

(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  
2024年9月12日(12.09.2024)



(10) 国際公開番号  
**WO 2024/185738 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*A61K 35/741* (2015.01) *C12Q 1/04* (2006.01)  
*A23L 33/135* (2016.01) *C12N 1/20* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/008014
- (22) 国際出願日: 2024年3月4日(04.03.2024)
- (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 2023-034667 2023年3月7日(07.03.2023) JP  
63/599,806 2023年11月16日(16.11.2023) US
- (71) 出願人:慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP];  
〒1088345 東京都港区三田二丁目15番  
45号 Tokyo (JP). J S R 株式会社 (JSR

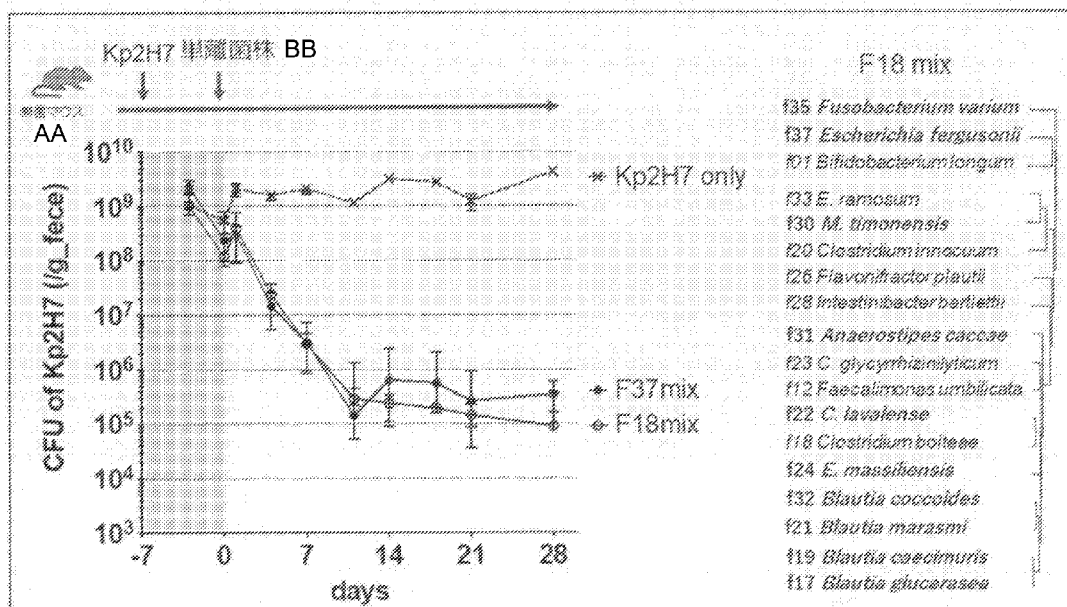
CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者: 本田 賢也(HONDA Kenya); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 古市 宗弘(FURUICHI Munchiro); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 長谷川 有美(HASEGAWA Naomi); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 笹島 悟史(SASAJIMA Satoshi); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 新幸二(ATARASHI Koji); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 大宅 喬(OHYA Takashi); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 青戸 良賢(AOTO Yoshimasa);

(54) Title: ANTIBACTERIAL COMPOSITION COMPRISING GLUCONIC ACID-CONSUMING BACTERIA AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: グルコン酸消費菌を有効成分とする抗菌組成物

[図1]



AA Germ-free mouse  
BB Isolate strain

(57) Abstract: Provided is an antibacterial composition against a second bacterium that consumes gluconic acid, such as inflammation-inducing bacteria and drug-resistant bacteria, the composition containing, as an active ingredient, a first bacterium that consumes gluconic acid.

(57) 要約: グルコン酸を消費する第1の細菌を有効成分として含有する、炎症惹起性細菌、薬剤耐性細菌といったグルコン酸を消費する第2の細菌に、対する抗菌組成物。

WO 2024/185738 A1

〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS);  
〒1040031 東京都中央区京橋2-8-21 仁大ビル9階 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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, ME, 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))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 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))

## 明 細 書

発明の名称： グルコン酸消費菌を有効成分とする抗菌組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、グルコン酸消費菌を有効成分とする抗菌組成物に関し、より詳しくは、グルコン酸を消費する第1の細菌を有効成分として含有する、グルコン酸を消費する第2の細菌に対する抗菌組成物に関する。本発明はまた、グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法に関する。

### 背景技術

[0002] 消化管や口腔等の粘膜には多様な常在細菌が存在し、全体としてフローラを形成している。常在菌フローラは、宿主の生理や健康維持に対して非常に大きな役割を果たしている。常在菌フローラの構成異常は *Dysbiosis* とよばれ、様々な疾患の原因となっていることが徐々に明らかになってきている。粘膜常在菌フローラの解明が進めば、様々な疾患に対する新たな疾病対策・治療開発に結びつく可能性が高いものの、その複雑さから詳細なメカニズムは十分明らかになっていない。

[0003] かかる粘膜常在菌に関し、本発明者らは、クローン病等の患者の唾液に含まれる菌（口腔内細菌）から、腸内（腸管）に定着し *Th1* 細胞を誘導することによって、当該疾患の発症に関与する菌を、単離培養し同定することに成功している（特許文献1）。より具体的には、本発明者らは、あるクローン病患者由来唾液を無菌マウスに経口投与した結果、大腸において *IFN- $\gamma$*  産生性 *CD4* 陽性 *T* 細胞（*Th1* 細胞）が著増することを、見出している。そして、この *Th1* 細胞の増加が見られたマウスの腸内から、クレブシエラニューモニエに属すると考えられる *Kp2H7* 株を単離培養することに成功している。さらに、クローン病患者の唾液由来の当該菌が、腸管に定着し、*Th1* 細胞の増殖又は活性化を誘導することによって、腸炎の発症に関与していることも、明らかにしている。

[0004] さらに、本発明者らは、ヒト腸内細菌において、Th1細胞誘導性細菌の腸内定着を抑制する細菌の存在を想定し、それらの同定を試みた。その結果、健康人（被験体番号：#F）由来の糞便試料から、37株の腸内細菌株を単離培養し、また各菌株の16S rDNAの配列を決定することに成功した。さらに、これら細菌株投与によって、Th1細胞誘導性細菌の腸内定着が抑制されることを明らかにしている（特許文献2）。

[0005] また、前述のTh1細胞誘導性細菌の腸内定着を抑制する細菌（健康人#F由来の腸内細菌37株、健康人#I由来の腸内細菌42株、健康人#K由来の腸内細菌47株等）は、多剤耐性細菌及び炎症惹起性細菌の腸内定着を抑制できることも明らかにしている。

[0006] また、このような腸内における細菌定着抑制能に関し、健康人#F由来の腸内細菌37株において重複している菌を除いた、腸内細菌31株（F31mix）を選択し、さらにこれらと同程度の細菌定着抑制能を発揮し得る18株（F18mix）を選抜することにも、本発明者らは成功している（特許文献3）。

[0007] しかしながら、かかる腸内細菌株が、どのようなメカニズムによって、Kp2H7株等の炎症惹起性細菌、薬剤耐性細菌の腸内定着を抑制できるかが、明らかになっていなかった。

## 先行技術文献

## 特許文献

- [0008] 特許文献1：国際公開第2018/084172号  
特許文献2：国際公開第2019/017389号  
特許文献3：国際公開第2020/179868号

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、炎症惹起性細菌、薬剤耐性細菌等の腸内定着を抑制できるメカニズムを明らかに

し、かかる細菌に対する抗菌組成物を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、前記目的を達成すべく、先ず、トランスポゾンを用い、K p 2 H 7 株の変異体ライブラリ (K p 2 H 7 \_\_ t p) を作製した。そして、当該ライブラリを無菌マウスに投与し、次いで F 1 8 m i x 又は F 3 1 m i x から当該 F 1 8 m i x を除いた 1 3 菌株 (F 3 1 - 1 8 m i x) を投与し、便中に含まれる K p 2 H 7 株においてどの遺伝子に変異が入っているか、またその変異株がどのくらいの割合で存在しているかを、経時的に解析した。その結果、F 3 1 - 1 8 m i x 投与群及び K p 2 H 7 \_\_ t p のみを投与した群では g n t R に変異の入った株が優勢となった一方で、F 1 8 m i x を投与した群では徐々に g n t R 変異株の減少が認められた。
- [0011] g n t R はグルコン酸の代謝に関連する遺伝子である。図 5 A に示すように、クレブシエラ、大腸菌等は、糖類の代謝経路として通常の解糖系 (E M P パスウェイ) の他に、E n t n e r - D o u d o r o f f p a t h w a y (E D パスウェイ) を有しており、グルコン酸はこの E D パスウェイに直接入り 3 ステップでピルビン酸に代謝される。g n t R は、グルコン酸を E D パスウェイを介して代謝する遺伝子である g n t U、g n t K、e d d 及び e d a に対して抑制的に働いていることが知られている。
- [0012] しかしながら、g n t R に変異があると、図 5 B に示すように、グルコン酸の代謝に対する抑制がなくなるため、E D パスウェイがよく回るようになり、グルコン酸が多い環境では、g n t R 変異株は生存に有利になることが予想される。つまり、マウスの腸内において、K p 2 H 7 \_\_ t p のみが投与された、又は、更に F 3 1 - 1 8 m i x が投与された状況は、グルコン酸が多い環境だと、本発明者らは推測した。
- [0013] 一方、F 1 8 m i x 存在下では、g n t R 変異株の優位性が失われていることから、環境中のグルコン酸が少なく、クレブシラが重要な炭素源であるグルコン酸を利用できなくなっている。つまり、F 1 8 m i x がグルコン酸を利用することで、腸内のグルコン酸が減少した結果と本発明者らは考えた

- 。
- [0014] そこで、前記推測に基づき、鋭意研究を重ねた結果、K p 2 H 7 株等と F 3 1 m i x における 1 0 種の細菌（F 1 8 m i x における 8 種の細菌を含む）とは共にグルコン酸を消費する細菌であり、このグルコン酸消費において競合することによって、前記 1 0 種の細菌等は、K p 2 H 7 株等の腸内定着を抑制していることを、本発明者らは見出した。また同様に、上記健常人 # 1 由来の腸内細菌 4 2 株においては 9 種の細菌、健常人 # K 由来の腸内細菌 4 7 株においては 1 3 種の細菌がグルコン酸を消費する細菌であることが、明らかになった。
- [0015] さらに、かかるグルコン酸消費菌の遺伝子を解析した結果、これら細菌の多数においては、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子又はグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とが、同一の遺伝子クラスターに含まれていることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0016] すなわち、本発明は以下の態様を提供する。
- [0017] [ 1 ] グルコン酸を消費する第 1 の細菌を有効成分として含有する、グルコン酸を消費する第 2 の細菌に対する抗菌組成物。
- [0018] [ 2 ] 第 1 の細菌が、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌である、[ 1 ] に記載の組成物。
- [0019] [ 3 ] 第 1 の細菌が、グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌である、[ 1 ] に記載の組成物。
- [0020] [ 4 ] グルコン酸を低濃度で含有する食品と組み合わせて摂取させる、[ 1 ] ~ [ 3 ] のうちのいずれか 1 項に記載の組成物。
- [0021] [ 5 ] 前記食品と同時に又は異時に摂取させる、[ 4 ] に記載の組成物。
- [0022] [ 6 ] 第 2 の細菌が、グルコン酸を消費しかつ疾患を惹起する細菌である

、 [ 1 ] ~ [ 5 ] のうちのいずれか 1 項に記載の組成物。

[0023] [ 7 ] 医薬組成物である、 [ 6 ] に記載の組成物。

[0024] [ 8 ] グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法であって、被験細菌についてグルコン酸消費能を検出する工程、及び

前記工程にて前記消費能を有することが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、方法。

[0025] [ 9 ] グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法であって、

被験細菌について、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを検出する工程、及び

前記工程にて検出された遺伝子が、同一の遺伝子クラスターに含まれていることが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、方法。

[0026] [ 1 0 ] グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法であって、

被験細菌について、グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを検出する工程、及び

前記工程にて検出された遺伝子が、同一の遺伝子クラスターに含まれていることが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、方法。

[0027] [ 1 1 ] グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌。

[0028] [ 1 2 ] グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トラン

スポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌。

## 発明の効果

[0029] 本発明によれば、前記32種（上記健常人#F由来の10種、上記健常人#I由来の9種、上記健常人#K由来の13種）のようなグルコン酸消費菌（第1の細菌）等をもって、炎症惹起性細菌又は薬剤耐性細菌等（第2の細菌）のグルコン酸消費と競合することにより、当該細菌の腸内定着を抑制することが可能となる。ひいては、第2の細菌が惹起する疾患を、予防又は治療することも可能となる。また、本発明によれば、グルコン酸消費能を指標として、第2の細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングすることも可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0030] [図1]無菌マウスにクレブシエラ（Kp2H7株）を投与し、その1週間後に、健常人#Fの便サンプルから単離した腸内細菌37株（F37mix）又は18株（F18mix）を投与した時の、便中Kp2H7株の菌量の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図2]トランスポゾンを用いたKp2H7株変異体ライブラリ作製の概要を示す、図である。

[図3]無菌マウスに前記Kp2H7株変異体ライブラリ（Kp2H7\_\_tp）を投与し、その1週間後に、F18mix又はF31mixから当該F18mixを除いた13菌株（F31-18mix）を投与した時の、便中Kp2H7株の菌量の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図4]図3に示す試験工程にて、day0、4、10及び28に回収した便中、Kp-2H7において変異が導入された遺伝子を解析し（Tn-seq）、その割合を示した、グラフである。図中、全ての回収時点で変異導入率が1%以下の遺伝子は黒塗りにて示す。白の棒グラフは、gntR遺伝子を示す。

[図5A]クレブシエラ等が有する、通常の解糖系（EMPパスウェイ）とEntner-Doudoroff（ED）パスウェイとの概要を示す図である

。

[図5B] *gntR* 遺伝子に変異がある場合の、EMPパスウェイとEDパスウェイの進み方における変化の概要を示す図である。

[図6] 無菌マウス (GF) に、F18mix又はF31-18mixを投与した時の、便中グルコン酸濃度を測定した結果を示す、グラフである。

[図7] 無菌マウスにKp2H7株を投与し、その1週間後に、F18mixを投与した時の、便中グルコン酸濃度の継時的変化を示したグラフである。

[図8] 炭素源としてグルコース又はグルコン酸のみが含まれる *minimum medium* を用いた、Kp-2H7の野生株 (Kp\_wt)、*gntK* 欠損株 (Kp\_Δ*gntK*) 及び *gntR* 欠損株 (Kp\_Δ*gntR*) の増殖試験の結果を示す、グラフである。

[図9] 無菌マウスに、Kp2H7の野生株と *gntR* 欠損株とを同量混ぜて投与し、2日後にF18mix又はF31-18mixを投与した時の、便中のクレブシエラの菌量 (CFU) と、便中の変異株と野生株との菌量比 (Competition index (Δ*gntR*/WT)) とを示す、グラフである。

[図10] 無菌マウスに、Kp2H7の野生株と *gntK* 欠損株とを同量混ぜて投与し、2日後にF18mix又はF31-18mixを投与した時の、便中のクレブシエラの菌量 (CFU) と、便中の変異株と野生株との菌量比 (Competition index (Δ*gntK*/WT)) とを示す、グラフである。

[図11] Kp2H7及びF18mixを定着させた無菌マウスに、グルコン酸 (GA) の含有濃度を0%、2.5%又は10%とする餌を与え、その1週間後の便中のクレブシエラ菌量を示す、グラフである。

[図12] 無菌マウスに、Kp2H7株を投与し、2日後にF18mix又はF31-18mixを投与した時の、Kp2H7株における *gntK* 遺伝子の発現を解析した結果を示す、グラフである。

[図13] 健常人 #Fの便サンプルから単離した腸内細菌31株について、グル

コン酸消費濃度をLC-MSを用いて測定した結果を示す、グラフである。当該グラフにおいては、独立した試験を3回行い、得られた測定濃度の平均値を示す。

[図14]病原微生物について、グルコン酸消費濃度をLC-MSを用いて測定した結果を示す、グラフである。

[図15]無菌マウスにKp2H7株を投与し、その1週間後に、F18mix、F8mix又はF10mixを投与した時の、便中Kp2H7株の菌量の継時的変化をCFUにて示したグラフである。F8mixは、図13にて示す、F18mixにおいてグルコン酸消費能を有すると認められた8菌株を示す。F10mixは、F18mixからF8mixを除いた10菌株を示す。

[図16A]無菌マウスにKp2H7株を投与し、その1週間後にF18mixを投与し、さらにその21日目から、グルコン酸(GA)の含有濃度を0%、2.5%又は10%とする餌を与えた場合の、便中Kp2H7株の菌量の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図16B]図16Aに示す試験にて、Day28における便中Kp2H7株の菌量の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図16C]図16Aに示す試験にて、便中のKp2H7株及びF18mixの各菌量(相対量)の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図16D]図16Aに示す試験にて、便中のKp2H7株及びF18mixの各菌量(絶対量)の継時的変化をCFUにて示したグラフである。

[図17A]無菌マウスに、Kp-2H7単独、又は、Kp-2H7及びF18mixを投与し、その2日後に糞便サンプルを採取し、便中の菌のRNA-seq解析を行った結果を示す、グラフである。図中、「Kp+F18-mix > Kp only」において、Kp-2H7単独投与群と比較して、Kp-2H7及びF18mix投与群にて、発現が増加していた遺伝子で構成されるパスウェイを示す。「Kp+F18-mix < Kp only」において、Kp-2H7単独投与群と比較して、Kp-2H7及びF18

m i x 投与群にて、発現が減少していた遺伝子で構成されるパスウェイを示す。

[図17B]無菌マウスに、K p - 2 H 7 単独、又は、K p - 2 H 7 及び F 1 8 m i x を投与し、その2日後に糞便サンプルを採取し、便中の菌における糖代謝に関与する遺伝子の発現プロファイルを示す、ヒートマップである。

[図18A]グルコン酸を含む栄養豊富な飼料、又は、含まない飼料を与えて飼育した、無菌マウスの便中グルコン酸濃度を解析した結果を示す、グラフである。図中、「G F o n C L - 2」は、グルコン酸を含む栄養豊富な飼料摂取群の結果を示し、「G F o n A I N 9 3 G」は、グルコン酸を含まない飼料摂取群の結果を示す。

[図18B]グルコン酸を含む栄養豊富な飼料 (C L - 2) を与えて飼育している無菌マウスに K p - 2 H 7 を投与し、21日目にグルコン酸を含まない飼料 (A I N 9 3 G) に変更し、便中の K p - 2 H 7 濃度を経時的に解析した結果を示す、グラフである。

[図19A]健常人 # F、# K、# I から単離した各細菌株を、300  $\mu$ M のグルコン酸を含む培地中で培養し、培養上清中のグルコン酸濃度を測定した結果と、各菌株における、古典的経路 (グルコン酸キナーゼ) に関する遺伝子クラスターの概要を示す、図である。

[図19B]健常人 # F、# K、# I から単離した各細菌株を、300  $\mu$ M のグルコン酸を含む培地中で培養し、培養上清中のグルコン酸濃度を測定した結果と、各菌株における、代替的経路 (グルコン酸脱水素酵素) に関する遺伝子クラスターの概要を示す、図である。

[図19C]健常人 # F、# K、# I から単離した各細菌株を、300  $\mu$ M のグルコン酸を含む培地中で培養し、培養上清中のグルコン酸濃度を測定した結果と、各菌株における、グルコン酸トランスポーターに関する遺伝子クラスターの概要を示す、図である。

[図19D]健常人 # F、# K、# I から単離され、グルコン酸代謝に関与する遺伝子の保有が認められない各細菌株を、300  $\mu$ M のグルコン酸を含む培

地中で培養し、培養上清中のグルコン酸濃度を測定した結果を示す、図である。

[図19E]グルコン酸キナーゼ又はグルコン酸脱水素酵素が関与する、グルコン酸代謝経路（古典的経路又は代替的経路）の概要を示す、図である。

[図20]無菌マウスに、健常人# Fの糞便試料から単離した腸内細菌18株（F18mix）若しくは13株（F13mix）を投与し、又は何も投与せず、その2週間後にKp2H7株を投与し、当該菌株の便中濃度の経時的変化を解析した結果を示す、グラフである（各投与群4匹）。

### 発明を実施するための形態

[0031] 本発明者らは従前、健常人# F由来の糞便試料から単離培養した37種の腸内細菌株（下記表1に示す37種の細菌）によって、Kp2H7株といった炎症惹起性細菌等の腸内定着を抑制できることを見出している。また、本発明者らは、前記腸内細菌37株において重複している菌を除いた腸内細菌31株（F31mix）を選択し、さらに、これらと同程度の腸内定着抑制能を発揮し得る18株（F18mix）を選抜することにも、本発明者らは成功している。

[0032]

[表1]

No.	菌別番号	菌種情報			F31 mix	F18 mix	グルコン酸 産生能
		菌別の表示	発注番号 (NITE BP)	発注日			
f01	1	f1_42146	3147	2020年3月2日	●	●	~
f02	2	-	-	-	●	-	~
f03	3	-	-	-	●	-	~
f04	4	-	-	-	●	-	~
f05	5	-	-	-	●	-	~
f06	6	-	-	-	-	-	h.d.
f07	7	-	-	-	●	-	~
f08	8	-	-	-	-	-	h.d.
f09	9	-	-	-	●	-	~
f10	10	f10_4313	3800	2023年1月12日	●	-	+
f11	11	-	-	-	●	-	~
f12	12	f12_42146	3148	2020年3月2日	●	●	~
f13	13	-	-	-	●	-	~
f14	14	-	-	-	●	-	~
f15	15	-	-	-	-	-	h.d.
f16	16	-	-	-	●	-	~
f17	17	f17_4217	3149	2020年3月2日	●	●	+
f18	18	f18_4212	3150	2020年3月2日	●	●	+
f19	19	f19_4312	3151	2020年3月2日	●	●	~
f20	20	f20_4311	3152	2020年3月2日	●	●	+
f21	21	f21_4248	3153	2020年3月2日	●	●	+
f22	22	f22_4313	3154	2020年3月2日	●	●	+
f23	23	f23_4244	3155	2020年3月2日	●	●	+
f24	24	f24_4214	3156	2020年3月2日	●	●	~
f25	25	-	-	-	-	-	h.d.
f26	26	f26_4242	3157	2020年3月2日	●	●	~
f27	27	-	-	-	-	-	h.d.
f28	28	f28_43A3	3158	2020年3月2日	●	●	~
f29	29	f29_4318	3801	2023年1月12日	●	-	+
f30	30	f30_43A5	3159	2020年3月2日	●	●	~
f31	31	f31_4315	3160	2020年3月2日	●	●	~
f32	32	f32_42A7	3161	2020年3月2日	●	●	+
f33	33	f33_4312	3162	2020年3月2日	●	●	~
f34	34	-	-	-	●	-	~
f35	35	f35_4218	3163	2020年3月2日	●	●	~
f36	36	-	-	-	-	-	h.d.
f37	37	f37_42G1	3164	2020年3月2日	●	●	+

[0033] なお、前記表1に記載の37種の細菌は、特許文献2及び3に記載のf01~f37に対応する。それらの16S rDNAの配列を各々、配列番号：1~37において示す。「F31mix」及び「F18mix」は、上記のとおり、特許文献3にて選抜された細菌であり、これらに属する細菌は、前

記表1において黒丸をもって各々示す。さらに、37種において微生物寄託してある細菌については、前記表1において、それらの識別の表示、受託番号及び受託日を示してある。また、これら寄託細菌株は、いずれも独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NITE、〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている。

[0034] そして今回、Kp2H7株等とF31mixにおける10種の細菌（F18mixにおける8種の細菌を含む）とは共にグルコン酸を消費する細菌であり、このグルコン酸消費において競合することによって、前記10種の細菌等は、Kp2H7株等の腸内定着を抑制していることを、本発明者らは明らかにした。なお、当該10種の細菌は、表1において+（プラス）をもって示す。一方、-（マイナス）はグルコン酸を消費しない細菌であることを示す。また「n. d.」は、グルコン酸消費能の評価を行っていない細菌であることを示す。

[0035] 本発明者らはまた、健常人#1由来の糞便試料から単離培養した42種の腸内細菌株（下記表2における114を除く42種の細菌）によって、Kp2H7株といった炎症惹起性細菌等の腸内定着を抑制できることを見出している。なお、前記表2に記載の101~113及び115~143は、特許文献2及び3に記載の101~113及び114~142に各々対応する。また、それらの16SrDNAの配列を各々、配列番号：168~209において示す。

[0036]

[表2]

No.	Species	配列番号	subject id	NCBI TAX ID	% identity	グルコン酸誘導体
101	<i>Bifidobacterium faecale</i>	168	NR_123882.1	1454229	98.96	+
102	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	169	NR_037117.1	20926	99.63	+
103	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	170	NR_044771.1	1681	100.00	~
104	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	NR_145539.1	1931217	99.70	~
105	<i>Collinsella aerofaciens</i>	172	NR_113316.1	74426	99.92	~
106	<i>Collinsella aerofaciens</i>	173	NR_113316.1	74426	99.72	~
107	<i>Bifidobacterium longum</i>	174	NR_145539.1	1931217	99.70	~
108	<i>Bacteroides stercoris</i>	175	NR_112943.1	449873	99.18	~
109	<i>Bacteroides massiliensis</i>	176	NR_042745.1	204516	99.70	~
110	<i>Bacteroides vulgatus</i>	177	NR_074510.1	435990	100.00	~
111	<i>Bacteroides dorei</i>	178	NR_041351.1	257276	100.00	~
112	<i>Parabacteroides merdae</i>	179	NR_041343.1	46503	99.65	~
113	<i>Parabacteroides distasonis</i>	180	NR_041342.1	823	99.63	~
114	---	---	---	---	---	n.d.
115	<i>Alistipes putredinis</i>	181	NR_113152.1	28117	100.00	~
116	<i>Bacteroides uniformis</i>	182	NR_040866.1	820	97.75	~
117	<i>Bacteroides koreana</i>	183	NR_159117.1	1912896	99.26	~
118	<i>Alistipes shahii</i>	184	NR_113153.1	328814	99.63	~
119	<i>Oribacter splanchnicus</i>	185	NR_112075.1	28118	99.77	~
120	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	186	NR_028961.1	853	97.24	+
121	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	187	NR_028961.1	853	97.24	+
122	<i>Blautia weiserae</i>	188	NR_044054.1	1121115	98.98	+
123	<i>Ruminococcus lactaris</i>	189	NR_027579.1	471875	97.24	+
124	<i>Ruminococcus albus</i>	190	NR_113022.1	1254	94.68	~
125	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	191	NR_028961.1	853	98.96	+
126	<i>Dorea longicatena</i>	192	NR_028683.1	38431	99.47	~
127	<i>Dorea formicigenerans</i>	193	NR_044645.2	39486	97.94	~
128	<i>Anaerostipes hadrus</i>	194	NR_117138.2	649755	99.85	~
129	<i>Intestinibacter bartlettii</i>	195	NR_027572.1	261299	99.55	~
130	<i>Flavonifractor plautii</i>	196	NR_029356.1	292806	99.71	~
131	<i>Pseudoflavonifractor phocaensis</i>	197	NR_147370.1	1870988	97.85	~
132	[ <i>Clostridium</i> ] <i>epiiforme</i>	198	NR_114392.1	29348	93.08	~
133	<i>Megasphaera elsdenii</i>	199	NR_102980.1	1064535	99.35	+
134	<i>Dialister succinatiphilus</i>	200	NR_041666.1	742743	97.82	~
135	<i>Acidaminococcus intestini</i>	201	NR_041694.1	187327	99.93	~
136	<i>Allisonella histaminiformans</i>	202	NR_028862.1	299880	99.56	n.d.
137	<i>Megasphaera massiliensis</i>	203	NR_133627.1	1232428	99.89	+
138	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	204	NR_104851.1	40545	99.78	~
139	<i>Clostridium haratii</i>	205	NR_029229.1	1561	99.85	~
140	<i>Anaeromassilibacillus senegalensis</i>	206	NR_144737.1	1673717	97.27	~
141	<i>Caldextribacter massiliensis</i>	207	NR_147375.1	1870566	98.80	~
142	<i>Flavonifractor plautii</i>	208	NR_029356.1	292806	97.95	~
143	[ <i>Clostridium</i> ] <i>leptum</i>	209	NR_114789.1	1535	94.55	~

[0037] さらに、健常人#K由来の糞便試料から単離培養した47種の腸内細菌株(下記表3に示す47種の細菌)によって、Kp2H7株といった炎症惹起性細菌等の腸内定着を抑制できることを見出している。なお、前記表3に記

載のK01~K44及びK46~K47は、特許文献2及び3に記載のK01~K44及びK45~K46に各々対応する。それらの16SrDNAの配列を各々、配列番号：210~255において示す。

[0038] [表3]

No.	Species	配列 番号	subject id	NCBI Tax ID	% identity	グルコン酸 産生能
K01	<i>Oranourtiella massiliensis</i>	210	NR_144722.1	1632013	99.57	--
K02	<i>Bacteroides ovatus</i>	211	NR_112940.1	28116	99.86	--
K03	<i>Blautia coccooides</i>	212	NR_164760.1	1532	99.88	+
K04	<i>Blautia hominis</i>	213	NR_163633.1	2026493	99.43	+
K05	<i>Desulfococcus vulgaris</i>	214	NR_074446.1	882	91.58	--
K06	<i>Alistipes onderdonkii</i>	215	NR_043313.1	326813	99.66	--
K07	<i>Eisenbergiella massiliensis</i>	216	NR_144731.1	1720294	99.56	--
K08	[ <i>Clostridium</i> ] <i>immscum</i>	217	NR_029164.1	1552	97.93	+
K09	<i>Bacteroides fragilis</i>	218	NR_112936.1	817	99.71	--
K10	<i>Eggerthella lenta</i>	219	NR_074377.1	84112	100.00	--
K11	<i>Dietaia festidiosa</i>	220	NR_125593.1	1034346	99.71	--
K12	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	221	NR_113243.1	1547	100.00	--
K13	<i>Enterococcus faecalis</i>	222	NR_118785.1	1351	99.93	+
K14	<i>Bacteroides intestinalis</i>	223	NR_041397.1	329854	99.36	--
K15	[ <i>Clostridium</i> ] <i>symbiosum</i>	224	NR_118736.1	1912	98.35	--
K16	[ <i>Clostridium</i> ] <i>hylemonae</i>	225	NR_024719.1	89153	99.50	--
K17	<i>Hungateella effluvis</i>	226	NR_133762.1	1098248	98.49	+
K18	<i>Bacteroides dorei</i>	227	NR_041391.1	367276	99.93	--
K19	[ <i>Clostridium</i> ] <i>clostridioforme</i>	228	NR_044715.2	1531	98.99	+
K20	<i>Flavonifractor plautii</i>	229	NR_028356.1	292890	100.00	--
K21	<i>Bacteroides xyloaminolyticus</i>	230	NR_112947.1	607309	99.50	--
K22	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	231	NR_112944.1	818	99.93	--
K23	<i>Parabacteroides merdae</i>	232	NR_041343.1	46603	99.78	--
K24	<i>Bacteroides vulgatus</i>	233	NR_074515.1	435590	100.00	--
K25	[ <i>Clostridium</i> ] <i>aldanense</i>	234	NR_043680.1	359742	99.41	--
K26	<i>Bacteroides uniformis</i>	235	NR_112946.1	820	97.39	--
K27	<i>Gordaniibacter unithiolicus</i>	236	NR_148281.1	1336613	99.56	--
K28	<i>Coprococcus comes</i>	237	NR_044048.1	470146	92.77	--
K29	<i>Anaerostipes saccae</i>	238	NR_023915.1	106843	96.78	--
K30	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	239	NR_036800.1	411470	98.78	+
K31	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	240	NR_036800.1	411470	98.71	+
K32	<i>Alistipes shahii</i>	241	NR_113153.1	328814	100.00	--
K33	<i>Bacteroides stercoris</i>	242	NR_112943.1	449673	98.77	--
K34	<i>Blautia hominis</i>	243	NR_163634.1	2026493	98.71	+
K35	<i>Butyrivibrio faecihominis</i>	244	NR_162060.1	1712515	97.86	--
K36	[ <i>Clostridium</i> ] <i>holtsae</i>	245	NR_026567.1	206479	99.56	+
K37	<i>Phoca massiliensis</i>	246	NR_144748.1	1041867	99.93	--
K38	<i>Holdemanella massiliensis</i>	247	NR_125626.1	1211919	99.71	--
K39	<i>Escherichia coli</i>	248	NR_114642.1	582	99.79	+
K40	<i>Agathobaculum desmolansi</i>	249	NR_044644.2	39884	96.68	+
K41	[ <i>Eubacterium</i> ] <i>rectale</i>	250	NR_074634.1	515619	100.00	--
K42	<i>Lactonifractor longovibrans</i>	251	NR_043551.1	341220	100.00	+
K43	<i>Desulfohalobacter rumicantium</i>	252	NR_118156.1	1607096	95.90	--
K44	<i>Pseudoflavonifractor phocacensis</i>	253	NR_147370.1	1870988	97.42	--
K45	---	---	---	---	---	n.d.
K46	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	254	NR_043666.1	197614	100.00	--
K47	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	255	NR_117778.1	40545	99.93	--

[0039] また、今回グルコン酸を消費することが明らかになった菌について、表2及び3において+（プラス）をもって示す。一方、-（マイナス）はグルコン酸を消費しない細菌であることを示す。また「n. d.」は、グルコン酸消費能の評価を行っていない細菌であることを示す。

[0040] [抗菌組成物]

よって、本発明は、上記32種（上記健常人#F由来の10種、上記健常人#I由来の9種、上記健常人#K由来の13種）のようなグルコン酸消費菌（第1の細菌）等をもって、炎症惹起性細菌又は薬剤耐性細菌等（第2の細菌）のグルコン酸消費と競合することにより、当該細菌の腸内定着を抑制する方法等に関する。すなわち、本発明は、グルコン酸を消費する第1の細菌を有効成分として含有する、グルコン酸を消費する第2の細菌に対する抗菌組成物を、提供するものである。

[0041] 本発明において、「抗菌」とは、細菌の活動の抑制、より具体的には、細菌の増殖、発育若しくは定着の抑制、又は細菌の死滅を意味し、例えば、腸内における細菌定着の抑制、腸内からの細菌の排除が挙げられる。

[0042] 本発明において、「グルコン酸」とは、(2R, 3S, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキサン酸とも称される、グルコースの1位の炭素を酸化することによって生成するカルボン酸を意味する。また、本発明にかかるグルコン酸には、当該カルボン酸のみならず、水溶液中での平衡状態にあるグルコノラクトン（グルコノ- $\delta$ -ラクトン）も含まれる。

[0043] 「グルコン酸の消費」とは、少なくとも細菌が周囲の環境よりグルコン酸を取り込むことを意味し、更には、取り込んだグルコン酸を他の化合物に変換すること（異化若しくは同化、代謝又は資化等）も含まれ得る。周囲の環境としては、特に制限はないが、例えば、宿主の腸内、培地が挙げられる。

[0044] 本発明において、グルコン酸を消費する細菌とは、グルコン酸消費能を有する細菌を意味する。ここで、細菌がグルコン酸消費能を有するか否かは、例えば、後述の実施例に示すように、グルコン酸を含有する培地にて当該細

菌を培養し、当該培地に残存するグルコン酸量が培養前と比較して有意に減少していれば、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると評価することが出来る。より具体的には、後述の実施例にて示すように、300  $\mu$ Mグルコン酸含有培地に、静止期にある細菌の培養液を、体積比にて100 : 1になるよう添加し、37 $^{\circ}$ C、嫌気条件下で48時間培養した後、培養上清に残存するグルコン酸濃度が、100  $\mu$ M以下である場合（好ましくは70  $\mu$ M以下、より好ましくは50  $\mu$ M以下、さらに好ましくは30  $\mu$ M以下、より好ましくは25  $\mu$ M以下、さらに好ましくは20  $\mu$ M以下、より好ましくは15  $\mu$ M以下である場合）、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると評価することが出来る。

[0045] また、後述の実施例に示すように、動物に細菌を摂取させ、当該動物の糞便におけるグルコン酸量を検出し、前記細菌を摂取させていない場合のそれと比較して有意に低下していれば、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると評価することも出来る。なお、動物としては特に制限はなく、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サル等が挙げられる。

[0046] （グルコン酸を消費する第1の細菌について）

本発明において、「グルコン酸を消費する第1の細菌」は、グルコン酸消費能を有し、腸内に定着し得る細菌であれば、特に制限はないが、前記方法における残存グルコン酸濃度が、好ましくは30  $\mu$ M以下、より好ましくは25  $\mu$ M以下、さらに好ましくは20  $\mu$ M以下、より好ましくは15  $\mu$ M以下、さらに好ましくは10  $\mu$ M以下、より好ましくは5  $\mu$ M以下、さらに好ましくは2  $\mu$ M以下となる腸内細菌である。

[0047] より具体的には、例えば、配列番号：10に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：17に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：18に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：20に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示す

すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：22に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：23に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：29に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：32に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：168に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：169に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：186に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：187に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：188に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：189に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：191に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：199に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：203に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：212に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：213に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：217に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：222に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：226に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：228に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：239に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配

列番号：240に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：243に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：245に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：248に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：249に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：251に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌（好ましくは2以上（例えば3又は4）、より好ましくは5以上（例えば6又は7）、さらに好ましくは8以上（例えば9又は10）の細菌、より好ましくは11以上の細菌（例えば12、13又は14）、さらに好ましくは15以上（例えば16又は17）、より好ましくは18以上（例えば19又は20）の細菌、さらに好ましくは21以上の細菌（例えば22、23又は24）、より好ましくは25以上（例えば26又は27）、さらに好ましくは28以上（例えば29、30、31又は32）の細菌）が挙げられる。

[0048] また、上記32の細菌において、よりグルコン酸の消費能が高いという観点から、配列番号：10に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：17に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：18に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：22に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：29に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：32に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：168に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すD

NAを有する細菌、配列番号：169に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：188に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：189に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：199に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：203に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：212に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：213に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：226に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：228に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：239に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：240に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：243に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：245に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：248に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：251に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌（好ましくは2以上（例えば3又は4）、より好ましくは5以上（例えば6又は7）、さらに好ましくは8以上（例えば9又は10）の細菌、より好ましくは11以上の細菌（例えば12、13又は14）、さらに好ましくは15以上（例えば16又は17）、より好ましくは18以上（例えば19又は20）の細菌、さらに好ましくは21以上（例えば22、23又は24）の細菌が挙げられる。

[0049] また、第1の細菌としては、例えば、配列番号：17に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：18に

記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：20に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：22に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：23に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：32に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌（好ましくは2以上（例えば3又は4）、より好ましくは5以上（例えば6又は7）、特に好ましくは8の細菌）であってもよい。

[0050] さらに、本発明において、第1の細菌としては、よりグルコン酸の消費能が高い（具体的には、後述の実施例3において、48時間後の培養上清のグルコン酸濃度が10 $\mu$ M以下となる）という観点から、配列番号：18に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：22に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌であることが好ましく、2以上の細菌であることがより好ましく、3以上の細菌であることがさらに好ましく、4の細菌であることが特に好ましい。

[0051] また、後述の実施例に示すように、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌は、グルコン酸消費能を有し得る。

[0052] 本発明において、「グルコン酸キナーゼ (gluconate kina

se; gluconokinase; gntK)」は、以下の反応を触媒するリン酸転移酵素 (EC 2. 7. 1. 12) を意味する (図19E 参照)。

ATP + グルコン酸  $\rightleftharpoons$  ADP + 6-ホスホグルコン酸。

[0053] かかるグルコン酸キナーゼとしては、例えば、配列番号：76～85のうちの少なくとも1のアミノ酸配列に対して相同性を示すアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる (後記表9～12 参照)。

[0054] 本発明において、「グルコン酸脱水素酵素 (gluconate dehydratase; gad)」は、以下の反応を触媒する脱水素酵素 (EC 4. 2. 1. 39) を意味する (図21 参照)。

グルコン酸  $\rightleftharpoons$  2-ケト-3-デオキシグルコン酸 (KDG) + H<sub>2</sub>O。

[0055] かかるグルコン酸脱水素酵素としては、例えば、配列番号：86～117のうちの少なくとも1のアミノ酸配列に対して相同性を示すアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる (後記表9～11 参照)。

[0056] 本発明において、「グルコン酸トランスポーター (gluconate transporter)」は、グルコン酸等の糖酸分子又は糖-ケト酸の輸送をするタンパク質を意味する。

[0057] かかるグルコン酸トランスポーターとしては、例えば、配列番号：118～167のうちの少なくとも1のアミノ酸配列に対して相同性を示すアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる (後記表9～12 参照)。

[0058] なお、本発明において「相同性を示す」とは、上記各配列番号に記載のアミノ酸配列に対し、カバレッジ60%以上かつ一致率60%以上の相同性を示すことである。ここで、カバレッジ (query cover, qcovhsp) とはクエリのアミノ酸配列全長に対するアラインメント長の割合のことを表し、一致率 (identity) とはアラインメント長に対するアミノ酸一致率を表す。また、ここでの60%以上は、カバレッジ及び一致率は各々独立して、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上 (91%以上、9

2%以上、93%以上、94%以上)、さらに好ましくは95%以上(96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、100%)である。

[0059] 本発明において、「遺伝子クラスター」とは、同一染色体にコードされ、ゲノム配列上の数千～数万塩基対以内の範囲に近接してコードされる、遺伝子群を意味する。ここで、前記「数千～数万塩基対以内」は、具体的には1万塩基対以内(10000bp)、9千塩基対以内(9000bp)、8千塩基対以内(8000bp)である。また、本発明にかかる遺伝子クラスターはオペロンの態様もとり得る。

[0060] 本発明において、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子を、同一の遺伝子クラスターに含む細菌としては、例えば、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：248に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：168に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：169に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：199に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：203に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌が、挙げられる(図19Aの「Glucanate kinase + Transporter [gene cluster (+)]」参照)。

[0061] また、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子を、同一の遺伝子クラスターに含む細菌としては、例えば、後記表17～40に示す403種の細菌が挙げられ、これらの中で好ましくは、表17～40において「gut\_microbes」の項目が「1」となっている、63種の細菌が挙げられる。

[0062] 本発明において、グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子及びグルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子を、同一の遺伝子クラスターに含む細菌としては、例えば、配列番号：17に記載の配列に対して少なくとも9

0%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：19に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：188に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：189に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：213に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：243に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：32に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：212に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：251に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：10に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：239に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：240に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：29に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：226に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：18に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：245に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：228に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：186に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：187に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：191に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌が、挙げられる（図19Bの「Glucanate dehydratase + Transporter [gene cluster (+)]」参照）。

[0063] また、グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子及びグルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子を、同一の遺伝子クラスターに含む細菌としては、例えば、後記表13～16に示す70種の細菌が挙げられ、これらの中で好ましくは、表13～16において「gut\_microbes」の項目が「1」となっている、10種の細菌が挙げられる。

[0064] (グルコン酸を消費しない細菌について)

本発明においては、上記第1の細菌を用いることによって、後述の第2の細菌の腸内定着が抑制される。また、当該抑制は、後述の実施例に示すとおり、グルコン酸を消費しない特定の細菌と併用することによって増強され得る。よって、本発明において、上記第1の細菌の他、グルコン酸を消費しない細菌（例えば、第1の細菌のグルコン酸消費能を増強する作用を有する細菌、第1の細菌の増殖又は定着を維持する作用を有する細菌）と併用してもよい。

[0065] 「グルコン酸を消費しない細菌」とは、グルコン酸消費能を有さない細菌を意味し、例えば、後述の実施例に示すように、グルコン酸を含有する培地にて当該細菌を培養し、当該培地に残存するグルコン酸量が培養前に有意に減少していなければ、前記細菌はグルコン酸消費能を有ないと評価することが出来る。より具体的には、上記方法における残存グルコン酸濃度が、250  $\mu$ M以上（好ましくは270  $\mu$ M以上、より好ましくは280  $\mu$ M以上、さらに好ましくは290  $\mu$ M以上）となる腸内細菌が挙げられる。

[0066] かかる第1の細菌と併用する非グルコン酸消費菌は、例えば、配列番号：1に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：2に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：3に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：4に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：5に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：7に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する

細菌、配列番号： 9 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 11 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 12 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 13 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 14 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 16 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 19 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 24 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 26 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 28 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 30 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 31 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 33 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 34 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、及び、配列番号： 35 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌からなる群から選択される、少なくとも 1 の細菌（好ましくは 2 以上（例えば 3 又は 4）、より好ましくは 5 以上（例えば 6、7、8 又は 9）、さらに好ましくは 10 以上（例えば 11、12、13 又は 14）、より好ましくは 15 以上（例えば 16、17、18 又は 19）、さらに好ましくは 20 以上（例えば 21）の細菌）が挙げられる。

[0067] また、非グルコン酸消費菌は、例えば、配列番号： 1 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 12 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA を有する細菌、配列番号： 19 に記載の配列に対して少なくとも 90% の同一性を示す DNA

Aを有する細菌、配列番号：24に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：26に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：28に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：30に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：31に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：33に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：35に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌（好ましくは2以上（例えば3又は4）、より好ましくは5以上（例えば6、7、8又は9）、特に好ましくは10の細菌）が挙げられる。

[0068] また、非グルコン酸消費菌は、第2の細菌を抑制する活性がより高まる傾向にあるという観点から、配列番号：1に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：19に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：24に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：35に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌であることが好ましく、2以上の細菌であることがより好ましく、3以上の細菌であることがさらに好ましく、4の細菌であることが特に好ましい。さらに、併用する第1の細菌は、上述の、配列番号：18に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：21に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、配列番号：22に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌、及び、配列番号：37に記載の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌からなる群から選択される、少なくとも1の細菌であることが望ましい。

[0069] なお、上述のとおり、本発明にかかる細菌（上述の第1の細菌、更にはグルコン酸を消費しない細菌）は、1株の細菌であってもよく、複数株の細菌から構成される細菌株の混合物であってもよい。また、本発明にかかる細菌には、特定の配列を含む16S rDNAを保持する細菌（例えば、配列番号：1に記載の配列を含む16S rDNAを保持する、受託番号：NITE BP-03147によって特定される細菌等）のみならず、前記特定の配列に対して少なくとも90%の同一性を示すDNAを有する細菌も含まれる。

[0070] 本発明において、「少なくとも90%の同一性」とは、各配列に対する同一性が、90%以上（例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上）、好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上）、さらに好ましくは99%以上（特に好ましくは100%）である。また、配列の同一性は、例えば、BLAST（Basic Local Alignment Search、基本ローカルアラインメント検索）のプログラム（Altschul et al. J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990）を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993）に基づいている。BLASTによって、配列間の同一性を解析する場合には、例えば、米国国立生物学情報センター（NCBI）のBLAST等を利用して（例えば、デフォルト、すなわち初期設定のパラメータを用いて）決定することができる。

[0071] 本発明にかかる細菌はまた、変異処理、遺伝子組換え、自然変異株の選択等によって育種された細菌であってもよい。かかる「変異株」は、特定の細菌（菌株）に対し、当業者に周知の方法により当業者がその性質に変化を及ぼさない範囲で変異させたもの、自然変異株の選択等によって育種されたもの、あるいは、それと同等であると当業者が確認できるものを包含することを意味する。また、本発明にかかる細菌には、上記のような、所定の機関に

寄託や登録がなされている株そのもの（以下「寄託株」とも称する）に限られず、それと実質的に同等な株（「派生株」又は「誘導株」とも称する）も包含される。本発明の寄託株としては、例えば、上記N I T E B P - 0 3 1 4 7 によって特定される細菌等が挙げられる。また、「寄託株と実質的に同等の株」とは、少なくとも前記寄託株と同種に属する株を意味する。寄託株と実質的に同等の株は、例えば、当該寄託株を親株とする派生株であってよい。派生株としては、寄託株から育種された株や寄託株から自然に生じた株が挙げられる。

[0072] （グルコン酸を消費する第2の細菌について）

本発明において、「グルコン酸を消費する第2の細菌」は、グルコン酸消費能を有し、腸内に定着し得る細菌であれば、特に制限はないが、グルコン酸消費において、第1の細菌と競合することにより、腸内の定着が抑制されるという観点から、グルコン酸消費能が第1の細菌と比較して低い細菌であることが好ましい。より具体的に、第2の細菌は、上記方法における残存グルコン酸濃度が、好ましくは70  $\mu$ M以下、より好ましくは50  $\mu$ M以下、さらに好ましくは30  $\mu$ M以下となる腸内細菌である。

[0073] かかる第2の細菌としては、例えば、腸内細菌科に属する細菌、より具体的には、クレブシエラに属する細菌、エシェリヒアに属する細菌、プロテウス属に属する細菌、サルモネラ属に属する細菌、シュードモナス属に属する細菌が挙げられる。また、腸内細菌科に属する細菌の他には、例えば、スタフィロコッカス属に属する細菌、バチルス属に属する細菌、ペプトストレプトコッカス属に属する細菌、メガスファエラ属に属する細菌、エンテロコッカス属に属する細菌等が挙げられる。

[0074] クレブシエラに属する細菌としては、例えば、クレブシエラ ニューモニエ（K p 2 H 7 株、3 4 E 1 株、B A A - 1 7 0 5 株、7 0 0 6 0 3 株、4 0 B 3 株等）、クレブシエラ アエロゲネス（K a 1 1 E 1 2 株等）が挙げられる。これら細菌の詳細については、特許文献1、下記表4を参照のほど。

[0075] [表4]

菌株名	情報	登録番号
Kp2H7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083910">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083910</a>	BioSample: SAMD00083910
34E1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083911">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083911</a>	BioSample: SAMD00083911
BAA-1705	<a href="https://www.atcc.org/Products/All/BAA-1705.aspx">https://www.atcc.org/Products/All/BAA-1705.aspx</a>	NCBI Taxonomy ID: 1276652
700603	<a href="https://www.atcc.org/Products/All/700603.aspx">https://www.atcc.org/Products/All/700603.aspx</a>	NCBI Taxonomy ID: 1276653
40B3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083913">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083913</a>	BioSample: SAMD00083913
Ka11E12	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083912">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=SAMD00083912</a>	BioSample: SAMD00083912

[0076] エシエリヒアに属する細菌としては、例えば、接着侵入性大腸菌（AIEC）（*E. coli* LF82等）、基質拡張型ベータラクタマーゼ（ES

BL) 産生大腸菌 (*E. coli* ATCC BAA2777等) といった、エシェリヒア コリが挙げられる。プロテウス属に属する細菌としては、例えば、プロテウス ミラビリス (*P. mirabilis* JCM1669T等)、プロテウス ブルガリス (*P. vulgaris* JCM20013等) が挙げられる。サルモネラ属に属する細菌としては、例えば、サルモネラ エンテリティディス (*S. enterica* subsp. *enterica* SL1344等) が挙げられる。シュードモナス属に属する細菌としては、例えば、シュードモナス エルギノーザ (*P. aeruginosa* ATCC10145等) が挙げられる。スタフィロコッカス属に属する細菌としては、例えば、スタフィロコッカス アウレウス (*S. aureus* JCM16555等)、スタフィロコッカス ミュータンス、スタフィロコッカス エピデルミディスが挙げられる。バチルス属に属する細菌としては、例えば、バチルス セレウス (*B. cereus* JCM2152等) が挙げられる。ペプトストレプトコッカス属に属する細菌としては、例えば、ペプトストレプトコッカス プレボティイが挙げられる。メガスファエラ属に属する細菌としては、例えば、メガスファエラ エルスデニが挙げられる。エンテロコッカス属に属する細菌としては、例えば、エンテロコッカス ファエカリス、エンテロコッカス フェシウムが挙げられる。

[0077] かかる第2の細菌は、腸内に定着することにより、疾患を惹起する細菌であってもよい。第2の細菌によって惹起される疾患としては、例えば、敗血症、腹膜炎、髄膜炎、腸炎、胃腸炎（感染性胃腸炎等）、呼吸器感染症（肺炎等）、尿路感染症、手術部位感染症、軟部感染症、医療器具関連感染症（医療器具関連血流感染症等）、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎といった慢性炎症性腸疾患等）、1型糖尿病、関節リウマチ、実験的免疫性脳炎（EAE）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患、慢性炎症性疾患、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染（MRSA）由来の日和見感染感症、食中毒（セレウス菌感染症等）、トキシックショック症候群（TSS）、が挙げられる。

[0078] (組成物の態様について)

本発明の組成物は、グルコン酸を消費する第1の細菌を有効成分として含有する、グルコン酸を消費する第2の細菌に対する抗菌組成物である。かかる組成物において含有される本発明にかかる細菌（上述の第1の細菌、更には上記非グルコン酸消費菌）は、生菌のみならず、その培養物であってもよい。培養物は、当該細菌を含むもの（増殖した当該細菌を含む培地（培養液、固形培地等））であってもよく、その形態は、特に限定されず、液体又は固体の何れでもよく、また、投与後に宿主の腸内において復元して増殖を再開できる限り、乾燥形態（例えば培養乾燥物等）であってもよい。かかる乾燥物は、菌体を溶媒（水等）に分散させた懸濁液を乾燥させることによって調製することができる。また、当該懸濁液には後記乾燥保護剤を適宜添加して乾燥させてもよい。乾燥方法は、特に制限はなく、例えば、凍結乾燥法、噴霧乾燥（スプレードライ）法、加熱乾燥法が挙げられるが、凍結乾燥法が好ましい。

[0079] 本発明の組成物は、医薬組成物（医薬品、医薬部外品等）、食品組成物（飲食品、動物用飼料等）、あるいは細胞実験、モデル動物実験等に用いられる試薬の形態であり得る。

[0080] 本発明の組成物を医薬組成物として用いる場合、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、咀嚼剤、バッカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤、坐剤等として、経口的又は非経口的に使用することができるが、非侵襲的かつ簡便に摂取させることができるという観点から、経口による摂取が望ましい。

[0081] これら製剤化においては、薬理学上若しくは飲食品として許容される担体、具体的には、生理食塩水、滅菌水、培地（変法GAMブイヨン（日水製薬株式会社製）、強化クロストリジウム培地、BHI培地、BL培地、LB培

地、EG培地等)、乾燥保護剤(スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール等の糖又は糖アルコール; アルギニン、ヒスチジン等のアミノ酸; プロピレングリコール、グリセロール、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(プロピレングリコール)等のポリオール)、植物油、溶剤、賦形剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤(リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等)、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。

[0082] また、本発明にかかる細菌が腸内細菌であるという点を鑑み、特に経口投与を目的とする製剤においては、本発明にかかる細菌を腸内に効率良く送達することを可能にする組成物と組み合わせてもよい。このような腸内への送達を可能とする組成物については特に制限されることなく、公知の組成物を適宜採用することができ、例えば、pH感受性組成物、腸までの放出を抑制する組成物(セルロース系ポリマー、アクリル酸重合体及び共重合体、ビニル酸重合体及び共重合体等)、腸管粘膜特異的に接着する生体接着性組成物(例えば、米国特許第6,368,586号明細書に記載のポリマー)、プロテアーゼ阻害剤含有組成物、腸内酵素によって特異的に分解される組成物が挙げられる。

[0083] 本発明において、第2の細菌が疾患を惹起する細菌である場合には、本発明の組成物は、前記疾患を治療又は予防するために用いられ得る。「治療」には、前記疾患からの完全な回復のみならず、前記疾患の症状を緩和又は改善し、その進行を抑制し、またその再発を抑制することが含まれる。「予防」には、前記疾患における発症の抑制若しくは遅延、又はその再発を抑制することが含まれる。

[0084] 本発明の組成物を食品組成物として用いる場合、例えば、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、栄養補助食品、

病者用食品、あるいは動物用飼料であり得る。なお、機能性食品は、通常、その作用メカニズムに基づき、プロバイオティクス、バイオジェニクス、プレバイオティクス、シンバイオティクスの4つに分類されるが、本発明においては、プロバイオティクスの態様をとり得る。

[0085] 本発明の組成物は、種々の飲食品として摂取することもできる。飲食品の具体例としては、機能性飲料、ドリンク剤、ゼリー状飲料、清涼飲料水、乳飲料、茶飲料、アルコール飲料、スープ類等の液状食品；ヨーグルト、ドリンクヨーグルト等の発酵食品、発酵飲料；食用油、ドレッシング、マヨネーズ、マーガリン等の油分を含む製品；飯類、麺類、パン類等の炭水化物含有食品；ハム、ソーセージ等の畜産加工食品；かまぼこ、干物、塩辛等の水産加工食品；漬物等の野菜加工食品；ゼリー等の半固形状食品；みそ等の発酵食品；洋菓子類、和菓子類、キャンディー類、ガム類、グミ、冷菓、氷菓等の各種菓子類；カレー、あんかけ、中華スープ等のレトルト製品；インスタントスープ、インスタントみそ汁等のインスタント食品や電子レンジ対応食品等が挙げられる。さらには、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、液状、ペースト状又はゼリー状に調製された健康飲食品も挙げられる。なお、本発明における飲食品の製造は、当該技術分野に公知の製造技術により実施することができる。

[0086] また本発明で提起される飲食品組成物において、保健用途が表示された飲食品として提供・販売されることも可能である。「表示」行為には、需要者に対して前記用途を知らしめたる全ての行為が含まれ、前記用途を直接的に認識できる表現、あるいは前記用途を想起・類推させうるような表現を、組成物自体に付したものであってもよいし、組成物が含入する容器、包装材または添付文書に付したものであってもよい。また「表示」は、本発明組成物の関連する情報として、チラシ、パンフレット、ポップ、カタログ、ポスター、書籍、DVD等の記憶媒体、電子掲示板やインターネット等の広告等で、本発明の組成物が効果的であることを表示・広告するものであってもよい。

- [0087] 本発明の組成物においては、第2の細菌に対する抗菌において有効な1種又は2種以上の成分（例えば、本発明にかかる細菌の腸での増殖に有効な成分）を添加してもよい。また、上記疾患を治療又は予防するための公知の成分又は薬剤若しくは食品と組み合わせてもよい。さらに、前記抗菌、治療及び予防以外の機能を発揮する他の成分又は薬剤若しくは食品と組み合わせてもよい。
- [0088] 特に、後述の実施例に示すとおり、グルコン酸を低濃度で含有する食品を摂取させ、腸内をグルコン酸量が少ない状況にすることによって、第2の細菌に対してより強い抗菌活性を奏することが可能となる。よって、本発明の組成物は、グルコン酸を低濃度で含有する食品と組み合わせる組成物の態様も、とり得る。
- [0089] ここで「低濃度」とは、例えば、食品におけるグルコン酸の濃度が、好ましくは2.5重量%以下であり、より好ましくは2重量%以下であり、さらに好ましくは1.5重量%以下であり、より好ましくは1重量%以下であり、さらに好ましくは0.5重量%以下であり、特に好ましくは0重量%である。
- [0090] また、かかるグルコン酸を低濃度で含有する食品としては、例えば、バナナ、ブルーベリー、イチゴ、グレープフルーツ、ニンジン、ナス、じゃがいも、かぼちゃ、グルテンフリーパン（米粉パン、ふすま粉パン、大豆粉パン等）、米、オーツ麦、ハードチーズ等の発酵食品、豆腐、砂糖が挙げられる。
- [0091] 本発明における「組み合わせる摂取」には、本発明にかかる細菌とグルコン酸を低濃度で含有する食品とを、各々、同時に又は異時に、同一経路又は別経路にて摂取させることを包含する。異時摂取の場合には、胃酸の影響が減少し、投与した細菌がより腸内に定着し易いという観点から、前記食品を摂取した後に本発明にかかる細菌を摂取させることが好ましい。この場合、通常、前記食品摂取後1時間以内に本発明にかかる細菌を摂取させればよく、前記食品摂取後20～30分に当該細菌を摂取させることが好ましい。ま

た、本発明にかかる細菌と前記食品の摂取回数は同一でも異なってもよい。したがって、本発明の組成物は、本発明にかかる細菌と前記食品とを1つの組成物中に含む態様であってもよく、本発明にかかる細菌と前記食品とを別々の組成物中に含む態様であってもよい。

[0092] [腸内における細菌の抑制方法]

本発明はまた、本発明にかかる細菌（上述の第1の細菌、更には上述の非グルコン酸消費菌）、又は当該細菌を含有する組成物（前述の本発明の組成物）を対象に投与する又は摂取させる工程を含む、対象の腸内においてグルコン酸を消費する第2の細菌を抑制する方法をも提供する。

[0093] ここで「抑制」とは、上記抗菌同様に、細菌の活動の抑制、より具体的には、細菌の増殖、発育若しくは定着の抑制、又は細菌の死滅を意味し、例えば、腸内における細菌定着の抑制、腸内からの細菌の排除が挙げられる。

[0094] 本発明における「対象」は、ヒトを含む動物である。ヒト以外の動物としては特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物等を対象とすることができる。具体的には、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サル等が挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明における対象としては、例えば、腸内に第2の細菌が定着している者、腸内に第2の細菌が定着しているおそれがある者、腸内に第2の細菌が定着するおそれがある者、上記疾患を罹患している者、上記疾患を罹患しているおそれがある者、上記疾患を罹患するおそれがある者が挙げられる。

[0095] また本技術は、治療目的であっても、非治療目的使用であってもよい。「非治療的使用」とは、医療行為、すなわち治療による人体への処置行為を含まない概念である。例えば、健康増進等が挙げられる。

[0096] 本発明にかかる細菌又は上述の本発明の組成物を、投与又は摂取する場合、その投与量又は摂取量は、対象の年齢、体重、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品等）、有効成分の形態（例えば、生菌、培養物）等に応じて、適宜選択される。

- [0097] 本発明にかかる細菌（生菌）の含有量又は使用量は特に限定されないが、前記組成物中に $1 \times 10^9$ 乗～ $1 \times 10^{12}$ 乗、より好ましくは $1 \times 10^9$ 乗～ $1 \times 10^{11}$ 乗である。なお、単位は、CFU/g若しくはCFU/mL、又はcells（個）/g若しくはcells（個）/mLである。CFUはColony forming unitを示す。
- [0098] また、本発明の微生物（生菌）の1日当たりの投与量は特に限定されないが、1日当たり $1 \times 10^9$ 乗～ $1 \times 10^{13}$ 乗であることが好ましく、 $1 \times 10^9$ 乗～ $1 \times 10^{12}$ 乗、さらには $1 \times 10^9$ 乗～ $1 \times 10^{10}$ の11乗であっても良い。なお、単位は、CFU/日、又はcells（個）/日である。
- [0099] また、有効成分が培養物である場合には、例えば、上記菌体量に対応する培養物量とすることができる。
- [0100] なお、本発明にかかる細菌、又は上述の本発明の組成物の投与又は摂取量としては上述のとおりであるが、1日当り1回又は複数回（例えば、2回、3回）に分けて投与又は摂取させてもよい。また、投与又は摂取の期間は、対象の状態に応じて中止することもできるが、中止することなく継続して投与又は摂取させても良い。なお、「継続」については、毎日継続でもよく、間隔を空けての継続でもよいが、効果の点で毎日継続して本発明にかかる細菌、又は上述の本発明の組成物を投与又は摂取することが好ましい。
- [0101] [抗菌活性を有する細菌のスクリーニング方法]  
本発明は、被験細菌についてグルコン酸の消費能を検出する工程、及び前記工程にて前記消費能を有することが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法を、提供する。
- [0102] 本発明はまた、被験細菌について、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを検出する工程、及び

前記工程にて検出された遺伝子が、同一の遺伝子クラスターに含まれていることが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、

グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法をも、提供する。

[0103] 本スクリーニング方法における「グルコン酸を消費する細菌」については、特に制限はないが、上記第2の細菌が挙げられる。また、本スクリーニング方法に供される「被験細菌」としても特に制限はないが、例えば、動物の腸内に存在する細菌が挙げられる。かかる動物としては、ヒト、非ヒト動物（マウス、ラット、サル、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター等）が挙げられる。また、被験細菌は、単離された細菌であってもよいが、当該細菌を含む試料（例えば、前記動物の糞便試料、又はその培養物）が挙げられる。

[0104] 「グルコン酸の消費能の検出」は、例えば、上述のとおり、グルコン酸を含有する培地にて当該細菌を培養し、当該培地に残存するグルコン酸量を検出することによって行うことができる。そして、当該グルコン酸量が培養前のそれと比較して有意に減少していれば、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると判定される。より具体的には、後述の実施例に示す方法にて、細菌を48時間培養した後、培養上清に残存するグルコン酸濃度が、100  $\mu$ M以下である場合（好ましくは70  $\mu$ M以下、より好ましくは50  $\mu$ M以下、さらに好ましくは30  $\mu$ M以下、より好ましくは20  $\mu$ M以下、さらに好ましくは10  $\mu$ M以下、より好ましくは3  $\mu$ M以下である場合）、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると判定することも出来る。

[0105] また、後述の実施例に示すように、動物に細菌を摂取させ、当該動物の糞便におけるグルコン酸量を検出し、前記細菌を摂取させていない場合のそれと比較して有意に低下していれば、前記細菌はグルコン酸消費能を有すると判定することも出来る。なお、動物としては特に制限はなく、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、

イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サル等が挙げられる。

[0106] なお、グルコン酸量の検出方法としては、特に制限はなく、例えば、後述の実施例に示すように、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いた検出方法が挙げられる。

[0107] 本スクリーニング方法における「グルコン酸キナーゼ」、「グルコン酸脱水素酵素」及び「グルコン酸トランスポーター」、並びに「遺伝子クラスター」については、上述のとおりである。本発明にかかる少なくとも2種の遺伝子が、同一の遺伝子クラスターに含まれているか、否かは、後述の実施例に示すように、例えば、次世代シーケンシング（NGS；Next Generation Sequencing）法を用いることによって行うことができる。「次世代シーケンシング法」としては、より具体的に、合成シーケンシング法（sequencing-by-synthesis、例えば、イルミナ社製Solexaゲノムアナライザー、HiSeq又はMiseqによるシーケンシング）、パイロシーケンシング法（例えば、ロッシュ・ダイアグノステックス（454）社製のシーケンサーGS LX又はFLXによるシーケンシング（所謂454シーケンシング））、リガーゼ反応シーケンシング法（例えば、ライフテクノロジー社製のSolid又は5500x1によるシーケンシング）、イオン半導体シーケンシング法（例えば、サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Ion Torrent技術）等が挙げられる。

## 実施例

[0108] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。本実施例は、以下に示す材料及び方法を用いて行った。

[0109] （マウス実験 1）

後述の実施例2については、以下に示すマウス実験を行った。無菌（GF；Germ-Free）マウスとして、無菌化されたC57BL/6Nの4～8週齢を、日本クレア株式会社又は三協ラボより購入した。それらを、飼

育用ビニルアイソレータ（無菌アイソレータ）（株式会社アイシーエム製；ICM-1B）内で維持し、8～14週齢のマウスを、以下の実験に使用した。

[0110] 本実施例にて、無菌マウスに投与するクレブシエラニューモニエ2H7株（以下、Kp2H7株とも称する）については特許文献1～3を参照のほど。また無菌マウスに投与する単離菌（F31-18mix又はF18mixに属する細菌）については特許文献2及び3、並びに下記表3を参照のほど。なお、F31-18mixは、F31mixからF18mixを除いた13菌株のことである。

[0111]

[表5]

No.	Species	配列 番号	subject id	NCBI TAX ID	% identity	F31 mix	F18 mix
f01	<i>Bifidobacterium longum</i>	1	NR_145535.1	1931217	99.50	●	●
f02	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	2	NR_112947.1	657369	99.59	●	-
f03	<i>Bacteroides fragilis</i>	3	NR_074784.2	817	98.95	●	-
f04	<i>Bacteroides uniformis</i>	4	NR_112945.1	820	99.93	●	-
f05	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	5	NR_074277.1	818	99.86	●	-
f06	<i>Bacteroides uniformis</i>	6	NR_112945.1	820	99.93	-	-
f07	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	7	NR_112931.1	85831	97.18	●	-
f08	<i>Bacteroides fragilis</i>	8	NR_074784.2	817	98.95	-	-
f09	<i>Parabacteroides goldsteini</i>	9	NR_113676.1	927665	98.98	●	-
f10	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	10	NR_036800.1	411470	99.86	●	-
f11	<i>Blautia luti</i>	11	NR_114315.1	649762	97.57	●	-
f12	<i>Faecalimonas umblicata</i>	12	NR_156907.1	1912955	99.97	●	●
f13	[ <i>Clostridium</i> ] <i>saccharolyticum</i>	13	NR_102852.1	84030	94.34	●	-
f14	<i>Yyzerella nexilis</i>	14	NR_029248.1	509632	98.49	●	-
f15	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	15	NR_036800.1	411470	99.86	-	-
f16	<i>Anaerostipes hadrus</i>	16	NR_117138.2	649756	99.74	●	-
f17	<i>Blautia glucerosa</i>	17	NR_113331.1	536633	96.91	●	●
f18	[ <i>Clostridium</i> ] <i>botteae</i>	18	NR_025567.1	208479	99.60	●	●
f19	<i>Blautia caecimuris</i>	19	NR_144607.1	1796615	99.13	●	●
f20	[ <i>Clostridium</i> ] <i>innocuum</i>	20	NR_029154.1	1522	98.71	●	●
f21	<i>Blautia marasmi</i>	21	NR_147355.1	1817860	98.20	●	●
f22	[ <i>Clostridium</i> ] <i>lavalense</i>	22	NR_044289.1	460384	98.97	●	●
f23	[ <i>Clostridium</i> ] <i>glycyrrhizinilyticum</i>	23	NR_112553.1	342942	99.13	●	●
f24	<i>Eisenbergiella massiliensis</i>	24	NR_144731.1	1720294	97.73	●	●
f25	[ <i>Clostridium</i> ] <i>glycyrrhizinilyticum</i>	25	NR_112553.1	342942	99.13	-	-
f26	<i>Flavonifractor plautii</i>	26	NR_029356.1	292890	100.00	●	●
f27	<i>Blautia luti</i>	27	NR_114315.1	649762	97.57	-	-
f28	<i>Intestinibacter bartlettii</i>	28	NR_027573.1	261299	99.93	●	●
f29	[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gnavus</i>	29	NR_036800.1	411470	98.85	●	-
f30	<i>Massiliimonobiota timonensis</i>	30	NR_144739.1	1778392	100.00	●	●
f31	<i>Anaerostipes caccae</i>	31	NR_028915.1	105841	97.32	●	●
f32	<i>Blautia coccoides</i>	32	NR_104700.1	1532	99.93	●	●
f33	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	33	NR_029247.1	1547	99.41	●	●
f34	<i>Veillonella parvula</i>	34	NR_074980.1	479436	99.16	●	-
f35	<i>Fusobacterium varium</i>	35	NR_113384.1	856	99.73	●	●
f36	<i>Fusobacterium varium</i>	36	NR_113384.1	856	99.73	-	-
f37	<i>Escherichia fergusonii</i>	37	NR_074902.1	585654	99.87	●	●

[0112] K p 2 H 7 株の菌液を、LB液体培地に入れ、37℃で一晩培養し、ODが1.2 (1 \* 10<sup>9</sup> CFU/mL相当) になるよう調整した。そして、200 μL/匹 (2 \* 10<sup>8</sup> CFU/匹相当) の菌液をマウスの胃内にゾンデを使用して投与した。また、遺伝子欠損株を用いた実験では、前記同様に調整した野生株と遺伝子欠損株を同量ずつ混合し、200 μL/匹 (それぞれ1 \*

10<sup>8</sup>CFU/匹相当)の菌液を、マウスの胃内にゾンデを使用して投与した。

[0113] 単離菌を、mGAM液体培地、EG培地又はCM0149培地を用い、37°Cで嫌気チャンバー内で24~48時間培養した。そして、得られた各単離菌の培養液を適宜等量ずつ混合した。さらに、それら混合液を5倍濃縮し、F18mix、F31-18mix、後述のF8mix、後述のF10mix (F18-8mix)を調製した。200μL/匹 (Total菌量1\*10<sup>9</sup>CFU/匹相当)の菌液をゾンデを用いて胃内に投与した。

[0114] マウスの便サンプルを、グリセロール (終濃度20%)及びEDTA (終濃度10mM)をPBSに混合した溶液に、50mg便/mLの割合になるよう溶解した。便溶解液を、50mg/Lアンピシリン及び50mg/Lスペクチノマイシン含有DHL培地に適切な濃度になるよう希釈をした後にプレーティングし、37°Cで一晩培養した後に、コロニー数をカウントし、便1gあたりのCFU数を算出した。

[0115] マウスの飼料として、通常はCL-2 (日本クレア)を用いた。飼料のグルコン酸量を途中から変える実験では、Day21以降、飼料をAIN93G (オリエンタル酵母)に変更した。AIN93Gには、グルコン酸を含めずに(0%)、又は、グルコン酸を2.5重量%(80μmol/g)若しくは10重量%(320μmol/g)の濃度になるよう添加し、マウスに与えた。なお、通常の飼育に用いたCL-2のグルコン酸含有量は5μmol/gである。また、いずれの実験でも自由摂食とした。

[0116] (便中の菌のDNA量)

無菌マウスに、Kp2H7及びF18mixを投与した後、グルコン酸の濃度を調整した飼料を投与し、当該マウスにおける各菌の菌量の変化を調べた。具体的には、各マウスの便を、週1回、飼料変更後はDay21及びDay25に採取し、それらから菌ゲノムを抽出した。

[0117] 菌ゲノムの抽出は、マウス糞便10mgに対し、EDTA及びグリセロール含有PBS溶液 (EDTAの終濃度:10mM、グリセロールの終濃度:

20体積%)を5倍重量加え、激しく振盪攪拌して破碎懸濁した。得られたサンプル液100 $\mu$ Lに、15mg リゾチーム (Sigma-Aldrich社製、Lysozyme from chicken egg white; L4919) 及び5 $\mu$ L RNase (Thermo Fisher Scientific社製、PureLink RNase A (20mg/mL); 12091-021) を溶解した、10mM Tris/10mM EDTA緩衝液 (pH8.0、以下「TE10」とも称する) 800 $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪した。続いて、アクロモペプチダーゼ (登録商標) (Wako; 015-09951) 2,000Uを添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間振盪し、溶菌した。20%SDS TE10溶液50 $\mu$ Lと、終濃度が20mg/mlになるようプロテイナーゼK (Roche, Proteinase K, recombinant, PCR Grade; 03115852001) を溶解したTE10溶液50 $\mu$ Lとを加え、55 $^{\circ}$ Cで60分間振盪した。その混合溶液400 $\mu$ Lから、Maxwell (登録商標) RSC Cultured Cells DNA Kit (Promega社) を用い、DNAを抽出した。得られたDNAを鋳型とし、各菌に特異的なプライマーを用いたqPCRを行ない、各菌量を定量した。各菌に特異的なプライマーは以下のとおりである。

[0118]

[表6]

プライマー名	配列番号	プライマー名	配列番号	配列番号	配列番号
301_4293_Fw1	38	AGCTTTTGGGTAATGGATG	38	801_4298_Rv1	39
312_4294_Fw1	40	ACACGGGATGATGATGATG	40	812_4294_Rv1	41
317_4297_Fw2	42	ATGCAAGCTTGGGTGAAATAG	42	117_4297_Rv2	43
318_4292_Fw3	44	GGCAAGGCAAGTCTGAAGTGA	44	118_4292_Rv3	45
319_4332_Fw2	46	CAGTTGAAAGTCTTATATATCC	46	119_4362_Fw2	47
320_4301_Fw2	48	CTGCTTCGAAADAGAACTTAG	48	120_4301_Rv2	49
321_4248_Fw2	50	AAGTGGATCTCTGGGATTC	50	121_4348_Rv2	51
322_4303_Fw2	52	GATCTGAAATGACTGACTGAGT	52	122_4303_Rv2	53
324_4284_Fw1	54	TGGGATATACTAATAGTGGGG	54	124_4284_Rv1	55
325_4241_Fw2	56	TAGGGGATTTCTTGGGGATG	56	125_4031_Rv2	57
326_4260_Fw1	58	TTATGGGCTGTGAGATGGCC	58	126_4262_Fw1	59
328_4263_Fw1	60	GTACACAGGGATAACTATACC	60	128_4343_Rv1	61
330_4385_Fw1	62	ATCCCAAGGGGATAGCAGAG	62	130_4345_Fv3	63
331_4345_Fw1	64	TTGCTTAAATGACTGAGTGGC	64	131_4345_Rv2	65
332_4287_Fw3	66	TGAGCTCTTTGACTGAGC	66	132_4247_Rv2	67
333_4382_Fw1	68	GTCCTCGAAAGCACTGGTAG	68	133_4382_Rv1	69
334_4218_Fw2	70	ACTTGATCTTGGGTTGAGC	70	135_4318_Rv2	71
337_4201_Fw3	72	GCTGCTTTGGTGAAGGATGG	72	137_4301_Rv3	73
339_298_F	74	AAGAACTAGGAGGCTGTGTAT	74	139_298_R	75

[0119] (K p 2 H 7 遺伝子欠損株の作製)

K p 2 H 7 遺伝子欠損株は、Quick and Easy E. coli Gene Deletion Kit (Gene Bridges, Heidelberg) を用い、当該キットのプロトコール通りに作製した。

[0120] 先ず、K p 2 H 7 株に、p R E D / E T プラスミドをエレクトロポレーションで導入し、30 mg / L テトラサイクリン含有LB寒天培地を用い30°Cで培養し、遺伝子導入菌株を選択した。選択したp R E D / E T 導入菌株を、LB液体培地にとり30°Cで一晩培養した後、その1 mLを40 mLのLB液体培地に入れ、ODが0.2になるまで30°Cで培養した。その後、L - a r a b i n o s e を0.3%になるよう追加し、37°Cに変更してさらに1時間培養し、菌液を回収し、コンピテントセルを調製した。F R T - P G K - g b 2 - n e o - F R T c a s s e t t e の両端に目的とする組換え配列を付加したDNA直鎖を、前記キットのプロトコールにしたがってPCRにより作製した。そして、得られたDNAを、前記コンピテントセルにエレクトロポレーションで導入し、90 mg / L カナマイシン含有LB寒天培地にて培養することにより、遺伝子欠損株を選択した。

[0121] (グルコン酸濃度の測定 1)

後述の実施例3及び4については、以下に示すグルコン酸濃度の測定を行った。菌株のグルコン酸消費能を調べるため、300 μM グルコン酸含有変法GAMブイヨン(日水製薬株式会社製)1 mLに、菌液10 μLを添加し、37°C、嫌気条件下(嫌気チャンバー内)で48時間静置培養した。得られた培養液を遠心し、L C - M S / M S を用いて上清中のグルコン酸濃度を測定した。なお、前記菌液は、シングルコロニーから釣菌した菌株を培地に入れ、37°C、嫌気条件下で一晩培養(前培養)し、静止期になったものを用いた。そして、グルコン酸濃度が有意に減少したもの(100 μM以下となったもの)はその株がグルコン酸を消費できる株であると判断した。

[0122] また、後述の実施例2に関し、便中のグルコン酸濃度の測定は、マウスの便を20 mg / mLのMQで溶解し、遠心処理に供した後、L C - M S / M S を用いて上清中のグルコン酸濃度を測定した。液体クロマトグラフはE x i o n L C A D を、質量分析はS C I E X T Q 6 5 0 0 + を用いて行った。測定条件は下記の通りである。

[0123]

[表7]

[LC条件]

カラム: Intracta Organic Acid, 150 x 2 mm

移動相: A: acetonitrile / water / formic acid = 10 / 90 / 0.1, B: acetonitrile / 100mM ammonium formate = 10 / 90

Time (min)	Flow (mL/min)	A conc	B conc
	0.2	100	0
3	0.2	100	0
10	0.2	0	100
13	0.2	0	100
13.1	0.2	100	0
18	0.2	100	0

カラム温度: 40°

注入量: 2 µL

[表8]

[MS条件]									
Carrier Gas (CUR)	: 30 psi								
Collision Gas (CAD)	: 9								
IonSpray Voltage (IS)	: -4500 V								
Temperature (TEM)	: 400°								
Ion Source Gas 1 (GS1)	: 50 psi								
Ion Source Gas 2 (GS2)	: 80 psi								
Q1 Mass	Q1 Mass	Dwell Time	ID	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)		
194.936	74.9	30	zirconate 112	-40	-10	-34	-11		

[0125] (トランスポンシーケンス (Tn-Seq))

Kp2H7株のエレクトロコンピテントセル 80 $\mu$ Lに、EZ-Tn5  
TM<KAN-2> (Lucigen Corp, USA) 0.5 $\mu$ Lを

添加し、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、ELEPO21 (Nepa Gene Co. Ltd., Japan) を用いて poring pulse (voltage: 1800V, pulse length: 5.0msec, pulse interval: 50msec, number of pulses: 1, and polarity: +) の条件で行った。エレクトロポレーション後は1mLのLB液体培地に入れ、37℃で3時間培養した後、90mg/L カナマイシン含有LB寒天培地で一晚培養した。コロニー数を数えた後、全てのコロニー（約80万コロニー）をかき集めて20%グリセロールストックとして-80℃で保存した。

[0126] 作製したトランスポゾン挿入Kp株のグリセロールストックを、無菌C57BL/6マウスに200μL/匹ずつ投与した。7日後に単離菌mix (F18mix若しくはF31-18mix) を投与、又は何も投与しない3群に分けた。単離菌を投与した日をDay0として、Day0, 4, 10, 28にマウスから便を回収し、50mg/mLのPBSで懸濁した後、90mg/L カナマイシン含有LB寒天培地で培養した。37℃で一晩培養した後、全てのコロニーを回収し、DNA抽出を行った。

[0127] 抽出したゲノムDNAを、300塩基程度の長さに断片化し、DNA断片の3'末端にポリC塩基を付加した。トランスポゾンの配列に相補的な配列を含むビオチン付加プライマーとポリG塩基とを含むプライマーを用い、トランスポゾン近傍の配列を増幅した。目的とする断片をストレプトアビジンビーズで精製後増幅し、Illumina HiSeq2500でシーケンスし、トランスポゾン近傍の配列を取得した。

[0128] 取得リード配列に対し、PCRプライマー相補配列とモザイク配列を除くため、先頭24bpをトリミングした。さらに、Illuminaシークエンスアダプターのトリミング、シークエンスクオリティに基づくフィルタリングを、Trimmomatic-v0.39 [A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, 'Trimmomatic

c: a flexible trimmer for illumina sequence data', *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114-2120, Aug. 2014, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170. 参照] (with options: ILLUMINACLIP:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:5) と FASTX-Toolkit-v0.0.13 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/); with options: -q 20 -p 80) を用いて実施した。これにより得られたクオリティコントロール済みのリード配列を Kp2H7 株のゲノム配列にマッピングした (bowtie2-v2.4.2 [B. Langmead and S. L. Salzberg, 'Fast gapped-read alignment with Bowtie 2', *Nature Methods* 2012 9:4, vol. 9, no. 4, pp. 357-359, Mar. 2012, doi: 10.1038/nmeth.1923. 参照])。マッピングされたリード数を遺伝子単位で集計し (samtools-v1.1.1 [H. Li et al., 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078-2079, 2009, doi:10.1093/bioinformatics/btp352. 参照]、featureCounts-v1.5.2 [Y. Liao, G. K. Smyth, and W. Shi, 'featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features', *Bioinformatics*, vol. 30, no. 7, pp. 923-930, Apr. 2014, doi:10.1093/BIOINFORMATICS

／BTT656. 参照] )、TPM (Transcripts Per Million) により正規化した。リード配列は、トランスポゾン挿入Kp株の変異位置に対応することに加え、各Kp変異株はゲノム中に1箇所のトランスポゾン変異を持つことを仮定することで、TPMを検体中の各遺伝子の変異率と捉えて比較解析を実施した。

[0129] (便中Kp-2H7のトランスクリプトーム解析)

全RNAは、NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) を用いて、便サンプルから単離した。RNA配列決定用のライブラリは、TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina Inc.) を使用して調製し、HiSeq X (Illumina Inc.) を使用して150-bpペアエンドモードで配列決定した。F18-mix (特許文献3におけるF18mixと同一) の有無によるKp-2H7のトランスクリプトームプロファイルを解析するために、Kp-2H7のゲノム配列とF18-mixのゲノム配列を連結して参照ゲノムを作成した (以下、連結参照ゲノムとする)。配列決定されたペアエンドリードは、Trimmomatic version 0.39の 'ILLUMINACLIP:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:30' オプションとFASTX-Toolkit version 0.0.13 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) の '-q20-p80' オプションを使用した。対になっていないリードは以降の解析から除外した。

[0130] 残りのリードは、minimap2 version 2.17-r941の '-N1-a' オプションを使用して、マウス (mm10) とPhiX参照ゲノムにマッピングした後、マウスゲノムとPhiXゲノムのいずれにもマップされなかったリードを抽出し、その後の解析に使用した。このリードは、bowtie2 version 2.3.4.1を用いて連結参照

ゲノムにマップされた。各Kp-2H7遺伝子にマップされたリードをカウントした。DESeq2 version 1.28.1を用いてF18-mix有無の条件間における発現差異解析を行い、Benjamini Hochberg-correctedによるFalse discovery rateが5%以下となる遺伝子を発現差異遺伝子として同定した。ヒートマップはDESeq2の出力から得られた分散安定化変換値 (variance stabilizing transformation; VST) から得た。

[0131] (グルコン酸濃度の測定 2)

後述の実施例10については、以下に示すグルコン酸濃度の測定を行った。細菌のグルコン酸利用を*in vitro*で評価するため、分離株を300  $\mu$ Mのグルコン酸を含むmGAM培地又はRCM培地中で、嫌気条件下、37°Cで48時間培養した。各培養培地の上清を回収し、ExionLC AD及びSCIEX Triple Quad 6500+ LC-MS/MSシステム (いずれもサイエックス社製) でグルコン酸濃度を測定した。糞便中の炭素濃度を評価するため、各糞便サンプルを水 (50 mg/mL) に懸濁し、培養上清中の炭素濃度をLC-MS/MSで測定した。グルコン酸の測定条件では、クロマト分離をIntrada Organic Acidカラム150×2 mm (Imtakt社製) を用い、カラム温度は40°C、1回の注入量は2  $\mu$ Lとした。A相 (アセトニトリル/水/ギ酸=10/90/0.1 (体積比)) とB相 (アセトニトリル/100 mMギ酸アンモニウム=10/90 (体積比)) からなる各移動相を以下のグラジエント条件で使用した (0-3分, A 100%, B 0%; 3-10分, A 100%, B 0%; 10-13分, A 0%, B 100%; 13-13.1分, A 0%, B 100%; 13.1-18分, A 100%, B 0%)。なお、流速は0.2 mL/minとした。

[0132] また、詳細なMS条件は以下の通りである。:カーテンガス、30 psi; コリジョンガス、9 psi; イオンスプレー電圧、-4500 V; 温度、

400℃；イオン源ガス1、50psi；イオン源ガス2、80psi。

[0133] (グルコン酸代謝関連遺伝子の検索)

細菌全ゲノムシーケンスにはIllumina MiSeq及びPacBio Sequelプラットフォームを使用した。Illumina MiSeqを用いたシーケンスは、TruSeq DNA PCRフリーライブラリープレップキット (Illumina社製) を用いて、ターゲットインサートサイズ550 bpでライブラリを調製した。得られたIllumina MiSeqのシーケンス配列はすべてFASTX-toolkit (version 0.0.13) を用いてトリミング及びフィルターを施した。PacBio Sequelを用いたシーケンスは、SMRTbell template prep kit 1.0を用いてライブラリを調製した。両タイプのシーケンスデータを用いて、ハイブリッドアセンブラーUnicyclerによるゲノムアセンブリを行った。ゲノムの分類はGTDB-tk version 2.3.0のclassify\_wfとGTDBデータベースR214を用いて行った。NCBI-genome-download version 0.3.3 (DOI: 10.5281/zenodo.8192432) とNCBI分類データベースのunknownlineage.dmp (downloaded on 2023/09/14) を用いて、各株のゲノムに関連するFastANI参照ゲノムのNCBI分類法を検索した。遺伝子はProkka version 1.14.0の '--kingdom Bacteria --rnammer' オプションと、rnammer version 1.2を用いて予測した。予測遺伝子の相同性検索は、diamond version 2.0.15 を使用し、'blastp --evaluate 0.00001 --id 30 --query-cover 60 --ultra-sensitive' オプションで、KEGG (downloaded on 19/04/2022), COG (downloaded on 19/05/2021), UniRef90 (downloaded o

n 24/05/2022; <https://www.uniprot.org/help/uniref>) データベースを用いて行った。

[0134] (マウス実験 2)

後述の実施例12については、以下に示すマウス実験を行った。無菌 (G F) マウスとして、無菌化されたC57BL/6Nの4~8週齢を、日本クレア株式会社又は三協ラボより購入した。それらを、飼育用ビニルアイソレータ (無菌アイソレータ、ICM-1B) 内で維持し、8~14週齢のマウスを、以下の実験に使用した。マウスの飼料として、CL-2 (日本クレア) を用いた。

[0135] 単離菌を、mGAM液体培地、EG培地又はCM0149培地を用い、37°Cで嫌気チャンバー内で24~48時間培養した。そして、得られた各単離菌の培養液を適宜等量ずつ混合した。さらに、それら混合液を5倍濃縮し、F18mix、F13mix (F31-18mix) を調製した。200  $\mu$ L/匹 (Total菌量  $1 \times 10^9$  CFU/匹相当) の菌液をマウスの胃内にゾンデを用いて投与した。

[0136] Kp2H7株の菌液を、LB液体培地に入れ、37°Cで一晩培養し、ODが1.2 ( $1 \times 10^9$  CFU/mL相当) になるよう調整したのち、100000倍希釈した。そして、200  $\mu$ L/匹 ( $2 \times 10^3$  CFU/匹相当) の菌液をマウスの胃内にゾンデを使用して投与した。

[0137] マウスの便サンプルを、グリセロール (終濃度20%) 及びEDTA (終濃度10mM) をPBSに混合した溶液に、50mg便/mLの割合になるよう溶解した。便溶解液を、50mg/L アンピシリン及び50mg/L スペクチノマイシン含有DHL培地に適切な濃度になるよう希釈をした後にプレーティングし、37°Cで一晩培養した後に、コロニー数をカウントし、便1gあたりのCFU数を算出した。

[0138] 以上の材料及び方法を用いて得られた結果を、以下に示す。

[0139] (実施例1) トランスポゾン挿入Kp2H7株を用いた、F18mixによる腸内における細菌抑制メカニズムの解析

本発明者らは従前、腸管に定着し、Th1細胞の増殖又は活性化を誘導することによって腸炎等の発症に関与する菌として、*Klebsiella pneumoniae*に属すると考えられるKp2H7株を明らかにしている（特許文献1）。また、本発明者らは、ヒト腸内細菌において、かかるTh1細胞誘導性細菌の腸内定着を抑制する細菌の存在を想定し、それらの同定を試みた結果、健常人（被験体番号：#F、#K及び#I）由来の糞便試料から、各々37株、47株及び42株の腸内細菌株を単離培養することに成功している。さらに、これら細菌株投与によって、Kp2H7株の腸内定着が抑制されることを明らかにしている（特許文献2）。また、このような腸内における細菌定着抑制能に関し、前記健常人#F由来の腸内細菌37株において重複している菌を除いた、腸内細菌31株（F31mix）を選択し、さらに、図1に示すように、これらと同程度の細菌定着抑制能を発揮し得る18株（F18mix）を選抜することにも、本発明者らは成功している（特許文献3）。しかしながら、かかる腸内細菌が、どのようなメカニズムによって、Kp2H7株といった炎症惹起性細菌等の腸内定着を抑制できるかが、明らかになっていなかった。

[0140] そこで、かかるメカニズムを探索するために、まず、Kp2H7株に、トランスポゾンとトランスポゼーゼの複合体であるトランスポゾームをエレクトロポレーションで導入した。トランスポゾンにはカナマイシン耐性遺伝子を含めており、導入されたトランスポゾンがKp2H7株の染色体に組み込まれるとカナマイシン耐性株となるため、カナマイシン含有培地でトランスポゾンが挿入された変異株を選択した。そして、これらを約80万株回収して混ぜ合わせ、変異株ライブラリを作製した（図2）。なお、トランスポゾンはランダムに挿入されるため、選択培地で発育したコロニーはそれぞれ別の部位に変異が入っていると推定される。Kp2H7のゲノムサイズは約5.5Mbpであるため、単純計算で7bpあたり1箇所に変異が入っていると見積もることができる。

[0141] 次に、図3に示すとおり、前記異株ライブラリ（Kp2H7\_\_tp）を無

菌マウスに投与し、次いで、F18mix又はF31-18mixを投与した。その後、Day0, 4, 10及び28のタイミングで便を回収し、便中に含まれるKp2H7株においてどの遺伝子に変異が入っているか、またその変異株がどのくらいの割合で存在しているかを解析し(Tn-seq)、変異の入った遺伝子の割合を、各マウスのタイムポイント毎に示した(図4)。その結果、F31-18mix投与群及びKp2H7\_\_tpのみを投与した群(Kp only)ではgntRに変異の入った株が優勢となった一方で、F18mixを投与した群では徐々にgntR変異株の減少が認められた。

[0142] gntRはグルコン酸の代謝に関連する遺伝子である。図5Aに示すように、クレブシエラ、大腸菌等は、糖類の代謝経路として通常の解糖系(EMPパスウェイ)の他に、Entner-Doudoroff pathway(EDパスウェイ)を持っており、グルコン酸はこのEDパスウェイに直接入り3ステップでピルビン酸に代謝される。gntRは、グルコン酸をEDパスウェイを介して代謝する遺伝子であるgntU、gntK、edd及びedaに対して抑制的に働いていることが知られている。

[0143] しかしながら、gntRに変異があると、図5Bに示すように、グルコン酸の代謝に対する抑制がなくなるため、EDパスウェイがよく回るようになり、グルコン酸が多い環境では、gntR変異株は生存に有利になることが予想される。つまり、マウスの腸内において、Kp2H7\_\_tpのみが投与された、又は、更にF31-18mixが投与された状況は、グルコン酸が多い環境だと推測できる。

[0144] 一方、F18mix存在下では、gntR変異株の優位性が失われていることから、環境中のグルコン酸が少なく、クレブシラが重要な炭素源であるグルコン酸を利用できなくなっている。つまり、F18mixがグルコン酸を消費することで、腸内のグルコン酸が減少した結果と考えられる。

[0145] (実施例2) F18mix及びKp2H7株のグルコン酸消費能についての解析

前記推測に基づき、実際に便中のグルコン酸濃度を測定すると、図6に示すとおり、無菌マウスにF18mixを投与した場合、便中グルコン酸は、F31-18mixを投与したもの又は無菌マウスと比較して有意に減少していた。また、無菌マウスにKp2H7株を投与し、その後F18mixを投与した結果、図7に示すとおり、便中のグルコン酸は減少した。

[0146] また、gntK及びgntRに関し、各々の欠損株を作製した。そして、これら欠損株を、炭素源としてグルコースのみ又はグルコン酸のみが含まれるminimum mediumにて培養し、増殖曲線を描いた。その結果、図8に示すとおり、グルコース含有培地ではいずれの欠損株も同様の増殖を示したが、グルコン酸含有培地ではgntK欠損株(Kp\_ΔgntK)の成長が遅くなり、gntR欠損株(Kp\_ΔgntR)の成長が早くなった。

[0147] さらに、Kp2H7株(野生株)及び前記gntR欠損株(ΔgntR)を同じ菌量混ぜて、無菌マウスに投与し、その2日後にF18mix又はF31-18mixを投与し、それらマウスの便におけるKp2H7株の菌量を測定した。その結果、図9の左側のグラフに示すとおり、gntR欠損株は、F18mix投与によって野生株よりも早く減少した。それに対して、F31-18mix投与群やKp2H7株のみを投与した群(Kp only)では便中のKp2H7株の菌量は大きく変化しなかった。また、便中のgntR欠損株と野生株の菌量の比(Competition index (ΔgntR/WT))を解析した。その結果、図9の右側のグラフに示すとおり、F18mix投与群において、Day21以降では、特にgntR欠損株の相対的な減少が著しかった。このことから、当該マウスの腸内において、グルコン酸が枯渇したことが示唆される。

[0148] 前記同様、Kp2H7株(野生株)及び上記gntK欠損株(ΔgntK)を同じ菌量混ぜて、無菌マウスに投与し、その2日後にF18mix又はF31-18mixを投与し、それらマウスの便におけるKp2H7株の菌量を測定した。その結果、図10の左側のグラフに示すとおり、F31-1

8 m i x 投与群やK p 2 H 7 株のみを投与した群 (K p o n l y) では、便中の g n t K 欠損株は著明に減少した。また c o m p e t i t i o n i n d e x が示すとおり (図 10 の右側のグラフに示すとおり)、F 1 8 m i x 投与群の腸内において、g n t K 欠損株は D a y 2 1 以降で減少が止まり、当該クレブシエラはグルコン酸を栄養源として利用していないことが示唆された。

[0149] 次に、上記同様、K p 2 H 7 株及び F 1 8 m i x を腸内に定着させたマウスを調製した。そして、これらマウスの餌を、F 1 8 m i x を投与してから D a y 2 0 迄は、C L - 2 (グルコン酸含有量 :  $5 \mu\text{mol/g}$ ) とし、D a y 2 1 以降は、グルコン酸の含有量を 0%、2.5% ( $80 \mu\text{mol/g}$ ) 又は 10% ( $320 \mu\text{mol/g}$ ) とする餌に変更した。その結果、図 11 に示すとおり、餌を変更してから 1 週間の時点で、便中 K p 2 H 7 株の菌量は、グルコン酸 10% 含有飼料を投与した群で有意に上昇していた。

[0150] また、K p 2 H 7 株のみを定着させたマウスに、F 1 8 m i x 又は F 3 1 - 1 8 m i x を投与し、その 2 日後に K p 2 H 7 株における g n t K 遺伝子の発現を解析した。その結果、図 12 に示すとおり、当該遺伝子の発現は F 1 8 m i x 投与群で低かった。

[0151] 以上のことより、F 1 8 m i x は、グルコン酸を腸内で消費し、クレブシエラの増殖を抑制していることが明らかになった。

[0152] (実施例 3) F 1 8 m i x におけるグルコン酸消費菌の同定

次に、F 1 8 m i x のうちどの菌がグルコン酸を消費できるか調べるために、 $300 \mu\text{M}$  グルコン酸含有変法 G A M ブイオンにて各種単離菌株をそれぞれ培養した。そして、48 時間後に培養上清を回収してグルコン酸濃度を測定し、グルコン酸濃度の減少が認められた菌株がグルコン酸を消費できる株であると判断した。その結果、図 13 に示すとおり、F 1 8 m i x において、8 株がグルコン酸を消費できる菌株であることが明らかとなった。さらに、F 3 1 - 1 8 m i x の 13 菌株においても、グルコン酸を消費できる 2 菌株が含まれていることが明らかになった。具体的には、f 1 7 (18.

4  $\mu$ M)、f 1 8 (1. 7  $\mu$ M)、f 2 0 (1 6. 5  $\mu$ M)、f 2 1 (4. 2  $\mu$ M)、f 2 2 (9. 0  $\mu$ M)、f 2 3 (1 5. 4  $\mu$ M)、f 3 2 (1 5. 0  $\mu$ M) 及び f 3 7 (9. 2  $\mu$ M) の 8 菌株と、f 1 0 (1 4. 2  $\mu$ M) 及び f 2 9 (8. 2  $\mu$ M) の 2 菌株とにおいて、グルコン酸消費能を有することが認められた。なお、これら菌株の表記 (No.) については表 1 及び 3 を参照のほど。各括弧内の濃度は、各菌株における 4 8 時間培養後のグルコン酸残存濃度 (3 回の測定値の平均値) を示す。また、これら 1 0 菌株以外の 2 1 菌株におけるグルコン酸残存濃度 (3 回の測定値の平均値) は、いずれも 2 7 0  $\mu$ M 超であった。

[0153] (実施例 4) 病原微生物におけるグルコン酸消費能の解析

次に、クレブシエラとは異なる他の病原微生物がグルコン酸を消費できるかを調べた。その結果、図 1 4 に示すとおり、クレブシエラを含めた腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) に属する細菌 (他エシェリヒア コリ、サルモネラ エンテリティディス、プロテウス ブルガリス、プロテウス ミラピリス、シュードモナス エルギノーザ) は、グルコン酸を消費していた。さらに、スタフィロコッカス アウレウス、バチルス セレウスも、グルコン酸を消費し得ることが明らかになった。

[0154] 一方、カンピロバクター (カンピロバクター ウプサリエンシス、カンピロバクター ジェジュニ)、ストレプトコッカス (ストレプトコッカス ピオゲネス、ストレプトコッカス ディスガラクティエ、ストレプトコッカス サンガイニス)、エンテロコッカス フェシウム、クロストリジウム (クロストリジウム ディフィシル、クロストリジウム クロストリジウム パーフリンジェンス) はグルコン酸を消費できなかった。

[0155] (実施例 5) F 1 8 m i x におけるグルコン酸消費菌と非消費菌との併用効果

無菌マウスに K p 2 H 7 株を定着させた後、F 1 8 株 (F 1 8 m i x)、F 1 8 株中のグルコン酸を消費する F 8 株 (F 8 m i x) 又は F 1 8 m i x においてグルコン酸を消費しない 1 0 株 (F 1 8 - 8 m i x (F 1 0 m i x

)) を、投与した。その結果、図15に示すとおり、F18mix投与群、F8mix投与群、F10mix投与群の順で便中のKp2H7株の菌量が低下した。

[0156] このように、F18mixを、グルコン酸を消費する株(F8mix)とそうでない株(F10mix)とで切り分けを行った場合、F8mixは、F10mixと比較して、Kp2H7株に対する高い抑制能を示した。これは、腸内でF8mixとKp2H7株とがグルコン酸を競合して消費した結果、F10mixよりクレブシエラ等の増殖を抑制できたためと考えられる。

[0157] 一方、F18mixとF8mixとを比較した場合、F18mixの方がKp2H7株の菌量低下が大きかった。このことから、グルコン酸を消費する菌株だけを用いるよりも、さらに特定の別株を用いることで相互作用等が生じ、より高いクレブシラ抑制効果がもたらされることが示唆される。

[0158] (実施例6) グルコン酸の濃度に応じた、F18mixによる腸内における細菌抑制能についての解析

腸内のグルコン酸の多くは、食事によって運ばれることに着目した。そこで、F18mix投与下のマウスにおける、食事とクレブシエラの菌量との関係性を観察した。

[0159] 無菌マウスにKp2H7株を定着させた後、F18mixを投与し、Day21日目迄は餌をCL-2を用いた。そして、それ以降はグルコン酸含有量が異なるAIN-93Gをマウスに与えた。その結果、図16A及び16Bに示すとおり、グルコン酸含有量を0%又は2.5重量%とするマウス餌を用いた場合は、Kp2H7株の菌量低下が認められた。その一方で、グルコン酸含有量を10重量%とするマウス餌を用いた場合は、Kp2H7株の菌量増加が見られた。

[0160] このように、グルコン酸含有量が2.5重量%以下とする場合、Kp2H7株の菌量低下が見られた。このことから、グルコン酸消費におけるクレブシエラとF18mixとの競合に加え、そもそもグルコン酸量が少ない状況

を形成することが、クレブシラ抑制に効果的であることが示唆される。一方、グルコン酸含有量が大量の場合、F18mixとの競合があってもクレブシラの菌量増加が見られた。ただし、この増加に関してもF18mix投与によって、その上昇速度は抑えられている。

[0161] (実施例7) 腸内におけるF18mixの増殖についての解析

前記同様の試験を行い、各マウスの糞便を採取した。得られた糞便から菌ゲノムの抽出を行い、各菌量を定量した。菌量は相対量及び絶対量の双方で確認した。その結果、図16C及び16Dに示すとおり、F18mixを投与した日から21日目までの期間において、Kp2H7株の菌量の急激な低下が認められた。また、21日目までの結果として、非グルコン酸消費菌のf19、f24の菌量が大きく増加している傾向が見られた。このことから、グルコン酸消費菌以外の菌であっても、何等かのクレブシラ抑制効果をもたらした可能性が示唆される。

[0162] 次に、異なるグルコン酸含有量のマウス餌を与えた21日目以降においては、グルコン酸含有量が10%のマウス餌を用いた場合、グルコン酸含有量が0%のマウス餌を用いた場合と比較して、特にグルコン酸消費菌のf18、f21、f22、f32、f37の菌量が大きく増加している傾向が見られた。このことから、他のグルコン酸消費菌と比較して、これら5種の菌株が、特にグルコン酸を消費している可能性が示唆される。

[0163] (実施例8) 腸内における遺伝子発現解析

無菌マウスにKp-2H7単独又はKp-2H7+F18-mixのいずれかを投与した。F18-mix投与2日後のマウスの糞便サンプルを採取し、便中の菌のRNA-seq解析を行った。クレブシエラ由来のRNAの発現量に関して、群間で有意差(Benjamini-Hochberg corrected p-value<0.001)のある遺伝子についてKEGG pathway解析を行った。Kp-2H7+F18-mix群でKp-2H7単独群と比較して発現が増加又は減少した10遺伝子以上で構成されるパスウェイ)を図17Aに示す。また、糖代謝に関与する遺伝子

の発現プロファイルを図17Bに示す。

[0164] 図17Aに示すとおり、特に糖代謝、アミノ酸代謝に関わるパスウェイにおいて、有意な変化が認められた。また、図17Bに示す結果から、糖代謝に関連する遺伝子は、Kp-2H7単独群ではグルコン酸やグルコース等の糖代謝関連遺伝子の発現が多いのに対し、F18-mixと共存することによりフルクトース、ラクトース、ソルビトール等、他の炭素源を利用するように主な炭素源がシフトしていると考えられる。

[0165] (実施例9) 腸内におけるグルコン酸濃度の解析

無菌マウスに、グルコン酸を含む栄養豊富な飼料としてCL-2（日本クレア株式会社製）又はグルコン酸を含まない飼料としてAIN93G（オリエンタル酵母工業株式会社製）を与えて飼育した。そして、これら無菌マウスの便中グルコン酸濃度をLC-MSで測定した。図18Aに示すとおり、食事により便中のグルコン酸量は変化するが、飼料中に含まれなくてもグルコン酸が検出されるため、便中のグルコン酸は飼料（エサ）及び宿主から供給されていると考えられる。

[0166] また、CL-2を与えて飼育している無菌マウスにKp-2H7を投与し、21日目に飼料をCL-2からAIN93Gに変更した。Kp-2H7の便中CFを中央値±IQRで示した。その結果、図18Bに示すとおり、AIN93Gに変更後、便中Kp-2H7の菌量は減少した。そのため、エサ由来のグルコン酸濃度の変化が、Kp-2H7の菌量変化に影響していることが考えられる。

[0167] (実施例10) グルコン酸消費菌における遺伝子クラスター解析

健常人 #F、#K、#I（特許文献3）から単離した細菌株を、300 μMのグルコン酸を含むmGAM培地中で、37℃で48時間培養した（n=3）。その後、培養上清中のグルコン酸濃度をLC-MS/MSで測定した。そして、培養後のグルコン酸が減少しているものは、グルコン酸を利用し得る菌と判断した。また、全菌株のゲノムの塩基配列から、グルコン酸代謝に関与すると考えられる遺伝子のうち、遺伝子クラスター（gene c

luster) を形成し得るものを、図19A~19Dに示す。

[0168] その結果、図19A~19Dにて、グルコン酸を利用可能な株は、グルコン酸キナーゼ及びグルコン酸トランスポーター、又は、グルコン酸脱水素酵素及びグルコン酸トランスポーターを、遺伝子クラスターとして有し、また、その後の代謝に必要なKD GKやE d aの遺伝子を近傍又は別の遺伝子クラスターとして有していることが、明らかになった。

[0169] なお、図19Bにおけるアスタリスクは、f19 *Blautia caecimuris*株のgluconate dehydrataseにおけるフレームシフト変異を示す。当該酵素は、そのフレームシフト変異により機能しないため、グルコン酸が減少していないと考えられる。

[0170] (実施例11) オペロン探索

2023年9月20日時点でNCBI Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>) に登録された原核生物の種レベルでの代表配列 (reference 14種; *Escherichia coli*のみ2配列, representative 18, 326種) について、ゲノム配列、タンパク質配列、遺伝子アノテーション情報をそれぞれ取得した。

[0171] 図19A~19Dにおいて同定されたグルコン酸脱水素酵素 (gad)、グルコン酸キナーゼ (gntK)、transporterタンパク質配列を収集し、これをグルコン酸代謝関連遺伝子データベース (DB) とした。

[0172]



[表10]

No.	アミノ酸名		糖名		No.	アミノ酸名		No.
	アミノ酸名	糖名	アミノ酸名	糖名				
131	381 CAACGPPAG 08191, Glycylserine	99	381 CAACGPPAG 08193, High-affinity glucose transporter	143				
132	382 FQDAWPEA 08221, Glucosylserine	79	382 FQDAWPEA 08220, Low-affinity glucose transporter	137				
133	383 AAAAAAG 38521, Glucosylserine	99		139				
137	381 GGGGAGG 08021, Glucosylserine	91						
139	313 ATFGDEEA 03371, Phosphoserine	99	313 ATFGDEEA 03371, Low-affinity glucose transporter	143				
143	320 GFTGAGPAG 04480, Glycylserine	100	320 GFTGAGPAG 04479, Low-affinity glucose transporter	143				
144	321 GAGAG 03021, Glycylserine	100	321 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
148	322 GAGAG 03021, Glycylserine	100	322 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	323 GAGAG 03021, Glycylserine	100	323 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	324 GAGAG 03021, Glycylserine	100	324 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	325 GAGAG 03021, Glycylserine	100	325 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	326 GAGAG 03021, Glycylserine	100	326 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	327 GAGAG 03021, Glycylserine	100	327 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	328 GAGAG 03021, Glycylserine	100	328 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	329 GAGAG 03021, Glycylserine	100	329 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	330 GAGAG 03021, Glycylserine	100	330 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	331 GAGAG 03021, Glycylserine	100	331 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	332 GAGAG 03021, Glycylserine	100	332 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	333 GAGAG 03021, Glycylserine	100	333 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	334 GAGAG 03021, Glycylserine	100	334 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	335 GAGAG 03021, Glycylserine	100	335 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	336 GAGAG 03021, Glycylserine	100	336 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				
149	337 GAGAG 03021, Glycylserine	100	337 GAGAG 03020, Low-affinity glucose transporter	143				

[0174]

[表11]

No.	シグナル配列番号		シグナル配列番号	シグナル配列番号	シグナル配列番号	シグナル配列番号
	配列名	配列名				
K03	...	...	...	...	...	...
K04	...	...	...	...	...	...
K05	...	...	...	...	...	...
K12	...	...	...	...	...	...
K17	...	...	...	...	...	...
K19	...	...	...	...	...	...
K20	...	...	...	...	...	...
K30	...	...	...	...	...	...
K31	...	...	...	...	...	...
K34	...	...	...	...	...	...
K36	...	...	...	...	...	...
K39	...	...	...	...	...	...
K40	...	...	...	...	...	...
K42	...	...	...	...	...	...

[0175]

[表12]

No.	酵素名	EC番号	遺伝子名	種名	株番号	株名
89-287	Hexokinase	2.7.1.1	Hexokinase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-288	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.41	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-289	Phosphoglucose isomerase	5.3.1.9	Phosphoglucose isomerase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-290	Phosphofruktokinase	2.7.1.11	Phosphofruktokinase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-291	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-292	Phosphoenolpyruvate decarboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-293	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	4.1.1.32	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-294	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-295	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-296	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-297	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-298	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-299	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739
89-300	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	ATCC 8739

[0176] このグルコン酸代謝関連遺伝子DBに対し、DIAMOND (version 2.0.15; B. Buchfink et al., 2021, Nature Methods, <https://www.nature>.)

com/articles/s41592-021-01101-x) を用いて、NCBIより取得した各菌種のタンパク質配列をクエリとしてそれぞれ以下の条件で相同性検索した：

```
“diamond blastp --evl aue 0.00001 --id 60 --query-cover 60 --max-target-seqs 1 --more-sensitive”
```

検索条件より、カバレッジ60%以上かつ一致率60%以上の相同性を持つタンパク質配列をヒットとした。ここで、カバレッジ (query cover, qcovhsp) とはクエリのアミノ酸配列全長に対するアラインメント長の割合のことを表し、一致率 (id, pident) とはアラインメント長に対するアミノ酸一致率を表す。

[0177] この相同性検索の結果と、遺伝子アノテーション情報をもとに、酵素 (gad または gntK) とトランスポーターが近接する菌を以下の条件で探索した：

酵素とトランスポーターが同一のDNA中にコードされている

酵素とトランスポーターの距離が10,000bp以下

酵素とトランスポーターの間にコードされる遺伝子が2つ以下。

[0178] この3つの条件を全て満たす、酵素とトランスポーターの遺伝子を近接して有する菌として、70種 (gad)、403種 (gnt) を同定した (70種 (gad) については、表13~16に示す。403種 (gnt) については、表17~40に示す。なお、表13及び14、表15及び16、表17及び18、表19及び20、表21及び22、表23及び24、表25及び26、表27及び28、表29及び30、表31及び32、表33及び34、表35及び36、表37及び38、表39及び40は、各々対応しており、各前者 (若い方の番号) の表に、菌とグルコン酸脱水素酵素 (gad) 又はグルコン酸キナーゼ (gntK) との情報を示し、各後者の表に、前者の表に記載の菌に対応するグルコン酸トランスポーターの情報と後述の「gut\_microbes」を示す。



[表14]

Accession	Transcript record	Transcript accession	Transcript strand	Seq. reporter gene on	Seq. reporter gene
C2F 000018005.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	892	88.4	5,755-513	1
C2F 000018105.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	88.1	5,185-575	0
C2F 000018205.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	88	5,555-552	1
C2F 000018305.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	89.3	83.2	4,155-184	0
C2F 000018405.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	83.2	1,885-182	0
C2F 000018505.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	83.1	1,005-225	0
C2F 000018605.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	82.3	3,455-184	0
C2F 000018705.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.7	81.5	4,755-238	0
C2F 000018805.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	89.4	73.8	5,585-337	0
C2F 000018905.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	72	2,725-228	0
C2F 000019005.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	69.3	2,755-334	0
C2F 000019105.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	62.3	4,045-183	0
C2F 000019205.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.4	73.8	5,095-114	0
C2F 000019305.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	88	69.6	5,585-133	1
C2F 000019405.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	69.3	2,725-228	0
C2F 000019505.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.1	69.3	2,495-131	0
C2F 000019605.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	100	5,515-300	0
C2F 000019705.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	72	3,725-228	0
C2F 000019805.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	88.9	4,815-286	1
C2F 000019905.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	100	5,145-308	0
C2F 000020005.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.3	87.1	7,035-228	0
C2F 000020105.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	88.1	2,495-174	0
C2F 000020205.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.7	78.3	1,395-241	0
C2F 000020305.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.6	88.1	1,855-158	0
C2F 000020405.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.6	83.6	3,785-189	0
C2F 000020505.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	88	4,035-233	1
C2F 000020605.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	100	2,115-326	1
C2F 000020705.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	89.1	5,235-274	0
C2F 000020805.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	84.4	75.1	3,615-223	0
C2F 000020905.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	100	100	5,515-298	1
C2F 000021005.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	84	3,035-254	0
C2F 000021105.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   high-affinity glucose transporter	89.6	78.6	4,135-238	0
C2F 000021205.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	89.4	88.7	1,395-254	0
C2F 000021305.1	transcript: M3:K03C08F0_00003   low-affinity glucose transporter	100	100	5,285-211	0

[0181]



[表16]

Accession	UniProt accession	1. UniProt description	2. UniProt length	3. UniProt molecular weight	4. UniProt isoelectric point	5. UniProt subcellular location
Q07-014668.1	Q07-014668.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014669.1	Q07-014669.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014670.1	Q07-014670.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014671.1	Q07-014671.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014672.1	Q07-014672.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014673.1	Q07-014673.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014674.1	Q07-014674.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014675.1	Q07-014675.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014676.1	Q07-014676.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014677.1	Q07-014677.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014678.1	Q07-014678.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014679.1	Q07-014679.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014680.1	Q07-014680.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014681.1	Q07-014681.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014682.1	Q07-014682.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014683.1	Q07-014683.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014684.1	Q07-014684.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014685.1	Q07-014685.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014686.1	Q07-014686.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014687.1	Q07-014687.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014688.1	Q07-014688.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014689.1	Q07-014689.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014690.1	Q07-014690.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014691.1	Q07-014691.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014692.1	Q07-014692.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014693.1	Q07-014693.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014694.1	Q07-014694.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014695.1	Q07-014695.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014696.1	Q07-014696.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014697.1	Q07-014697.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014698.1	Q07-014698.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014699.1	Q07-014699.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0
Q07-014700.1	Q07-014700.1	Transporter, low-affinity, glucose, permease, Ypk1	103	1648.317	88.5	0

[0183]











[表22]

発明の名称	発明の要約	発明の概要	発明の詳細な説明	発明の効果	発明の産業上の利用可能性
001	001	001	001	001	001
002	002	002	002	002	002
003	003	003	003	003	003
004	004	004	004	004	004
005	005	005	005	005	005
006	006	006	006	006	006
007	007	007	007	007	007
008	008	008	008	008	008
009	009	009	009	009	009
010	010	010	010	010	010
011	011	011	011	011	011
012	012	012	012	012	012
013	013	013	013	013	013
014	014	014	014	014	014
015	015	015	015	015	015
016	016	016	016	016	016
017	017	017	017	017	017
018	018	018	018	018	018
019	019	019	019	019	019
020	020	020	020	020	020
021	021	021	021	021	021
022	022	022	022	022	022
023	023	023	023	023	023
024	024	024	024	024	024
025	025	025	025	025	025
026	026	026	026	026	026
027	027	027	027	027	027
028	028	028	028	028	028
029	029	029	029	029	029
030	030	030	030	030	030
031	031	031	031	031	031
032	032	032	032	032	032
033	033	033	033	033	033
034	034	034	034	034	034
035	035	035	035	035	035
036	036	036	036	036	036
037	037	037	037	037	037
038	038	038	038	038	038
039	039	039	039	039	039
040	040	040	040	040	040
041	041	041	041	041	041
042	042	042	042	042	042
043	043	043	043	043	043
044	044	044	044	044	044
045	045	045	045	045	045
046	046	046	046	046	046
047	047	047	047	047	047
048	048	048	048	048	048
049	049	049	049	049	049
050	050	050	050	050	050
051	051	051	051	051	051
052	052	052	052	052	052
053	053	053	053	053	053
054	054	054	054	054	054
055	055	055	055	055	055
056	056	056	056	056	056
057	057	057	057	057	057
058	058	058	058	058	058
059	059	059	059	059	059
060	060	060	060	060	060
061	061	061	061	061	061
062	062	062	062	062	062
063	063	063	063	063	063
064	064	064	064	064	064
065	065	065	065	065	065
066	066	066	066	066	066
067	067	067	067	067	067
068	068	068	068	068	068
069	069	069	069	069	069
070	070	070	070	070	070
071	071	071	071	071	071
072	072	072	072	072	072
073	073	073	073	073	073
074	074	074	074	074	074
075	075	075	075	075	075
076	076	076	076	076	076
077	077	077	077	077	077
078	078	078	078	078	078
079	079	079	079	079	079
080	080	080	080	080	080
081	081	081	081	081	081
082	082	082	082	082	082
083	083	083	083	083	083
084	084	084	084	084	084
085	085	085	085	085	085
086	086	086	086	086	086
087	087	087	087	087	087
088	088	088	088	088	088
089	089	089	089	089	089
090	090	090	090	090	090
091	091	091	091	091	091
092	092	092	092	092	092
093	093	093	093	093	093
094	094	094	094	094	094
095	095	095	095	095	095
096	096	096	096	096	096
097	097	097	097	097	097
098	098	098	098	098	098
099	099	099	099	099	099
100	100	100	100	100	100

[0189]











[表28]

発明番号	発明の要約	特許請求の範囲	発明の要約	発明の要約	発明の要約	発明の要約
001	本発明は、...	...	...	...	...	...
002	本発明は、...	...	...	...	...	...
003	本発明は、...	...	...	...	...	...
004	本発明は、...	...	...	...	...	...
005	本発明は、...	...	...	...	...	...
006	本発明は、...	...	...	...	...	...
007	本発明は、...	...	...	...	...	...
008	本発明は、...	...	...	...	...	...
009	本発明は、...	...	...	...	...	...
010	本発明は、...	...	...	...	...	...
011	本発明は、...	...	...	...	...	...
012	本発明は、...	...	...	...	...	...
013	本発明は、...	...	...	...	...	...
014	本発明は、...	...	...	...	...	...
015	本発明は、...	...	...	...	...	...
016	本発明は、...	...	...	...	...	...
017	本発明は、...	...	...	...	...	...
018	本発明は、...	...	...	...	...	...
019	本発明は、...	...	...	...	...	...
020	本発明は、...	...	...	...	...	...
021	本発明は、...	...	...	...	...	...
022	本発明は、...	...	...	...	...	...
023	本発明は、...	...	...	...	...	...
024	本発明は、...	...	...	...	...	...
025	本発明は、...	...	...	...	...	...
026	本発明は、...	...	...	...	...	...
027	本発明は、...	...	...	...	...	...
028	本発明は、...	...	...	...	...	...
029	本発明は、...	...	...	...	...	...
030	本発明は、...	...	...	...	...	...
031	本発明は、...	...	...	...	...	...
032	本発明は、...	...	...	...	...	...
033	本発明は、...	...	...	...	...	...
034	本発明は、...	...	...	...	...	...
035	本発明は、...	...	...	...	...	...
036	本発明は、...	...	...	...	...	...
037	本発明は、...	...	...	...	...	...
038	本発明は、...	...	...	...	...	...
039	本発明は、...	...	...	...	...	...
040	本発明は、...	...	...	...	...	...
041	本発明は、...	...	...	...	...	...
042	本発明は、...	...	...	...	...	...
043	本発明は、...	...	...	...	...	...
044	本発明は、...	...	...	...	...	...
045	本発明は、...	...	...	...	...	...
046	本発明は、...	...	...	...	...	...
047	本発明は、...	...	...	...	...	...
048	本発明は、...	...	...	...	...	...
049	本発明は、...	...	...	...	...	...
050	本発明は、...	...	...	...	...	...
051	本発明は、...	...	...	...	...	...
052	本発明は、...	...	...	...	...	...
053	本発明は、...	...	...	...	...	...
054	本発明は、...	...	...	...	...	...
055	本発明は、...	...	...	...	...	...
056	本発明は、...	...	...	...	...	...
057	本発明は、...	...	...	...	...	...
058	本発明は、...	...	...	...	...	...
059	本発明は、...	...	...	...	...	...
060	本発明は、...	...	...	...	...	...
061	本発明は、...	...	...	...	...	...
062	本発明は、...	...	...	...	...	...
063	本発明は、...	...	...	...	...	...
064	本発明は、...	...	...	...	...	...
065	本発明は、...	...	...	...	...	...
066	本発明は、...	...	...	...	...	...
067	本発明は、...	...	...	...	...	...
068	本発明は、...	...	...	...	...	...
069	本発明は、...	...	...	...	...	...
070	本発明は、...	...	...	...	...	...
071	本発明は、...	...	...	...	...	...
072	本発明は、...	...	...	...	...	...
073	本発明は、...	...	...	...	...	...
074	本発明は、...	...	...	...	...	...
075	本発明は、...	...	...	...	...	...
076	本発明は、...	...	...	...	...	...
077	本発明は、...	...	...	...	...	...
078	本発明は、...	...	...	...	...	...
079	本発明は、...	...	...	...	...	...
080	本発明は、...	...	...	...	...	...
081	本発明は、...	...	...	...	...	...
082	本発明は、...	...	...	...	...	...
083	本発明は、...	...	...	...	...	...
084	本発明は、...	...	...	...	...	...
085	本発明は、...	...	...	...	...	...
086	本発明は、...	...	...	...	...	...
087	本発明は、...	...	...	...	...	...
088	本発明は、...	...	...	...	...	...
089	本発明は、...	...	...	...	...	...
090	本発明は、...	...	...	...	...	...
091	本発明は、...	...	...	...	...	...
092	本発明は、...	...	...	...	...	...
093	本発明は、...	...	...	...	...	...
094	本発明は、...	...	...	...	...	...
095	本発明は、...	...	...	...	...	...
096	本発明は、...	...	...	...	...	...
097	本発明は、...	...	...	...	...	...
098	本発明は、...	...	...	...	...	...
099	本発明は、...	...	...	...	...	...
100	本発明は、...	...	...	...	...	...

[0195]

[表29]

項目	内容	単位	数値	備考
1	...	...	...	...
2	...	...	...	...
3	...	...	...	...
4	...	...	...	...
5	...	...	...	...
6	...	...	...	...
7	...	...	...	...
8	...	...	...	...
9	...	...	...	...
10	...	...	...	...
11	...	...	...	...
12	...	...	...	...
13	...	...	...	...
14	...	...	...	...
15	...	...	...	...
16	...	...	...	...
17	...	...	...	...
18	...	...	...	...
19	...	...	...	...
20	...	...	...	...
21	...	...	...	...
22	...	...	...	...
23	...	...	...	...
24	...	...	...	...
25	...	...	...	...
26	...	...	...	...
27	...	...	...	...
28	...	...	...	...
29	...	...	...	...
30	...	...	...	...
31	...	...	...	...
32	...	...	...	...
33	...	...	...	...
34	...	...	...	...
35	...	...	...	...
36	...	...	...	...
37	...	...	...	...
38	...	...	...	...
39	...	...	...	...
40	...	...	...	...
41	...	...	...	...
42	...	...	...	...
43	...	...	...	...
44	...	...	...	...
45	...	...	...	...
46	...	...	...	...
47	...	...	...	...
48	...	...	...	...
49	...	...	...	...
50	...	...	...	...
51	...	...	...	...
52	...	...	...	...
53	...	...	...	...
54	...	...	...	...
55	...	...	...	...
56	...	...	...	...
57	...	...	...	...
58	...	...	...	...
59	...	...	...	...
60	...	...	...	...
61	...	...	...	...
62	...	...	...	...
63	...	...	...	...
64	...	...	...	...
65	...	...	...	...
66	...	...	...	...
67	...	...	...	...
68	...	...	...	...
69	...	...	...	...
70	...	...	...	...
71	...	...	...	...
72	...	...	...	...
73	...	...	...	...
74	...	...	...	...
75	...	...	...	...
76	...	...	...	...
77	...	...	...	...
78	...	...	...	...
79	...	...	...	...
80	...	...	...	...
81	...	...	...	...
82	...	...	...	...
83	...	...	...	...
84	...	...	...	...
85	...	...	...	...
86	...	...	...	...
87	...	...	...	...
88	...	...	...	...
89	...	...	...	...
90	...	...	...	...
91	...	...	...	...
92	...	...	...	...
93	...	...	...	...
94	...	...	...	...
95	...	...	...	...
96	...	...	...	...
97	...	...	...	...
98	...	...	...	...
99	...	...	...	...
100	...	...	...	...

[0196]









[表34]

試験番号	試験内容	試験回数	試験結果	試験結果	試験結果
001	試験内容	100	54	100	54
002	試験内容	100	55	100	55
003	試験内容	100	56	100	56
004	試験内容	100	57	100	57
005	試験内容	100	58	100	58
006	試験内容	100	59	100	59
007	試験内容	100	60	100	60
008	試験内容	100	61	100	61
009	試験内容	100	62	100	62
010	試験内容	100	63	100	63
011	試験内容	100	64	100	64
012	試験内容	100	65	100	65
013	試験内容	100	66	100	66
014	試験内容	100	67	100	67
015	試験内容	100	68	100	68
016	試験内容	100	69	100	69
017	試験内容	100	70	100	70
018	試験内容	100	71	100	71
019	試験内容	100	72	100	72
020	試験内容	100	73	100	73
021	試験内容	100	74	100	74
022	試験内容	100	75	100	75
023	試験内容	100	76	100	76
024	試験内容	100	77	100	77
025	試験内容	100	78	100	78
026	試験内容	100	79	100	79
027	試験内容	100	80	100	80
028	試験内容	100	81	100	81
029	試験内容	100	82	100	82
030	試験内容	100	83	100	83
031	試験内容	100	84	100	84
032	試験内容	100	85	100	85
033	試験内容	100	86	100	86
034	試験内容	100	87	100	87
035	試験内容	100	88	100	88
036	試験内容	100	89	100	89
037	試験内容	100	90	100	90
038	試験内容	100	91	100	91
039	試験内容	100	92	100	92
040	試験内容	100	93	100	93
041	試験内容	100	94	100	94
042	試験内容	100	95	100	95
043	試験内容	100	96	100	96
044	試験内容	100	97	100	97
045	試験内容	100	98	100	98
046	試験内容	100	99	100	99
047	試験内容	100	100	100	100

[0201]













. com/articles/s41587-020-0603-3) で報告されている204,938腸内細菌ゲノムのTaxonomy情報を取得し、これを腸内細菌リストとして、今回グルコン酸代謝菌として解析的に同定した菌種が腸内細菌に含まれるかを照らし合わせた。

[0208] この結果、腸内細菌リストとの種名の一致から、10種 (gad)、68種 (gnt) がそれぞれ腸内から検出されることが示唆された。なお、前記10種 (gad) 及び68種 (gnt) は、表13~40において、「gut\_microbes」の項目が「1」となっている菌である。

[0209] すなわち、図19A~19D及び以上の結果から、Kp-2H7等の疾患を惹起する細菌と、グルコン酸消費において競合することによって、前記細菌の腸内定着を抑制し得る菌として、図19A~19D中の中央の棒グラフにおいてグルコン酸量が100  $\mu$ M以下である菌、上記70種 (gad) 及び403種 (gnt) のうちの少なくとも1種の菌が好ましく、さらに図19A~19D中の中央の棒グラフにおいてグルコン酸量が100  $\mu$ M以下である菌、上記10種 (gad) 及び68種 (gnt) のうちの少なくとも1種の菌がより好ましく、さらに図19A~19D中の中央の棒グラフにおいてグルコン酸量が100  $\mu$ M以下である菌が特に好ましいことが示される。

[0210] (実施例12) Kp2H7株の腸内定着に対する、F18mix又はF13mixの抑制効果

無菌マウスに、健常人#Fの糞便試料から単離した腸内細菌18株 (F18-mix) を投与した群、13株 (F13-mix) を投与した群、何も投与しなかった群 (Kp only) の3群に分け (各群4匹)、実験開始直後に、前者2群にはF18mix又はF13mixを投与し、その2週間後に3群それぞれに対してKp2H7株を投与した際の、便中Kp2H7株の菌量を経時的に解析した。得られた結果を図20に示す。

[0211] 図20に示した結果から明らかなように、何も投与しなかった群と比較して、特にF18mixを投与した際はKp2H7株の菌量増加が大きく抑制されることが確認された。

## 産業上の利用可能性

[0212] 以上説明したように、本発明によれば、薬剤耐性細菌、炎症惹起性細菌といったグルコン酸消費菌の腸管への定着等を抑制することによって、これら細菌に起因する疾患を治療又は予防することも可能となる。したがって、本発明は、前記細菌に起因する感染症等に関する、医薬品の開発、治療、改善及び予防等において、極めて有用である。

## 受託番号

- [0213] (1) 識別の表示：f 1\_\_4 2 H 6  
(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 4 7  
(3) 受託日：2 0 2 0 年 3 月 2 日  
(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
- (1) 識別の表示：f 1 2\_\_4 2 H 4  
(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 4 8  
(3) 受託日：2 0 2 0 年 3 月 2 日  
(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
- (1) 識別の表示：f 1 7\_\_4 2 I 7  
(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 4 9  
(3) 受託日：2 0 2 0 年 3 月 2 日  
(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
- (1) 識別の表示：f 1 8\_\_4 2 I 2  
(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 0  
(3) 受託日：2 0 2 0 年 3 月 2 日  
(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
- (1) 識別の表示：f 1 9\_\_4 3 G 2

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 1

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f 2 0 \_ 4 3 G 1

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 2

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f 2 1 \_ 4 2 A 8

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 3

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f 2 2 \_ 4 3 C 3

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 4

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f 2 3 \_ 4 2 K 4

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 5

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f 2 4 \_ 4 2 I 4

(2) 受託番号：N I T E B P - 0 3 1 5 6

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

ター

- (1) 識別の表示 : f 2 6 \_\_ 4 2 K 2
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 5 7
- (3) 受託日 : 2 0 2 0 年 3 月 2 日
- (4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン

ター

- (1) 識別の表示 : f 2 8 \_\_ 4 3 A 3
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 5 8
- (3) 受託日 : 2 0 2 0 年 3 月 2 日
- (4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン

ター

- (1) 識別の表示 : f 3 0 \_\_ 4 3 A 5
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 5 9
- (3) 受託日 : 2 0 2 0 年 3 月 2 日
- (4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン

ター

- (1) 識別の表示 : f 3 1 \_\_ 4 3 J 5
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 6 0
- (3) 受託日 : 2 0 2 0 年 3 月 2 日
- (4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン

ター

- (1) 識別の表示 : f 3 2 \_\_ 4 2 A 7
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 6 1
- (3) 受託日 : 2 0 2 0 年 3 月 2 日
- (4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン

ター

- (1) 識別の表示 : f 3 3 \_\_ 4 3 N 2
- (2) 受託番号 : N I T E B P - 0 3 1 6 2

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f35\_\_42L8

(2) 受託番号：NITE BP-03163

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f37\_\_42G1

(2) 受託番号：NITE BP-03164

(3) 受託日：2020年3月2日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f10\_\_43J3

(2) 受託番号：NITE BP-03800

(3) 受託日：2023年1月12日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(1) 識別の表示：f29\_\_43J8

(2) 受託番号：NITE BP-03801

(3) 受託日：2023年1月12日

(4) 寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

## 請求の範囲

- [請求項1] グルコン酸を消費する第1の細菌を有効成分として含有する、グルコン酸を消費する第2の細菌に対する抗菌組成物。
- [請求項2] 第1の細菌が、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 第1の細菌が、グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項4] グルコン酸を低濃度で含有する食品と組み合わせて摂取させる、請求項1～3のうちのいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項5] 前記食品と同時に又は異時に摂取させる、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6] 第2の細菌が、グルコン酸を消費しかつ疾患を惹起する細菌である、請求項1～3のうちのいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項7] 医薬組成物である、請求項6に記載の組成物。
- [請求項8] グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法であって、  
被験細菌についてグルコン酸を消費能を検出する工程、及び  
前記工程にて前記消費能を有することが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、方法。
- [請求項9] グルコン酸を消費する細菌に対して抗菌活性を有する細菌をスクリーニングする方法であって、  
被験細菌について、グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする

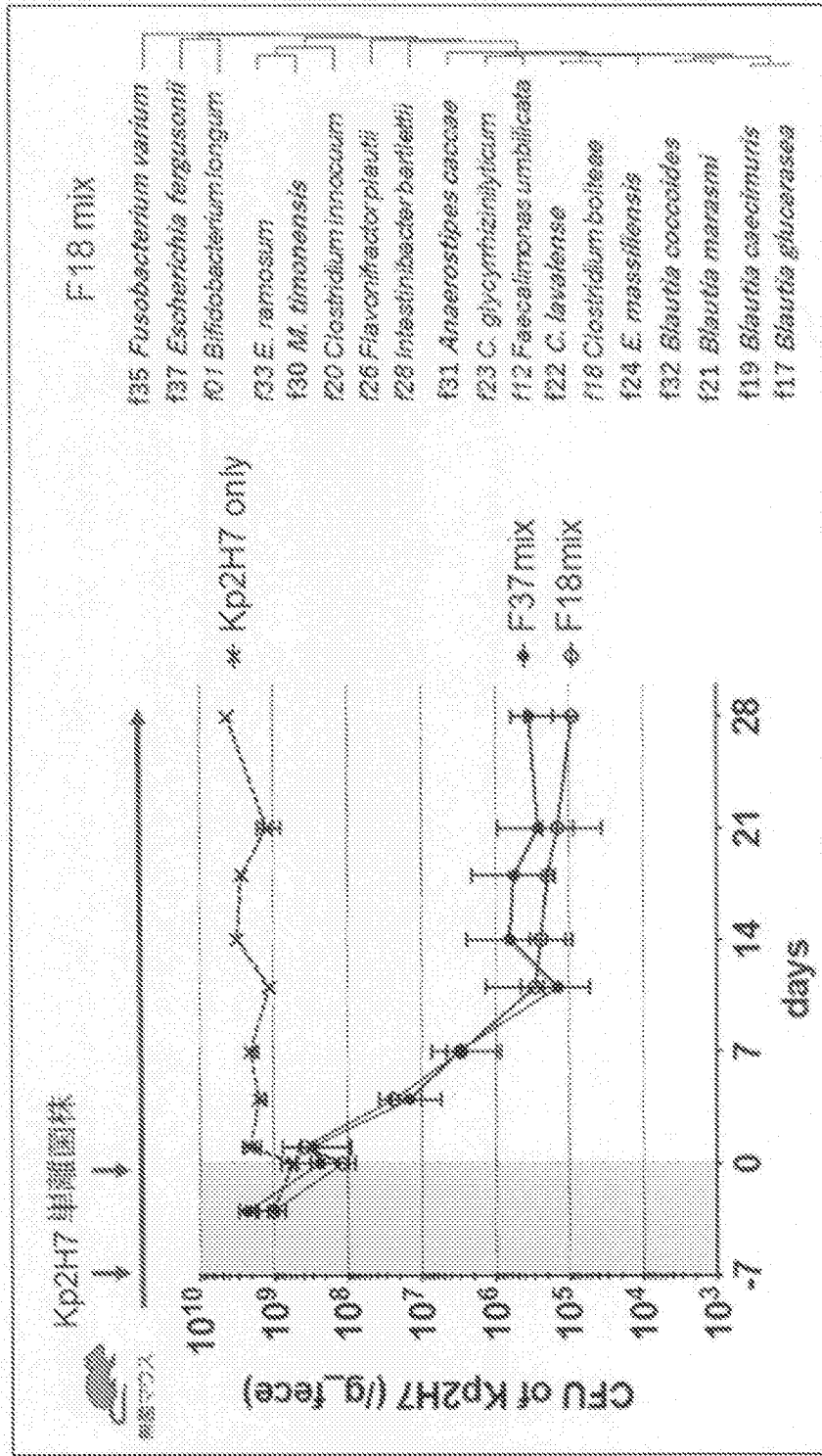
遺伝子とを検出する工程、及び

前記工程にて検出された遺伝子が、同一の遺伝子クラスターに含まれていることが認められた場合、前記被験細菌は前記抗菌活性を有すると判定する工程を含む、方法。

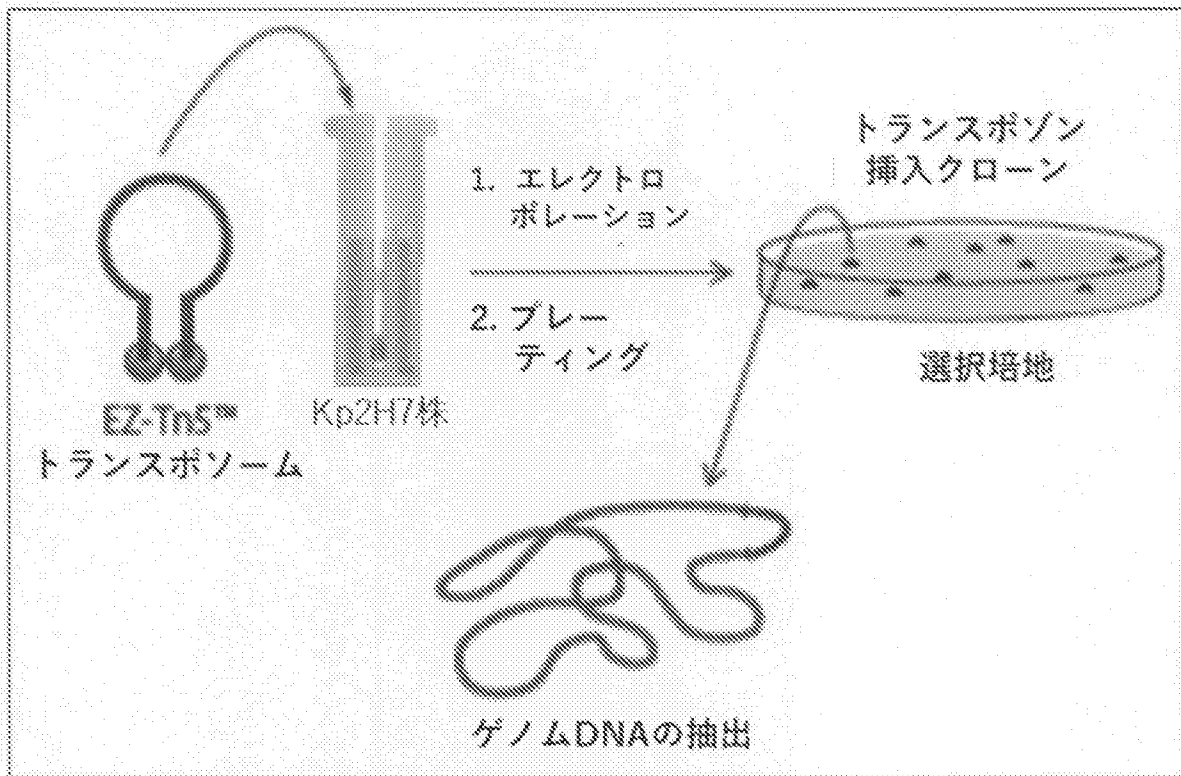
[請求項10]       グルコン酸キナーゼをコードする遺伝子及びグルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌。

[請求項11]       グルコン酸脱水素酵素をコードする遺伝子と、グルコン酸トランスポーターをコードする遺伝子とを、同一の遺伝子クラスターに含む細菌。

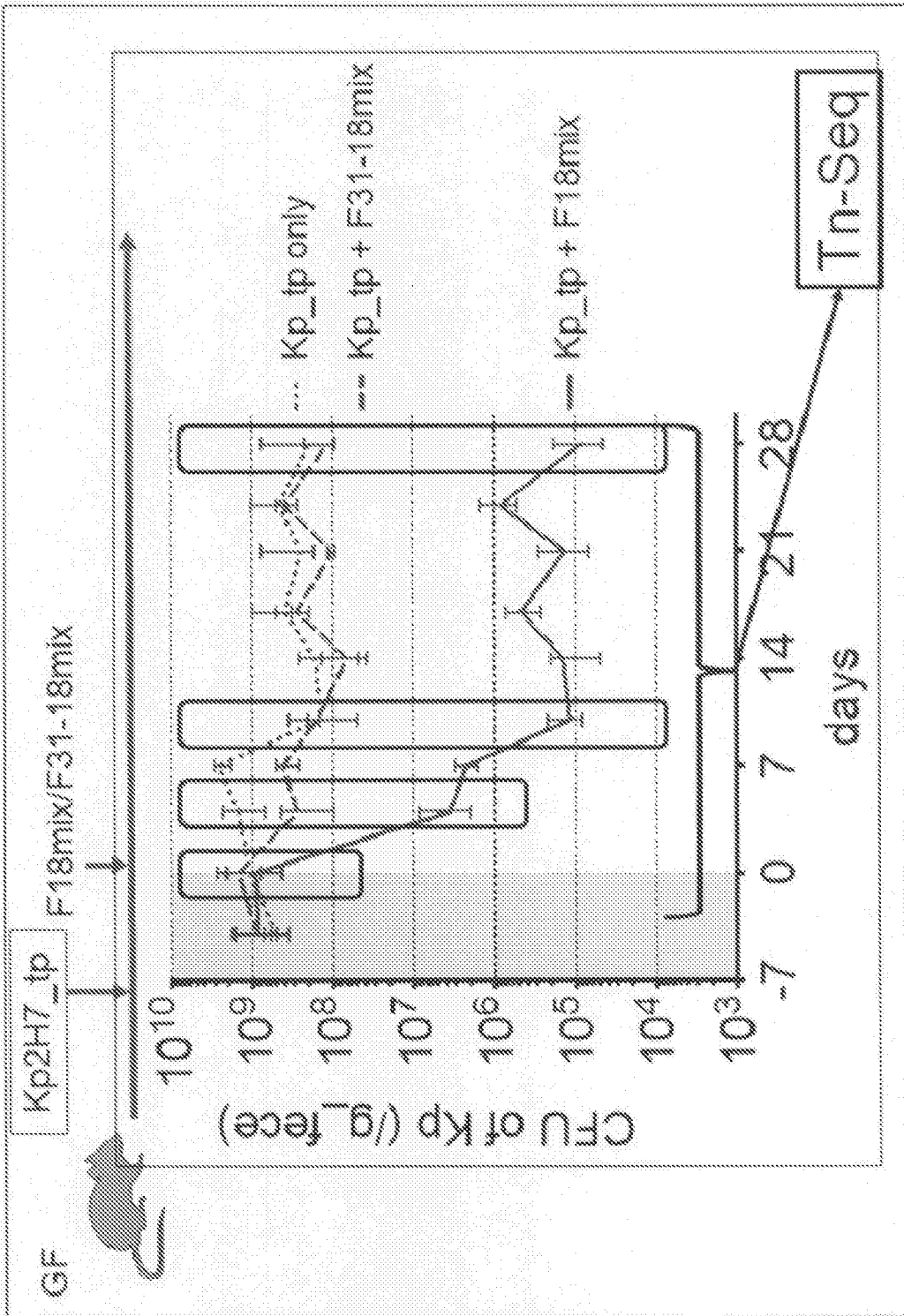
[ 1 ]



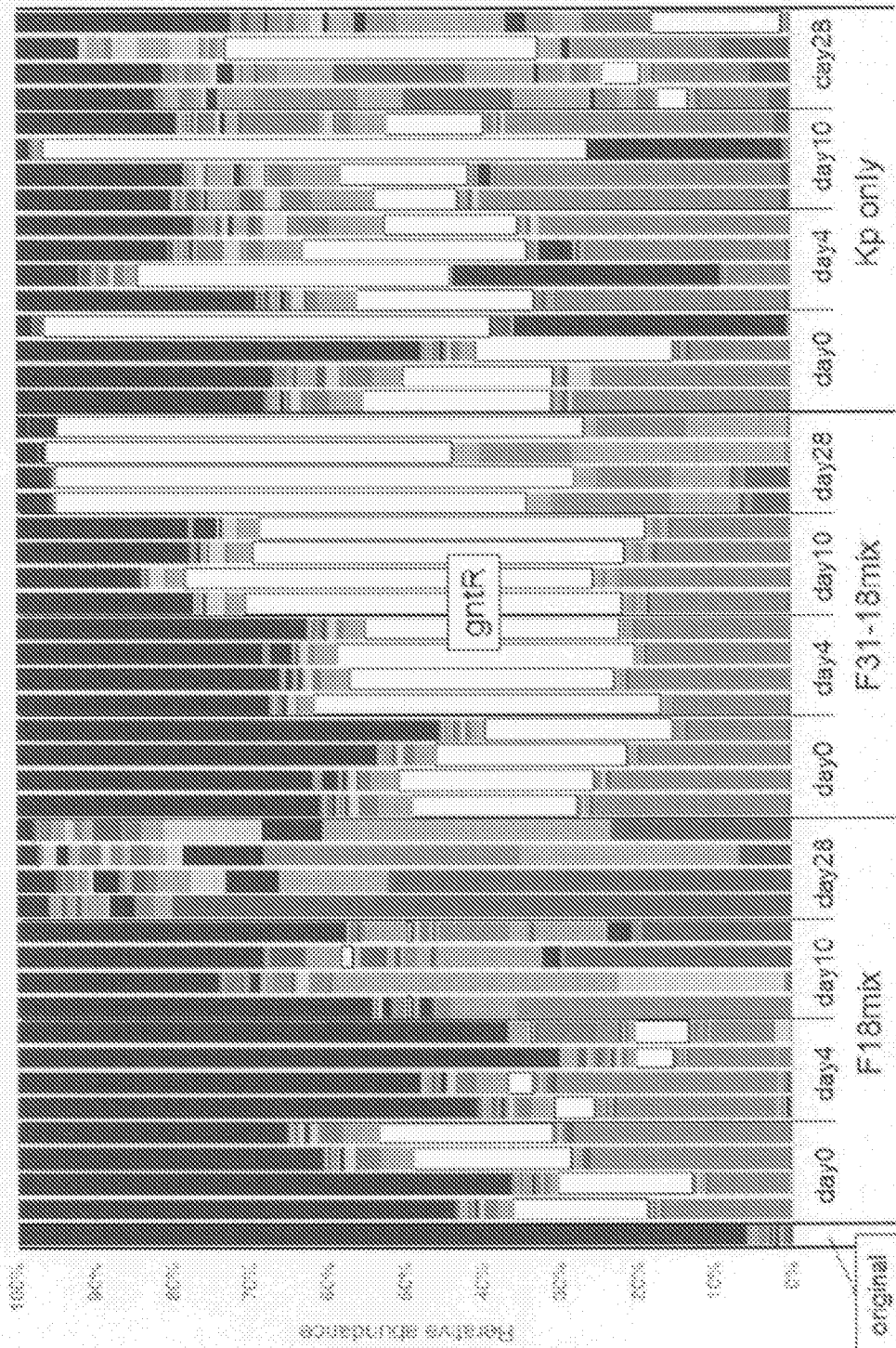
[図2]



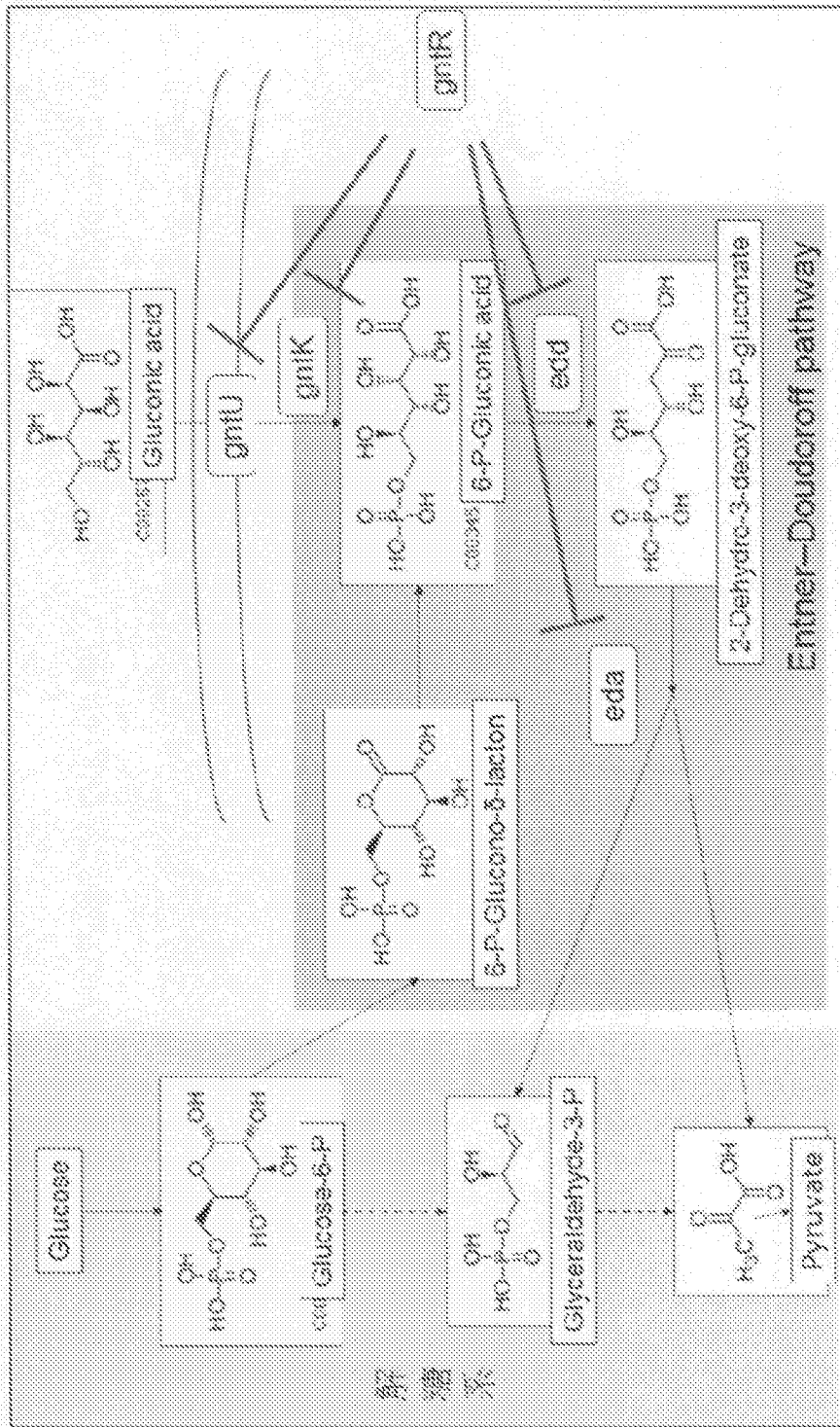
[図3]



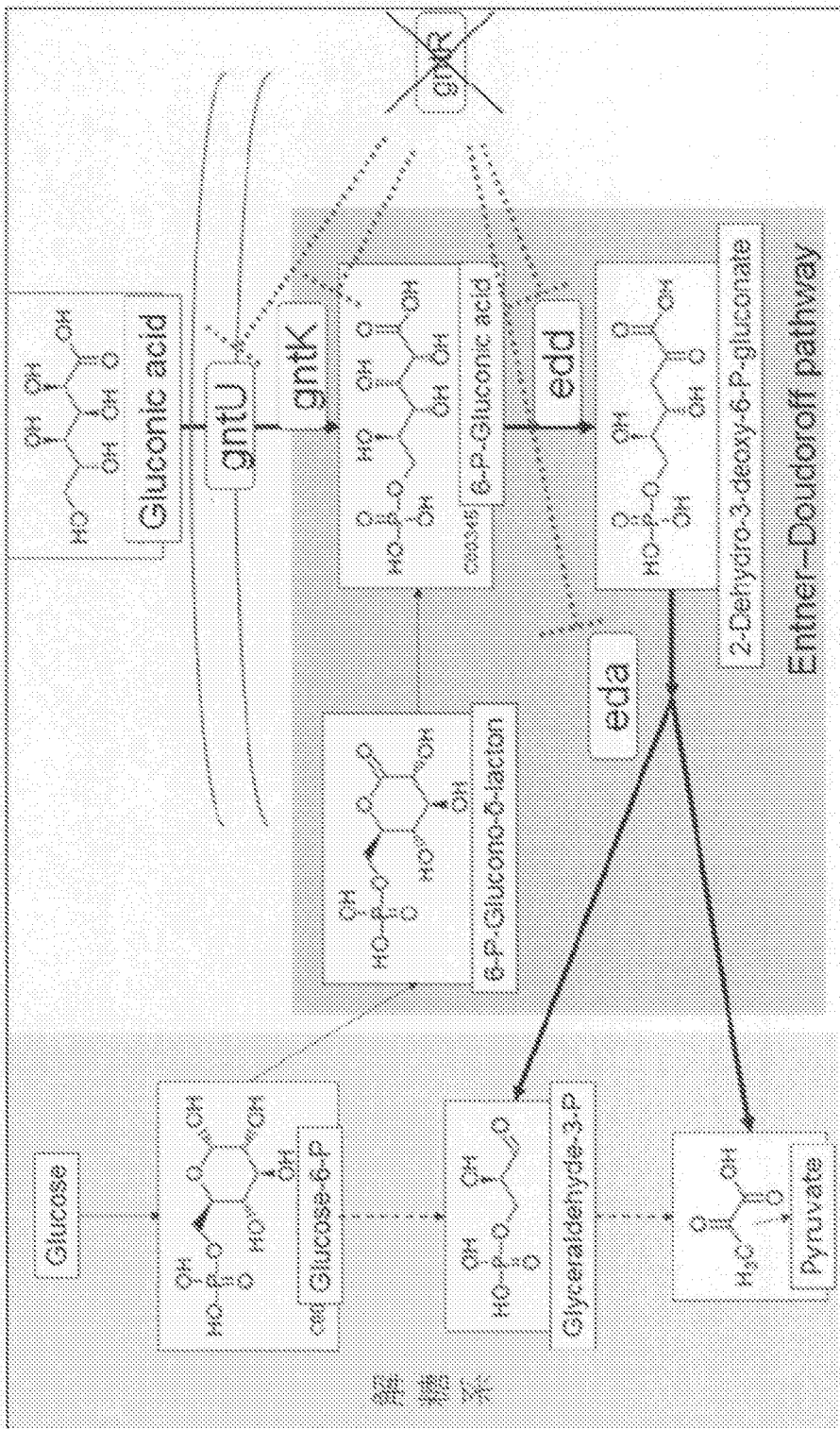
[図4]



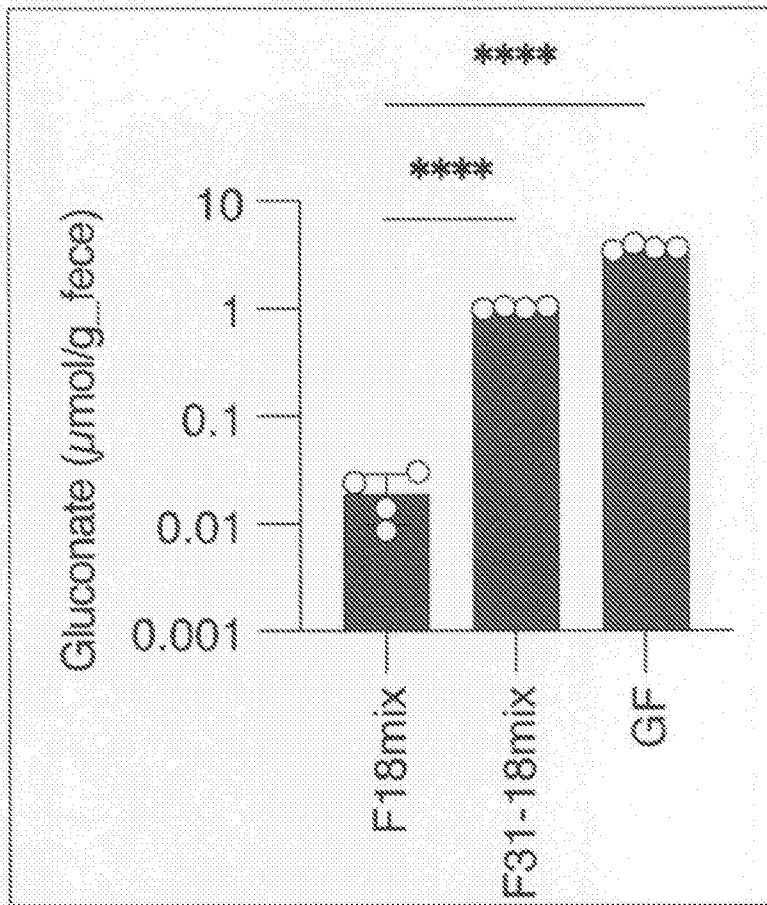
[図5A]



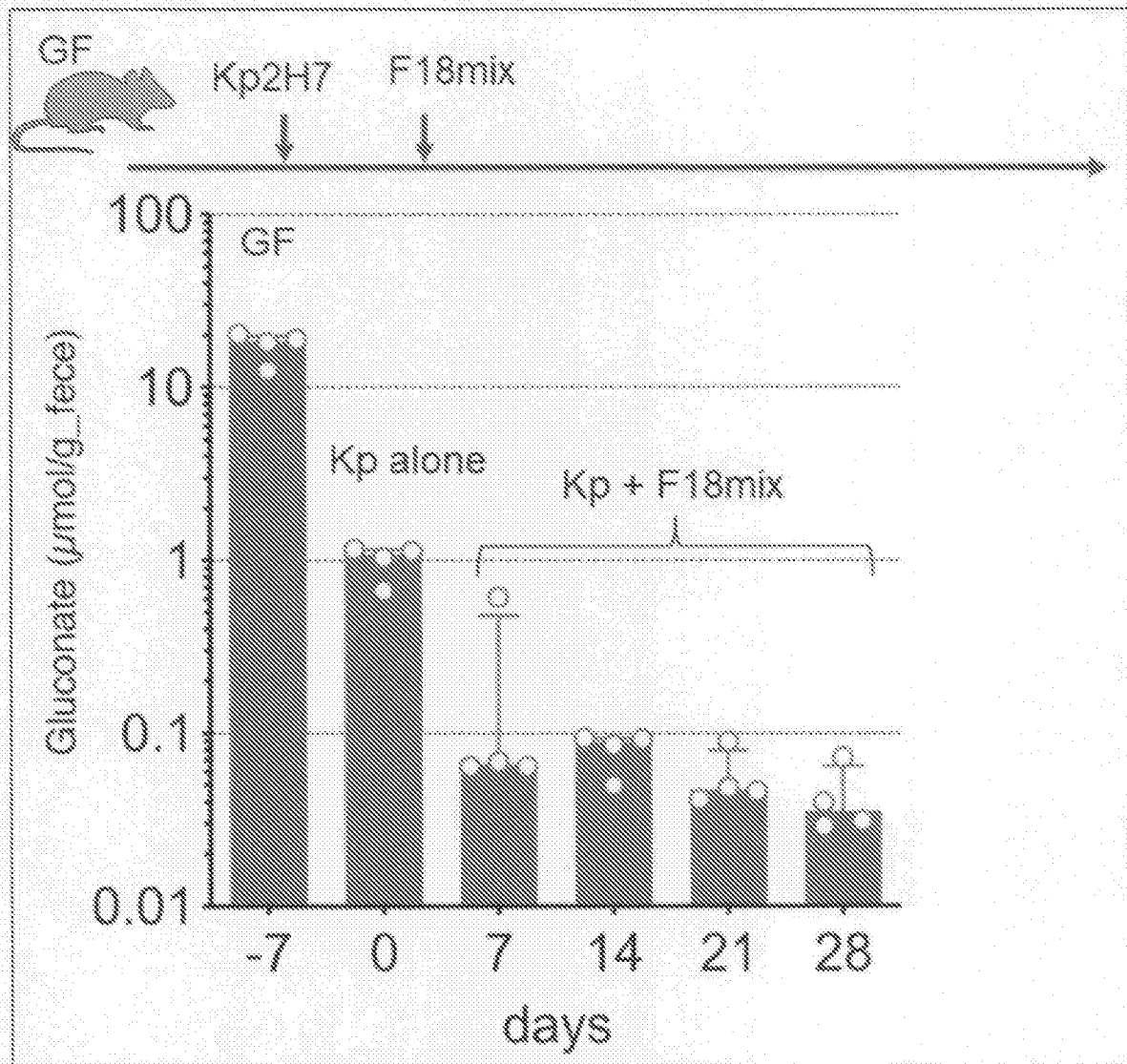
[図5B]



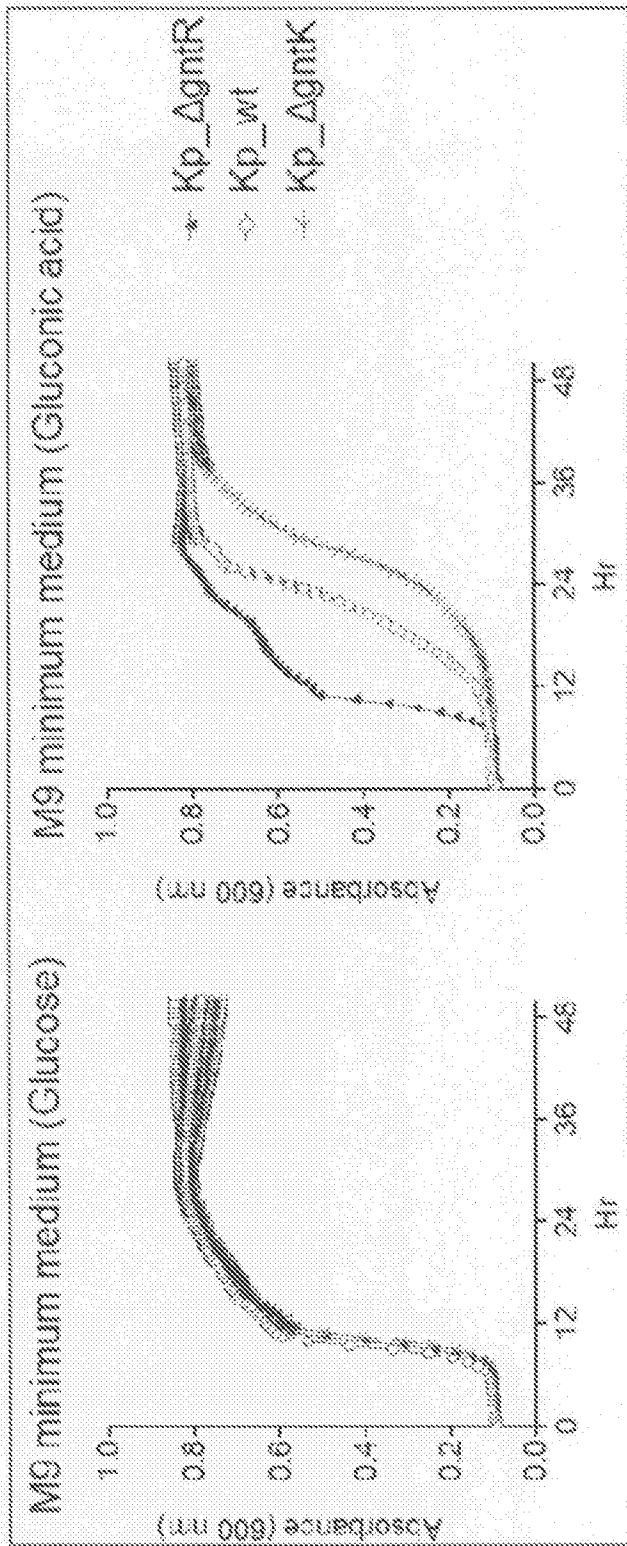
[図6]



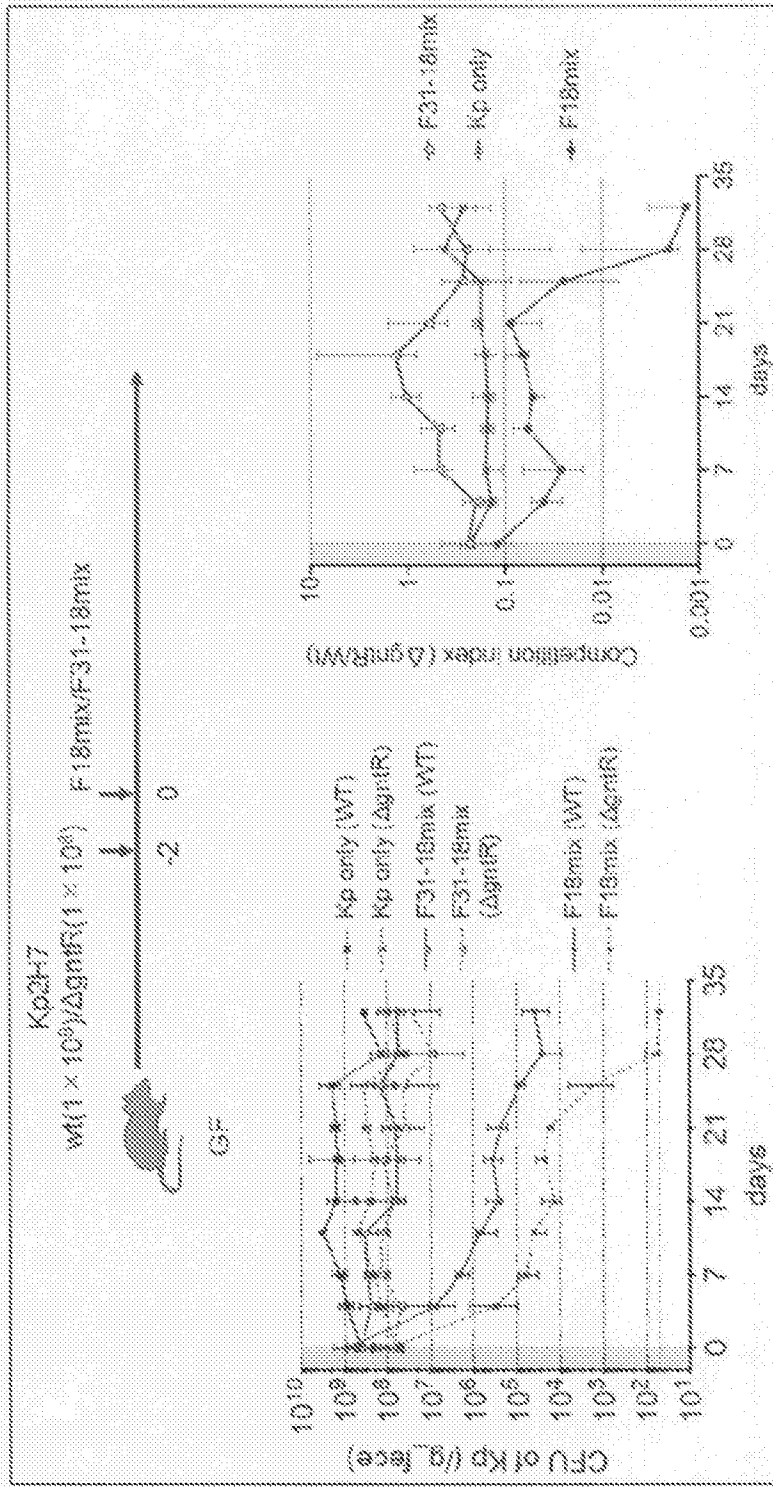
[7]



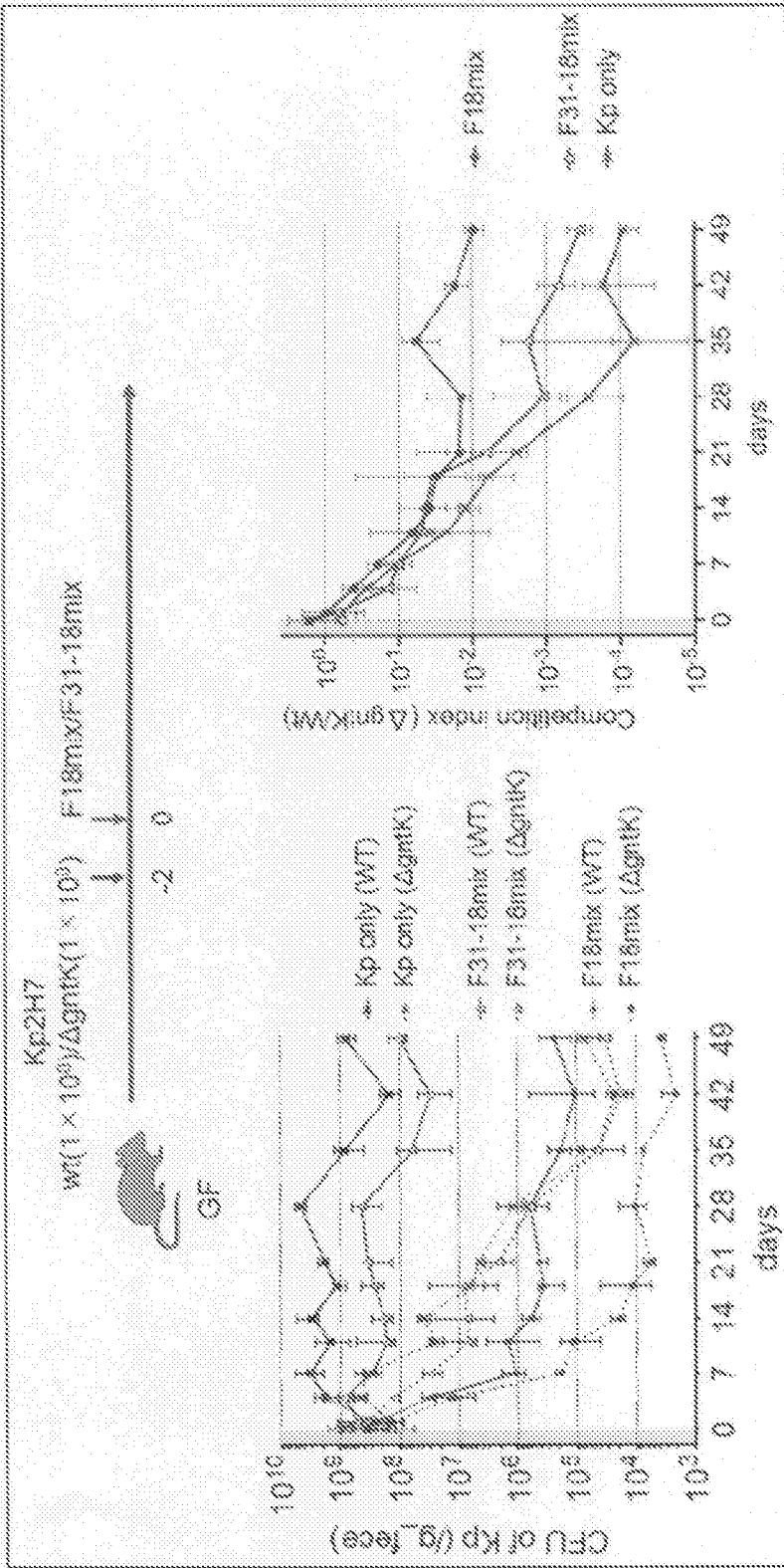
[8]



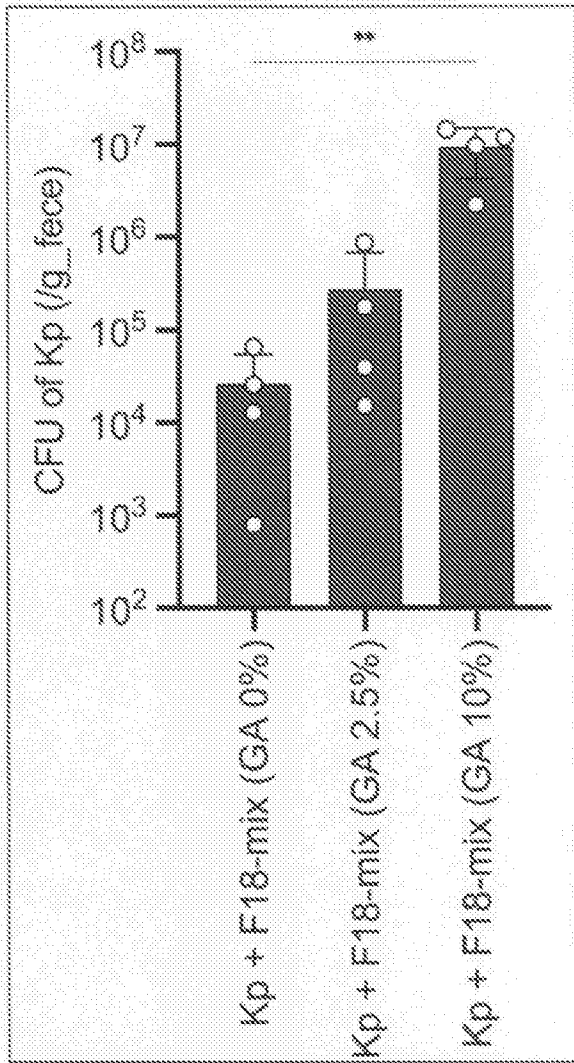
[9]



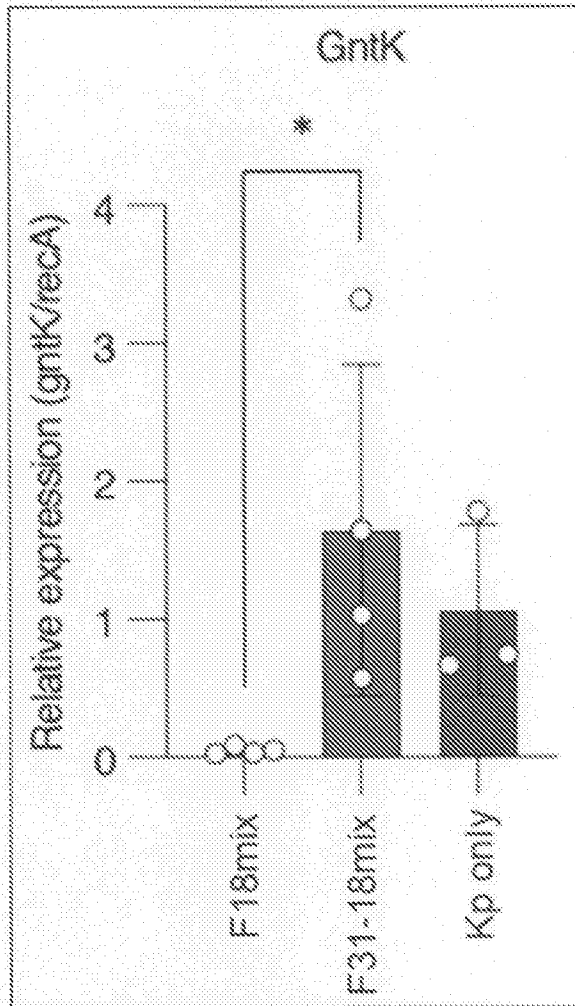
[10]



[11]

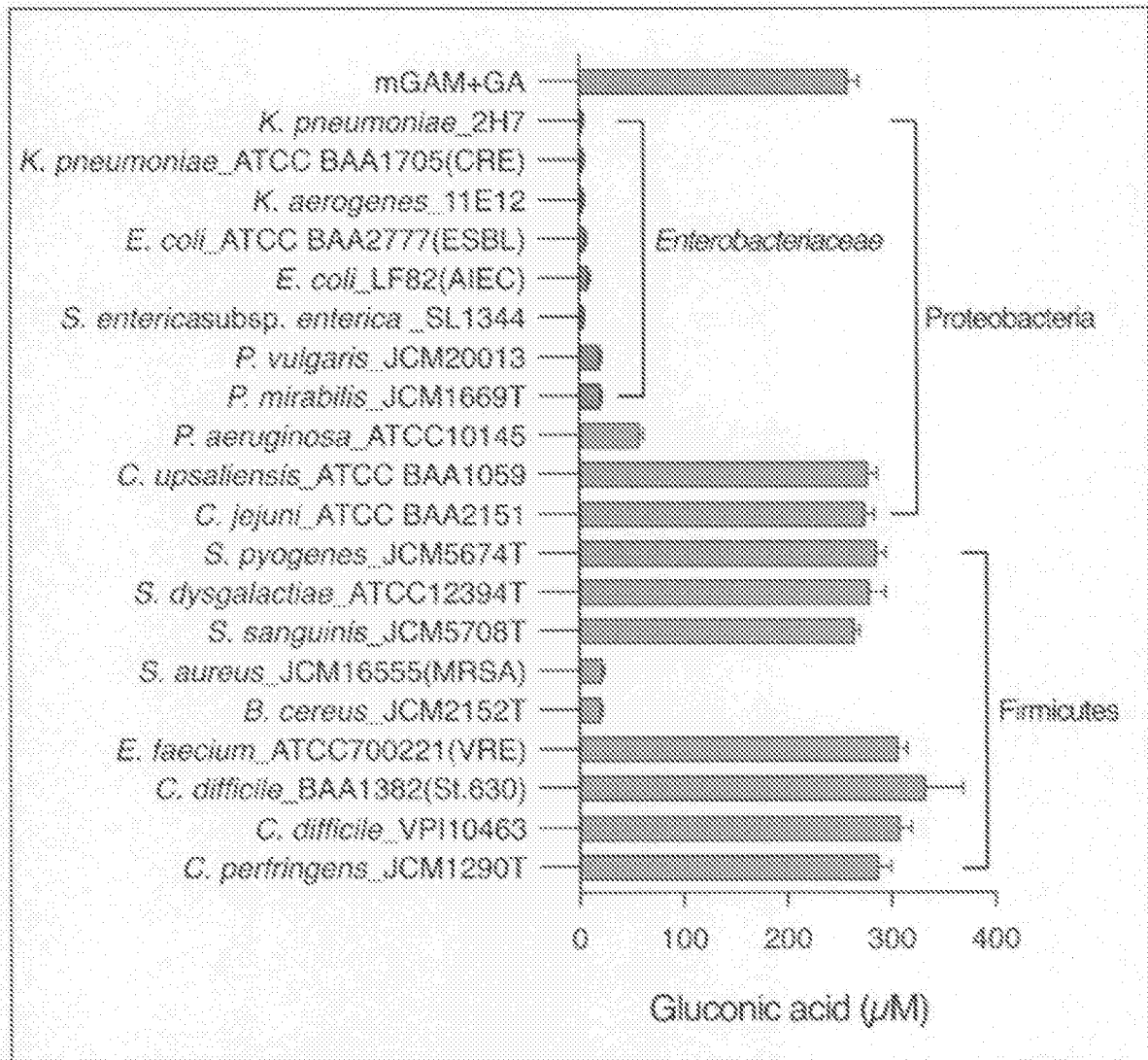


[圖12]

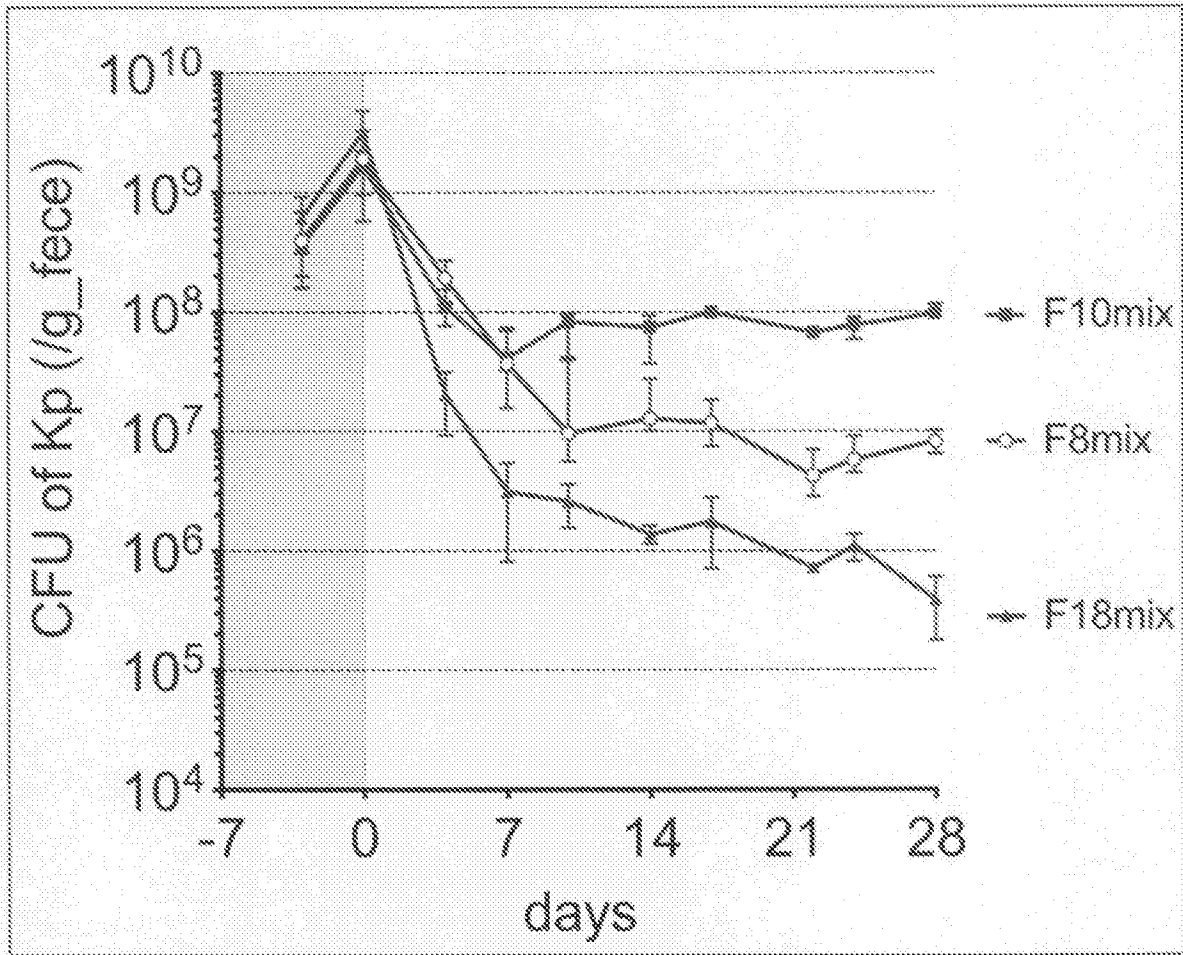




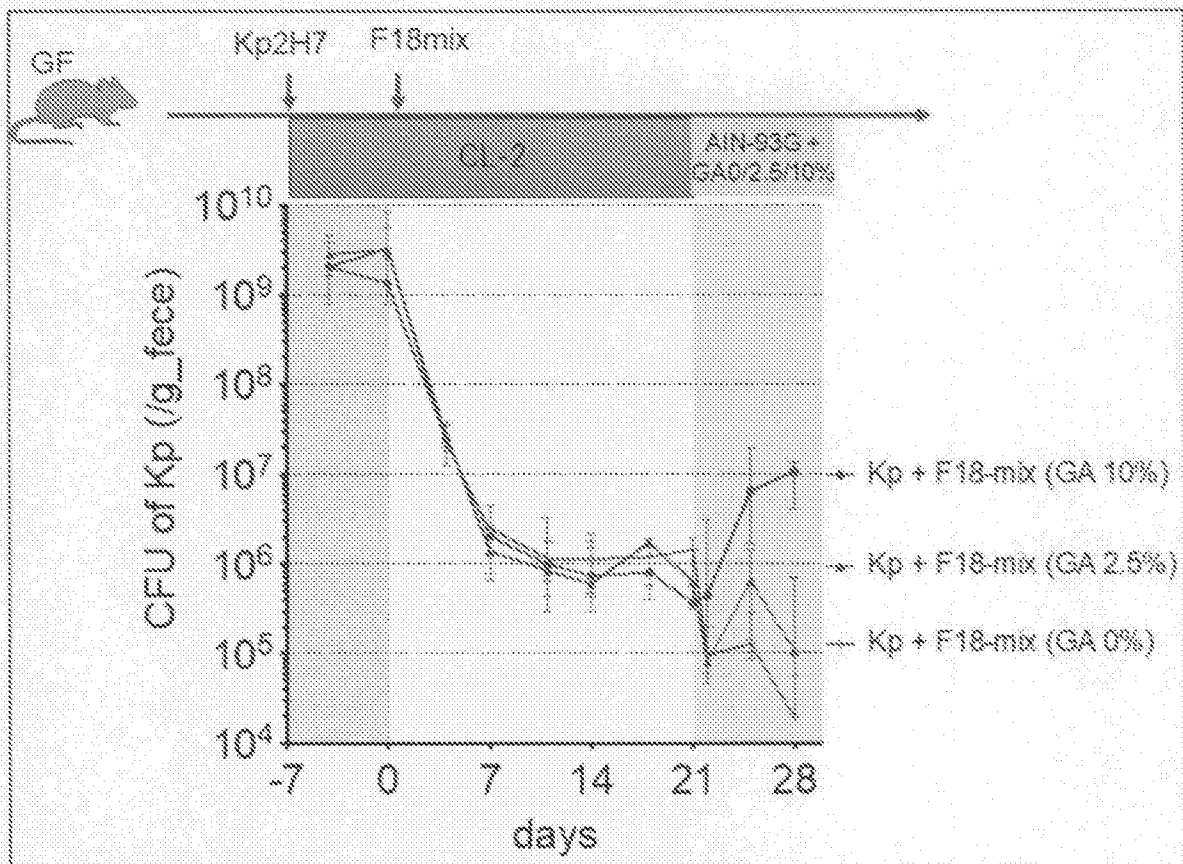
[図14]



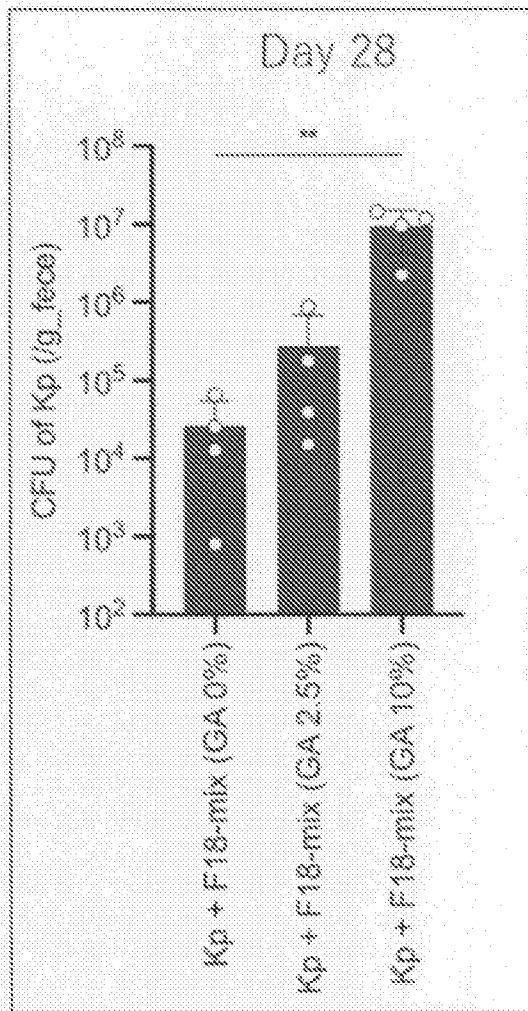
[図15]




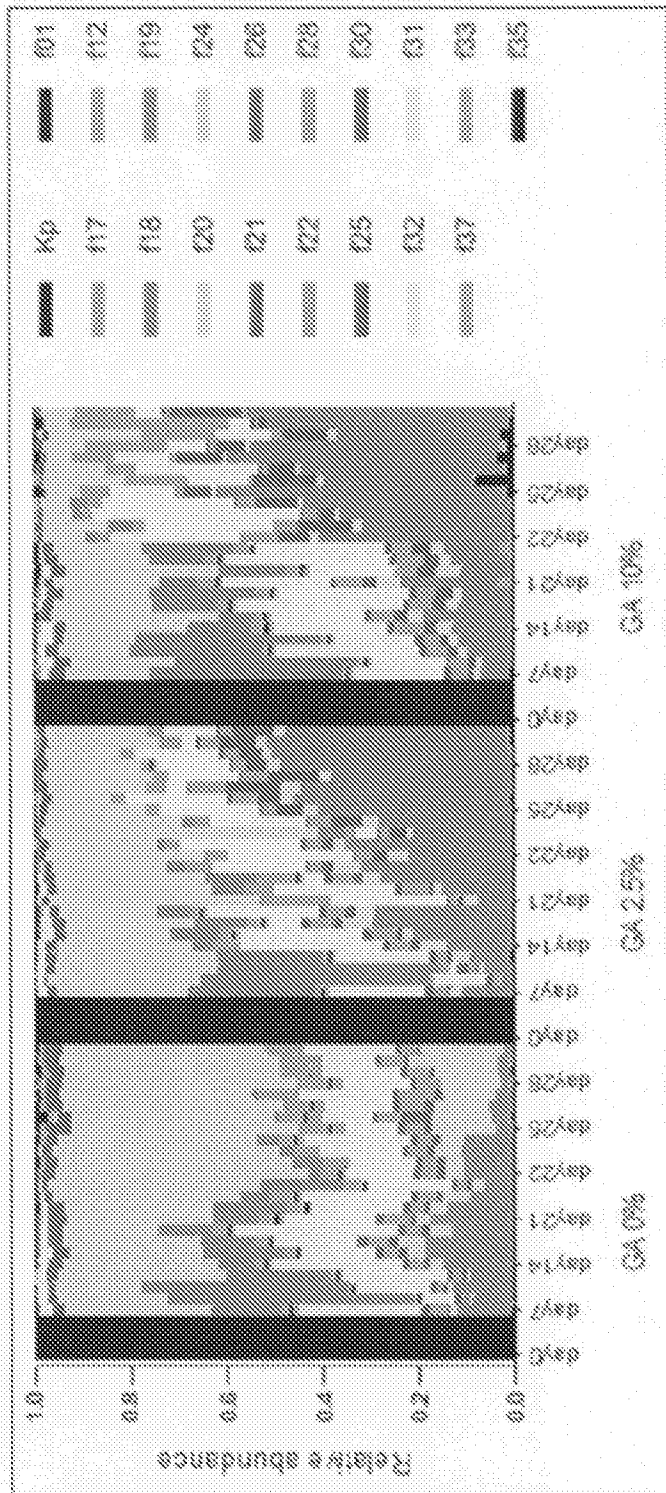
[図16A]



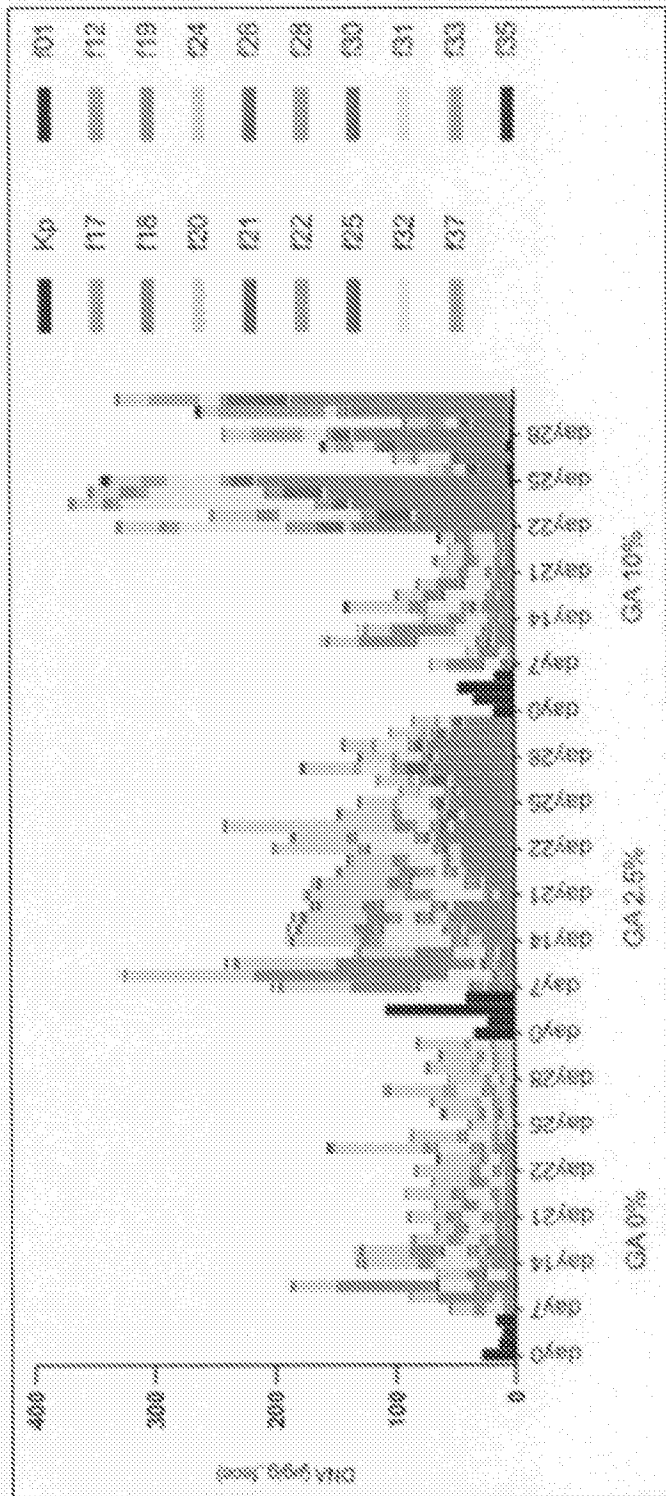
[16B]




[ 16C]

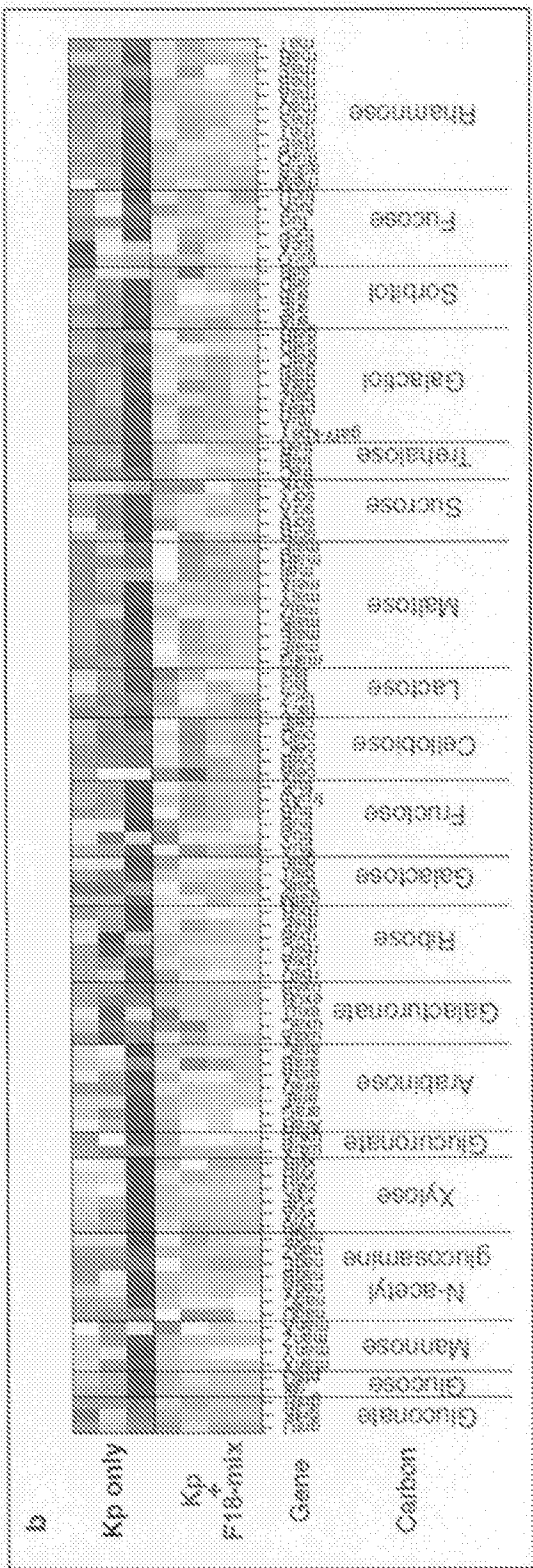


[図16D]

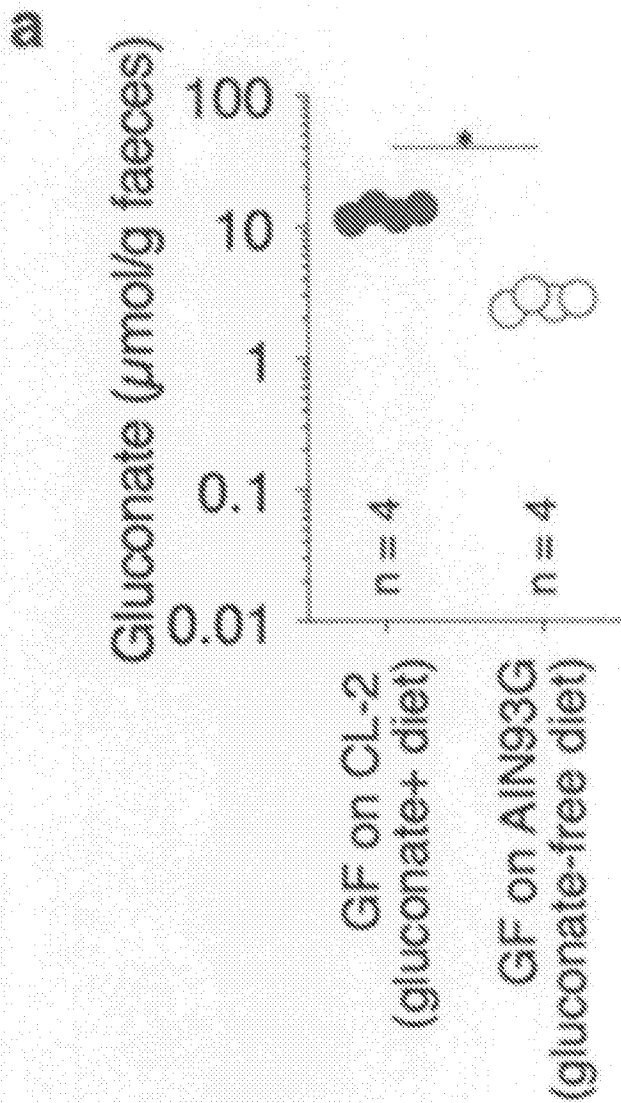




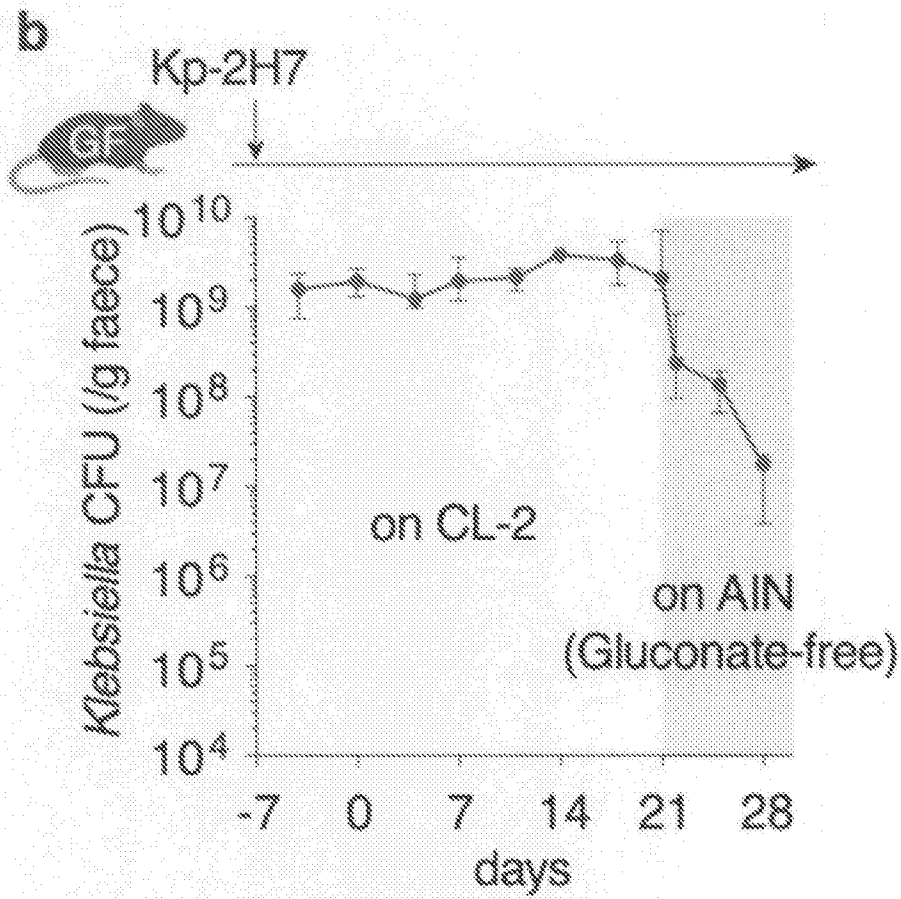
[17B]



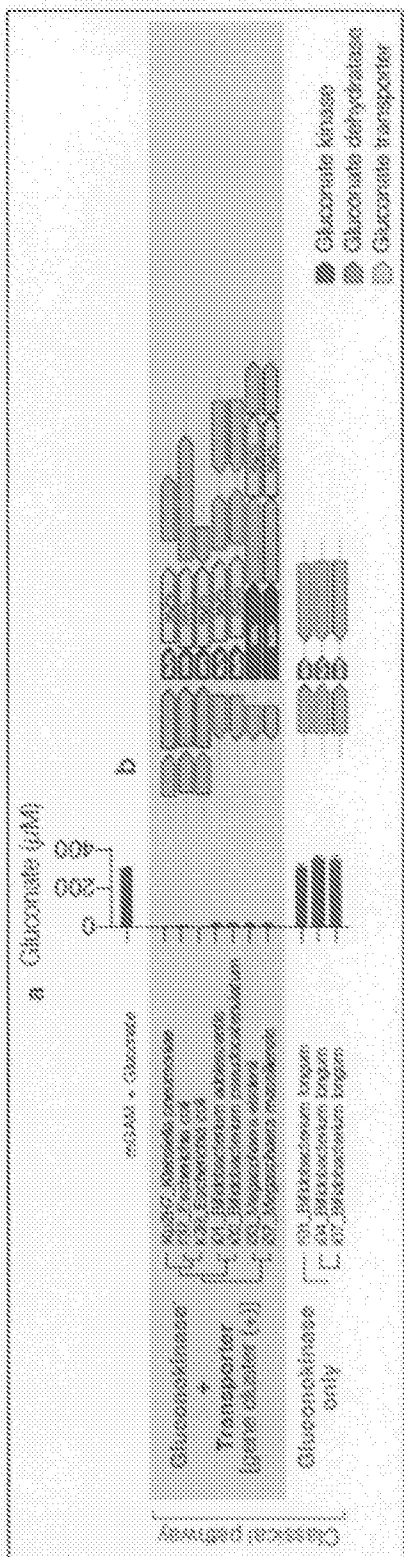
[18A]



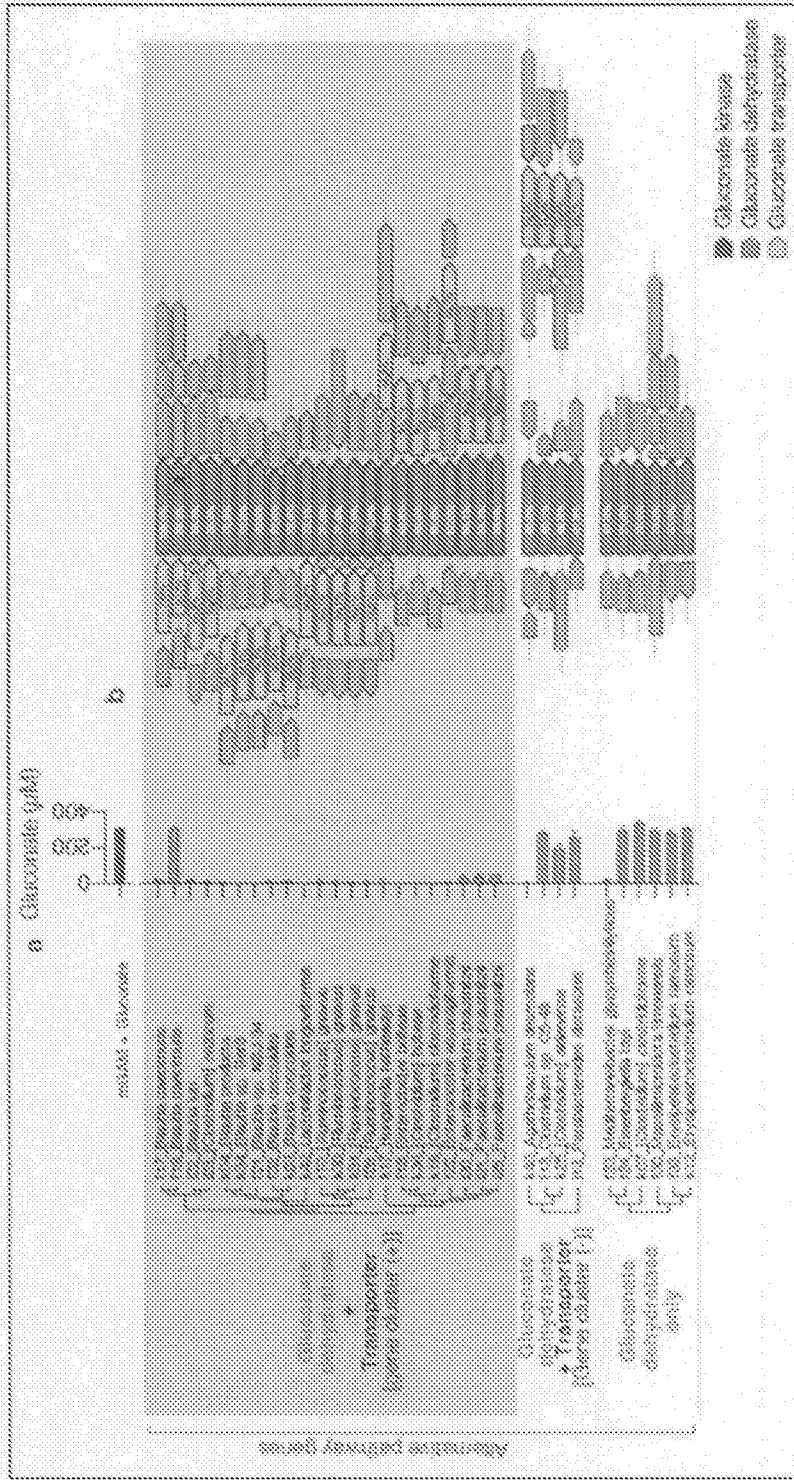
[圖18B]




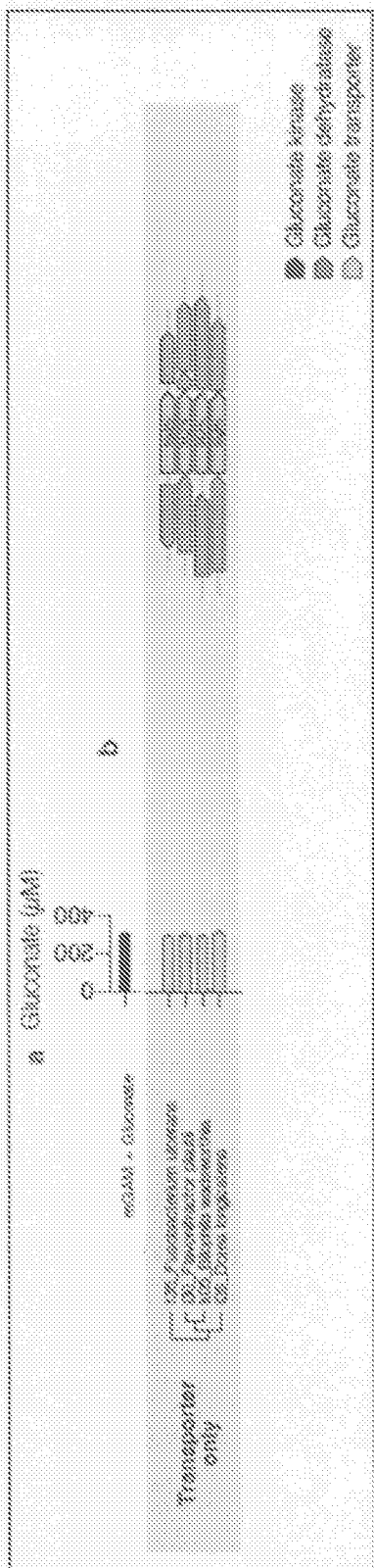
[19A]



[19B]

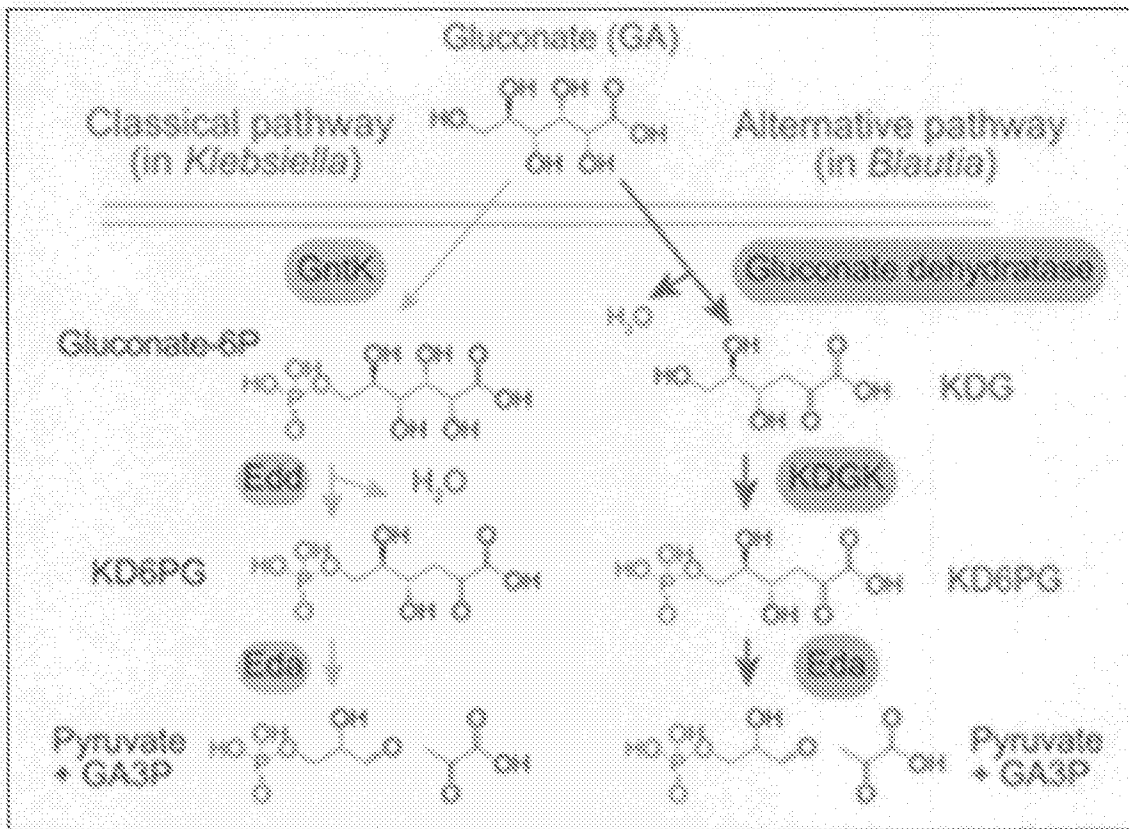


[19C]

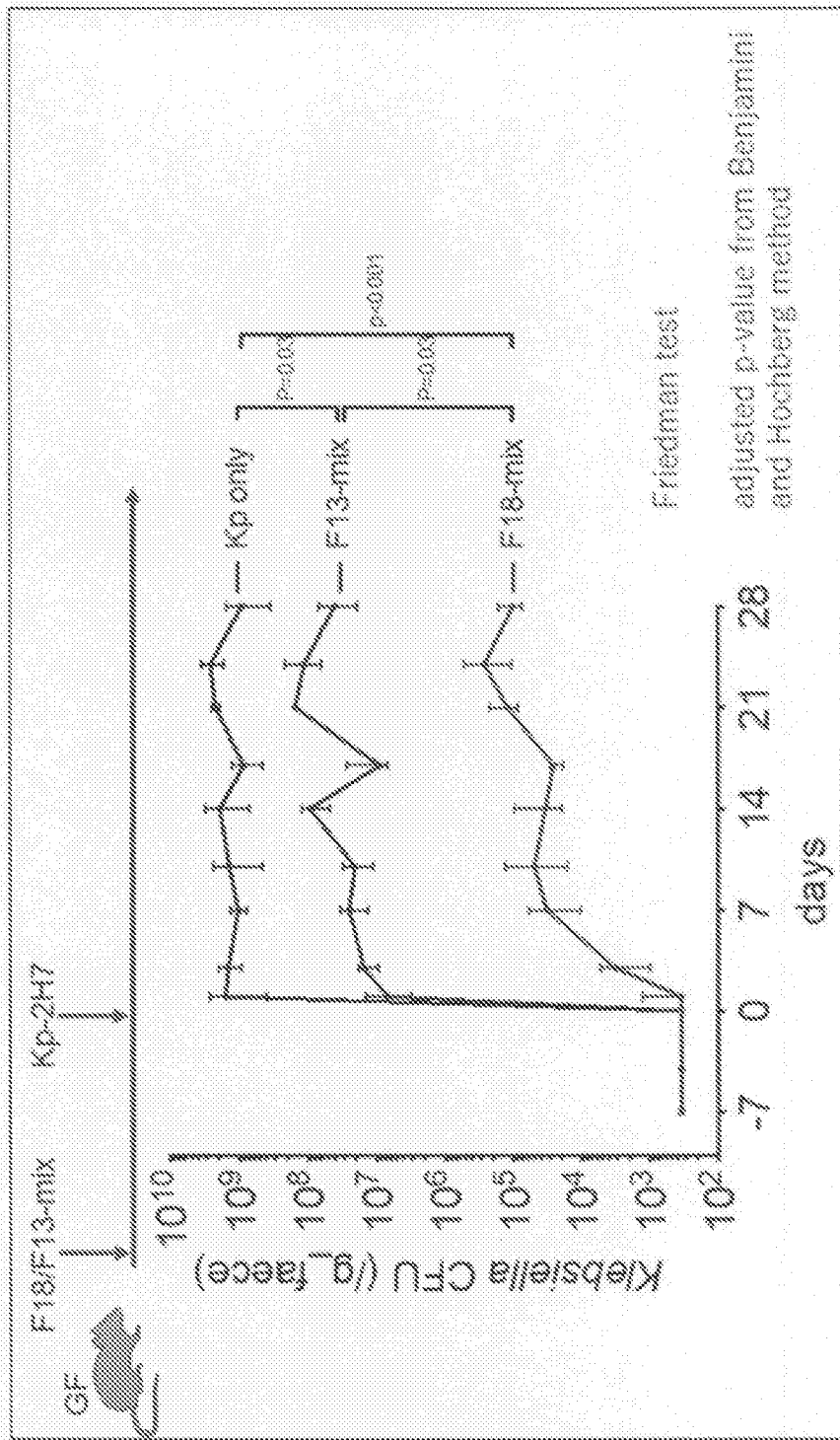




[19E]



[圖20]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/008014

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 35/741</b>(2015.01)i; <b>A23L 33/135</b>(2016.01)i; <b>A61P 31/04</b>(2006.01)i; <b>C12Q 1/04</b>(2006.01)i; <b>C12N 1/20</b>(2006.01)n  FI: A61K35/741; A23L33/135; A61P31/04; C12Q1/04; C12N1/20 E ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/741; A23L33/135; A61P31/04; C12Q1/04; C12N1/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/017389 A1 (KEIO UNIVERSITY) 24 January 2019 (2019-01-24) claim 1, paragraphs [0010]-[0011], [0022], examples 4, 6	1-3, 6, 7, 10, 11
X	WO 2020/179868 A1 (KEIO UNIVERSITY) 10 September 2020 (2020-09-10) examples 7, 8	1-3, 6, 7, 10, 11
X	SYLVESTRE, P. et al., Carbohydrate Metabolism Differences between Subgroup A1 and B2 Strains of Bacillus anthracis as Assessed by Comparative Genomics and Functional Genetics, Applied and Environmental Microbiology, 2009, vol. 75, no. 17, pages 5727-5728 abstract, fig. 1, etc.	10, 11
Y		1-11
X	CASTILLO, T. et al., A Set of Activators and Repressors Control Peripheral Glucose Pathways in Pseudomonas putida To Yield a Common Central Intermediate, J. Bacteriol., 2008, vol. 190, no. 7, pages 2331-2339 abstract, fig. 1, 2C, etc.	10
Y		1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 <b>07 May 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>14 May 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAWLEY, T. D. et al., Intestinal colonization resistance, Immunology, 2012, vol. 138, pages 1-11 abstract, page 2, left column, third paragraph, page 6, left column, third paragraph	1-11
Y	AMIRMOZAFARI, N. et al., Nutritional Requirements for Synthesis of Heat-Stable Enterotoxin by Yersinia enterocolitica, Applied and Environmental Microbiology, 1993, vol. 59, no. 10, pages 3314-3320 title, page 3317, left column, the last paragraph to right column, first paragraph, page 3319, left column, fourth paragraph, table 4	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/008014

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2024/008014</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019/017389 A1	24 January 2019	US 2020/0171099 A1 claim 1, paragraphs [0015]- [0016], [0038]-[0039], examples 4, 6	
		EP 3656389 A1	
		CN 110891583 A	
-----			
WO 2020/179868 A1	10 September 2020	US 2022/0125858 A1 examples 7, 8	
		EP 3957367 A1	
		CN 113573780 A	
-----			

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 35/741(2015.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)n FI: A61K35/741; A23L33/135; A61P31/04; C12Q1/04; C12N1/20 E ZNA</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K35/741; A23L33/135; A61P31/04; C12Q1/04; C12N1/20</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table> <p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019/017389 A1 (学校法人慶應義塾) 24.01.2019 (2019 - 01 - 24) 請求項1、[0010] ~ [0011]、[0022]、実施例4、6</td> <td>1-3, 6, 7, 10, 11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020/179868 A1 (学校法人慶應義塾) 10.09.2020 (2020 - 09 - 10) 実施例7、8</td> <td>1-3, 6, 7, 10, 11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SYLVESTRE P, et al., Carbohydrate Metabolism Differences between Subgroup A1 and B2 Strains of Bacillus anthracis as Assessed by Comparative Genomics and Functional Genetics, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009, Vol.75, No.17, pp.5727-5728 要約、図1等</td> <td>10, 11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			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	WO 2019/017389 A1 (学校法人慶應義塾) 24.01.2019 (2019 - 01 - 24) 請求項1、[0010] ~ [0011]、[0022]、実施例4、6	1-3, 6, 7, 10, 11	X	WO 2020/179868 A1 (学校法人慶應義塾) 10.09.2020 (2020 - 09 - 10) 実施例7、8	1-3, 6, 7, 10, 11	X	SYLVESTRE P, et al., Carbohydrate Metabolism Differences between Subgroup A1 and B2 Strains of Bacillus anthracis as Assessed by Comparative Genomics and Functional Genetics, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009, Vol.75, No.17, pp.5727-5728 要約、図1等	10, 11	Y		1-11
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	WO 2019/017389 A1 (学校法人慶應義塾) 24.01.2019 (2019 - 01 - 24) 請求項1、[0010] ~ [0011]、[0022]、実施例4、6	1-3, 6, 7, 10, 11															
X	WO 2020/179868 A1 (学校法人慶應義塾) 10.09.2020 (2020 - 09 - 10) 実施例7、8	1-3, 6, 7, 10, 11															
X	SYLVESTRE P, et al., Carbohydrate Metabolism Differences between Subgroup A1 and B2 Strains of Bacillus anthracis as Assessed by Comparative Genomics and Functional Genetics, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009, Vol.75, No.17, pp.5727-5728 要約、図1等	10, 11															
Y		1-11															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般の技術水準を示すもの</p> <p>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>07.05.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.05.2024</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>長谷川 茜 4U 3228</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>																

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
X	CASTILLO T, et al., A Set of Activators and Repressors Control Peripheral Glucose Pathways in Pseudomonas putida To Yield a Common Central Intermediate, J. Bacteriol., 2008, Vol.190, No.7, pp.2331-2339 要約、図1、図2 C等	10
Y		1-11
Y	LAWLEY TD, et al., Intestinal colonization resistance, Immunology, 2012, Vol.138, pp.1-11 要約、第2頁左欄第3段落、第6頁左欄第3段落	1-11
Y	AMIRMOZAFARI N, et al., Nutritional Requirements for Synthesis of Heat-Stable Enterotoxin by Yersinia enterocolitica, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1993, Vol.59, No.10, p.3314-3320 表題、第3317頁左欄最終段落～右欄第1段落、第3319頁左欄第4段落、表4	1-11

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
  - a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
  - b.  国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a))  
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2.  この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2024/008014

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/017389	A1	24.01.2019	US	2020/0171099	A1	
					請求項1、[0015]～ [0016]、[003 8]～[0039]、実施 例4、6		
				EP	3656389	A1	
				CN	110891583	A	
-----							
WO	2020/179868	A1	10.09.2020	US	2022/0125858	A1	
					実施例7、8		
				EP	3957367	A1	
				CN	113573780	A	
-----							