCE(抽出乾燥物)をマウスに単回経口投与し、その急性毒性を評価した。

30

【0142】

(1) 方法

以下の表7に示す群構成を行い、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物およびハナビラタケ菌系体抽出乾燥物を雌雄各5匹のICR系マウスに2000 mg/kgでそれぞれ単回経口投与を行い、投与後14日間観察し、14日目の観察終了後、剖検(肉眼的観察)により急性毒性を評価した。

【0143】

【表13】

40

群	投与物質	投与量(mg/kg)	投与液濃度(mg/mL)	投与液量(mL/kg)	動物数(雄)	動物数(雌)
1	溶媒(0.5% CMC)	0	0	20	5	5
2	ハナビラタケ培養乾燥物	2,000	100	20	5	5
3	ハナビラタケ抽出乾燥物	2,000	100	20	5	5

CMC:カルボキシメチルセルロース

【0144】

(2) 結果

投与後の一般状態、体重推移(図14、図15)および投与後14日の剖検所見において

50

ハナビラタケ菌系体培養乾燥物およびハナビラタケ菌系体熱水抽出物SCE（抽出乾燥物）に起因する変化は認められなかった。

【0145】

ハナビラタケ菌系体培養乾燥物およびハナビラタケ菌系体熱水抽出物SCE（抽出乾燥物）をそれぞれ2000 mg/kgまで単回投与しても影響は認められず、最小致死量は雌雄いずれも2000 mg/kg以上と推察された。

【0146】

<実施例11> 抗動脈硬化作用と内臓脂肪蓄積の減少作用

高脂肪食を与えたBALB/c.KOR/Stm Slc-Apoesh1マウス（以下、ApoE 欠損マウス）に、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物を180 mg/kg/day、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物を1000 mg/kg/dayで、それぞれ6週間連日経口投与した。投与期間終了時に血液生化学的検査と内臓脂肪蓄積量の測定を実施した。

（1）方法

高脂肪食を与えたApoE 欠損マウスに、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物を180 mg/kg/day、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物を1000 mg/kg/dayで、それぞれ6週間連日経口投与した。投与期間終了時に麻酔下で採血後、血液生化学的検査を行った。また内臓脂肪（精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪）を摘出し、生理食塩水で各臓器に付着している体液を取り除いた後、重量を測定した。

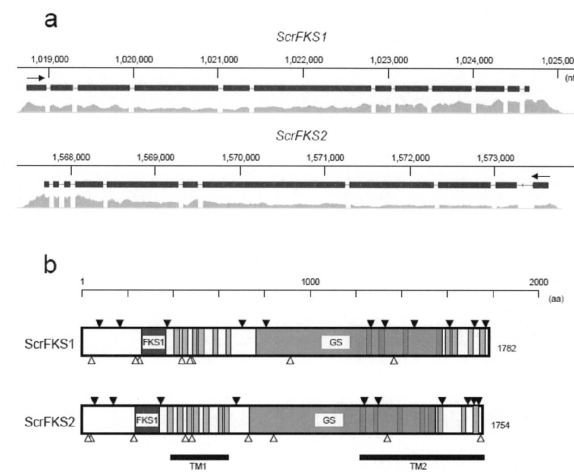
【0147】

（2）結果

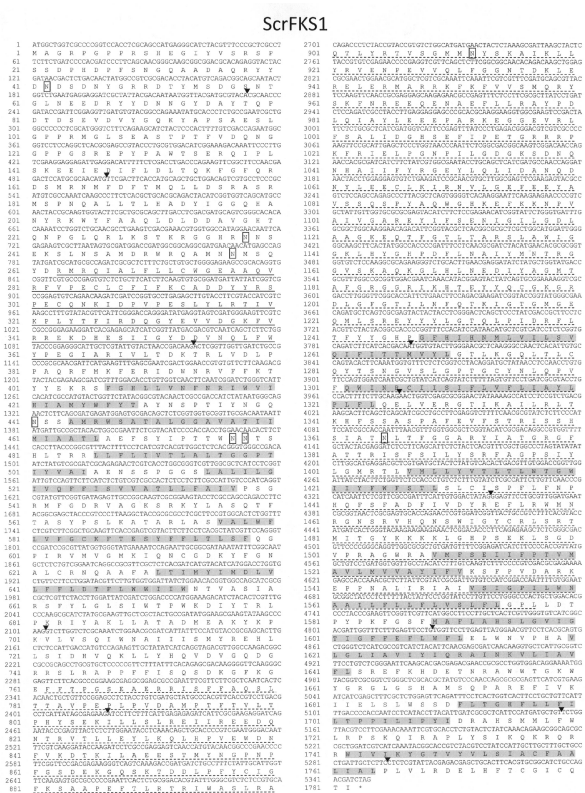
総コレステロール値は、6週間連日経口投与後において、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物をそれぞれ投与したApoE欠損マウスは非投与群ApoE欠損マウスに比べ、それぞれ統計的有意に低値傾向を示した。中性脂質値も、6週間連日経口投与後において、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物をそれぞれ投与したApoE欠損マウスは非投与群ApoE欠損マウスに比べ、それぞれ統計的有意に低値傾向を示した。また遊離脂肪酸値も、6週間連日経口投与後において、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物をそれぞれ投与したApoE欠損マウスは非投与群ApoE欠損マウスに比べ、それぞれ統計的有意に低値傾向を示した（図16）。また内臓脂肪の蓄積量は、6週間連日経口投与後において、ハナビラタケ菌系体培養乾燥物、ハナビラタケ菌系体抽出乾燥物をそれぞれ投与したApoE欠損マウスは非投与群ApoE欠損マウスに比べ、それぞれ統計的有意に低値傾向を示した（図17）。



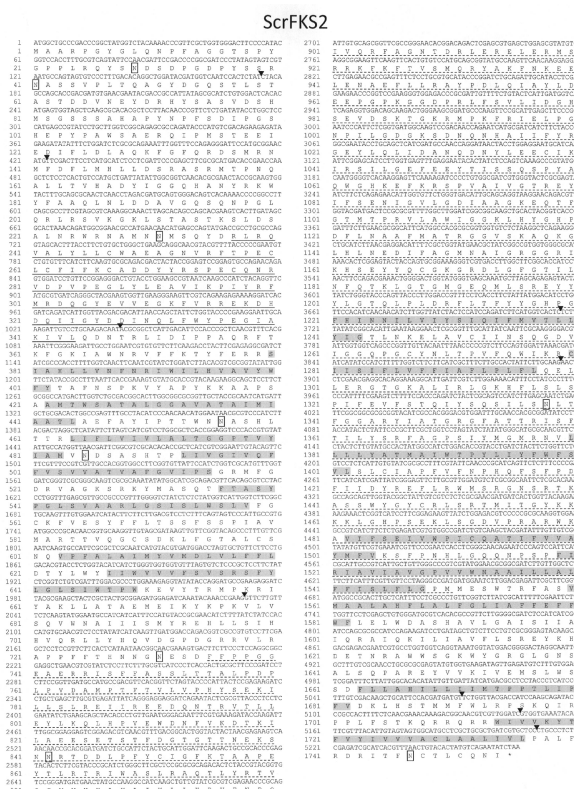
【図 6】



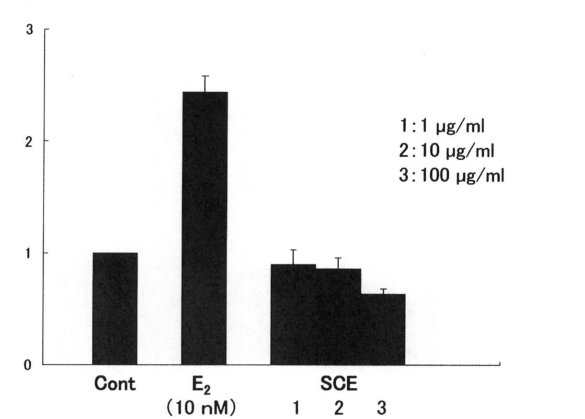
【図 7】



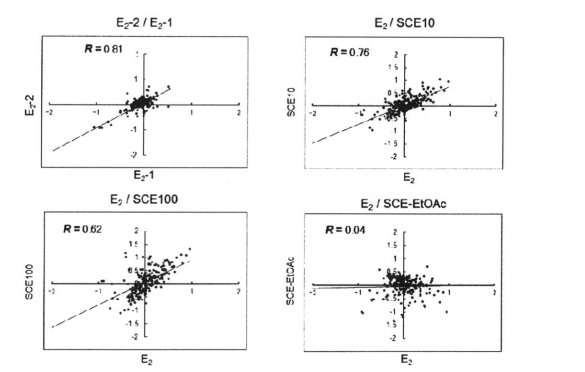
【図 8】



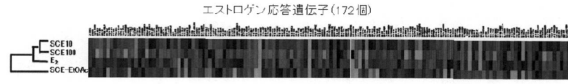
【図 9】



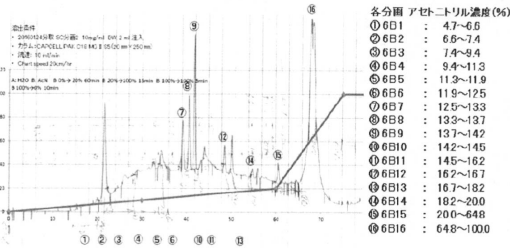
【図 10】



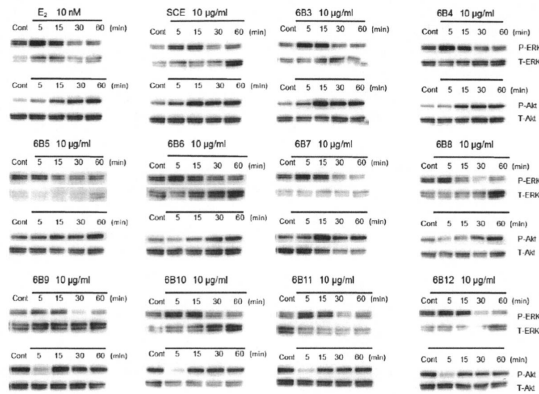
【図 1 1】



【図 1 2】



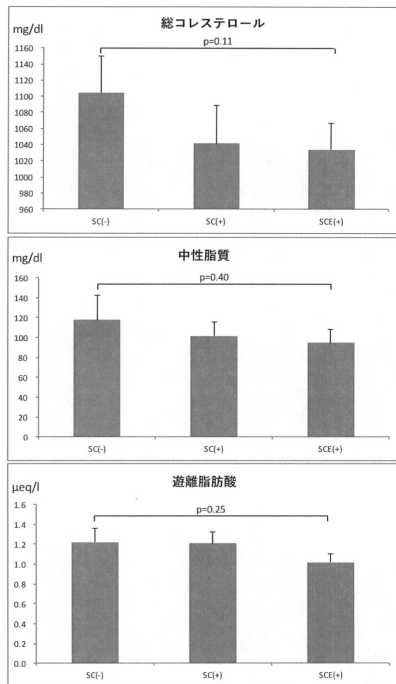
【図 1 3】



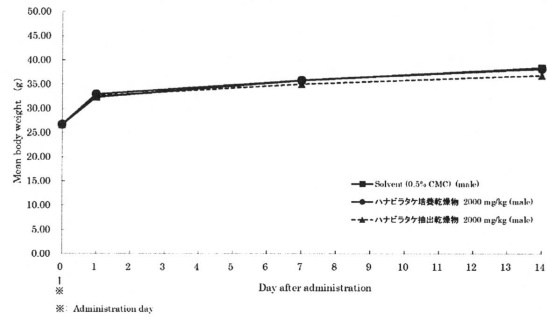
【図 1 6】

	n	総コレステロール (mg/dl)	中性脂質 (mg/dl)	遊離脂肪酸 (μeq/l)
SC(-)	5	1104.61 ± 45.206	117.875 ± 25.23	1.22 ± 0.14
SC(+)	6	1041.34 ± 46.81	101.92 ± 14.11	1.21 ± 0.12
SCE(+)	6	1033.95 ± 32.81	94.88 ± 13.83	1.02 ± 0.09

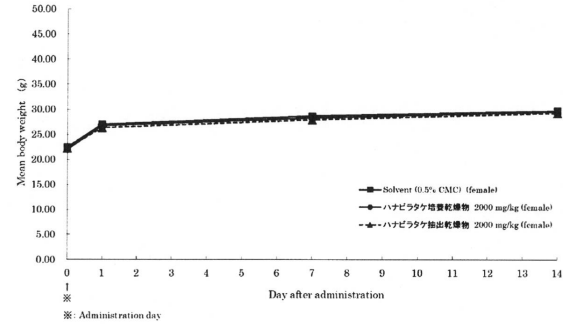
SC: ハナピラタケ乾燥物, SCE: ハナピラタケ抽出乾燥物



【図 1 4】



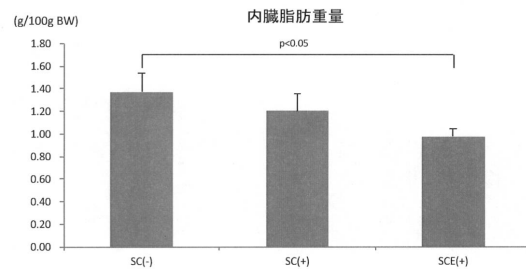
【図 1 5】



【図 1 7】

	n	内臓脂肪重量 (g/100g BW)
SC(-)	5	1.371 ± 0.171
SC(+)	6	1.203 ± 0.149
SCE(+)	6	0.976 ± 0.067

SC: ハナピラタケ乾燥物, SCE: ハナピラタケ抽出乾燥物



【配列表】

0006861422000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08
A 6 1 P 15/12	(2006.01)	A 6 1 P	15/12
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 2 3 L 33/105	(2016.01)	A 2 3 L	33/105
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09 Z
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68
A 0 1 H 5/00	(2018.01)	A 0 1 H	5/00 Z

(72)発明者 古谷 喜幸

東京都新宿区河田町 8 - 1 学校法人東京女子医科大学内

(72)発明者 田中 真弘

東京都中央区新川 1 - 1 7 - 2 1 茅場町ファーストビル 3 階 株式会社インタートレード内

(72)発明者 木山 亮一

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所 知的財産・標準化推進部内

(72)発明者 川口 佳代子

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所 知的財産・標準化推進部内

(72)発明者 廣瀬 玉紀

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所 知的財産・標準化推進部内

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 6 4 8 8 ( W O , A 1 )

International Journal of Medicinal Mushrooms, 2 0 1 5 年, Vol.17, No.10, pp.965-975

FASEB Journal, 2 0 1 0 年, Vol.24, Supp.Meeting Abstracts, Abstract Number 918.1

日本栄養・食料学会九州・沖縄支部大会講演要旨集, 2 0 1 5 年, Vol.2015, p.31

食品関係等調査研究報告, 2 0 1 2 年, Vol.36, pp.19-25

Mycobiology, 2 0 1 4 年, Vol.42, No.2, pp.167-173

国内初の網羅的遺伝情報を活用したキノコ栽培にアプローチ「雪国まいたけ」等の大規模遺伝子情報取得に成功, プレスリリース詳細, 2 0 0 9 年 3 月 2 3 日, pp.1-3, [検索日]2018.05.

16, U R L , [http://www.maitake.co.jp/press/index\\_o8.php](http://www.maitake.co.jp/press/index_o8.php)

生物工学, 2 0 1 4 年, Vol.92, No.10, pp.572-575

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8

A 2 3 L 3 3 / 0 0 - 3 3 / 2 9

A 6 1 P 3 / 0 6

A 6 1 P 5 / 3 0

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 1 3 / 0 0

A 6 1 P 1 3 / 0 8

A 6 1 P 1 5 / 0 0

A 6 1 P 1 5 / 1 2

A 6 1 P 1 9 / 1 0

A 6 1 P 2 5 / 2 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 0 1 H 5 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 Q 1 / 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )