

(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
2014 年 9 月 18 日(18.09.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/142186 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/056537
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 12 日(12.03.2014)
- (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 2013-050631 2013 年 3 月 13 日(13.03.2013) JP
- (71) 出願人: 株式会社ヤクルト本社(KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松本 星隆(MATSUMOTO, Hoshitaka); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 白澤 幸生(SHIRASAWA, Yukio); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 佐藤 澄江(SATO, Sumie); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 木脇 真祐美(KIWAKI, Mayumi); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 飯野 透(IINO, Tohru); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, 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, 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, KM, 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))

(54) Title: BIFIDOBACTERIUM-BREVE-SPECIFIC GENE

(54) 発明の名称: ビフィドバクテリウム・ブレーベ株特異的遺伝子

(57) Abstract: The present invention provides a gene specific to Bifidobacterium breve YIT 12272, and a method for using said gene. A gene for specifically detecting Bifidobacterium breve YIT 12272, which is DNA comprising a base sequence indicated by SEQ ID NO 1-145 or DNA comprising a base sequence complementary to said sequence.

(57) 要約: ビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株に特異的な遺伝子及びその利用法の提供。配列番号 1 ~ 1 4 5 に示される塩基配列からなる DNA 又は該配列に相補的な塩基配列からなる DNA である、ビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株を特異的に検出するための遺伝子。



WO 2014/142186 A1

明 細 書

発明の名称： ビフィドバクテリウム・ブレーベ株特異的遺伝子 技術分野

[0001] 本発明は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株に特異的な遺伝子及びその利用法に関する。

背景技術

[0002] ビフィドバクテリウム属細菌は、ヒトの腸内細菌叢における主要細菌であり、便秘や下痢の改善等の整腸作用、血清コレステロール上昇抑制作用、免疫賦活作用等、ヒトの健康に対して有益な作用を有することが知られている。このため、各種発酵飲食品や生菌製剤等の形態で多数の市販品が販売されており、特に発酵乳飲食品は、優れた嗜好性を有していることから、ビフィドバクテリウム属細菌の継続的な摂取に適している。

[0003] ビフィドバクテリウム属細菌は偏性嫌気性菌であり、酸素や低 pH、高酸度に弱く、発酵飲食品においては製造時の増殖や保存時の生残性等、取り扱いに困難な点が多い。ビフィドバクテリウム属細菌の生理効果を得るには、できるだけ多くの菌が生きたまま腸に到達する必要があると考えられており、特に飲食品中での菌の生残性、すなわち飲食後の腸への到達率を高めることが重要なファクターとされている。

[0004] 斯かる問題を解決するために、好氣的条件や低 pH、高酸度の条件下でも高い生残性を有するビフィドバクテリウム属細菌の作出が行われている。このような菌株の例として、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 10001 株 (FERM BP-8205) (特許文献 1)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ SBR 3212 株 (FERM P-11915) (特許文献 2)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT 4002 株 (FERM BP-1038) (特許文献 3)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株 (FERM BP-11320) (特許文献 4) 等が挙げられ、中でもビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272

株は高い生残性を有し、人工胃液耐性、人工胆汁・腸液耐性ともに強化されており、様々な飲食品に適用可能な汎用性の高い菌株である。ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株は、他のビフィドバクテリウム属細菌やビフィドバクテリウム・ブレーベと比較しても非常に優れた特性を有することから、他のビフィドバクテリウム属細菌やビフィドバクテリウム・ブレーベに存在しない当該菌株に特異的な遺伝子を探索し、その機能を明らかにすることは極めて重要である。

[0005] ビフィドバクテリウム属細菌やビフィドバクテリウム・ブレーベに存在する有用遺伝子としては、宿主細胞接着に関連すると考えられている B L O 6 7 4 遺伝子（非特許文献 1）や、 β -ガラクトシダーゼの産生に関する β -ガラクトシダーゼ遺伝子（非特許文献 2）などが報告されているが、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株に特異的な遺伝子は報告されていない。また、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株に特異的なプライマーおよびこれらプライマーを使用することを特徴とする当該菌株の特異的検出方法は、既に報告されている（特許文献 4）が、このプライマーは当該菌株の菌体から DNA を抽出し、PCR を行うことで RAPD 法を行い、当該菌株に特異的な塩基配列を検索し、その配列を基に設計したプライマーであり、当該菌株の遺伝子をターゲットにしているものではなかった。このため、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株に特異的な遺伝子はいまだに明らかにされていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献 1：国際公開第 2003/040350 号

特許文献 2：特許第 2922013 号公報

特許文献 3：特公昭 61-19220 号公報

特許文献 4：国際公開第 2011/105335 号

非特許文献 1：Schell et al., Proc Natl Acad Sci USA, 99(22):14422-14427, 2002

非特許文献2：Møller, P.L. et al., Appl&Environ.Microbial., (2001), 62, (5), 2276-2283

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株に特異的な遺伝子及びその利用法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題に鑑み検討したところ、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の全遺伝子1966より、当該菌株に特異的な145の遺伝子を特定し、その機能を推定した。また、当該遺伝子を標的とすることにより、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株を特異的に検出・定量できることを見出した。

[0009] 本発明は、以下の1)～9)に係るものである。

1) 配列番号1～145に示される塩基配列からなるDNA又は該配列に相補的な塩基配列からなるDNAである、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株を特異的に検出するための遺伝子。

2) 配列番号1～36に示される塩基配列からなるDNA又は該配列に相補的な塩基配列からなるDNAである1)記載の遺伝子。

3) 配列番号37～55に示される塩基配列からなるDNA又は該配列に相補的な塩基配列からなるDNAである1)記載の遺伝子。

4) 1)記載の遺伝子のいずれか1つ以上を標的とすることを特徴とするビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の特異的検出方法。

5) 1)記載の遺伝子のいずれか1つ以上を標的とすることを特徴とするビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の定量方法。

6) 1)記載の遺伝子又はその発現産物のいずれか1つ以上の存在及び／又は発現量を指標とすることを特徴とする当該遺伝子を有する微生物のスクリーニング方法。

7) 6) 記載のスクリーニング方法により選択された微生物。

8) 1) 記載の遺伝子のいずれか1つ以上を導入すること、及び／又は1) 記載の遺伝子のいずれか1つ以上を標的として微生物の遺伝子を改変することを特徴とする遺伝子改変微生物の作出方法。

9) 8) 記載の作出方法により得られた遺伝子改変微生物。

発明の効果

[0010] 本発明の遺伝子は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株に特異的な遺伝子であることから、当該遺伝子を標的とすることにより、検体中よりビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株のみを遺伝子レベルで検出・定量することができる。また、本発明の遺伝子を用いることで、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の持つ優れた特性を遺伝子レベルで解明することができる。さらに、本発明の遺伝子又はその発現産物の存在及び／又は発現量を指標として、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株が有する固有の性質と同一の性質を保持する微生物をスクリーニングすることができる。また、他の微生物へ本発明の遺伝子を導入したり、他の微生物が本発明遺伝子に相当する遺伝子を有する場合に当該遺伝子の改変を行うことで、有用な機能を持った遺伝子改変微生物を作出することができる。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の配列番号1～145に示される塩基配列からなるDNAは、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株に特異的な遺伝子であり、後記実施例1に記載の手法によって特定されたものである。

すなわち、先ずビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株 (FERM BP-11320) (前記特許文献4参照) のゲノム配列情報から取得した当該菌株の全アミノ酸配列と、ゲノム情報が公開されているビフィドバクテリウム・ブレーベに属する細菌4菌株の全遺伝子のアミノ酸配列を比較し、e-value (偶然に誤った検索結果が含まれる期待値) が0.01未満且つカバー率が60%を上回る相同配列が、対照とした4菌株

全てに認められなかった161の遺伝子を、当該菌株に特異的な遺伝子の候補として選択した。次いで、当該161遺伝子の塩基配列を、公共データベース上でゲノム全長の塩基配列が公開されているビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株に属する細菌株のゲノム配列と比較し、 $e-value$ が0.01未満且つカバー率が100%且つギャップ数が0となる相同配列が、対照とした菌株に認められなかった遺伝子145個を、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株特異的遺伝子として選択した（〔表1〕）。

ここで「カバー率」とは、検索にかけたビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株のアミノ酸配列の全長に対して、他菌株との間に配列類似性が認められる領域が占める割合のことをいう。具体的には、相同性検索の結果から得られるアライメント長およびギャップ数の値を用いて以下のように算出する。「カバー率」＝（「アライメント長」－「ギャップ数」）／「ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の検索アミノ酸配列長」×100

例えば、100アミノ酸からなるビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の配列aにおいて、相同性検索により菌株Bの105アミノ酸からなる配列bがアライメント長90、ギャップ数10でヒットした場合、そのカバー率は、 $(90 - 10) / 100 \times 100 = 80\%$ となる。

[0012] また、各遺伝子について、米国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information、NCBI）で公開されている全アミノ酸配列データベースに対する相同性検索（ $e-value < 0.01$ ）を行い、NCBIのデータベースにより、その機能を推定した。

[0013]

[表1-1]

配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能	配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能
1	SPC0005	機能未知タンパク質	3 1	SPC0095	機能未知タンパク質
2	SPC0006	機能未知タンパク質	3 2	SPC0096	機能未知タンパク質
3	SPC0009	機能未知タンパク質	3 3	SPC0098	機能未知タンパク質
4	SPC0017	機能未知タンパク質	3 4	SPC0099	機能未知タンパク質
5	SPC0018	機能未知タンパク質	3 5	SPC0117	機能未知タンパク質
6	SPC0019	機能未知タンパク質	3 6	SPC0135	機能未知タンパク質
7	SPC0020	機能未知タンパク質	3 7	SPC0012	機能未知細胞質タンパク質
8	SPC0021	機能未知タンパク質	3 8	SPC0043	機能未知タンパク質
9	SPC0023	機能未知タンパク質	3 9	SPC0049	機能未知タンパク質
1 0	SPC0024	機能未知タンパク質	4 0	SPC0061	アラビノース／プロトンシンポーター
1 1	SPC0026	機能未知タンパク質	4 1	SPC0075	機能未知タンパク質
1 2	SPC0027	機能未知タンパク質	4 2	SPC0076	トランスポザーゼ
1 3	SPC0029	機能未知タンパク質	4 3	SPC0078	トランスポザーゼ
1 4	SPC0030	機能未知タンパク質	4 4	SPC0079	機能未知タンパク質
1 5	SPC0032	機能未知タンパク質	4 5	SPC0088	機能未知タンパク質
1 6	SPC0034	機能未知タンパク質	4 6	SPC0089	トランスポザーゼ
1 7	SPC0035	機能未知タンパク質	4 7	SPC0094	ATP 結合タンパク質
1 8	SPC0038	機能未知タンパク質	4 8	SPC0116	トランスポザーゼ
1 9	SPC0040	機能未知タンパク質	4 9	SPC0121	グルコース／ガラクトース輸送体
2 0	SPC0041	機能未知タンパク質	5 0	SPC0126	機能未知タンパク質
2 1	SPC0042	機能未知タンパク質	5 1	SPC0137	パーミターゼ
2 2	SPC0044	機能未知タンパク質	5 2	SPC0138	トランスポザーゼ
2 3	SPC0045	機能未知タンパク質	5 3	SPC0139	糖 ABC トランスポーター
2 4	SPC0071	機能未知タンパク質	5 4	SPC0140	機能未知タンパク質
2 5	SPC0073	機能未知タンパク質	5 5	SPC0141	機能未知膜タンパク質
2 6	SPC0085	機能未知タンパク質	5 6	SPC0001	機能未知タンパク質
2 7	SPC0087	機能未知タンパク質	5 7	SPC0002	細胞外リガンド結合受容体
2 8	SPC0090	機能未知タンパク質	5 8	SPC0003	ハロ酸デハロゲナーゼ様加水分解酵素
2 9	SPC0091	機能未知タンパク質	5 9	SPC0004	機能未知タンパク質
3 0	SPC0093	機能未知タンパク質	6 0	SPC0007	機能未知タンパク質

[0014]

[表1-2]

配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能	配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能
6 1	SPC0008	DNA メチラーゼ	9 1	SPC0063	機能未知タンパク質
6 2	SPC0010	機能未知タンパク質	9 2	SPC0064	機能未知タンパク質
6 3	SPC0011	複製タンパク質 RepA	9 3	SPC0065	機能未知タンパク質
6 4	SPC0013	メジャーファシリテーター スーパーファミリータン パク質	9 4	SPC0066	ニトロレダクターゼ
6 5	SPC0014	α -L-フコシダーゼ	9 5	SPC0067	機能未知タンパク質
6 6	SPC0015	機能未知タンパク質	9 6	SPC0068	機能未知タンパク質
6 7	SPC0016	機能未知タンパク質	9 7	SPC0069	機能未知タンパク質
6 8	SPC0022	機能未知タンパク質	9 8	SPC0070	機能未知タンパク質
6 9	SPC0025	機能未知タンパク質	9 9	SPC0072	機能未知タンパク質
7 0	SPC0028	機能未知タンパク質	1 0 0	SPC0074	機能未知タンパク質
7 1	SPC0031	機能未知タンパク質	1 0 1	SPC0077	DNA インベルターゼ様タ ンパク質
7 2	SPC0033	機能未知タンパク質	1 0 2	SPC0080	機能未知タンパク質
7 3	SPC0036	機能未知タンパク質	1 0 3	SPC0081	機能未知タンパク質
7 4	SPC0037	機能未知タンパク質	1 0 4	SPC0082	Abi ファミリータンパク質
7 5	SPC0039	機能未知タンパク質	1 0 5	SPC0083	機能未知タンパク質
7 6	SPC0046	機能未知タンパク質	1 0 6	SPC0084	転写調節因子
7 7	SPC0047	機能未知タンパク質	1 0 7	SPC0086	機能未知タンパク質
7 8	SPC0048	機能未知タンパク質	1 0 8	SPC0092	機能未知タンパク質
7 9	SPC0050	リゾホスホリパーゼ	1 0 9	SPC0097	機能未知タンパク質
8 0	SPC0051	機能未知タンパク質	1 1 0	SPC0100	機能未知タンパク質
8 1	SPC0052	機能未知タンパク質	1 1 1	SPC0101	リゾホスホリパーゼ
8 2	SPC0053	グリコシドヒドロラーゼ ファミリータンパク質	1 1 2	SPC0102	セロビオースホスホリラー ゼ
8 3	SPC0054	グリコシドヒドロラーゼ ファミリータンパク質	1 1 3	SPC0103	メジャーファシリテーター スーパーファミリータンパ ク質
8 4	SPC0055	パーミターゼ	1 1 4	SPC0104	トランスボザーゼ
8 5	SPC0056	パーミターゼ	1 1 5	SPC0105	機能未知タンパク質
8 6	SPC0057	PF06032 ファミリータン パク質	1 1 6	SPC0106	ピロホスホヒドロラーゼ
8 7	SPC0058	PF06032 ファミリータン パク質	1 1 7	SPC0107	機能未知タンパク質
8 8	SPC0059	ヒダントイナーゼ/オキ ソプロリナーゼ	1 1 8	SPC0108	機能未知タンパク質
8 9	SPC0060	PF06675 ファミリータン パク質	1 1 9	SPC0109	機能未知タンパク質
9 0	SPC0062	機能未知タンパク質	1 2 0	SPC0110	機能未知タンパク質

[0015]

[表1-3]

配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能	配列番号	遺伝子名	推定遺伝子機能
1 2 1	SPC0111	機能未知タンパク質	1 3 6	SPC0130	マグネシウム輸送タンパク質 ATPase サブユニット
1 2 2	SPC0112	機能未知タンパク質	1 3 7	SPC0131	α -L-ラーラムノシダーゼ
1 2 3	SPC0113	機能未知タンパク質	1 3 8	SPC0132	機能未知タンパク質
1 2 4	SPC0114	機能未知タンパク質	1 3 9	SPC0133	OsmC ファミリータンパク質
1 2 5	SPC0115	機能未知タンパク質	1 4 0	SPC0134	機能未知タンパク質
1 2 6	SPC0118	機能未知タンパク質	1 4 1	SPC0136	ジオキシゲナーゼ
1 2 7	SPC0119	転写調節因子	1 4 2	SPC0142	ATP 分解酵素
1 2 8	SPC0120	プロフェージタンパク質	1 4 3	SPC0143	機能未知タンパク質
1 2 9	SPC0122	機能未知タンパク質	1 4 4	SPC0144	キシランエステラーゼ
1 3 0	SPC0123	ABC トランスポーター	1 4 5	SPC0145	機能未知タンパク質
1 3 1	SPC0124	機能未知タンパク質			
1 3 2	SPC0125	機能未知タンパク質			
1 3 3	SPC0127	機能未知タンパク質			
1 3 4	SPC0128	センサーヒスチジンキナーゼ			
1 3 5	SPC0129	マグネシウム輸送タンパク質			

[0016] 上記表1の145の遺伝子のうち、配列番号1～36に示す36のDNAはNCBIで公開されている全アミノ酸配列データベースを用いてe-valueが0.01未満で検索した際に、該当する相同配列が存在せず、全微生物に対して新規のアミノ酸配列をコードする遺伝子である。また、表1の配列番号37～55に示す19のDNAは、e-valueが0.01未満且つカバー率が60%を超える条件で検索した際には該当する相同配列が存在しない遺伝子である。

したがって、これらの55遺伝子は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株について特に特異性が高く、当該菌株の特異的検出や当該菌株が有する固有の性質と同一の性質を保持する微生物のスクリーニング等に、より有用である。

[0017] 本発明のビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の特異的検出方法は、配列番号1～145で示される塩基配列からなるDNA又は該配列に相補的な塩基配列からなるDNAである遺伝子のいずれか1つ以上を標的とするものである。

当該検出方法は、具体的には、これらDNAに特異的に結合するオリゴヌ

クレオチドプローブを用いて検出するDNAプローブ法やこれらのDNAを増幅可能なプライマーを用いて増幅させる核酸増幅法が例示される。

核酸増幅法の一例として、配列番号1～145で示される塩基配列からなるDNA又は該配列に相補的な塩基配列からなるDNAを基に作製されるプライマーを用いて検体から抽出したDNAに対してPCR反応等を行い、増幅されたDNA断片を検出する方法が挙げられる。

[0018] ここで用いられるプライマーは、各DNAの5'末端及び3'末端部の塩基配列を基に、遺伝子全長を増幅するプライマーとして作製することができる。また、PCR法においては、通常2種類のプライマーを1組として用いることが好ましく、両者がリーディング鎖とラギング鎖との組み合わせになるようにする必要がある。

斯かるプライマーは、例えば自動DNA合成機によって容易に合成することができる。また、これらのプライマーはプローブとしても使用することができる。

[0019] PCR反応の条件は、通常のPCRの条件で行うことができる。例えば、二本鎖DNAを一本鎖にする熱変性反応を90～98℃、プライマーを鋳型cDNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応を37～72℃、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を50～75℃という温度条件で、これを1サイクルとしたものを1～数十サイクル行うことにより、行うことができる。なお、好ましい反応条件の一例としては、熱変性98℃10秒、アニーリング60℃30秒、伸長反応72℃120秒×30サイクルが挙げられる。

[0020] 前記プライマーは、後記実施例2に示すように、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株のDNAのみを増幅し、他のビフィドバクテリウム・ブレーベ株のDNAを増幅しないことから、電気泳動により増幅産物の有無を観察することにより、検体中、好ましくは検体中のビフィドバクテリウム・ブレーベの中からビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の存在の有無を把握することができる。

斯様に、本発明の145遺伝子を利用することにより、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株を遺伝子レベルで特異的に検出することができる。

[0021] 尚、検体中のDNAを抽出する方法としては、熱抽出法、アルカリ熱抽出法、フェノール・クロロホルム抽出法等を利用すればよい。抽出前の検体の培養に使用する培地は、検体を培養することができるものであれば特に限定されるものではなく、例えば、ビフィズス菌増殖用培地として知られるGAM培地を挙げることができる。また、培地には、グルコースやアガーを添加することができる。培養時間は、検体により異なるが、例えば、48～144時間、好ましくは72時間で行うことができ、培養温度は、ビフィドバクテリウム・ブレーベが好適に増殖できる条件であれば特に限定されないが、例えば34～40℃、好ましくは37℃で行うことができる。

[0022] 上記検体としては、微生物を含有する可能性があるものであれば特に限定されないが、例えば、結膜ぬぐい液、歯石、歯垢、喀痰、咽頭ぬぐい液、唾液、鼻汁、肺胞洗浄液、胸水、胃液、胃洗浄液、尿、子宮頸管粘液、膣分泌物、皮膚病巣、糞便、血液、腹水、組織、髄液、関節液、患部ぬぐい液などの生態由来試料、食品、医薬品、化粧品、食品・医薬品・化粧品の間処理物、微生物培養液、植物、土壌、活性汚泥、排水のような微生物を含有する可能性のある対象が挙げられる。

[0023] 出現したコロニーの懸濁に使用するバッファーとしては、特に限定されるものではなく、例えばTEバッファーが挙げられる。DNAの熱抽出法の一例として、加熱処理は、バッファー懸濁液を72～100℃で1～10分間、好ましくは98℃で2分間の処理を行う。遠心分離の条件は、4～30℃、6,000～15,000rpmで1～10分間、好ましくは、4℃、15,000rpm、5分間で行う。このようにして準備した上清液を鋳型DNA溶液としてPCR反応に供試すればよい。

[0024] また、前記プライマーを使用した定量的PCRを用いることで、検体中のビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株を定量することが

できる。定量的PCRの方法の一例として、International Journal of Food Microbiology (2008) Vol. 126, p210-215に記載の方法を挙げることができる。

[0025] また、本発明の遺伝子又はその発現産物の存在及び／又は発現量を指標とすることで、当該遺伝子を有し、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の固有の性質と同一の性質を保持する微生物をスクリーニングすることができる。すなわち、本発明の遺伝子又はその発現産物の存在及び／又は発現量を測定することにより、当該菌株が有する優れた特性を持った有用微生物をスクリーニングすることができる。これら遺伝子の発現産物としては、mRNAやポリペプチド等が挙げられる。ここで、遺伝子又はその発現産物の存在及び／又は発現量の測定は、当該遺伝子又はその発現産物を検出し得るプローブやプライマーを用いて、微生物における標的とする遺伝子の有無、コピー数や発現量をサザンハイブリダイゼーション法やノーザンハイブリダイゼーション法やDNAマイクロアレイやRT-PCR法により行うことができる。そして、当該遺伝子又はその発現産物の存在及び／又は発現量に基づき、目的の微生物を選択すればよい。

[0026] さらに、本発明の遺伝子を元来有しない他の微生物に、当該遺伝子を単独あるいは組み合わせて導入することで、当該菌株と同様か、或いはその機能が增強された遺伝子改変微生物を作出することができる。これら遺伝子の他の微生物への導入方法としては、DNAの取り込み能を利用したコンピテンズ法、プロトプラストを利用したプロトプラストPEG法及び高電圧パルスを利用したエレクトロポレーション法等を利用すればよい。また、遺伝子を微生物染色体に組み込む場合には、相同組換えを利用した方法、部位特異的に組み込む方法を用いることができる。

[0027] また、他の微生物が本発明の遺伝子に相当する遺伝子を有する場合には、当該遺伝子を改変することで、当該遺伝子の機能が增強又は抑制された遺伝子改変微生物を作出することもできる。遺伝子の改変には、これら遺伝子の発現阻害若しくは発現抑制、又は発現增強が挙げられる。

[0028] 遺伝子の発現を阻害するには、これら遺伝子を破壊、欠損すればよく、この方法としては、全く別のDNA断片を遺伝子の内部に挿入する挿入失活法や段階的な相同組換えによって標的遺伝子の一部又は全部を欠失する段階的二重交叉法を用いればよく、特に段階的二重交叉法が好ましい。具体的には、標的遺伝子の一部又は全部を欠失する場合には、欠失領域をはさむ両側の領域を染色体DNAから分離するか、あるいはPCR法によって増幅して分離し、例えばpYSS E 3のような大腸菌では増殖するが対象とする微生物中では複製が出来ないプラスミドベクターにそれら両DNA断片を本来の向きと同じ向きに並んだ状態でクローニングする。次に、得られる組換えプラスミドDNAを、欠失を起こさせようとする微生物にエレクトロポレーション法等を用いて導入し、生じる抗生物質耐性のクローンから、PCR法等によって目的の欠失領域の上流又は下流のクローニングした領域との相同領域で組換えを起こしてプラスミドが染色体上に挿入したクローンを選択する。こうして得たクローンを、抗生物質を含まない培地で継代培養を繰り返すことによって、プラスミドが再び近接して存在する相同領域間の組換えによって染色体から離脱し、菌の増殖に伴って消失することによって、抗生物質耐性をなくしたクローンを選択する。こうして得たクローンからPCR法等によって標的遺伝子領域を欠失したクローンを分離することができる。

[0029] 遺伝子の発現を抑制するには、標的遺伝子のmRNAの5'末端領域と相補的な短いRNAを合成することによる、いわゆるRNA干渉による方法や、これら遺伝子の発現を制御する領域又は制御遺伝子を破壊若しくは欠損等して改変する方法を用いることができ、特にこれら遺伝子の発現を制御する領域の改変が好ましい。具体的には、遺伝子の転写を制御するプロモーターの配列を改変することによって、これら遺伝子のmRNAへの転写量を少なくすることができる。

[0030] 遺伝子の発現を増強するには、これら遺伝子を運ぶ組換えプラスミドを対象とする微生物に導入すること、これら遺伝子を染色体の別の場所に部位特異的組換えによって組み込むことによって微生物内でのこれら遺伝子のコピー

一数を増加させること、これら遺伝子の発現を制御する制御領域を改変したり、制御遺伝子を改変し、mRNAへの転写量を多くすることによって発現を増加させる方法等によって行えばよいが、特にこれら遺伝子のコピー数を増加させる方法が好ましい。具体的には、1個の微生物細胞あたり複数個のコピー数を持つプラスミドに、対象とする遺伝子をその遺伝子の本来のプロモーター配列とリボソーム結合部位を含めてクローニングするか、別の遺伝子から分離した、あるいは化学合成によって作成したプロモーターとリボソーム結合部位の下流に該遺伝子のポリペプチドをコードする領域だけをつなげてクローニングした組換えプラスミドを作成し、微生物細胞内にエレクトロポレーション法などによって導入することによって、微生物細胞内での該遺伝子のコピー数を上げることができる。

[0031] ここで、遺伝子導入又は改変の対象となる微生物は、特に限定されるものではなく、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母等を用いることができる。

[0032] 上記スクリーニング方法により選択された微生物および上記遺伝子導入又は改変により得られた遺伝子改変微生物は、飲食品や医薬品として使用できる。この場合、菌体は、生菌又は加熱菌体（死菌体）のいずれでもよく、又は凍結乾燥したものであってもよく、あるいはこれら微生物を含む培養物を用いることでもよい。また、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の持つ優れた特性が保存されている限りは、菌体処理物を利用することも可能である。

[0033] 斯かる医薬品は、当該微生物を固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬品製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、

エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤、賦形剤等の慣用の添加剤を適宜添加することもできる。

[0034] また、当該微生物は、上記のような製剤とするだけでなく、飲食品に配合して使用することもできる。飲食品に配合する場合は、当該微生物をそのまま、または種々の栄養成分と共に含有せしめればよい。この飲食品は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株の持つ優れた特性に応じ、種々の薬理作用を発揮する保健用食品又は食品素材として利用できる。斯かる飲食品は、飲食品として使用可能な添加剤を適宜使用し、慣用の手段を用いて食用に適した形態、すなわち、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳に添加して使用したり、水、果汁、牛乳、清涼飲料、茶飲料等の飲料に添加して使用してもよい。なお、飲食品には、動物の飼料も含まれる。

[0035] さらに飲食品としては、当該微生物を利用した発酵乳、乳酸菌飲料、発酵豆乳、発酵果汁、発酵植物液等の発酵飲食品の例が挙げられる。これら発酵飲食品の製造は常法に従えばよい。例えば発酵乳を製造する場合は、まず、殺菌した乳培地に当該微生物を単独又は他の微生物と同時に接種培養し、これを均質化処理して発酵乳ベースを得る。次いで、別途調製したシロップ溶液を添加混合し、ホモゲナイザー等で均質化し、更にフレーバーを添加して最終製品に仕上げればよい。このようにして得られる発酵乳は、プレーンタイプ、ソフトタイプ、フルーツフレーバータイプ、固形状、液状等のいずれの形態の製品とすることもできる。

実施例

[0036] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例1 ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272 株に特異的な遺伝子の特定

以下の1)～3)に示す手順により、ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株ゲノム配列より、当該菌株に特異的な145遺伝子を特定した。

1) 遺伝子予測プログラムGene Hacker Plus (Yada, T. et al. 2001, DNA Research, 8, 97-106.)を用いて決定したビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株ゲノム配列上の全遺伝子領域について、各々の塩基配列を配列変換プログラムEMBOSS-Transseq (version 6.4.0.0)によりアミノ酸配列へと変換し、当該菌株の全アミノ酸配列を取得した。

[0037] 2) これらのアミノ酸配列について、公共データベース上 (Genbank, version 192.0) でゲノム情報が公開されているビフィドバクテリウム・ブレーベに属する細菌4菌株 (ビフィドバクテリウム・ブレーベ DSM 20213^T株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ ACS-071-V-Sch8b株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ UCC2003株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ CECT 7263株) の全遺伝子のアミノ酸配列に対し、検索プログラムNCBI-blastp (version 2.2.25+) による相同性検索を行った。ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の全1966個の遺伝子のうち、e-value (偶然に誤った検索結果が含まれる期待値) が0.01未満且つカバー率が60%を上回る相同配列が、対照とした4菌株全てに認められなかった161の遺伝子を、当該菌株に特異的な遺伝子の候補とした。

尚、「カバー率」は、検索にかけたビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株のアミノ酸配列の全長に対して、他菌株との間に配列類似性が認められる領域が占める割合を意味し、以下のように算出される。「カバー率」= (「アライメント長」-「ギャップ数」) / 「ビフィドバクテリウム・ブレーベ YIT 12272株の検索アミノ酸配列長」×100

[0038] 3) 次に、上記の161の遺伝子の塩基配列について、公共データベース上 (Genbank, version 192.0) でゲノム全長の塩基配

列が公開されているビフィドバクテリウム・ブレーベに属する細菌2菌株（ビフィドバクテリウム・ブレーベ ACS-071-V-Sch8b株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ UCC2003株）のゲノム配列に対し、検索プログラムNCBI-blastn (version 2.2.25+)による相同性検索を行った。このうち、e-valueが0.01未満且つカバー率が100%且つギャップ数が0となる相同配列が、対照とした2菌株いずれにも認められなかった145の遺伝子（前記〔表1〕）を、ビフィドバクテリウム・ブレーベに属する細菌の中でYIT 12272株を特異的に検出するための遺伝子として抽出した。

[0039] 上記表1の145の遺伝子のうち、配列番号1～36に示す36の遺伝子は、米国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information、NCBI）で公開されている全アミノ酸配列データベースを用いてe-valueが0.01未満で検索した際に、該当する相同配列が存在せず、全微生物に対して新規のアミノ酸配列をコードする遺伝子である。

また、表1の配列番号37～55に示す19の遺伝子は、e-valueが0.01未満且つカバー率が60%を超える条件で検索した際には該当する相同配列が存在しない遺伝子である。

[0040] 実施例2 特異的遺伝子の配列に基づいた特異的プライマーの作製

（1）プライマーの作製

配列番号1～145の本発明の遺伝子からランダムに選出した表2に示す18遺伝子を対象として、各遺伝子の5'末端及び3'末端部の塩基配列を基に、遺伝子全長を増幅するプライマーをDNA合成機を用いて作製した（表2、配列番号146～181）。

また陽性対照として、16SrRNA遺伝子の共通配列領域、及びビフィドバクテリウム・ブレーベの菌種内での配列共通性が極めて高いdnaA遺伝子を用い、これらの領域を増幅するプライマーを同様に作製した（表2、配列番号182～185）。

[0041] [表2]

配列番号	標的遺伝子	プライマー名	配列(5'...3')
146	SPC0001	0001-F	ATGACCATACGAATCGAAGCATACGACC
147	SPC0001	0001-R	TTAATTCTCGGAGCCAAGAATCAAGTCC
148	SPC0007	0007-F	ATGCTGTTCAAGCTCAAGGACTTCCAAG
149	SPC0007	0007-R	TCAACTATAGTTTTTGCCTAGTTGCCGG
150	SPC0013	0013-F	ATGGCATTAGATGTTGGTAAAGCGTTGAA A
151	SPC0013	0013-R	TCACACCGTGAGCTTCTTGTCCACC
152	SPC0019	0019-F	ATGGTCAACGTCCTTGGTCAACCCG
153	SPC0019	0019-R	CTAGCAACCCACCTTCTCTTCGATTG
154	SPC0027	0027-F	ATGCTGCTCTCCCTCGCATGGCTGC
155	SPC0027	0027-R	TCATTGCTGGTCCTCTCTTTTCGGTG
156	SPC0037	0037-F	ATGAGCTCACTGCTATACGGGCGGG
157	SPC0037	0037-R	TCATGCGGCCTCGTCCAGTTCGCCC
158	SPC0038	0038-F	ATGATGGGCGTCGTGCAGGAGACCA
159	SPC0038	0038-R	TCACTGCTTATCCTCCGTTTCCGCC
160	SPC0045	0045-F	ATGCAGGTCATCAACGGCATCCGAT
161	SPC0045	0045-R	TCACCCCTCCTTTTTTGGTGGTCTTG
162	SPC0048	0048-F	ATGGCATCACAGTTTGCCCCGTTGA
163	SPC0048	0048-R	TCACGTCTCGTTCCTTTCCTGGGCC
164	SPC0049	0049-F	GTGAGCGGAATCAACCAGACCCGC
165	SPC0049	0049-R	TCATCCGGTGACCGTGCCCTTGTTTC
166	SPC0057	0057-F	ATGCGTCATCTCGTATCTTCCGACATC
167	SPC0057	0057-R	TTACGTGAGTACGGAGCGAATCTGC
168	SPC0085	0085-F	ATGAAAACGGGGGCAATCAGGGAAAAAG
169	SPC0085	0085-R	TTAGCCGAGAGCTAATGCACGCGGC
170	SPC0094	0094-F	GTGCCGCGCACGCTGGCGGTCGACA
171	SPC0094	0094-R	CTATTTGGTCATGAGGGCGTTTCGG
172	SPC0098	0098-F	ATGGCCATGGATTGGAAGACCGTGG
173	SPC0098	0098-R	TCATTGCCGTTCTCCGAACATGAGAC
174	SPC0101	0101-F	ATGACGACAAGTCTGATCGGCAAAGG
175	SPC0101	0101-R	TCAGTCATTGCTTTTATCCTTCGTCCTG A
176	SPC0105	0105-F	ATGGAACCAATCAAGGATGACGGACG
177	SPC0105	0105-R	CTACATATACACATGAGGTAATGGATACC G
178	SPC0112	0112-F	GTGAGGGAGCTGCACGCCTGGATGG
179	SPC0112	0112-R	CTACCAATGGGGCATGAAACGCGGG
180	SPC0120	0120-F	ATGAATAAGACGGAGATTATGGATCCGAT G
181	SPC0120	0120-R	TTAATCGACAACATAGCTTTCATCGGCTT C
182	16SrRNA	16S-F	GGGTTCGATTCTGGCTCAGGATGAA
183	16SrRNA	16S-R	CCGGTACGGCTACCTTGTTACGAC
184	dnaA	dnaA-F	ATGGTTGATGTTTCCGGTGACCCCA
185	dnaA	dnaA-R	TCAGTCTGCGTTCTGCTTCAAACGC

[0042] (2) 鋳型DNAの抽出

表3に示した由来の異なるビフィドバクテリウム・ブレーベに属する13菌株を、GAM培地（日水製薬社製）に1%グルコース及び1.5%アガーを添加した平板培地にて嫌氣的に37℃で72時間培養した。出現したコロニーの1つを50μLのTEバッファー（10mM Tris、1mM EDTA、pH8.0）に懸濁し、98℃で2分間処理してDNAを抽出した。加熱処理後は直ちに氷冷し、4℃、15,000rpmで5分間遠心した上清を鋳型DNA溶液として下記のPCR反応に供試した。

[0043] [表3]

菌株名	備考	
<u>Bifidobacterium breve</u>	YIT 12272	
<u>Bifidobacterium breve</u>	DSM 20213 ^T	基準株(ATCC 15700 ^T)、ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	B10	乳製品由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	G2	乳製品由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	ATCC 15698	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	ATCC 15701	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	AB1-1	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	SZ3-1	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	AS40-7	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	OO4-2	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	SN58-1	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	HY56-2	ヒト由来
<u>Bifidobacterium breve</u>	IS9-8	ヒト由来

[0044] (3) PCR反応

7.5μLのEmerald Amp PCR Master Mix（タカラ社製）、0.2μM プライマー、0.5μLの鋳型DNA溶液を水で総量を15μLとした反応液を、iCycler（バイオ・ラッド社製）により、98℃10秒、60℃30秒、72℃120秒で30サイクルのPCR反応を行った。

[0045] (4) Y I T 1 2 2 7 2 株の特異的検出

上記PCR反応による増幅産物の有無から各プライマーと各菌株DNAとの結合能を観察することにより、表2に示した18遺伝子がビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株に特異的な遺伝子であるか、及びこれら遺伝子が当該菌株を特異的に検出することに利用できるかを検証した。PCR反応後の反応液に対して、M u p i d - e x U (アドバンス社製)を用いて、1%アガロースゲルによる100V、25分の電気泳動を行い、0.5mg/mlのエチジウムブロマイドにて染色後、UV照射下で増幅産物を観察した。各プライマーを用いた時の増幅産物の有無は表4に示す通りとなった。これより、表2に示した18遺伝子がビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株に特異的であること及びこれら遺伝子を当該菌株を特異的に検出することに利用できることが明らかとなった。

[0046]

[表4]

[illegible]

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号 1 ～ 1 4 5 に示される塩基配列からなる DNA 又は該配列に相補的な塩基配列からなる DNA である、ビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株を特異的に検出するための遺伝子。
- [請求項2] 配列番号 1 ～ 3 6 に示される塩基配列からなる DNA 又は該配列に相補的な塩基配列からなる DNA である請求項 1 記載の遺伝子。
- [請求項3] 配列番号 3 7 ～ 5 5 に示される塩基配列からなる DNA 又は該配列に相補的な塩基配列からなる DNA である請求項 1 記載の遺伝子。
- [請求項4] 請求項 1 記載の遺伝子のいずれか 1 つ以上を標的とすることを特徴とするビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株の特異的検出方法。
- [請求項5] 請求項 1 記載の遺伝子のいずれか 1 つ以上を標的とすることを特徴とするビフィドバクテリウム・ブレーベ Y I T 1 2 2 7 2 株の定量方法。
- [請求項6] 請求項 1 記載の遺伝子又はその発現産物のいずれか 1 つ以上の存在及び／又は発現量を指標とすることを特徴とする当該遺伝子を有する微生物のスクリーニング方法。
- [請求項7] 請求項 6 記載のスクリーニング方法により選択された微生物。
- [請求項8] 請求項 1 記載の遺伝子のいずれか 1 つ以上を導入すること、及び／又は請求項 1 記載の遺伝子のいずれか 1 つ以上を標的として微生物の遺伝子を改変することを特徴とする遺伝子改変微生物の作出方法。
- [請求項9] 請求項 8 記載の作出方法により得られた遺伝子改変微生物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/056537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(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)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/20, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/68

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	WO 2011/105335 A1 (Yakult Honsha Co., Ltd.), 01 September 2011 (01.09.2011), entire text & US 2012/0329059 A1 & EP 2540816 A1 & CN 102770528 A	$\frac{7}{1-9}$
$\frac{X}{Y}$	WO 2011/083738 A1 (Yakult Honsha Co., Ltd.), 14 July 2011 (14.07.2011), claims 31, 38 & US 2013/0004463 A1 & EP 2522355 A1	$\frac{7}{1-9}$
Y	Takashi SATO et al., "Genome Analysis of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria : Genome Analysis of Lactobacillus casei and Bifidobacterium breve", Journal of intestinal microbiology, 2004, vol.18, pages 135 to 140	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
02 June, 2014 (02.06.14)

Date of mailing of the international search report
10 June, 2014 (10.06.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/056537

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIMENEZ, E. et al., "Complete genome sequence of Bifidobacterium breve CECT 7263, a strain isolated from human milk.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2012.07, Vol.194, No.14, P.3762-3763	1-9
Y	BOURGET, N. et al., "Analysis of the genome of the five Bifidobacterium breve strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and rrn loci number.", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1993, Vol.110, No.1, P.11-20	1-9
Y	Takashi SASAKI, "Genome Analysis of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria : Applications of Genome Sequence Information of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria", Journal of intestinal microbiology, 2004, vol.18, pages 129 to 134	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(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. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/20, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/68

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

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

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
<u>X</u> Y	WO 2011/105335 A1（株式会社ヤクルト本社）2011.09.01, 全文 & US 2012/0329059 A1 & EP 2540816 A1 & CN 102770528 A	<u>7</u> 1 - 9
<u>X</u> Y	WO 2011/083738 A1（株式会社ヤクルト本社）2011.07.14, 請求項 3 1、3 8 等 & US 2013/0004463 A1 & EP 2522355 A1	<u>7</u> 1 - 9
Y	佐藤隆、外 3 名, 「乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析: Lactobacillus casei と Bifidobacterium breve のゲノム解析」, 腸内細菌学雑誌, 2004, Vol.18, P.135-140	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

0 2 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 6 . 2 0 1 4

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）

野村 英雄

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

4 B

4 1 5 5

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	JIMENEZ, E. et al., "Complete genome sequence of Bifidobacterium breve CECT 7263, a strain isolated from human milk.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2012.07, Vol.194, No.14, P.3762-3763	1 - 9
Y	BOURGET, N. et al., "Analysis of the genome of the five Bifidobacterium breve strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and rrn loci number.", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1993, Vol.110, No.1, P.11-20	1 - 9
Y	佐々木隆, 「乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析: 乳酸菌・ビフィズス菌ゲノム解読情報の応用」, 腸内細菌学雑誌, 2004, Vol.18, P.129-134	1 - 9