

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/182470

発行日 平成29年6月1日 (2017.6.1)

(43) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015.12.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	2 B 1 5 O
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G 4 B 0 1 8
A 6 1 K 35/744 (2015.01)	A 6 1 K 35/744	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 7 6
A 2 3 L 33/195 (2016.01)	A 2 3 L 33/195	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2016-523447 (P2016-523447)	(71) 出願人	000000055
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/064573		アサヒグループホールディングス株式会社
(22) 国際出願日	平成27年5月21日 (2015.5.21)		東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号
(31) 優先権主張番号	特願2014-111681 (P2014-111681)	(71) 出願人	503359821
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014.5.29)		国立研究開発法人理化学研究所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		埼玉県和光市広沢2番1号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 腸管における物質取り込み促進剤

(57) 【要約】

本発明は、乳酸菌などの腸管免疫誘導に有用な物質を効率的に腸管内に取り込むことのできる手段を提供することを課題とする。

本発明によれば、ラクトバチルス属乳酸菌に共通するペプチドモチーフを含む表層蛋白質(S-layer protein)を含む、腸管における物質取り込み促進剤、該取り込み促進剤と腸管取り込み対象物質との複合体、該複合体を含む飲食品または医薬品、ならびに被検乳酸菌の菌体表層におけるS-layer proteinの発現量を測定することを含む、腸管内移行能が高い乳酸菌のスクリーニング方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式 (I) ~ (VI) に示すアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも 1 種を含み、かつウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質又はその断片を含有する、腸管における物質取り込み促進剤。

式 (I) : Asn-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Lys-Tyr-Asp-Val-Asp-Val-Thr-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-X1-Ala (式 (I) 中、X1 は Val または Ile を表す)

式 (II) : Gly-X2-Leu-Thr-Gly-X3-Ile-Ser-Ala-Ser-Tyr-Asn-Gly-Lys-X4-Tyr-Thr-Ala Asn-Leu (式 (II) 中、X2 は Asn または Ser を表し、X3 は Thr または Ser を表し、X4 は Thr または Ser を表す)

10

式 (III) : Tyr-Thr-Val-Thr-Val-X5-Asp-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Gly-Ser-Glu-Asn-Ala-Gly-Lys (式 (III) 中、X5 は Asn または Pro を表す)

式 (IV) : Val-Val-Ala-Ala-Ile-X6-Ser-Lys-Tyr-Phe-Ala-Ala-Gln-Tyr-Ala (式 (IV) 中、X6 は Asn または Thr を表す)

式 (V) : His-Thr-Phe-Thr-Val-Asn-Val-Lys-Ala-Thr-Ser-Asn-X7-Asn-X8-Lys-Ser-Ala Thr-Leu-Pro-Val (式 (V) 中、X7 は Thr または Val を表し、X8 は Gly または Ser を表す)

式 (VI) : Val-Thr-Val-Pro-Asn-Val-Ala-Glu-Pro-Thr-Val-X9-Ser-Val-Ser-Lys (式 (VI) 中、X9 は Ala または Pro を表す)

【請求項 2】

前記式 (I) ~ (VI) で示されるアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも 1 種を含み、かつウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質を含有する、請求項 1 に記載の腸管における物質取り込み促進剤。

20

【請求項 3】

前記表層蛋白質が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*Lactobacillus amylovorus*)、またはラクトバチルス・ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*) 由来の S-layer protein である、請求項 1 または 2 に記載の腸管における物質取り込み促進剤。

【請求項 4】

前記表層蛋白質がラクトバチルス・アシドフィルス由来の SlpA 蛋白質である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の腸管における物質取り込み促進剤。

30

【請求項 5】

前記ラクトバチルス・アシドフィルス由来の SlpA 蛋白質が以下の (a) ~ (c) のいずれかの蛋白質である、請求項 4 に記載の腸管における物質取り込み促進剤。

(a) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列と 90 % 以上の配列同一性を有する蛋白質

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の腸管における物質取り込み促進剤と腸管取り込み対象物質との複合体。

40

【請求項 7】

前記腸管取り込み対象物質が食品成分である、請求項 6 に記載の複合体。

【請求項 8】

前記食品成分が乳酸菌である、請求項 7 に記載の複合体。

【請求項 9】

前記腸管取り込み対象物質が医薬品成分である、請求項 6 に記載の複合体。

【請求項 10】

前記医薬品成分が粘膜ワクチン抗原である、請求項 9 に記載の複合体。

50

【請求項 1 1】

請求項 6～10 のいずれかに記載の複合体を含む組成物。

【請求項 1 2】

飲食品、医薬品または動物用飼料である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

被検乳酸菌の菌体表層における、下記式(I)～(VI)で示されるアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも 1 種を含む蛋白質の発現量を測定することを含む、腸管内移行能が高い乳酸菌のスクリーニング方法。

式(I)：Asn-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Lys-Tyr-Asp-Val-Asp-Val-Thr-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-X1-Ala (式(I)中、X1はValまたはIleを表す)

式(II)：Gly-X2-Leu-Thr-Gly-X3-Ile-Ser-Ala-Ser-Tyr-Asn-Gly-Lys-X4-Tyr-Thr-Ala Asn-Leu (式(II)中、X2はAsnまたはSerを表し、X3はThrまたはSerを表し、X4はThrまたはSerを表す)

式(III)：Tyr-Thr-Val-Thr-Val-X5-Asp-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Gly-Ser-Glu-Asn-Ala- Gly-Lys (式(III)中、X5はAsnまたはProを表す)

式(IV)：Val-Val-Ala-Ala-Ile-X6-Ser-Lys-Tyr-Phe-Ala-Ala-Gln-Tyr-Ala(式(IV)中、X6はAsnまたはThrを表す)

式(V)：His-Thr-Phe-Thr-Val-Asn-Val-Lys-Ala-Thr-Ser-Asn-X7-Asn-X8-Lys-Ser-Ala Thr-Leu-Pro-Val (式(V)中、X7はThrまたはValを表し、X8はGlyまたはSerを表す)

式(VI)：Val-Thr-Val-Pro-Asn-Val-Ala-Glu-Pro-Thr-Val-X9-Ser-Val-Ser-Lys (式(VI)中、X9はAlaまたはProを表す)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌由来の表層タンパク質を含有する、腸管における物質取り込み促進剤に関する。

【背景技術】

【0002】

外界からの異物の侵入に対する防御システムとして免疫系が存在している。その中でも腸管免疫系は最も大きな免疫系であり、免疫系全体の60%の免疫細胞や抗体から構成されている。腸管には、パイエル板(Payer's Patch; PP)、粘膜固有層(Lamina Propria, LP)、粘膜固有層リンパ球(Lamina Propria Lymphocytes, LPL)、腸管上皮間細胞リンパ球(Intraepithelial Lymphocytes, IEL)、腸管上皮細胞(Intestinal Epithelial Cell, IEC)、クリプトパッチ(Cryptopatch, CP)などで構成される腸管関連リンパ組織(gut-associated lymphoid tissue, GALT)が存在し、腸管は体内最大の免疫器官となっている。なかでもパイエル板の管腔側を覆う濾胞上皮細胞(Follicle Associated Epithelium, FAE)に存在するM細胞(Microfold cell)は、病原微生物を含む抗原取り込みに特化した細胞であり、樹状細胞などの各種免疫担当細胞に抗原を受け渡すことで、その後の免疫応答が誘導される。そのため、抗原取り込みの門戸であるM細胞を標的にすれば、効率良く免疫細胞に働きかけることが期待される。

【0003】

これまで、M細胞への効果的な抗原送達のために、Yersinia菌由来のinvasinやReovirusのσ1 proteinなどのように病原体がM細胞に侵入する際に働くリガンドを用いる方法が提案されている(非特許文献1～3)。しかしながら、病原体のような食経験のない材料由来の成分は安全性に不安が残り、体内へ取り込ませるには不適切であるという問題がある。そのため、食経験が豊富で安全性の高い材料由来の成分を用いたM細胞をターゲットとしたデリバリーシステムが望まれている。

【0004】

一方、乳酸菌は腸内環境を整えたり、腸管免疫系に働きかけたりする機能を有する微生物菌体(プロバイオティクス)であり、乳酸菌飲料やヨーグルトなどの日常的に摂取する

10

20

30

40

50

食品の機能性成分として利用されている。プロバイオティクス乳酸菌もまた、パイエル板上のM細胞により腸管内に取り込まれ、M細胞の下部（パイエル板内）に存在する樹状細胞に存在するToll様受容体(TLR)やNod様受容体(NLR)に作用することによって、T細胞の活性化、腸管上皮細胞の増殖、IgA産生の促進、炎症の抑制など様々な免疫応答が起こることが推察されている。従って、プロバイオティクス乳酸菌の利用においてもその腸管への効率的な取り込み手段の確立が必須となる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hussan N., Florence A.T., Pharm. Res., 15, 153-156 (1998)

10

【非特許文献2】Wu Y., Wang X., Csencsits K.L., Haddad A., Walters N., Pascual D.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 9318-9323 (2001)

【非特許文献3】Wang X., Hone D.M., Haddad A., Shata M.T., Pascual D.W., J. immunol., 171, 4717-4725 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明は、乳酸菌などの腸管免疫誘導に有用な物質を効率的に腸管内に取り込むことのできる手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

本発明者らは上記課題を解決すべき鋭意研究を重ねた結果、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) L-92株の表層蛋白質 (SlpA蛋白質) が、M細胞に発現しているウロモジュリン蛋白質 (Umod) への当該乳酸菌株の結合とM細胞からの取り込み促進に関与することを見出した。また、SlpA蛋白質を結合させた蛍光ビーズのパイエル板内への取り込み量を調べた結果、有意にその取り込み量が増加することを確認し、SlpA蛋白質は腸管への新規なデリバリー分子として用いることができるという知見を得た。さらに、乳酸菌の菌体表層におけるSlpA蛋白質のアミノ酸配列に存在するラクトバチルス属乳酸菌に共通するペプチドモチーフを有する蛋白質の発現の有無を指標とすれば、腸管への取り込みに優れた乳酸菌を *in vitro* で簡易にスクリーニングできるという知見も得た。本発明はかかる知見により完成されたものである。

30

【0008】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 下記の式(I)～(VI)に示すアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも1種を含み、かつウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質又はその断片を含有する、腸管における物質取り込み促進剤。

式(I)：Asn-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Lys-Tyr-Asp-Val-Asp-Val-Thr-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-X1-Ala (式(I)中、X1はValまたはIleを表す)

式(II)：Gly-X2-Leu-Thr-Gly-X3-Ile-Ser-Ala-Ser-Tyr-Asn-Gly-Lys-X4-Tyr-Thr-Ala Asn-Leu (式(II)中、X2はAsnまたはSerを表し、X3はThrまたはSerを表し、X4はThrまたはSerを表す)

40

式(III)：Tyr-Thr-Val-Thr-Val-X5-Asp-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Gly-Ser-Glu-Asn-Ala-Gly-Lys (式(III)中、X5はAsnまたはProを表す)

式(IV)：Val-Val-Ala-Ala-Ile-X6-Ser-Lys-Tyr-Phe-Ala-Ala-Gln-Tyr-Ala (式(IV)中、X6はAsnまたはThrを表す)

式(V)：His-Thr-Phe-Thr-Val-Asn-Val-Lys-Ala-Thr-Ser-Asn-X7-Asn-X8-Lys-Ser-Ala Thr-Leu-Pro-Val (式(V)中、X7はThrまたはValを表し、X8はGlyまたはSerを表す)

式(VI)：Val-Thr-Val-Pro-Asn-Val-Ala-Glu-Pro-Thr-Val-X9-Ser-Val-Ser-Lys (式(VI)中、X9はAlaまたはProを表す)

(2) 前記式(I)～(VI)で示されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、

50

置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも1種を含み、かつウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質を含有する、(1)に記載腸管における物質取り込み促進剤。

(3) 前記表層蛋白質が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*Lactobacillus amylovorus*)、またはラクトバチルス・ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*) 由来のS-layer proteinである、(1)または(2)に記載の腸管における物質取り込み促進剤。

(4) 前記表層蛋白質がラクトバチルス・アシドフィルス由来のSlpA蛋白質である、(1)～(3)のいずれかに記載の腸管における物質取り込み促進剤。

(5) 前記ラクトバチルス・アシドフィルス由来のSlpA蛋白質が以下の(a)～(c)のいずれかの蛋白質である、(4)に記載の腸管における物質取り込み促進剤。

(a) 配列番号7に示すアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号7に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) 配列番号7に示すアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する蛋白質

(6) (1)～(5)のいずれかに記載の腸管における物質取り込み促進剤と腸管取り込み対象物質との複合体。

(7) 前記腸管取り込み対象物質が食品成分である、(6)に記載の複合体。

(8) 前記食品成分が乳酸菌である、(7)に記載の複合体。

(9) 前記腸管取り込み対象物質が医薬品成分である、(6)に記載の複合体。

(10) 前記医薬品成分が粘膜ワクチン抗原である、(9)に記載の複合体。

(11) (6)～(10)のいずれかに記載の複合体を含む組成物。

(12) 飲食品、医薬品または動物用飼料である、(11)に記載の組成物。

(13) 被検乳酸菌の菌体表層における、下記式(I)～(VI)で示されるアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも1種を含む蛋白質の発現量を測定することを含む、腸管内移行能が高い乳酸菌のスクリーニング方法。

式(I)：Asn-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Lys-Tyr-Asp-Val-Asp-Val-Thr-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-X1-Ala (式(I)中、X1はValまたはIleを表す)

式(II)：Gly-X2-Leu-Thr-Gly-X3-Ile-Ser-Ala-Ser-Tyr-Asn-Gly-Lys-X4-Tyr-Thr-Ala-Asn-Leu (式(II)中、X2はAsnまたはSerを表し、X3はThrまたはSerを表し、X4はThrまたはSerを表す)

式(III)：Tyr-Thr-Val-Thr-Val-X5-Asp-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Gly-Ser-Glu-Asn-Ala-Gly-Lys (式(III)中、X5はAsnまたはProを表す)

式(IV)：Val-Val-Ala-Ala-Ile-X6-Ser-Lys-Tyr-Phe-Ala-Ala-Gln-Tyr-Ala (式(IV)中、X6はAsnまたはThrを表す)

式(V)：His-Thr-Phe-Thr-Val-Asn-Val-Lys-Ala-Thr-Ser-Asn-X7-Asn-X8-Lys-Ser-Ala-Thr-Leu-Pro-Val (式(V)中、X7はThrまたはValを表し、X8はGlyまたはSerを表す)

式(VI)：Val-Thr-Val-Pro-Asn-Val-Ala-Glu-Pro-Thr-Val-X9-Ser-Val-Ser-Lys (式(VI)中、X9はAlaまたはProを表す)

【0009】

本願は、2014年5月29日に出願された日本国特許出願2014-111681号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0010】

本発明の腸管における物質取り込み促進剤の有効成分である乳酸菌由来の表層蛋白質 (S-layer protein) は、腸管M細胞への結合活性および腸管M細胞からの物質取り込み促進活性を有する。従って、本発明の腸管における物質取り込み促進剤は、有用乳酸菌や粘膜ワクチン抗原などの腸管取り込み量を増加させることができ、その結果、効果的かつ確実に腸管免疫へと働きかけることで、アレルギー症状の抑制やインフルエンザなどの粘膜感染

10

20

30

40

50

症防御が可能となる。また、本発明の腸管における物質取り込み促進剤は、乳酸菌由来の蛋白質を有効成分とするので、安全性が高い。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、被検乳酸菌株(L-92株、CP23株、LiCl-L92株)の免疫染色結果を示す(白く見える部分が染色されたSlpA)。

【図2】図2は、被検乳酸菌株(L-92株、CP23株、LiCl-L92株)のUmod結合率を示す[Dunnett t-Test, L-92株(n=9), CP23株(n=12), LiCl-L92株(n=12), **: p<0.01]。

【図3】図3は、被検乳酸菌株(L-92株、抗SlpA抗体処理したL-92株)のUmod結合率を示す[Student t-Test (n=9), #: p<0.1]。

【図4】図4は、被検乳酸菌株(L-92株、CP23株、LiCl-L92株)のM細胞への取り込み量を示す[Mann-Whitney U test, L-92株 vs CP23株(n=3), L-92株 vs LiCl-L92株 (n=4), *: p<0.05, **: p<0.01]。

【図5】図5は、蛍光ビーズ(SlpA結合、BSA結合)のM細胞への取り込み量を示す[Student t-Test (n=4), *: p<0.05]。

【図6】図6は、ラクトバチルス・アシドフィルス(L.acidophilus)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(L.helveticus)、ラクトバチルス・ガセリ(L.gasseri)のS-layer proteinのマルチプルアライメント解析結果を示す(モチーフ1~6: Umod結合性の高いラクトバチルス・アシドフィルス(L.acidophilus)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(L.helveticus)が共通して保有し、逆にUmod結合性が低いラクトバチルス・ガセリ(L.gasseri)が保有しないペプチドモチーフ)。

【図7】図7は、マルチプルアライメント解析により決定されたウロモジュリン(Umod)蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質(S-layer protein)に共通するペプチドモチーフの構造式(I)~(VI)を示す。

【図8】図8は、ウロモジュリン(Umod)蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質(S-layer protein)に共通するペプチドモチーフのアミノ酸配列に対応する部分のラクトバチルス・アシドフィルス(L.acidophilus)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(L.helveticus)、ラクトバチルス・クリスパタス(L.crispatus)、ラクトバチルス・アミロボラス(L.amylovorus)、ラクトバチルス・ガリナルム(L.gallinarum)のアミノ酸配列を示す(式(I)~(VI)のアミノ酸配列の上の数字が1: L.acidophilus、L.helveticus、L.crispatus、L.amylovorus、L.gallinarumの5菌種に共通するアミノ酸、当該数字が2: L.acidophilus、L.helveticus、L.crispatusの3菌種に共通するアミノ酸、当該数字が3: L.acidophilus、L.helveticusの2菌種に共通するアミノ酸を意味する)。

【発明を実施するための形態】

【0012】

1. 腸管における物質取り込み促進剤

本発明の腸管における物質取り込み促進剤は、下記式(I)~(VI)で示されるアミノ酸配列からなるペプチドモチーフの少なくとも1種を含み、かつウロモジュリン(Umod)蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質(以下、本表層蛋白質を「S-layer protein」と称する)又はその断片を含有する。

式(I): Asn-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Lys-Tyr-Asp-Val-Asp-Val-Thr-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-X1-Ala (式(I)中、X1はValまたはIleを表す) (配列番号1)

式(II): Gly-X2-Leu-Thr-Gly-X3-Ile-Ser-Ala-Ser-Tyr-Asn-Gly-Lys-X4-Tyr-Thr-Ala Asn-Leu (式(II)中、X2はAsnまたはSerを表し、X3はThrまたはSerを表し、X4はThrまたはSerを表す) (配列番号2)

式(III): Tyr-Thr-Val-Thr-Val-X5-Asp-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Gly-Ser-Glu-Asn-Ala-Gly-Lys (式(III)中、X5はAsnまたはProを表す) (配列番号3)

式(IV): Val-Val-Ala-Ala-Ile-X6-Ser-Lys-Tyr-Phe-Ala-Ala-Gln-Tyr-Ala (式(IV)中、X6はAsnまたはThrを表す) (配列番号4)

式(V) : His-Thr-Phe-Thr-Val-Asn-Val-Lys-Ala-Thr-Ser-Asn-X7-Asn-X8-Lys-Ser-Ala Thr-Leu-Pro-Val (式(V)中、X7はThrまたはValを表し、X8はGlyまたはSerを表す) (配列番号5)

式(VI) : Val-Thr-Val-Pro-Asn-Val-Ala-Glu-Pro-Thr-Val-X9-Ser-Val-Ser-Lys (式(VI)中、X9はAlaまたはProを表す) (配列番号6)

【0013】

また、S-layer proteinに含まれるペプチドモチーフは、ウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対する結合活性を有する限り変異を有していてもよく、例えば、前記式(I)~(VI)で示されるアミノ酸配列において、1~10個、好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個、もっとも好ましくは1~3個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されていてもよい。ここで、アミノ酸の置換としては、保存的アミノ酸置換が好ましく、保存的アミノ酸置換は、例えば構造的、電気的、極性もしくは疎水性などの性質が類似したアミノ酸間の置換を意味する。このような性質は、例えばアミノ酸側鎖の類似性で分類することも可能である。例えば、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (セリン、トレオニン、チロシン)、アミド含有側鎖を有するアミノ酸 (アスパラギン、グルタミン) を挙げることができる。

【0014】

本発明において用いるS-layer proteinとしては、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*Lactobacillus amylovorus*)、またはラクトバチルス・ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*) 由来のS-layer proteinが好ましい。

【0015】

なかでもラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) L-92株の表層に存在するS-layer protein A (以下、「SlpA蛋白質」という) がより好ましい。SlpA蛋白質は、分子量43.6kDa、等電点が10.4の蛋白質で、これまで防御、細胞の形質維持、分子やイオン吸着や接着などの機能を有することが知られている (FEMS Microbiol. Rev. 29:511-529)。

【0016】

本発明は、これまで知られていないSlpA蛋白質の機能である、小腸パイエル板の上皮細胞層に存在するM細胞に発現している蛋白質の一つであるウロモジュリン (Umod) 蛋白質 (以下、単に「Umod」という記載する場合がある) への結合活性およびM細胞からの物質取り込み促進活性を利用するものである。これまで乳酸菌の表層蛋白質の物質結合性については、*Lactobacillus acidophilus* (NCFM) のSlpAがC型レクチンであるDC-SIGNに結合すること (Konstantinov SR et al., S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 9;105(49):19474-9)、*Lactobacillus crispatus* (JCM 5810) のS-layer proteinであるCbsAがタイプI型、V型コラーゲンに結合すること (Sillanpaa J et al., Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. J Bacteriol. 2000 Nov;182(22):6440-50) について報告があるが、腸管M細胞上の蛋白質に結合するという報告はない。

【0017】

SlpA蛋白質は、配列番号7に示すアミノ酸配列からなる蛋白質であるが、SlpA蛋白質が有するUmodへの結合活性およびM細胞からの物質取り込み促進活性を有する限り、その変異蛋白質であってもよく、上記アミノ酸配列の部分配列を有する蛋白質 (部分ペプチド) であってもよい。

【0018】

変異蛋白質としては、例えば、配列番号7に示すアミノ酸配列において、1から数個の

10

20

30

40

50

アミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質が挙げられる。ここで、「1から数個」の範囲は、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異蛋白質作製法により欠失、置換、若しくは付加できる程度の数をいい、前記の活性を保持する限り、その個数は制限されないが、1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個をいう。ここで、アミノ酸置換としては、前述の保存的アミノ酸置換が挙げられる。また、変異蛋白質としては、配列番号7に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質であってもよい。ここで、「90%以上の同一性」とは、好ましくは95%以上、より97%以上、最も好ましくは98%以上の配列の同一性をいう。アミノ酸配列の同一性は、FASTA検索やBLAST検索により決定することができる。また、ここにいう「変異」は、主には公知の変異蛋白質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異であってもよい。

10

【0019】

本発明に用いるSlpA蛋白質は、配列番号7に示すアミノ酸配列に基づいて化学合成する方法によって作成してもよく、また、遺伝子組換え技術により作成してもよい。遺伝子組換え技術による場合は、例えば、配列番号7に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む発現ベクターを作成し、この発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換することにより形質転換体を得、この形質転換体を培養し、その培養物から目的のタンパク質を大量生産することができる。発現ベクターの作製及び宿主細胞への導入は、公知の方法に従って行うことができる。

【0020】

宿主細胞には、原核生物及び真核生物のいずれの細胞も用いることができる。例えば、原核生物の宿主細胞として一般的に用いられるものとしては、大腸菌や枯草菌等が挙げられる。また真核生物の細胞としては、例えば、酵母細胞等を挙げることができる。

20

【0021】

宿主細胞への発現ベクターの導入は、公知の方法で行うことができ、たとえば、リン酸カルシウム法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等が挙げられる。

【0022】

形質転換細胞で発現させた蛋白質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー法や、これらと塩析、限外ろ過、ゲルろ過、透析、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、遠心分離、超音波処理、酵素消化等を組み合わせた方法が挙げられる。

30

【0023】

本発明のウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有するラクトバチルス属の乳酸菌の表層蛋白質の断片とは、上記で定義した「S-layer protein」の断片であって、ウロモジュリン (Umod) 蛋白質に対して結合活性を有している限りその長さには限定はないが、例えば、S-layer proteinを構成するアミノ酸配列の少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有する断片が挙げられる。

40

【0024】

2. 腸管における物質取り込み促進剤と腸管取り込み対象物質との複合体

本発明の腸管における物質取り込み促進剤は、腸管取り込み対象物質（以下、「対象物質」という）との複合体を形成させることにより、該対象物質を腸管内に効率的に取り込ませることができる。対象物質としては、腸管から取り込まれた場合に生体内で活性を示す物質であればよく、例えば、食品成分や医薬品成分などが挙げられる。特に、腸管免疫誘導効果を有する食品成分や医薬品成分が好ましく、例えば、乳酸菌や粘膜ワクチン抗原などが挙げられる。

【0025】

50

乳酸菌は、生菌であっても死菌であっても良い。また、死菌の場合は破碎されたものでもよい。菌体の破碎は、当技術分野で公知の方法及び機器を使用して、例えば物理的破碎、酵素溶解処理等によって行うことができる。物理的破碎は、湿式（菌体懸濁液の状態での処理）又は乾式（菌体粉末の状態での処理）のいずれで行ってもよく、ホモゲナイザー、ボールミル、ビーズミル、ダイノミル、遊星ミル等を使用した攪拌により、ジェットミル、フレンチプレス、細胞破碎機等を使用した圧力により、或いは、フィルター濾過により行うことができる。酵素溶解処理は、例えばリゾチームなどの酵素を用いて菌体の細胞壁を破壊することができる。

【0026】

本発明の複合体において、腸管における物質取り込み促進剤は対象物質に共有結合または非共有結合した状態であればよく、結合手段としては特に限定はされない。

10

【0027】

例えば、対象物質がS-layer proteinをその菌体表層に有さない乳酸菌の場合、上記腸管における物質取り込み促進剤を直接又は適当な架橋剤（リンカー）を介して該乳酸菌菌体の表層に結合させることにより複合体を形成させることができる。複合体の形成方法としては、例えば、取り込み対象となる乳酸菌菌体の表層に存在する蛋白質（糖鎖受容体蛋白質など）のアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、好ましくはアミノ基を標的とし、これらの基と結合できる反応性官能基をもつ蛋白質架橋剤を用いる方法が挙げられる。蛋白質架橋剤は、グルタルアルデヒド、EDAC（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide, hydrochloride）、DSP（Dithiobis(succinimidyl propionate)）、DCC（N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide）などの市販品を利用すればよい。

20

【0028】

あるいは、乳酸菌菌体の細胞壁への非共有結合に関与するアンカーモチーフ（例えばCWB Dモチーフ、LysMモチーフ、GWモチーフ）とS-layer proteinとを連結させることにより乳酸菌菌体の表層にS-layer proteinを固定化させる方法、または乳酸菌菌体の細胞壁への共有結合に関与するアンカーモチーフ（例えばLPXTGモチーフ）をS-layer proteinと連結させて強制発現させる方法、乳酸菌菌体の表層に局在するいずれかのタンパク質とS-layer proteinを蛋白質架橋化酵素（トランスグルタミナーゼ）を用いてペプチド結合させる方法なども用いることができる。

【0029】

また、対象物質が粘膜ワクチン抗原である場合は、上記腸管における物質取り込み促進剤を直接又は適当なキャリアを介して粘膜ワクチン抗原に結合させることにより複合体を形成することができる。具体的には、取り込み対象となる粘膜ワクチン抗原とS-layer proteinとの融合蛋白質を作成する方法、粘膜ワクチン抗原を封入したキャリアに反応基を導入してS-layer proteinを結合させる方法などを用いることができる。キャリアとしては、例えば、リポソーム、マイクロスフェアまたはナノスフェア、PLGA（ポリ乳酸・グリコール酸）等の生分解性キャリア、ヒアルロン酸やキチン等からなる粘膜付着性キャリア等が挙げられる。

30

【0030】

S-layer proteinと粘膜ワクチン抗原との融合タンパク質は、公知の遺伝子組換え技術により製造することができる。例えば、S-layer proteinをコードする遺伝子と粘膜ワクチン抗原タンパク質をコードする遺伝子とを人工的に連結した融合遺伝子を作製し、当該融合遺伝子を、発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、適当な宿主細胞に導入して発現させることにより取得することができる。融合タンパク質において、S-layer proteinと粘膜ワクチン抗原との結合順序は限定されない。また、粘膜ワクチン抗原タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列情報は、公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。また、公知の方法を用いて目的遺伝子をクローニングし、塩基配列解析を行うことで塩基配列情報を取得することができる。

40

【0031】

また、上記キャリアとして例えばリポソームを用いる場合、そのリポソームの脂質組成

50

やサイズ、およびS-layer proteinの結合方法は特に限定されない。リボソーム作製には、ホスファチジルコリン、コレステロール、ポリエチレングリコール結合脂質などに加え、S-layer protein結合用に脂質末端カルボキシル基もしくはマレイミド基を有する脂質を使用する。リボソーム内への抗原の封入は公知の凍結融解法、逆相蒸発法、水和法などにより行うことができる。作製した抗原内封リボソームにS-layer proteinを加え、ペプチド縮合反応もしくはSH基反応系によりリボソームとS-layer proteinとの結合体を作製することができる。

【0032】

3. 腸管における物質取り込み促進剤と腸管取り込み対象物質との複合体を含む組成物

上記の複合体は、適当な添加物とともに飲食品、医薬品や動物用飼料などの組成物に配合することができる。ここで、医薬品には、ヒト用医薬品のみならず、動物用医薬品をも包含するものとする。また、動物用飼料には、家畜（ブタ、ウシ等）用の飼料、愛玩動物（犬、猫等）用のペットフードをも包含するものとする。

【0033】

腸管取り込み対象物質が乳酸菌である複合体は、飲食品に配合できる。本発明において、飲食品とは、健康食品、機能性食品、栄養補助食品、または特定保健用食品を含む意味で用いられる。飲食品の種類としては、例えば、ヨーグルトやチーズ、乳酸菌入り飲料などの乳製品、漬物などが最適である。飲食品の形態は、食用に適した形態、例えば、固形状、液状、顆粒状、粒状、粉末状、カプセル（硬カプセル、軟カプセル）状、クリーム状、ペースト状のいずれであってもよい。特に、健康食品および機能性食品に適した形状として、タブレット状、カプセル状、顆粒状、粉末状が例示できる。例えば、タブレット状の健康食品の製造は、上記のような手法にて本発明の腸管における物質取り込み促進剤を結合させた乳酸菌を配合した処方物を一定の形状に圧縮するか、または水もしくはアルコールのような溶媒で湿潤させた練合物を一定の形状にするか、あるいは、一定の型に流し込んで成型することにより行なうことができる。

【0034】

腸管取り込み対象物質が粘膜ワクチン抗原である複合体は、医薬品、特に、粘膜ワクチン製剤に配合することができる。この場合、免疫反応を増強するためのアジュバントと一緒に配合してもよい。アジュバンドとしては、例えば、水酸化アルミニウム、BCG、リン酸アルミニウム、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、デキストラン、TLRリガンド（例、リポ多糖（LPS）、CpG）が挙げられる。

【0035】

粘膜ワクチン抗原は、粘膜免疫応答を誘導しうる限り特に限定されないが、典型的には、粘膜感染症の病原体由来の抗原である。粘膜感染症の病原体はウイルスであってもよく細菌であってもよい。ウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、重症急性呼吸器感染症候群（SARS）ウイルス等が挙げられるが、これらに限定はされない。また、細菌としては、例えば、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎球菌、結核菌等が挙げられるが、これらに限定はされない。これらの病原体由来の抗原は、天然物由来であってもよいし、遺伝子組換え等の手法により人為的に作製されたものであってもよい。

【0036】

また、上記ワクチン抗原には、減感作療法に用いるアレルゲンも含まれる。アレルゲンワクチンとは、生体にアレルゲンを投与することにより、アレルゲンに対するIgG抗体を生産させてアレルギーの原因となるIgEの作用をブロックし、あるいは生体内でアレルゲンに特異的な1型ヘルパーT細胞（Th1細胞）を増加させ、アレルギー症状に関与する2型ヘルパーT細胞（Th2細胞）を減少させるためのワクチンをいい、減感作によりアレルギー症状を抑制することができる。アレルゲンの種類は、特に限定はされないが、食物アレルゲン（カゼイン、ラクトアルブミン、ラクトグロブリン、オボムコイド、オボアルブミン、コンアルブミン等）、ハウスダストアレルゲン（ダニ類アレルゲン等）、花粉アレルゲ

10

20

30

40

50

ン（スギ花粉アレルゲン、ブタクサアレルゲン、カモガヤアレルゲン等）、動物の体毛等のアレルゲンなどが挙げられる。

【0037】

4. 腸管内移行能が高い乳酸菌のスクリーニング方法

本発明はまた、SlpA蛋白質のUmodへの結合活性およびM細胞からの物質取り込み促進活性に基づき、被検乳酸菌の菌体表層におけるS-layer proteinの発現量を測定することを含む、腸管内移行能が高い乳酸菌のスクリーニング方法を提供する。

【0038】

S-layer proteinは、そのままでもよいが、任意の標識物質で標識されたものを用いることもできる。標識物質としては、蛍光物質、放射性同位体（例えば、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 等）、化学発光物質、ビオチン、マーカータンパク質、またはペプチドタグなどを例示することができる。マーカータンパク質としては、例えば、抗体のFc領域、アルカリフォスファターゼ、またはHRP(Horse radish peroxidase)などが挙げられる。またペプチドタグとしては、例えば、FLAG、6または10個のHis（ヒスチジン）残基からなる6×Hisまたは10×His、インフルエンザ凝集素（HA）の断片などが挙げられる。

【0039】

本発明において、「腸管内移行能」とは、腸管M細胞に接着し、M細胞内に移行し、M細胞内の基底膜を経てパイエル板内に到達する能力をいう。

【0040】

本発明のスクリーニング方法において、被検乳酸菌の菌体表層におけるS-layer proteinの発現量は、標準サンプルとの比較などにより絶対量を測定してもよいが、必ずしもS-layer proteinの絶対的な量を測定する必要はなく、対照となる乳酸菌の菌体表層におけるS-layer proteinとの相対的な関係を明らかにできれば評価としては十分である。

【0041】

S-layer proteinの発現量の測定は、公知の蛋白質発現解析方法に従って行うことができる。典型的には、S-layer proteinに対する抗体を用いた免疫学的測定法が挙げられる。免疫学的測定法としては、特に制限はなく、従来公知の方法、例えば酵素免疫測定法(EIA法)、ラテックス凝集法、免疫クロマトグラフィー法、ウエスタンブロット法、放射免疫測定法(RIA法)、蛍光免疫測定法(FIA法)、ルミネッセンス免疫測定法、スピン免疫測定法、抗原抗体複合体形成に伴う濁度を測定する比濁法、抗体固相膜電極を利用し抗原との結合による電位変化を検出する酵素センサー電極法、免疫電気泳動法などを採用することができる。これらの中でもEIA法またはウエスタンブロット法が好ましい。なお、EIA法には、競合的酵素免疫測定法や、サンドイッチ酵素結合免疫固相測定法(サンドイッチELISA法)等が包含される。

【0042】

上記測定に用いられるS-layer proteinに対する抗体は、当業者に周知の方法を用いて得ることができる。抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また、抗体としては、抗体の活性フラグメントであってもよい。活性フラグメントとしては、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fvなどが挙げられる。例えば、S-layer proteinに対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物（例えば、ウサギ、ラット、マウスなど）から血液を採取し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から抗体産生細胞（脾臓細胞、リンパ節細胞など）を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

【0043】

S-layer proteinの検出には、これらの抗体を適宜標識すればよい。標識物質は、前記の酵素、放射性同位体、蛍光色素を使用することができる。また、抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検

出することもできる。

【0044】

被検乳酸菌は、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ビフィドバクテリウム属、ロイコノストック属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、ペディオコッカス属、ワイセラ属、オエノコッカス属等に属するいずれの乳酸菌株であってもよい。ラクトバチルス属に属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・デルブリュッキイ、ラクトバチルス・ファーメンタム、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・ケフィア、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・ブルガリカス、ラクトバチルス・ラムノーサス、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ジョンソニー、ラクトバチルス・ガセリ、ラクトバチルス・アミロボラス、ラクトバチルス・クリスパタス、ラクトバチルス・ガリナルム等が挙げられる。ラクトコッカス属に属する乳酸菌としては、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトコッカス・プランタラム、ラクトコッカス・ラフィノラクティス等が挙げられる。ビフィドバクテリウム属に属する乳酸菌としては、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ビフィドバクテリウム・カテニュラータム、ビフィドバクテリウム・シュードカテニュラータム等が挙げられる。ロイコノストック属に属する乳酸菌としては、ロイコノストック・ラクティス、ロイコノストック・メセンテロイデス等が挙げられる。ストレプトコッカス属に属する乳酸菌としては、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ストレプトコッカス・ラクティス等が挙げられる。エンテロコッカス属に属する乳酸菌としては、エンテロコッカス・フェーカリス、エンテロコッカス・デュランス、エンテロコッカス・フェシウム等が挙げられる。ペディオコッカス属に属する乳酸菌としては、ペディオコッカス・ペントサセウス等が挙げられる。ワイセラ属に属する乳酸菌としては、ワイセラ・チバリア、ワイセラ・コンフューザ、ワイセラ・ハロトレランス等が挙げられる。オエノコッカス属に属する乳酸菌としては、オエノコッカス・オエニ等が挙げられる。

【実施例】

【0045】

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものでない。

【0046】

(実施例1) 乳酸菌株のSlpA定量

(1) 乳酸菌株の調製

実験には、*Lactobacillus acidophilus* L-92株、*Lactobacillus acidophilus* CP23株を用いた。各菌株をMRS培地 (Difco) にて37°C、20時間静置培養した後、PBSにて3回洗菌し、PBSに懸濁した。

【0047】

L-92株のLiCl処理は、L-92株をPBSにて2回洗菌した後、上清を除去し、5 MのLiCl (Wako) 溶液中で室温・静置にて一定時間インキュベートすることにより行った。インキュベート後、再度PBSで2回洗菌した後、PBSに再懸濁した。

【0048】

(2) 免疫染色

菌体懸濁液10 µlをスライドガラスに塗布し乾燥させた後、アルコールランプにて火炎固定した。Mouse anti-SlpA (clone 383) (1.4 mg/ml) をPBSにて100倍希釈し、スライドガラスに載せた。室温にて2~3時間反応させた後、PBSにてスライドガラスを3回洗浄した。さらに、Cy3-ストレプトアビジン (Cy3-conjugated Streptavidin, ImmunoResearch Laboratories, INC., No.016-160-084) をPBSにて200倍希釈して、スライドガラスに載せた。室温にて2~3時間反応させた後、PBSにてスライドガラスを3回洗浄した。

【0049】

カバーガラスをかけて封入した後、蛍光顕微鏡で観察し、目視により蛍光強度を確認した。結果を図1に示す。

【0050】

L-92株は菌体の表面がSlpAで覆われていたが、CP23株は表面に局在するSlpAが少ないことが示された。さらに、LiCl処理したL-92株も、表面のSlpAはほとんど除去されていることが示された(図1)。

【0051】

(実施例2) 乳酸菌株のUmod結合性の評価

(1) 乳酸菌株の調製

実験には、実施例1と同様にして調製したL-92株、CP23株、LiCl処理したL-92株を用いた。L-92株の抗SlpA抗体処理は、抗SlpA抗体を終濃度140 µg/mlとなるように溶解したPBS溶液にL-92株を懸濁し、4°Cで一晩、穏やかに振とうすることによって行った。

【0052】

(2) Umod結合試験(in vitro結合アッセイ)

L-92株、CP23株、LiCl処理したL-92株(LiCl-L92)、及び抗SlpA抗体処理したL-92株についてUmod結合性を調べた。

まず、ヒトIgG1のFcドメインにマウスUmod蛋白質(配列番号8の1-616位)をつなげて発現させた融合蛋白質(Fc-mUmod)を、Hase K. et al., Uptake through glycoprotein 2 of FimH1 bacteria by M cells initiates mucosal immune response, Nature 2009, 462:226-31の記載に従って作製した。mUmod(マウスUmod)配列(配列番号9)を増幅させるためのプライマーとしてForwardプライマー: 5'-CGCAGATCTACCATGGGGATCCCTTTGACC-3'(配列番号10)およびReverseプライマー: 5'-CGCGTCGACCTTGGACACTGAGGCCTGG-3'(配列番号11)を用い、制限酵素BglIIとSalIを用いてFcドメインを挿入したpcDNA3ベクター(invitrogen)にクローニングした。

【0053】

Fc-mUmodをクローニングしたベクターを、ヒト胎児腎細胞由来HEK293T細胞に導入し、7-10日培養した。上清中に分泌されたFc-mUmod蛋白質を回収し、HiTrap protein AHP affinity column(GE Healthcare)を用いて精製した。

【0054】

次に、Fc-mUmod蛋白質およびコントロールFc蛋白質としてhIgGを、5 µg/mlになるようにPBSにて希釈したものを96穴プレートに50 µlアプライし、4°Cにて一晩固相化した。各ウェルを200 µlのPBSにて3回洗浄した後、1% BSA/PBS溶液を200 µlアプライして室温にて2時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去した後、10⁶ cells/50 µl となるようにPBSにて懸濁した被検乳酸菌の菌体を、50 µlずつアプライし、室温にて2時間インキュベートした。各ウェルを200 µlのPBSにて5回洗浄した後、PBSを完全に除去した。

【0055】

NucleoSpinTM Tissue (Takara)を用いて、プレートに結合した菌体からDNAを抽出した。方法は付属のプロトコルに従った。抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA遺伝子をターゲットとするユニバーサルプライマー(F: 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'(配列番号12)、R: 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'(配列番号13))を用いてリアルタイムPCRを行い、Fc-mUmodおよびhIgGに結合した菌数を定量した。方法はSYBRTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)(Takara)に付属のプロトコルに従った。

【0056】

Fc-mUmodに結合した菌数からhIgGに結合した菌数を引いた値をUmod結合数とした。各菌株のUmod結合数は、L-92株の結合数を100%とし、それに対する比率で示した。結果を図2および3に示す。

【0057】

表層蛋白質SlpAが少ないCP23株、LiCl処理によってSlpAを除去したL-92株は、SlpAを多量に有するL-92株と比較してUmod結合性が有意に低かった(図2)。また、L-92株を抗Sl

10

20

30

40

50

pA抗体で処理すると、Umod結合性が減少傾向を示した（図3）。これらの結果より、L-92株のUmod結合性にはSlpAが関与することが示唆された。

【0058】

（実施例3）乳酸菌株のM細胞への取り込み量の評価

（1）乳酸菌株の調製

実験には、実施例1と同様にして調製したL-92株、CP23株、LiCl処理したL-92株を用いた。

【0059】

（2）ループアッセイ

L-92株、CP23株、LiCl処理したL-92株は、Cy3 Mono-Reactive Dye Pack (GE Healthcare) によって蛍光標識し、 10^9 cells/mlとなるようにPBSに懸濁した。手順はメーカーの推奨プロトコルに従った。C57BL/6Jマウスを数時間絶食させた後、イソフルラン麻酔下において開腹し、小腸パイエル板の両側を糸で縛り、菌体溶液を100 μ lずつ (10^8 cellsずつ) ループ部位に注入した。1時間インキュベートした後に頸椎脱臼にてマウスを安楽死させた。

【0060】

（3）免疫染色

パイエル板を切り出し、1 x HBSS (GIBCO) にて洗浄した後、BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience) にて固定し、Perm/Wash™ Buffer 10x (BD Bioscience) をmilliQ水で1xに希釈し、Saponin from Quillaja bark (SIGMA) を終濃度0.1%となるように添加した洗浄液にてよく洗い、洗浄液に0.2%となるようにBSAを懸濁させたブロッキング溶液でブロッキングを行った。

【0061】

Rat anti-mouse GP2 IgG2a (clone 2F11-C3) (1.0 mg/ml) を100倍となるようにブロッキング溶液に希釈した一次抗体溶液中でインキュベートし、洗浄液にてよく洗い、次にAlexa Fluor™ 488 goat anti-rat IgG (H+L) (Invitrogen) (2.0 mg/ml) を200倍となるようにブロッキング溶液に希釈した二次抗体溶液中でインキュベートした。PBSにてよく洗浄した組織をホルマウントし、観察に用いた。

【0062】

（4）M細胞への取り込み量比較

共焦点顕微鏡Leica SP2 AOBs Confocal and Multiphoton (Leica) にて濾胞上皮領域を撮影し、Alexa 488により免疫染色されたM細胞と、Cy3標識された菌体が重なっている部分を、「M細胞に取り込まれている菌体」としてカウントした。Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> よりダウンロード) を用いて、濾胞上皮部分の面積を測定し、面積あたりでM細胞に取り込まれている菌体量 (Cy3⁺M cells/PP dome area (cells/m²)) を算出した。

【0063】

各菌株のM細胞への取り込み量は、L-92株の取り込み量を100%とし、それに対する比率で示した。結果を図4に示す。Umod結合性の低いCP23株およびLiCl-L92株は、L-92株と比較するとM細胞への取り込み性が有意に減少した。よって、L-92株のM細胞への取り込みにSlpAが関与することが示唆された。

【0064】

（実施例4）SlpA結合担体のM細胞への取り込み量の評価

（1）SlpAの単離精製

Lactobacillus acidophilus L-92株を5MのLiCl中で30分インキュベートし、SlpAを抽出した。遠心して菌体を除去した後、透析チューブ（20/32吋、日本メデカルサイエンス）を用いてPBS溶液にて透析し、SlpAを得た。SDS-PAGEおよびCBB染色により単一のバンドが得られたことを確認した。

【0065】

（2）蛍光ビーズへの蛋白質結合

2色の蛍光ビーズ (FluoSpheres (登録商標) calboxylate-modified microspheres 1.0 mm, orange / yellow-green (Invitrogen)) に(1)で単離精製したSlpAまたはBSAを共有結合させた。EDAC[1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide, hydrochloride] (同仁化学研究所) を用い、手順はメーカーの推奨プロトコルに従った。

【0066】

(3) ループアッセイ

インキュベート時間を2時間とする以外は、実施例3に記載のとおり行った。

【0067】

(4) パイエル板取り込み量比較

パイエル板を切り出し、1xHBSS (GIBCO) にて洗浄した後、O.C.T.compound (Sakura Finetek USA) を用いて凍結ブロックを作成した。クリオスタットLEICA CM1850を用いて5mm厚さの凍結切片を作成し、パイエル板内部に取り込まれているビーズの数を蛍光顕微鏡にて観察および測定した。1マウスあたり6~12切片を観察し、平均を求めた。

【0068】

SlpAを結合させた蛍光ビーズとBSAを結合させた蛍光ビーズのパイエル板への取り込み量の比較を図5に示す。SlpAを結合させることによりM細胞からの取り込み量を促進することが確認された。

【0069】

(実施例5) 各種乳酸菌株のUmod結合性の評価

(1) 被検乳酸菌の調製

実験には、ラクトバチルス属に属する乳酸菌約20株を用いた。各菌株は、実施例1と同様に、MRS培地 (Difco) にて37℃、20時間静置培養した後、PBSにて3回洗菌し、PBSに懸濁した。

【0070】

(2) Umod結合試験 (in vitro結合アッセイ)

各菌株のUmod結合性の評価は、実施例2と同様に実施した。

【0071】

被検乳酸菌14株のUmod結合数の算出結果を表1に示す。Fc-mUmodに結合した菌数からhIgGに結合した菌数を引いた値をUmod結合数とした。

【0072】

【表1】

乳酸菌株	Umod結合数(log ₁₀)
Lactobacillus fermentum CP1753	5.4
Lactobacillus fermentum CP1299	5.3
Lactobacillus johnsonii CP1544	4.7
Lactobacillus helveticus CP2151	4.3
Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus CP2189	4.3
Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus CP973	4.2
Lactobacillus acidophilus L-92	4.1
Lactobacillus acidophilus CP1613	4.0
Lactobacillus brevis CP287	3.9
Lactobacillus acidophilus CP734	3.7
Lactobacillus acidophilus CP23	3.5
Lactobacillus casei CP2517	3.5
Lactobacillus gasseri CP793	3.1
Lactobacillus rhamnosus CP1270	2.7

【0073】

表1に示されるように、Umod結合数は、ラクトバチルス属の中でも菌種や菌株の違いによって異なることが確認された。

【0074】

(実施例6) 乳酸菌の菌体表層におけるS-layer proteinのアミノ酸配列に存在する共通配列の検討

実施例5の結果を踏まえ、S-layer proteinのマルチプルアライメント解析をClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて行った。具体的にはゲノム情報の利用が可能なラクトバチルス属に属する菌種の中で、実施例5において比較的Umod結合性が高いことが確認されたラクトバチルス・アシドフィルス (gi|58336516|ref|YP_193101.1| S-layer protein [Lactobacillus acidophilus NCFM])、およびラクトバチルス・ヘルベティカス (gi|550820440|emb|CDI42266.1| Surface layer protein [Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 953]) が共通して保有し、逆にUmod結合性が低いことが確認されたラクトバチルス・ガセリ (gi|1619598|emb|CAA69725.1| aggregation promoting protein [Lactobacillus gasserii]) が保有しない配列を特定した。 10

【0075】

アライメント解析の結果を図6に示す。Umod結合性の高いラクトバチルス・アシドフィルスおよびラクトバチルス・ヘルベティカスが共通して保有し、逆にUmod結合性が低かったラクトバチルス・ガセリが保有しない配列として、式(I)～式(VI)が特定された(図7)。

【0076】

また、ラクトバチルス・アシドフィルスおよびラクトバチルス・ヘルベティカスに加え、ゲノム情報が利用可能であった他のラクトバチルス属の菌種の中から、ラクトバチルス・アシドフィルスの近縁種として考えられるラクトバチルス・クリスパタス (gi|113967820|gb|ABI49168.1| SlpB [Lactobacillus crispatus])、ラクトバチルス・アミロボラス (gi|385816784|ref|YP_005853174.1| s-layer protein [Lactobacillus amylovorus GRL 1118]) およびラクトバチルス・ガリナルム (gi|51242255|gb|AAT99079.1| LgsF [Lactobacillus gallinarum]) を選択して解析した。 20

【0077】

図8に、式(I)～式(VI)で示されるアミノ酸配列と、それに対応する部分のラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・クリスパタス、ラクトバチルス・アミロボラス、ラクトバチルス・ガリナルムのアミノ酸配列を示す(配列番号14～43)。これら5菌種においては、式(V)が最も共通性が高く、式(VI)が最も共通性が低いことがわかった。 30

【産業上の利用可能性】

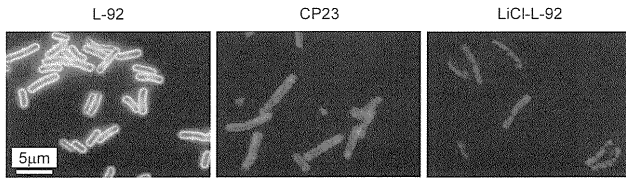
【0078】

本発明は、プロバイオティクス飲食品や粘膜ワクチンなどの医薬品の製造分野において利用できる。

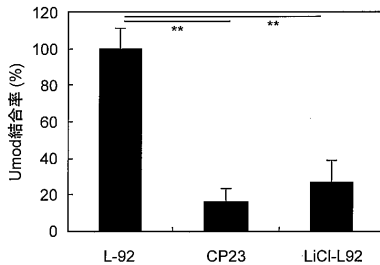
【0079】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

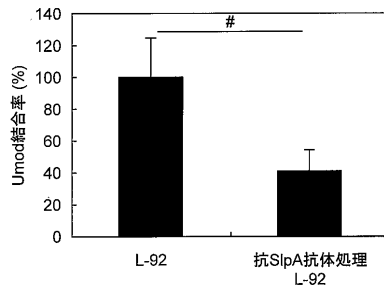
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 6】

シグナル配列		モチーフ1
L. acidophilus	MKK-NLRIVSAAAAALLAVAPVAASAVSTVSA-ATTINASSA	NTNTNA 48
L. helveticus	MKK-NLRIVSVAIAALLAVAPVAASAVSTVNA-ATTINAGSAV	NTNTNA 47
L. gasseri	MKPKSILTKSLAAALATGLVALNSQNTNDAQATITVQNDTNVTNTNA	50

モチーフ2	
L. acidophilus	KYDQDVTSPVSAVA-ANTANNTPAIAGNLGTISASYNKGTITANLAD 96
L. helveticus	KYDQDVTSPVSALA-KVAGSDTMTPTIP-GSLTGSISASYNKGSYTANL-AK 95
L. gasseri	NSTVAIVWDGVEN-AMFTGKELVHGTTWKVIRTA- 82

モチーフ3	
L. acidophilus	TENATITAAAGSTTAVKPAEAAAGVATVTVNDVSNFNGSENAGHTVTLGS 146
L. helveticus	DTKNATISDGSNNVDPADLEYGKPTVTVPDVSNFNGSENAGHTITGS 145
L. gasseri	YDAMG-NKWDYLGANQWI-MAKYTVVEGNN 109

モチーフ4	
L. acidophilus	NSNVNFDVTSYGATVINGAVSVNADNQGVNVAIVAAINSKYFAAQYAD 246
L. helveticus	NRDVFYDVTGATVKTGAVSLDADNQQLNTASVVAITTSKYFAAQYAK 239
L. gasseri	SVASQGVN-TQAKAATQVQHQTVAQA-PKNTNYNVQRTYSAPVQQR 195

モチーフ5	
L. acidophilus	K-KLNTRTANTEDAIKAALKDQKIDVNSVGYFKAFHFTFVNKATSNTN 294
L. helveticus	KQLSQDQNVVNTETAVKDALKAKIEVNSVGYFKAFHFTFVNKATSNNV 289
L. gasseri	Y-SYASAQKQT-TQVAQKTQTTSYTLNA- 222

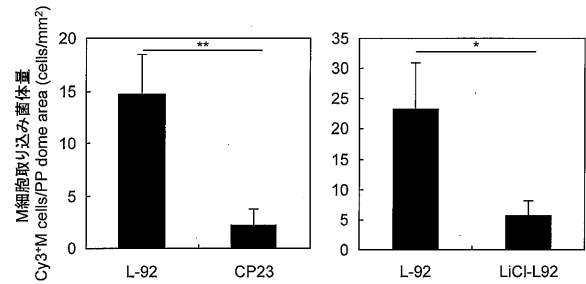
モチーフ6		アンカー配列
L. acidophilus	GKSATLPVWTVPNVAEPTVASVSKRTIMHNAIYYDKAKRVGTDVSKRYN 344	
L. helveticus	SKSATLPVWTVPNVAEPTVPSVSKRTIMHNAIYFDKNAKRVGTDKVTRYN 339	
L. gasseri	SGSEAAAKAW-MAGRESGGPYSAAGNQY 249	

モチーフ7	
L. acidophilus	SVSVLPNTTTINGKTYQVVE-NGKAVDKYINAINDGKTRTLKHNAIYY 393
L. helveticus	TVTVMNTTKLANGISYVEVIENGKATGKYINADNDGKTRTLKHNAIYY 389
L. gasseri	IGKYQLS-ASVGGDYSAAANQE-RVADNY 276

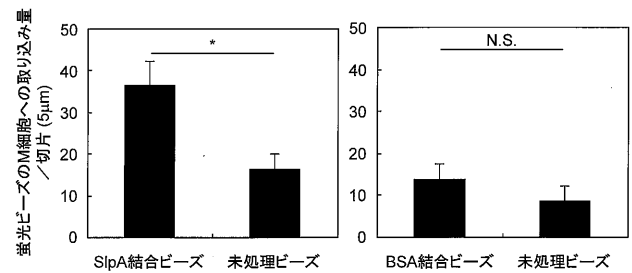
モチーフ8	
L. acidophilus	ASSKKRANKVVLKKEVVTTYGASYTPKNGQKYYKIGDNTDKTYVKVANF 443
L. helveticus	KTSKKRANKVVLKKEVVTTYGSGYKPKNGQRYKIGADIKTYVKVANF 439
L. gasseri	VKSRYGSGTGAQKF-#QTNGWY 297

モチーフ9	
L. acidophilus	R 444
L. helveticus	D 440
L. gasseri	-

【図 4】



【図 5】



【図 7】

- 式(I) NTNTNAKYDQDVTSPVSA-A (配列番号1)
 式(II) G-LTG-ISASYNKG-YTANL (配列番号2)
 式(III) YTVTV-DVSFNGSENAGK (配列番号3)
 式(IV) VVAAL-SKYFAAQYA (配列番号4)
 式(V) HTFTVNVKATS-N-KSATLPV (配列番号5)
 式(VI) VTVPNVAEPTV-SVSK (配列番号6)

【図 8】

式 (I)	222322112221211332 1	
	NTNTNAKYDVDVTPSVSA-A	:配列番号1
	NTNTNAKYDVDVTPSVSAVA (L. acidophilus)	:配列番号14
	NTNTNAKYDVDVTPSVSAIA (L. helveticus)	:配列番号15
	NTNANAKYDVDVTPSLIAIA (L. crispatus)	:配列番号16
	---DVAKYVANVNPSFTLNA (L. amylovorus)	:配列番号17
式 (II)	1 111 22132313 21111	
	G-LTG-ISASYNKG-YTANL	:配列番号2
	GNLGTGISASYNKTYTANL (L. acidophilus)	:配列番号19
	GSLTGSISASYNKSYTANL (L. helveticus)	:配列番号20
	GSLGTGISATYGGQSYTANL (L. crispatus)	:配列番号21
	GSLTGSVTANVGGVTATANL (L. amylovorus)	:配列番号22
式 (III)	12223 3131111331131	
	YTVTV-DVSFNFGSENAGK	:配列番号3
	YTVTVNDVSFNFGSENAGK (L. acidophilus)	:配列番号24
	YTVTVPDVSFNFGSENAGK (L. helveticus)	:配列番号25
	YTVTISGVGFNFGTANANK (L. crispatus)	:配列番号26
	YSIVVNKVGFNFGANNAGK (L. amylovorus)	:配列番号27
式 (IV)	22211 322312133	
	VVAAI-SKYFAAQYA	:配列番号4
	VVAAINSKYFAAQYA (L. acidophilus)	:配列番号29
	VVAAITSKYFAAQYA (L. helveticus)	:配列番号30
	VVAAIQAKYAAAQVD (L. crispatus)	:配列番号31
	ILQAIKSNFTAFQRV (L. amylovorus)	:配列番号32
式 (V)	331112111213 1 3312111	
	HTFTVNVKATSN-N-KSATLPV	:配列番号5
	HTFTVNVKATSNNGKSATLPV (L. acidophilus)	:配列番号34
	HTFTVNVKATSNVNSKSATLPV (L. helveticus)	:配列番号35
	TSFTVNVKATSSINGLTATLPV (L. crispatus)	:配列番号36
	HSFTVTVKAVSDINGKAKLPV (L. amylovorus)	:配列番号37
式 (VI)	23131333321 1221	
	VTVPNVAEPTV-SVSK	:配列番号6
	VTVPNVAEPTVASVSK (L. acidophilus)	:配列番号39
	VTVPNVAEPTVPSVSK (L. helveticus)	:配列番号40
	VNVINGVNTTVDSVSK (L. crispatus)	:配列番号41
	FTVANVADPVVPSQIK (L. amylovorus)	:配列番号42
	FTVANVADPVVPSQSK (L. gallinarum)	:配列番号43

【配列表】

2015182470000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/064573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/42(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61P37/04(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)

A61K47/42, A23K1/16, A23L1/30, A23L1/305, A61K38/00, A61K39/00, A61K39/39, A61P37/04

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2014/167995 A1 (Calpis Co., Ltd.), 16 October 2014 (16.10.2014), claims 1 to 14; examples 1 to 4 (Family: none)	1-13
X A	WO 2006/073145 A1 (Calpis Co., Ltd.), 13 July 2006 (13.07.2006), examples 1 to 3 & US 2010/0040735 A1 & EP 1852498 A1 & CN 101098957 A	6-9, 11, 12 1-5, 10, 13
X, Y A	MOEINI, H. et al., Lactobacillus acidophilus as a live vehicle for oral immunization against chicken anemia virus, Appl Microbiol Biotechnol, 2011, Vol.90, p.77-88	1-12 13

☒ 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
03 July 2015 (03.07.15)

Date of mailing of the international search report
14 July 2015 (14.07.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/064573

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005-528085 A (Nederlandse Organisatie Voor Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek Tno) 22 September 2005 (22.09.2005), claims 1 to 31; paragraphs [0113], [0121], [0122]; examples & US 2005/0233408 A1 & WO 2003/055906 A1 & EP 1458753 A	1-13 1-12
Y A	HYNONEN, U. et al., Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications, Appl Microbiol Biotechnol, 2013, Vol.97, p.5225-5243	1-12 13
A	XUEYAN, C. et al., Characterization of Surface Layer Proteins in Lactobacillus crispatus Isolate ZJ001, J. Microbiol. Biotechnol., 2009, Vol.19, No.10, p.1176-1183	1-13
A	AATTOURI, N. et al., Oral ingestion of lactic- acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production, British Journal of Nutrition, 2002, Vol.87, p.367-373	1-13
A	HOLLMANN, A. et al., S-layer proteins from lactobacilli as vaccine delivery systems, International Journal of Microbiology Research, 2010, Vol.2, p.30-43	1-13
A	WO 1999/51631 A1 (KORHONEN, Timo), 14 October 1999 (14.10.1999), page 17, line 4 to page 18, line 16 (Family: none)	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 4 5 7 3	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K47/42(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61P37/04(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. A61K47/42, A23K1/16, A23L1/30, A23L1/305, A61K38/00, A61K39/00, A61K39/39, A61P37/04			
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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） CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
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	
P, A	WO 2014/167995 A1 (カルピス株式会社) 2014.10.16 請求項 1-14, 実施例 1-4 (ファミリーなし)	1-13	
X A	WO 2006/073145 A1 (カルピス株式会社) 2006.07.13 実施例 1-3 & US 2010/0040735 A1 & EP 1852498 A1 & CN 101098957 A	6-9, 11, 12 1-5, 10, 13	
☒ 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 03.07.2015		国際調査報告の発送日 14.07.2015	
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） 高橋 樹理	4C 4498 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 4 5 7 3
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
X, Y A	MOEINI, H. et al., Lactobacillus acidophilus as a live vehicle for oral immunization against chicken anemia virus, Appl Microbiol Biotechnol, 2011, Vol.90, p.77-88	1-12 13
X Y	JP 2005-528085 A (ネーデルランドセ・オルガニザテイエ・フール・テゲパストーナトウルペテンシヤツペリーク・オンデルツエク・テイエヌオー) 2005.09.22 請求項 1-31, [0113], [0121], [0122], 実施例 & US 2005/0233408 A1 & WO 2003/055906 A1 & EP 1458753 A	1-13 1-12
Y A	HYNONEN, U. et al., Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications, Appl Microbiol Biotechnol, 2013, Vol.97, p.5225-5243	1-12 13
A	XUEYAN, C. et al., Characterization of Surface Layer Proteins in Lactobacillus crispatus Isolate ZJ001, J. Microbiol. Biotechnol., 2009, Vol.19, No.10, p.1176-1183	1-13
A	AATTOURI, N. et al., Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production, British Journal of Nutrition, 2002, Vol.87, p.367-373	1-13
A	HOLLMANN, A. et al., S-layer proteins from lactobacilli as vaccine delivery systems, International Journal of Microbiology Research, 2010, Vol.2, p.30-43	1-13
A	WO 1999/51631 A1 (KORHONEN, Timo) 1999.10.14 第17頁第4行-第18頁第16行 (ファミリーなし)	1-13

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 2 3 L	33/17	(2016.01)	A 2 3 L	33/17	4 C 0 8 7	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04		
A 2 3 K	20/147	(2016.01)	A 2 3 K	20/147		
A 2 3 K	10/16	(2016.01)	A 2 3 K	10/16		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569	F	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 百武 沙恵
神奈川県相模原市中央区淵野辺5丁目11番10号 アサヒグループホールディングス株式会社内

(72)発明者 山本 直之
神奈川県相模原市中央区淵野辺5丁目11番10号 アサヒグループホールディングス株式会社内

(72)発明者 金谷 高史
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 弘田 辰彦
神奈川県相模原市中央区淵野辺5丁目11番10号 アサヒグループホールディングス株式会社内

(72)発明者 福田 真嗣
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 大野 博司
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

Fターム(参考) 2B150 AA02 AA03 AA06 AB10 AC06 AC37 AE02 AE05 AE13 AE16
DC23
4B018 MD20 MD86 ME14
4B063 QA18 QQ06 QR48 QR82 QS36 QX01
4C076 BB01 CC07 EE41N
4C085 AA03 BA14 BA16 BA17 BA18 BA26 BA51 BA53 BA55 BA56
BA58 BA63 BA69 BA71 BA77 BA78 BA79 BB03 BB04 BB11
BB15 EE05 GG08
4C087 AA01 AA02 BC56 CA16 MA52 NA11 ZB09

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	肠道中的物质摄取促进剂		
公开(公告)号	JPWO2015182470A1	公开(公告)日	2017-06-01
申请号	JP2016523447	申请日	2015-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	朝日啤酒株式会社 独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	朝日集团控股公司 国立研究开发法人理化学研究所		
[标]发明人	百武沙惠 山本直之 金谷高史 弘田辰彦 福田真嗣 大野博司		
发明人	百武 沙惠 山本 直之 金谷 高史 弘田 辰彦 福田 真嗣 大野 博司		
IPC分类号	A61K47/42 A61K39/00 A61K35/744 A61P37/04 A23L33/195 A23L33/17 C12Q1/04 A23K20/147 A23K10/16 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/164 A23K20/10 A23K20/147 A23L2/52 A23L33/135 A23L33/18 A23V2002/00 A23Y2220/03 A61K35/747 A61K38/10 A61K38/16 A61K39/00 A61K39/39 A61K2039/541 C12Q1/02 G01N33/56911 G01N33/68 G01N2333/335		
FI分类号	A61K47/42 A61K39/00.G A61K35/744 A61P37/04 A23L33/195 A23L33/17 C12Q1/04 A23K20/147 A23K10/16 G01N33/53.D G01N33/569.F		
F-TERM分类号	2B150/AA02 2B150/AA03 2B150/AA06 2B150/AB10 2B150/AC06 2B150/AC37 2B150/AE02 2B150/AE05 2B150/AE13 2B150/AE16 2B150/DC23 4B018/MD20 4B018/MD86 4B018/ME14 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS36 4B063/QX01 4C076/BB01 4C076/CC07 4C076/EE41N 4C085/AA03 4C085/BA14 4C085/BA16 4C085/BA17 4C085/BA18 4C085/BA26 4C085/BA51 4C085/BA53 4C085/BA55 4C085/BA56 4C085/BA58 4C085/BA63 4C085/BA69 4C085/BA71 4C085/BA77 4C085/BA78 4C085/BA79 4C085/BB03 4C085/BB04 4C085/BB11 4C085/BB15 4C085/EE05 4C085/GG08 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC56 4C087/CA16 4C087/MA52 4C087/NA11 4C087/ZB09		
优先权	2014111681 2014-05-29 JP		
其他公开文献	JP6376417B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种能够有效地将对肠道免疫诱导有用的物质例如乳酸菌掺入到肠道中的手段。根据本发明，其包含表层蛋白（S层蛋白），所述表层蛋白包含乳酸杆菌乳酸菌共有的肽基序，肠道中的物质吸收促进剂，吸收促进剂与肠吸收目标物质的复合物，一种用于筛选具有高进入肠道能力的乳酸菌的方法，该方法包括测量受试乳酸菌（包括含有复合物的食物或饮料）的细胞表面中S层蛋白的表达水平。

発行日 平成29年6月1日 (2017. 6. 1)

(43) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015. 12. 3)

(51) Int. Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42		2 B 1 5 0
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G	4 B 0 1 8
A 6 1 K 35/744 (2015.01)	A 6 1 K 35/744		4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04		4 C 0 7 6
A 2 3 L 33/195 (2016.01)	A 2 3 L 33/195		4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く			

出願番号	特願2016-523447 (P2016-523447)	(71) 出願人	000000055
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/064573		アサヒグループホールディングス株式会社
(22) 国際出願日	平成27年5月21日 (2015. 5. 21)		東京都墨田区吾妻橋一丁目2 3 番 1 号
(31) 優先権主張番号	特願2014-111681 (P2014-111681)	(71) 出願人	503358821
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014. 5. 29)		国立研究開発法人理化学研究所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		埼玉県和光市広沢2 番 1 号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 郎
		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腸管における物質取り込み促進剤