

(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12月13日(13.12.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/169437 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/064241
- (22) 国際出願日: 2012年5月31日(31.05.2012)
- (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 2011-128778 2011年6月9日(09.06.2011) JP
特願 2011-158077 2011年7月19日(19.07.2011) JP
特願 2011-195239 2011年9月7日(07.09.2011) JP
特願 2011-197796 2011年9月12日(12.09.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三洋化成工業株式会社 (SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町1番地の1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柳原 芳充 (YANAGIHARA Fusamitsu) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町1番地の1 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP). 松尾 健太郎 (MATSUO Kentaro) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町1番地の1 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP). 草野 美紀 (KUSANO Miki) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町1番地の1 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所 (YASUTOMI & Associates); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 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, 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))
— 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))



WO 2012/169437 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYSACCHARIDE

(54) 発明の名称: 多糖の製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for producing a polysaccharide using a polysaccharide synthetase, which can produce the polysaccharide with good efficiency.

(57) 要約: 本発明は、多糖合成酵素を用いた多糖の製造方法であって、多糖を効率よく生産する方法を提供することを目的とする。

明 細 書

発明の名称：多糖の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は多糖の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 多糖としては、植物由来の多糖（デンプン及びセルロース等）、微生物由来の多糖（キサンタン等）、高等生物由来の多糖（ヒアルロン酸、ヘパリン及びコンドロイチン等）など、様々な種類の多糖が知られている。これらの多糖は、医薬品・食品から一般工業用途まで様々な用途において用いられている。

[0003] 例えば、ヒアルロン酸は牛の眼球、鶏冠、動物の緩衝組織、胎盤、癌細胞及び皮膚などの生体組織に多量に含まれているもので、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが β 1, 3結合と β 1, 4結合とで交互に結合した直鎖状の多糖であり、分子量が $10^5 \sim 10^6$ Daの高分子量のグルコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は、粘度が高く、高い保湿効果を有し、物理的摩擦に対する潤滑効果及び細菌などの侵入に対する保護効果が優れているという性質を持つ。

ヒアルロン酸はこれらの性質を持つので、化粧品添加剤、医薬品添加剤（関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤及び外科手術後の癒着阻止剤等）として広範囲に使用される。

[0004] ヒアルロン酸の生産方法としては、

- (1) 前記の生体組織から抽出する方法（抽出法）（特許文献1及び2）、
- (2) グルコース等の糖の存在下で、ヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を培養してヒアルロン酸を生産し、回収する方法（微生物培養方法）（特許文献3及び4）

が多く知られている。

[0005] しかしながら、(1)の抽出法により得られたヒアルロン酸には、コンド

ロイチンサルフェートやグリコサミノグリカンサルフェート等の不純物が含まれており、これらを除去するには複雑な精製過程を要するという問題がある。

また、(2)の微生物培養方法によるヒアルロン酸の生産では、ヒアルロン酸が生産されるのに伴って、培養溶液の粘度が上昇するため、通気攪拌が困難になる。さらに、通気攪拌が困難になることにより、ヒアルロン酸の生産が停止する。したがって、微生物培養方法は、ヒアルロン酸の生産効率が非常に低い問題がある。また、培養液の粘度が高いため、用いた微生物の除去に複雑な精製過程を要する問題がある。さらに、微生物の有するヒアルロン酸分解酵素により、生産されたヒアルロン酸が分解されるため、ヒアルロン酸の分子量が大きくなる、分子量の不均一性が高くなる等の問題もある。

ヒアルロン酸以外の多糖についても同様に、抽出法では不純物が多く混入してしまう問題があり、微生物培養方法では生産効率が低い、分子量が大きくなる、分子量の不均一性が高くなる等の問題がある。

[0006] そこで、生体組織からの抽出や微生物培養によらない第3の多糖の生産方法として、多糖合成酵素を用いた方法(酵素合成法)が検討されている。例えば、ヒアルロン酸合成酵素を用いた方法が知られている(非特許文献1)。しかしながら酵素合成法では、酵素が多量に必要である、生産効率が低く生産量が少ない等の問題があるため、研究レベルに留まっており、工業化の検討はされていない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：米国特許第4, 141, 973号明細書
特許文献2：米国特許第4, 303, 676号明細書
特許文献3：特開昭58-056692号公報
特許文献4：国際公開第86/8604355号

非特許文献

[0008] 非特許文献1: The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 273, No. 14, P8454-8458

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、多糖合成酵素を用いた多糖の製造方法であって、多糖を効率よく生産できる方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

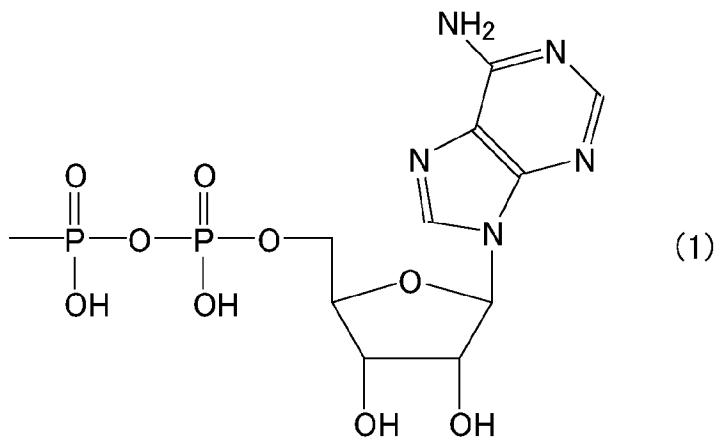
[0010] 本発明者らは、上記の目的を達成するべく検討を行った結果、本発明に到達した。

すなわち、本発明の多糖の製造方法は、下記リボヌクレオシド2リン酸一単糖(A)に多糖合成酵素(B)を作用させて多糖を製造する方法において、(A)に(B)を作用させる時間中の10~100%の時間において、反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度が多糖合成酵素(B)の下記阻害濃度 IC_{50} の100倍未満である多糖の製造方法である。

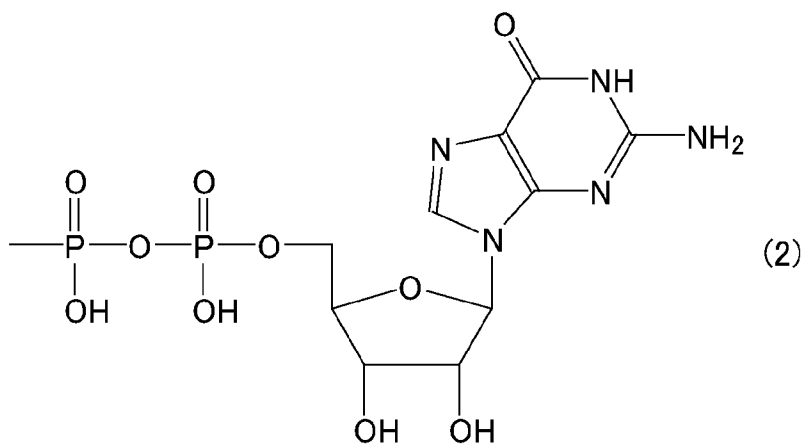
阻害濃度 IC_{50} : 多糖合成酵素(B)をリボヌクレオシド2リン酸一単糖(A)に作用させる際の(B)の濃度において、基質としてリボヌクレオシド2リン酸一単糖(A)を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド2リン酸を用いて求めた、(B)の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド2リン酸の濃度。

リボヌクレオシド2リン酸一単糖(A): トリオース(a-1)、テトロース(a-2)、ペントース(a-3)、ヘキソース(a-4)、ヘプトース(a-5)及び下記単糖(a-6)からなる群より選ばれる少なくとも1種の単糖(a)が有する少なくとも1つのヒドロキシル基のプロトンが下記化学式(1)~(5)のいずれか1つの官能基で置換された糖ヌクレオチド。

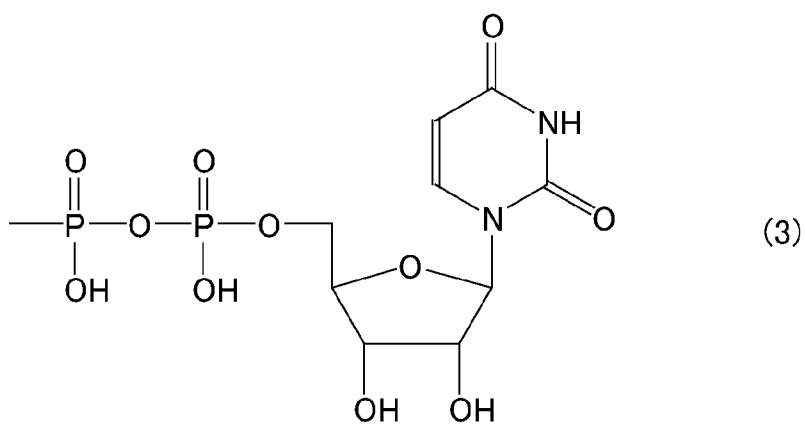
[化1]



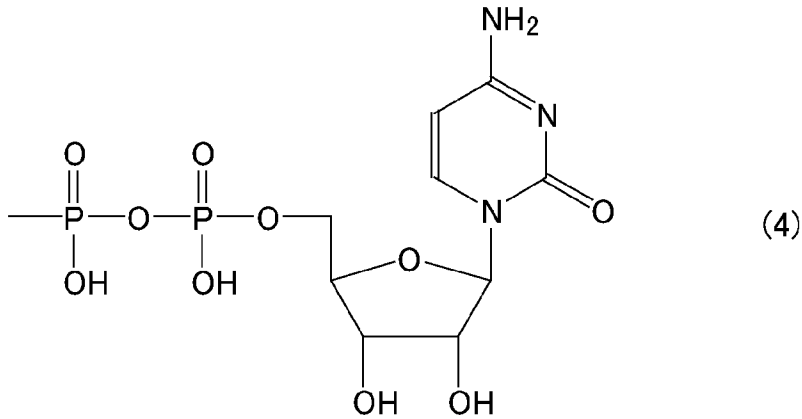
[化2]



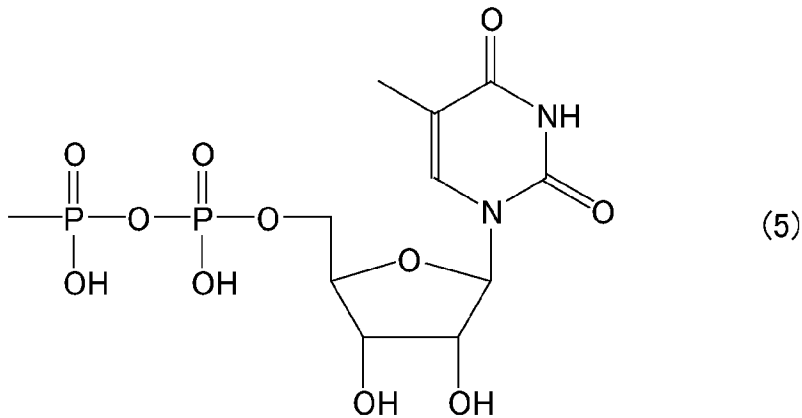
[化3]



[化4]



[化5]



単糖 (a-6) : (a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4) 及び (a-5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有するプロトン、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種が下記置換基 (E) で置換された単糖。

置換基 (E) : カルボキシル基、アミノ基、N-アセチルアミノ基、スルファート基、メチルエステル基、N-グリコリル基、メチル基、1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基。

発明の効果

[0011] 本発明の多糖の製造方法は、単位酵素あたりの多糖の生産量が多いという効果を奏する。

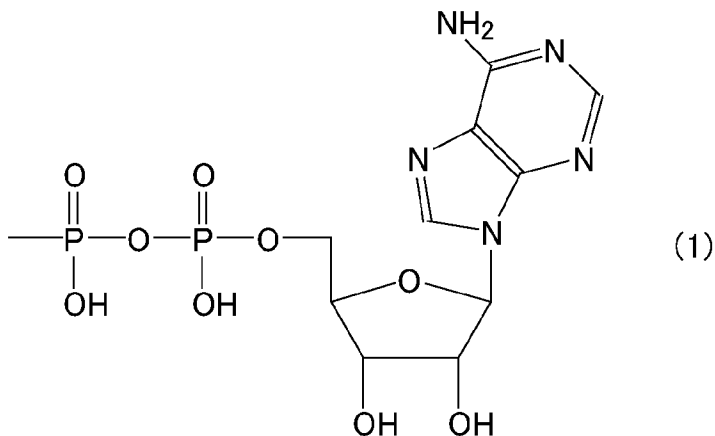
発明を実施するための形態

[0012] 本発明の多糖の製造方法は、下記リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) に多糖合成酵素 (B) を作用させて多糖を製造する方法において、(A) に (B) を作用させる時間中の10~100%の時間において、反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度が多糖合成酵素 (B) の下記阻害濃度 IC_{50} の100倍未満である多糖の製造方法である。

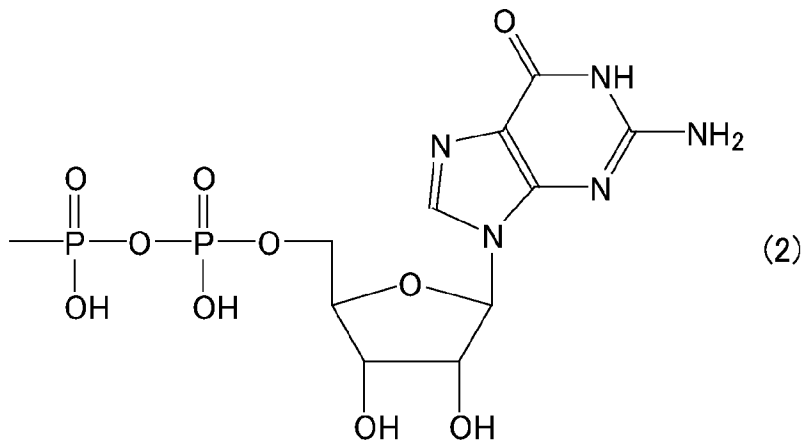
阻害濃度 IC_{50} : 多糖合成酵素 (B) をリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) に作用させる際の (B) の濃度において、基質としてリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド2リン酸を用いて求めた、(B) の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド2リン酸の濃度。

リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) : トリオース (a-1)、テトロース (a-2)、ペントース (a-3)、ヘキソース (a-4)、ヘプトース (a-5) 及び下記単糖 (a-6) からなる群より選ばれる少なくとも1種の単糖 (a) が有する少なくとも1つのヒドロキシル基のプロトンが下記化学式 (1) ~ (5) のいずれか1つの官能基で置換された糖ヌクレオチド。

[化6]

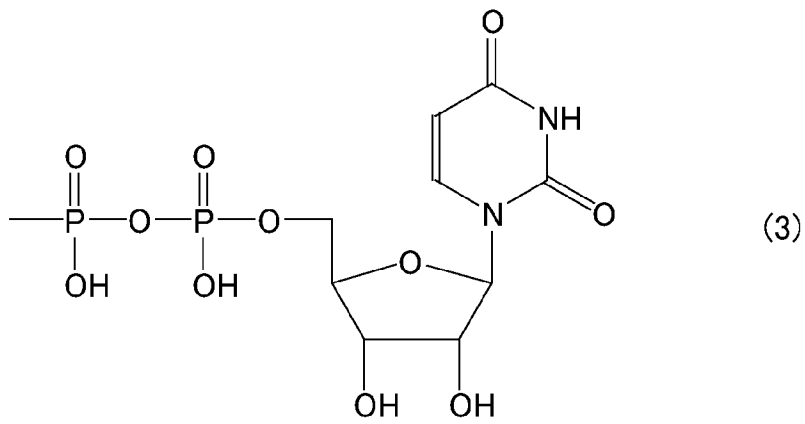


[化7]



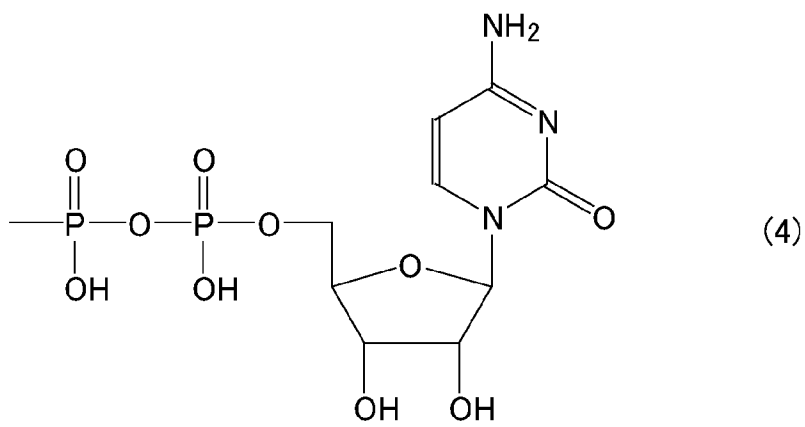
(2)

[化8]



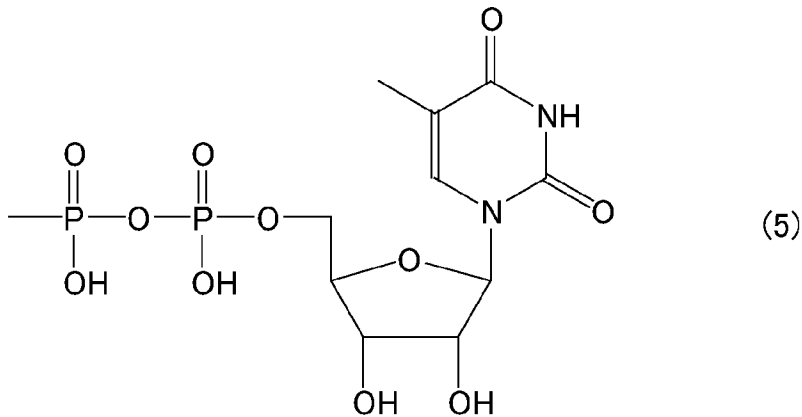
(3)

[化9]



(4)

[化10]



単糖 (a-6) : (a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4) 及び (a-5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有するプロトン、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種が下記置換基 (E) で置換された単糖。

置換基 (E) : カルボキシル基、アミノ基、N-アセチルアミノ基、スルファート基、メチルエステル基、N-グリコリル基、メチル基、1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基。

単糖 (a) には、光学異性体及び立体異性体が含まれる。

[0013] トリオース (a-1) は、炭素数3の単糖であり、具体的には、ジヒドロキシアセトン及びグリセルアルデヒド等が挙げられる。

テトロース (a-2) は、炭素数4の単糖であり、具体的には、エリトロース、トレオース及びエリトルロース等が挙げられる。

ペントース (a-3) は、炭素数5の単糖であり、具体的には、アラビノース、キシロース、リボース、キシロース、リブロース及びデオキシリボース等が挙げられる。

ヘキソース (a-4) は、炭素数6の単糖であり、具体的には、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、タガトース、フコース、フクロース及びラムノース等が挙げられる。

ヘプトース (a-5) は、炭素数7の単糖であり、具体的には、セドヘプ

ツロース等が挙げられる。

[0014] 置換基 (E) で置換された単糖 (a-6) には、上記単糖 (a-1) ~ (a-5) の分子中のプロトン (-H)、ヒドロキシル基 (-OH) 及びヒドロキシメチル基 (-CH₂OH) のうち少なくとも1つが、カルボキシル基、アミノ基、N-アセチルアミノ基、スルファート基、メチルエステル基、N-グリコリル基、メチル基、1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基で置換された下記 (a-6-1) ~ (a-6-10) 及び下記 (a-6-11) が含まれる。

(a-6-1) : カルボキシル基 (-COOH) で置換された単糖

(a-6-2) : アミノ基 (-NH₂) で置換された単糖

(a-6-3) : N-アセチルアミノ基 (-NHCOCH₃) で置換された単糖

(a-6-4) : スルファート基 (-OSO₃H) で置換された単糖

(a-6-5) : メチルエステル基 (-COOCH₃) で置換された単糖

(a-6-6) : N-グリコリル基 (-NHCOCH₂OH) で置換された単糖

(a-6-7) : メチル基で置換された単糖

(a-6-8) : 1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル基 (-CHOHCHOHCH₂OH) で置換された単糖

(a-6-9) : リン酸基 (-OPO₃H₂) で置換された単糖

(a-6-10) : 2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基 (-CH₂CHOHCOOH) で置換された単糖

(a-6-11) : (a-1) ~ (a-5) の分子中のプロトン、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基のうち少なくとも2つが2種以上の置換基 (E) で置換された単糖

[0015] (a-6-1) として、具体的には、グルクロン酸、イズロン酸、マンヌロン酸及びガラクトツロン酸等のウロン酸等が挙げられる。

(a-6-2)として、具体的には、グルコサミン、ガラクトサミン及びマンノサミン等のアミノ糖等が挙げられる。

(a-6-3)として、具体的には、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルマンノサミン及びN-アセチルガラクトサミン等が挙げられる。

(a-6-4)として、具体的には、ガラクトース-3-硫酸等が挙げられる。

(a-6-5)として、具体的には、グルコースメチルエステル及び(a-6-1)中のカルボン酸をメチルエステル化したもの等が挙げられる。

(a-6-11)として、具体的には、N-アセチルムラミン酸、ムラミン酸、N-アセチルグルコサミン-4-硫酸、イズロン酸-2-硫酸、グルクロン酸-2-硫酸、N-アセチルガラクトサミン-4-硫酸、シアル酸、ノイラミン酸、N-グライコリルノイラミン酸及びN-アセチルノイラミン酸等が挙げられる。

[0016] (a-6)が、置換基(E)としてアニオン基であるカルボキシル基、リン酸基、2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基及びスルファート基からなる群より選ばれる少なくとも1種を有する場合、アニオン基のプロトンがアルカリ金属(Li、Na及びK等)カチオン及び/又はアルカリ土類金属(Ca等)カチオンで置換されていてもいい。

[0017] リボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)は、上記単糖(a-1)~(a-6)の有する少なくとも1つのヒドロキシル基のプロトンが、上記化学式(1)~(5)で置換された糖ヌクレオチド(A-1)~(A-6)である。

(A-3)として、具体的には、ウリジン2リン酸-キシロース等が挙げられる。

(A-4)として、具体的には、シチジン2リン酸-グルコース、グアノシン2リン酸-マンノース、グアノシン2リン酸-フコース、アデノシン2リン酸-グルコース、ウリジン2リン酸-グルコース、ウリジン2リン酸-ガラクトース及びウリジン2リン酸-マンノース等が挙げられる。

(A-6)として、具体的には、ウリジン2リン酸-グルクロン酸、ウリ

ジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン、ウリジン2リン酸-ウリジン2リン酸-N-アセチルガラクトサミン及びウリジン2リン酸-イズロン酸等が挙げられる。

[0018] 本発明の製造方法において、(A)は1種を使用してもよく、2種以上を使用してもいい。また、1種の(A)を使用して、1種の単糖が複数連なった多糖を製造してもよく、2種の(A)を使用して、2種の単糖がランダム又は交互に連なった多糖を製造してもよく、3種以上の(A)を使用して、3種以上の単糖がランダム又は規則的に連なった多糖を製造してもいい。また、2種以上の(A)及び2種以上の(B)を使用して、複数種類の多糖を製造してもいい。

[0019] 多糖合成酵素(B)は、上記(A)から多糖を合成する多糖合成活性を有する酵素である。本発明において多糖とは、上記単糖(a-1)~(a-6)が2~10,000,000個結合したものであり、重量平均分子量200~1,000,000,000のものが含まれる。さらに、多糖にポリペプチドや脂質などが結合した構造の化合物も含まれ、多糖部分を有していれば良い。

多糖合成酵素(B)には、合成する多糖がヒアルロン酸であるヒアルロン酸合成酵素(B-1)、合成する多糖がコンドロイチンであるコンドロイチン合成酵素(B-2)、合成する多糖がキサンタンであるキサンタン合成酵素(B-3)、合成する多糖がセルロースであるセルロース合成酵素(B-4)、デンプン合成酵素(B-5)及びヘパリン合成酵素(B-6)が含まれる。また、(B)には、(B-1)~(B-6)以外にも、単糖から多糖を合成する活性を有する酵素が含まれる。

[0020] ヒアルロン酸合成酵素(B-1)は、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸とリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルグルコサミンとから、ヒアルロン酸を合成するヒアルロン酸合成活性を有する酵素である。ヒアルロン酸合成活性は、具体的には、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルグルコサミンを糖供与体として

、グルクロン酸が β 1, 3結合でN-アセチルグルコサミンに結合した二糖単位の、 β 1, 4結合による繰り返し構造を有するオリゴ糖を合成する能力をいう。

(B-1)としては、従来のヒアルロン酸合成酵素を使用でき、ヒアルロン酸合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、非特許文献(The Journal of Biological Chemistry, 2007, Vol. 282, No. 51, P36777-36781)に記載されているクラスI及びクラスIIのヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。クラスI及びクラスIIは、酵素のアミノ酸配列の相同性によって分類されたものである。クラスIのヒアルロン酸合成酵素として、具体的には、ストレプトコッカスピロジェネシス由来、ストレプトコッカスエクシミリリス由来及び藻類ウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。また、クラスIIのヒアルロン酸合成酵素として、具体的には、パストレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。

[0021] 本発明の製造方法において、(B)として(B-1)を用いてヒアルロン酸を製造する場合、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルグルコサミンが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンである。

[0022] コンドロイチン合成酵素(B-2)は、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸とリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルガラクトサミンとから、コンドロイチンを合成するコンドロイチン合成活性を有する酵素である。コンドロイチン合成活性は、具体的には、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルガラクトサミンを糖供与体として、グルクロン酸が β 1, 3結合でN-アセチルガラクトサミンに結合した二糖単位の、 β 1, 4結合による繰り返し構造を有するオリゴ糖を合成する能力をいう。(B-2)としては、従来のコンドロイチン合成酵

素を使用でき、コンドロイチン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、ストレプトコッカスエキシミス由来のコンドロイチン合成酵素及びパスツレラ・ムルトシダ由来のコンドロイチン合成酵素等が挙げられる。

[0023] 本発明の製造方法において、(B)として(B-2)を用いてコンドロイチンを製造する場合、用いる(A)としては、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルガラクトサミンが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルガラクトサミンである。

[0024] キサンタン合成酵素(B-3)は、リボヌクレオシド2リン酸-グルコース、リボヌクレオシド2リン酸-マンノース及びリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸から、キサンタンを合成するキサンタン合成活性を有する酵素である。キサンタン合成活性は、具体的には、リボヌクレオシド2リン酸-グルコース、リボヌクレオシド2リン酸-マンノース及びリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸を糖供与体としてキサンタンを合成する活性である。(B-3)としては、従来キサンタン合成酵素を使用でき、キサンタン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、キサンタン・カムペストリスから得られるキサンタン合成酵素等が挙げられる。

[0025] 本発明の製造方法において、(B)として(B-3)を用いてキサンタンを製造する場合、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルコース、リボヌクレオシド2リン酸-マンノース及びリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸が好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルコース、グアノシン2リン酸-マンノース及びウリジン2リン酸-グルクロン酸である。

[0026] セルロース合成酵素(B-4)は、リボヌクレオシド2リン酸-β-グルコースをグリコシド結合により直鎖状に結合させたセルロースを合成するセルロース合成活性を有する酵素である。セルロース合成活性は、具体的には

、リボヌクレオシド2リン酸グルコースを糖供与体として β 1, 4結合を形成する活性である。(B-4)としては、従来のセルロース合成酵素を使用でき、セルロース合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、酢酸菌由来のセルロース合成酵素等が挙げられる。

[0027] 本発明の製造方法において、(B)として(B-4)を用いてセルロースを製造する場合、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、リボヌクレオシド2リン酸- β -グルコースが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸- β -グルコースである。

[0028] デンプン合成酵素(B-5)は、リボヌクレオシド2リン酸- α -グルコースをグリコシド結合により直鎖状に結合させたデンプンを合成するデンプン合成活性を有する酵素である。デンプン合成活性は、具体的には、リボヌクレオシド2リン酸- α -グルコースを糖供与体として α 1, 6結合を形成する活性である。(B-5)としては、従来のデンプン合成酵素を使用でき、デンプン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、トウモロコシ由来のデンプン合成酵素等が挙げられる。

[0029] 本発明の製造方法において、(B)として(B-5)を用いてデンプンを製造する場合は、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、リボヌクレオシド2リン酸- α -グルコースが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸- α -グルコースである。

[0030] ヘパリン合成酵素(B-6)は、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸又はリボヌクレオシド2リン酸-イズロン酸とリボヌクレオシド2リン酸-グルコサミンとからヘパリンを合成するヘパリン合成活性を有する酵素である。ヘパリン合成活性は、具体的には、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸(β -D-)又はリボヌクレオシド2リン酸-イズロン酸(α -L-)とリボヌクレオシド2リン酸-グルコサミン(D-グルコサミン)を糖供与体として1, 4結合を形成する活性である。(B-6)としては、従来のヘパリン合成酵素を使用でき、ヘパリン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、ヒト由来のヘパリン合成酵素等が挙げられる。

[0031] 本発明の製造方法において、(B)として(B-6)を用いてヘパリンを製造する場合、単位酵素あたりの多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸又はリボヌクレオシド2リン酸-イズロン酸とリボヌクレオシド2リン酸-グルコサミンとであることが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルクロン酸又はウリジン2リン酸-イズロン酸とウリジン2リン酸-グルコサミンとであることである。

[0032] 上記糖ヌクレオチド(A)及び上記多糖合成酵素(B)は、製造する多糖に応じて適宜選択する。

[0033] 本発明の製造方法において、反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度は、多糖合成酵素(B)の下記阻害濃度 IC_{50} の100倍未満である。
阻害濃度 IC_{50} :多糖合成酵素(B)をリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)に作用させる際の(B)の濃度において、基質としてリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド2リン酸を用いて求めた、(B)の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド2リン酸の濃度。

阻害濃度 IC_{50} は、(B)を(A)に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での、(B)を作用させる際と同じ(B)の濃度、温度及びpHの条件下で、下記測定を行うことにより求められる。

<阻害濃度 IC_{50} の測定方法>

一定量の多糖合成酵素(B)、リボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)、リボヌクレオシド2リン酸、pH調整剤(K)及び水を含む一定の温度及びpHに調整した酵素反応溶液(I)を作成する。

酵素反応溶液(I)の温度は、製造工程中で(B)を(A)に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での温度と同じ温度に調整する。

酵素反応溶液(I)のpHは、製造工程中で(B)を(A)に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点でのpHと同じpHに調整す

る。

酵素反応溶液 (I) 中の (B) のモル濃度は、(B) を (A) に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での濃度と同じ濃度に調整する。

酵素反応溶液 (I) 中のリボヌクレオシド 2 リン酸の含有量 (モル濃度) は、リボヌクレオシド 2 リン酸が 0 M の酵素反応溶液 (I) 、及びリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が 0 M から多糖合成酵素 (B) の活性が 0 になる (多糖の生成が観測できなくなる) リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度との間で、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が異なる 4 種類以上の酵素反応溶液 (I) 、合計 5 種類以上の酵素反応溶液 (I) を作成する。また、類似の多糖合成酵素に対するリボヌクレオシド 2 リン酸の阻害定数 K_i が分かっている場合は、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が 0 M のもの、類似の多糖合成酵素の K_i 未満で 0 M より大きい濃度範囲で 2 種類以上、 K_i 以上及び K_i の 10 倍以下の濃度範囲で 2 種類以上、合計 5 種類以上作成すればよい。

酵素反応溶液 (I) 中のリボヌクレオシド 2 リン酸-単糖 (A) の含有量は、経時的なピーク面積変化を観測できる濃度を 1 点選べばよい。測定に使用する (B) と類似の多糖合成酵素のミカエリス定数 K_m が分かっている場合は、 K_m 以上及び K_m の 5 倍以下の濃度範囲の間で選べばよい。

酵素反応溶液 (I) に用いる pH 調整剤 (K) は、扱いやすさ及び酵素の安定性の観点から、リン酸塩、ホウ酸塩、HEPES バッファー及び MES バッファー等の Good バッファーが好ましい。酵素反応溶液 (I) 中の (K) の含有量 (モル濃度) は、10 ~ 500 mM である。

作成した酵素反応溶液 (I) について、(I) を作成直後及び一定時間 (例えば 5 分) ごとに溶液の一部 (例えば 100 μ L) を取り出し、取り出したものを 100 °C で 1 分間熱処理し、酵素反応を停止する。液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略記する) を用いて、取り出した反応溶液中の多糖の量を定量する。酵素反応溶液 (I) を作成直後のピーク面積を P_0 、 h 時間後のピーク面積を P_h とし、ピーク面積の変化 ΔP ($\Delta P = P_h - P_0$) と

多糖のピーク面積に対する検量線を用いて酵素反応初速度 v (M/s) を算出する。

さらに、リボヌクレオシド2リン酸の濃度が異なる酵素反応溶液 (1) を用いて同様に測定し、酵素反応初速度 v を算出する。

横軸に (x 軸) に酵素反応溶液 (1) 中のそれぞれのリボヌクレオシド2リン酸の濃度、縦軸 (y 軸) にリボヌクレオシド2リン酸の濃度が0の時の酵素反応初速度 v を100 (%) としたときの相対活性をプロットする。プロットを直線でつなぎ、 $y = 50$ (%) となるときのリボヌクレオシド2リン酸の濃度を阻害濃度 IC_{50} とする。

[0034] 本発明において、反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度は、多糖を効率よく製造する観点から、阻害濃度 IC_{50} の100倍未満が好ましく、さらに好ましくは10倍以下である。

リボヌクレオシド2リン酸の濃度が高くなればなるほど、多糖合成酵素 (B) の活性が抑制される。 IC_{50} の100倍のリボヌクレオシド2リン酸が存在すれば、多糖合成酵素の活性は100分の1に抑制される。したがって、 IC_{50} の100倍のリボヌクレオシド2リン酸が存在すれば、多糖合成酵素を100倍必要とする。さらに、多糖合成酵素溶液に含まれる夾雑酵素も同時に反応系に組み込まれる。つまり、多糖合成酵素の純度99%として、リボヌクレオシド2リン酸が IC_{50} の100倍存在する場合、(リボヌクレオシド2リン酸が存在しない条件の) 100倍多糖合成酵素を添加すると、夾雑酵素はリボヌクレオシド2リン酸が存在しない時に添加する多糖合成酵素の量と同程度含まれることになる。よって、夾雑酵素による望まない反応が問題になってくる。多糖合成酵素の精製度を上げればこの問題は解決するのだが、工業的に酵素を精製する場合、純度99%以上を達成する事は非常に困難である。よって、リボヌクレオシド2リン酸の濃度は100倍未満にする必要がある。

また、複数種類の (B) を用いる場合は、全ての (B) の阻害濃度 IC_{50} を測定し、少なくとも1つの (B) の阻害濃度 IC_{50} について上記範囲であ

ることが好ましい。

また、(A)に(B)を作用させる工程において、リボヌクレオシド2リン酸の濃度が上記範囲である時間は、(A)に(B)を作用させる時間中の10～100%の時間であるが、反応効率の観点から、30～100%の時間であることが好ましく、さらに好ましくは50～100%の時間であり、特に好ましくは80～100%の時間であり、最も好ましくは90～100%の時間である。

多糖合成酵素(B)を用いた従来の生産方法は、副生成物であるリボヌクレオシド2リン酸により、(B)の活性が阻害されるため、多糖の生産効率が低い、生産量が少ない、(B)が大量に必要である等の問題があるが、本発明では、(A)に(B)を作用させる際の反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度が上記範囲であることにより、リボヌクレオシド2リン酸が(B)の活性を阻害しにくく、従来の生産方法よりも生産効率が高い。また、(B)の活性が阻害されにくいので、単位酵素あたりの多糖の生産量が多く、(B)を多量に使用する必要がない。

[0035] 本発明の製造方法において、リボヌクレオシド2リン酸の濃度を上記範囲にする方法としては、下記(i)～(iii)の方法等が挙げられる。

(i) リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)を用いてリボヌクレオシド2リン酸を後述する化合物(C)に変換する方法

(ii) シリカゲル担体等を用いて反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸を吸着させる方法

(iii) 化学反応によりリボヌクレオシド2リン酸を他の化合物に変換する方法

[0036] (ii)の方法においては、シリカゲル担体以外にも、活性炭及びゼオライトなど、リボヌクレオシド2リン酸を吸着できるものであれば制限なく利用できる。

(iii)の方法においては、リボヌクレオシド2リン酸を他の化合物に変換することができる化学反応であれば、一般的に知られている化学反応を

制限無く用いることができる。

[0037] 本発明において、リボヌクレオシド2リン酸の濃度を上記範囲にする方法としては、反応の基質特異性が高く、基質（リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A））が分解されるなどの問題が少ないという観点から、（i）の方法が好ましい。

[0038] （i）のリボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）を用いてリボヌクレオシド2リン酸を化合物（C）に変換する方法とは、具体的には下記方法が含まれる。

リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）に多糖合成酵素（B）を作用させて多糖を製造する方法において、リボヌクレオシド2リン酸を下記化合物（C）に変換する活性を有するリボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）の存在下で（B）を作用させる多糖の製造方法。

化合物（C）：プリン塩基又はピリミジン塩基（C-1）、リボヌクレオシド（C-2）、リボヌクレオシド1リン酸（C-3）、リボヌクレオシド3リン酸（C-4）、ポリリボヌクレオチド（C-5）、デオキシリボヌクレオシド2リン酸（C-6）及びリボヌクレオシド2リン酸-単糖（C-7）からなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物。

[0039] （C-1）には、プリン塩基（アデニン及びグアニン等）並びにピリミジン塩基（チミン、シトシン及びウラシル等）等が含まれる。

（C-2）は、（C-1）の塩基と単糖が結合した化合物であり、具体的には、ウリジン、アデノシン、リボチミジン、シチジン及びグアノシン等が挙げられる。

（C-3）は、（C-2）のモノリン酸エステル化物であり、具体的には、ウリジル酸（ウリジン5'-リン酸）、アデノシン1リン酸（アデノシン5'-リン酸）、リボチミジル酸（リボチミジン5'-リン酸）、シチジン1リン酸（シチジン5'-リン酸）及びグアノシン1リン酸（グアノシン5'-リン酸）等が挙げられる。

（C-4）は、（C-2）のトリリン酸エステル化物であり、具体的には

、ウリジン3リン酸（ウリジン5' - 3リン酸）、アデノシン3リン酸（アデノシン5' - 3リン酸）、リボチミジン-3リン酸（リボチミジン5' - 3リン酸）、シチジン3リン酸（シチジン5' - 3リン酸）及びグアノシン3リン酸（グアノシン5' - 3リン酸）等が挙げられる。

（C-5）は、（C-3）がホスホジエステル結合で重合したポリマーであり、具体的には、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリシチジル酸及びポリグアニル酸等が挙げられる。

（C-6）は、リボヌクレオシド2リン酸分子中のリボースが2-デオキシリボースとなったものであり、具体的には、デオキシウリジン2リン酸、デオキシアデノシン2リン酸、デオキシグアノシン2リン酸、デオキシシチジン2リン酸及びチミジン2リン酸等が挙げられる。

（C-7）には、上記リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）が含まれる。

[0040] リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）には、下記（D1）～（D7）が含まれる。

（D1）リボヌクレオシド2リン酸をプリン塩基又はピリミジン塩基に変換する活性を有する酵素

（D2）リボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオシドに変換する活性を有する酵素

（D3）リボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオシド1リン酸に変換する活性を有する酵素

（D4）リボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオシド3リン酸に変換する活性を有する酵素

（D5）リボヌクレオシド2リン酸をポリリボヌクレオチドに変換する活性を有する酵素

（D6）リボヌクレオシド2リン酸をデオキシリボヌクレオシド2リン酸に変換する活性を有する酵素

（D7）リボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオシド2リン酸-単糖に変

換する活性を有する酵素

[0041] (D2) は、リボヌクレオチド中の糖とリン酸との間のリン酸エステル結合を加水分解して、ヌクレオシドとリン酸にする反応を触媒する酵素である。(D2) として、具体的には、アピラーゼ等が挙げられる。

[0042] (D3) は、リボヌクレオシド2リン酸等のリン酸ジエステルを加水分解してリン酸モノエステルとする反応を触媒する酵素である。(D3) として、具体的には、アデノシン2リン酸(ADP) 特異的ホスホフルクトキナーゼ及びヌクレオチダーゼ等が挙げられる。

[0043] (D4) は、リン酸基を有する化合物から、リボヌクレオシド2リン酸にリン酸基を転移させてリボヌクレオシド3リン酸とする反応を触媒する酵素である。(D4) として、具体的には、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、アルギニンキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、カルバミン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ及びホスホクレアチンキナーゼ等が含まれる。

また、(D4) には、ウリジン3リン酸合成酵素(D4-1) が含まれる。(D4-1) は、作用するリボヌクレオシド2リン酸がウリジン2リン酸であり、ウリジン3リン酸を合成する反応を触媒する酵素である。

[0044] ヌクレオシド2リン酸キナーゼは、ヌクレオシド3リン酸からヌクレオシド2リン酸にリン酸基を転移する酵素である。ヌクレオシド2リン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの(例えば、シロイヌナズナ由来及びコメ由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、エシエリヒア(*Escherichia*) 属由来、サッカロマイセス(*Saccharomyces*) 属由来、バシルス(*Bacillus*) 属由来及びサーマス(*Thermus*) 属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)及び生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例え

ば、Smithらの方法 (The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0045] ポリリン酸キナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸とポリリン酸とから、リボヌクレオシド3リン酸と、重合度の1つ少ないポリリン酸とを生成する活性を有する酵素である。ポリリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {植物由来のもの (例えば、タバコ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (エシェリヒア (Escherichia) 属由来、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属由来、シュードモナス (Pseudomonas) 属由来及びサーマス (Thermus) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0046] アルギニンキナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸と ω -ホスホノーレーアルギニンからリボヌクレオシド3リン酸とL-アルギニンを生成する活性を有する酵素である。アルギニンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ショウジョウバエ由来、エビ由来及びノミ由来のもの等)、植物由来のもの (例えば、ケヤリ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、バシルス (Bacillus) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, N

o. 18, P 6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0047] ピルビン酸キナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸とホスホエノールピルビン酸からリボヌクレオシド3リン酸とピルビン酸を生成する活性を有する酵素である。ピルビン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの (例えば、シロイヌナズナ由来及びトウゴマ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属由来及びサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P 6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0048] カルバミン酸キナーゼは、カルバモイルリン酸とリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸、二酸化炭素、及びアンモニアを生成する活性を有する酵素である。カルバミン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ラット由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、ピロコッカス (*Pyrococcus*) 属由来、及びラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P 6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げ

られる。

[0049] ホスホグリセリン酸キナーゼは、3-ホスホグリセロールリン酸とリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸及び3-ホスホグリセリン酸を生成する活性を有する酵素である。ホスホグリセリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ラット由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0050] ホスホクレアチンキナーゼは、ホスホクレアチンとリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸及びクレアチンを生成する活性を有する酵素である。ホスホクレアチンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ラット由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等} 等が挙げられる。

[0051] (D4) は、1種を使用してもよく、2種以上を使用してもいい。

(D4) のうち、リボヌクレオシド3リン酸合成活性の高さの観点から、アルギニンキナーゼ、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ及びカルバミン酸キナーゼが好ましい。

[0052] (D4) を作用させる際、必要により、リボヌクレオシド2リン酸にリン

酸基を与えるリン酸基含有化合物（F）を用いてもいい。（F）はリン酸基を有する化合物である。（F）としては、（D4）の基質特異性の観点から、リボヌクレオシド2リン酸にリン酸基を供与し得る化合物が好ましい。（F）としては、例えば、トリアミノホスフィンオキシド、リン酸化したアミノ酸（例えば ω -ホスホノーレ-アルギニン等）、ポリリン酸、ホスホエノールピルビン酸及びその塩（例えば、リチウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩等）、カルバモイルリン酸、3-ホスホグリセロールリン酸、ホスホクレアチン並びにヌクレオシド3リン酸（例えばグアノシン3リン酸及びアデノシン3リン酸等）等が挙げられる。

リン酸基含有化合物（F）を用いる場合、（D4）と（F）との組み合わせとしては、ヌクレオシド2リン酸キナーゼとヌクレオシド3リン酸との組み合わせ、ポリリン酸キナーゼとポリリン酸との組み合わせ、アルギニンキナーゼと ω -ホスホノーレ-アルギニンとの組み合わせ、ピルビン酸キナーゼとホスホエノールピルビン酸及びその塩との組み合わせ、カルバミン酸キナーゼとカルバモイルリン酸との組み合わせ、ホスホグリセリン酸キナーゼと3-ホスホグリセロールリン酸との組み合わせ、ホスホグリセリン酸キナーゼと3-ホスホグリセロールリン酸との組み合わせ並びにホスホクレアチンキナーゼとホスホクレアチンとの組み合わせが好ましい。

[0053] リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）がウリジン3リン酸合成酵素（D4-1）であり、化合物（C）がウリジン3リン酸であり、リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）がウリジン2リン酸-単糖である場合、下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 $I_{C_{50}}$ の100倍未満であることが好ましい。

ミカエリス定数 K_m ：ウリジン2リン酸を基質とし、（D4-1）を酵素とし、リン酸基含有化合物（F）の存在下でウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 $I_{C_{50}}$ ：多糖合成酵素（B）をウリジン2リン酸-単糖に作用させる際の（B）の濃度において、基質としてウリジン2リン酸-単糖を用いて

、阻害剤としてウリジン2リン酸を用いて求めた、(B)の酵素活性が半減するときのウリジン2リン酸の濃度。

[0054] ミカエリス定数 K_m は、Agarwalらによって報告された方法 (Methods of enzymology, 1978, Vol. 51, P483-491に記載の方法) で酵素反応初速度の基質濃度依存性を求めることによって求められる。ミカエリス定数 K_m の測定に用いる(D4-1)の形態としては、精製酵素を用いる。また、阻害濃度 IC_{50} は、上述の方法によって求める。

[0055] (D5)は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオシド1リン酸の共重合体(ポリリボヌクレオチド等)及び無機リン酸とする反応を触媒する酵素である。(D5)として、具体的には、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ等が挙げられる。

[0056] (D6)は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオチドを還元してデオキシリボヌクレオチド(デオキシウリジン2リン酸等)とする反応を触媒する酵素である。(D6)として、具体的には、リボヌクレオチドジホスホリダクターゼ等が挙げられる。

[0057] リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)として(D6)を用いる場合、還元剤(d6)を用いる必要がある。(d6)としては、電子伝達タンパク質を用いることができ、例えば、還元型チオレドキシニン等が挙げられる。

[0058] (D7)は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオシド2リン酸と糖又は糖リン酸とから糖核酸(リボヌクレオシド2リン酸-単糖)を合成する反応を触媒する酵素である。(D7)として、具体的には、スクロースシンターゼ及びN-アシルニューラミネートシチジルトランスフェラーゼ等が挙げられる。

[0059] リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)として(D7)を用いる場合、糖核酸の原料(d7)として、糖(d7-1)又は糖リン酸(d7-2)を用いる必要がある。

(d7-1)には、単糖、二糖及びオリゴ糖等が含まれ、具体的には、ス

クローズ等が挙げられる。

(d 7-2) は、単糖の有するヒドロキシル基のうち1つに1つのリン酸が結合した化合物であり、例えば、グルクロン酸1リン酸(1-ホスホ- α -D-グルクロン酸等)、N-アセチルグルコサミン1リン酸(N-アセチル-D-グルコサミン-1-ホスファート等)等が挙げられる。

(D 7) により合成されるリボヌクレオシド2リン酸-単糖は、本発明の製造方法の原料である(A)と同じでもよく、(A)と異なってもいい。糖

(d 7-1) 又は糖リン酸(d 7-2)として、本発明の製造方法の原料であるリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)と同じ単糖(a)のヒドロキシル基に、1つのリン酸が結合した化合物である場合は、(A)が合成される。

[0060] 上記リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)のうち、多糖を効率よく製造する観点及び工業化しやすいという観点から、(D 2)、(D 3)、(D 4)、(D 5)及び(D 7)が好ましく、さらに好ましくは(D 4)、特に好ましくは(D 4-1)である。

(D) は、1種を使用してもよく、2種以上を併用してもいい。

[0061] 本発明において、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)を用いる場合、下記酵素活性 V_{max1} 及び下記酵素活性 V_{max2} を用いて下記数式(1)から算出した酵素活性比(Y_1)が、多糖を効率よく製造する観点及び基質(リボヌクレオシド2リン酸-単糖(A))を有効利用する観点から、0.1以上であることが好ましい。

$$\text{酵素活性比}(Y_1) = V_{max1} / V_{max2} \quad (1)$$

酵素活性 V_{max1} : リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)のリボヌクレオシド2リン酸に対する酵素活性。

酵素活性 V_{max2} : リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)のリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)に対する酵素活性。

なお、酵素活性 V_{max1} 及び V_{max2} は下記酵素活性 V_{max} の測定法により測定できる。

[0062] <酵素活性 V_{max} の測定法>

一定量の基質（リボヌクレオシド 2 リン酸又はウリジン 2 リン酸-単糖（A））、酵素（多糖合成酵素（B）又はリボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素（D））、pH調整剤（K）及び水を含む、一定の温度及び一定の pH に調整した酵素反応溶液（I I）を作成する。酵素反応溶液（I I）中において、用いる酵素が（D 4）である場合は必要によりリン酸基含有化合物（F）を添加し、酵素が（D 6）である場合は還元剤（d 6）を添加し、（D 7）である場合は糖核酸の原料（d 7）を添加する。

酵素反応溶液（I I）を作成後、静置し、1分～100時間酵素反応させる。次に、反応後の反応生成物量（X）を測定して酵素反応初速度 v を求める。同様に、基質の濃度が異なる酵素反応溶液（I I）を用いて、酵素反応初速度 v を求める。得られた酵素反応初速度 v と基質の濃度とからラインウェバー-バークプロットを作成し、酵素活性 V_{max} を求める。

ここで、酵素反応溶液（I I）の温度は、0～100℃の範囲内で、酵素の活性が失活せず、活性がある温度で、酵素反応溶液（I I）作成時から測定終了までの間、一定温度に保つことができればいい。

酵素反応溶液（I I）の pH は、pH 3～12 の範囲内であればいい。後述する多糖合成酵素（B）の最適 pH がわかっている場合は、最適 pH であることが好ましい。

酵素反応溶液（I I）に用いる pH 調整剤（K）は、扱いやすさ及び酵素の安定性の観点から、HEPES バッファー、MES バッファーなどの Good バッファーが好ましい。酵素反応溶液（I I）中の pH 調整剤（K）の濃度（モル濃度）は、25～500 mM である。

酵素反応溶液（I I）中の酵素の濃度（モル濃度）は、使用する（D）の種類によって適宜選択されるが、後述する反応生成物量（X）を縦軸に、時間 h を横軸にプロットした場合、プロットが一次関数となる濃度を選ぶ。

酵素が（D 4）であり、リン酸基含有化合物（F）を添加する場合、酵素反応溶液（I I）中の（F）の濃度（モル濃度）は、1 nM～10 M である

。また、(F)の濃度は、(F)の濃度を2倍又は1/2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

酵素が(D6)である場合、酵素反応溶液(11)中の還元剤(d6)の濃度(モル濃度)は、1 nM~10Mである。また、(d6)の濃度は、(d6)の濃度を2倍又は1/2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

酵素が(D7)である場合、酵素反応溶液(11)中の糖核酸の原料(d7)の濃度(モル濃度)は、1 nM~10Mである。また、(d7)の濃度は、(d7)の濃度を2倍又は1/2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

酵素反応溶液(11)中の基質の濃度(モル濃度)は、経時的に反応生成物量(X)を観測できる最小の基質濃度から最大の基質濃度の間で3点以上選ばばよい。

反応時間は、短すぎると、反応生成物量(X)の正確な値が測定できない。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活したり基質が枯渇するという問題が存在する。したがって、反応時間は反応生成物量(X)を縦軸に、時間を横軸にプロットした場合、プロットが一次関数となる反応時間とする。

反応生成物量(X)は、反応生成物の量を定量的に測定する目的で適切な条件下でHPLCを用いて解析を行うことにより求める。ここにおいて、反応生成物とは、多糖合成酵素(B)又はリボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)が有する活性により基質が変換されて生成したものである。

酵素活性 V_{max} (M/s)はミカエリスメンテン式から派生したラインウェバーバーク(Lineweaver-Burk)プロットを用いて求める。ラインウェバーバークプロットは、横軸(x軸)にそれぞれの基質の濃度の逆数($1/[S]$)、縦軸(y軸)にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数($1/v$)をプロットしたものであり、プロットの近似直線とy軸との交点が酵素活性 V_{max} の逆数($1/V_{max}$)である。

[0063] 上記測定において、酵素としてリボヌクレオシド2リン酸変換酵素(D)

を用いて、基質としてリボヌクレオシド2リン酸を用いて求めたものが V_{max_1} である。また、酵素としてリボヌクレオシド2リン酸変換酵素 (D) を用いて、基質としてリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) を用いて求めたものが V_{max_2} である。2種以上のリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) を用いる場合は、それぞれのリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) についてそれぞれ V_{max_2} を求める。また、それぞれの V_{max_2} を用いて、数式 (1) からそれぞれ酵素活性比 (Y_1) を求める。酵素活性比 (Y_1) は、多糖を効率よく製造する観点及び基質 (リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A)) を有効利用する観点から、全ての酵素活性比 (Y_1) が0.1以上であることが好ましい。

また、多糖の製造において、2種以上の (D) を用いる場合は、それぞれの (D) について酵素活性比 (Y_1) を求める。多糖を効率よく製造する観点及び基質 (リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A)) を有効利用する観点から、少なくとも1種の (D) について酵素活性比 (Y_1) が0.1以上であることが好ましく、さらに好ましくは全ての (D) について酵素活性比 (Y_1) が0.1以上であることが好ましい。

[0064] <多糖合成酵素 (B) の最適 pH 測定法>

一定量のリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A)、多糖合成酵素 (B)、pH調整剤 (K) 及び水を含み、pHがそれぞれ3~12である酵素反応溶液 (III) を作成する。次に、酵素反応溶液 (III) を静置して、1分~100時間反応を行う。さらに、酵素反応溶液 (III) 中に生成した多糖の量をそれぞれ測定する。縦軸に多糖の生成量、横軸にpHをプロットし、多糖の生成量が極大値となるpHが最適pHである。

酵素反応溶液 (III) の温度は、0~100℃の範囲内で、多糖合成酵素 (B) の活性が失活せず、活性があり、吸光度の測定ができる温度で、酵素反応溶液 (III) 作成時から測定終了までの間、一定温度に保つことができればよい。

酵素反応溶液 (III) に用いるpH調整剤 (K) は、扱いやすさ及び安

定性の観点から、HEPESバッファー及びMESバッファー等のGoodバッファーが好ましい。酵素反応溶液(III)中のpH調整剤(K)の濃度(モル濃度)は、25~500mMである。

酵素反応溶液(III)中のリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)の濃度(モル濃度)は、10mMである。また、複数種類の(A)を用いる場合は、それぞれの濃度(モル濃度)が10mMである。(A)としては、(B)を作用させる(A)を適宜選択して用いる(例えば、(B)が(B-1)である場合は、(A)としてリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルグルコサミンを用いる)。

酵素反応溶液(III)中の多糖合成酵素(B)の濃度(U/L)は0.001~10,000U/Lである。(但し1Uとは1分間に1 μ molのリボヌクレオシド2リン酸-糖からリボヌクレオシド2リン酸を生成する酵素量である。)

反応時間は、短すぎると多糖の生成量の正確な値が測定できない。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活したり基質が枯渇するという問題が存在する。したがって、多糖の生成量を縦軸に、時間を横軸にプロットした場合、プロットが一次関数となる反応時間で、多糖の生成量の正確な値が測定できる反応時間とする。

多糖の生成量は、放射性同位体でラベルしたリボヌクレオシド2リン酸-単糖を用いることで測定できる。例えば、¹⁴Cで単糖(例えばグルクロン酸)をラベルしたリボヌクレオシド2リン酸-単糖(A)(例えばリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸)を用いて多糖合成を行い、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質(リボヌクレオシド2リン酸-単糖(A))と多糖を分離し、多糖の生成量を測定する。

それぞれのpH(pH3~12)の酵素反応溶液(III)について、同様に多糖の生成量を測定する。

縦軸に多糖の合成量、横軸にpHをプロットし、多糖の合成量が極大値となるpHが最適pHである。

[0065] また、本発明において、上記酵素活性 V_{max1} 及び下記酵素活性 V_{max3} を用いて下記数式 (2) から算出した酵素活性比 (Y_2) が 0.1 以上であることが好ましい。

$$\text{酵素活性比 } (Y_2) = V_{max1} / V_{max3} \quad (2)$$

酵素活性 V_{max3} : 多糖合成酵素 (B) のリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) に対する酵素活性。

なお、酵素活性 V_{max3} は上記酵素活性 V_{max} の測定法において、酵素として多糖合成酵素 (B) を用いて、基質としてリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) を用いることにより測定できる。

[0066] 2 種以上のリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) を用いる場合は、それぞれのリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) についてそれぞれ V_{max3} を求める。また、それぞれの V_{max3} を用いて、数式 (2) からそれぞれ酵素活性比 (Y_2) を求める。酵素活性比 (Y_2) は、多糖を効率よく製造する観点及び基質 (リボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A)) を有効利用する観点から、全ての酵素活性比 (Y_2) が 0.1 以上であることが好ましい。

また、多糖の製造において、2 種以上の (B) 及び/又は 2 種以上の (D) を用いる場合は、それぞれの (B) 及び (D) について酵素活性比 (Y_2) を求める。多糖を効率よく製造する観点及び基質 (リボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A)) を有効利用する観点から、少なくとも 1 種の (B) 及び (D) の関係について酵素活性比 (Y_2) が 0.1 以上であることが好ましく、さらに好ましくは全ての (B) 及び (D) の関係において酵素活性比 (Y_2) が 0.1 以上であることが好ましい。

[0067] 本発明の製造方法は、反応溶液中のリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が多糖合成酵素 (B) の阻害濃度 IC_{50} の 100 倍未満であれば、従来のリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) に多糖合成酵素 (B) を作用させる多糖の製造方法と同様でいい。例えば、リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) を用いて、下記工程 (a) ~ (c) により製造する方法が含まれる。下記において、(A) に (B) を作用させる工程は、工程 (a) 及び (b) であり

、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）の存在下で（B）を作用させる工程は、工程（a）及び（b）である。

工程（a）：所定量のリボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）、多糖合成酵素（B）、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）及び溶剤（H）を混合して反応溶液（Z）とし、所定の温度、所定のpHに調整する。本工程では、必要により攪拌してもいい。

リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）及び溶剤（H）を混合し、温度及びpHを調整した後、（B）及び（D）を添加してもいい。さらに、（B）及び（D）は、そのまま添加してもよく、溶剤（H）で希釈してから添加してもいい。

また、反応溶液（Z）中には、使用する（D）が（D4）である場合は、リン酸基含有化合物（F）を含んでもいい。また、使用する（D）が（D6）である場合は、還元剤（d6）を含む。また、使用する（D）が（D7）である場合は、糖核酸の原料（d7）を含む。

さらに、反応溶液（Z）中には、脂質（L）、糖類（M）及びオリゴ糖（N）を含んでもいい。

工程（b）：反応溶液（Z）の温度を調整しながら、所定の時間、リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）に多糖合成酵素（B）を作用させる。本工程では、必要により攪拌してもいい。

工程（c）：生成した多糖を精製する。多糖の精製方法としては、適量のアルコール（炭素数1～10のアルコール）などの溶剤を加えて沈殿させる方法や膜（具体的には、セラミック膜等）を用いて溶液交換をする方法等が挙げられる。

[0068] 反応溶液（Z）中のリボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）の含有量（モル濃度）は、多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素（B）を効率よく作用させる観点から、0.1 mM～2 Mが好ましい。複数種類の（A）を含む場合は、それぞれの含有量（モル濃度）が0.1 mM～2 Mであることが好ましい。

反応溶液（Z）中の多糖合成酵素（B）の含有量（重量％）は、多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素（B）を効率よく作用させる観点から、0.1～100,000 U/Lが好ましい。

ここで1 Uは、1分間に1 μmol の基質（リボヌクレオシド2リン酸単糖（A））を多糖に変換する酵素量を意味する。例えば、（B）が（B-1）であり、（A）としてウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンを用いる場合、1分間にウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンを合計1 μmol 、多糖に変換する酵素量を意味する。

反応溶液（Z）中のリボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）の含有量（U/L）は、多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素（B）を効率よく作用させる観点から、0.1～100,000 U/Lが好ましい。

1 Uは、1分間に1 μmol の基質（リボヌクレオシド2リン酸）を化合物（C）に変換する酵素量を意味する。

[0069] 反応溶液（Z）中のリン酸基含有化合物（F）、還元剤（d6）及び糖核酸の原料（d7）のそれぞれの含有量（モル濃度）は、多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素（B）を効率よく作用させる観点から、それぞれ0.01 nM～10 Mが好ましい。

[0070] 溶剤（H）としては、水及びpH調整剤（K）を含有した水が含まれる。pH調整剤としては、従来のpH調整剤が使用でき、例えば、ホウ酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、Trisバッファー、HEPESバッファー、硫酸、塩酸、クエン酸、乳酸、ピルビン酸、蟻酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、モノエタノールアミン及びジエタノールアミン等が挙げられる。

[0071] 反応溶液（Z）の温度は、（B）及び（D）の安定性並びに反応速度の観点から、0～100℃が好ましい。

[0072] 反応溶液（Z）のpHは、反応の至適条件である観点から、pH3～12が好ましい。また、効率よく多糖を製造する観点から、（B）の最適pHで

あることが好ましい。

[0073] 上記工程 (a) 及び (b) において、上記ウリジン 2 リン酸-単糖 (A)、多糖合成酵素 (B)、リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D)、リン酸基含有化合物 (F)、還元剤 (d 6) 及び糖核酸の原料 (d 7) 以外に、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、脂質 (L)、糖類 (M) 及びオリゴ糖 (N) を用いてもよい。

[0074] 脂質 (L) としては、例えば、カルディオピン及びオレイン酸等が挙げられる。

糖類 (M) としては、例えば、グリセリン等が挙げられる。

オリゴ糖 (N) としては、例えば、オリゴヒアルロン酸等が挙げられる。

[0075] 反応溶液 (Z) 中の脂質 (L) の含有量 (重量%) は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0~1 が好ましい。

反応溶液 (Z) 中の糖類 (M) の含有量 (重量%) は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0~30 が好ましい。

反応溶液 (Z) 中のオリゴ糖 (N) の含有量 (重量%) は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0~1 が好ましい。

[0076] 工程 (b) において、多糖合成酵素 (B) を作用させる時間は、多糖合成酵素 (B) の活性、反応溶液 (Z) の温度、多糖合成酵素 (B) 及びリボヌクレオシド 2 リン酸-単糖 (A) の量比等によって異なる。反応溶液 (Z) の温度を、多糖合成酵素 (B) の活性が高く、反応速度が速い温度に調整すれば、反応時間を短くすることができる。また、反応溶液 (Z) 中のリボヌクレオシド 2 リン酸-単糖 (A) に対する多糖合成酵素 (B) の量が多いほど、反応は速くなり、反応時間は短くなる。

[0077] 本発明の製造方法では、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度を阻害濃度 1C_{50} の 100 倍未満とすることで、多糖合成酵素 (B) の活性が阻害されにくく、単位酵素当たりのリボヌクレオシド 2 リン酸-単糖 (A) への作用効率が高く、多糖を効率よく製造することができる。また、本発明の製造方法では、反応溶液中にコンドロイチンサルフェート、グリコサミノグリカンサルフ

エート及び微生物等の不純物が含まれておらず、精製が容易である。また、従来の多糖合成酵素を用いた製造方法に比べて、多糖合成酵素（B）の活性が阻害されにくく、多糖合成酵素（B）を大量に使用する必要がないため、多糖の製造コストが低い。

[0078] 本発明の製造方法において、多糖がヒアルロン酸であり、リボヌクレオシド2リン酸-単糖（A）がウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンであり、多糖合成酵素（B）がヒアルロン酸合成酵素（B-1）であり、化合物（C）がウリジン3リン酸であり、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）がウリジン3リン酸合成酵素（D4-1）であることが好ましい。この場合、多糖であるヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、上記反応溶液（Z）中に、さらにリン酸基含有化合物（F）、1-ホスホ-グルクロン酸及びウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G）を含んでいることがより好ましい。

[0079] 1-ホスホ-グルクロン酸は、グルクロン酸の1位のヒドロキシル基がリン酸でリン酸エステル化されたものである。

[0080] ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G）は、ウリジン3リン酸と1-ホスホ-グルクロン酸からウリジン2リン酸-グルクロン酸を生成する活性を有する酵素であれば特に限定されない。動物起源の動物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G-1）、植物起源の植物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G-2）、微生物起源の微生物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G-3）、（G-1）～（G-3）が化学的に修飾された変異体（G-4）及び（G-1）～（G-3）が遺伝子的に修飾された変異体（G-5）が含まれる。

[0081] 動物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G-1）としては、例えば、ブタ由来のもの等が挙げられる。

- [0082] 植物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G-2) としては、例えば、シロイヌナズナ由来、エンドウマメ由来及びオオムギ由来のもの等が挙げられる。
- [0083] 微生物ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G-3) としては、例えば、サーマス (Thermus) 属由来のもの等が挙げられる。
- [0084] 化学的に修飾したウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G-4) として、例えば上記ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼにカルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物等を作用させて化学修飾したもの等が挙げられる。
- [0085] 遺伝子的に修飾したウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G-5) として、Smithらの方法 (The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560) で上記ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼの遺伝子を改変してアミノ酸を置換したもの等が挙げられる。
- [0086] 上記ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G) のうち、ウリジン2リン酸-グルクロン酸を合成する活性の高さの観点から、(G-2) が好ましく、さらに好ましくはシロイヌナズナ由来のヌクレオシド-2-リン酸キナーゼである。
- また、ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (G) は、2種以上を用いてもいい。
- [0087] 反応溶液 (Z) 中の1-ホスホ-グルクロン酸の含有量 (モル濃度) は、ウリジン2リン酸-グルクロン酸に変換されやすくする観点から、0.0001 mM~1 Mが好ましく、さらに好ましくは0.01 mM~100 mMである。
- 反応溶液 (Z) 中のウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリ

ジリルトランスフェラーゼ (G) の含有量 (U/mL) はウリジン 2 リン酸-グルクロン酸の変換効率を良くする観点から、0.00001 U/mL ~ 10,000 U/mL が好ましく、さらに好ましくは 0.001 U/mL ~ 1,000 U/mL である。

1 U とは、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のウリジン 3 リン酸及び $1 \mu\text{mol}$ の 1-ホスホグルクロン酸をウリジン 2 リン酸-グルクロン酸にする酵素量である。

[0088] 本発明の製造方法において、リボヌクレオシド 2 リン酸-単糖 (A) としてウリジン 2 リン酸-グルクロン酸及びウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミン、多糖合成酵素 (B) としてヒアルロン酸合成酵素 (B-1)、化合物 (C) としてウリジン 3 リン酸、リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) としてウリジン 3 リン酸合成酵素 (D4-1) を用いて、リン酸基含有化合物 (F)、1-ホスホグルクロン酸及びウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (G) を含む反応溶液 (Z) 中で多糖であるヒアルロン酸を製造する場合、ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、下記工程 (1) ~ (3) を同時に行う製造方法であることが好ましい。

工程 (1) : ウリジン 2 リン酸-グルクロン酸とウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンとにヒアルロン酸合成酵素 (B-1) を作用させて、ヒアルロン酸及びウリジン 2 リン酸を得る工程。

工程 (2) : ウリジン 2 リン酸とリン酸基含有化合物 (F) とにウリジン 3 リン酸合成酵素 (D4-1) を作用させてウリジン 3 リン酸を得る工程。

工程 (3) : ウリジン 3 リン酸と 1-ホスホグルクロン酸とにウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (G) を作用させてウリジン 2 リン酸-グルクロン酸を得る工程。

[0089] また、上記工程 (1) ~ (3) を同時に行う製造方法である場合、下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 $I_{C_{50}}$ の 100 倍未満であることが好ましい。

ミカエリス定数 K_m : ウリジン 2 リン酸を基質とし、(D 4 - 1) を酵素とし、リン酸基含有化合物 (F) の存在下でウリジン 3 リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 $I_{C_{50}}$: (B - 1) をウリジン 2 リン酸-グルクロン酸及びウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンに作用させる際の (B - 1) の濃度において、基質としてウリジン 2 リン酸-グルクロン酸及びウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンを用いて、阻害剤としてウリジン 2 リン酸を用いて求めた、(B - 1) の酵素活性が半減するときのウリジン 2 リン酸の濃度。

[0090] ミカエリス定数 K_m は、Agarwal らによって報告された方法 (Methods of enzymology, 1978, Vol. 51, P 483-491 に記載の方法) で酵素反応初速度の基質濃度依存性を求めることによって求められる。ミカエリス定数 K_m の測定に用いる (D 4 - 1) の形態としては、精製酵素を用いる。

[0091] 上記工程 (1) ~ (3) を同時に行うヒアルロン酸の製造方法は、工程 (1) ~ (3) の反応を同じ反応溶液中で行っていれば特に制限なく実施できる。具体的一例としては、リン酸基含有化合物 (F)、ウリジン 3 リン酸合成酵素 (D 4 - 1)、1-ホスホ-グルクロン酸、ウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (G)、ウリジン 2 リン酸-グルクロン酸、ウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミン、ヒアルロン酸合成酵素 (B - 1) 及び溶剤 (H) を仕込んで反応溶液 (Z') として、ヒアルロン酸を製造する方法が挙げられる。反応溶液 (Z') には、ピロリン酸分解酵素、脂質 (L)、糖類 (M) 及びオリゴ糖 (N) を含有してもいい。反応溶液 (Z) 中の各成分の濃度、反応条件等は上記工程 (a) ~ (c) を含む製造方法と同様である。

[0092] 上記工程 (1) ~ (3) を同時に行う製造方法では、副生成物としてピロリン酸が生成し、ピロリン酸が酵素 { (B - 1)、(D 4 - 1) 及び (G) } の活性を阻害してしまう場合がある。本発明の製造方法でピロリン酸分解

酵素を用いると、ピロリン酸を分解し、ピロリン酸が（B-1）、（D4-1）及び（G）の酵素活性を阻害することを緩和することができるので好ましい。

ピロリン酸分解酵素としては、EC 3. 1. 3 及び EC 3. 6. 1 に分類される酵素が挙げられ、具体的にはアルカリホスファターゼ、アピラーゼ、フィターゼ及びジホスファターゼ等が挙げられる。

ピロリン酸分解酵素としては、反応生成物（ウリジン3リン酸及びヒアルロン酸）を分解しにくいという観点から、ジホスファターゼが好ましい。

反応溶液（Z）中のピロリン酸分解酵素の含有量（U/mL）は、反応生成物（ウリジン3リン酸、ウリジン2リン酸-グルクロン酸及びヒアルロン酸）を分解せずにピロリン酸を分解する観点から、0.00001~100が好ましい。

ピロリン酸分解酵素において、1Uは、1分間に1 μ molのピロリン酸を分解する酵素量である。

[0093] 本発明の多糖の製造方法によれば、多糖を高効率で生産できる。また、本発明の製造方法により得られた多糖は、化粧品、医薬部外品、医薬品及び医療機器だけでなく、食品等にも用いることができる。

実施例

[0094] 以下、実施例及び比較例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0095] <製造例1>

ストレプトコッカスエクイシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子にFLAGタグを融合した遺伝子をpKK223-3に組み込んだプラスミドを大腸菌*E. coli* SUREに形質転換して、30℃で5時間培養し、培養液の濁度（濁度計：島津製作所社製「UV-1700」、1mlの石英セル）が0.5に達したところで、発現誘導した。その後、遠心分離機[KUBOTA社製「5922」（以下同じ）、4℃、6000×g、15分間]を用いて大腸菌を回収した。回収した大腸菌を、緩衝液A

{100 mMの塩化ナトリウム、10 mMの塩化マグネシウム、10 mMのドデシルマルトシド、5 mMのオレイン酸を含む100 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0)} に再懸濁して、超音波破碎 (130 W、10分) を行った。その後、抗FLAG抗体カラムで精製を行い、ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1) を得た。

[0096] <ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1) の比活性測定>

水溶液 S {1 mMのウリジン2リン酸-グルクロン酸 (^{14}C でラベルした放射性同位体を含むウリジン2リン酸-グルクロン酸、放射能 $300\text{ mCi} / \text{mmol}$)、1 mMのウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン、100 mMの塩化ナトリウム、10 mMの塩化マグネシウム、10 mMのドデシルマルトシド、5 mMのオレイン酸を含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0)} 1 mLに、製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1) を $10\ \mu\text{L}$ 加えて、反応溶液 (1) としたものを4つ作成し、それぞれ 30°C で5分、10分、15分、20分反応を行った。ろ紙 (Whatman No. 3MM、以下同じ) を用いたペーパークロマトグラフィー法 (展開溶媒: 1 M酢酸アンモニウム (pH 5.5) : エタノール = 7 : 13、以下同じ) で未反応の基質とヒアルロン酸とを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定した。 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量から、ヒアルロン酸の合成量を算出したところ、それぞれ5分後 1.6 mg 、10分後 2.9 mg 、15分後 4.2 mg 、20分後 5.5 mg であった。ヒアルロン酸の合成量と反応時間との関係から、ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1) の比活性を計算した。その結果、 $0.15\text{ U} / \mu\text{l}$ であった。

[0097] <ヒアルロン酸合成酵素の阻害濃度 IC_{50} の測定>

1. 5 mL容量のチューブ中で $940\ \mu\text{L}$ の水溶液1 [5 mMの塩化マグネシウムと0.05 mMのウリジン2リン酸ナトリウムを含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5、 25°C)] に、製造例1で得たヒアルロン酸合成

酵素水溶液（B-1）を1.5 U/mLとなるように溶解し、恒温水槽を用いてチューブを40°Cで20分静置した。ここに、40°Cに温調した基質溶液〔1-1〕〔ウリジン2リン酸-グルクロン酸ナトリウム塩及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンを緩衝液B {50 mMのリン酸緩衝液（pH 7.5、25°C）}に溶解してそれぞれ20 mMの濃度にしたもの〕を50 µL添加し、酵素反応溶液（1-1）とした。（1-1）を作成直後及び5分おきに100 µLずつ取り出し、取り出した溶液は、100°Cで2分間加熱して酵素反応を停止した。酵素反応を停止した溶液について、遠心分離器（4°C、12,000×g、10分）を用いて遠心し、不純物を沈殿させた。上清80 µLを下記条件でHPLCにより分析し、ヒアルロン酸のピーク面積を記録した。

<HPLCの測定条件>

以下において、HPLCの測定条件は全て同じである。

装置：ACQUITY UPLCシステム

カラム：Shodex OHpak SB-806M HQ

移動相：0.1 M NaNO₃

流速：1.0 ml/min

検出器：ACQUITY UPLC RID検出器

温度：40°C

水溶液1において、ウリジン2リン酸ナトリウムの濃度が異なる溶液 {0 mM（水溶液2）、0.15 mM（水溶液3）、3 mM（水溶液4）、1 mM（水溶液5）及び3 mM（水溶液6）}を作成した。水溶液1に代えて水溶液2～6を用いる以外は同様にして酵素反応溶液（1-2）～（1-6）を作成した。酵素反応溶液（1-2）～（1-6）についても、酵素反応溶液（1-1）の場合と同様にして、ヒアルロン酸のピーク面積を記録した。

ヒアルロン酸ナトリウム（フナコシ社製、「ヒアロース」、分子質量：175 kDa）を緩衝液Bに溶解し、それぞれ0.001 µg/mL、0.01 µg/mL、0.1 µg/mL及び5 µg/mLの濃度にしたものを作成

し、ヒアルロン酸標準溶液（１）～（４）とした。（１）～（４）を、HPLCにより分析し、ヒアルロン酸のピーク面積をそれぞれ記録した。横軸（x軸）にそれぞれのヒアルロン酸濃度（ μg ）、縦軸（y軸）にそれぞれのピーク面積Pをプロットし、直線の傾き「k」を算出した。

（１－１）～（１－６）を作成直後のウリジン３リン酸のピーク面積を P_0 、「m」分後のピーク面積を P_h とし、それぞれピーク面積の変化 ΔP （ $\Delta P = P_h - P_0$ ）と上記直線の傾きを用いて下記数式（１）からそれぞれの酵素反応初速度 v （ $\mu\text{g}/\text{s}$ ）を算出した。

$$v = \Delta P / (k \times m \times 60) \quad (1)$$

酵素反応溶液（１－２）を用いて測定した酵素反応初速度 v を100%とし、酵素反応溶液（１－１）及び（１－３）～（１－６）を用いて測定した酵素反応初速度の相対値（%）を算出した。算出した相対値を用いて、横軸（x軸）にそれぞれのウリジン２リン酸濃度[S]、縦軸（y軸）に酵素反応溶液（１－１）～（１－６）での酵素反応初速度 v の相対値をプロットした。プロットの近似曲線と直線 $y = 50$ （%）との交点でのウリジン２リン酸の濃度が阻害濃度 IC_{50} であり、阻害濃度 IC_{50} は0.11mMであった。

また、上記において、「ヒアルロン酸合成酵素水溶液（B－１）を1.5U/mL」に代えて「ヒアルロン酸合成酵素水溶液（B－１）を45U/mL」とする以外は同様にして、阻害濃度 IC_{50} を測定したところ、0.11mMであった。

[0098] <ヒアルロン酸合成酵素の酵素活性 V_{max3} 、酵素活性比（ Y_2 ）の測定>

下記の「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比（ Y_1 ）の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液（D7－１）」に代えて「ヒアルロン酸合成酵素水溶液（B－１）」を用いて、基質として、「ウリジン２リン酸」に代えて「ウリジン２リン酸－グルクロン酸及びウリジン２リン酸－N－アセチルグルコサミン」を用いて、また、「スクロース」を用いない以外は同様にして、ウリジン２リン酸－グルクロン酸及び

ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンに対する酵素活性 V_{max_3} を求めた。

得られた酵素活性 V_{max_3} と、後述する (D2-1)、(D3-1)、(D4-1-1) ~ (4-1-3)、(D5-1)、(D6-1) 及び (D7-1) について求めた酵素活性 V_{max_1} とから、酵素活性比 (Y_2) を求めた。酵素活性比 (Y_2) は全て0.1以上であった。

[0099] <製造例2>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミリス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「ソラマメ由来の配列番号2のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1) を得た。

[0100] <スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1) の比活性測定>

水溶液R {100mMの塩化ナトリウム、10mMの塩化マグネシウム、1mMのウリジン2リン酸を含む50mMのリン酸緩衝液 (pH7.0)} 1mLに、1Mのスクロース水溶液を10 μ L及びスクロースシンターゼ水溶液 (D7-1) を10 μ L加えて反応溶液 (2) としたものを3つ作成し、それぞれ30 $^{\circ}$ Cで5分、10分、15分反応を行った。化合物 (C-7) である反応生成物 (ウリジン2リン酸-グルコース) の量は、TLC (Sigma社製、PEI-Celluloseプレート、以下同じ) で展開して (展開溶媒: 1MのLiCl、1Mのギ酸を含む水溶液、以下同じ)、UVライト (260nm) で検出して求めた。化合物 (C-7) の生成量と反応時間との関係から、スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1) の比活性を計算したところ、0.3U/ μ Lであった。

[0101] <スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max_1} 、 V_{max_2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定>

水溶液P {100mMの塩化ナトリウム、10mMの塩化マグネシウムを含む50mMのリン酸緩衝液 (pH7.0)} 1mLに、溶液中の濃度が0.5mMとなるように基質 (ウリジン2リン酸) を加え、スクロース (和光

純薬工業社製)を溶液中の濃度が100mMとなるように加え、スクロースシンターゼ水溶液(D7-1)を1 μ L加えて酵素反応溶液(11-1)とし、反応を開始した。酵素反応溶液(11-1)を30 $^{\circ}$ Cで静置し、HPLCを用いて反応生成物(ウリジン2リン酸-グルコース)の量を5分毎に測定しながら30分酵素反応させ、酵素反応初速度 v を算出した。さらに、酵素反応溶液(11-1)中のウリジン2リン酸の濃度が0.3mM、0.1mM、0.05mMのもの(11-2)~(11-4)について、同様に酵素反応初速度 v を算出した。

横軸(x軸)にそれぞれ酵素反応溶液(11-1)~(11-4)の基質(ウリジン2リン酸)の濃度の逆数($1/[S]$)、縦軸(y軸)にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数($1/v$)をプロットしたLineweaver-Burkプロットを作成した。プロットの近似直線とy軸との交点から、酵素活性 V_{max_1} の逆数($1/V_{max_1}$)を求めた。

基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」を用いる以外は同様にして V_{max_2} を求めた。求めた V_{max_1} 及び V_{max_2} から酵素活性比(Y_1)を算出したところ、10以上であった。

また、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」を用いる以外は同様にして V_{max_2} を求めた。求めた V_{max_1} 及び V_{max_2} から酵素活性比(Y_1)を算出したところ、10以上であった。

[0102] <製造例3>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「コリネバクテリウム・グルタミカス由来の配列番号3のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼ水溶液(D6-1)を得た。

[0103] <リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼ水溶液(D6-1)の比活性測定>

1 mLの水溶液Rに、還元型チオレドキシンを0.1 mgと、リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼ水溶液(D6-1)を10 μ L加えて、反応溶液(3)としたものを3つ作成し、それぞれ30°Cで5分、10分、15分反応を行った。化合物(C-6)である反応生成物(デオキシウリジン2リン酸)の量は、TLCで展開して、UVライト(260 nm)で検出して求めた。化合物(C-6)の生成量と反応時間との関係から、リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼ水溶液(D6-1)の比活性を計算したところ、0.3 U/ μ Lであった。

[0104] <リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比(Y_1)の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比(Y_1)の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液(D7-1)」に代えて「リボヌクレオチド2リン酸リダクターゼ水溶液(D6-1)」を用いて、また、「スクロース」に代えて「還元型チオレドキシ」を用いる以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 V_{max1} を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」及び「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして V_{max2} を求めた。求めた V_{max1} 及び V_{max2} から酵素活性比(Y_1)を算出したところ、全て10以上であった。

[0105] <製造例4>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「大腸菌由来の配列番号4のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、ピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)を得た。

[0106] <ピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)の比活性測定>

1 mLの水溶液Rに、1 Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液(和光純薬工業社製)を10 μ Lと、ピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1

− 1) を 10 μ L 加えて、反応溶液 (4) としたものを 3 つ作成し、それぞれ 30 $^{\circ}$ C で 5 分、10 分、15 分反応を行った。化合物 (C-4) である反応生成物 (ウリジン 3 リン酸) の量は、TLC で展開して、UV ライト (260 nm) で検出して求めた。化合物 (C-4) の生成量と反応時間との関係から、ピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1) の比活性を計算したところ、0.3 U/ μ l であった。

[0107] <ピルビン酸キナーゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1)」に代えて「ピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1)」を用いて、また、「スクロース」に代えて「ホスホエノールピルビン酸 1 カリウム」を用いる以外は同様にして、ウリジン 2 リン酸に対する酵素活性 V_{max1} を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン 2 リン酸」に代えて「ウリジン 2 リン酸−グルクロン酸」、「ウリジン 2 リン酸−N−アセチルグルコサミン」、「ウリジン 2 リン酸−N−アセチルガラクトサミン」、「ウリジン 2 リン酸−グルコース」、「ウリジン 2 リン酸−マンノース」及び「ウリジン 2 リン酸−グルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 V_{max2} を求め、酵素活性比 (Y_1) を求めた。酵素活性比 (Y_1) は全て 10 以上であった。

[0108] <製造例 5>

製造例 1 において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「大腸菌由来の配列番号 5 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、ヌクレオチダーゼ水溶液 (D3-1) を得た。

[0109] <ヌクレオチダーゼ水溶液 (D3-1) の比活性測定>

1 mL の水溶液 R に、ヌクレオチダーゼ水溶液 (D3-1) を 10 μ L 加えて、反応溶液 (5) としたものを 3 つ作成し、それぞれ 30 $^{\circ}$ C で 5 分、1

0分、15分反応を行った。化合物(C-3)である反応生成物(ウリジン1リン酸)の量は、TLCで展開して、UVライト(260nm)で検出して求めた。化合物(C-3)の生成量と反応時間との関係から、ヌクレオチダーゼ水溶液(D3-1)の比活性を計算したところ、 $0.3\text{ U}/\mu\text{ l}$ であった。

[0110] <ヌクレオチダーゼの酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 、 $V_{\text{max}2}$ 、酵素活性比(Y_1)の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 、 $V_{\text{max}2}$ 、酵素活性比(Y_1)の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液(D7-1)」に代えて「ヌクレオチダーゼ水溶液(D3-1)」を用いて、また、「スクロース」を用いない以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 $V_{\text{max}1}$ を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」及び「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 $V_{\text{max}2}$ を求め、酵素活性比(Y_1)を求めた。酵素活性比(Y_1)は全て10以上であった。

[0111] <製造例6>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「大腸菌由来の配列番号6のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液(D5-1)を得た。

[0112] <ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液(D5-1)の比活性測定>

1mLの水溶液Rに、ポリウリジン(Sigma社製、品名「ポリウリジリックアシッドポタジウムソルト」)を1mg、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液(D5-1)を10 $\mu\text{ L}$ 加えて、反応溶液(6)としたものを3つ作成し、それぞれ30 $^{\circ}\text{ C}$ で5分、10分、15

分反応を行った。化合物（C-5）である反応生成物（ポリウリジル酸）の量は、TLCで展開して、UVライト（260nm）で検出して求めた。化合物（C-5）の生成量と反応時間との関係から、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液（D5-1）の比活性を計算したところ、 $0.3\text{ U}/\mu\text{ l}$ であった。

[0113] <ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼの酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 、 $V_{\text{max}2}$ 、酵素活性比（ Y_1 ）の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 、 $V_{\text{max}2}$ 、酵素活性比（ Y_1 ）の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液（D7-1）」に代えて「ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液（D5-1）」を用いて、また、「スクロース」を用いない以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 $V_{\text{max}1}$ を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」及び「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 $V_{\text{max}2}$ を求め、酵素活性比（ Y_1 ）を求めた。酵素活性比（ Y_1 ）は全て10以上であった。

[0114] <製造例7>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「アフリカツメガエル由来の配列番号7のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、アピラーゼ水溶液（D2-1）を得た。

[0115] <アピラーゼ水溶液（D2-1）の比活性測定>

1 mLの水溶液Rに、アピラーゼ水溶液（D2-1）を $10\ \mu\text{ L}$ 加えて、反応溶液（7）としたものを3つ作成し、それぞれ 30° C で5分、10分、15分反応を行った。化合物（C-2）である反応生成物（ウリジン）の量は、TLCで展開して、UVライト（260nm）で検出して求めた。化合物（C-2）の生成量と反応時間との関係から、アピラーゼ水溶液（D2-1）の比活性を計算したところ、 $0.3\text{ U}/\mu\text{ l}$ であった。

[0116] <アピラーゼの酵素活性 V_{max_1} 、 V_{max_2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max_1} 、 V_{max_2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1)」に代えて「アピラーゼ水溶液 (D2-1)」を用いて、また、「スクロース」を用いない以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 V_{max_1} を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」及び「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 V_{max_2} を求め、酵素活性比 (Y_1) を求めた。酵素活性比 (Y_1) は全て10以上であった。

[0117] <製造例8>

製造例1において、「ストレプトコッカスエクイシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「ラットすい臓由来の配列番号8のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2) を得た。

[0118] <ヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2) の比活性測定>

1 mLの水溶液Rに、5 mMのアデノシン3リン酸 (Sigma社製) を含む溶液を作成し、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2) を10 μ L加えて、反応溶液(8)としたものを3つ作成し、30°Cで5分、10分、15分反応を行った。化合物(C-4)である反応生成物(ウリジン3リン酸)の量は、TLCで展開して、UVライト(260 nm)で検出して求めた。化合物(C-4)の生成量と反応時間との関係から、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2) の比活性を計算したところ、0.3 U/ μ lであった。

[0119] <ヌクレオシド2リン酸キナーゼの酵素活性 V_{max_1} 、 V_{max_2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max_1} 、 V_{max_2} 、酵素活性比 (Y_1) の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液 (D7-1)」に代

えて「ヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液（D4-1-2）」を用いて、また、「スクロース」に代えて「アデノシン3リン酸」を用いる以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 V_{max1} を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」、「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」、「ウリジン2リン酸-N-アセチルガラクトサミン」、「ウリジン2リン酸-グルコース」、「ウリジン2リン酸-マンノース」及び「ウリジン2リン酸-グルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 V_{max2} を求め、酵素活性比（ Y_1 ）を求めた。酵素活性比（ Y_1 ）は全て10以上であった。

[0120] <製造例9>

製造例1において、「ストレプトコッカスエクイシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「トキソプラズマ属由来の配列番号9のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、アルギニンキナーゼ水溶液（D4-1-3）を得た。

[0121] <アルギニンキナーゼ水溶液（D4-1-3）の比活性測定>

水溶液Rを1 mLに、1 Mの ω -ホスホノーL-アルギニン水溶液（Sigma社製）を含む溶液を作成し、アルギニンキナーゼ水溶液（D4-1-3）を10 μ L加えて、反応溶液（9）としたものを3つ作成し、それぞれ30°Cで5分、10分、15分反応を行った。化合物（C-4）である反応生成物（ウリジン3リン酸）の量は、TLCで展開して、UVライト（260 nm）で検出して求めた。化合物（C-4）の生成量と反応時間との関係から、アルギニンキナーゼ水溶液（D4-1-3）の比活性を計算したところ、0.3 U/ μ lであった。

[0122] <アルギニンキナーゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比（ Y_1 ）の測定>

「スクロースシンターゼの酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比（ Y_1 ）の測定」において、「スクロースシンターゼ水溶液（D7-1）」に代

えて「アルギニンキナーゼ水溶液（D4-1-3）」を用いて、また、「スクロース」に代えて「ホスホエノールピルビン酸1カリウム」を用いる以外は同様にして、ウリジン2リン酸に対する酵素活性 V_{max_1} を求めた。

さらに、基質として、「ウリジン2リン酸」に代えて「ウリジン2リン酸-グルクロン酸」、「ウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン」、「ウリジン2リン酸-N-アセチルガラクトサミン」、「ウリジン2リン酸-グルコース」、「ウリジン2リン酸-マンノース」及び「ウリジン2リン酸-グルコサミン」をそれぞれ用いる以外は同様にして、それぞれ酵素活性 V_{max_2} を求め、酵素活性比（ Y_1 ）を求めた。酵素活性比（ Y_1 ）は全て10以上であった。

[0123] <ヌクレオシド-2-リン酸キナーゼを用いたウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m の測定>

製造例8で得たヌクレオシド-2-リン酸キナーゼ水溶液（D4-1-2）10 μ Lを、1.5mLのチューブ中で890 μ Lの水溶液7[5mMの塩化マグネシウム、100mMのアデノシン3リン酸（Sigma社製）を含む50mMのリン酸緩衝液（pH7.5、25 $^{\circ}$ C）]に溶解し、恒温水槽を用いてチューブを30 $^{\circ}$ Cで3分静置した。ここに、30 $^{\circ}$ Cに温調した基質溶液[2-1]（ウリジン2リン酸ナトリウムを緩衝液Bに溶解して10mMの濃度にしたもの）を100 μ L添加し、酵素反応溶液（IV-2-1）とした。（IV-2-1）を作成直後及び1分おきに100 μ Lずつ取り出し、取り出した溶液を100 $^{\circ}$ Cで2分間加熱して酵素反応を停止した。遠心分離器（4 $^{\circ}$ C、12,000 \times g、10分）を用いて遠心し、不純物を沈殿させた。上清80 μ LをHPLCで分析し、ウリジン3リン酸のピーク面積を記録した。

基質溶液[2-1]において、ウリジン2リン酸ナトリウムのモル濃度を5mM（基質溶液[2-2]）、2mM（基質溶液[2-3]）、1mM（基質溶液[2-4]）及び0.3mM（基質溶液[2-5]）に変更した溶液を作成した。酵素反応溶液（IV-2-1）において、基質溶液[2-1

] に代えて基質溶液 [2-2] ~ [2-5] を用いる以外は同様にして酵素反応溶液 (1V-2-2) ~ (1V-2-5) を作成した。酵素反応溶液 (1V-2-2) ~ (1V-2-5) についても、酵素反応溶液 (1V-2-1) と同様にして、ウリジン3リン酸のピーク面積を記録した。

ウリジン3リン酸ナトリウム (和光純薬工業社製) を緩衝液Bに溶解し、0.005 mM、0.1 mM、1 mM及び5 mMの濃度にしたものを作成し、ウリジン3リン酸標準溶液 (M-1) ~ (M-4) とした。(M-1) ~ (M-4) を80 μ L、上記と同条件のHPLCで分析し、ウリジン3リン酸のピーク面積をそれぞれ記録した。横軸 (x軸) にそれぞれのウリジン3リン酸濃度 (mM)、縦軸 (y軸) にそれぞれのピーク面積Pをプロットし、直線の傾き「k'」を算出した。

酵素反応溶液 (1V-2-1) ~ (1V-2-5) を作成直後のウリジン3リン酸のピーク面積を P_0 、「m'」分後のピーク面積を P_h とし、それぞれピーク面積の変化 ΔP ($\Delta P = P_h - P_0$) と上記直線の傾き「k'」を用いて下記数式 (5) からそれぞれの酵素反応初速度 v (mM/s) を算出した。

$$v = \Delta P / (k' \times m' \times 60) \quad (5)$$

算出した酵素反応初速度 v を用いて、横軸 (x軸) にそれぞれの基質濃度[S]、縦軸 (y軸) にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数[S] / v をプロットし、Hanes-Woolfプロットを作成した。プロットの近似直線とx軸との交点 ($-K_m$) から、ミカエリス定数 K_m は0.25 mMであった。

[0124] <ピルビン酸キナーゼを用いてウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m 測定>

「ヌクレオシド-2-リン酸キナーゼを用いたウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m の測定」において、「製造例8で得たヌクレオシド-2-リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2)」に代えて「製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1)」を用いて、「アデ

ノシン3リン酸」に代えて、「ホスホエノールピルビン酸1カリウム」を用いる以外は同様にして、ミカエリス定数 K_m を求めたところ、6 mMであった。

[0125] <アルギニンキナーゼを用いてウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m 測定>

「ヌクレオシド-2-リン酸キナーゼを用いたウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m の測定」において、「製造例8で得たヌクレオシド-2-リン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)」に代えて「製造例9で得たアルギニンキナーゼ水溶液(D4-1-3)」を用いて、「アデノシン3リン酸」に代えて、「 ω -ホスホノールアルギニン」を用いること以外は同様にして、ミカエリス定数 K_m を求めたところ、0.71 mMであった。

[0126] <実施例1>

1 mLの水溶液Sに、1 Mのスクロース水溶液を100 μ L、製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液(D7-1)を10 μ L及び製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液(B-1)を10 μ L加えて、反応溶液(Z-1)とし、30°Cで2時間反応を行った。反応途中でサンプリングを行い、HPLCを用いて反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を測定した。結果を表1に示す。

また、2時間反応した後、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とヒアルロン酸を分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量からヒアルロン酸の生成量を算出した。ヒアルロン酸の生成量は5.1 mgであった。

[0127] <実施例2>

実施例1において、「製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液(D7-1)を10 μ L」に代えて「製造例3で得たリボヌクレオチド2リン酸リ

ダクターゼ水溶液（D6-1）を10 μ L」として、「1Mのスクロース水溶液を100 μ L」に代えて「還元型チオレドキシンを10mg」とする以外は実施例1と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は5.3mgであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0128] <実施例3>

実施例1において、「製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液（D7-1）を10 μ L」に代えて「製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液（D4-1-1）を10 μ L」として、「1Mのスクロース水溶液を100 μ L」に代えて「1Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液を100 μ L」とする以外は実施例1と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は5.0mgであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0129] <実施例4>

実施例1において、「製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液（D7-1）を10 μ L」に代えて「製造例5で得たヌクレオチダーゼ水溶液（D3-1）を10 μ L」とし、「1Mのスクロース水溶液を100 μ L」を用いない以外は実施例1と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は4.8gであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0130] <実施例5>

実施例1において、「製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液（D7-1）を10 μ L」に代えて「製造例6で得たポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ水溶液（D5-1）を10 μ L」とし、「1Mのスクロース水溶液を100 μ L」を用いない以外は実施例1と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は5.0mgであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0131] <実施例6>

実施例 1 において、「製造例 2 で得たスクロースシンターゼ水溶液 (D 7-1) を 10 μ L」に代えて「製造例 7 で得たアピラーゼ水溶液 (D 2-1) を 10 μ L」とし、「1 M スクロース水溶液を 100 μ L」を用いない以外は実施例 1 と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は 5.3 mg であった。また、反応溶液中のウリジン 2 リン酸の濃度測定の結果を表 1 に示す。

[0132] <製造例 10>

製造例 1 において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「シロイヌナズナ由来の配列番号 10 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、ウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ水溶液 (G-1) を得た。

[0133] <ウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ水溶液 (G-1) の比活性測定>

水溶液 {100 mM の塩化ナトリウム、10 mM の塩化マグネシウム、10 mM のウリジン 3 リン酸、10 mM の N-アセチルグルコサミン 1 リン酸を含む 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0)} 1 mL に、製造例 10 で得たウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ水溶液 (G-1) を 10 μ L 加えて、反応溶液 (10-1) としたものを 3 つ作成し、それぞれ 30 $^{\circ}$ C で 5 分、10 分、15 分反応を行った。生成したウリジル 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンの定量は HPLC を用いて、UV ライト (260 nm) で検出して求めた。ウリジル 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンの生成量から、ウリジン 3 リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼのウリジル 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンを生成させる活性を求めたところ、0.1 U/mL であった。

上記において、「10 mM の N-アセチルグルコサミン 1 リン酸」に代えて「10 mM のグルクロン 1 リン酸」を含む水溶液を用いて、「ウリジル 2

リン酸-N-アセチルグルコサミン」に代えて「ウリジル2リン酸-グルクロン酸」を定量する以外は同様にして、ウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼのウリジル2リン酸-グルクロン酸を生成させる活性を求めたところ、 $5\text{ U}/\mu\text{ l}$ であった。

[0134] <実施例7>

緩衝液B (pH 7.5、 25°C)中に、 1 mM のウリジン2リン酸-グルクロン酸 (^{14}C でラベルした放射性同位体を含むウリジン2リン酸-グルクロン酸、放射能 $300\text{ mCi}/\text{mmol}$)、 1 mM のウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン、 100 mM のアデノシン3リン酸、 100 mM の1-ホスホ-グルクロン酸、 100 mM のN-アセチルグルコサミン-1リン酸及び 5 mM の塩化マグネシウムを含む 1 mL の溶液に、製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1)を $10\mu\text{ l}$ 、ピロリン酸分解酵素 (ロシュアプライドサイエンス社製)を $5\mu\text{ l}$ 、製造例8で得たヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2)を $5\mu\text{ l}$ 、製造例10で得たウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ水溶液 (G-1)を $5\mu\text{ L}$ 加えて反応溶液 (Z-7)を調製した。すべて混合してから2時間、 30°C の恒温水槽で温調し、酵素反応させた。反応途中でサンプリングを行い、HPLCを用いて反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を測定した。結果を表1に示す。

また、2時間反応した後、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とヒアルロン酸を分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量からヒアルロン酸の生成量を算出した。ヒアルロン酸の生成量は 16 mg であった。

[0135] <実施例8>

実施例7において、「製造例8で得たヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-2)を $5\mu\text{ l}$ 」及び「 100 mM のアデノシン3リン酸」に

代えて「製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)を5 μ l」及び「100mMのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液」を用いたこと以外は実施例7と同様にして、ヒアルロン酸を生成した。ヒアルロン酸の生成量は14mgであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0136] <実施例9>

実施例7において、「製造例8で得たヌクレオシド2リン酸キナーゼ水溶液(D4-1-2)を5 μ l」及び「100mMのアデノシン3リン酸」に代えて「製造例9で得たアルギニンキナーゼ水溶液(D4-1-3)を5 μ l」及び「100mMの ω -ホスホノールアルギニン水溶液」を用いたこと以外は実施例7と同様にして、ヒアルロン酸を生成した。ヒアルロン酸の生成量は15mgであった。また、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度測定の結果を表1に示す。

[0137] <比較例1>

実施例1において、「製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液(D7-1)を10 μ L」及び「1M スクロース水溶液を10 μ L」を用いないこと、ヒアルロン酸合成酵素(B-1)を「10 μ L」でなく「300 μ L」用いた以外は実施例1と同様にして、ヒアルロン酸を合成した。ヒアルロン酸の生成量は3.0mgであった。なお、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を実施例1と同様に測定した。結果を表1に示す。

[0138]

[表1]

	使用した多糖合成酵素(B)のIC ₅₀ (mM)	リボヌクレオシド2リン酸の反応液中の濃度(mM)						多糖の生成量(mg)
		10分後	20分後	40分後	60分後	90分後	120分後	
実施例1	0.11	0.01	0.05	0.1	0.3	0.3	0.2	5.1
実施例2	0.11	0.01	0.07	0.2	0.4	0.3	0.3	5.3
実施例3	0.11	0.004	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	5.0
実施例4	0.11	0.02	0.1	0.4	0.5	0.5	0.5	4.8
実施例5	0.11	0.03	0.2	0.4	0.4	0.3	0.3	5.0
実施例6	0.11	0.005	0.04	0.1	0.2	0.3	0.4	5.3
実施例7	0.11	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	16
実施例8	0.11	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	14
実施例9	0.11	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	15
比較例1	0.11	11	12	13	16	19	21	3.0

[0139] <製造例11>

製造例1において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「パスツレラ・ムルトシダ由来の配列番号11のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、コンドロイチン合成酵素水溶液(B-2)を得た。

[0140] <コンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) の比活性測定>

水溶液 T {1 mM のウリジン 2 リン酸-グルクロン酸 (^{14}C でラベルした放射性同位体を含むウリジン 2 リン酸-グルクロン酸、放射能 $300\text{ mCi} / \text{mmol}$)、1 mM のウリジン 2 リン酸-N-アセチルガラクトサミン、100 mM の塩化ナトリウム、10 mM の塩化マグネシウム、10 mM のドデシルマルトシド、5 mM のオレイン酸を含む 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0)} 1 mL に、製造例 11 で得たコンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) を $10\ \mu\text{L}$ 加えて、反応溶液 (11) としたものを 3 つ作成し、それぞれ 30°C で 5 分、10 分、15 分反応を行った。ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とコンドロイチンを分離した。その後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定した。 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量からコンドロイチンの生成量を算出したところ、それぞれ 5 分後 $1.7\ \mu\text{g}$ 、10 分後 $3.1\ \mu\text{g}$ 、15 分後 $4.4\ \mu\text{g}$ であった。コンドロイチンの生成量と反応時間との関係から、コンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) の比活性を計算した。結果は $0.15\ \text{U} / \text{mL}$ であった。

[0141] <コンドロイチン合成酵素の阻害濃度 IC_{50} の測定>

「ヒアルロン酸合成酵素の阻害濃度 IC_{50} の測定」において、「製造例 11 で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1)」に代えて「製造例 11 で得たコンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2)」を用いて、「基質溶液 [1-1]」に代えて「基質溶液 [1-2] (ウリジン 2 リン酸-グルクロン酸ナトリウム塩、ウリジン 2 リン酸-N-アセチルガラクトサミンを緩衝液 B に溶解してそれぞれ 20 mM の濃度にしたもの)」を用いて、「ヒアルロン酸ナトリウム」に代えて「コンドロイチンナトリウム (和光純薬工業社製)」を用いて同様に測定した。阻害濃度 IC_{50} は $0.085\ \text{mM}$ であった。

また、「コンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) を $1.5\ \text{U} / \text{mL}$ 」に代えて「コンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) を $45\ \text{U} / \text{mL}$ 」とする

以外は同様にして、阻害濃度 IC_{50} を求めたところ、 0.085 mM であった。

[0142] <実施例 10>

水溶液 T を 1 mL に、 1 M のホスホエノールピルビン酸 1 カリウム水溶液を $100 \mu\text{L}$ 、製造例 4 で得たピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1) を $10 \mu\text{L}$ 及び製造例 11 で得たコンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) を $10 \mu\text{L}$ 加えて、反応溶液 (Z-10) とし、 30°C で 2 時間反応を行った。反応途中でサンプリングを行い、HPLC を用いて (実施例 1 の条件と同じ)、反応溶液中のウリジン 2 リン酸の濃度を測定した。結果を表 2 に示す。

また、2 時間反応した後、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とコンドロイチンを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量からコンドロイチンの生成量を算出した。コンドロイチンの生成量は 5.0 mg であった。

[0143] <比較例 2>

実施例 10 において、「製造例 4 で得たピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1)」及び「 1 M のホスホエノールピルビン酸 1 カリウム水溶液」を用いないこと、コンドロイチン合成酵素水溶液 (B-2) を「 $10 \mu\text{L}$ 」でなく「 $300 \mu\text{L}$ 」用いたこと以外は実施例 10 と同様にして、コンドロイチンを合成した。コンドロイチンの生成量は 2.5 mg であった。なお、反応溶液中のウリジン 2 リン酸の濃度を実施例 10 と同様に測定した。結果を表 2 に示す。

[0144] <製造例 12>

製造例 1 において、「ストレプトコッカスエキシミス由来の配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「酢酸菌由来の配列番号 12 のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にして、セルロ

ース合成酵素水溶液（B-3）を得た。

[0145] <セルロース合成酵素水溶液（B-3）の比活性測定>

水溶液U {100 mMのウリジン2リン酸-β-グルコース (^{14}C でラベルした放射性同位体を含むウリジン2リン酸-β-グルコース、放射能300 mCi / mmol)、100 mMの塩化ナトリウム、10 mMの塩化マグネシウム、5 mMのオレイン酸を含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0)} 1 mLに、製造例12で得たセルロース合成酵素水溶液（B-3）を10 μL加えて、反応溶液（12）としたものを4つ作成し、それぞれ30°Cで5分、10分、15分、20分反応を行った。ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とセルロースを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルコースの取り込み量からセルロースの生成量を算出したところ、5分後は1.3 mg、10分後は2.6 mg、15分後は3.7 mg、20分後は5.1 mgであった。セルロースの生成量と反応時間との関係から、セルロース合成酵素水溶液（B-3）の比活性を計算した。結果は0.15 U / μlであった。

[0146] <セルロース合成酵素の阻害濃度 IC_{50} の測定>

「ヒアルロン酸合成酵素の阻害濃度 IC_{50} の測定」において、「製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液（B-1）」に代えて「製造例12で得たセルロース合成酵素水溶液（B-3）」を用いて、「基質溶液 [1-1]」に代えて「基質溶液 [1-3]（ウリジン2リン酸-β-グルコースを緩衝液Bに溶解して20 mMの濃度にしたもの）」を用いて、「ヒアルロン酸ナトリウム」に代えて「酢酸菌由来のセルロース（東京化成工業社製）」を用いて同様に測定した。阻害濃度 IC_{50} は0.1 mMであった。

また、「セルロース合成酵素水溶液（B-3）を1.5 U / mL」に代えて「セルロース合成酵素水溶液（B-3）を45 U / mL」とする以外は同様にして、阻害濃度 IC_{50} を求めたところ、0.1 mMであった。

[0147] <実施例 1 1 >

水溶液Uを1 mLに、1 Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液を10 μ L、製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)を10 μ L及び製造例12で得たセルロース合成酵素水溶液(B-3)を10 μ L加えて、反応溶液(Z-11)とし、30°Cで2時間反応を行った。反応途中でサンプリングを行い、HPLCを用いて(実施例1の条件と同じ)、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を測定した。結果を表2に示す。

2時間反応した後、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とセルロースを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、¹⁴Cでラベルしたグルコースの取り込み量からセルロースの生成量を算出した。セルロースの生成量は10 mgであった。

[0148] <比較例 3 >

実施例11において、「製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液(D4-1-1)」及び「1 Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液」を用いないこと、「製造例12で得たセルロース合成酵素水溶液(B-3)」を「10 μ L」から「300 μ L」に変更した以外は実施例11と同様にし、セルロースを合成した。セルロースの生成量は3.0 mgであった。なお、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を実施例11と同様に測定した。結果を表2に示す。

[0149] <製造例 1 3 >

製造例1において、「ストレプトコッカスエクイシミス由来の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子」に代えて「サッカロマイセスセルビシエ由来の配列番号13のアミノ酸配列をコードする遺伝子」を用いる以外は同様にし、デンプン合成酵素水溶液(B-4)を得た。

[0150] <デンプン合成酵素水溶液(B-4)の比活性測定>

水溶液V {100 mMのウリジン2リン酸- α -グルコース(¹⁴Cでラベルした放射性同位体を含むウリジン2リン酸- α -グルコース、放射能30

0 mCi / mmol)、100 mMの塩化ナトリウム、10 mMの塩化マグネシウム、5 mMのオレイン酸を含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0) } 1 mLに、製造例13で得たデンプン合成酵素水溶液 (B-4) を10 μ L加えて、反応溶液 (13) としたものを4つ作成し、それぞれ30°Cで5分、10分、15分、20分反応を行った。ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とデンプンを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、¹⁴Cでラベルしたグルコースの取り込み量からデンプンの生成量を算出したところ、5分後は1.3 mg、10分後は2.5 mg、15分後は3.8 mg、20分後は5.2 mgであった。デンプンの生成量と反応時間との関係から、デンプン合成酵素水溶液 (B-4) の比活性を計算した。結果は0.15 U / μ lであった。

[0151] <デンプン合成酵素の阻害濃度 IC₅₀の測定>

「ヒアルロン酸合成酵素 (B-1) の阻害濃度 IC₅₀の測定」において、「製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液 (B-1)」に代えて「製造例13で得たデンプン合成酵素水溶液 (B-4)」を用いて、「基質溶液 [1-1]」に代えて「基質溶液 [1-4] (ウリジン2リン酸- α -グルコースを緩衝液Bに溶解して20 mMの濃度にしたもの)」を用いて、「ヒアルロン酸ナトリウム」に代えて「デンプン (和光純薬工業社製)」を用いて同様に測定した。阻害濃度 IC₅₀は0.2 mMであった。

また、「デンプン合成酵素水溶液 (B-4) を1.5 U / mL」に代えて「デンプン合成酵素水溶液 (B-4) を75 U / mL」とする以外は同様にして、阻害濃度 IC₅₀を求めたところ、0.2 mMであった。

[0152] <実施例12>

水溶液Vを1 mLに、1 Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液を10 μ L、製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液 (D4-1-1) を10 μ L及び製造例13のデンプン合成酵素水溶液 (B-4) を10 μ L加えて、反応溶液 (Z-12) とし、30°Cで2時間反応を行った。反応途中

でサンプリングを行い、HPLCを用いて（実施例1の条件と同じ）、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を測定した。結果を表2に示す。

また、2時間反応した後、ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とデンプンを分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルコースの取り込み量からデンプンの生成量を算出した。デンプンの生成量は9.0mgであった。

[0153] <比較例4>

実施例12において、「製造例4で得たピルビン酸キナーゼ水溶液（D4-1-1）」及び「1Mのホスホエノールピルビン酸1カリウム水溶液」を用いないこと、「製造例13で得たデンプン合成酵素水溶液（B-4）」を「10 μl 」から「500 μl 」に変更した以外は実施例12と同様にして、デンプンを合成した。デンプンの生成量は6.0mgであった。なお、反応溶液中のウリジン2リン酸の濃度を実施例12と同様に測定した。結果を表2に示す。

[0154]

[表2]

	使用した多糖合成酵素(B)のIC ₅₀ (mM)	リボヌクレオシド2リン酸の反応溶液中の濃度(mM)							多糖の生成量(mg)
		10分後	20分後	40分後	60分後	90分後	120分後		
実施例10	0.085	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	5.0
実施例11	0.1	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	10
実施例12	0.2	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	9.0
比較例2	0.085	8	9	9	10	10	10	11	2.5
比較例3	0.1	10	11	12	12	13	13	13	3.0
比較例4	0.2	21	23	25	27	28	28	29	6.0

[0155] リボヌクレオシド2リン酸の濃度が阻害濃度IC₅₀の100倍未満である実施例1～12は、比較例1～4よりも、使用した多糖合成酵素(B)の量が少ないものの、多糖の生成量が多かった。したがって、単位酵素当たりの多糖の生産量が極めて多いことが分かる。また、多糖合成酵素(B)の種類によらず、リボヌクレオシド2リン酸の濃度を低くすることで、単位酵素あ

たりの多糖の生産量が多くなり、効率よく多糖を製造することができることがわかる。

また、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）の存在下で多糖合成酵素（B）を作用させることで、リボヌクレオシド2リン酸の濃度を低くすることができ、多糖の生成量が多くなることがわかる。

産業上の利用可能性

[0156] 本発明の多糖の製造方法によれば、多糖を高効率で生産できる。また、本発明の製造方法により得られた多糖は、化粧品、医薬部外品、医薬品及び医療機器だけでなく、食品等にも用いることができる。

請求の範囲

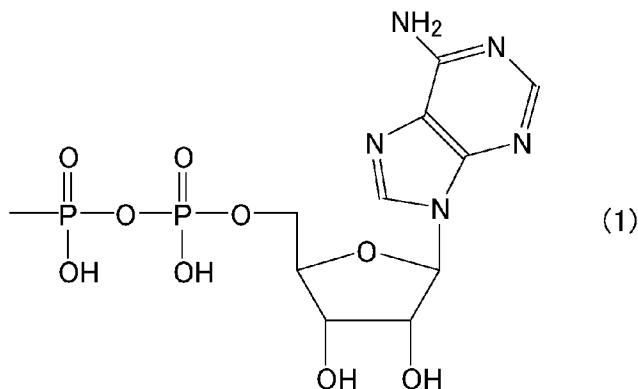
[請求項1]

下記リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) に多糖合成酵素 (B) を作用させて多糖を製造する方法において、(A) に (B) を作用させる時間中の10～100%の時間において、反応溶液中のリボヌクレオシド2リン酸の濃度が多糖合成酵素 (B) の下記阻害濃度 IC_{50} の100倍未満である多糖の製造方法。

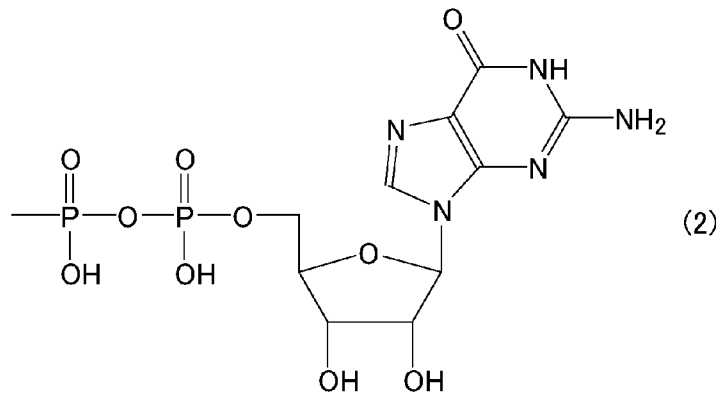
阻害濃度 IC_{50} : 多糖合成酵素 (B) をリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) に作用させる際の (B) の濃度において、基質としてリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド2リン酸を用いて求めた、(B) の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド2リン酸の濃度。

リボヌクレオシド2リン酸-単糖 (A) : トリオース (a-1)、テトロース (a-2)、ペントース (a-3)、ヘキソース (a-4)、ヘプトース (a-5) 及び下記単糖 (a-6) からなる群より選ばれる少なくとも1種の単糖 (a) が有する少なくとも1つのヒドロキシル基のプロトンが下記化学式 (1) ~ (5) のいずれか1つの官能基で置換された糖ヌクレオチド。

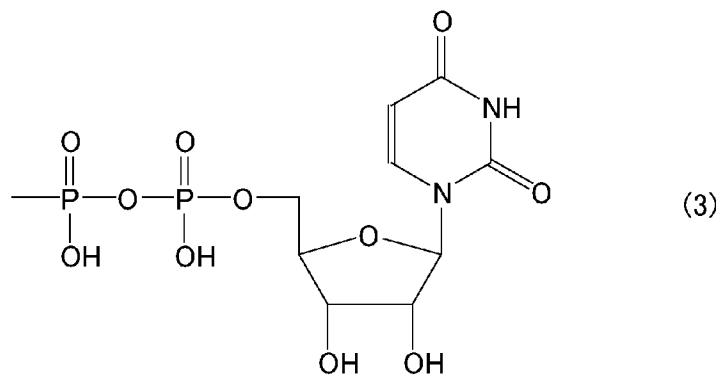
[化1]



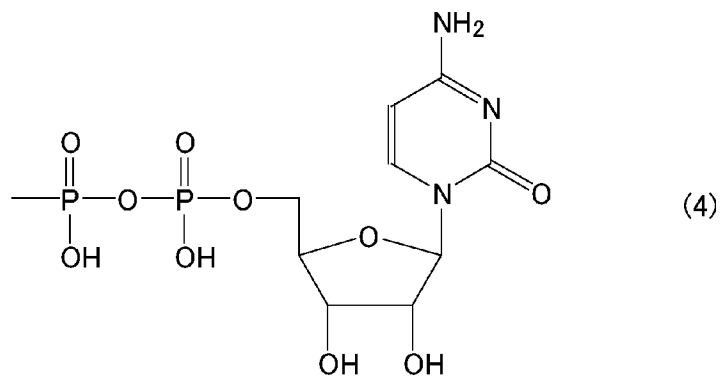
[化2]



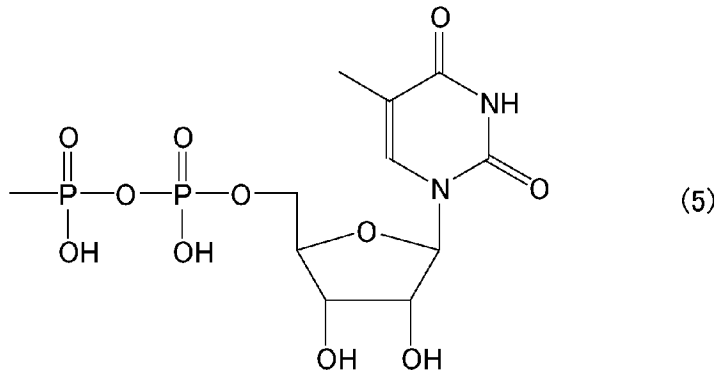
[化3]



[化4]



[化5]



単糖 (a-6) : (a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4) 及び (a-5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有するプロトン、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種が下記置換基 (E) で置換された単糖。

置換基 (E) : カルボキシル基、アミノ基、N-アセチルアミノ基、スルファート基、メチルエステル基、N-グリコリル基、メチル基、1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2-カルボキシ-2-ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基。

[請求項2]

請求項1に記載の製造方法において、リボヌクレオシド2リン酸を下記化合物 (C) に変換する活性を有するリボヌクレオシド2リン酸変換酵素 (D) の存在下で (B) を作用させる多糖の製造方法。

化合物 (C) : プリン塩基又はピリミジン塩基 (C-1)、リボヌクレオシド (C-2)、リボヌクレオシド1リン酸 (C-3)、リボヌクレオシド3リン酸 (C-4)、ポリリボヌクレオチド (C-5)、デオキシリボヌクレオシド2リン酸 (C-6) 及びリボヌクレオシド2リン酸-単糖 (C-7) からなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物。

[請求項3]

下記酵素活性 V_{max1} 及び下記酵素活性 V_{max2} を用いて下記数式 (1) から算出した酵素活性比 (Y_1) が0.1以上である請求項2に記載の多糖の製造方法。

$$\text{酵素活性比 } (Y_1) = V_{\text{max}1} / V_{\text{max}2} \quad (1)$$

酵素活性 $V_{\text{max}1}$: リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) のリボヌクレオシド 2 リン酸に対する酵素活性。

酵素活性 $V_{\text{max}2}$: リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) のリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) に対する酵素活性。

[請求項4] 下記酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 及び下記酵素活性 $V_{\text{max}3}$ を用いて下記数式 (2) から算出した酵素活性比 (Y_2) が 0.1 以上である請求項 2 又は 3 に記載の多糖の製造方法。

$$\text{酵素活性比 } (Y_2) = V_{\text{max}1} / V_{\text{max}3} \quad (2)$$

酵素活性 $V_{\text{max}1}$: リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) のリボヌクレオシド 2 リン酸に対する酵素活性。

酵素活性 $V_{\text{max}3}$: 多糖合成酵素 (B) のリボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) に対する酵素活性。

[請求項5] リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (D) がウリジン 3 リン酸合成酵素 (D4-1) であり、化合物 (C) がウリジン 3 リン酸であり、リボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) がウリジン 2 リン酸一単糖であり、下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 $I_{C_{50}}$ の 100 倍未満である請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の多糖の製造方法。

ミカエリス定数 K_m : ウリジン 2 リン酸を基質とし、(D4-1) を酵素とし、リン酸基含有化合物 (F) の存在下でウリジン 3 リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 $I_{C_{50}}$: 多糖合成酵素 (B) をウリジン 2 リン酸一単糖に作用させる際の (B) の濃度において、基質としてウリジン 2 リン酸一単糖を用いて、阻害剤としてウリジン 2 リン酸を用いて求めた、(B) の酵素活性が半減するときのウリジン 2 リン酸の濃度。

[請求項6] 多糖がヒアルロン酸であり、リボヌクレオシド 2 リン酸一単糖 (A) が、ウリジン 2 リン酸一グルクロン酸及びウリジン 2 リン酸一 N-アセチルグルコサミンであり、多糖合成酵素 (B) がヒアルロン酸合成

酵素（B-1）であり、化合物（C）がウリジン3リン酸であり、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素（D）がウリジン3リン酸合成酵素（D4-1）である請求項2～5のいずれかに記載の多糖の製造方法。

[請求項7] 反応溶液中に、さらにリン酸基含有化合物（F）、1-ホスホグルクロン酸及びウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G）を含有させる請求項6に記載の多糖の製造方法。

[請求項8] 下記工程（1）～（3）を同時に行う請求項7に記載の多糖の製造方法。

工程（1）：ウリジン2リン酸-グルクロン酸とウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンとにヒアルロン酸合成酵素（B-1）を作用させて、ヒアルロン酸及びウリジン2リン酸を得る工程。

工程（2）：ウリジン2リン酸とリン酸基含有化合物（F）とにウリジン3リン酸合成酵素（D4-1）を作用させてウリジン3リン酸を得る工程。

工程（3）：ウリジン3リン酸と1-ホスホグルクロン酸とにウリジン3リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（G）を作用させてウリジン2リン酸-グルクロン酸を得る工程。

[請求項9] 下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 $I_{C_{50}}$ の100倍未満である請求項8に記載の多糖の製造方法。

ミカエリス定数 K_m ：ウリジン2リン酸を基質とし、（D4-1）を酵素とし、リン酸基含有化合物（F）の存在下でウリジン3リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 $I_{C_{50}}$ ：（B-1）をウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミンに作用させる際の（B-1）の濃度において、基質としてウリジン2リン酸-グルクロン

酸及びウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミンを用いて、阻害剤としてウリジン 2 リン酸を用いて求めた、(B-1) の酵素活性が半減するときのウリジン 2 リン酸の濃度。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/26 (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)

C12P19/26

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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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.
Y	JP 2009-536031 A (Glycofi, Inc.), 08 October 2009 (08.10.2009), paragraph [0008] & US 2004/0018590 A1 & WO 2007/130638 A2	1-9
Y	JP 2007-330112 A (San-Ei Gen F.F.I., Inc.), 27 December 2007 (27.12.2007), paragraphs [0006], [0007] (Family: none)	1-9
Y	Naoki ITANO et al., "Hyaluronan Synthase", Protein, nucleic acid and enzyme, 1998, vol.43, pages 2387 to 2393	1-9

 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
01 August, 2012 (01.08.12)Date of mailing of the international search report
14 August, 2012 (14.08.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064241

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-004886 A (Seikagaku Corp.), 11 January 2000 (11.01.2000), entire text (Family: none)	1-9
Y	JP 2005-160321 A (Toyobo Co., Ltd.), 23 June 2005 (23.06.2005), entire text (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P19/26(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. C12P19/26

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	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
Y	JP 2009-536031 A (グライコフィ, インコーポレイテッド) 2009.10.08, [0008] & US 2004/0018590 A1 & WO 2007/130638 A2	1-9
Y	JP 2007-330112 A (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) 2007.12.27, [0006], [0007] (ファミリーなし)	1-9
Y	板野直樹他, ヒアルロン酸合成酵素, 蛋白質 核酸 酵素, 1998, Vol.43, p.2387-2393	1-9

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

01.08.2012

国際調査報告の発送日

14.08.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

松原 寛子

4 N

4154

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	JP 2000-004886 A (生化学工業株式会社) 2000.01.11, 全文 (ファミリーなし)	1-9
Y	JP 2005-160321 A (東洋紡績株式会社) 2005.06.23, 全文 (ファミリーなし)	1-9