

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4504607号
(P4504607)

(45) 発行日 平成22年7月14日 (2010. 7. 14)

(24) 登録日 平成22年4月30日 (2010. 4. 30)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 P 19/14 (2006. 01)	C 1 2 P 19/14 Z
C O 7 H 15/04 (2006. 01)	C O 7 H 15/04 D
C O 7 H 15/08 (2006. 01)	C O 7 H 15/08

請求項の数 5 (全 18 頁)

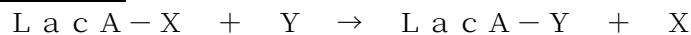
(21) 出願番号	特願2001-518886 (P2001-518886)	(73) 特許権者	390033145
(86) (22) 出願日	平成12年8月18日 (2000. 8. 18)		焼津水産化学工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/005576		静岡県焼津市小川新町 5-8-13
(87) 国際公開番号	W02001/014575	(74) 代理人	100104673
(87) 国際公開日	平成13年3月1日 (2001. 3. 1)		弁理士 南條 博道
審査請求日	平成19年5月9日 (2007. 5. 9)	(72) 発明者	安武 望
(31) 優先権主張番号	特願平11-233262		日本国茨城県つくば市桜 1 丁目 1 6 番 昭
(32) 優先日	平成11年8月19日 (1999. 8. 19)		和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		センター内
		(72) 発明者	三吉 新介
			日本国茨城県つくば市桜 1 丁目 1 6 番 昭
			和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究
			センター内
		(72) 発明者	碓氷 泰市
			日本国静岡県静岡市小島 1 7 3 9-7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 配糖体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

セルラーゼの存在下、次式：



(式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。) で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法。

【請求項 2】

前記アルコール性水酸基を有する化合物が、脂肪族アルコールまたは糖質である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

前記アルコール性水酸基を有する化合物が、セリンまたはスレオニン残基を有するアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 4】

Xが水素である、請求項 1 ないし 3 のいずれかの項に記載の製造方法。

【請求項 5】

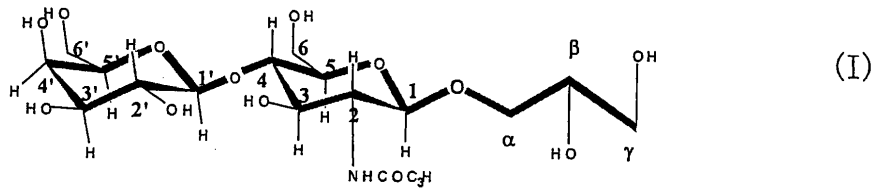
以下の構造式 (I) で示される、グリセロイルN-アセチルラクトサミニド (O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-O-β-D-2-Acetylaminosyl-2-deoxy-β-D-Glucopyranosyl-(1→1)-Glyce

10

20

rol)。

【化1】



【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。さらに詳しくは、 β -1, 4グルコシル結合を切断する活性を有する酵素を用いるラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖質および複合糖質（糖蛋白質、糖脂質、配糖体など）は、生物細胞、体液、果実、種子など動・植物に存在し、細胞膜表面における生体情報の伝達、細胞の形態形成、蛋白質との共有結合による高次構造の維持など、遺伝子や蛋白質と同様に生体機能の維持・調節に不可欠な機能を担っていることが明らかにされてきている。

20

【0003】

複合糖質である糖脂質は、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質などに分類される。スフィンゴ糖脂質は、大部分が動物組織に存在し、その基本糖鎖の構造によってグロボ系、ラクト系、ガングリオ系、ガラ系のおおよそ4つの系列に大別される。このうち、グロボ系、ラクト系、ガングリオ系の3つは、ラクトース構造を有し、セラミドにラクトースが結合したラクトシルセラミドを基本骨格としており、つぎに付加される糖質によって分類されている。

【0004】

このラクトシルセラミドは、Gal β 1-4Glcユニット、すなわちラクトースユニットを有しているが、細菌が複合糖質の配列を認識する際、このラクトースユニットを認識することが知られるようになり、微生物が宿主細胞に糖鎖を介して接着するというメカニズムは、細胞と細胞の認識作用のモデルとして重要な役割を示している。さらに、細菌は細胞表面にある糖鎖の末端部分だけを認識して結合するだけではなく、糖鎖内部にある糖鎖構造を認識することがわかってきた。例：大腸菌、シュードモナス属菌、放線菌、プロピオン酸菌は糖鎖の内部にあるラクトース構造も認識することが知られている。

30

【0005】

このように、このラクトシルセラミドは、細胞の接着などの生理学的に重要な機能を担っている。従って、ラクトシル配糖体は、医療、食品などの用途に利用できるが、その製造が容易ではないのが実状である。

40

【0006】

複合糖質である配糖体にも多くの種類がある。例えば、グリセロールをアグリコンとするグルコース、ガラクトース、N-アセチルラクトサミンの配糖体が知られてる。グルコースの配糖体としては、グリセロイルグルコシド（2-O- α -D-Glucosylglycerol、(2R)-1-O- α -D-Glucosylglycerol、および(2S)-1-O- α -D-Glucosylglycerol）などの天然物質が知られている。ガラクトースの配糖体としては、化学合成物質として、グリセロイルガラクトシド（1-O- β -D-Galactosylglycerol）が知られている。また、N-アセチルラクトサミニル配糖体としては、(O- β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-2-Acetylamin-2-deoxy

50

1-Glucopyranosyl-(1→2)-Glycerol)の存在が報告されている。

【0007】

上記の配糖体のうち、グリセロイルグルコシド、グリセロイルガラクトシドなどは味質や保湿性、生理機能に特徴を有する物質である。また、これらの物質はグリセロ糖脂質の合成原料としても有用である。グリセロ糖脂質は微生物から高等植物に至るまで広く生体に存在し、乳化安定性や発ガンプロモーター抑制効果などが報告されている。従って、異なる構造の糖がグリセロールに付加した化合物は新たな機能や新たなグリセロ糖脂質の原料としての応用が期待できる。

【0008】

また、N-アセチラクトサミニル配糖体は、ブドウ状球菌が認識するレセプター、あるいはインフルエンザウイルスAおよびB、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどが認識する糖鎖構造のコア部分に存在することが知られており、細胞の認識に関与するので、医療用途に有用であるが、その製造が容易ではないのが実状である。

【0009】

このような糖関連物質の機能に注目し、その機能をさらに向上させ、あるいはその生理機能を改変して、医療、食品などの用途に利用すべく、糖鎖および複合糖質の修飾・置換研究(リモデリング)が行われている。

【0010】

糖質および複合糖質の糖鎖のリモデリングの方法には、化学的な方法と酵素的な方法、および双方を組み合わせた方法がある。

【0011】

化学的な方法として有機合成法による糖鎖合成があるが、この方法は操作が煩雑である上、副生産物の除去(目的物質の精製)工程が必要となる。さらに、人体に有害な試薬を用いることが多く、廃液による周辺環境への影響が危惧されるという問題点がある。

【0012】

他方、糖鎖を酵素的にリモデリングする方法としては、転移酵素またはエキソグルコシダーゼを用いる方法、エンドグルコシダーゼを用いる方法などが知られている。

【0013】

転移酵素またはエキソグルコシダーゼを用いる方法として、D. H. ジョジアッセ(D. H. Joziassse)ら Eur. J. Biochem.、第191巻、第75~83頁(1990)には、エキソグルコシダーゼまたはグルコシルトランスフェラーゼを用いて、糖鎖の非還元末端にグルコシル基を逐次添加していく方法が記載されている。

【0014】

しかし、エキソグルコシダーゼまたはグルコシルトランスフェラーゼを用いた糖鎖合成は、化学的合成に比べると容易であるが、それでも糖残基一つ一つについてその酵素反応を逐次的に行う必要があるので、多数の反応ステップを行う必要があり、煩雑であるという問題がある。

【0015】

エンドグルコシダーゼを用いる糖転移反応として、R. B. トリムブル(R. B. Trimble)ら J. Biol. Chem.、第261巻、第12000~12005頁(1986)には、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム(Flavobacterium meningosepticum)由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる方法が記載されている。R. M. バーデールス(R. M. Bardales)ら J. Biol. Chem.、第264巻、第19893~19897頁(1989)にはディプロコッカス・ニューモニエ(Diprococcus pneumoniae)由来のエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼを用いる方法が記載されている。さらに、特開平5-64594号公報には、アルスロバクター・プロトホルミエ(Arthrobacter protophormiae)由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への高マンノース型糖鎖の転移反応が記載されてい

10

20

30

40

50

る。また、K. ヤマモト (K. Yamamoto) ら Biochem. Biophys. Res. Commun.、第203巻、第244～252頁(1994)にはムコール・ヒエマリス (Mucor hiemalis) 由来のエンドーβ-アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への糖鎖転移反応が記載されている。さらに、特開平10-245402号公報には、エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた (Man) 6-GlcNAcの転移反応が記載され、特開平10-33194号公報には、ラクト-N-ビオシダーゼを用いた Galβ1-3GlcNAcの転移反応が記載されている。

【0016】

このように、エンドグルコシダーゼで様々な糖鎖を転移する例が報告されているが、ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを転移させた例はこれまでに報告されていない。

10

【0017】

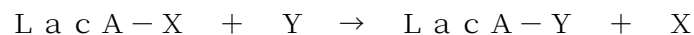
【発明が解決しようとする課題】

従って、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の簡便な製造方法が望まれている。

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明は、β1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



(式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。) で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

20

【0019】

好ましい実施態様においては、前記Yがアルコール性水酸基を有する化合物である。

【0020】

別の好ましい実施態様においては、前記アルコール性水酸基を有する化合物が脂肪族アルコールまたは糖質である。

【0021】

さらに別の好ましい実施態様においては、前記アルコール性水酸基を有する化合物が、セリンまたはスレオニン残基を有するアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質である。

30

【0022】

好ましい実施態様においては、Xが水素である。

【0023】

また、好ましい実施態様においては、前記β-1, 4グルコシル結合を切断する活性を有する酵素が、エキソセロビオヒドロラーゼ、β-D-グルコシダーゼ、および/またはセルラーゼである。

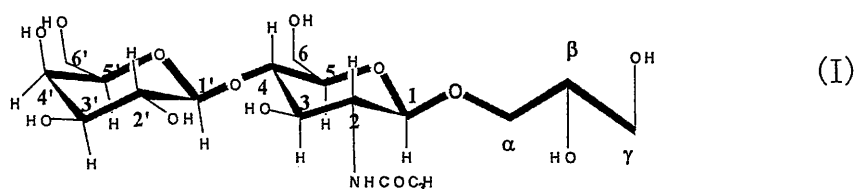
【0024】

本発明は、また、以下の構造式(I)で示される、グリセロイルN-アセチルラクトサミニド (O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-O-β-D-2-Acetyl amino-2-deoxyl-Glucopyranosyl-(1→1)-Glycerol) に関する。

40

【0025】

【化2】

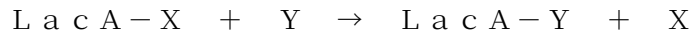


50

【0026】

【発明の実施の形態】

本発明は、 β 1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法である。

【0027】

(酵素)

本発明に用いられる酵素は、 β 1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素であれば、特に制限がない。エンド型の酵素でもよく、エキソ型の酵素でもよい。好ましい酵素としては、エキソ-セロビオヒドロラーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、セルラーゼなどが挙げられる。これらの酵素は、単独で用いてもよく、混合して用いてもよい。

10

【0028】

酵素は、市販の β 1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素であってもよく、 β 1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物、その培養液あるいは抽出物、あるいは精製物であってもよい。 β 1, 4グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物は、公知である。

【0029】

細菌の例としては、例えば、バシラス (*Bacillus*) 属、セルビブリオ (*Cellvibrio*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、スポロサイトファーガ (*Sporocytophaga*) 属、アセティビブリオ (*Acetivibrio*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、バクテリオイド (*Bacterioides*) 属、トレポネマ (*Treponema*) 属、ルミノコッカス (*Ruminococcus*) 属などが挙げられる。

20

【0030】

糸状菌の例としては、例えば、フミコーラ (*Humicola*) 属、トリコデルマ (*Tricoderma*) 属、マイロセシウム (*Myrothecium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、イルペクス (*Irpeex*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、ペリクラリラ (*Pellicularia*) 属などに属する微生物が挙げられる。

30

【0031】

放線菌の例としては、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、サーモノスポラ (*Thermonospora*) 属に属する微生物が挙げられる。

【0032】

(供与体)

一般式 LacA-X で表されるラクトースまたはN-アセチルラクトサミン供与体としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミン (Xが水素の場合) 及び、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを含有する糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物が挙げられる。

【0033】

ラクトース供与体及び／又はN-アセチルラクトサミン供与体の糖質としては、ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンが β -グルコシド結合したオリゴ糖が挙げられる。

40

【0034】

ラクトース供与体及び／又は、N-アセチルラクトサミン供与体の複合糖質としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを末端に有する糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質が挙げられる。糖脂質としては、スフィンゴ糖脂質が好ましく、スフィンゴ糖脂質の構成成分であるセラミドあるいはセラミド類縁体の末端にラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを有するものが好ましく用いられる。

【0035】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミン供与体のフェノール性化合物としては、特

50

に制限がない。ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを有するフェノールおよびその誘導体（例えば、パラニトロフェノール）、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体などが挙げられる。なお、LacA-XがラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの場合には、受容体Yとの間で縮合反応が起こるが、これも本発明でいう転移反応に含まれるものである。

【0036】

（受容体）

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるYとしては、水酸基、すなわち、アルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物が挙げられる。

【0037】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるアルコール性水酸基を有する化合物としては、例えば、脂肪族アルコール、アミノ酸、糖質などが挙げられる。

【0038】

脂肪族アルコールは脂肪族炭化水素の水素原子の1個または複数個を水酸基で置換したものであり、これらは、水酸基の結合している炭素に結合するアルキル基の数で一級アルコール、二級アルコール、三級アルコールに分類される。また、水酸基の結合数によって、一価アルコール、二価アルコール、多価アルコールとも分類される。

【0039】

一級アルコールとしては、メタノール、エタノール、ブタノール、プロパノール、ヘキサノール（シス-3-ヘキサノール）、オクタノール、アリルアルコール、ゲラニオール、シトロネロールなどが挙げられる。

【0040】

二級アルコールとしては、イソプロパノール、sec-ブタノールなどが挙げられる。

【0041】

三級アルコールとしては、tert-ブチルアルコールなどが挙げられる。

【0042】

一価アルコールとしては、上記メタノールなどが、二価アルコールとしてはエチレングリコールなどが、三価アルコールとしてはグリセロールなどが代表的なものである。

【0043】

以上の物質の他に、メントール、サンタロールなどの環状構造を有する脂環族アルコールも脂肪族アルコールに含む。

【0044】

また、アルコール性水酸基を有するアミノ酸としては、例えば、セリン、スレオニンなどが挙げられる。さらに、アルコール性水酸基を有するアミノ酸、例えば、セリン、スレオニン残基を含有するペプチドおよび蛋白質、あるいは後述のフェノール性水酸基を有するチロシンを含有するペプチドも本発明の受容体として用いられる。

【0045】

また、アルコール性水酸基を有する糖質としては、グルコース、マンノースなどの単糖が挙げられる。オリゴ糖としては、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、サイクロデキストリン、ゲンチオオリゴ糖、ニゲロオリゴ糖などの澱粉関連のオリゴ糖、マルトオリゴシルスクロース、フラクトオリゴ糖、パラチノース、ラクトスクロース、キシロシルフルクトシド、ラフィノース、スタキオースなどの砂糖関連のオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ラクチュロースなどの乳糖関連のオリゴ糖、キシロオリゴ糖、アガロオリゴ糖、キチン・キトサンオリゴ糖、マンノオリゴ糖、アルギン酸オリゴ糖などが挙げられる。また、糖蛋白質、糖脂質の構成成分となっている糖鎖もしくはその部分構造となる糖鎖などを挙げるができる。

【0046】

フェノール性水酸基を有する化合物としては、フェノールおよびその誘導体、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体、ゲニステインなどの大豆イソフラボン類などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0047】

その他、糖蛋白質やスフィンゴ糖脂質などの複合糖質、セラミドなどの複合脂質、フラボノールなどのフラボノイド類縁体が水酸基を有しており、受容体として用いることができる。

【0048】

(ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応)

ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応には、特に制限はない。ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体と、 β -1, 4グルコシル結合を切断する活性を有する酵素と、ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル受容体とを適切な割合で混合し、反応させればよい。

10

【0049】

転移反応におけるラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体および受容体の濃度は、特に制限はなく、当業者が反応の効率などを考慮して適宜決定すればよい。

【0050】

用いる酵素の濃度は、特に制限がない。基質の濃度、反応温度、反応時間などを考慮して、当業者が決定すればよい。例えば、予備試験を行って、用いる酵素量を決定することができる。

【0051】

反応温度は特に制限はない。一般的には、用いる酵素の至適温度 $\pm 20^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適温度 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲で行われる。

20

【0052】

反応のpHも特に制限がなく、用いる酵素によっても異なるが、一般には用いる酵素の至適pH ± 3 程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適pH ± 2 程度の範囲で行われる。このようなpH調整には、当業者が用いる適切な緩衝液が用いられる。

【0053】

なお、基質が水に溶解しにくい場合、基質を溶解して反応効率を高めるために少量の溶媒や界面活性剤を加えても良い。

【0054】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

30

【0055】

(実施例1)

脂肪族アルコールを受容体とするラクトシル転移反応を行った。ラクトース供与体として、p-ニトロフェニル- β -D-ラクトシド(以下、Lac-pNPという)を用い、ラクトース受容体として、脂肪族アルコールであるエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、イソプロパノールおよびt-ブチルアルコールを用いた。酵素として、トリコデルマ・リーゼイ(T. reesei)由来のセルラーゼ(協和発酵製)を用いた。

【0056】

10mg/mlの酵素溶液50 μl (20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解)に、4.65mg/mlのLac-pNPを200 μl 、各種アルコールを120 μl 、0.2M酢酸緩衝液(pH5.5)を30 μl 加え、全量を400 μl とした。酵素反応は40 $^{\circ}\text{C}$ で行い、転移反応は経時的に薄層クロマトグラフィー(以下、TLCという:展開溶媒はクロロホルム:メタノール:水=60:35:8)で確認した。TLCはメルク社製のアルミニウムシートシリカゲル60/Kieselgur F254プレコートを用いた。検出は、オルシン-硫酸による発色で行った。

40

【0057】

結果を図1に示す。図中、Rはラクトース(Lac)とLac-pNPの混合液を表し、ラクトースのRf値(0.13)はLac-pNPのRf値(0.43)より小さい。

50

また、Sは反応液を、Bはブランクを意味する。なお、ブランクは、酵素の代わりに水を添加して反応させたものである。図1において、(1)はエタノール、(2)はブタノール、(3)はヘキサノール、(4)はオクタノール、(5)はイソプロパノールおよび(6)は α -ブチルアルコールを基質としたときの結果である。

【0058】

(1)～(6)のすべての反応液S中に、反応初期には存在しなかったラクトース(Lac)が生成され、さらに(1)～(6)のそれぞれの基質に対応するアルキルラクトシド(それぞれ、エチルラクトシド、ブチルラクトシド、ヘキシルラクトシド、オクチルラクトシド、イソプロピルラクトシド、および α -ブチルラクトシド)が生成していた。即ち、(1)～(6)のすべての反応液で、Lac-pNPのラクトシル基が脂肪族アルコールの水酸基に転移されて、アルキルラクトシドが生成していることが確認された。なお、(2)のブチルラクトシドのR_f値(0.38)と(6)の α -ブチルラクトシドのR_f値(0.45)は、Lac-pNPのR_f値(0.43)と近かったので、図1のTLCにおいて、(2)と(6)とは、一見、Lac-pNPと区別がされにくかった。

【0059】

(実施例2)

実施例1のエタノールをラクトース受容体としたもの((1))について、反応生成物を解析した。27時間反応させた後、100℃、10分加熱し、17,000rpm、10分の遠心分離処理を行い、上清を得た。上清をエバポレートして乾固し、10mlの25%メタノール水溶液に溶解した。溶解液をトヨパールHW-40Sゲル濾過カラムクロマトグラフィー(ϕ 2.5×80cm)にロードし、25%メタノール水溶液を溶媒として、流速1.0ml/分で、10mlずつ、分画した。検出は、210nmおよび300nmのUV吸収、フェノール-硫酸法による発色(485nm)を測定することにより、行った。チューブNo.34～44の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

【0060】

乾固物を10mlのクロロホルム：メタノール：水=50：45：10に溶解し、ワコーゲルC-300を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離・精製した。クロロホルム：メタノール：水=50：45：10を展開溶媒とし、流速2.0ml/分で展開し、10mlずつ、分画した。検出は、210nmおよび300nmのUV吸収、フェノール-硫酸法による発色(485nm)を測定することにより、行った。チューブNo.11～13の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

【0061】

得られた乾固物の一部を0.3mlの蒸留水に溶解して、質量分析FAB/MASを行い、他方で、得られた乾固物の一部を重水に溶解して、¹H-NMR分析を行った。¹H-NMRの結果を図2に、FAB/MASの結果を図3に示す。また、図2、3に対応する¹H-NMRおよびFAB/MASのデータを以下に示す。

【0062】

¹H-NMR(270MHz、D₂O)： δ 4.50(d, J7.9Hz, H-1), 4.45(d, J7.7Hz, H-1'), 3.30(dd, H-2), 1.24(t, H- β);

FAB/MAS：(m/z)=371(C₁₄H₂₆NO₁₁+H)⁺、(m/z)=393(C₁₄H₂₆NO₁₁+Na)⁺。

【0063】

これらのデータから、(1)の生成物が以下の構造式(II)で示されるエチルラクトシドであることが確認された。

【0064】

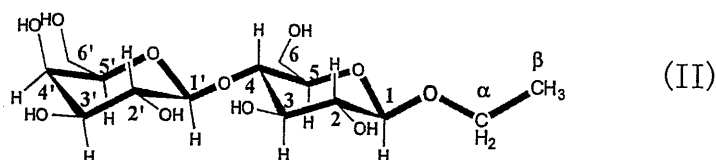
【化3】

10

20

30

40



【0065】

(実施例3)

アルコール性水酸基を有するアミノ酸へのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を0.5mg、Lac-pNPを0.94mg、セリンを50mgまたはスレオニンを含む、15mM酢酸緩衝液(pH5.0)400μlを調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図4に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50：45：10であった。

10

【0066】

図4において、RはLacとLac-pNPの混合液、Sは反応液、Bはブランクを示す。(7)はセリン、(8)はスレオニンを受容体としたときの結果である。(7)および(8)の反応液において、基質Lac-pNPは消滅し、それぞれ、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドとが生じていた。なお、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドのRf値はそれぞれ、0.27、0.29であり、ラクトースのRf値(0.34)と近いために、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドはラクトースから明確に分離されず、ブロードなバンドとして表れた。

20

【0067】

(実施例4)

アルコール性水酸基を有する単糖へのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を0.5mg、Lac-pNPを0.94mg、グルコースまたはマンノースをそれぞれ70mg含む、15mM酢酸緩衝液(pH5.0)400μlを調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図5に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50：45：10であった。

【0068】

図5において、RはLacとLac-pNPの混合液、Sは反応液、Bはブランクを示す。(9)はグルコース、(10)はマンノースを受容体としたときの結果である。(9)および(10)の反応液において、基質Lac-pNPは消滅し、それぞれ、グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドとが生じていた。グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドのRf値はそれぞれ、0.24、0.25であり、ラクトース(Lac)のRf値(0.34)よりも小さいRf値を有しており、ラクトースから明確に分離された。

30

【0069】

なお、図5において、Lac-pNPとLacの間にバンドがあるが、(9)はグルコース(Glu)、(10)はマンノース(Man)であった。

40

【0070】

(実施例5)

アルコール性水酸基を有する脂環族アルコールであるL-メントールへのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を1mg、Lac-pNPを1mg、L-メントールを5mg、および界面活性剤として、コール酸を2重量%含む、15mM酢酸緩衝液(pH5.0)400μlを調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図6に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=65：35：4であった。

【0071】

50

図6において、RはLacとLac-pNPの混合液、Sは反応液、Bはブランクを示す。基質Lac-pNPは消滅し、L-メントリルラクトシド（Lac-メントール）が生じており（Rf値0.62）、ラクトース（Rf値0.13）と区別された。L-メントリルラクトシド以外のスポットは、Rf値0.81のコール酸以外は、なんらかの反応生成物と考えられる。

【0072】

（実施例6）

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコールへのN-アセチルラクトサミニル転移反応を行った。

【0073】

N-アセチルラクトサミン供与体として、p-ニトロフェニル-β-N-アセチルラクトサミン（以下、LacNAc-pNPという）を用いた。反応液として、0.94mg、N-アセチルラクトサミン（以下、LacNAcという）受容体として、メタノール、エタノール、プロパノールをそれぞれ120μl、酵素として、トリコデルマ・リーゼイ（T. reesei）由来のセルラーゼ（協和発酵製）を0.5mgを含む400μlの15mM酢酸緩衝液（pH5.0）を調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図7に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50：40：50であった。

【0074】

図7において、RはLacNAcおよびLacNAc-pNPを、Bはブランクを示す。基質LacNAc-pNP（Rf=0.56）は消滅し、LacNAc（Rf値=0.30）、および矢印で示されるRf値=0.38、0.46および0.56の新しいスポットが表れ、それぞれ、メチルN-アセチルラクトサミニド（1）、エチルN-アセチルラクトサミニド（2）およびプロピルN-アセチルラクトサミニド（3）に対応していた。このうち、エチルN-アセチルラクトサミニド（2）については、標品（Carbicochem製）とTLCのスポットが一致した。

【0075】

（実施例7）

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコール、糖類を受容体とするラクトシル転移（ラクトースの縮合）反応をおこなった。供与体としてラクトースを用いた。また、受容体としてメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、ドデカノール、アリルアルコール、マンノースを用いた。

【0076】

ラクトース100mg、各受容体170μl（マンノースの場合は75mg）、酵素としてトリコデルマ・リーゼイ（T. reesei）由来のセルラーゼ（協和発酵製）を25mg含む650μlの10mM酢酸緩衝液（pH5.0）を調製し、40℃、48時間反応させた。反応後、TLCで分析した。結果を図8（1）～（7）に示す。図中、Sは反応液、Bはブランクを示す。また、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=60：35：8である。

【0077】

各反応液とも複数のスポットが認められたがラクトース（Lac）のRf値=0.29に対して、矢印で示すRf値=0.45、0.52、0.54、0.62、0.65、0.68、0.69の新しいスポットが見出された。それぞれのスポットから、メチルラクトシド（1）、エチルラクトシド（2）、プロピルラクトシド（3）、ブチルラクトシド（4）、ヘキシルラクトシド（5）、オクチルラクトシド（6）、ドデシルラクトシド（7）の生成が示唆された。

【0078】

また、ラクトースのRf値=0.36に対して、Rf値=0.53、0.29（展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水=50：45：10）の新しいスポットが見出され（図8（8）～（9））、それぞれアリルラクトシド（8）、マンノシルラクトシド（

10

20

30

40

50

9) の生成が示唆された。以下、それぞれの生成物を確認した。

【0079】

7-1. エチルラクトシド (2)

エチルラクトシド (2) の T L C のスポットは、実施例 1 における L a c - p N P とエタノールとの転移反応生成物及び標品 (シグマ社製) と一致した。また、実施例 2 と同様に分離精製後、得られた乾燥物の一部を F A B / M A S、 ^1H -NMR、および ^{13}C -NMR にて分析した結果を以下に示す。

【0080】

F A B / M A S : $(m/z) = 371 (C_{14}H_{26}NO_{11} + H)^+$ 、 $(m/z) = 393 (C_{14}H_{26}NO_{11} + Na)^+$;

^1H -NMR (270 MHz、 D_2O) : δ 4.50 (d, J 7.9 Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.7 Hz, H-1'), 3.30 (dd, H-2), 1.24 (t, H- β) ;

^{13}C -NMR (270 MHz、 D_2O) : 17.1 (C- β)、62.9 (C-6)、63.8 (C-6')、69.0 (C-4')、71.4 (C- α)、73.8 (C-2')、75.4 (C-3')、75.6 (C-2)、77.3 (C-3)、77.6 (C-5)、78.2 (C-5')、81.3 (C-4)、104.5 (C-1)、105.7 (C-1')。

【0081】

以上から、生成物 (2) は構造式 (I I) に示すエチルラクトシドであることが確認された。

【0082】

7-2 ブチルラクトシド (4)、ヘキシルラクトシド (5)、オクチルラクトシド (6)

ブチルラクトシド (4)、ヘキシルラクトシド (5)、オクチルラクトシド (6) についても実施例 1 で得られた、L a c - p N P と対応する脂肪族アルコールにおける転移反応生成物と T L C のスポットが一致した。

【0083】

更に、オクチルラクトシド (6) を含むと思われる反応液を前出のシリカゲルカラム ($\phi 2 \times 50 \text{ cm}$) にかき、溶離液として、クロロホルム：メタノール：水 = 60 : 25 : 4 を用い、流速 2.0 ml / 分で溶出した。10 ml / フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色 (485 nm) で検出した。フラクション No. 21 ~ 28 を回収し、凍結乾燥して反応生成物約 5 mg を得た。本品の純度は T L C、及び液体クロマトグラフィーにより 99% 以上であることを確認した。

【0084】

得られた乾燥物の一部を F A B / M A S にて、他方を ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR にて分析した。結果を以下に示す。

【0085】

F A B / M A S : $(m/z) = 455 (C_{20}H_{38}NO_{11} + H)^+$ 、 $(m/z) = 477 (C_{20}H_{38}NO_{11} + Na)^+$;

^1H -NMR (270 MHz、 D_2O) : δ 4.48 (d, J 8.0 Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.7 Hz, H-1'), 3.31 (dd, H-2), 1.63 (m, H- β), 1.36 (m, H- γ), 1.29 (m, H- δ - η), 0.87 (t, H- θ) ;

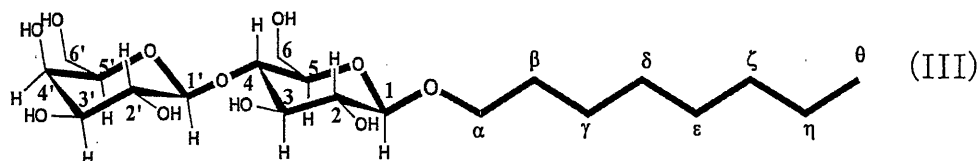
^{13}C -NMR (270 MHz、 D_2O) : 16.2 (C- θ)、24.8 (C- η)、27.8 (C- γ)、31.2 (C- δ)、31.2 (C- ϵ)、31.5 (C- β)、33.9 (C- ζ)、63.0 (C-6)、63.8 (C-6')、71.4 (C-4')、73.6 (C- α)、73.8 (C-2')、75.4 (C-3')、75.7 (C-2)、77.3 (C-3)、77.6 (C-5)、78.2 (C-5')、81.3 (C-4)、104.8 (C-1)、105.7 (C-1')。

【0086】

以上より、生成物（6）は、以下の構造式（III）で示されるオクチルラクトシドであることが確認された。

【0087】

【化4】



10

【0088】

7-3 ドデシルラクトシド（7）

さらに、ドデシルラクトシド（7）を含むと思われる反応液を、Chromatorex-ODS DM1020Tを用いたODSカラム（φ3.5×60cm）にかけた。カラムの5倍量の65%メタノールで洗浄後、75%メタノール（流速2.5ml/分）で溶出した。30ml/フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色（485nm）で検出した。フラクションNo. 17～23を回収し、凍結乾燥して反応生成物約5mgを得た。本品の純度はTLC、及び液体クロマトグラフィーにより99%以上であることを確認した。

【0089】

20

得られた乾燥物の一部をFAB/MASにて、他方を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ にて分析した。結果を以下に示す。

【0090】

FAB/MAS: $(m/z) = 511 (C_{24}H_{46}NO_{11} + H)^+$ 、 $(m/z) = 533 (C_{24}H_{46}NO_{11} + Na)^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, D_2O): δ 4.23 (d, J 8.0Hz, H-1)、4.45 (d, J 7.3Hz, H-1')、3.19 (dd, H-2)、1.57 (m, H- β)、1.33 (m, H- γ)、1.24 (m, H- $\delta \sim \lambda$)、0.85 (t, H- μ);

$^{13}\text{C-NMR}$ (270MHz, D_2O): 14.4 (C- μ)、23.7 (C- λ)、27.1 (C- γ)、30.5 (C- δ)、30.5 (C- ϵ)、30.6 (C- β)、30.8 (C- ζ)、30.8 (C- η)、30.8 (C- θ)、30.8 (C- τ)、33.1 (C- κ)、61.9 (C-6)、62.5 (C-6')、70.3 (C-4')、71.0 (C- α)、72.6 (C-2')、74.8 (C-3')、74.8 (C-2)、76.4 (C-3)、76.5 (C-5)、77.1 (C-5')、80.7 (C-4)、104.3 (C-1)、105.1 (C-1')。

30

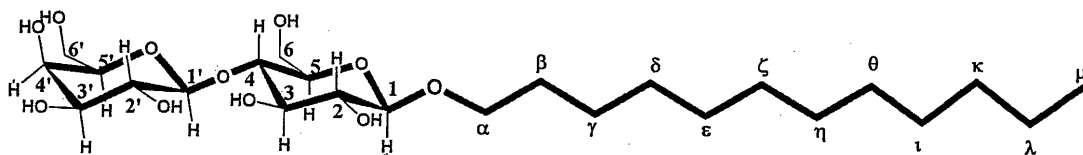
【0091】

以上より、生成物（7）は、以下の構造式（IV）で示されるドデシルラクトシド（7）であることが確認された。

【0092】

40

【化5】



(IV)

【0093】

50

7-4 マンノシルラクトシド (8)

また、マンノシルラクトシド (8) については、実施例 4 で得られた転移生成物のマンノシルラクトシドと T L C のスポットが一致した。

【0094】

(実施例 8)

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコール、糖類への N-アセチルラクトサミニル転移 (N-アセチルラクトサミンの縮合) 反応を行った。

【0095】

供与体として N-アセチルラクトサミン (L a c N A c) を用い、受容体としてメタノール、エタノール、プロパノール、マンノースを用いて、実施例 7 と同条件で反応を行った。図 9 に結果を示す。図中、S は反応液を、B はブランクをそれぞれ表す。各反応液とも複数のスポットが認められたが、L a c N A c の R f 値 = 0.24 に対して、矢印で示す、R f 値 = 0.36、0.40、0.45 (展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水 = 60 : 35 : 8) の新しいスポットにより、それぞれメチル N-アセチルラクトサミニド (1)、エチル N-アセチルラクトサミニド (2)、プロピル N-アセチルラクトサミニド (3) の生成が示唆された (図 9 (1) ~ (3))。

【0096】

また、L a c N A c の R f 値 = 0.58 に対して、R f 値 = 0.3 (展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10) の新しいスポットにより、マンノシル N-アセチルラクトサミニド (4) の生成が示唆された (図 9 (4))。

【0097】

8-1 エチル N-アセチルラクトサミニド (2) の構造確認

エチル N-アセチルラクトサミニド (2) を含むと思われる反応液を前出のシリカゲルカラム ($\phi 2 \times 40$ cm) にかき、溶離液として、クロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 を用い、流速 2.0 ml / 分で溶出した。5 ml / フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色 (485 nm) で検出した。フラクション No. 11 ~ 14 を回収し、凍結乾燥して反応生成物約 5 mg を得た。本品の純度は T L C、及び液体クロマトグラフィーにより 99% 以上であることを確認した。

【0098】

得られた乾燥物の一部を F A B / M A S にて、他方を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ にて分析した。結果を以下に示す。

【0099】

F A B / M A S : $(m/z) = 411$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} + \text{H}$) $^{+}$ 、 $(m/z) = 433$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} + \text{Na}$) $^{+}$;

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz、 D_2O) : δ 4.53 (d, J 5.6 Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.9 Hz, H-1'), 2.02 (s, COCH_3), 1.24 (t, H- β) ;

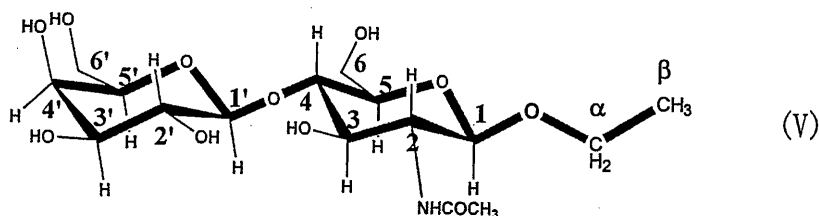
$^{13}\text{C-NMR}$ (270 MHz、 D_2O) : δ 17.1 (C- β)、24.9 (NHCOCH_3)、57.9 (C-2)、62.9 (C-6)、63.8 (C-6'), 69.1 (C-4'), 71.4 (C- α)、73.8 (C-2'), 74.9 (C-3'), 75.3 (C-3)、77.6 (C-5'), 78.2 (C-5)、81.3 (C-4)、103.4 (C-1)、105.7 (C-1')、177.6 (NHCOCH_3)。

【0100】

以上より、生成物は以下の構造式 (V) で示されるエチル N-アセチルラクトサミニドであることが確認された。

【0101】

【化 6】



【0102】

8-2 マンノシルN-アセチラクトサミニド(4)の構造確認

マンノシルN-アセチラクトサミニド(4)を含むと思われる反応物をクロマトグラフ用活性炭素(和光純薬製)を用いた活性炭カラム($\phi 2.5 \times 25 \text{ cm}$)にかけ、水/エタノール溶液のリニアグラジエント($0 \rightarrow 30\%$; 2 L)により、流速 1.5 ml/分 で溶出した。 15 ml/フラクション で分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色(485 nm)で検出した。フラクションNo. $80 \sim 102$ を回収し、凍結乾燥して反応生成物約 5 mg を得た。本品の純度はTLC、及び液体クロマトグラフィーにより 99% 以上であることを確認した。

【0103】

得られた乾燥物の一部をFAB/MASにて、他方を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ にて分析した。結果を以下に示す。

【0104】

FAB/MAS: $(m/z) = 546 \text{ (C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{H})^+$ 、 $(m/z) = 568 \text{ (C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{Na})^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz , CD_3OD): $\delta 5.16 \text{ (d, } J 1.6 \text{ Hz, H-1}\alpha)$ 、 $4.89 \text{ (s, H-1}\beta)$ 、 $4.58 \text{ (d, } J 8.3 \text{ Hz, H-1'}$)、 $4.47 \text{ (d, } J 7.6 \text{ Hz, H-1'')}$ 、 (dd, H-2) ;

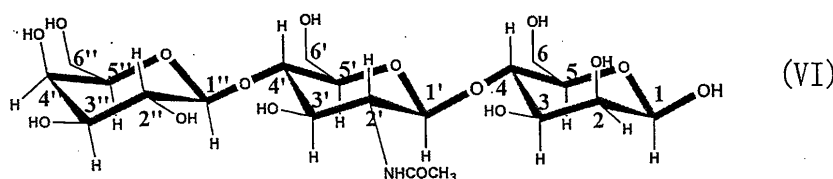
$^{13}\text{C-NMR}$ (270 MHz , D_2O): $24.9 \text{ (NHCOCH}_3)$ 、 58.0 (C-2') 、 63.2 (C-6') 、 $62.8 \text{ (C-6}\alpha)$ 、 $62.8 \text{ (C-6}\beta)$ 、 63.8 (C-6'') 、 71.4 (C-4'') 、 $71.8 \text{ (C-2}\alpha)$ 、 $73.0 \text{ (C-3}\alpha)$ 、 $73.5 \text{ (C-5}\alpha)$ 、 $73.5 \text{ (C-2}\beta)$ 、 73.8 (C-2'') 、 $74.6 \text{ (C-3}\beta)$ 、 74.9 (C-3'') 、 75.3 (C-3') 、 $77.5 \text{ (C-5}\beta)$ 、 77.6 (C-5'') 、 78.2 (C-5') 、 $79.8 \text{ (C-4}\beta)$ 、 $80.3 \text{ (C-4}\alpha)$ 、 81.1 (C-4') 、 $96.4 \text{ (C-1}\beta)$ 、 $96.5 \text{ (C-1}\alpha)$ 、 104.2 (C-1'') 、 105.7 (C-1'') 、 $177.6 \text{ (NHCOCH}_3)$ 。

【0105】

以上より、生成物は以下の構造式(VI)で示されるマンノシルN-アセチラクトサミニドであることが確認された。

【0106】

【化7】



【0107】

実施例7および8の結果は、 β -1,4グルコシド結合を切断する酵素の存在下、ラクトース及びN-アセチラクトサミン自体がアルコール性水酸基を有する化合物と縮合し、対応する配糖体が生成することを示している。

【0108】

(実施例9)

100mg/mlの酵素溶液5.6mlに1gのN-アセチルラクタサミン(LacNAc)、4.2mlのグリセロール、1.4mlの酢酸エチルを加え、酢酸カルシウムでpHを7.0に調整し、40℃で48時間反応を行った。

【0109】

反応液をアニリン酢酸処理し、LacNAcを除去した後、この反応液を前出のものと同じ担体を用いた活性炭カラム(φ5×50cm)にロードして、流速5ml/分で吸着物を溶出させた。展開溶媒として、水/メタノール溶液(リニアグラジエント、0→20%; 6L)を用いた。50ml/フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色(485nm)で検出した。フラクションNo. 115~125を回収し、凍結乾燥して反応生成物である乾燥物を約10mg得た。本品の純度はTLC、及び

10

【0110】

得られた乾燥物の一部をFAB/MASにて、他方を¹H-NMR、¹³C-NMRにて分析した。結果を以下に示す。

【0111】

FAB/MAS: (m/z) = 458 (C₁₇H₃₁NO₁₃+H)⁺、(m/z) = 607 (C₁₇H₃₁NO₁₃+Triethanolamine)⁺;

¹H-NMR (270MHz、D₂O): δ 4.55 (d, J 7.3Hz, H-1)、4.47 (d, J 6.8Hz, H-1')、2.04 (s, COCH₃);

¹³C-NMR (270MHz、D₂O): δ 25.0 (NHCOCH₃)、57.9 (C-2)、62.9 (C-6)、63.9 (C-6')、65.2 (C-γ)、71.4 (C-4')、73.1 (C-β)、73.5 (C-α)、73.8 (C-2')、75.2 (C-3')、75.4 (C-3)、77.6 (C-5')、78.2 (C-5)、81.3 (C-4)、104.2 (C-1)、105.7 (C-1')、177.6 (NHCOCH₃)。

20

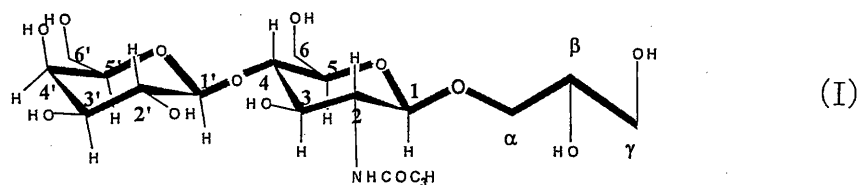
【0112】

以上より、生成物は以下の構造式(I)で示される、O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-O-β-D-2-Acetyl amino-2-deoxyyl-Glucopyranosyl-(1→1)-Glycerolであることが判明した。

30

【0113】

【化8】



【0114】

得られた化合物は、従来報告された化合物とは、ガラクトースとN-アセチルグルコサミンの結合様式並びにN-アセチルグルコサミンとグリセロールの結合様式において異なる新規物質である。

40

【0115】

本発明において、グリセロールにN-アセチルラクタサミンが付加した新規配糖体が得られたことにより、従来のグリセロールをアグリコンとする配糖体が呈する公知の物性、及び生理学的機能は勿論のこと、全く新規の機能が期待でき、グリセロ糖脂質等の有用物質の新たな骨格(原料)物質としても活用できる。

【0116】

【発明の効果】

本発明により、食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖

50

体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体が、温和な条件で、しかも高収率で大量に製造され、安価に供給することが可能となる。また、本発明によるラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体は、医学、生化学の研究に貢献するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Lac-pNPのラクトシル基の脂肪族アルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図2】 エチルラクトシドの ^1H -NMRである。

【図3】 エチルラクトシドの質量分析スペクトルである。

【図4】 Lac-pNPのラクトシル基の、アミノ酸への転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

10

【図5】 Lac-pNPのラクトシル基の、単糖への転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図6】 Lac-pNPのラクトシル基の、L-メントールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図7】 LacNAc-pNPのN-アセチルラクトサミニル基の、脂肪族アルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

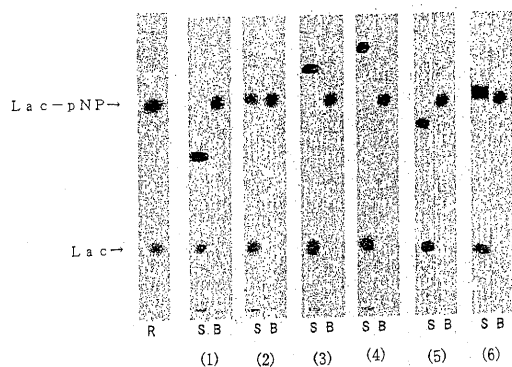
【図8】 ラクトースと脂肪族アルコールまたは単糖との縮合反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図9】 N-アセチルラクトサミンと脂肪族アルコールまたは単糖との縮合反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

20

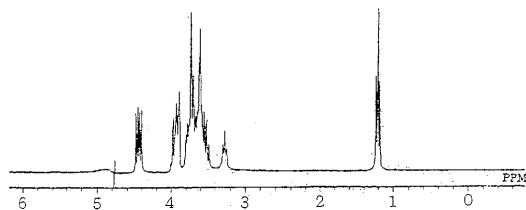
【図1】

第1図



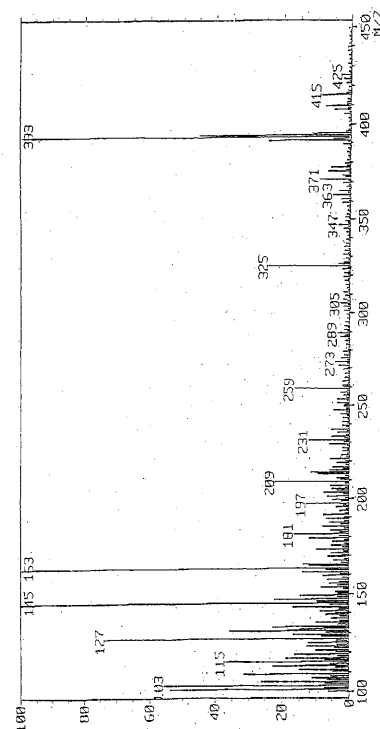
【図2】

第2図



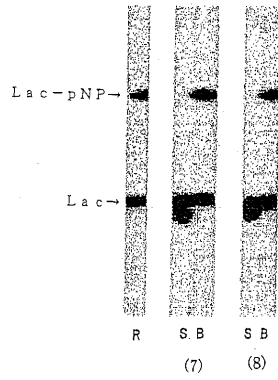
【図3】

第3図



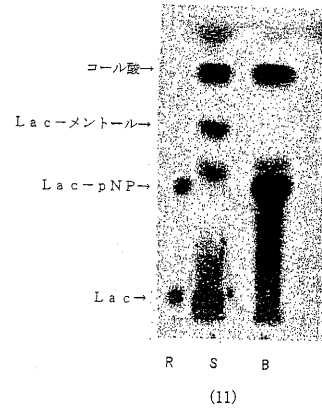
【図 4】

第4図



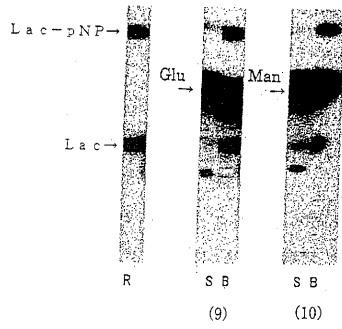
【図 6】

第6図



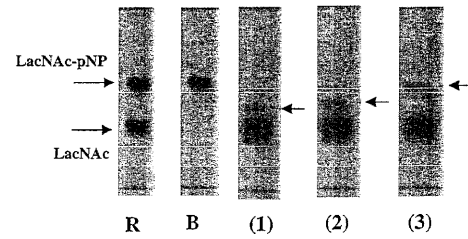
【図 5】

第5図



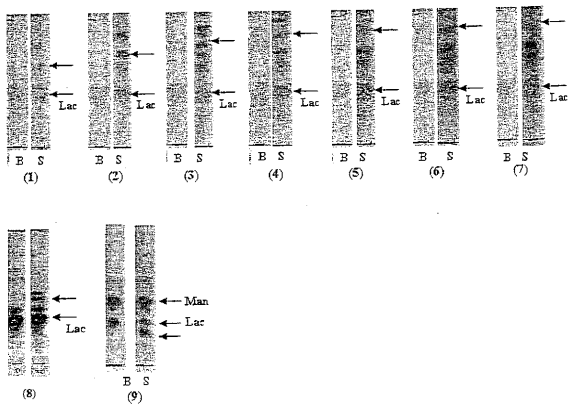
【図 7】

第7図



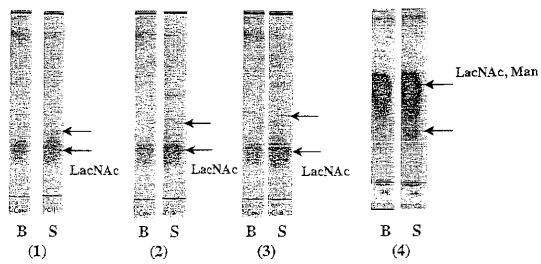
【図 8】

第8図



【図 9】

第9図



フロントページの続き

- (72)発明者 村田 健臣
日本国静岡県静岡市小鹿3丁目3番2-10-15号
- (72)発明者 戸谷 一英
日本国静岡県静岡市小鹿913-3 208号

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開昭59-082096 (JP, A)
特開平10-066595 (JP, A)
特開平03-277276 (JP, A)
特開平02-069192 (JP, A)
Carbohydr. Res., Vol. 319, No. 1-4 (1999. Jun.) p. 29-37
Biotechnol. Lett., Vol. 18, No. 7 (1996) p. 791-794

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
CA/REGISTRY(STN)
BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)