

明 細 書

S-アデノシルメチオニンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、S-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine:以下、SAMという)の製造方法に関する。

背景技術

[0002] SAMは、生体組織全体に存在し、ホルモン、神経伝達物質、リン脂質及びタンパク質の合成および代謝における様々なメチル化反応のメチル基供与体として機能する生理活性物質である。臨床的には、肝臓機能を高め、有害物質を体内から排出するのを助ける作用があり、従来から肝炎、高脂血症、動脈硬化症などに対する治療効果があることが知られている。また、神経伝達物質の生成にも関与し、近年ではうつ病、老人性痴呆症、関節炎の治療薬やサプリメントとしても使われている。このようにSAMの有用性が明らかになるに従って近年需要が拡大し、さらに生産性の高いSAMの製造方法が希求されている。

[0003] 現在、SAMの工業的生産は微生物培養によって行われており、主に酵母が使用されている。生産に使用される酵母は、過去の経験や研究からSAMを高蓄積することが知られている既存の菌株が使用されており、ビタミン類、アミノ酸、各種塩などの基本的な栄養成分や培養条件を検討することによりその生産性の向上が図られてきた。しかし、効率的にSAM蓄積株を選抜する方法がなく、又、培養条件で飛躍的にSAMの生産性を向上させることには限界があった。

[0004] 一方、近年のバイオテクノロジーの進歩により、微生物の代謝経路や遺伝子の情報などが整備され、SAMの代謝、蓄積に関与する遺伝子を推定し、直接特定遺伝子を加工する事が可能となり、新たなアプローチで変異株を作製したり、製造方法を改良することが可能となった。

上記アプローチによりSAMの高蓄積変異株の作製を行った例として、特許文献1にはSAMを消費する酵素の一つであるホスファチジルコリン生合成系酵素の機能を分子生物学的手法を用いて抑制した変異株が開示されており、該変異株を培養する

ことにより細胞内外にSAMが高蓄積することが示されている。

特許文献1:国際公開WO2008/020595号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、SAMを大量生産し得る製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] SAMに関連する酵素の一つとしてホスファチジルコリン生合成系酵素がある。本酵素は、ホスファチジルエタノールアミンからホスファチジルコリンを合成する一連の反応を触媒する酵素で、具体的にはホスファチジルエタノールアミンのアミノ基をメチル化するホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素、およびN-メチルホスファチジルエタノールアミンをホスファチジルコリンとなるように更にN-メチル化するN-メチルホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素を指す。これらメチル化反応においてSAMはメチル基供与体として関与する事が知られている(図1)。

上記の生合成経路において、ホスファチジルコリン生合成系酵素をコードする遺伝子を変異させてその酵素機能を消失させることにより、ホスファチジルエタノールアミンからホスファチジルコリンの生合成経路におけるSAMの消費が抑えられ、結果として菌体内外にSAMが蓄積することが判明した(特許文献1)。

一方、ホスファチジルコリンを生合成する経路は上記ホスファチジルコリン生合成系酵素による新規生合成系経路(*de novo pathway*)以外に、再生系経路(*salvage pathway*)が存在し、ホスファチジルコリンの生合成ではこの2つの生合成経路が互いに競合していると考えられる(図2)。即ち、一方の生合成系を活性化すれば他方は抑制される。

そこで、再生系経路を活性化させることで新規生合成系経路を抑制し、結果としてSAMの消費を抑えることができるのではないかと仮説をたて、培地中に再生系の基質たるコリン系化合物を添加してSAM生産株を培養した。その結果、細胞内外にSAMが高蓄積する事を見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、以下の要旨を有する。

(1)コリン系化合物を添加した培地で酵母を培養し、系内に蓄積したS-アデノシル

メチオニンを回収することを特徴とするS-アデノシルメチオニンを生産する方法。

(2)前記コリン系化合物がコリン、ホスファチジルコリン、ホスホコリン、シチジン-5'-ジリン酸コリン、又はアセチルコリンである上記(1)に記載の方法。

(3)前記酵母がサッカロミセス(*Saccharomyces*)属である上記(1)に記載の方法。

(4)前記酵母がサッカロミセス セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)である上記(3)に記載の方法。

(5)前記酵母が、ホスファチジルコリン合成系酵素をコードする遺伝子において、1個またはそれ以上の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加した配列を有する変異体である上記(1)に記載の方法。

(6)前記酵母がcho2変異体である上記(5)に記載の方法。

(7)前記コリン系化合物を添加した培地が、10 μ M以上のコリン系化合物を含む培地である上記(1)に記載の方法。

(8)前記コリン系化合物を添加した培地が、0.1～100mMのコリン系化合物を含む培地である上記(7)に記載の方法に関する。

(9)前記コリン系化合物を添加した培地が、メチオニンを含む培地である上記(1)に記載の方法。

(10)前記コリン系化合物を添加した培地が、0.01w/v%以上のメチオニンを含む培地である上記(9)に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明の生産方法では、細胞内外にSAMを高濃度で蓄積するので、従来よりも効率的かつ大量にSAMを生産する事が可能となる。また、酵母としてcho2変異体等の高生産株を用いることにより、更にSAMの生産性を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)におけるSAM関連代謝系と遺伝子の相関図。

[図2]酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)におけるホスファチジルコリンのde novoとsalvage生合成系の概略図。

[図3]コリン添加培地で清酒酵母(Kyokai 7)、実験室酵母の野生型(Wt)およびそのc

ho2変異体(cho2)を培養したときの、コリン濃度とSAMの収量を示す表。ただし、()内の数値は、コリン添加なしの場合に対する増加率。

[図4]コリン添加培地で清酒酵母、実験室酵母の野生型およびそのcho2変異体を培養したときのSAMの収率向上を示すグラフ。(図3のコリン濃度とSAMの収量増加率を図示したもの。)

[図5]コリンを添加した培地における実験室酵母の野生型及びそのcho2変異体の生育曲線。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の一形態について説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明はSAM生産菌に好適な培地に対して、コリン系化合物を添加することによりSAMの生産性を向上させる方法である。

[0011] コリン系化合物とは、コリン又は生体内で分解し容易にコリンに転換される化合物の一群をいう。コリンに転換される化合物として、コリンの水酸基にホスファチジル基、リン酸基、CDP基、酢酸基などがエステル結合したものなどが挙げられ、これら化合物は生物体内で容易に分解しコリンへ変換される事が知られている。コリン系化合物の内、好ましい化合物としては、コリン、ホスファチジルコリン、ホスホコリン、シチジーン5'-ジリン酸コリンやアセチルコリンが挙げられる。コリン系化合物の添加量は、 $10\ \mu\text{M}$ ($=0.01\text{mM}$)以上であり、好ましくは 0.1mM 以上である。該添加量は 500mM 以下であり、好ましくは 100mM 以下である。特に好ましくは 1mM である。 $10\ \mu\text{M}$ 未満であれば、十分なSAMの蓄積効果が得られず、また、 500mM 超であると培養や精製に悪影響を与えるため好ましくない。

[0012] 酵母とは、単細胞の真菌を示し、有孢子酵母、担子菌酵母、不完全酵母などが挙げられる。この中でもSaccharomyces属、Picha属、Hansenula属、Zygosaccharomyces属など有孢子酵母が望ましく、より望ましくはSaccharomyces属である。中でもSaccharomyces cerevisiaeが更に望ましい。具体的には、実験室酵母、清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母、ビール酵母、パン酵母などが含まれる。又、より好ましい酵母としては、ホスファチジルコリン合成系酵素をコードする遺伝子において、1個またはそれ以上の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加した配列を有する酵

母の変異体が挙げられる。なかでも、ホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素遺伝子(CHO2遺伝子)の変異体(以下、「cho2変異体」ともいう)が代表的な例として挙げられる。

[0013] SAM生産は、酵母を適切な培地で培養し、SAMを菌体内外に生産蓄積せしめ、適切な精製工程を経ることによって、高収率で生産することができる。

[0014] 酵母の培養については特に限定されることはなく、培養条件としては通常、酵母に対して好適な条件を用いることができる。例えば、培養温度を20～45℃(好ましくは25～40℃)、培養中のpHを3～8(好ましくは5～8)に制御した好氣的条件下で12～150時間(好ましくは16～120時間)培養することができる。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

[0015] 培地についても同様に、酵母に対して好適な培地を用いる事ができる。例えば、炭素源、窒素源などの基本成分と、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分とを含有する通常の培地である。その成分選択は過去の知見から酵母が利用可能な物質とされていれば、特に限定されるものではない。例えば、炭素源としてはグルコースやフルクトースの様な単糖に限らず、ショ糖や乳糖などの二糖、セルロースやスターチなどの多糖、エタノールや乳酸などの有機化合物、さらには廃糖蜜など粗精製原料なども利用可能である。窒素源に関しても、アンモニウム塩や硝酸塩などの無機塩類だけでなく、アミノ酸やグルコサミンなどの含窒素有機化合物、酵母抽出物やペプトンなどの有機原料なども利用可能である。これらの基本成分に加え、過去の培養工学の知見から好適な無機イオン塩、ビタミン、ミネラル、有機化合物、緩衝成分、消泡剤などを添加することができる。さらにSAM生産にとって望ましくは、メチオニン添加培地を使用することによって、更なるSAMの大量取得が可能となる。

[0016] メチオニンの添加量としては0.01w/v%以上であり、好ましくは0.05w/v%以上、更に好ましくは0.1w/v%以上である。該添加量は0.4w/v%以下、好ましくは0.35w/v%以下、更に好ましくは0.3w/v%以下である。該添加量は0.1～0.3w/v%の範囲内が最も好ましい。該添加量が0.01w/v%未満では、十分なSAMの蓄積効果が得られず、また、0.4w/v%超では、酵母の生育に悪影響を与えるため好ましくな

い。

なお、ここで、「w/v%」とは、質量対容量の百分率を示す。

[0017] 培養後の培地からのSAMの抽出及び精製については、特に限定されることは無い。例えば、培養物からの菌体の回収については、遠心、沈殿、ろ過といった方法で実施することができる。例えば酵母では遠心やろ過により容易に回収が可能である。又、得られた菌体からのSAMの回収は、物理的破壊法(ホモジナイザー、ガラスビーズ破碎、凍結融解など)や化学的破壊法(溶剤処理、酸、塩基処理、浸透圧処理、酵素処理など)によって行なうことができる。例えば酵母では酸処理により容易にSAMは溶出する。さらに、抽出したSAMの精製については、既存の精製方法(溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、塩沈降など)によって実施することができる。具体的にはSAMは酸性のイオン交換クロマトグラフィーを用いる事で精製は可能であり、冷アセトンを添加することで塩沈降によって固体として回収することが可能である。これらの方法は、必要に応じて適宜組み合わせることで実施することが可能である。

[0018] 以下、本発明の具体的な実施例について述べるが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0019] 実施例

実験室酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BY20592)およびそのcho2変異体、清酒酵母(協会7号酵母)をそれぞれ親株として培養を行い、菌体内に蓄積されたSAM含量を測定した。なお、本試験で用いた実験室酵母株は全て酵母遺伝資源センターより入手した。

[0020] (1) cho2変異体の作製

標的遺伝子破壊用のベクターはタカラバイオ社製 pAUR135ベクターを利用して作製した。具体的には、pAUR135ベクターのEcoR I-Sma I制限酵素切断処理物と、CHO2の一部のPCR増幅物(実験室酵母BY2041のゲノムDNAを鋳型に、プライマーA、B(表1、配列番号1及び2)を用いたPCR反応によって増幅された配列)のEcoR I制限酵素切断処理物を混合し、T4DNAリガーゼでライゲーションして、CHO2破壊用ベクターを作製した。さらに、このベクターをクローニングするために大腸菌DH5 α へ導入し、この大腸菌培養物から常法に従いプラスミド精製を行うことで、必要量の遺伝

子破壊用ベクターを調製した。

[0021] 前項で作製したCHO2破壊用ベクターに挿入されているCHO2遺伝子の部分配列に対して、CDSに相当する配列でストップコドンが発生するように点突然変異を設計したプライマーC、D(表1、配列番号3及び4)を用いてCHO2破壊用ベクターの全長を増幅した。このPCR反応物をそのまま大腸菌DH5 α へ形質転換し、目的の点突然変異が導入されたCHO2破壊用ベクターを保持した大腸菌を得た。この大腸菌培養物から常法に従いプラスミド精製を行い、必要量の点突然変異が導入されたCHO2破壊用ベクター(以下、「CHO2変異導入ベクター」という)を作製した。

[0022] 上記のCHO2変異導入ベクターを用いて酵母ゲノムのCHO2遺伝子への変異導入を行った。具体的には、親株として実験室酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BY20592)を用い、酢酸リチウム法によって上記ベクターを導入し、形質転換を行った。この形質転換酵母をYPD液体培地で一晚培養した後、0.5 μ g/mlのオーレオバシジンA含有YPD固体培地に塗布し、生育してきたコロニーについて、導入ベクターがCHO2遺伝子部位に挿入されている事を確認できた。

[0023] 次に、そのコロニーをYP-Galactose固体培地(2w/v%ペプトン、1w/v%イーストエキス、2w/v%ガラクトース、2w/v%精製寒天)に塗布し、28°Cで3日間培養した。ここで、pAUR135ベクターにはガラクトース誘導致死性があるため、生育してくるコロニーはベクター配列が脱落した復帰変異体であり、その中にはcho2変異導入ベクターに導入したストップコドンがゲノムに導入された株が含まれる。そこで、CHO2遺伝子にストップコドンが導入されたコロニー(以後、この株を「cho2変異体」という)のゲノムをシーケンスする事により選抜した。

[0024] (2)コリン添加培地によるSAM生産量の測定

前項で得られた実験室酵母のcho2変異体と野生型親株(BY20592)および清酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BY2696、協会7号)を下記の条件で培養し、培養物を得た。すなわち、50mlの遠沈管に5mlのSAM発酵用培地(5w/v%グルコース、1w/v%ペプトン、0.5w/v%イーストエキス、0.4w/v%KH₂PO₄、0.2w/v%K₂HPO₄、0.05w/v%Mg₂SO₄・H₂O、0.15w/v%L-メチオニン、pH6.0)を分注した後、最終濃度が10 μ M～100mMの範囲となるように10倍濃度毎にコリンを添加した。これらの培地に酵母株

をそれぞれ接種し、28°C、72時間浸とう培養を行い、十分量の培養物を得た。

[0025] 上述の72時間培養物に蓄積されるSAMを以下のような方法で抽出し、定量した。すなわち、菌体を遠心にて沈降させ、上清を除いた後、10%過塩素酸を添加してSAMを抽出(室温、1時間)し、その上清をペーパークロマトグラフィー(展開溶媒 EtOH: n-BuOH: 水: AcOH: 1w/v%NaP₂O₇ = 30: 35: 40: 1: 2)にて精製し、SAMスポットを切り出して抽出したものを分析用サンプルとした。

[0026] 定量はHPLCを用いて260nmのUV吸収を指標に標準品との比較で行った。分析条件としては、使用装置: Waters 2690 Separation Module Waters 2487 Dual Absorbance Detectorシステム、使用カラム: cosmosil packed column 5C18-MS(4.6i.d. × 250mm)、溶出溶媒: 5v/v%メタノール-95v/v%0.2M KH₂PO₄ 溶液、流速: 1ml/min、カラム温度: 25°Cであった。

[0027] その結果、全ての株でコリン添加によるSAMの蓄積量の向上が確認された。さらにその効果は1mMまで濃度依存的に向上する事が観察され、それ以上の濃度では効果は飽和する事が分かった(図3及び4)。

[0028] さらに、コリン添加の効果をcho2変異体とその親株の培養物において比較した。その結果、SAM収量増加効果はcho2変異体を培養した方が効果的であった。これはCHO2遺伝子がホスファチジルコリンの生合成に関与する遺伝子である事からも明らかであり、ホスファチジルコリンのde novoの生合成系の抑制だけではなく、不足していたホスファチジルコリンがコリンの添加によって補給される事による生育改善などが相乗的に効果を及ぼしていると推測される。実際に図5に示すように、コリン添加濃度に応じて生育は改善され、野生型に比べて大きな生育促進効果を示している。このことから、コリン添加は特にcho2変異体によるSAM生産性向上に対して有効であると言える。

実施例で使用したプライマーの配列を第1表に示す。

[0029] [表1]

第1表		
プライマーID	塩基配列	配列番号
プライマーA	CACGATATGGTGCGTTCGC	1
プライマーB	GGAATTCCGCTACGGTACCAATTGTG	2
プライマーC	CGTTTACCTTTCTATTTGATAAAGCTGGGTTT	3
プライマーD	GAACCCAGCTTTATCAAATAGAAAGGTAACG	4

産業上の利用可能性

[0030] 本発明は、SAMの大量生産を可能とするため、治療薬やサプリメント等を始め、医療分野その他において広く使用されるSAMの大量供給に寄与する。

なお、2008年2月12日に出願された日本特許出願2008-030672号の明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

配列表フリーテキスト

[0031] SEQ ID NO: 1, Primer for amplification of CHO2 gene

SEQ ID NO: 2, Primer for amplification of CHO2 gene

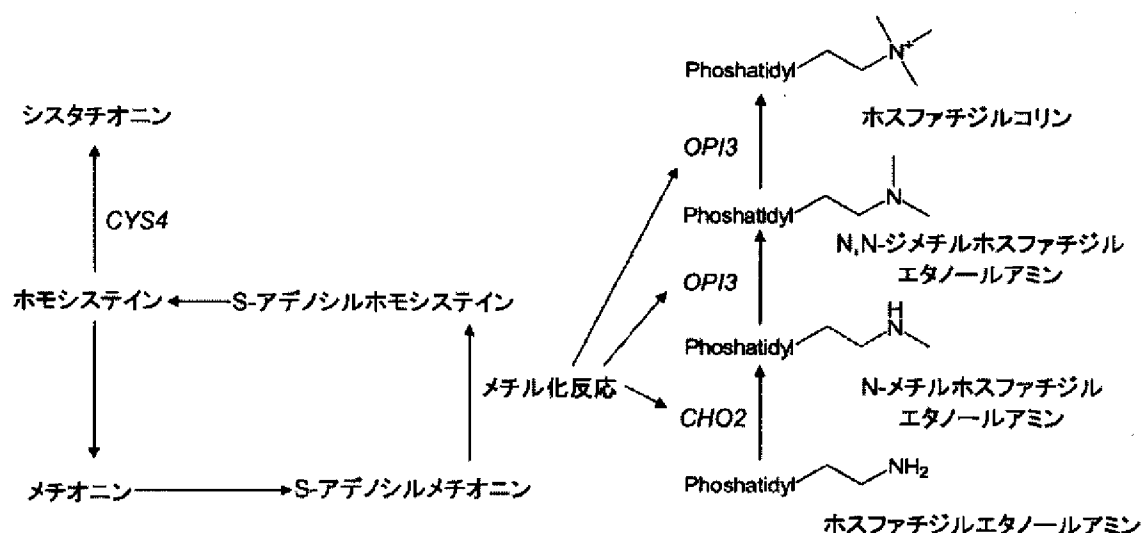
SEQ ID NO: 3, Mutagenic primer containing mutations for amplification of CHO2 gene

SEQ ID NO: 4, Mutagenic primer containing mutations for amplification of CHO2 gene

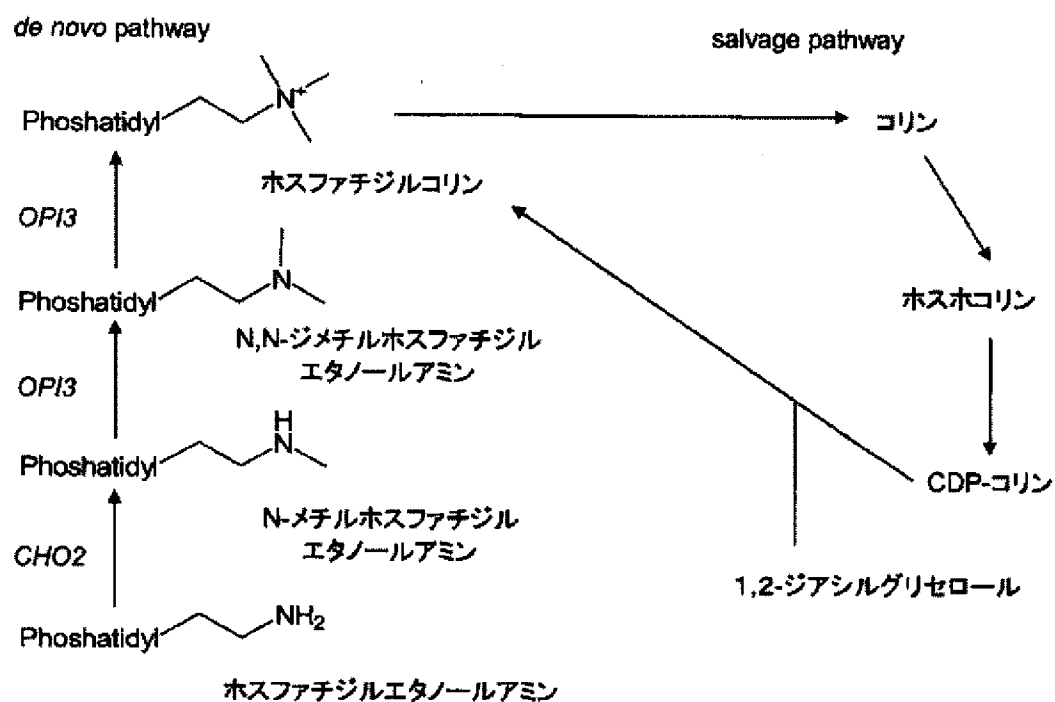
請求の範囲

- [1] コリン系化合物を添加した培地で酵母を培養し、系内に蓄積したS－アデノシルメチオニンを回収することを特徴とするS－アデノシルメチオニンを生産する方法。
- [2] 前記コリン系化合物がコリン、ホスファチジルコリン、ホスホコリン、シチジン－5’－ジリン酸コリン、又はアセチルコリンである請求項1に記載の方法。
- [3] 前記酵母がサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属である請求項1に記載の方法。
- [4] 前記酵母がサッカロミセス セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である請求項3に記載の方法。
- [5] 前記酵母が、ホスファチジルコリン合成系酵素をコードする遺伝子において、1個またはそれ以上の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加した配列を有する変異体である請求項1に記載の方法。
- [6] 前記酵母がcho2変異体である請求項5に記載の方法。
- [7] 前記コリン系化合物を添加した培地が、10 μ M以上のコリン系化合物を含む培地である請求項1に記載の方法。
- [8] 前記コリン系化合物を添加した培地が、0.1～100mMのコリン系化合物を含む培地である請求項7に記載の方法。
- [9] 前記コリン系化合物を添加した培地が、メチオニンを含む培地である請求項1に記載の方法。
- [10] 前記コリン系化合物を添加した培地が、0.01w/v%以上のメチオニンを含む培地である請求項9に記載の方法。

[図1]



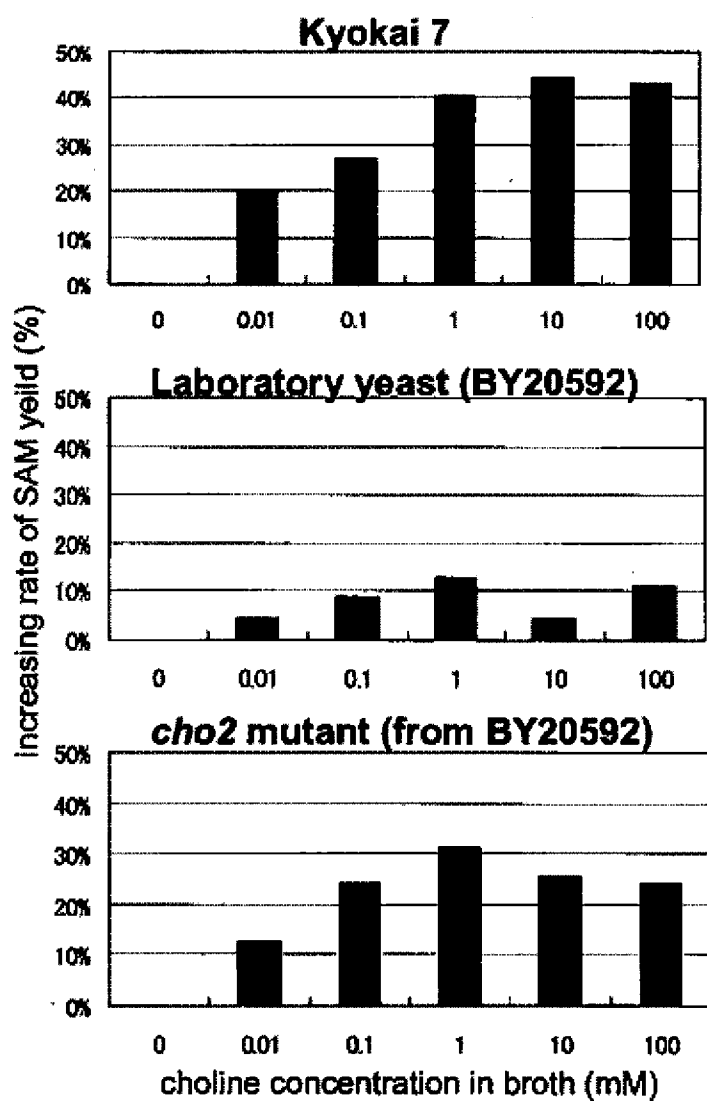
[図2]



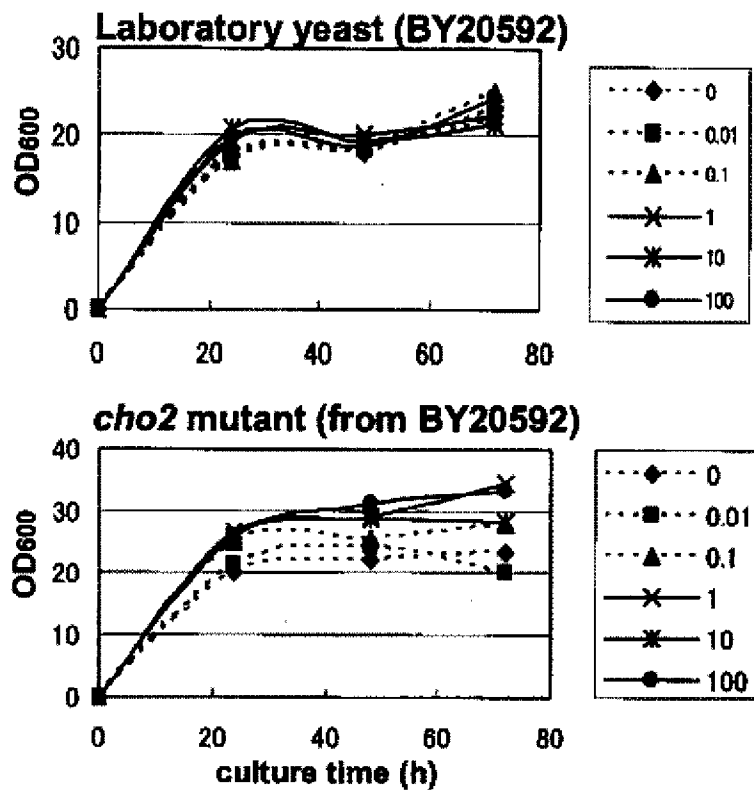
[図3]

Choline conc. (mM)	SAM yield in 1ml broth(mg/ml broth)					
	() : increasing rate of SAM yield (%)					
	Kyokai 7		Laboratory yeast (BY20592)			
			Wt		cho2	
-	0.74	(-)	0.46	(-)	1.50	(-)
0.01	0.89	(20.3)	0.48	(4.3)	1.69	(12.7)
0.1	0.94	(27.0)	0.50	(8.7)	1.86	(24.0)
1	1.04	(40.5)	0.52	(13.0)	1.97	(31.3)
10	1.07	(44.6)	0.48	(4.3)	1.88	(25.3)
100	1.06	(43.2)	0.51	(10.9)	1.86	(24.0)

[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/052240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/40(2006.01) i, C12N15/09(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)

C12P19/40, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-112474 A (Kansai Technology Licensing Organization Co., Ltd.), 24 April, 2001 (24.04.01), Full text (Family: none)	1-10
A	JP 2005-261361 A (Hiroshima University), 29 September, 2005 (29.09.05), Full text (Family: none)	1-10
A	SHOBAYASHI, M. et al., A new method for isolation of S-adenosylmethionine (SAM)- accumulating yeast, Appl.Microbiol.Biotechnol., 2006, Vol.69, No.6, p.704-710	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 April, 2009 (09.04.09)

Date of mailing of the international search report
21 April, 2009 (21.04.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/052240

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUMMERS, E.F. et al., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cho2 mutants are deficient in phospholipid methylation and cross-pathway regulation of inositol synthesis, <i>Genetics</i> , 1988, Vol.120, No.4, p.909-922	1-10
P,A	WO 2008/020595 A1 (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.), 21 February, 2008 (21.02.08), Full text & JP 2008-67693 A	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12P19/40(2006.01)i, C12N15/09(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（I P C））

Int.Cl. C12P19/40, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

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
A	JP 2001-112474 A（関西ティール・エル・オー株式会社）2001.04.24, 全文（ファミリーなし）	1-10
A	JP 2005-261361 A（国立大学法人広島大学）2005.09.29, 全文（ファミリーなし）	1-10
A	SHOBAYASHI, M. et al., A new method for isolation of S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast,	1-10

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

0 9 . 0 4 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 4 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

4 N

9 2 8 1

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Appl.Microbiol.Biotechnol., 2006, Vol.69, No. 6, p. 704-710 SUMMERS, E.F. et al., Saccharomyces cerevisiae cho2 mutants are deficient in phospholipid methylation and cross-pathway regulation of inositol synthesis, Genetics, 1988, Vol.120, No. 4, p. 909-922	1-10
P, A	WO 2008/020595 A1 (石原産業株式会社) 2008.02.21, 全文 & JP 2008-67693 A	1-10