(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
2019年10月10日(10.10.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/194130 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 14/46 (2006.01)　*A61P 3/06* (2006.01)
A23L 33/17 (2016.01)　*A61P 3/10* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)　*C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2019/014480

(22) 国際出願日：　2019年4月1日(01.04.2019)

(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 2018-073308　2018年4月5日(05.04.2018)　JP

(71) 出願人: 丸共バイオフーズ株式会社 (**MARUKYOU BIO FOODS CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒0970022 北海道稚内市中央４丁目１８番１８号 Hokkaido (JP). 国立大学法人静岡大学 (**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷８３６ Shizuoka (JP).

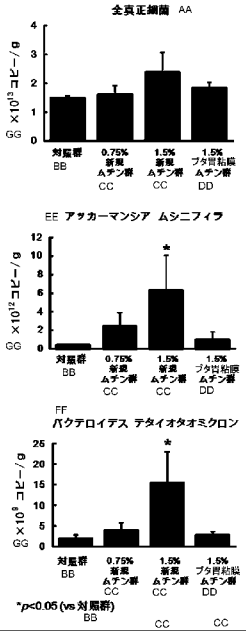
(72) 発明者: 宮本　宜之 (**MIYAMOTO Nobuyuki**); 〒0970022 北海道稚内市中央４丁目１８番１８号 丸共バイオフーズ株式会社内 Hokkaido (JP). 森田 達也(**MORITA Tatsuya**); 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷８３６ 国立大学法人静岡大学内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 佐川 慎悟，外(**SAGAWA Shingo** et al.); 〒0600042 北海道札幌市中央区大通西５丁目１１番１号 電通恒産札幌ビル３階 佐川慎悟国際特許事務所 Hokkaido (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** NOVEL MUCIN-TYPE GLYCOPROTEIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称： 新規ムチン型糖タンパク質およびその用途



	BB 対照群	CC 0.75% 新規ムチン群	CC 1.5% 新規ムチン群	DD 1.5% ブタ胃粘膜ムチン群
AA 全真正細菌 (×10¹³コピー/g) GG	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.4 ± 0.7	1.9 ± 0.2
EE アッカーマンシア ムシニフィラ (×10¹⁰コピー/g) GG	0.4 ± 0.1	2.5 ± 1.4	6.3 ± 3.7*	1.0 ± 0.8
FF バクテロイデス テタイオタオミクロン (×10⁹ コピー/g) GG	2.0 ± 0.8	3.8 ± 1.9	15.5 ± 7.4*	2.6 ± 0.7

AA Total eubacteria
BB Control group
CC Novel mucin group
DD Pig gastric mucosa mucin group
EE Akkermansia muciniphila
FF Bacteroides thetaiotaomicron
GG Copies/g

(57) **Abstract:** [Problem] To provide a novel mucin-type glycoprotein having a large sulfate group content and having a unique composition or structure, and a use thereof. [Solution] Provided is a mucin-type glycoprotein comprising a sulfate group and a sialic acid, wherein the content of the sulfate group is at least 0.07 mol per 1 mol of saccharide bound to a core protein by an O-glycosidic bond, and the content of the sialic acid is at least 0.1 mol per 1 mol of saccharide bound to a core protein by an O-glycosidic bond. According to the present invention, it is possible to obtain a mucin-type glycoprotein having a novel composition or structure. In addition, according to the present invention, the mucin-type glycoprotein can effectively increase the number of Akkermansia bacteria and/or Bacteroides bacteria in a living human or animal body, and thus contribute to the prevention or treatment of diseases such as obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia, and so on.

WO 2019/194130 A1

［続葉有］

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:【課題】 硫酸基の含有量が大きく、特有の成分ないし構造を有する新規なムチン型糖タンパク質およびその用途を提供することを目的とする。 【解決手段】 硫酸基およびシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上であり、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。本発明によれば、新規な成分ないし構造を有するムチン型糖タンパク質を得ることができる。また、本発明によれば、ヒトや動物の生体におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を効果的に増加させ、もって肥満や２型糖尿病、脂質異常症等の疾患の予防や治療に寄与することができる。

明　細　書

発明の名称 ： 新規ムチン型糖タンパク質およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、硫酸基の含有量が大きいという新規な成分ないし構造を有するムチン型糖タンパク質およびその用途に関する。

背景技術

[0002] ムチンは、動植物の粘液などに見られる粘性物質をいい、分子量１００万～１０００万の、糖含有量の高い糖タンパク質を主成分としている。この糖タンパク質の糖鎖の大部分は、コアタンパク質中のセリンまたはスレオニンの水酸基と糖鎖の還元末端に位置する糖（Ｎ－アセチルガラクトサミンである場合が多い）とがＯ－グリコシド結合を介して結合してなる比較的短い糖鎖であり、係る糖鎖は「ムチン型糖鎖」と呼ばれている（以下、ムチン型糖鎖を有する糖タンパク質をムチン型糖タンパク質という）。

[0003] ムチンは、粘膜上皮の保護や保湿、抗菌、潤滑等、種々の生理作用を有することが報告されており、動植物から抽出精製したムチンあるいはムチン型糖タンパク質が、健康食品や医薬品として利用されている。例えば、特許文献１には、特定のアミノ酸配列からなる繰り返し構造に糖鎖が結合していることを特徴とする新規ムチン型糖タンパク質と、これを健康増進、薬剤投与、疾患の治療もしくは予防等に用いることとが開示されている（請求項１、請求項１４）。また、特許文献２には、エイの皮や体表粘性物から採取されるムチンを有効成分とする、抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤が開示されている（請求項１）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第５０５７３８３号公報

特許文献2：特許第５３５５６８２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、ムチン型糖タンパク質は、特にその糖鎖において、多種多様な成分ないし構造を採りうる。そのため、上記特許文献を鑑みても、有用な用途を提供しうる、新規な成分ないし構造を有するムチン型糖タンパク質の提供は未だ十分になされているとはいえない。本発明は係る課題を解決するために成されたものであって、新規な成分ないし構造を有するムチン型糖タンパク質およびその用途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

[0006] 本発明者らは、鋭意研究の結果、エイから、硫酸基やシアル酸の含有量が大きく、特有の成分ないし構造を有する新規なムチン型糖タンパク質を単離・精製することに成功した。また、硫酸基の含有量が大きいムチン型糖タンパク質が、腸内のアッカーマンシア属細菌およびバクテロイデス属細菌の菌数を顕著に増加させることを見出した。さらに、ムチン型糖タンパク質において、スレオニンの含有割合が高いものが、よりアッカーマンシア属細菌の菌数増加作用を増強できることを見出した。

[0007] ここで、下記非特許文献１～３では、アッカーマンシア属細菌であるアッカーマンシア　ムシニフィラは、当該細菌を投与することにより、マウスで、肥満の進行を抑制することや、脂肪塊の発達、インスリン抵抗性および脂質異常症を減少させること等が報告されている。

非特許文献１；Hubert P. et al., NATURE MEDICINE, Vol. 23, No. 1, January 2017, pp. 107-116

非特許文献２；Patrice D. Cani and Willem M. de Vos, Frontiers in Microbiology, Vol. 8, Art. 1765, 22 September 2017

非特許文献３；Amandine Everard et al, PNAS, Vol. 110, No. 22, May 28, 2013, pp. 9066-9071

[0008] また、非特許文献４では、バクテロイデス属細菌であるバクテロイデステタイオタオミクロンもまた、体重減少後にその菌数が増加していることや、ラクチトールやポリデキストロースなどのプレバイオティクスと共投与す

ることにより体重減少や血中の中性脂肪が減少することが報告されている。

非特許文献４；Kaisa Olli et al, Frontiers in Nutrition, Vol. 3, Art. 15, 08 June 2016

[0009] すなわち、本発明に係る新規ムチン型糖タンパク質をヒトや動物に摂取させて、その生体におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を増加させることにより、肥満や２型糖尿病、脂質異常症を予防ないし治療できると考えられる。そこで、これらの知見に基づいて、下記の各発明を完成した。

[0010] （１）硫酸基およびシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上であり、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0011] （２）トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（１）に記載のムチン型糖タンパク質。

[0012] （３）エイの皮および／または体表粘性物から採取される、（１）または（２）に記載のムチン型糖タンパク質。

[0013] （４）（１）から（３）のいずれかに記載のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加剤。

[0014] （５）下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加剤；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0015] （６）アッカーマンシア属細菌の菌数増加剤であって、前記ムチン型糖タンパク質において、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミ

ノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（５）に記載の菌数増加剤。

[0016] （７）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、（５）または（６）に記載の菌数増加剤。

[0017] （８）肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療に用いられることを特徴とする、（４）から（７）のいずれかに記載の菌数増加剤。

[0018] （９）（１）から（３）のいずれかに記載のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加用食品組成物。

[0019] （１０）下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加用食品組成物；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0020] （１１）アッカーマンシア属細菌の菌数増加用食品組成物であって、前記ムチン型糖タンパク質において、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除いたアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（１０）に記載の菌数増加用食品組成物。

[0021] （１２）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、（１０）または（１１）に記載の菌数増加用食品組成物。

[0022] （１３）肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療に用いられることを特徴とする、（９）から（１２）のいずれかに記載の菌数増加用食品組成物。

[0023] （１４）下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療剤；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0024] （１５）前記ムチン型糖タンパク質が、さらにシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、（１４）に記載の予防または治療剤。

[0025] （１６）前記ムチン型糖タンパク質が、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（１４）または（１５）に記載の予防または治療剤。

[0026] （１７）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、（１４）～（１６）のいずれかに記載の予防または治療剤。

[0027] （１８）前記ムチン型糖タンパク質が、ヒトまたは動物の腸内におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を増加させるものである、（１４）～（１７）のいずれかに記載の予防または治療剤。

[0028] （１９）下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療用食品組成物；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0029] （２０）前記ムチン型糖タンパク質が、さらにシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、（１９）に記載の予防または治療用食品組成物。

[0030] （２１）前記ムチン型糖タンパク質が、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％

以上である、（１９）または（２０）に記載の予防または治療用食品組成物。

[0031] （２２）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、（１９）～（２１）のいずれかに記載の予防または治療用食品組成物。

[0032] （２３）前記ムチン型糖タンパク質が、ヒトまたは動物の腸内におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を増加させるものである、（１９）～（２２）のいずれかに記載の予防または治療用食品組成物。

[0033] （２４）　下記（ａ）および（ｂ）の工程を有する、肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患を予防または治療する方法；

（ａ）前記疾患を罹患している、または、罹患する可能性があるヒトもしくは動物に、下記のムチン型糖タンパク質を摂取させる工程；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質、

（ｂ）前記ヒトまたは動物の腸内におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を増加させて、前記疾患を予防または治療する工程。

[0034] （２５）前記ムチン型糖タンパク質が、さらにシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、（２４）に記載の方法。

[0035] （２６）前記ムチン型糖タンパク質が、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（２４）に記載の方法。

[0036] （２７）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物

から採取されたものである、（２４）に記載の方法。

[0037] （２８）肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療用医薬品を製造するための、下記のムチン型糖タンパク質の使用；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[0038] （２９）前記ムチン型糖タンパク質が、さらにシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、（２８）に記載の使用。

[0039] （３０）前記ムチン型糖タンパク質が、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、（２８）または（２９）に記載の使用。

[0040] （３１）前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、（２８）または（２９）に記載の使用。

[0041] （３２）前記ムチン型糖タンパク質が、ヒトまたは動物の腸内におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を増加させるものである、（２８）または（２９）に記載の使用。

発明の効果

[0042] 本発明によれば、新規な成分ないし構造を有するムチン型糖タンパク質を得ることができる。また、本発明によれば、ヒトや動物の生体におけるアッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数を効果的に増加させ、もって肥満や２型糖尿病、脂質異常症等の疾患の予防や治療に寄与することができる。

図面の簡単な説明

[0043] [図1]新規ムチン型糖タンパク質およびブタ胃粘膜ムチンを基質とするムシナーゼ反応により生じた還元糖の量を示すグラフである。

[図2]ラット腸管粘膜ムチンを基質とするムシナーゼ反応により生じた還元糖の量を示す棒グラフである。

[図3]ブタ胃粘膜ムチンを基質とするムシナーゼ反応により生じた還元糖の量を示す棒グラフである。

[図4]新規ムチン型糖タンパク質を基質とするムシナーゼ反応により生じた還元糖の量を示す棒グラフである。

[図5]ムチン型糖タンパク質を摂取しないラット（対照群）、新規ムチン型糖タンパク質を摂取したラット（１．５％新規ムチン群）およびブタ胃粘膜ムチンを摂取したラット（１．５％ブタ胃粘膜ムチン群）の盲腸内容物に含まれるＯ－結合型糖の濃度を示す棒グラフである。

[図6]対照群、０．７５％新規ムチン群、１．５％新規ムチン群および１．５％ブタ胃粘膜ムチン群のラット盲腸内容物に存在する、各種腸内細菌由来の１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数を示す棒グラフである。

[図7]ムチン型糖タンパク質を摂取しないラット（対照群）および新規ムチン型糖タンパク質を摂取したラット（ロットＩ～Ｖ群）の盲腸内容物に存在する、全真正細菌およびアッカーマンシア　ムシニフィラ由来の１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数を示す棒グラフである。

[0044] 以下、本発明について詳細に説明する。本発明は下記〈１〉～〈７〉を提供する。

〈１〉ムチン型糖タンパク質。

〈２〉アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌（以下、まとめて「本細菌」という場合がある。）の菌数増加剤。

〈３〉本細菌の菌数増加用食品組成物。

〈４〉肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患（以下、「本疾患」という場合がある。）の予防または治療剤。

〈５〉本疾患の予防または治療用食品組成物。

〈６〉本疾患を予防または治療する方法。

〈７〉本疾患の予防または治療用医薬品を製造するためのムチン型糖タン

パク質の使用。

[0045] 本発明において「ムチン型糖タンパク質」とは、上述のとおり、ムチン型糖鎖を有する糖タンパク質をいう。また、「ムチン型糖鎖」とは、コアタンパク質中のセリンまたはスレオニンの水酸基にＯ－グリコシド結合を介して結合してなる糖鎖をいう。ムチン型糖鎖の還元末端に位置する糖、すなわち、コアタンパク質のセリン残基またはスレオニン残基とＯ－グリコシド結合している糖は、多くの場合、Ｎ－アセチルガラクトサミンである。

[0046] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、硫酸基を高い割合で含有することを特徴としている。具体的には、Ｏ－グリコシド結合している糖１モルに対し、硫酸基を０．０７モル以上という割合で含有している。硫酸基は、ムチン型糖鎖では非還元末端の糖残基に付加している場合が多いことから、本発明に係るムチン型糖タンパク質は、その糖鎖非還元末端の多くに硫酸基を有しているといえる。

[0047] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、硫酸基に加えて、シアル酸を高い割合で含有するものであってもよい。具体的には、Ｏ－グリコシド結合している糖１モルに対し、シアル酸を０．１モル以上という割合で含有するものであってよい。シアル酸もまた、ムチン型糖鎖では非還元末端に位置している場合が多いことから、本発明に係るムチン型糖タンパク質は、その糖鎖非還元末端の多くにシアル酸を有するものであってよい。

[0048] 本発明に係るムチン型糖タンパク質において、スレオニンの含有割合あるいは質量百分率が所定の値以上の場合は、アッカーマンシア属細菌の菌数増加効果をより高くすることができる。好ましいスレオニンの含有割合としては、例えば、２８ｍｇ／ｇ以上、２８．５ｍｇ／ｇ以上、２９ｍｇ／ｇ以上、２９．５ｍｇ／ｇ以上、３０ｍｇ／ｇ以上、３０．５ｍｇ／ｇ以上、３１ｍｇ／ｇ以上、３１．５ｍｇ／ｇ以上、３２ｍｇ／ｇ以上、３２．５ｍｇ／ｇ以上、３３ｍｇ／ｇ以上、３３．５ｍｇ／ｇ以上を挙げることができる。また、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率として、好ましくは、１４％以上、１４．

５％以上、１５％以上、１５．５％以上、１６％以上、１６．５％以上、１７％以上、１７．５％以上、１８％以上、１８．５％以上、１９％以上、１９．５％以上を例示することができる。

[0049] なお、タンパク質におけるアミノ酸の測定値について、測定方法により相当の差異が生じるのは本発明の分野における技術常識である。この点、本発明に係るムチン型糖タンパク質におけるアミノ酸の含有割合や質量百分率は、後述する実施例６（２）に示すように、強酸によりタンパク質を加水分解した後、ポストカラムニンヒドリン法により誘導体化してクロマトグラフィーにより分離測定する方法により定量することが好ましい。

[0050] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、例えば、ガンギエイ等のエイ（板鰓亜綱エイ上目に属する軟骨魚類）の表皮や体表に付着している粘性物から採取することができる。後述する実施例においてはメガネカスベ属の表皮・体表粘性物とソコガンギエイ属の体表粘性物とを合わせて用いているが、このように複数種のエイに由来する原料を合わせて用いてもよく、単一種のエイに由来する原料を用いてもよい。

[0051] エイの皮や体表粘性物には本発明に係るムチン型糖タンパク質が豊富に含まれるため、これをそのまま用いてもよいが、精製・濃縮して用いてもよい。精製・濃縮する場合は、まず、原料にタンパク質分解酵素を作用させて夾雑タンパク質・ペプチドを低分子化する。タンパク質分解酵素は、アスパルティックプロテイナーゼ、金属プロテイナーゼ、セリンプロテイナーゼおよびチオールプロテイナーゼといったプロテイナーゼ（エンドペプチダーゼ）やペプチダーゼ（エキソペプチダーゼ）から、原料の由来等に応じて適宜選択して用いることができる。続いて、これを限外ろ過に供して低分子化した雑タンパク質・ペプチドを除去するとともに、高分子物質を濃縮すればよい。その他、原料をすり潰した後、適当な溶媒（水や生理食塩水、リン酸緩衝液等）を加えて撹拌、抽出し、遠心分離を行って上清を回収する方法を挙げることができる。また、ムチンクロット法、硫安分画による方法、バリウムイオンやカルシウムイオンの存在下でのアルコール分別による方法、セタブ

ロン（セチルトリメチルアンモニウムブロマイド）や塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）などの四級アミンの陽性界面活性剤を使用する沈澱法などによる精製方法を挙げることができる。

[0052] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、ヒトまたは動物に経口摂取させることにより使用することができる。また、本発明に係るムチン型糖タンパク質は生体の腸内においてその機能を発揮することから、腸内に到達する方法で使用すればよく、例えば、有効成分を経腸栄養剤に添加して、これを、胃や小腸などの消化管に挿入したチューブを経由して経腸栄養法により投与する方法で使用してもよい。

[0053] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、主として、消化管においてその作用（特定の腸内細菌に対する菌数増加作用）を発揮する。そのため、本発明に係るムチン型糖タンパク質をヒトや動物に対して用いる場合の摂取量（投与量）は、他の薬剤において一般的な体重当たりではなく、食物摂取量当たりで算出するのが妥当と考えられる。後述する実施例では、ムチン型糖タンパク質を１質量％程度含有する飼料を摂取したラットで効果が認められた（図６）。ここで、一般に、ラットはヒトと比較して基礎代謝が顕著に大きいため、ヒトでは、ラットで有効な投与量の１／４～１／２の投与量で有効な場合が多い。従って、当該実施例によれば、本発明に係るムチン型糖タンパク質をヒトに用いる場合の、１日当たりの摂取量は、「当該ヒト個体における１日の食物（固形物）摂取量の０．２５～０．５質量％程度の量」を例示することができる。

[0054] 本発明に係るムチン型糖タンパク質は、硫酸基を高い割合で含有しているため、これを摂取したヒトや動物の腸内において、硫酸基分解酵素（スルファターゼ）を有する腸内細菌であるアッカーマンシア属細菌やバクテロイデス属細菌の菌数を特異的に増加させることができる。

[0055] ここで、「アッカーマンシア属細菌」は、アッカーマンシア属に属する微生物をいう。係る微生物としては、例えば、アッカーマンシア　ムシニフィラ（Akkermansia muciniphila）を挙げることができる。アッカーマンシア

ムシニフィラは多くのヒトの腸内に生息する腸内細菌であり、上述のとおり、本細菌を投与することにより、マウスで、肥満の進行を抑制することや、脂肪塊の発達、インスリン抵抗性および脂質異常症を減少させること等が報告されている。

[0056] また、「バクテロイデス属細菌」は、バクテロイデス属に属する微生物をいう。係る微生物としては、例えば、バクテロイデス テタイオタオミクロン（Bacteroides thetaiotaomicron）を挙げることができる。バクテロイデス属細菌もまた、腸内細菌叢を構成する細菌であり、上述のとおり、バクテロイデス テタイオタオミクロンは、体重減少後にその菌数が増加していることや、ラクチトールやポリデキストロースなどのプレバイオティクスと共投与することにより体重減少や血中の中性脂肪が減少することが報告されている。

[0057] すなわち、本発明に係るムチン型糖タンパク質をヒトや動物に摂取させて、その生体における本細菌の菌数を増加させることにより、肥満や２型糖尿病、脂質異常症を予防ないし治療できると考えられる。このことから、本発明に係るムチン型糖タンパク質は、本疾患を予防または治療する用途に用いることができる。

[0058] 具体的には、例えば、本発明に係るムチン型糖タンパク質は、本細菌の菌数増加剤、本細菌の菌数増加用食品組成物、本疾患の予防もしくは治療剤、または、本疾患の予防もしくは治療用食品組成物の有効成分とすることができる。すなわち、本発明に係るムチン型糖タンパク質は、本疾患の予防または治療用医薬品を製造するために使用することができる。また、（ａ）本疾患を罹患している、または、罹患する可能性があるヒトもしくは動物に、本発明に係るムチン型糖タンパク質を摂取させる工程と、（ｂ）その腸内における本細菌の菌数を増加させて、前記疾患を予防または治療する工程とにより、本疾患を予防または治療することができる。

[0059] 本発明の剤の形態としては、有効成分であるムチン型糖タンパク質のみからなるもののほか、適当な賦形剤や担体と合わせてなる、医薬品や食品添加

剤、サプリメントなどの形態を挙げることができる。医薬品や食品添加剤、サプリメントの形態とする場合、その剤型としては、例えば、散剤、錠剤、糖衣剤、カプセル剤、顆粒剤、ドライシロップ剤、液剤、シロップ剤、ドロップ剤、ドリンク剤等の固形または液状の剤型を挙げることができる。係る各剤型の医薬品や食品添加剤、サプリメントは、当業者に公知の方法で製造することができる。

[0060] また、本発明の食品組成物の形態としては、有効成分であるムチン型糖タンパク質のみからなるもののほか、菓子や飲料、加工食品、健康食品、乳幼児食品などの通常の飲食物の形態を挙げることができる。飲食物の形態とする場合は、通常の製造過程で、有効成分を添加して製造することができる。

[0061] 本発明において、本細菌の「菌数を増加させる」とは、生体のいずれかの細胞ないし組織・器官における当該細菌の菌数を増加させることをいう。

[0062] 例えば、腸における本細菌の菌数は、腸の内容物または糞便中の当該細菌の菌数と相関していると考えられるため、腸内容物または糞便中の本細菌の菌数を計測することにより、腸において本細菌の菌数が増加したか否かを確認することができる。具体的には、例えば、本発明に係るムチン型糖タンパク質の摂取後の腸内容物または糞便を試料として、本細菌に特異的なプライマーを用いたリアルタイムＰＣＲ法を行って１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数を計測する。本細菌に特異的なプライマーは、本細菌の公知の塩基配列に基づいて設計することができ、例えば配列番号１～４に示す配列からなるプライマーを用いることができる。また、簡便には、本細菌を定量するための市販のキットを用いて定量することもできる。

[0063] 本細菌の１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数と本細菌の菌数とは相関関係にあるため、１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、菌数の指標とすることができる。よって、本細菌の１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数を計測した結果、摂取後の糞便における１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数が摂取前よりも大きければ、あるいは摂取後の盲腸内容物における１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数が摂取していない被検体の盲腸内容物よりも大きければ、本発明に係るムチン型糖タンパク質により本細菌の菌数が

増加したと判断することができる。

[0064] 以下、本発明について、各実施例に基づいて説明する。なお、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。また、本実施例において、「％」は、特段の記載のない限り質量％（（ｗ／ｗ）％）を表す。

実施例

[0065] ＜実施例１＞新規ムチン型糖タンパク質の単離・精製

真カスベ（エイ上目ガンギエイ目ガンギエイ科メガネカスベ属メガネカスベ、Raja pulchra Liu ）から、体表に付着している粘性物とともに表皮を剥ぎ取り、これを真カスベ由来原料とした。また、水カスベ（エイ上目ガンギエイ目ガンギエイ科ソコガンギエイ属ドブカスベ、Bathyraja smirnovi）から、体表に付着している粘性物を水洗により剥離して回収し、これを水カスベ由来原料とした。

[0066] 真カスベ由来原料約２４０ｋｇおよび水カスベ由来原料約１２０ｋｇの合計約３６０ｋｇを斜軸ニーダー（ＧＮ１００／６０ＳＴ、サムソン）中へ投入し、チオールプロテイナーゼ製剤３００ｇを加えて５５℃で４時間攪拌した。続いて、金属プロテイナーゼおよびペプチダーゼの混合製剤３００ｇを加えて５５℃でさらに４時間インキュベートした。その後、９０℃で１０分間加熱処理することにより、酵素を失活させた。

[0067] 加熱処理後の酵素反応液に珪藻土（ラヂオライト＃１００、昭和化学工業）３５ｋｇを加え、フィルタープレス（ＦＰ－６６型、薮田機械）でろ過して、ろ液を回収した。このろ液を内部保持液として、限外ろ過膜（マイクローザＡＣＰ－３０１３Ｄ、分画分子量１３０００、旭化成）を用いて清水を加えながら限外ろ過を行うことにより、夾雑タンパク質やペプチド等の不純物を除去した。膜透過液の固形分濃度がブリックス計（ＭＡＳＴＥＲ－１０Ｐα、アタゴ）指針でおおよそゼロとなったことを確認したのち清水の注入を止め、そのまま運転を続けた。膜透過液がほとんど排出されなくなるまで濃縮を行って、約９０Ｌの内部保持液を得た。これを９０℃にて１０分間加

熱殺菌した後、回転ディスク型噴霧乾燥機（ＤＡ２２０－１０Ｓ型、坂本技研）を用いて噴霧乾燥し、乾燥粉末１．４ｋｇを得た。以下、これを「新規ムチン型糖タンパク質」として用いた。

[0068] ＜比較例１＞ブタ胃粘膜ムチン

比較例１として、ブタ胃粘膜ムチンの精製物を用いた。具体的には、市販のブタ胃粘膜ムチン（Mucin from porcine stomach TypeＩＩ、SIGMA-ALDRICH）５ｇをビーカーに量り取り、そこに１００倍量の０．１５ＭのＮａＣｌ水溶液を加えて懸濁した後、１ＭのＮａＯＨ水溶液でｐＨ７．５に調整した。これをホモジナイザーＰＴ－３１００（KINEMATICA）を用いて４℃にて１４５００回転／分（ｒｐｍ）で６０秒間均一化した後、吸引濾過することで濾液を得た。この濾液に２倍量の９０％エタノールを加えて転倒混和し、－３０℃で一晩放置した後、２３００×ｇ、４℃で１０分間遠心分離して上清を除去することによりエタノール沈殿を行った。沈殿物に０．１５ＭのＮａＣｌ水溶液を５００ｍＬ加え、ボルテックスミキサーを用いて懸濁した。これを再度エタノール沈殿させ、得られた沈殿物に蒸留水を１５０ｍＬ加え、ボルテックスミキサーを用いて懸濁した。この懸濁液を凍結乾燥したものを「ブタ胃粘膜ムチン」とし、重量を測定した。

[0069] ＜比較例２＞ラット腸管粘膜ムチン

比較例２として、ラットの腸管粘膜から分泌されるムチンを用いた。ムチンを摂取しないラットの盲腸内容物に含まれるムチンは、その腸管粘膜から分泌されるムチンであることから、下記（１）の条件下で飼育したラットを解剖して盲腸内容物を回収し、そこから下記（２）の方法により盲腸内容物ムチン画分を調製して、これを「ラット腸管粘膜ムチン」とした。

[0070] （１）ラットの飼育条件

飼料：ムチンを含有しない標準精製飼料（ミルクカゼイン２５．０％、コーンスターチ６０．２５％、セルロースパウダー５．０％、コーンオイル５．０％、ビタミン混合物１．０％、ミネラル混合物３．５％、重酒石酸コリン０．２５％）。なお、ビタミンおよびミネラルは、ＡＩＮ－７６（米国国

立栄養研究所（ＡＩＮ）から１９７７年に発表された、ラットの標準精製飼料のガイドライン）に準拠した混合物を用いた。

飲料水：腸内細菌によるムチンの分解を抑制するため、飲料水中に下記の抗生物質を括弧内の終濃度となるよう添加した。ベンジルペニシリン（５０ｕｎｉｔ／ｍＬ）、ネオマイシン三硫酸塩（２ｍｇ／ｍＬ）、セフォペラゾンナトリウム（０．５ｍｇ／ｍＬ）。

飼育期間：７日間

[0071] （２）盲腸内容物ムチン画分の調製

盲腸内容物の凍結乾燥物２００ｍｇをガラス遠心管に量り取り、そこに３０倍量のリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．２）を加えて懸濁した後、１０分間煮沸殺菌した。これを３７℃の恒温振盪水槽に入れ、１２５ｒｐｍで９０分間振とうした。ホモジナイザーＰＴ－２１００（KINEMATICA）を用いて４℃にてレベル１１で２０秒間破砕して均一化した後、２００００×ｇ、４℃で３０分間の遠心分離を２回行って上清を回収した。これを５０ｍＬ容量のファルコンチューブに移し、３倍量の１００％エタノールを加えて転倒混和し、－３０℃で一晩放置した後、２３００×ｇ、４℃で１０分間遠心分離して上清を除去することによりエタノール沈殿を行った。沈殿物に０．１５ＭのＮａＣｌ水溶液を１５ｍＬ加え、ボルテックスミキサーを用いて懸濁した。これを再度エタノール沈殿させ、得られた沈殿物に蒸留水を５ｍＬ加え、ボルテックスミキサーを用いて懸濁した。この溶液を凍結乾燥したものを盲腸内容物ムチン画分とし、重量を測定した。

[0072] ＜実施例２＞新規ムチン型糖タンパク質の評価：成分および構造

実施例１の新規ムチン型糖タンパク質、比較例１のブタ胃粘膜ムチンおよび比較例２のラット腸管粘膜ムチンについて、下記（１）～（６）の方法により成分分析を行った。それぞれの粉末１０ｍｇを蒸留水４ｍＬに溶解してムチン溶液とし、分析に用いた。なお、新規ムチン型糖タンパク質は、異なる６つの原料からそれぞれ調製し（ロットＡ～Ｆとする）、さらに、各ロットから複数の試料（試料１～１３）を個別に採取（サンプリング）して解析

した。また、ブタ胃粘膜ムチンおよびラット腸管粘膜ムチンも、試料を７つずつ（試料１～７）個別にサンプリングして解析した。

[0073] （１）タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はＬｏｗｒｙ法に従って測定した。すなわち、標準試料にはウシ血清由来アルブミン（SIGMA-ALDRICH）を用い、蒸留水で２５－１００μｇ／ｍＬの希釈系列を作製した。測定試料は、ムチン溶液を蒸留水で２０倍に希釈した。１０％のNa_2CO_3を含有する０．５規定の水酸化ナトリウム水溶液と、０．５％の$CuSO_4 \cdot 5H_2O$を含有する１％のクエン酸ナトリウム水溶液とを、体積比１０：１の割合で混合してＢｉｕｒｅｔ試薬を調製した。また、１．８Ｎのフェノール試薬（ナカライテクス）を蒸留水で１２倍希釈して希釈フェノール試薬を調製した。

[0074] 標準試料および測定試料各０．５ｍＬに、Ｂｉｕｒｅｔ試薬０．５ｍＬを加えて室温で１０分間放置した。希釈フェノール試薬１．５ｍＬを加えて撹拌し、３７℃で３０分間放置した。その後、室温で１５分間放置した後、７５０ｎｍにおける吸光度を測定した。標準試料の測定結果を基に、測定試料におけるタンパク質濃度を求め、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン１ｍｇ当たりのタンパク質濃度（μｇ／ｍｇ）を算出した。

[0075] （２）全糖濃度の測定

全糖濃度はフェノール硫酸法に従って測定し、グルコース換算で算出した。すなわち、標準試料には１ｍｇ／ｍＬのＤ（+）－グルコース（Ｗａｋｏ）を用い、蒸留水で３１．２５～２５０μｇ／ｍＬの希釈系列を作製し、蒸留水のみのブランクを含め、それぞれ大試験管２本に１ｍＬずつ分注した。測定試料は、粉末ムチン５０ｍｇを蒸留水１０ｍＬに分散させたものを原液とし、それを蒸留水で１０、２０、４０および１００倍に希釈し、原液を含めそれぞれ大試験管２本に１ｍＬずつ分注した。

[0076] 標準試料および測定試料に５％フェノール溶液を加え、ボルテックスミキサーで撹拌した。ホールピペットで濃硫酸５ｍＬを直接液面に加えるように添加し、ボルテックスミキサーで撹拌した。放置して試料を室温に戻した後

、４８０ｎｍにおける吸光度を測定した。標準試料の測定結果を基に、測定試料における全糖濃度を求め、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン１ｍｇ当たりの全糖濃度（μｇ／ｍｇ）を算出した。

[0077] （３）Ｏ－結合型糖濃度の測定

Ｏ－グリコシド結合している糖（Ｏ－結合型糖）の濃度は、Crowther RSらの方法に従って行った（Crowther RS, Wetmore RF、Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide、Anal. biochem.、第１６３巻、第１７０－１７４頁、１９８７年）。すなわち、アルカリ処理により糖タンパク質のＯ－グリコシド結合を切断し、生じる糖鎖還元末端に２－シアノアセトアミド（２－ＣＮＡ）を反応させて蛍光物質を生じさせ、係る蛍光強度を測定した。

[0078] 具体的には、標準試料にＮ－アセチルガラクトサミン（SIGMA-ALDRICH）を用い、蒸留水で０．１５６２５～１０μｇ／ｍＬの希釈系列を作製した。測定試料は、ムチン溶液を蒸留水で８０倍に希釈した。また、０．１５Ｍの水酸化ナトリウム水溶液と０．６Ｍの２－ＣＮＡ水溶液とを体積比５：１の割合で混合してアルカリ化２－ＣＮＡ溶液を調製した。標準試料および測定試料各１００μＬを１．５ｍＬ容量のマイクロチューブに分注し、アルカリ化２－ＣＮＡ溶液１２０μＬを加え、１００℃ で３０分加熱した。放置冷却して室温に戻した後、各マイクロチューブに０．６Ｍのホウ酸緩衝液（ｐＨ８．０）１ｍＬを加えて撹拌した。続いて、蛍光光度計（Ｆ－２０００、日立製作所)を用いて、３３６ｎｍの励起光にて、３８３ｎｍの蛍光を測定した。標準試料の測定結果を基に、測定試料におけるＯ－結合型糖の濃度を求め、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン１ｍｇ当たりのＯ－結合型糖濃度（μｍｏｌ／ｍｇ）を算出した。

[0079] （４）硫酸基濃度の測定

ムチン溶液を１０倍希釈した測定試料１００μＬを、１．５ｍＬ容量のマイクロチューブに分取し、１時間遠心濃縮を行って水分を完全に蒸発させた。その後、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水で調製した４Ｍ塩酸を２００μＬ加えて１００

℃で４時間置くことにより酸加水分解を行った。続いて遠心濃縮を行い塩酸を蒸発させた。その後、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水３００μＬを加えて加水分解物を溶解させ、再度、遠心濃縮を行った。このＭｉｌｌｉ－Ｑ水による加水分解物の洗浄作業を計３回繰り返し、最終的に５００μＬのＭｉｌｌｉ－Ｑ水に溶解させた。これをフィルター（ＤＩＳＭＩＣ－１３ＨＰ、１３ＨＰ０２０ＡＮ、アドバンテック)でろ過したものを、下記条件のイオンクロマトグラフィーに供して硫酸イオン濃度を測定した。測定結果を基に、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン１ｍｇ当たりの硫酸基濃度（μｍｏｌ／ｍｇ）を算出した。

[0080] 《イオンクロマトグラフィーの条件》

装置：イオンクロマトグラフ　ＩＣＳ－２０００（DIONEX）

検出器　：電気伝導度検出器　ＤＳ６（DIONEX）

カラム　：ＩｏｎＰａｃＡＳ１７（４×２５０ｍｍ）（DIONEX）

ガードカラム：ＩｏｎＰａｃ　ＡＧ１７Ｃ（DIONEX）

カラム温度：３０℃

溶離液：１８分間に５ｍＭから４０ｍＭまで直線的に濃度を高めた水酸化カリウム水溶液

流速：１ｍＬ／分

[0081] （５）シアル酸濃度の測定

標準試料にはＮ－アセチルノイラミン酸（ＮｅｕＡｃ）およびＮ－グリコリルノイラミン酸（ＮｅｕＧｃ）を用いた。測定試料は、ムチン溶液を蒸留水で２０倍に希釈した。測定試料５０μＬと６２．５ｍＭの塩酸２００μＬをガラスバイアル瓶に入れた。ボルテックスミキサーで撹拌後、８０℃に設定したヒートブロック中で１時間放置することにより酸加水分解を行ってシアル酸を遊離させた。その後、室温で２０分間放冷した。この溶液５０μＬをガラスバイアル瓶に分取し、ＤＭＢ溶液（Coupling solution：蒸留水：DMB solution＝５：４：１（体積比）、シアル酸蛍光標識試薬キット、タカラバイオ）２００μＬを加えた。ボルテックスミキサーで撹拌後、５０℃で

２．５時間遮光下に放置することにより、遊離したシアル酸を１，２－ジアミノ－４，５－メチレンジオキシベンゼン（ＤＭＢ）により蛍光標識した。室温で放冷した後、下記条件の高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）に供した。標準試料の測定結果を元に検量線を作成し、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン１ｍｇ当たりのシアル酸濃度（μｍｏｌ／ｍｇ）を算出した。

[0082] 《ＨＰＬＣの条件》

装置 ：高速液体クロマトグラフ ＬＣ－１０ＡＤ（島津製作所）

検出器：蛍光検出器 ＲＦ－１０ＡＸＬ（島津製作所）

励起波長：３７３ｎｍ、測定波長：４４８ｎｍ

カラム：ＴＳＫ ｇｅｌ ＯＤＳ－８０ＴＳ（TOSOH）

溶離液：Ａ液が水：メタノール＝９３：７（体積比）、Ｂ液がアセトニトリル：メタノール＝９３：７（体積比）として、Ａ：Ｂ＝９０：１０（体積比）からＡ：Ｂ＝４０：６０（体積比）まで直線的に濃度勾配をかけた溶液

流速：０．５ｍＬ／分

カラム温度：４０℃

注入量：１０μＬ

[0083] （６）糖鎖を構成する単糖の測定

標準試料にはMonosaccharide Mixture-11（Ｊ－オイルミルズ）を用いた。測定試料は、ムチン溶液を全糖量が１μｍｏｌ／ｍＬとなるように希釈した。試料５０μＬを１．５ｍＬ容量のエッペンチューブに分注し、８規定のトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）または塩酸 （ＨＣｌ）を加えた。これをヒートブロックを用いて１００℃に加熱し、ＴＦＡの場合は３時間、ＨＣｌの場合は４時間、放置することにより糖の酸加水分解を行った。その後、２０μＬを新しいエッペンチューブに移し、８０℃で１時間遠心濃縮した。続いて、２－プロパノール４０μＬを加え、再度、８０℃で遠心濃縮を行った。その後、ピリジン：メタノールを体積比１：９で混合した溶液を４０μＬ加え、ボルテックスミキサーで混和した。そこに、無水酢酸１０μＬを加え、再度ボ

ルテックスミキサーで混和した後、室温で３０分放置した。続いて、８０℃で３０分間遠心濃縮し、蒸留水１０μＬおよびABEE Labeling solution（ABEE Labeling Kit、Ｊ－オイルミルズ）４０μＬを加え、ヒートブロックを用いて８０℃で１時間加熱した。その後、蒸留水２００μＬおよびクロロホルム２００μＬを加え、ボルテックスミキサーで混和した。１５０００×ｇ、室温にて５分間遠心分離した後、上層（水層）を回収してフィルター（DISMIC-13HP、13HP020AN（アドバンテック）濾過し、下記条件のＨＰＬＣに供した。標準試料の測定結果を元に、単糖の同定および定量を行った。その結果において検出されたグルコース、アラビノースおよびリボースはムチン型糖タンパク質の糖鎖構成糖ではないため、原料由来の夾雑物あるいは各試料の調製段階で混入したものと考えられる。したがって、これらの単糖は「その他の単糖」としてまとめて示した。

[0084] 《ＨＰＬＣの条件》

装置　：高速液体クロマトグラフ　ＬＣ－１０ＡＤ（島津製作所）

検出器：蛍光検出器　ＲＦ－１０ＡＸＬ（島津製作所）

励起波長：３０５ｎｍ、測定波長：３６０ｎｍ

カラム：Ｈｏｎｅｎｐａｋ　Ｃ１８（Ｊ－オイルミルズ）

溶離液：ホウ酸カリウム緩衝液（ｐＨ８．９）

流速：１ｍＬ／分

カラム温度：３０℃

注入量：１０μＬ

[0085] 以上の本実施例２（１）～（５）の結果を表１に、（６）の結果を表２に、それぞれ示す。

[表1]

新規ムチン型糖タンパク質

成分	ロットA				ロットB		ロットC		平均値
	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8	
タンパク質(ug/mg)	207.4	248.5	232.5	237.1	227.3	241.6	194.2	216.2	225.6
全糖(ug/mg)	205.6	198.3	233.6	223.8	195.0	216.6	220.4	233.2	215.8
O－結合型糖(umol/mg)	0.497	0.548	0.522	0.495	0.454	0.434	0.502	0.465	0.490
硫酸基(umol/mg)	0.051	0.039	0.048	0.079	0.053	0.053	0.090	0.081	0.062
シアル酸(umol/mg) 合計	0.081	0.068	0.072	–	–	0.085	–	0.084	0.078
N-アセチルノイラミン酸	0.081	0.068	0.072	–	–	0.085	–	0.084	0.078
N-グリコリルノイラミン酸	0.000	0.000	0.000	–	–	0.000	–	0.000	0.000
O－結合型糖1モル当たりの硫酸基の量(mol)	0.039/0.548 ≒0.071 ～ 0.090/0.434 ≒0.207								0.126
O－結合型糖1モル当たりのシアル酸の量(mol)	0.068/0.548 ≒0.124 ～ 0.085/0.434 ≒0.196								0.159

ブタ胃粘膜ムチン

成分	試料1	試料2	試料3	試料4	平均値
タンパク質(ug/mg)	197.1	186.6	210.3	–	198.0
全糖(ug/mg)	174.5	188.9	184.2	–	182.5
O－結合型糖(umol/mg)	0.728	0.752	–	–	0.740
硫酸基(umol/mg)	0.041	0.035	0.037	0.045	0.040
シアル酸(umol/mg) 合計	0.051	0.045	0.048	–	0.048
N-アセチルノイラミン酸	0.046	0.043	0.045	–	0.045
N-グリコリルノイラミン酸	0.005	0.002	0.004	–	0.004
O－結合型糖1モル当たりの硫酸基の量(mol)	0.035/0.752 ≒0.047 ～ 0.046/0.728 ≒0.063				0.054
O－結合型糖1モル当たりのシアル酸の量(mol)	0.045/0.752 ≒0.060 ～ 0.051/0.728 ≒0.070				0.065

ラット腸管粘膜ムチン

成分	試料1	試料2	試料3	試料4	平均値
タンパク質(ug/mg)	236.1	218.6	255.9	–	236.9
全糖(ug/mg)	185.8	198.2	191.7	–	191.9
O－結合型糖(umol/mg)	0.498	0.434	–	–	0.466
硫酸基(umol/mg)	0.023	0.024	0.021	0.037	0.026
シアル酸(umol/mg) 合計	0.208	0.189	0.208	–	0.201
N-アセチルノイラミン酸	0.138	0.119	0.143	–	0.133
N-グリコリルノイラミン酸	0.070	0.069	0.065	–	0.068
O－結合型糖1モル当たりの硫酸基の量(mol)	0.021/0.498 ≒0.042 ～ 0.037/0.434 ≒0.085				0.056
O－結合型糖1モル当たりのシアル酸の量(mol)	0.189/0.498 ≒0.380 ～ 0.208/0.434 ≒0.479				0.431

[表2]

新規ムチン型糖タンパク質

成分(umol/mg)	ロットD	ロットE			ロットF	平均値
	試料9	試料10	試料11	試料12	試料13	
ガラクトース	0.348	0.616	0.349	0.370	0.417	0.420
フコース	0.327	0.401	0.351	0.371	0.400	0.370
マンノース	0.040	0.044	0.000	0.018	0.040	0.028
N-アセチルグルコサミン	0.407	0.507	0.359	0.425	0.444	0.428
N-アセチルガラクトサミン	0.785	1.087	0.739	0.815	0.866	0.858
その他の単糖	0.233	0.377	0.153	0.215	0.252	0.246

ブタ胃粘膜ムチン

成分(umol/mg)	試料5	試料6	試料7	平均値
ガラクトース	0.755	0.370	0.516	0.547
フコース	0.335	0.249	0.347	0.310
マンノース	0.000	0.000	0.040	0.013
N-アセチルグルコサミン	0.764	0.823	1.079	0.889
N-アセチルガラクトサミン	0.663	0.602	0.724	0.663
その他の単糖	0.000	0.129	0.148	0.092

ラット腸管粘膜ムチン

成分(umol/mg)	試料5	試料6	試料7	平均値
ガラクトース	0.621	0.332	0.402	0.452
フコース	0.274	0.214	0.233	0.240
マンノース	0.000	0.086	0.115	0.067
N-アセチルグルコサミン	0.426	0.451	0.578	0.485
N-アセチルガラクトサミン	0.579	0.490	0.625	0.565
その他の単糖	0.000	0.208	0.248	0.152

[0086] 表１に示すように、ムチン型糖鎖量の指標となるＯ－結合型糖の濃度は、新規ムチン型糖タンパク質では０．４３４～０．５４８マイクロモル／ｍｇ（μｍｏｌ／ｍｇ）、ブタ胃粘膜ムチンでは０．７２８～０．７５２μｍｏｌ／ｍｇ、ラット腸管粘膜ムチンでは０．４３４～０．４９８μｍｏｌ／ｍｇであった。そして、硫酸基濃度は、新規ムチン型糖タンパク質では０．０３９～０．０９０μｍｏｌ／ｍｇであったのに対して、ブタ胃粘膜ムチンでは０．０３５～０．０４６μｍｏｌ／ｍｇ、ラット腸管粘膜ムチンでは０．０２１～０．０３７μｍｏｌ／ｍｇであった。すなわち、Ｏ－結合型糖１モルに対する硫酸基の量は、ブタ胃粘膜ムチンの０．０４７～０．０６３モル（０．０３５／０．７５２≒０．０４７～０．０４６／０．７２８≒０．０６３）、ラット腸管粘膜ムチンの０．０４２～０．０８５モル（０．０２１／０．４９８≒０．０４２～０．０３７／０．４３４≒０．０８５）に対して、新規ムチン型糖タンパク質では０．０７１～０．２０７モル（０．０３

９／０．５４８≒０．０７１～０．０９０／０．４３４≒０．２０７）であり、新規ムチン型糖タンパク質において、顕著に大きいことが明らかになった。

[0087] また、シアル酸濃度も、ブタ胃粘膜ムチンでは０．０４５～０．０５１μｍｏｌ／ｍｇであったのに対して、新規ムチン型糖タンパク質では０．０６８～０．０８５μｍｏｌ／ｍｇ、ラット腸管粘膜ムチンでは０．１８９～０．２０８μｍｏｌ／ｍｇであった。すなわち、Ｏ－結合型糖１モルに対するシアル酸の量は、ブタ胃粘膜ムチンの０．０６０～０．０７０モル（０．０４５／０．７５２≒０．０６０～０．０５１／０．７２８≒０．０７０）に対して、新規ムチン型糖タンパク質では０．１２４～０．１９６モル（０．０６８／０．５４８≒０．１２４～０．０８５／０．４３４≒０．１９６）、ラット腸管粘膜ムチンでは０．３８０～０．４７９モル（０．１８９／０．４９８≒０．３８０～０．２０８／０．４３４≒０．４７９）であり、新規ムチン型糖タンパク質およびラット腸管粘膜ムチンの方が顕著に大きいことが明らかになった。

[0088] 一方、表２に示すように、新規ムチン型糖タンパク質の糖鎖は、ガラクトースをおよそ０．３～０．７μｍｏｌ／ｍｇ、フコースをおよそ０．３～０．５μｍｏｌ／ｍｇ、マンノースをおよそ０～０．０５μｍｏｌ／ｍｇ、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）をおよそ０．３～０．６μｍｏｌ／ｍｇ、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）をおよそ０．７～１．１μｍｏｌ／ｍｇ含有することが明らかになった。

[0089] 以上の結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、ロット間の差異や測定誤差を鑑みても、Ｏ－グリコシド結合している糖１モルに対し、硫酸基を０．０７モル以上という高い割合で含有するという点で、新規な成分ないし構造を有することが明らかになった。また、新規ムチン型糖タンパク質は、硫酸基に加えてシアル酸の含有量も大きく、Ｏ－グリコシド結合している糖１モルに対し、シアル酸を０．１モル以上含有することが明らかになった。

[0090] ここで、一般に、ムチン型糖鎖においては、硫酸基は糖鎖の非還元末端の

糖残基に付加している場合が多い。従って、表１の測定結果において、暫定的に、Ｏ－結合型糖のモル数をムチン型糖鎖のモル数と見なし、全ての硫酸基がムチン型糖鎖の非還元末端に位置すると見なした場合、新規ムチン型糖タンパク質では、ムチン型糖鎖０．４８１モル（平均値）に対して、硫酸基は０．０６４モル（平均値）であるから、硫酸基による糖鎖非還元末端の封鎖率（末端キャッピング率）は、平均約１３．３％（（０．０６４／０．４８１）×１００≒１３．３１）となる。これに対して、ブタ胃粘膜ムチンでは、ムチン型糖鎖０．７４０モル（平均値）に対して、硫酸基は０．０４０モル（平均値）であるから、硫酸基による末端キャッピング率は、平均約５．４％（（０．０４０／０．７４０）×１００≒５．４１）に過ぎない。また、ラット腸管粘膜ムチンでも、ムチン型糖鎖０．４６６モル（平均値）に対して、硫酸基は０．０２６モル（平均値）であるから、硫酸基による末端キャッピング率は、平均約５．６％（（０．０２６／０．４６６）×１００≒５．５８）に過ぎない。すなわち、新規ムチン型糖タンパク質は多数の糖鎖非還元末端に硫酸基を含有し、係る末端キャッピング率は、ブタ胃粘膜ムチンやラット腸管粘膜ムチンなどの他のムチン型糖タンパク質と比較して２倍以上と顕著に高いことが明らかになった。このことから、新規ムチン型糖タンパク質は、多数の糖鎖非還元末端に硫酸基を含有するという特有の構造を有することが明らかになった。

[0091] ＜実施例３＞新規ムチン型糖タンパク質の評価：ムチン非摂取ラットにおけるムシナーゼ活性

実施例１の新規ムチン型糖タンパク質および比較例１のブタ胃粘膜ムチンについて、ムチンを摂取しないラットの糞便に含まれるムチン型糖鎖分解酵素（ムシナーゼ）によって分解される程度（ムシナーゼ活性）を分析した。なお、糞便中に存在するムシナーゼの大部分は腸内細菌に由来するものである。

[0092] （１）ムシナーゼ酵素液の調製

比較例２（１）の標準精製飼料を摂取したラットから、糞便を採取した。

採取から３時間以内の糞便に１００倍量（ｗ／ｖ） の０．０１Ｍ酢酸バッファー（ｐＨ５．５）を加えた後、糞便をハサミで細断し、氷中で２０分間放置することで軟化させた。ホモジナイザーＰＴ－２１００（KINEMATICA）を用いて、４℃にてレベル１１で３０秒間破砕して均一化したものをムシナーゼ酵素液とした。

[0093] （２）ムシナーゼ反応

新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチン２００ｍｇを０．０１Ｍ酢酸バッファー（ｐＨ５．５）１０ｍＬに溶解し、一晩冷蔵保存して、これを基質溶液とした。ムシナーゼ酵素液を３０℃で２分間予備加温した後、ムシナーゼ酵素液０．９ｍＬに対して基質溶液０．１ｍＬを加え、３０℃で３０分置くことにより、ムシナーゼ反応を行った。その後、沸騰水中で３分間加熱して酵素を失活させることで反応を停止させ、これを反応後溶液とした。

[0094] （３）還元糖濃度の測定

反応後溶液中に遊離した還元糖の量を、Ｓｏｍｏｇｙｉ－Ｎｅｌｓｏｎ法により測定した。すなわち、まず、Ａ液（１５％硫酸銅溶液）とＢ液（蒸留水５００ｍＬにNa_2CO_3を１２．５ｇ、ロッシェル塩を１２．５ｇ、$NaHCO_3$を１０ｇおよびNa_2SO_4を１００ｇ溶解した溶液）とを、体積比１：２５の割合で混合して、Ｓｏｍｏｇｙｉ試薬を調製した。また、蒸留水４５０ｍＬに$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$を２５ｇ溶解させた溶液と、$H_2SO_4$を２１ｍＬと、蒸留水２５ｍＬに$Na_2HAsO_4\cdot 7H_2O$を３ｇ溶解させた溶液とを混合し、３７℃で２４～４８時間加温して、Ｎｅｌｓｏｎ試薬を調製した。Ｎｅｌｓｏｎ試薬は常温で保存して、使用前には再度、３７℃で２４～４８時間加温した。

[0095] 標準試料には１ｍｇ／ｍＬのＤ（＋）－グルコース（Ｗａｋｏ）を用い、蒸留水で２５～２００μｇ／ｍＬの希釈系列を作製した。標準試料または反応後溶液１ｍＬに対してＳｏｍｏｇｙｉ試薬１ｍＬを加え、ビー玉で試験管にふたをして沸騰水中で２０分間反応させた。その後直ちに氷水中で冷やす

ことで逆酸化を防ぐとともに反応を停止した。次いで、Ｎｅｌｓｏｎ試薬１ｍＬを加え、１５分間放置して発色させた後、これを４５０μＬ量り取り、３．３ｍＬの蒸留水に加えた。２３３０×ｇ、室温にて１０分間遠心分離して上清を回収し、６６０ｎｍで吸光度を測定した。標準試料の吸光度測定結果に基づき、検量線を作成した。この検量線を用いて、反応後溶液の吸光度測定結果から、反応後溶液中の還元糖濃度（ｎｍｏｌ／ｍＬ）を算出した。その結果を図１に示す。

[0096] 図１に示すように、新規ムチン型糖タンパク質およびブタ胃粘膜ムチンのいずれも、酵素反応時間が長いほど還元糖濃度が大きかった。すなわち、糞中に存在するムシナーゼにより、糖鎖が分解されて還元糖が生成したことが明らかになった。しかしながら、新規ムチン型糖タンパク質とブタ胃粘膜ムチンとで還元糖濃度を比較すると、酵素反応時間が１０分、２０分および３０分のいずれにおいても、新規ムチン型糖タンパク質の方が顕著に小さく、ブタ胃粘膜ムチンの約１／３～１／５の濃度であった。すなわち、新規ムチン型糖タンパク質に対するムシナーゼ活性は、ブタ胃粘膜ムチンと比較して顕著に小さかった。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、ムチンを含有しない精製飼料を摂取したラットの腸内細菌によっては資化されにくい、特有の成分ないし構造を有することが明らかになった。

[0097] 一般に、ムチン型糖鎖の分解は、エキソ型のムシナーゼによって非還元末端から進行するが、糖鎖非還元末端に硫酸エステルやシアル酸が存在する場合は分解が阻害される。このことと、実施例２の結果とを鑑みると、新規ムチン型糖タンパク質に対するムシナーゼ活性が小さい理由は、新規ムチン型糖タンパク質の糖鎖非還元末端の多数に硫酸基やシアル酸が存在するためとも考えられる。

[0098] ＜実施例４＞新規ムチン型糖タンパク質の評価：ムチン摂取ラットにおけるムシナーゼ活性

実施例１の新規ムチン型糖タンパク質、比較例１のブタ胃粘膜ムチンおよび比較例２のラット腸管粘膜ムチンについて、ムチンを摂取したラットの糞

便に含まれるムシナーゼによって分解される程度（ムシナーゼ活性）を分析した。

[0099] （１）ラットの飼育

７週齢（体重１５０～１７０ｇ）のＷｉｓｔａｒ系雄ラット（日本エスエルシー）１８匹を６匹ずつ３群に分け、対照群、１．５％新規ムチン群、１．５％ブタ胃粘膜ムチン群とした。各群につき、下記の飼料を水道水とともに自由摂取させながら、１５日間飼育した。飼育条件は、室温２４±１℃、相対湿度５５±５℃、１２時間の明暗周期（７：００－１９：００点灯）、ステンレス製ゲージ内での個別飼育とした。１２日目に糞便を採取した後、１５日目に解剖して盲腸を摘出し、切り開いて盲腸組織および盲腸内容物を回収した。

対照群：比較例２（１）の標準精製飼料。

１．５％新規ムチン群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを置換することにより１．５％の新規ムチン型糖タンパク質を含有する飼料。

１．５％ブタ胃粘膜ムチン群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを置換することにより１．５％のブタ胃粘膜ムチンを含有する飼料。

[0100] （２）ムシナーゼ酵素液の調製

対照群、１．５％新規ムチン群および１．５％ブタ胃粘膜ムチン群の糞便から、実施例３（１）に記載の方法によりムシナーゼ酵素液を調製し、「対照群由来酵素」、「新規ムチン群由来酵素」および「ブタ胃粘膜ムチン群由来酵素」とした。また、これらのムシナーゼ酵素液中のタンパク質濃度を実施例２（１）に記載のＬｏｗｒｙ法に従って測定した。

[0101] （３）ムシナーゼ反応

実施例１の新規ムチン型糖タンパク質、比較例１のブタ胃粘膜ムチンおよび比較例２のラット腸管粘膜ムチンの３種類を基質とし、本実施例４（２）のムシナーゼ酵素液を用いて、実施例３（２）に記載の方法によりムシナー

ゼ反応を行った。ただし、ラット腸管粘膜ムチンを基質とした反応では、ムシナーゼ酵素液を０．０１Ｍ酢酸バッファー（ｐＨ５．５）により４倍に希釈してから用いた。続いて、実施例３（３）に記載の方法により還元糖濃度を測定した。測定した還元糖濃度は、ムシナーゼ反応の時間およびムシナーゼ酵素液中のタンパク質量で除し、ムシナーゼ酵素液中のタンパク質１ｍｇによりムシナーゼ反応１分間当たりに生じた還元糖の量（ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質）として表した。ラット腸管粘膜ムチンを基質とした場合の結果を図２に、ブタ胃粘膜ムチンを基質とした場合の結果を図３に、新規ムチン型糖タンパク質を基質とした場合の結果を図４に、それぞれ示す。

[0102] 図２に示すように、ラット腸管粘膜ムチンを基質とした場合の還元糖の量は、対照群由来酵素では２９．６±２．１ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であったのに対して、新規ムチン群由来酵素では９２．６±５．７ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質、ブタ胃粘膜ムチン群由来酵素では８７．６±１３．０ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であり、いずれも対照群由来酵素と比較して有意に高かった。すなわち、ラット腸管粘膜ムチンに対するムシナーゼ活性は、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチンを摂取したラットの糞便に含まれるムシナーゼの方が、ムチンを摂取しないラットの糞便に含まれるムシナーゼよりも高かった。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチンの摂取により、「腸管粘膜から分泌されるムチン」に対する分解活性が高い腸内細菌が誘導されることが明らかになった。

[0103] 次に、図３に示すように、ブタ胃粘膜ムチンを基質とした場合の還元糖の量は、対照群由来酵素では７．６±１．８ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であったのに対して、新規ムチン群由来酵素では２１．９±２．６ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質、ブタ胃粘膜ムチン群由来酵素では２３．６±５．３ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であり、いずれも対照群由来酵素と比較して有意に高かった。すなわち、ブタ胃粘膜ムチンに対するムシナーゼ活性は、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチンを摂取したラットの糞便に含まれるムシナーゼの方が、ムチンを摂取しないラットの糞便に含まれるム

シナーゼよりも高かった。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチンの摂取により、「ブタ胃粘膜ムチン」に対する分解活性が高い腸内細菌が誘導されることが明らかになった。

[0104] 最後に、図４に示すように、新規ムチン型糖タンパク質を基質とした場合の還元糖の量は、対照群由来酵素では３．３±０．４ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質、ブタ胃粘膜ムチン群由来酵素では５．３±０．６ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であったのに対して、新規ムチン群由来酵素では９．６±０．７ｎｍｏｌ／分／ｍｇタンパク質であり、対照群由来酵素およびブタ胃粘膜ムチン群由来酵素と比較して有意に高かった。すなわち、新規ムチン型糖タンパク質に対するムシナーゼ活性は、新規ムチン型糖タンパク質を摂取したラットの糞便に含まれるムシナーゼの方が、ムチンを摂取しないラットの糞便に含まれるムシナーゼはもとより、ブタ胃粘膜ムチンを摂取したラットの糞便に含まれるムシナーゼよりも高かった。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質の摂取により、「新規ムチン型糖タンパク質」に対する分解活性が高い腸内細菌が誘導されることが明らかになった。

[0105] 以上のとおり、新規ムチン型糖タンパク質またはブタ胃粘膜ムチンのいずれを摂取した場合も、ブタ胃粘膜ムチンに対する分解活性は同程度に高くなった（図３）のに対して、新規ムチン型糖タンパク質に対する分解活性は、新規ムチン型糖タンパク質を摂取した場合にのみ、高くなった（図４）。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、ブタ胃粘膜ムチンの摂取により誘導される腸内細菌によっては分解されにくい、特有の成分ないし構造を有することが明らかになった。また、新規ムチン型糖タンパク質の摂取により、ブタ胃粘膜ムチンの摂取により誘導されるものとは異なる、特有の腸内細菌叢を誘導できることが明らかになった。

[0106] （４）盲腸内容物中のＯ－結合型糖濃度の測定

本実施例４（１）で回収した盲腸内容物から、比較例２（２）に記載の方法により盲腸内容物ムチン画分を調製した。ここで、ムチンを摂取しないラット（対照群）の盲腸内容物に含まれるムチンはラット腸管粘膜ムチンであ

るが、ムチンを摂取したラット（１．５％新規ムチン群、１．５％ブタ胃粘膜ムチン群）の盲腸内容物に含まれるムチンは、ラット腸管粘膜ムチンおよび摂取したムチンに由来する。

[0107] 調製した盲腸内容物ムチン画分に蒸留水を加えて５ｍＬに定容した後、さらに蒸留水で１０倍に希釈した。これを測定試料として、実施例２（３）に記載の方法により、Ｏ－グリコシド結合している糖（Ｏ－結合型糖）の濃度を測定した。標準試料の測定結果を基に、測定試料におけるＯ－結合型糖の濃度を求め、盲腸内容物ムチン画分１ｇ当たりのＯ－結合型糖濃度（μｍｏｌ／ｇ）を算出した。その結果を図５に示す。

[0108] 図５に示すように、Ｏ－結合型糖濃度は、対照群では０．５０±０．０４μｍｏｌ／ｇであったのに対して、１．５％新規ムチン群では２．２６±０．４７μｍｏｌ／ｇであり、対照群と比較して有意に高かった。一方、１．５％ブタ胃粘膜ムチン群のＯ－結合型糖濃度は０．５４±０．１１μｍｏｌ／ｇであり、対照群と比較して有意差は無かった。ここで、Ｏ－結合型糖の濃度は、ムチン型糖鎖の量に比例すると考えられる。従って、新規ムチン型糖タンパク質を摂取したラットの腸内には、ブタ胃粘膜ムチンを摂取したラットの腸内と比較して、顕著に多くのムチン型糖鎖が残存していることが明らかになった。

[0109] この結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、ブタ胃粘膜ムチンと比較してラット腸内で利用される速度が遅いことが明らかになった。その理由は、実施例３および本実施例４（３）で述べたように、新規ムチン型糖タンパク質が、これを摂取していない腸内細菌によっては資化されにくい、特有の成分ないし構造を有するためと考えられる。なお、盲腸組織の杯細胞数、クリプト長および盲腸内容物中のアンモニア濃度については、各群間に有意差はなかった。

[0110] ＜実施例５＞新規ムチン型糖タンパク質の評価：腸内細菌への作用

実施例１の新規ムチン型糖タンパク質および比較例１のブタ胃粘膜ムチンを摂取したラットにおける腸内細菌（全真正細菌、アッカーマンシア　ムシ

ニフィラおよびバクテロイデス　テタイオタオミクロン）量の変化を、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子を標的としたリアルタイムＰＣＲ法により分析した。

[0111] （１）ラットの飼育

７週齢（体重１５０～１７０ｇ）のＷｉｓｔａｒ系雄ラット（日本エスエルシー）２４匹を６匹ずつ４群に分け、対照群、０．７５％新規ムチン群、１．５％新規ムチン群、１．５％ブタ胃粘膜ムチン群とした。各群につき、下記の飼料を水道水とともに自由摂取させながら、１４日間飼育した。飼育条件は、実施例４（１）に記載の条件と同様にした。その後、解剖して盲腸を摘出し、切り開いて盲腸内容物を回収した。

対照群：比較例２（１）の標準精製飼料。

０．７５％新規ムチン群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを置換することにより０．７５％の新規ムチン型糖タンパク質を含有する飼料。

１．５％新規ムチン群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを置換することにより１．５％の新規ムチン型糖タンパク質を含有する飼料。

１．５％ブタ胃粘膜ムチン群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを置換することにより１．５％のブタ胃粘膜ムチンを含有する飼料。

[0112] （２）ＤＮＡの抽出

盲腸内容物からのＤＮＡの抽出は、ＤＮＡ抽出キットISOFECAL for Beads Beating（ニッポンジーン）を用いて行った。具体的には、１５０ｍｇの盲腸内容物に１ｍＬのLysis Solution Fを加えて懸濁した後、全量を２ｍＬ容量のBeads Tubeへ移して混合した。続いて、ビーズ式破砕装置により、２７００ｒｐｍ、室温にて２分間ビーズ破砕した後、１２０００×ｇ、室温にて５分間遠心分離し、上清６００μＬを２ｍＬ容量のマイクロチューブに移した。Purification solutionを４００μＬ加えて混合した後、クロロホルムを６００μＬ加えて１５秒間ボルテックスミキサーにより混合した。１２０００

×ｇ、室温にて５分間遠心分離し、上清８００μＬを１．５ｍＬ容量マイクロチューブに移してPrecipitation solutionを８００μＬ加えてボルテックスミキサーで混合した。２００００×ｇ、室温にて１５分間遠心分離して上清を除去した。沈殿物にWash solution 1 mLを加えて転倒混和した。２００００×ｇ、４℃にて１０分間遠心分離し、上清を除去して沈殿物に７０％エタノール１ｍＬとEtachinmate２μＬを加えてボルテックスミキサーで混合した。２００００×ｇ、４℃にて５分間遠心分離し、上清を除去して沈殿物を乾燥させた後、TE（ｐＨ８．０）１００μＬに溶解した。この溶液をＤＮＡ溶液とした。

[0113] （３）リアルタイムＰＣＲ

リアルタイムＰＣＲはLightCycler（登録商標）Nano（Roche）を用いて、添付の使用書に従って行った。反応液の組成は、鋳型ＤＮＡ溶液が２μＬ、SYBR Premix EX Taq ＩＩ（タカラバイオ）が１０μＬ、１０μＭのセンスプライマー溶液が０．８μＬ、１０μＭのアンチセンスプライマー溶液が０．８μＬおよびＤＥＰＣ処理水が６．４μＬの計２０μＬとした。なお、鋳型ＤＮＡ溶液は、本実施例５（２）のＤＮＡ溶液を、全真正細菌を測定する場合は５００倍に、アッカーマンシア　ムシニフィラまたはバクテロイデス　テタイオタオミクロンを測定する場合は１００倍に、それぞれ希釈して用いた。既知濃度のＤＮＡを用いた測定により検量線を作成し、係る検量線から、測定結果に基づき盲腸内容物１ｇあたりの各細菌の１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数を絶対定量した。その結果を図６に示す。また、各細菌に特異的なプライマーの配列を以下に示す。

[0114] 《アッカーマンシア　ムシニフィラ》

センスプライマー：ＣＡＧＣＡＣＧＴＧＡＡＧＧＴＧＧＧＧＡＣ（配列番号１）

アンチセンスプライマー：ＣＣＴＴＧＣＧＧＴＴＧＧＣＴＴＣＡＧＡＴ（配列番号２）

《バクテロイデス　テタイオタオミクロン》

センスプライマー ： ＧＣＡＡＡＣＴＧＧＡＧＡＴＧＧＣＧＡ（配列番号３）
アンチセンスプライマー：ＡＡＧＧＴＴＴＧＧＴＧＡＧＣＣＧＴＴＡ（配列番号４）

《全真正細菌》

センスプライマー ：ＣＧＧＣＡＡＣＧＡＧＣＧＣＡＡＣＣＣ（配列番号５）
アンチセンスプライマー：ＣＣＡＴＴＧＴＡＧＣＡＣＧＴＧＴＧＴＡＧＣＣ（配列番号６）

[0115] 図６に示すように、全真正細菌の１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、各群間に有意差はなかった。その一方で、アッカーマンシア ムシニフィラの１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、１．５％新規ムチン群で対照群に対して有意に大きく、０．７５％新規ムチン群でも、対照群と比較して、有意差はないものの大きかった。これに対して、ブタ胃粘膜ムチン群のアッカーマンシア ムシニフィラの１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、対照群と同等であった。また、バクテロイデス テタイオタオミクロンの１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数も、１．５％新規ムチン群で対照群に対して有意に大きく、０．７５％新規ムチン群でも、対照群と比較して、有意差はないものの大きかった。これに対して、ブタ胃粘膜ムチン群のバクテロイデス テタイオタオミクロンの１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、対照群と同等であった。

[0116] すなわち、ラット盲腸内容物中のアッカーマンシア属細菌の１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数およびバクテロイデス属細菌の１６Ｓ ｒＤＮＡコピー数は、新規ムチン型糖タンパク質の摂取により顕著に増大した。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、アッカーマンシア属細菌およびバクテロイデス属細菌の菌数を増加させる作用を有することが明らかになった。

[0117] ここで、一般に、大多数の腸内細菌は硫酸基分解酵素（スルファターゼ）やシアル酸分解酵素（シアリダーゼ）を有していないために、硫酸基やシアル酸の含有量が高い糖鎖を資化できない。これに対して、アッカーマンシア属細菌およびバクテロイデス属細菌は、これらの酵素を有しているため、硫酸基やシアル酸の含有量が高い糖鎖を資化し、栄養源として利用できること

が報告されている。

[0118] しかしながら、本実施例５では、いずれの群も、表１に示すようにシアル酸の含有量が相当に高いラット腸管粘膜ムチンを元来有するにもかかわらず、これらの細菌の菌数は大きく異なっていた。よって、摂取するムチン型糖タンパク質においてシアル酸の含有量が高いことは、アッカーマンシア属細菌およびバクテロイデス属細菌の増加要因とならないことが示唆される。そして、硫酸基の含有量が高い新規ムチン型糖タンパク質を摂取した群のみにおいてこれらの細菌が増加したことから、硫酸基の含有量が高いことが、これらの細菌の増加要因となることが示唆される。

[0119] すなわち、硫酸基の含有量が高いムチン型糖タンパク質を摂取したラットの腸内では、アッカーマンシア属細菌やバクテロイデス属細菌が、当該ムチン型糖タンパク質を利用できない他の腸内細菌種と比較して優性となり、特異的に増加したものと考えられる。このことから、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、硫酸基を０．０７モル以上という高い割合で含有するムチン型糖タンパク質は、アッカーマンシア属細菌およびバクテロイデス属細菌の菌数を増加させる作用を有することが明らかになった。

[0120] ＜実施例６＞新規ムチン型糖タンパク質の評価：アッカーマンシア属細菌の菌数増加作用

（１）新規ムチン型糖タンパク質の調製および含有成分の解析

実施例１に記載の方法により、異なる５つの原料から新規ムチン型糖タンパク質を調製し、ロットＩ～Ｖとした。ただし、ロットＩおよびロットＩＩＩは真カスベ由来原料：水カスベ由来原料＝２：１（重量比）の原料から、ロットＩＩは真カスベ由来原料のみから、ロットＩＶおよびロットＶは水カスベ由来原料のみから、それぞれ調製した。これらについて、実施例２（１）～（５）に記載の方法によりタンパク質濃度、全糖濃度、Ｏ－結合型糖濃度、硫酸基濃度およびシアル酸濃度を測定した。その結果を表３に示す。なお、表３において、±の左側は平均値、右側は標準誤差を示す。標準誤差を

付した数値は、各ロットから３つの試料をサンプリングして、各試料につき三重反復測定した結果である。標準誤差を付していない数値は、各ロットから１つの試料をサンプリングして、各試料につき三重反復測定した平均値である。

[表3]

成分	ロット				
	I	II	III	IV	V
タンパク質(ug/mg)	201.5±4.6	228.0±8.1	205.4±4.1	171.3±6.0	160.6±2.4
全糖(ug/mg)	230.1±3.3	193.5±4.6	238.9±11.6	167.2±4.2	236.8±1.9
O－結合型糖(umol/mg)	0.46±0.02	0.27±0.02	0.46±0.01	0.23	0.46
硫酸基(umol/mg)	0.08±0.00	0.10±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.07±0.00
シアル酸(umol/mg) 〈合計〉	0.09±0.01	0.19	0.11	0.05	0.18
O－結合型糖1モル当たりの硫酸基の量(mol)	0.174	0.370	0.174	0.391	0.152
O－結合型糖1モル当たりのシアル酸の量(mol)	0.196	0.704	0.239	0.217	0.391

[0121] 表３に示すように、新規ムチン型糖タンパク質は、いずれのロットにおいても、Ｏ－グリコシド結合している糖１モルに対し、硫酸基を０．０７モル以上、シアル酸を０．１モル以上という高い割合で含有することが確認された。

[0122] （２）アミノ酸解析

本実施例６（１）の新規ムチン型糖タンパク質について、下記の方法により各アミノ酸の含有割合（ｍｇ／ｇ）を測定した。また、測定結果に基づいて、総アミノ酸に占める各アミノ酸の質量百分率（％）を解析した。なお、下記の測定方法では、トリプトファン（Ｗ）、メチオニン（Ｍ）およびシステイン（Ｃ）は分解されるため、これらのアミノ酸は測定していない。また、「総アミノ酸」は「Ｗ、ＭおよびＣを除く総アミノ酸」を意味する。解析結果を表４に示す。表４において、含有割合は、ムチン型糖タンパク質１ｇ当たりの各アミノ酸の含有量（ｍｇ）で示す。また、質量百分率は、Ｗ、ＭおよびＣを除くアミノ酸の総量に占める各アミノ酸の質量の百分率で示す。数値は、各ロットから１つの試料をサンプリングして、各試料につき二重反復測定した平均値である。

[0123] 《アミノ酸の測定》

ムチン型糖タンパク質５０ｍｇを２．０ｍＬの蒸留水に懸濁し、このうち０．５ｍＬを１ｍＬ容量のバキュームリアクションチューブ（ジーエルサイエンス）に量り入れた。そこへ０．２％の２－メルカプトエタノールを含む１２ｍｏｌ／Ｌの塩酸溶液を０．５ｍＬ加えてよく混合した後、真空ポンプ（ＤＴＣ－２２、ＵＬＶＡＣ）で脱気した。流動パラフィン（Ｗａｋｏ）で満たしたヒートブロック(ＨＦ６１、ヤマト科学)にリアクションチューブを入れて１１０℃で２４時間置くことにより、ムチン型糖タンパク質を酸加水分解した。リアクションチューブを室温に戻してチューブ内の内容物をメスフラスコに移した後、蒸留水で５回洗った。これに３ｍｏｌ／ＬのＮａＯＨ１．７５ｍＬを加えてｐＨ２．２付近に調整した後、０．０６７ｍｏｌ／Ｌのクエン酸ナトリウム緩衝液(ｐＨ２．２、Ｗａｋｏ）で２５ｍＬに定容した。これをメンブレンフィルター（ＤＩＳＭＩＣ－１３ＨＰ、１３ＨＰ０２０ＡＮ、アドバンテック）でろ過してろ液を回収し、アミノ酸分析に供した。アミノ酸分析は、分析用カラム（日立ハイテクパックドカラム＃２６２２ＰＨ、径４．６×６０ｍｍ、日立ハイテクノロジーズ）およびプレカラム（日立パックドカラム ＃２６５０Ｌ、径４．６×４０ｍｍ、日立ハイテクノロジーズ）を備えたＬ－８９００形高速アミノ酸分析計（日立ハイテクノロジーズ）で行った。溶離液（ＭＣＩ（商標）ＢＵＦＦＥＲ Ｌ－８５００－ＰＨ－ＫＩＴ、三菱ケミカル）および反応液（日立用ニンヒドリン発色溶液キット、Ｗａｋｏ）は市販のキットを用いた。アミノ酸の標品には、アミノ酸混合標準液 Ｈ型（Ｗａｋｏ）１ｍＬを０．０６７ｍｏｌ／Ｌのクエン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ２．２、Ｗａｋｏ）で２５ｍＬに定容したものを用いた。

[表4]

成分	ロット				
	I	II	III	IV	V
含有割合(mg/g)					
セリン(S)	25.1	23.7	28.0	13.4	27.5
プロリン(P)	27.7	25.7	30.5	20.5	30.6
スレオニン(T)	68.2	51.7	65.6	28.5	74.3
グルタミン酸及び グルタミン(E+Q)	13.0	16.3	11.0	10.7	11.3
アスパラギン酸及び アスパラギン(D+N)	21.5	24.8	25.1	22.8	17.8
グリシン(G)	15.2	21.6	14.3	8.7	12.7
アラニン(A)	9.5	12.2	10.8	7.6	9.9
バリン(V)	10.6	9.4	10.6	8.2	9.8
イソロイシン(I)	27.4	25.0	26.7	28.5	26.1
ロイシン(L)	23.6	23.0	20.6	21.5	21.1
チロシン(Y)	2.8	2.1	2.3	4.2	2.9
フェニルアラニン(F)	4.5	4.2	3.8	7.2	4.1
リシン(K)	8.6	9.7	9.7	9.7	6.7
ヒスチジン(H)	3.0	3.9	3.2	3.5	2.2
アルギニン(R)	6.2	10.1	6.2	6.2	3.2
総アミノ酸(W,M及びCを除く)	267.0	263.6	268.3	201.3	260.1
総アミノ酸に占める質量百分率(%)					
セリン(S)	9.4	9.0	10.4	6.7	10.6
プロリン(P)	10.4	9.8	11.3	10.2	11.8
スレオニン(T)	25.6	19.6	24.4	14.2	28.6
グルタミン酸及び グルタミン(E+Q)	4.9	6.2	4.1	5.3	4.3
アスパラギン酸及び アスパラギン(D+N)	8.0	9.4	9.3	11.3	6.8
グリシン(G)	5.7	8.2	5.3	4.3	4.9
アラニン(A)	3.6	4.6	4.0	3.8	3.8
バリン(V)	4.0	3.6	4.0	4.1	3.8
イソロイシン(I)	10.3	9.5	9.9	14.1	10.1
ロイシン(L)	8.8	8.7	7.7	10.7	8.1
チロシン(Y)	1.1	0.8	0.9	2.1	1.1
フェニルアラニン(F)	1.7	1.6	1.4	3.6	1.6
リシン(K)	3.2	3.7	3.6	4.8	2.6
ヒスチジン(H)	1.1	1.5	1.2	1.8	0.8
アルギニン(R)	2.3	3.8	2.3	3.1	1.2

[0124] 表４に示すように、ロットＩＶは、ロットＩ～ＩＩＩおよびロットＶと比較して、セリンおよびスレオニンの含有割合および質量百分率が小さく、イソロイシン、チロシンおよびフェニルアラニンの含有割合および質量百分率が大きいことが明らかになった。

[0125] （３）ラットの飼育

７週齢（体重１４０～１６０ｇ）のＷｉｓｔａｒ系雄ラット（日本エスエ

ルシー）３６匹を６匹ずつ６群に分け、対照群ならびにロットＩ～Ｖ群とした。各群につき、下記の飼料を水道水とともに自由摂取させながら、１４日間飼育した。飼育条件は、実施例４（１）に記載の条件と同様にした。その後、解剖して盲腸を摘出し、切り開いて盲腸内容物を回収した。

対照群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを一部置換することにより５重量％のセルロースおよび１０重量％のスクロースを含有する飼料。

ロットＩ～Ｖ群：比較例２（１）の標準精製飼料において、コーンスターチを一部置換することにより１．２％の新規ムチン型糖タンパク質（本実施例６（１）のロットＩ～
Ｖ）を含有する飼料。

[0126] （４）ＤＮＡの抽出およびリアルタイムＰＣＲ

回収した盲腸内容物から、実施例５（２）に記載の方法によりＤＮＡを抽出した。続いて、実施例５（３）に記載の方法によりリアルタイムＰＣＲを行い、全真正細菌およびアッカーマンシア　ムシニフィラの１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数を測定した。その結果を図７に示す。

[0127] 図７に示すように、全真正細菌の１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数は、各群間に有意差はなかった。その一方で、アッカーマンシア　ムシニフィラの１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数は、ロットＩ群、ロットＩＩ群、ロットＩＩＩ群およびロットＶ群で対照群に対して有意に大きく、ロットＩＶ群でも、対照群と比較して、有意差はないものの大きかった。すなわち、ラット盲腸内容物中のアッカーマンシア属細菌の１６Ｓ　ｒＤＮＡコピー数は、新規ムチン型糖タンパク質の摂取により増大した。この結果から、新規ムチン型糖タンパク質は、アッカーマンシア属細菌の菌数を増加させる作用を有することが明らかになった。

[0128] ここで、非特許文献５によれば、アッカーマンシア　ムシニフィラは、必須アミノ酸のうちのスレオニンを合成することができない（RESULTS AND DISCUSSION、第２段落第５－７行目）。また、非特許文献６によれば、アンモニ

アおよび他のアミノ酸を含み、かつＬ－スレオニンを含まない培地では、アッカーマンシア　ムシニフィラは増殖できない（Results and discussion 、第１段落第１４－１７行目、Fig. S1）。すなわち、アッカーマンシア　ムシニフィラは、生存ないし増殖に、外部からスレオニンを供給されることが必要といえる。

非特許文献５；Ottman N. et al, Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of Akkermansia muciniphila reveal a preferential mucin-degrading lifestyle, Appl Environ Microbiol, Volume 83, Issue 18, e01014-e01017, September 2017

非特許文献６；Kees C. H. van der Ark et al., Model-driven design of a minimal medium for Akkermansia muciniphila confirms mucus adaptation, Microbial Biotechnology 11(1339-1353), January 2018, DOI: 10.1111/1751-7915.13033

[0129] この点、表４に示すように、ロットＩＶのムチン型糖タンパク質は、他のロットと比較して、スレオニンの含有割合がムチン型糖タンパク質１ｇあたり２８．５ｍｇ、総アミノ酸に占めるスレオニンの質量百分率が１４．２％と小さかった。このことから、ロットＩＶ群で、アッカーマンシア属細菌の菌数が増加しているものの、その増加の程度が比較的小さいのは、摂取させたムチン型糖タンパク質におけるスレオニンの含有割合ないし総アミノ酸に占める質量百分率が小さいためと考えられた。すなわち、この結果から、ムチン型糖タンパク質においてスレオニンの含有率が高いものが、より強いアッカーマンシア属細菌の菌数増加作用を有することが明らかになった。具体的には、高いアッカーマンシア属細菌の菌数増加効果を得るためには、ムチン型糖タンパク質において、スレオニンの含有割合が２９ｍｇ／ｇ以上、あるいは、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上であることが好ましいことが明らかになった。

請求の範囲

[請求項1] 硫酸基およびシアル酸を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上であり、前記シアル酸の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．１モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[請求項2] トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、請求項１に記載のムチン型糖タンパク質。

[請求項3] エイの皮および／または体表粘性物から採取される、請求項１または請求項２に記載のムチン型糖タンパク質。

[請求項4] 請求項１から請求項３のいずれかに記載のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加剤。

[請求項5] 下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加剤；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

[請求項6] アッカーマンシア属細菌の菌数増加剤であって、前記ムチン型糖タンパク質において、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除くアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、請求項５に記載の菌数増加剤。

[請求項7] 前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、請求項５または請求項６に記載の菌数増加剤。

[請求項8] 肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療に用いられることを特徴とする、請求項４

から請求項７のいずれかに記載の菌数増加剤。

[請求項9] 請求項１から請求項３のいずれかに記載のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加用食品組成物。

[請求項10] 下記のムチン型糖タンパク質を有効成分とする、アッカーマンシア属細菌および／またはバクテロイデス属細菌の菌数増加用食品組成物；

硫酸基を含有するムチン型糖タンパク質であって、前記硫酸基の含有量が、コアタンパク質にＯ－グリコシド結合している糖１モルに対し、０．０７モル以上である、前記ムチン型糖タンパク質。

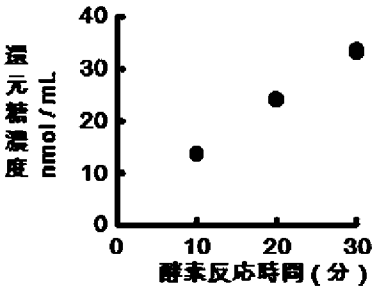
[請求項11] アッカーマンシア属細菌の菌数増加用食品組成物であって、前記ムチン型糖タンパク質において、トリプトファン、メチオニンおよびシステインを除いたアミノ酸の総量に占めるスレオニンの質量百分率が１５％以上である、請求項１０に記載の菌数増加用食品組成物。

[請求項12] 前記ムチン型糖タンパク質が、エイの皮および／または体表粘性物から採取されたものである、請求項１０または請求項１１に記載の菌数増加用食品組成物。

[請求項13] 肥満、２型糖尿病および脂質異常症からなる群から選択される１以上の疾患の予防または治療に用いられることを特徴とする、請求項９から請求項１２のいずれかに記載の菌数増加用食品組成物。

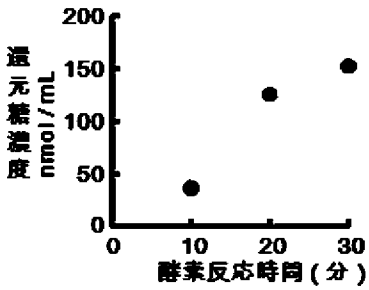
[図1]

新規ムチン型糖タンパク質



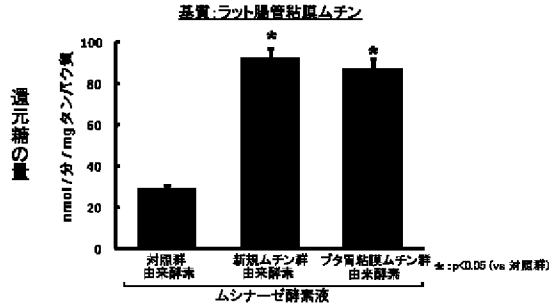
	酵素反応時間(分)		
	10	20	30
還元糖濃度(nmol/mL)	13.9	24.1	33.4

ブタ胃粘膜ムチン

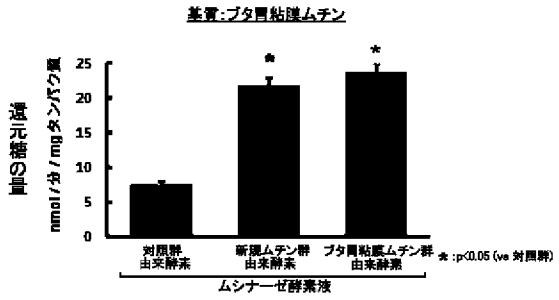


	酵素反応時間(分)		
	10	20	30
還元糖濃度(nmol/mL)	36.1	125.9	152.6

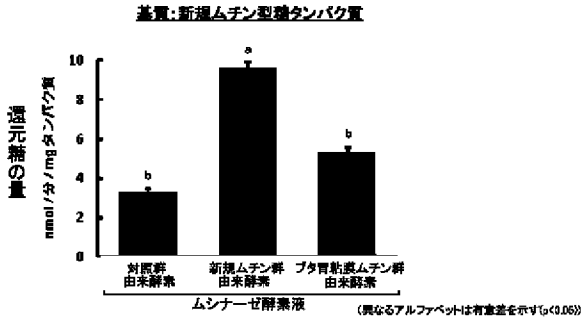
[図2]



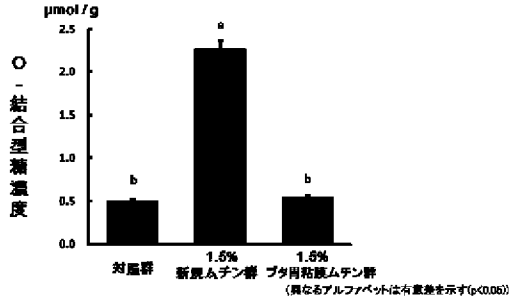
[図3]



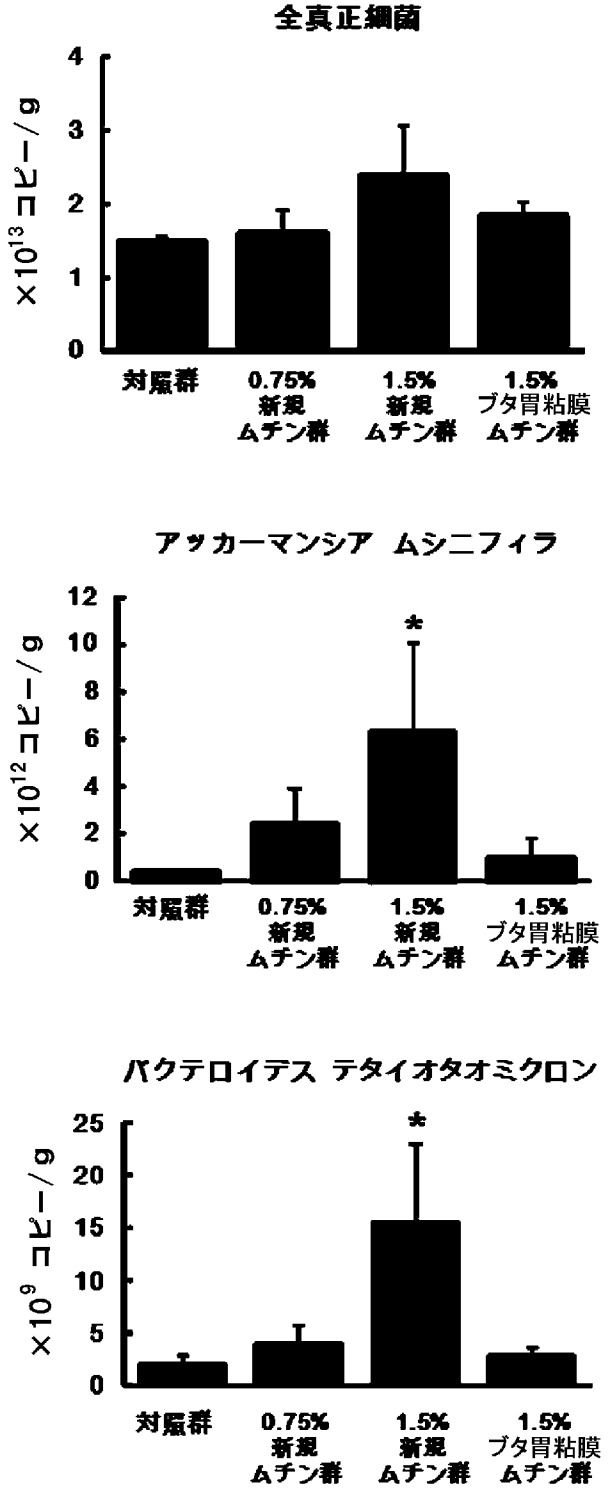
[図4]



[図5]


μmol / g
O-結合型糖濃度
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
対照群
1.5%
豚胃粘膜ムチン群
1.5%
ブタ胃粘膜ムチン群
（異なるアルファベットは有意差を示す(p<0.05)）

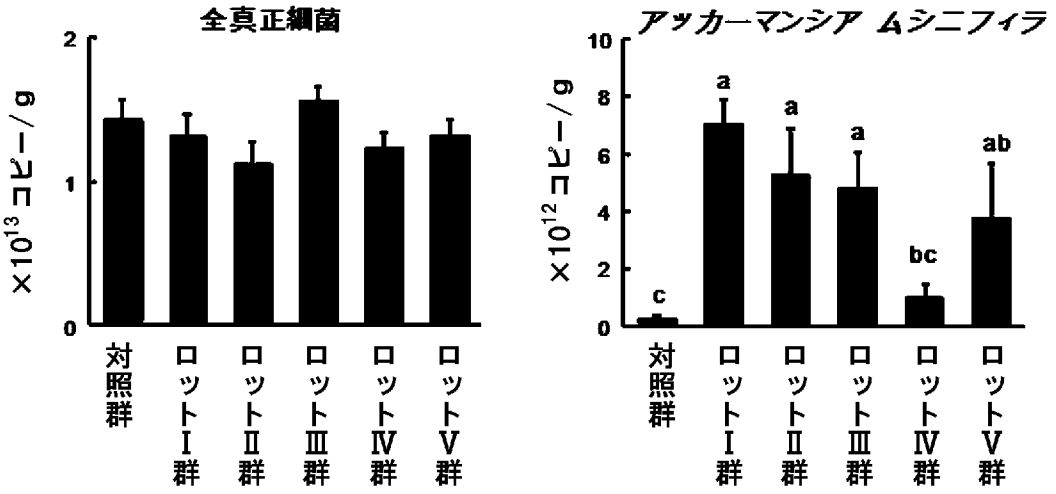
[図6]



*p<0.05 (vs 対照群)

	対照群	0.75% 新規ムチン群	1.5% 新規ムチン群	1.5% ブタ胃粘膜ムチン群
全真正細菌 (×10^{13}コピー/g)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.4 ± 0.7	1.9 ± 0.2
アッカーマンシア ムシニフィラ (×10^{12}コピー/g)	0.4 ± 0.1	2.5 ± 1.4	6.3 ± 3.7*	1.0 ± 0.8
バクテロイデス テタイオタオミクロン (×10^{9}コピー/g)	2.0 ± 0.8	3.8 ± 1.9	15.5 ± 7.4*	2.8 ± 0.7

[図7]



	対照群	ロットⅠ群	ロットⅡ群	ロットⅢ群	ロットⅣ群	ロットⅤ群
全真正細菌 (×10^{13}コピー/g)	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
A.ムシニフィラ (×10^{12}コピー/g)	0.3 ± 0.1^{c}	7.0 ± 0.8^{a}	5.3 ± 1.6^{a}	4.8 ± 1.2^{a}	1.1 ± 0.3^{bc}	3.8 ± 1.9^{ab}

異なるアルファベットは有意差を示す (p<0.05)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/014480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K14/46(2006.01)i, A23L33/17(2016.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07K14/46, A23L33/17, A61K38/17, A61P3/06, A61P3/10, C12N15/09

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/107083 A1 (MARUKYOU BIO FOODS) 23 September 2010, claims, examples (Family: none)	1-3 4-13
Y A	WO 2017/178496 A1 (WAGENINGEN UNIVERSITEIT) 19 October 2017, claims & EP 3443071 A1 & KR 10-2018-0133443 A & CN 109415683 A & JP 2019-510520 A	4-13 1-3
Y A	ROBERTON, A. M., et al., "In vitro utilization of mucin by Bacteroides fragilis", Appl. Environ. Microbiol., February 1982, vol. 43, no. 2, pp. 325-330, in particular, abstract, fig. 3	4-13 1-3
A	SUMI, T., et al., "Isolation and properties of a sialoglycoprotein from the skin mucus of the stingray Dasyatis akajei", Fisheries Science, 1997, vol. 63, no. 3, pp. 453-458, in particular, abstract	1-13

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 June 2019 (14.06.2019)	25 June 2019 (25.06.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０１４４８０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/46(2006.01)i, A23L33/17(2016.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/46, A23L33/17, A61K38/17, A61P3/06, A61P3/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	WO 2010/107083 A1 (丸共バイオフーズ株式会社) 2010.09.23, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-3 4-13
Y A	WO 2017/178496 A1 (WAGENINGEN UNIVERSITEIT) 2017.10.19, 特許請求の範囲 & EP 3443071 A1 & KR 10-2018-0133443 A & CN 109415683 A & JP 2019-510520 A	4-13 1-3

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

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１４．０６．２０１９	２５．０６．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３９６１
小金井　悟
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	ROBERTON A.M., et al., In vitro utilization of mucin by	4-13
A	Bacteroides fragilis, Appl. Environ. Microbiol., 1982.02, Vol.43, No.2, p.325-330, 特に要約、図３	1-3
A	SUMI T., et al., Isolation and properties of a sialoglycoprotein from the skin mucus of the stingray Dasyatis akajei, Fisheries Science, 1997, Vol.63, No.3, p.453-458, 特に要約	1-13