

(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
2010 年 11 月 4 日(04.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/126073 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/057535
- (22) 国際出願日: 2010 年 4 月 28 日(28.04.2010)
- (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 2009-108839 2009 年 4 月 28 日(28.04.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和発酵キリン株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本間央之(HONMA Nakayuki) [JP/JP]; 〒1948533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 次世代創薬研究所内 Tokyo (JP). 三井秋徳(MITSUI Akinori) [JP/JP]; 〒1948533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 次世代創薬研究所内 Tokyo (JP). 石田功(ISHIDA Isao) [JP/JP]; 〒2591136 神奈川県伊勢原市串橋 3 5 2 - 6 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町MTビル 1 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: EXPRESSION CASSETTE FOR SECRETION/EXPRESSION OF POLYPEPTIDE, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: ポリペプチドの分泌発現のための発現カセットおよびその使用

[図3]



FIG. 3:

AA PROMOTER REGION
BB SIGNAL SEQUENCE
CC INSERTION SEQUENCE FOLLOWING THE SIGNAL SEQUENCE
DD cDNA ENCODING POLYPEPTIDE
EE TERMINATOR SEQUENCE

(57) Abstract: Disclosed are a method for the efficient secretion/expression of a polypeptide by means of a microorganism, preferably a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* and a means for the method. Specifically disclosed is an expression cassette characterized by comprising: (i) a promoter selected from the group consisting of a promoter for a *cbaH* gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, a promoter for *rplJ* gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and a promoter for *hup* gene derived from *Bifidobacterium breve*; (ii) DNA encoding a signal sequence selected from the group consisting of a signal sequence for a product of BL1181 gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and a signal sequence for a product of *amyB* gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*; and (iii) DNA encoding a polypeptide or a cloning site into which the DNA is to be inserted.

(57) 要約: 本発明は、微生物、好適にはビフィドバクテリウムでポリペプチドを効率的に分泌発現する方法およびその手段を提供する。具体的には、本発明は、(i)ビフィドバクテリウム属細菌由来の *cbaH* 遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来の *rplJ* 遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム・ブレーベ由来の *hup* 遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーター、(ii)ビフィドバクテリウム属細菌由来の BL1181 遺伝子産物のシグナル配列およびビフィドバクテリウム属細菌由来の *amyB* 遺伝子産物のシグナル配列からなる群より選択されるシグナル配列をコードする DNA、ならびに(iii)ポリペプチドをコードする DNA または該 DNA を挿入するためのクローニング部位、を含むことを特徴とする発現カセットを提供する。

WO 2010/126073 A1



-
- 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：

ポリペプチドの分泌発現のための発現カセットおよびその使用

技術分野

[0001] 本発明は、ポリペプチドの微生物での分泌発現に関する。特に、本発明は、疾患または障害を治療または予防する目的で、ポリペプチドを粘膜および／または腫瘍組織へデリバリーするために用いるビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 等のグラム陽性細菌における、ポリペプチドの分泌発現のための手段および方法に関する。

背景技術

[0002] これまで、さまざまな組換え微生物について、疾患の治療または予防の目的に、それらの有用性が検討されてきた（非特許文献1）。例えば、有用ポリペプチドの粘膜へのデリバリーを目的として、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) やビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) などを用いた方法が検討されてきた（非特許文献2、3、4）。また、腫瘍治療を目的として、プロドラッグ変換酵素を発現するクロストリジウム (*Clostridium*)、サルモネラ (*Salmonella*) やビフィドバクテリウムを用いた方法などが、検討されてきた（非特許文献5、6、7）。さらには、大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いたRNAiのデリバリーも検討されている（非特許文献8）。組換え微生物を用いる方法は、有効な核酸やポリペプチドを全身投与する場合の毒性や血中半減期の問題を克服し、効果的に核酸やポリペプチドを送達するための手段となり得る。さらに、製造の過程において、精製など大きな費用がかかる工程を省略することができ、組換えタンパク質製品と比べて容易かつ／または安価に有用性を提供し得る。

[0003] これらの宿主微生物の中で、ビフィドバクテリウムは、プロバイオティクスにも用いられる病原性を持たない常在菌で、偏性嫌気性菌であり、粘膜と腫瘍の両方へのデリバリーに利用できるため、安全性、生物学的封じ込め、

および汎用性の観点から、優れた特性を持つと考えられる。

[0004] さらに、ビフィドバクテリウムは、消化管耐性のための改良が人工的にされていない非共生細菌であるラクトコッカス・ラクティス (*L. lactis*) と比べ、腸管での持続性が圧倒的に優れ、疾患の治療や予防にとって好ましい体内動態を示す可能性が示唆されている（非特許文献 9）。したがって、炎症性腸疾患治療などのために消化管粘膜へ有用なポリペプチドをデリバリーする目的において、組換え *L. lactis* に比べてビフィドバクテリウムの方が優れている可能性が考えられる。

[0005] ビフィドバクテリウムは、静脈内に投与した場合、非常に高い選択性をもって腫瘍でのみ生残増殖する（非特許文献 10）。これは、ひとつには腫瘍が低酸素領域を有するためと考えられている。この性質を利用して、腫瘍治療を目的として、プロドラッグである 5-フルオロシトシン (5-FC) を 5-フルオロウラシル (5-FU) に転換できる大腸菌シトシンデアミナーゼ (CD) を、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*B. longum*) の *hup* 遺伝子のプロモーターを使用して、特に分泌することなく産出するビフィドバクテリウムが作製され、この菌を用いた腫瘍治療効果の検討が行われている（特許文献 1）。この方法に関しては、酵素 CD によってビフィドバクテリウム自らが産生する 5-FU が、腫瘍細胞のみならず菌にも作用するため、菌が自殺することにより治療効果が制限される。このことを考慮して、インビトロで 5-FU 耐性菌が取得されている（特許文献 2）。しかし、インビボで抗腫瘍効果を発揮するためには、5-FU が細胞の酵素により変換された活性代謝産物、5-fluoro-UTP (5-FUTP) または 5-fluoro-dUMP (5-FdUMP) が必要である（非特許文献 11）。これらもまた菌に毒性を発揮し、やはり薬効は制限される可能性がある。また、この方法は、ビフィドバクテリウムとは別に、生体への大量の 5-FC の投与が必要であり、制約が大きい。したがって、腫瘍治療用途においても、より効果的な方法として、有用なポリペプチドを分泌発現するビフィドバクテリウムの使用が求められている。

[0006] 一般に、細菌において、異種ポリペプチドの分泌発現、特に生物学的に活

性を持ったポリペプチドの分泌発現には多くのボトルネックがあり、異種ポリペプチドそれぞれ固有の問題のために、分泌発現が困難である場合が多い。しかし、特にバシラス・サブティリス (*Bacillus subtilis*) やラクトコッカス・ラクティスなどにおいては非常に多くの研究の蓄積がある（非特許文献 12、13、14）。

[0007] 一方、ビフィドバクテリウムを用いた分泌発現についての報告は、それらと比較すると非常に少ない。例えば、ビフィドバクテリウムにおいて、*B. longum* の *hup* 遺伝子のプロモーターとガラクトシダーゼのシグナル配列を使用してインターロイキン-10 (IL-10) の分泌発現が試みられているが、培養上清中の濃度が 22 pg/ml と極めて低かったことが報告されている（非特許文献 15）。同様に、*hup* 遺伝子のプロモーターを使用して、塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF-2) の分泌発現が試みられ、培養上清をトリクロロ酢酸で沈殿してウェスタンブロッティングでタンパク質を検出できたことが報告されている（非特許文献 16）。また、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*B. adolescentis*) の *amyB* 遺伝子のプロモーターおよびシグナル配列を使用して、外来ポリペプチドを分泌発現する試みが報告されている（非特許文献 17、18）。ここで、培養上清中のポリペプチドは、活性形態でまたは硫酸沈殿された形態で SDS-PAGE で検出されている。

[0008] さらに、大腸菌のプロモーターを用いた、ビフィドバクテリウムでのエンドスタチンの発現が報告されている。この報告ではシグナル配列が使用されておらず、菌体破砕物から精製を行った後にウェスタンブロッティングで発現タンパク質が検出されている（非特許文献 19）。最近、同じ発現系で TRAIL/Apo2-L が発現され、担癌マウスにおいてその菌の効果が示されている。しかしながら、TRAIL/Apo2-L の発現量や比活性、さらには TRAIL/Apo2-L がどのようにして大腸菌プロモーターの制御下で発現し、シグナル配列なしでビフィドバクテリウムの菌体外に作用するのかは示されていない（非特許文献 20）。また、特許文献 1 においては、*B. longum* でのインターロイキン-2 (IL-2) とエンドスタチンの発現についての示唆はあるが、それらの実際の発現

については現在まで報告されていない。

- [0009] 要約すると、従来にはない医療価値を提供できる可能性のある組換え細菌を使用した治療方法が検討されている中で、ビフィドバクテリウムは他にはない優れた特性を持つ宿主と考えられるが、異種のポリペプチドの分泌発現に関しては、必ずしも満足のいく状況ではなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：日本国特許第3642755号
特許文献2：国際公開W02006/109619号

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Vassaux G, et al. J Pathol. 2006. 208(2):290-8.
非特許文献2：Remaut E, et al. Bioscience and Microflora. 2006. 25(3):81-97.
非特許文献3：Liu X, et al. Appl Environ Microbiol. 2008. 74(15):4626-35.
非特許文献4：Takata T, et al. J Gene Med. 2006. 8(11):1341-6.
非特許文献5：Wei MQ, et al. Cancer Lett. 2008. 259(1):16-27.
非特許文献6：Nemunaitis J, et al. Cancer Gene Ther. 2003. 10(10):737-44.
非特許文献7：Sasaki T, et al. Cancer Sci. 2006. 97(7):649-57.
非特許文献8：Xiang S, et al. Nat Biotechnol. 2006. 24(6):697-702.
非特許文献9：Watson D, et al. BMC Microbiol. 2008. 8:176.
非特許文献10：Kimura NT, et al. Cancer Res. 1980. 40(6):2061-8.
非特許文献11：Erbs P, et al. Cancer Res. 2000. 60(14):3813-22.
非特許文献12：Bolhuis A, et al. Appl Environ Microbiol. 1999. 65(7):2934-41.
非特許文献13：Li W, et al. Res Microbiol. 2004. 155(8):605-10.
非特許文献14：Morello E, et al. J Mol Microbiol Biotechnol. 2008. 14(

1-3): 48-58.

非特許文献15: Reyes Escogido ML, et al. *Biotechnol Lett.* 2007. 29(8): 1249-53.

非特許文献16: Shkoporov AN, et al. *Biotechnol Lett.* 2008. 30(11): 1983-8.

非特許文献17: Park MS, et al. *Lait* 2005. 85: 1-8.

非特許文献18: Moon GS, et al. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71(9): 5630-2.

非特許文献19: Xu YF, et al. *Cancer Gene Ther.* 2007. 14(2): 151-7.

非特許文献20: Hu B, et al. *Cancer Gene Ther.* 2009. 16(8): 655-63.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明者らは、有用なポリペプチドをビフィドバクテリウムで効率的に分泌発現させることによって、医療をはじめとした用途に、従来にはない大きな利用価値を持つ技術を提供できると考えた。しかしながら、ビフィドバクテリウムにおいて従来利用されていたプロモーターおよびシグナル配列ならびにそれらの組み合わせは、有用なポリペプチドを分泌発現させるために必ずしも満足のいくものではなかった。

[0013] そこで本発明の第一の目的は、有用なポリペプチドを微生物、好適にはビフィドバクテリウムで効率的に分泌発現する方法およびその手段を提供することにある。第二には、有用なポリペプチドを粘膜および／または腫瘍組織へデリバリーする手段を含む医薬組成物を提供することにある。第三には、該医薬組成物を利用することによる、疾患または障害の治療および予防のための手段および方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、ビフィドバクテリウムにおいて、生物活性のある有用なポリペプチドを効率よく分泌発現させ得るプロモーターとシグナル配列の組み合わせを得る目的で鋭意検討を重ねた。その結果、従来知られていた発現力

セットと比較して、生物活性をもった有用なポリペプチドを高いレベルで分泌発現させることができるプロモーターとシグナル配列との組み合わせを見出した。また、シグナル配列の後に、特定の遺伝子のシグナル配列の後のおよそ1～20アミノ酸をコードするDNAを挿入した場合には、ポリペプチドの分泌発現効率がさらに高まることを見出した。さらに本発明者らは、動物実験において、該発現カセットを含む発現ベクターが導入されたビフィドバクテリウムが、そのわずか一回の投与でも、長期の抗腫瘍効果を示すことを見出した。

[0015] すなわち本発明は以下の(1)～(6)である。

[0016] (1) 以下の(i)、(ii)および(iii)を含むことを特徴とする発現カセット。

(i) ビフィドバクテリウム属細菌由来の*cbaH*遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来の*rplJ*遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム属細菌由来の*hup*遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーター、

(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列およびビフィドバクテリウム属細菌由来の*amyB*遺伝子産物のシグナル配列からなる群より選択されるシグナル配列をコードするDNA、

(iii) ポリペプチドをコードするDNA、または該DNAを挿入するためのクローニング部位

[0017] 上記発現カセットにおいて、(iii)にポリペプチドをコードするDNAが挿入されていることが好ましい。

[0018] また、プロモーターは、好ましくはビフィドバクテリウム属細菌由来の*cbaH*遺伝子のプロモーターまたはビフィドバクテリウム属細菌由来の*hup*遺伝子産物のプロモーターである。シグナル配列は、好ましくはビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列である。

[0019] 上記発現カセットは、(ii)シグナル配列をコードするDNAと(iii)ポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAを挿入するためのクローニング部位と

の間に、ビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAが連結されていてもよい。

[0020] あるいは上記発現カセットは、(ii) シグナル配列をコードするDNAと (iii) ポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAを挿入するためのクローニング部位との間に、配列番号9に示されるアミノ酸配列をコードするDNAが連結されていてもよい。

[0021] (2) 以下の(i)、(ii)、(iii)および(iv)を含むことを特徴とする発現カセット。

(i) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子のプロモーター、

(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNA、

(iii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNA、

(iv) ポリペプチドをコードするDNA、または該DNAを挿入するためのクローニング部位

[0022] 上記発現カセットにおいて、(iv)にポリペプチドをコードするDNAが挿入されていることが好ましい。

[0023] また、プロモーターは、好ましくはビフィドバクテリウム属細菌由来のcbaH遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来のrplJ遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム属細菌由来のhup遺伝子のプロモーターからなる群より選択される。

[0024] 上記(1)または(2)の発現カセットにおいて、ポリペプチドは、好ましくはインターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-2 (IL-2)、TRAIL/Apo2-L、I型インターフェロン (IFN- β など)、インターロイキン-4 (IL-4) 拮抗変異体、およびR-spondinsからなる群より選択される。

[0025] 上記(1)または(2)の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロ

ンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、IL-10をコードするDNAとを含有する。

[0026] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く１～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、IL-10をコードするDNAとを含有する。

[0027] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、IL-2をコードするDNAとを含有する。

[0028] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く１～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAと、IL-2をコードするDNAとを含有する。

[0029] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のrplJ遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、IL-4拮抗変異体をコードするDNAとを含有する。

[0030] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス由来のamyB遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、TRAIL/Ap

o2-LをコードするDNAとを含有する。

[0031] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、I型インターフェロンをコードするDNAとを含有する。

[0032] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く１～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、I型インターフェロンをコードするDNAとを含有する。

[0033] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、R-spondinsをコードするDNAとを含有する。

[0034] 上記（１）または（２）の発現カセットは、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く１～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、R-spondinsをコードするDNAとを含有する。

[0035] また上記（１）または（２）の発現カセットは、ビフィドバクテリウム属細菌においてポリペプチドを分泌発現させるために使用される。

[0036] （３）上記（１）または（２）の発現カセットを含有する発現ベクター。

[0037] （４）上記（１）もしくは（２）の発現カセットまたは上記（３）の発現ベクターを含む組換え微生物。

- [0038] 上記微生物は、例えばビフィドバクテリウム属細菌である。
- [0039] (5) 上記(4)の微生物を含む医薬組成物。
- [0040] 上記医薬組成物は、疾患または障害を治療するために用いることができる。かかる疾患または障害は、好ましくは炎症性腸疾患または腫瘍疾患である。
- [0041] (6) 上記(1)もしくは(2)の発現カセットまたは上記(3)の発現ベクターを含む組換え微生物を培養し、得られる培養物からポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。

発明の効果

- [0042] 本発明によれば、安全性、体内動態および生物学的封じ込めなどさまざまな点において優れた特性を有するビフィドバクテリウムにおいて、種々の有用なポリペプチドを、活性な状態でかつ効率よく分泌発現させ得る発現カセットが提供される。また、該発現カセットを含み、有用なポリペプチドを分泌発現する微生物が提供される。該微生物は、ヒトを含む動物に投与することにより粘膜および／または腫瘍組織へ有用なポリペプチドを効率的にデリバリーするための医薬組成物に用いることができる。これにより、疾患の治療および／または予防を効率的に行い得る。

図面の簡単な説明

- [0043] [図1]pKKT427のマッピングを示す。
- [図2]pBSM4 (A) とpBSM11 (B) のマッピングを示す。
- [図3]発現カセットの構成の一例を示す。
- [図4]培養上清中IL-10のウェスタンブロット像を示す。
- [図5]MC/9細胞増殖アッセイにおける、培養上清中IL-10のin vitro生物活性を示す。Aのグラフは陽性対照の市販のIL-10タンパク質の活性である。
- [図6]培養上清中IL-10のウェスタンブロット像 (B. breve) を示す。
- [図7]培養上清中IL-10のウェスタンブロット像 (pBSM4) を示す。
- [図8]さまざまな長さのシグナル配列後挿入配列を用いた場合の培養上清中IL-10のウェスタンブロット像を示す。

[図9] MC/9細胞増殖アッセイにおける、培養上清中IL-10のin vitro生物活性を示す。Aのグラフは陽性対照の市販のIL-10タンパク質の活性である。Bのグラフはシグナル配列後挿入配列の長さが0から3の場合の活性である。Cのグラフはシグナル配列後挿入配列の長さが6から16の場合の活性である。

[図10] 培養上清中IL-2のウェスタンブロット像を示す。

[図11] CTLL/2細胞増殖アッセイにおける、培養上清中IL-2のin vitro生物活性を示す。Aのグラフは陽性対照の市販のIL-2タンパク質の活性である。

[図12] 培養上清中または細胞質中のIL-4拮抗変異体のウェスタンブロット像を示す。

[図13] 培養上清中TRAIL/Apo2-Lのウェスタンブロット像（経時変化）を示す。

[図14] 培養上清中TRAIL/Apo2-Lのウェスタンブロット像（発現カセットAからD）を示す。

[図15] 培養上清中TRAIL/Apo2-Lのウェスタンブロット像（発現カセットAとE）を示す。

[図16] COLO 205細胞アポトーシスアッセイにおける、培養上清中TRAIL/Apo2-Lのin vitro生物活性を示す。Aのグラフは陽性対照の市販の組換え可溶化型hTRAIL/Apo2-Lの活性である。

[図17] 培養上清中TRAIL/Apo2-Lのウェスタンブロット像（pBSM11）を示す。

[図18] 培養上清中または細胞質中のIFN- β のウェスタンブロット像を示す。

[図19] I型インターフェロン活性アッセイにおける、培養上清中IFN- β のin vitro生物活性を示す。Aのグラフは陽性対照の市販の組換えhIFN- β 1aの活性である。

[図20] 培養上清中または細胞質中のR-spondin 2 dCのウェスタンブロット像を示す。

[図21] TRAIL/Apo2-L発現ビフィドバクテリウム（hupプロモーター）のin vivo腫瘍成長抑制効果（4回投与、矢印）を示す。

[図22] 実施例 11 の試験での体重変化を示す。

[図23] TRAIL/Apo2-L発現ビフィドバクテリウム (cbaHプロモーター) のin vivo腫瘍成長抑制効果 (単回投与、矢印) を示す。

発明を実施するための形態

[0044] 以下に本発明について詳細に説明する。本願は、2009年4月28日に出願された日本国特許出願第2009-108839号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

[0045] 本発明は、微生物においてポリペプチドを発現および分泌させるために有用な、プロモーターとシグナル配列の組み合わせ、そして場合によりさらにポリペプチドおよび／またはシグナル配列に続く配列、をコードする発現カセットと、その利用に関する。

[0046] 本明細書において「発現カセット」とは、目的とするポリペプチドが発現し得るように、該ポリペプチドをコードするDNAとその発現を調節するプロモーター等の種々の調節エレメントとが、宿主微生物または宿主細胞中で機能し得る状態で連結されているDNA配列をいう。ここで「機能し得る状態で連結されている」とは、ポリペプチドをコードするDNAが、プロモーターの制御下で、そして場合により他の調節エレメントの制御下で、発現されるように、発現カセットまたは発現ベクターに含まれる各構成要素が連結されていることを意味する。

[0047] 本発明に係る発現カセットは、プロモーターを含む。本明細書で言う「プロモーター」とは、特定の転写開始点 (+1) からRNAポリメラーゼに転写を開始させる機能を担っているDNA配列を意味する。また、この領域以外に、発現調節のためにRNAポリメラーゼ以外のタンパク質が会合するために必要な領域を含んでいてもよい。また本明細書中で「プロモーター領域」と記載する場合があるが、これは本明細書で言うプロモーターを含む領域のことを示す。

[0048] 本発明の一実施形態では、プロモーターは、ビフィドバクテリウム属細菌由来のcbaH遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来のrplJ遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム属細菌由来のhup遺伝子のプロモーターからなる群より選択される。ビフィドバクテリウム属細菌由来

のhup遺伝子のプロモーターは、好ましくはビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子のプロモーターである。

[0049] ビフィドバクテリウム属細菌由来のcbaH遺伝子のプロモーターとしては、*B. longum* 105-AのcbaH遺伝子のプロモーター領域（配列番号1）が挙げられる。この配列は、Accession Number AE014295の*Bifidobacterium longum* NCC 2705, complete genomeに含まれる、locus tag BL0796の、共役胆汁酸ヒドロラーゼ（conjugated bile acid hydrolase）すなわち胆汁酸塩ヒドロラーゼ（bile salt hydrolase）をコードするcbaH遺伝子のプロモーター領域と100%一致する。また、Accession Number ABQ81846の特許出願公開EP1227152-A1の*Bifidobacterium longum* NCC2705 related nucleotide sequence SEQ ID:1102にも含まれている。また、Accession Number CP000605の*Bifidobacterium longum* DJ010A, complete genomeに含まれる、locus tag BLD_0536の共役胆汁酸ヒドロラーゼをコードするcbaH遺伝子のプロモーター領域とも100%一致する。また、Accession Number AF148138 の*Bifidobacterium longum* SBT2928の胆汁酸塩ヒドロラーゼ（bsh）遺伝子のプロモーター領域とも100%一致する。

[0050] ビフィドバクテリウム属細菌由来のrplJ遺伝子のプロモーターとしては、*B. longum* ATCC 15707のrplJ遺伝子のプロモーター領域（配列番号2）が挙げられる。この配列は、Accession Number AE014295の*Bifidobacterium longum* NCC2705, complete genomeに含まれる、locus tag BL1549の、50Sリボソームタンパク質L10をコードするrplJ遺伝子のプロモーター領域と100%一致する。また、Accession Number CP000605の*Bifidobacterium longum* DJ010A, complete genomeに含まれる、locus tag BLD_1667のリボソームタンパク質L10をコードするrplJ遺伝子のプロモーター領域とも100%一致する。

[0051] ビフィドバクテリウム属細菌由来のhup遺伝子のプロモーターとしては、*B. breve* ATCC15700のhup遺伝子のプロモーター領域（配列番号3）が挙げられる。また、場合によっては、特許文献1（特許第3642755号）に開示されている*B. longum* ATCC15707のhup遺伝子のプロモーター領域（配列番号13）を

使用することも可能である。

[0052] プロモーターは、上記例示した配列の一部でも、または上記例示した配列の全体もしくは一部にさらなる配列が付加されていても、所望のプロモーター活性を発揮することができることがある。従って、本発明においては、上記例示した配列（例えば配列番号 1、2 および 3 で示される DNA 配列）の全部またはその一部を含むものをプロモーターとして使用することができる。即ち、プロモーター活性を有する限り、上記例示した配列（例えば配列番号 1 から 3 で示される DNA 配列）のいかなる DNA 断片であってもよく、あるいは、上記例示した配列（例えば配列番号 1 から 3 で示される DNA 配列）の一部を含むいかなる DNA 断片であってもよい。

[0053] また、プロモーターは、所望のプロモーター活性を有する限り、1 もしくは数個の塩基に変異を含んでもよい。例えば、上記例示した配列（例として配列番号 1 から 3 に示される塩基配列）において、1 もしくは数個、好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個の塩基の欠失、置換もしくは付加を有する配列からなるプロモーターを用いることができる。そのようなプロモーターは、上記例示した配列に基づいて、当技術分野で公知の方法、例えば部位特異的突然変異誘発法により、プロモーター活性を維持しつつ配列の異なる変異体を作製することができる。

[0054] また例えば、上記例示した配列（例えば配列番号 1 から 3 に示す塩基配列）からなる DNA に相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA も、プロモーター活性を有する限り用いることができる。上記の「ストリンジントな条件下でハイブリダイズできる DNA」としては、上記例示した配列（例えば配列番号 1 から 3 に示す塩基配列）と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列からなる DNA 等が挙げられる。ここで、ストリンジントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、例えば、ナトリウム濃度が、10mM～300mM、好ましくは 20～200mM であり、温度が 25℃～70℃、好

ましくは42℃～55℃での条件をいう。

[0055] ここで「プロモーター活性」とは、プロモーター（領域）に、発現可能な状態でDNAを連結し、宿主に導入した際、宿主内において該DNAからのRNAの転写を開始させる能力および機能を有することを示す。ある配列がプロモーター活性を有するか否かは、当技術分野で公知の方法によって確認することができる。例えば、種々のレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子（LUC）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、 β グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子（uidA）等をプロモーターの下流域に連結したベクターを作製し、当該ベクターを宿主に導入した後、当該レポーター遺伝子の発現を測定することにより確認することができる。プロモーター活性は、例えば配列番号1～3に示される塩基配列からなるプロモーターが機能する条件と同一の条件でほぼ同程度のプロモーター活性（例えば約0.01～100倍の活性）が維持されていることが好ましい。このような所望の活性を有するプロモーターの作製は、当業者に公知である。

[0056] また本発明に係る発現カセットは、シグナル配列をコードするDNAを含有する。本明細書で言う「シグナル配列」とは、タンパク質分子に含まれるペプチド配列で、細胞質内で生合成されたポリペプチドの分泌を指示する構造である。これは、シグナルペプチド、分泌シグナル、局在シグナル、あるいは輸送（移行）シグナルなどとも呼ばれる。

[0057] 本発明の一実施形態では、シグナル配列は、ビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列およびビフィドバクテリウム属細菌由来のamyB遺伝子産物のシグナル配列からなる群より選択される。

[0058] 例えばビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列としては、*B. longum* 105-AのBL1181遺伝子産物のシグナル配列（配列番号4）が挙げられる。これは、Accession Number NP_696350の*Bifidobacterium longum* NCC2705のhypothetical protein BL1181の推定シグナル配列と100%一致する。また、Accession Number ZP_00121020の*Bifidobacterium longum* DJ010AのCOG3942：表面抗原（Surface antigen）の推定シグナル配列とも100

%一致する。この配列番号 4 に示されるシグナル配列をコードする DNA の一例としては、配列番号 6 に示される塩基配列を有する DNA が挙げられる。

[0059] また例えばビフィドバクテリウム属細菌由来の amyB 遺伝子産物のシグナル配列として、非特許文献 18 に開示されている *B. adolescentis* INT-57 の amyB 遺伝子産物のシグナル配列（配列番号 5）が挙げられる。これは、Accession Number AAP69820 の *Bifidobacterium adolescentis* の amyB 遺伝子産物である α -アミラーゼ（alpha-amylase）の推定シグナル配列である。またこれは Accession Number ADX45166 の KR2004087056-A の SEQ ID NO 2 の *Bifidobacterium* sp. タンパク質分泌関連 α -アミラーゼタンパク質（Protein secretion-related alpha amylase protein）の一部である。それは、Accession Number ADX45166 AEN03241 の KR2006014660-A の SEQ ID NO 1 の *Bifidobacterium adolescentis* アミラーゼシグナルペプチド（amylase signal peptide）である。それは、Accession Number AEN03244 の KR2006014660-A の SEQ ID NO 4 の *Bifidobacterium adolescentis* アミラーゼ（Amylase）の一部でもある。Accession Number ZP_02029407 の *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 の hypothetical protein BIFAD0_01864 の推定シグナル配列と 97% 一致する。この配列番号 5 に示されるシグナル配列をコードする DNA の一例としては、配列番号 7 に示される塩基配列を有する DNA が挙げられる。

[0060] 本発明のシグナル配列には、所望のシグナル配列としての活性を有する限り、上記例示した配列（例えば配列番号 4～5 に示される配列）の変異体も含まれる。そのような変異体には、ビフィドバクテリウム属細菌の他の菌種のオルソログの相当する配列も含まれる。

[0061] ここでシグナル配列としての活性とは、ポリペプチドの小胞体膜への移行と膜透過に寄与する機能を意味し、シグナル配列を有するポリペプチドは、シグナル認識粒子によって認識されて小胞体内腔へと送られ、膜を透過して分泌される。ある配列がシグナル配列としての活性を有するか否かは、当技術分野で公知の方法により、例えば連結したポリペプチドの培養上清中への分泌を、ELISA 法やウェスタンブロッティング法でそのポリペプチドに対する

抗体を用いて検出することにより、あるいは該ポリペプチドが酵素活性を有する場合、酵素活性を測定することにより確認することができる。

[0062] また、シグナル配列をコードするDNAとポリペプチドをコードするDNAの間に、特定のシグナル配列の後に続く配列をコードするDNA、またはLEISSTCDAをコードするDNAを挿入すると、ポリペプチドの分泌発現効率が著しく向上する場合がある。本明細書においては特に、そのようなポリペプチドの分泌を促進する活性を有する配列を「シグナル配列後挿入配列」と呼ぶ。かかるシグナル配列後挿入配列としては、例えばビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物（タンパク質）のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAが挙げられる。

[0063] 配列番号8は、*B. longum* 105-AのBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く16アミノ酸からなるペプチド配列である。この配列は、上記Accession Number NP_696350の*Bifidobacterium longum* NCG2705のhypothetical protein BL1181の推定シグナル配列とAccession Number ZP_00121020の*Bifidobacterium longum* DJ010AのCOG3942：表面抗原の推定シグナル配列に続く16アミノ酸と100%一致する。この配列番号8に示されるシグナル配列後挿入配列をコードするDNAの一例としては、配列番号10に示される塩基配列を有するDNAが挙げられる。

[0064] また、シグナル配列後挿入配列としては、アミノ酸LEISSTCDAからなるペプチド配列（配列番号9）（以後、LEISSと呼ぶ）を用いることも可能である。この配列は、*L. Lactis*における異種タンパク質の分泌に関する論文で示されている人工配列である（Le Loir Y, et al. *J Bacteriol.* 1998. 180(7):1895-903.）。この配列番号9に示されるシグナル配列後挿入配列をコードするDNAの一例としては、配列番号11に示される塩基配列を有するDNAが挙げられる。

[0065] 本発明のシグナル配列後挿入配列には、所望の分泌促進活性を有する限り、シグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸のうち任意の個数のアミノ酸をコードするDNAを用いることができる。例えば好ましくは1～18個、さ

らに好ましくは1～16個の連続するアミノ酸をコードするDNAが挙げられる。また、上記例示した配列（例えば配列番号8～9に示される配列）の変異体も用いることができる。該変異体には、欠失変異体および延長変異体も含まれる。さらに、該変異体には、ビフィドバクテリウム属細菌の他の菌種のオルソログの相当する配列も含まれる。

[0066] ここである配列または変異体が、本発明におけるシグナル配列後挿入配列として用いることができるか否かは、例えばシグナル配列に該候補配列を連結し、その後続くポリペプチドの培養上清中での分泌量向上を、該ポリペプチドに対する抗体を用いたELISA法やウェスタンブロッティング法で検出することにより、あるいは該ポリペプチドが酵素活性を有する場合、酵素活性を測定することにより確認することができる。

[0067] 本発明に係る発現カセットは、ポリペプチドの発現および分泌のために、ポリペプチドをコードするDNA、またはそのようなDNAを挿入するためのクローニング部位を含有する。

[0068] 本明細書で言う「ポリペプチド」は、2以上のアミノ酸からなるポリペプチドであれば特に限定されず、あらゆる生物に由来するあらゆる機能・活性を有するポリペプチドを意味する。

[0069] このようなポリペプチドの具体例としては、タンパク質ホルモンまたはペプチドホルモン、例えば、成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、インスリン、ソマトスタチン、カルシトニン、パソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド、アドレノメデュリン、レプチン、グルカゴン様ペプチド（GLP）-1～2またはインスリン様成長因子（IGF）-1～2など、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、肝細胞因子（SCF）、トロンプオエチン（TPO）、白血球抑制因子（LIF）、オンコスタチンM（OSM）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、インターロイキン（IL）1～35、I～III型インターフェロン（IFN）、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリータンパク質、

例えば、TNF- α 、CD40、TRAIL/Apo2-L、FAS ligandまたはRANKLなど、ケモカイン、例えばCCL1~28またはCXCL1~17など、線維芽細胞成長因子（FGF）1~23、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）-1~2、ケラチン細胞増殖因子（KGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）- β スーパーファミリータンパク質、例えばTGF- β または骨形成タンパク質（BMP）1~15など、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）ファミリー、例えばVEGF-Aから-Eなど、神経栄養因子、例えば神経成長因子（NGF）など、R-spondin 1~4、Trefoil因子 1~3、上皮増殖因子（EGF）ファミリータンパク質、例えばEGFまたはニューレグリン-1~4、結合組織成長因子（CTGF）、組織プラスミノゲン活性化因子（t-PA）、ウロキナーゼ、免疫グロブリン、例えばラクダ科VHH抗体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0070] あるいは、「ポリペプチド」は、上記のポリペプチドに対するレセプターまたはアンタゴニストであってもよい。

[0071] あるいは、「ポリペプチド」は、細胞内タンパク質または酵素、例えばプロドラッグ変換酵素、例えば大腸菌または酵母のシトシンデアミナーゼ（CD）またはグルクロニダーゼなど、そして抗原性ポリペプチド（すなわち免疫応答を誘発されるところの対象）、そして発光性タンパク質（ルシフェラーゼなど）、そして毒素、例えば緑膿菌外毒素（PE）であってもよい。

[0072] さらに、「ポリペプチド」は、上記のポリペプチドの部分ペプチド、変異体、または融合体であってもよい。例えば、CDまたはp53などと、タンパク質トランスダクシンドメイン（PTD）、例えばVP22またはTATなどとの融合ポリペプチドであってもよい。

[0073] 本発明の一実施形態では、ポリペプチドは、IL-10、IL-2、IL-4拮抗変異体、TRAIL/Apo2-L、I型IFN（IFN- α 、 β 、 ω ）またはR-spondinsであることが好ましい。

[0074] IL-10は、抗炎症性のサイトカインである。これまで炎症性腸疾患で組換えIL-10の臨床試験が試みられてきたが、大きな成功を収めるには至っていない

(World J Gastroenterol. 2004 Mar 1;10(5):620-5.)。一方で、IL-10を分泌発現する*L. lactis*は、経口投与されることによって消化管でのみIL-10が作用するなどの利点を持つ可能性があり、炎症性腸疾患での臨床試験が試みられているところである(非特許文献2: Remaut E, et al. Bioscience and Microflora. 2006. 25(3):81-97.)。したがって、IL-10を分泌発現するビフィドバクテリウムも炎症性腸疾患の治療薬になる可能性が考えられる。腸管での持続性が優れている可能性があること(非特許文献9: Watson D, et al. BMC Microbiol. 2008. 8:176.)や偏性嫌気性菌であることが、*L. lactis*に対するビフィドバクテリウムの利点となりうる。また、他の粘膜部位における疾患にも有用である可能性がある。

[0075] IL-2は、NK細胞やT細胞を増殖させて、抗腫瘍免疫を賦活化しうる。IL-2の局所投与は、多くの臨床試験で効果が見られている(Den Otter W, et al. Cancer Immunol Immunother. 2008. 57(7):931-50.)。IL-2を全身投与すると全く抗腫瘍効果がないが、腫瘍局所へデリバリーすると有効であるという動物モデルでの報告もある(Marling J, et al. Clin Cancer Res. 2008. 14(20):6515-24.)。したがって、ビフィドバクテリウムは静脈内投与すると腫瘍局所にのみ生残し増殖することから(Kimura NT, et al. Cancer Res. 1980. 40(6):2061-8.)、IL-2を発現するビフィドバクテリウムは腫瘍の効果的な治療薬になる可能性があると考えられる。また、IL-2を分泌発現するビフィドバクテリウムは、ワクチンのアジュバントとしての利用も考えられる。

[0076] 多くの上皮癌細胞や癌幹細胞は、TRAIL/Apo2-Lなどにより誘導されるアポトーシスに対し耐性であるが、それは腫瘍細胞由来のIL-4を介していることが示唆されている(Todaro M, et al. Cell Death Differ. 2008. 15(4):762-72., Todaro M, et al. Cell Stem Cell. 2007. 1(4):389-402.)。したがって、IL-4拮抗変異体は腫瘍の治療に有用である可能性がある。また、IL-4は多くの免疫反応に関わっていることから、IL-4拮抗変異体は免疫疾患にも有用である可能性がある。さらにIL-4拮抗変異体は、ビフィドバクテリウムに分泌発現させることによって腫瘍または粘膜局所で選択的に作用させるこ

とにより、より高い薬効で、より低い毒性を実現できる可能性がある。

[0077] TRAIL/Apo2-Lは、腫瘍細胞上の受容体DR4および／またはDR5と相互作用し、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する（Ashkenazi A, et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2008. 7(12):1001-12.）。したがって、TRAIL/Apo2-Lを含むDR4およびDR5のアゴニストは腫瘍治療に有用であると考えられ、臨床試験が実施されている。TRAIL/Apo2-Lを分泌発現するビフィドバクテリウムは、腫瘍へ選択的にターゲティングすることにより、副作用や持続性などの面で治療薬として利点を持つ可能性がある。

[0078] I型IFNは、腫瘍に対して直接または血管新生阻害や免疫を介した間接作用により抗腫瘍効果を発揮する（Gresser I. *Biochimie.* 2007. 89(6-7):723-8., Ferrantini M, et al. *Biochimie.* 2007. 89(6-7):884-93.）。また、I型IFNは抗ウイルス剤として広く使用されている。これらのことから、I型IFNを分泌発現するビフィドバクテリウムは、抗腫瘍剤および抗ウイルス剤としても使用されうる。

[0079] R-spondin 1から4（R-spondins）の投与は似たように腸の肥大をもたらす生物活性を持ち（Kim KA, et al. *Cell Cycle.* 2006. 5(1):23-6.）、R-spondin 1は炎症性腸疾患モデルで有効である（Zhao J, et al. *Gastroenterology.* 2007. 132(4):1331-43.）。このことから、R-spondinsは腸の疾患治療に使用できる可能性がある。IL-10の場合と同様、R-spondinsを分泌発現するビフィドバクテリウムは、R-spondinタンパク質製剤に対して利点を持つ可能性がある。さらに、腸以外の粘膜部位の疾患の治療にも使用できる可能性がある（Zhao J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(7):2331-6.）。

[0080] 後述するような疾患または障害の治療または予防においてヒトを対象とする場合には、IL-10、IL-2、IL-4拮抗変異体、TRAIL/Apo2-L、I型IFN（IFN- α 、 β 、 ω ）またはR-spondinsは、ヒトのオルソログであることが好ましい。

[0081] 上述したポリペプチドは全て公知であり、当業者であれば、そのアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列を、公知の文献または公のデータベース（GenBankなど）から適宜入手することができる。

[0082] あるいは、本発明に係る発現カセットは、ポリペプチドをコードするDNAを挿入するためのクローニング部位を含有するものであってもよい。そのようなクローニング部位は当技術分野で公知であり、例えば、様々な制限酵素により認識される部位を含むマルチクローニング部位を利用することができる。このようなクローニング部位を含有する発現カセットの場合、所望のポリペプチドをコードするDNAを、そのクローニング部位を介して発現カセットに挿入することが容易となる。

[0083] 上記の各構成要素の組み合わせは、発現させようとするポリペプチドの種類、使用するベクターの種類、宿主微生物の種類などによって、所望の分泌発現が達成されるように選択することができる。例えば、適当なプロモーターおよびシグナル配列をコードするDNAを、発現させようとするポリペプチドをコードするDNAと連結して発現ベクターを調製し、その発現ベクターを適当な微生物に導入して、微生物におけるポリペプチドの発現量、好ましくは分泌量を測定することによって、所望の分泌発現が達成されるかを確認することができる。

[0084] 特定のポリペプチドに関して、最適な分泌発現を達成することができるプロモーターおよびシグナル配列、そして任意によりシグナル配列後挿入配列の組み合わせを以下に例示するが、これらに限定されるものではない：

(i) IL-10の発現には、以下が好ましい：

 ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせ、あるいはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列と、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列後挿入配列またはLE1SSTCDAをコードする配列の組み合わせ。

[0085] (ii) IL-2の発現には、以下が好ましい：

 ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビ

フィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせ、あるいは

ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列と、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列後挿入配列の組み合わせ。

[0086] (iii) IL-4拮抗変異体の発現には、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のrplJ遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせが好ましい。

[0087] (iv) TRAIL/Apo2-Lの発現には、ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス由来のamyB遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせが好ましい。

[0088] (v) I型インターフェロン、特にIFN- β の発現には、以下が好ましい：

ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせ、あるいはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列と、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列後挿入配列またはLEISSTCDAをコードする配列の組み合わせ。

[0089] (vi) R-spondins、特にdC型R-spondin2の発現には、以下が好ましい：

ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列との組み合わせ、あるいはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロ

モーターと、ビフィドバクテリウム・ロングム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列と、ビフィドバクテリウム・ロングム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列後挿入配列またはLEISSTCDAをコードする配列の組み合わせ。

[0090] 本発明に係る発現カセットには、上述した構成要素のほかに、所望によりエンハンサー配列などのシスエレメント、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）、相同配列などが含まれてもよい。

[0091] 「ターミネーター配列」とは、転写を終結させる活性をもつDNA配列であり、ポリペプチドをコードするDNAの下流に連結することが好ましいが、必ずしも必要ではない。

[0092] 本発明の一実施形態では、ターミネーター配列として、*B. longum* ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーター配列（Tanaka K, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2005. 69(2):422-5.）を用いることができるが、当技術分野で公知の他のターミネーター配列を用いることも可能である。

[0093] 「選択マーカー」は、形質転換された細胞のみを選択するために使用される。例えば、アンピシリン耐性、クロラムフェニコール耐性、エリスロマイシン耐性、ネオマイシン耐性、スペクチノマイシン耐性、またはテトラサイクリン耐性などの薬剤耐性マーカーが挙げられる。好適には、スペクチノマイシン耐性遺伝子（SpR）またはクロラムフェニコール耐性遺伝子（CmRもしくはcat）が使用される。形質転換された細胞のみを選択するためには、必ずしも薬剤耐性マーカーを使用する必要はなく、例えば、栄養要求性による検出、導入された発現カセットもしくは発現ベクターのPCR法などによる検出、またはポリペプチド産物のELISAもしくはウェスタンブロッティングなどによる検出などによっても形質転換細胞を選択することができる。

[0094] また、ポリペプチドを微生物細胞の表層に提示させる場合は、表層提示用配列を連結することが好ましい。表層提示用配列としては、例えばバシラス・サブティリス（*Bacillus subtilis*）のポリ- γ -グルタミン酸の生合成に関わるタンパク質であるPgsAの膜貫通型アンカー配列（Narita J, et al. Appl Environ Microbiol. 2006. 72(1):269-75.）、さらにはLPXTG 細胞壁アンカ

リングモチーフやペプチドグリカン結合ドメイン (Ramasamy R, et al. Vaccine. 2006. 24(18):3900-8.) などが知られている。

[0095] 上述した各構成要素を連結する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、精製された各構成要素のDNAを適当な制限酵素で切断し、リガーゼなどを用いて連結する方法を採用することができる。あるいは合成PCR法により連結する方法を採用することもできる。

[0096] 本発明は、上記の発現カセットを含有する発現ベクターも提供する。本明細書において「発現ベクター」とは、目的とするポリペプチドをコードするDNAを転写せしめるプロモーターおよび他の適当な配列からなる発現のためのユニット（発現カセット）が挿入されたベクターをいい、目的とするポリペプチドをコードするDNAが挿入されたものを含む。また本明細書において「ベクター」とは、遺伝子組換え技術に用いられる、それに挿入された核酸分子を宿主細胞内へ導入させるための核酸分子をいい、ベクターには、限定されるものではないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、ファージミドベクター、および人工染色体などが含まれる。

[0097] 本発明の一実施形態では、ベクターは、pTB6 (Matsumura H, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 1997. 61(7):1211-2., Tanaka K, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2005. 69(2):422-5.) のレプリコンを含むビフィドバクテリウムと大腸菌とのシャトルベクターpKKT427が挙げられるが（図1；Yasui K, et al. Nucleic Acids Res. 2009. 37(1):e3.）、特に限定されない。

[0098] また本発明の他の実施形態では、ベクターは、pTB4 (Imamoto F and Kano Y, "Bifizusukin no Kenkyu" (in Japanese), ed. by Mitsuoka T, JapanBifidus Foundation, Tokyo, Japan, 1994, pp. 150-157.) のレプリコンを含むビフィドバクテリウムと大腸菌とのシャトルベクターpBSM4およびpBSM11が挙げられる（図2AおよびB）。ここでpBSM4とpBSM11は、マルチクローニングサイトの向きが互いに逆になったものである。

[0099] ベクターに各構成要素または発現カセットを挿入するには、例えば、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、ベクターDNAの制限酵素部位またはマ

ルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する。ベクターが宿主微生物において自律複製されるか（染色体外）、またはベクター上のDNAが宿主微生物のゲノムに組み込まれるように（染色体内）、ベクターを構築する必要がある。

[0100] 発現ベクターにおいて、連結される発現カセットまたはそれぞれの構成要素は、単数であっても複数であってもよい。また、宿主微生物に導入される発現ベクターは、一種類であっても複数種類であってもよい。

[0101] 発現ベクター（核酸構築物）の構築についての遺伝子工学の基本操作については、市販の実験書、例えば、Molecular Cloning, 2nd ed. (Sambrook, J et al. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.) またはMolecular Cloning, 3rd ed. (Sambrook, J et al. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.) などに記載された方法に従って行うことができる。

[0102] さらに本発明は、上記の発現カセットまたは上記の発現ベクターを含む組換え微生物を提供する。本明細書で言う「組換え微生物」は、本発明の発現カセットまたは発現ベクター（核酸構築物）を含み、該発現カセットまたは発現ベクターにコードされるポリペプチドを分泌発現し得る微生物である。かかる組換え微生物の作製に用いることができる宿主微生物は、導入される発現カセットまたは発現ベクターからポリペプチドを分泌発現することができる微生物であれば特に限定されるものではなく、好適にはグラム陽性細菌である。グラム陽性細菌には、例えばビフィドバクテリウム属細菌、ラクトコッカス属細菌、ラクトバシラス属細菌、クロストリジア属細菌、バシラス属細菌などが含まれ、より好適には微生物はビフィドバクテリウム属細菌である。あるいは、微生物にはグラム陰性細菌のサルモネラ属細菌（腸内細菌科）、エシェリキア属細菌なども含まれる。

[0103] 本発明で用いられるビフィドバクテリウム属細菌は、該属に属する菌株のいずれでもよい。例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス (*B. adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*B. animalis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブ

レーベ (*B. breve*)、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム (*B. catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*B. dentium*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*B. infantis*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*B. lactis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*B. longum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*B. pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*B. thermophilum*) などが挙げられる。これらの菌は、いずれも市販されているか、または寄託機関から容易に入手することができる。あるいは、これらの菌は、生体から採取することもできる。さらに、これらの変異体、またはこれらから育種された菌を用いてもよい。

[0104] 本発明の一実施形態では、ビフィドバクテリウム属細菌は、*B. longum* 105-A (Matsumura H, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 1997. 61(7):1211-2.) または *B. breve* ATCC 15700 (アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より入手可) である。

[0105] 組換え微生物の培養には、炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよく、当業者であれば使用する株に適切な公知の培地を適宜選ぶことができる。ビフィドバクテリウム属細菌の培養には、例えば以下の組成の滅菌された培地を使用することができる。

[0106] 「MRS液体培地」

Lactobacilli MRS Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI)

50 mM Sucrose

3.4 mg/ml L-Ascorbic Acid Sodium Salt

0.2 mg/ml L-Cysteine Hydrochloride

また「MRS寒天培地」は、上記MRS液体培地に、Bacto Agar (Difco Laboratories) が1.5%の割合になるように混合されたものである。「MRS-HEPES培地」は、上記MRS液体培地と0.5 M HEPES Buffer Solution (pH 7.2~7.5) を1:1で混合したものである。形質転換され、薬剤耐性マーカーを持つ菌は、選択マーカーに応じて各種薬剤を加えておくことにより、選択的に培養できる

。例えば、スペクチノマイシンは $100\mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコールは $2.5\mu\text{g/ml}$ で使用される。

[0107] ビフィドバクテリウム属細菌の培養は、約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 程度、好ましくは約 37°C 程度において、嫌気条件下で行う。嫌気条件下とは、ビフィドバクテリウム属細菌が増殖可能な程度の低酸素環境下のことであり、例えば嫌気チャンバー、嫌気ボックスまたはアネロパック（三菱ガス化学、東京）などの脱酸素剤を入れた密閉容器または袋などを使用することにより得られる。

[0108] 発現カセットまたは発現ベクターを宿主微生物に導入するための形質転換方法は、公知のいずれの方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法等が挙げられる。本発明においては、エレクトロポレーション法を用いるのが好ましい。形質転換体は、例えば選択マーカーに応じた薬剤を含有する培地（ビフィドバクテリウム属細菌の場合にはMRS寒天培地など）を使用して、コロニーとして分離できる。

[0109] 上述のようにして作製された、本発明に係る発現カセットまたは発現ベクターを含む組換え微生物は、発現カセットまたは発現ベクターにコードされるポリペプチドを高レベルで発現し、分泌する。本明細書で言う「分泌」とは、細胞が代謝産物を細胞外へ排出することを意味するが、細胞表層への提示も含む。好ましくは、ポリペプチドは、 1ml あたり、ナノグラム（ ng ）からマイクログラム（ μg ）のオーダーで分泌発現される。そのため、本発明に係る発現カセットを含む発現ベクター、および／または該発現ベクターを含む組換え微生物は、該ポリペプチドを送達するために用いることができる。例えばビフィドバクテリウム属細菌は、ヒトに投与された場合に粘膜および／または腫瘍組織もしくは細胞に局在化することが知られているため、本発明に係る発現カセットまたは発現ベクターを含む組換えビフィドバクテリウム属細菌は、それにコードされるポリペプチドの粘膜および／または腫瘍組織もしくは細胞への局所送達に有用である。

[0110] 従って、本発明は、本発明に係る組換え微生物を含む医薬組成物も提供する。本発明に係る医薬組成物は、溶液もしくは懸濁液、または粒状もしくは

粉状の乾燥物をそのまま、より一般的には、有効成分である組換え微生物と1または2以上の製剤用添加物とを含む組成物の形態である。

[0111] 本発明に係る医薬組成物は、例えば、共生細菌を宿主とした遺伝子治療に使用することができる。

[0112] 本発明に係る医薬組成物において、組換え微生物は、生きた状態または生きていない状態で使用することができる。

[0113] 該組換え微生物は、公知の後処理を行ってもよい。例えば、所望により、遠心分離などにより粗精製を行った後、適当な溶媒に溶解または懸濁させてもよい。また、所望により、凍結乾燥または噴霧乾燥を行い、粉状物または粒状物にしてもよい。

[0114] 本発明に係る医薬組成物は、所望の投与経路に応じて、適当な剤形とすることができる。例えば経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、溶液剤、カプセル剤または懸濁剤などを挙げることができる。非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤、坐剤、経粘膜吸収剤などを挙げることができる。このような組成物は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。

[0115] 本発明に係る医薬組成物は、例えば食品または飼料などに配合されてもよい。医薬組成物を配合する食品の形態および種類は特に限定されるものではない。例えば、固体状食品、ゼリー状食品、液状食品、カプセル状食品、乳製品（ヨーグルト等）など様々な形態の食品に配合することができる。

[0116] 本発明に係る医薬組成物は、各種疾患や障害の治療または予防を目的として、生体に投与することができる。本発明に係る医薬組成物の投与対象となる被験体は、ヒトに限定されず、脊椎動物、具体的には、哺乳動物、例えば霊長類（サル、チンパンジーなど）、家畜動物（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなど）、ペット用動物（イヌ、ネコなど）、実験動物（マウス、ラットなど）、さらには爬虫類および鳥類も含む。

[0117] 本発明に係る医薬組成物は、消化管の疾患、例えば小腸（十二指腸、空腸

、回腸）、および大腸（盲腸、結腸、直腸）などの消化管の疾患の治療または予防のために投与される。より好適には炎症性腸疾患、例えば、消化性潰瘍（十二指腸潰瘍）、胃腸管の粘膜炎、潰瘍性大腸炎、非感染性大腸炎、感染性大腸炎、クローン病、好ましくは潰瘍性大腸炎およびクローン病に適用される。

[0118] 本発明に係る医薬組成物は、腫瘍、より好適には各種固形癌の治療または予防のために投与される。固形癌としては、例えば大腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、膵島細胞癌、絨毛癌、結腸癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、精巣癌、前立腺癌、辜丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫、メラノーマ、および扁平上皮癌などが挙げられる。

[0119] 本発明に係る医薬組成物により治療または予防の対象となる疾患または障害は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよい。

[0120] また本発明に係る医薬組成物は、ワクチン、またはワクチンに伴う免疫誘導のためのアジュバントとして使用できる。

[0121] 本発明の医薬組成物の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与などが挙げられる。非経口投与としては、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内および患部局所、例えば腫瘍内などの投与経路を挙げることができる。

[0122] 本発明の医薬組成物の投与量および投与頻度は特に限定されず、治療すべき病態の種類、投与経路、患者の年齢および体重、症状、および疾患の重篤度などの種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。

[0123] 本発明の医薬組成物は、他の医薬、治療または予防法等と併用してもよい。このような他の医薬は、本発明の医薬組成物と共に一製剤を成していてもよいし、また、別々の製剤であって同時にまたは間隔を空けて投与してもよい。

[0124] 本発明に係る医薬組成物は、投与される動物自体は代謝することができないが、該医薬組成物に含まれる組換え微生物が利用できる栄養源を併用してもよい。例えば、ビフィドバクテリウム属細菌の増殖促進剤として、ラクツロース（Lactulose）またはラクトNビオースなどが挙げられる。

[0125] 本発明に係る医薬組成物に含まれる組換え微生物は、適当な抗生物質で殺すことができる。従って、本発明に係る医薬組成物を被験者に投与した後、一定の時間を置いて、抗生物質を被験者に投与することによって、被験者体内から組換え微生物を除去することができる。

[0126] またさらに本発明に係る発現カセット、発現ベクターおよび組換え微生物は、所望のポリペプチドを工業的に生産するために使用することも当然可能である。具体的には、本発明に係る発現ベクターを含む組換え微生物を培養し、得られる培養物からポリペプチドを採取することにより、ポリペプチドを製造することができる。培養後、ポリペプチドが菌体外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体を除去する。ポリペプチドが菌体内または菌体の細胞表面上に生産される場合には、菌体を破碎することによりタンパク質を抽出する。ポリペプチドは、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組み合わせることで用いることにより、単離精製することができる。

[0127] 以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこの実施例によって限定されるものではない。以下の実施例の結果から、異種ポリペプチドの分泌発現、特に生物活性を持ったポリペプチドの分泌発現は、発現カセットの構成要素、すなわちプロモーター領域およびシグナル配列、また場合によりシグナル配列後挿入配列のそれぞれに大きく影響を受けることがわかる。

実施例 1

[0128] マウスIL-10を分泌発現する組換えB. longum 105-A

（1）マウスIL-10分泌発現用ベクターの構築

ビフィドバクテリウムプラスミドレプリコンがpTB6系のシャトルベクター pKKT427（元京都薬科大学・加納康正教授より供与；図1）のマルチクローニングサイト（MCS）のHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、マウスIL-10 cDNA、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている（図3）。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、マウスIL-10 cDNAは、元のシグナル配列を除いたものである。ここで、活性に不要なシステインの好ましくない反応を除去した方がよいという文献（Ball C, et al. Eur Cytokine Netw. 2001. 12(1):187-93.）を参考に、149番目のシステインがチロシンに置換された変異体（mIL-10 C149Y）を使用した（配列番号15）。ターミネーター配列は、*B. longum* ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイトに一塩基変異を入れた配列番号12を利用した。比較対照として、特許文献1（特許第3642755号）のプロモーター領域である*B. longum* ATCC15707のhup遺伝子のプロモーター領域（配列番号13）を使用した。BamHIサイト前までの発現カセットの組み合わせを表1に示す。

[表1]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup (配列番号 13)	amyB (配列番号 7)	—
B	hup (配列番号 13)	BL1181 (配列番号 6)	—
C	hup (配列番号 13)	BL1181 (配列番号 6)	BL1181 (配列番号 10)
D	hup (配列番号 13)	BL1181 (配列番号 6)	LEISS (配列番号 11)
E	cbaH (配列番号 1)	BL1181 (配列番号 6)	—
F	cbaH (配列番号 1)	BL1181 (配列番号 6)	BL1181 (配列番号 10)
G	cbaH (配列番号 1)	BL1181 (配列番号 6)	LEISS (配列番号 11)
H	rplJ (配列番号 2)	BL1181 (配列番号 6)	—

[0129] なお、発現カセットの構築手順は次の通りである。末端にSpeIサイトとNotIサイトを付加したターミネーター配列を、PCR法で人工合成した。その合成DNA断片を、制限酵素SpeIとNotIで消化し、pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) のマルチクローニングサイトのSpeIとNotIの間に挿入した。末端にBamHIサイトとSpeIサイトを付加したmIL-10 C149Y cDNAを、マウスIL-10 cDNA (Open BioSystems, Huntsville, AL) を鋳型として、PCR法で変異を導入して合成した。そのPCR増幅DNA断片を、制限酵素BamHIとSpeIで消化し、ターミネーターが既に挿入されているpBluescript IIのマルチクローニングサイトのBamHIとSpeIの間に挿入した。そして、cDNAとターミネーターを含むBamHIからNotIまでの断片を、pBluescript II からpKKT427のマルチクローニングサイトのBamHIとNotIの間に移しかえた。プロモーター領域は、*B. longum*ゲノムからPCR法で増幅した。BL1181のシグナル配列およびシグナル配列後挿入配列も、*B. longum*ゲノムからPCR法で増幅した。amyBのシグナル配列は、PCR法で人工合成した。プロモーター領域からシグナル配列まで、あるいはシグ

ナル配列後挿入配列までは、それらPCR増幅DNA断片を鋳型として、末端にHindIIIサイトとBamHIサイトを付加して、PCR法で合成した。そのPCR増幅DNA断片を、制限酵素HindIIIとBamHIで消化し、cDNAとターミネーターが既に挿入されているpKKT427のマルチクローニングサイトのHindIIIとBamHIの間に挿入した。そして、マウスIL-10分泌発現用ベクターを完成させた。PCR酵素には、KOD Plus Ver. 2 (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。完成したベクターの発現カセットは、全て配列を確認した。

[0130] (2) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中マウスIL-10タンパク質の検出

表1のAからHの各発現カセットを含むpKKT427を、B. longum 105-A (元京都薬科大学・加納康正教授より供与) に形質転換した。なお、ビフィドバクテリウムの形質転換のためのエレクトロポレーションは、12 kV/cm、25 μ F、200 Ω の条件で行った。また、ビフィドバクテリウムを培養するための培地として、MRS寒天培地を使用した。これは、MRS液体培地 (Lactobacilli MR S Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI)、50 mMショ糖、3.4 mg/ml L-アスコルビン酸ナトリウム塩、および0.2 mg/ml L-システイン塩酸塩) に、Bacto Agar (Difco Laboratories) が1.5%の割合になるように混合したものである。スペクチノマイシンを添加する場合には、100 μ g/mlで添加した。

[0131] スペクチノマイシン含有MRS寒天培地に生えてきたコロニーを、各発現カセットにつき4クローンずつ拾った。各クローンをスペクチノマイシン含有MRS液体培地で前培養した後、MRS-HEPES培地 (MRS液体培地と0.5 M HEPES Buffer Solution (pH 7.2~7.5) を1:1で混合したもの) で希釈し、600nmの吸光度 (OD600nm) で0.1に希釈した。37°Cで6時間培養後、培養上清および菌体を回収した。菌体は、PBSで1回洗浄後、培養上清と等量のPBSで懸濁し、超音波破碎した。

[0132] 培養上清および菌体破碎上清の各10 μ lを還元条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、PVDF膜に転写し、ウェスタンブロッティング法でマウスIL-10を検出した。一次抗体には、抗マウスIL-10抗体 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ) を使用し、ECL plusウェスタンブロッティング検出

試薬 (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, England) を用いた。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換された*B. longum* 105-Aの培養上清を用いた。陽性対照には、市販の組換えmIL-10 C149Y (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いた。

[0133] 図4に、イメージアナライザーLAS-3000 (Fujifilm, 東京) で取得した、培養上清中IL-10のウェスタンブロット像を示す。ここで明瞭に示される通り、予想される分子量の位置にバンドが検出され、発現量の順番は、 $A < H < B < E < C < D < F < G$ であった。同一発現カセットの4クローン間での差はほとんどなかった (data not shown)。特にシグナル配列後挿入配列を使用したクローン (C、D、F、G) では、IL-10タンパク質は、菌体中よりも上清中に多く含まれた (data not shown)。

[0134] ウェスタンブロット像上の各バンドを、陽性対照の市販の組換えマウスIL-10のバンドを標準として、LAS-3000に付属のソフトウェア、Image Gauge Ver. 4.0 (Fujifilm, 東京) で解析すると、表2に示されるように、培養上清中IL-10濃度が算出された。従来の技術としては、*B. longum* NCC 2705のhup遺伝子のプロモーターと*B. bifidum* DSM 20215の β -ガラクトシダーゼのシグナル配列を使用したヒトIL-10の分泌発現が報告されているが、培養上清中に検出された濃度は22 pg/mlであった (非特許文献15: Reyes Escogido ML, et al. Biotechnol Lett. 2007. 29(8):1249-53.)。これに比べると、今回の系がはるかに優れていることは明らかである。また、プロモーターおよびシグナル配列の組み合わせと、シグナル配列後挿入配列の有無のそれぞれの効果が明確に示されている。

[表2]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号	上清中マウス IL-10 濃度 (ng/ml)
A	28
B	81
C	504
D	875
E	211
F	1302
G	1332
H	77

[0135] (3) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中マウスIL-10の生物活性測定

マウス肥満細胞株MC/9 (ATCC CRL-8306) を用いた増殖アッセイにより、培養上清中マウスIL-10の生物活性を測定した。はじめに、培養上清をNAPカラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過により、DMEM培地にバッファー交換した。MC/9細胞を 1×10^4 cells/well で96穴プレートにまいた。バッファー交換した溶液、あるいはバッファー交換した溶液を同バッファーで希釈して得られた希釈液を、MC/9細胞培養液の10%の容量で各ウェルに添加した。バッファー交換した溶液のMC/9細胞培養液中の最終濃度が、0~10% (v/v) の各濃度となるようにした。72時間培養して、CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) を用いてアッセイを行った。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換されたB. longum 105-Aの培養上清を用いた。陽性対照には、市販の組換えmIL-10 C149Y (R&D Systems) を用いた。

[0136] アッセイの結果は図5に示される通りであった。バッファー交換した溶液の10%添加だと、培養上清中成分が多く含まれるためと考えられるが、増殖促進効果の伸びが抑えられた。2%添加の値で計算してみると、市販mIL-10 C149Yタンパク質 (図5A) に対して、比活性はFとGがそれぞれ196%と42%であった (図5B)。また、10%添加の値で計算してみると、EはFに対して127%であった。したがって、シグナル配列後挿入配列を用いないEとシグナル配列後挿入配列にBL1181を用いたFは、市販のmIL-10 C149Yと生物活性が遜色な

かった。一方、シグナル配列後挿入配列にLEISSを用いたGIは、生物活性が低かった。

- [0137] 以上の結果から、本発明により、従来技術をはるかに上回るレベルでの、IL-10のビフィドバクテリウムでの分泌発現が可能になることが判る。IL-10タンパク質の分泌発現や他の異種タンパク質の菌体内発現が報告されている*B. longum*の*hup*のプロモーター領域に比べて、*cbaH*のプロモーター領域の方が優れていた。また、他の異種タンパク質の分泌発現への利用が報告されている*amyB*のシグナル配列に比べて、BL1181のシグナル配列の方が優れていた。さらに、シグナル配列後挿入配列の分泌促進効果は両者とも著しかった。しかしながら、IL-10の生物活性の点では、BL1181のシグナル配列後挿入配列を用いた方が優れていた。

実施例 2

- [0138] マウスIL-10を分泌発現する*B. breve* ATCC 15700

(1) 組換え*B. breve* ATCC 15700の培養上清中マウスIL-10タンパク質の検出

IL-10分泌発現用の実施例1の発現カセットが、ビフィドバクテリウム属の*B. longum*以外の菌種においても高い能力を持つかどうかを検証した。*B. breve* ATCC 15700を用いて、実施例1と同じように、表1の発現カセットFとHの発現をウェスタンブロッティングで観察した。結果は図6に示されている通り、*B. longum*におけるのと同程度の高い分泌発現が*B. breve*においても観察された。

- [0139] (2) 組換え*B. breve* ATCC 15700の培養上清中マウスIL-10タンパク質の検出

ウェスタンブロット像上の各バンドを、実施例1と同じように解析すると、表3に示されるように、培養上清中IL-10濃度が算出された。

[表3]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号	上清中マウス IL-10 濃度 (ng/ml)
F	693
H	37

- [0140] 以上の結果から、表 1 に示される発現カセット F と H は、*B. longum* に限定されず、ビフィドバクテリウム属の他の菌種である *B. breve* においても、IL-10 の高い分泌発現能力を持つことが示された。

実施例 3

- [0141] pTB4 系ベクターでマウス IL-10 を分泌発現する組換え *B. longum* 105-A

(1) マウス IL-10 分泌発現用 pTB4 系ベクターの構築

IL-10 分泌発現用の実施例 1 の発現カセットが、実施例 1 の pTB6 系プラスミド以外のビフィドバクテリウムプラスミド系ベクターにおいても高い能力を持つかどうかを検証した。ビフィドバクテリウムプラスミドレプリコンが pTB4 系の pBSM4 (元京都薬科大学・加納康正教授から入手した pBS423 (加納康正、外 6 名、日本乳酸菌学会 2008 年度大会・一般講演 6) にマルチクローニングサイト (MSC) を挿入したもの; 図 2 A) のマルチクローニングサイト (MSC) の HindIII と NotI の間に、実施例 1 の表 1 の中で上清中の生物活性が一番高かった発現カセットである発現カセット F を挿入した。

- [0142] (2) 組換え *B. longum* 105-A の培養上清中マウス IL-10 タンパク質の検出

発現カセット F での IL-10 の分泌発現について、実施例 1 と同じようにウェスタンブロッティングにより、pBSM4 を用いた形質転換体 4 クローンを pKKT427 を用いた形質転換体と比較した。結果は図 7 に明確に示されている通り、pTB4 系の pBSM4 を用いた場合も、pTB6 系の pKKT427 を用いた場合とほぼ同等の分泌発現量であった。

- [0143] 以上の結果から、本発明の発現カセットの成果は、pTB6 系の pKKT427 ベクターを使用した場合に限定されるものでないことがわかる。このことは TRAIL / Apo2-L の分泌発現の場合として、実施例 8 にも示される。

実施例 4

[0144] さまざまな長さのBL1181のシグナル配列後挿入配列を用いてマウスIL-10を分泌発現する組換えB. longum 105-A

実施例 1 の表 1 の発現カセット F 、すなわち cbaH のプロモーター領域、BL1181 のシグナル配列、BL1181 のシグナル配列後挿入配列の組み合わせにおいて、シグナル配列後挿入配列の長さを変えて、マウス IL-10 の分泌発現量を検討した。

[0145] BL1181 遺伝子産物のシグナル配列に続く、シグナル配列の直後から数えて、0、1、2、3、6、9、12、16 個の連続するアミノ酸が、BL1181 遺伝子産物のシグナル配列と BamHI サイトの間に挿入されるように、HindIII サイトから BamHI サイトまでを、BamHI 側のプライマーを変えることによって PCR 法で人工合成することにより、発現カセットを構築した。

[0146] 実施例 1 と同様に、mIL-10 C149Y を、pKKT427 を用いて B. longum 105-A で分泌発現させた。培養上清を、NAP カラムを用いたゲルろ過により、PBS/0.1 % BSA にバッファー交換し、ウェスタンブロッティング法で、分泌されたマウス IL-10 タンパク質を検出した。図 8 に、バッファー交換した溶液中 IL-10 のウェスタンブロット像を示す。ここで示される通り、シグナル配列後挿入配列がない場合と比べて、シグナル配列後挿入配列が 1、2、3、6、9、12、16 個の場合の効果が明確に示されている。

[0147] 実施例 1 と同様に、マウス肥満細胞株 MC/9 を用いた増殖アッセイにより、分泌されたマウス IL-10 の生物活性を測定した。バッファー交換した溶液のアッセイの結果は図 9 に示される通りであった。ここで示される通り、シグナル配列後挿入配列がない場合と比べて、シグナル配列後挿入配列が 1、2、3、6、9、12、16 個のアミノ酸の場合の効果が明確に示されている。

[0148] 以上の結果から、本発明により、BL1181 遺伝子産物のシグナル配列に続く配列を用いる場合、シグナル配列後挿入配列の長さが、1 から 16 アミノ酸のいずれの場合においても、分泌発現を著しく促進する効果を持つことが示された。

実施例 5

[0149] ヒトIL-2を分泌発現するB. longum 105-A

(1) ヒトIL-2分泌発現用ベクターの構築

pKKT427 (図1) のマルチクローニングサイトのHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、ヒトIL-2 cDNA、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている(図3)。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、ここで用いられたヒトIL-2 cDNAは、元のシグナル配列を除いたものであり、活性に不要システインを除いた変異体(hIL-2 C145S) (Wang A, et al. Science. 1984. 224(4656):1431-3.) である(配列番号16)。ターミネーター配列は、B. longum ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイトに一塩基変異を入れた配列番号12を利用した。BamHIサイト前までの発現カセットの組み合わせを表4に示す。

[表4]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup (B. longum) (配列番号13)	amyB (配列番号7)	—
B*	hup (B. breve) (配列番号3)	BL1181 (配列番号6)	—
C	cbaH (B. longum) (配列番号1)	BL1181 (配列番号6)	—
D*	hup (B. breve) (配列番号3)	BL1181 (配列番号6)	BL1181 (配列番号10)
E	cbaH (B. longum) (配列番号1)	BL1181 (配列番号6)	BL1181 (配列番号10)

* ここでBとDのプロモーター領域は、PCRによるクローニングのため、B. longumのhupプロモーター領域の5'端の26塩基からなる配列(配列番号14)が先頭(5')に付加されている。

[0150] (2) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトIL-2タンパク質の検出

実施例 1 と同様に、菌の培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った。一次抗体には、抗ヒトIL-2ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を使用した。陽性対照には、市販の組換えhIL-2 C145S (R&D Systems) を用いた。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換された *B. longum* 105-Aの培養上清を用いた。図 10 に、ウェスタンブロット像を示す。ここで明瞭に示される通り、予想される分子量の位置にバンドが検出され、発現量の順番は、A < C < B < E < Dであった。

[0151] ウェスタンブロット像上の各バンドを、実施例 1 と同じように解析すると、表 5 に示されるように、培養上清中IL-2濃度が算出された。ビフィドバクテリウムでのIL-2の発現は、知りうる限り、今回が初めての報告である。

[表5]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号	上清中ヒト IL-2 濃度 (ng/ml)
A	27
B	106
C	32
D	395
E	147

[0152] (3) 組換え *B. longum* 105-Aの培養上清中ヒトIL-2の生物活性測定

マウス細胞傷害性T細胞株CTLL-2 (ATCC TIB-214) を用いた増殖アッセイにより、培養上清中ヒトIL-2の生物活性を測定した。はじめに、培養上清をNAPカラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過により、PBS/0.1% BSAにバッファ交換した。CTLL-2細胞を 1×10^4 cells/well で96穴プレートにまいた。バッファ交換した溶液を、同バッファで希釈した。その希釈液を細胞培養液の10%の容量で各ウェルに添加し、CTLL-2細胞培養液中のIL-2の最終濃度が0.01~10ng/mlの各濃度になるようにした。24時間培養して、CellTiter-Glo (Promega) を用いてアッセイを行った。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換された *B. longum* 105-Aの培養上清を用いた。陽性対照には、市販の組換えhIL-2 C145S (R&D Systems) を用いた。

。

[0153] アッセイの結果は図 1 1 AおよびBに示される通りであった。市販のIL-2タンパク質に対する比活性は、表 6 の通りであり、市販のIL-2タンパク質と遜色がなかった。また、BL1181シグナル配列後挿入配列は活性低下をもたらさなかった。

[表6]

記号	上清中ヒトIL-2の市販IL-2に対する比活性(%)
A	34
B	39
C	57
D	45
E	54

[0154] 以上の結果から、IL-2の分泌発現においては、*B. breve*のhup遺伝子のプロモーター領域あるいは*B. longum*のcbaHのプロモーター領域、BL1181のシグナル配列およびBL1181のシグナル配列後挿入配列の組み合わせが特に優れていることが示された。

実施例 6

[0155] ヒトIL-4拮抗変異体を分泌発現する*B. longum* 105-A

(1) ヒトIL-4拮抗変異体分泌発現用ベクターの構築

pKKT427 (図 1) のマルチクローニングサイトのHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、ヒトIL-4拮抗変異体cDNA、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている (図 3)。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、ここで用いられたヒトIL-4拮抗変異体cDNAは、ヒトIL-4の元のシグナル配列を除いた、3箇所のアミノ酸が置換された変異体 (hIL4 T13D/R121D/Y124D) (米国特許第6,028,176号) である (配列番号 17)。ターミネーター配列は、*B. longum* ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイト

に一塩基変異を入れた配列番号 1 2 を利用した。BamHI サイト前までの発現カセットの組み合わせを表 7 に示す。

[表 7]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup (配列番号 13)	amyB (配列番号 7)	—
B	cbaH (配列番号 1)	BL1181 (配列番号 6)	—
C	rplJ (配列番号 2)	BL1181 (配列番号 6)	—

[0156] (2) 組換え *B. longum* 105-A の培養上清中ヒト IL-4 拮抗変異体タンパク質の検出

実施例 1 と同様に、菌の培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った。一次抗体には、抗ヒト IL-4 抗体 (R&D Systems) を使用した。陰性対照には、発現カセットが入っていない pKKT427 で形質転換された *B. longum* 105-A の培養上清を用いた (Ctrl)。陽性対照には、市販の組換え hIL-4 (rhIL4) (R&D Systems) を用いた。

[0157] 図 1 2 に、ウェスタンブロット像を示す。IL-4 拮抗変異体の発現は、IL-10 (実施例 1) や IL-2 (実施例 5) では有用な cbaH プロモーター領域と BL1181 シグナル配列の組み合わせ B では観察されなかった。一方、rplJ プロモーター領域と BL1181 シグナル配列の組み合わせ C では、予想された分子量に分泌発現が観察された。ウェスタンブロット像上の C の #1 のバンドを、実施例 1 と同じように解析すると、その上清中濃度は、49 ng/ml であった。ビフィドバクテリウムでの IL-4 拮抗変異体の発現は、知りうる限り、今回が初めての報告である。

[0158] 以上の結果から、IL-4 拮抗変異体の分泌発現においては、rplJ プロモーター領域と BL1181 シグナル配列の組み合わせが優れていることが示された。

実施例 7

[0159] ヒトTRAIL/Apo2-Lを分泌発現するB. longum 105-A

(1) ヒトTRAIL/Apo2-L分泌発現用ベクターの構築

pKKT427 (図1) のマルチクローニングサイトのHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、ヒトTRAIL/Apo2-L cDNA、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている (図3)。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、ここで用いられたヒトTRAIL/Apo2-L cDNAは、アミノ酸114-281の可溶化型 (Ashkenazi A, et al. J Clin Invest. 1999. 104(2):155-62.) である (配列番号18)。ターミネーター配列は、B. longum ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイトに一塩基変異を入れた配列番号12を利用した。BamHIサイト前までの発現カセットの組み合わせを表8に示す。

[表8]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup (B. longum) (配列番号13)	amyB (配列番号7)	—
B	hup (B. longum) (配列番号13)	BL1181 (配列番号6)	—
C	cbaH (B. longum) (配列番号1)	amyB (配列番号7)	—
D	cbaH (B. longum) (配列番号1)	BL1181 (配列番号6)	—
E*	hup (B. breve) (配列番号3)	amyB (配列番号7)	—

* ここでEのプロモーター領域は、PCRによるクローニングのため、B. longumのhupプロモーター領域の5'端の26塩基からなる配列 (配列番号14) が先頭 (5') に付加されている。

[0160] (2) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lタンパク質の検出

実施例 1 と同様に、菌の培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った。一次抗体には、ビオチン化抗ヒトTRAIL/Apo2-L抗体 (R&D Systems) を使用した。陽性対照には、市販の組換え可溶化型hTRAIL/Apo2-L (PeproTech) を用いた。図 1 3 に、表 8 の発現カセットAでの、各培養時間のウェスタンブロット像を示す。培養時間9時間では、幾分分解産物が見られている。培養時間6時間の培養上清中TRAIL/Apo2-Lの濃度は、 $1.08 \mu\text{g/ml}$ と計算された。以下、培養時間6時間の培養上清について解析した。

[0161] 図 1 4 に、表 8 の発現カセットAからDのウェスタンブロット像を示す。また、図 1 5 には、表 8 の発現カセットAとEのウェスタンブロット像を示す。図 1 4 および 1 5 において、Ctrlは、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換された*B. longum* 105-Aの培養上清を示す。表 9 は、発現カセットAでの培養上清中TRAIL/Apo2-Lの濃度を100として、各発現カセットでの培養上清中TRAIL/Apo2-L濃度の比を示す。

[表9]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号 上清中ヒト TRAIL/Apo2-L の相対比 (A = 100)

A	100
B	80
C	27-35
D	40-70
E	143-193

[0162] その他のプロモーター領域、シグナル配列およびシグナル配列後挿入配列の組み合わせも数多く試された。しかし、hupのプロモーター領域やcabHのプロモーター領域を上回る分泌発現量は得られなかった。また、例えば*Lactococcus lactis*のP1プロモーターと usp45のシグナル配列 (Steidler L, et al. Science. 2000. 289(5483):1352-5.) の組み合わせなど、異なる属で優良である発現カセットも、ビフィドバクテリウムでは、試みられた限り、上記AからEの組み合わせに遠く及ばなかった (data not shown)。

[0163] (3) 組換え*B. longum* 105-Aの培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lの生物活性測定

ヒト結腸直腸腺癌細胞株C0L0 205 (ATCC CCL-222) を用いたアポトーシスアッセイにより、培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lの生物活性を測定した。C0L0 205細胞を 1×10^4 cells/wellで96穴プレートにまき、一晚接着させた。その後、フィルターろ過した組換えB. longum 105-Aの培養上清、またはフィルターろ過した培養上清をMRS-HEPES培地で希釈した液を、C0L0 205細胞培養液の10%の容量で各ウェルに添加した。添加した組換えB. longum 105-Aの培養上清のC0L0 205細胞培養液中の最終濃度が、0~10% (v/v) の各濃度になるようにした。24時間培養して、CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) を用いてアッセイを行った。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換されたB. longum 105-Aの培養上清を用いた。陽性対照には、市販の組換え可溶化型hTRAIL/Apo2-L (PeproTech) を用いた。

[0164] 発現カセットAからDのアッセイの結果は図16に示されるとおりであった。amyBのシグナル配列で分泌されたTRAIL/Apo2-Lは生物活性を持っていたが、予想外に、BL1181のシグナル配列で分泌されたものは生物活性が失われていた。

[0165] 以上の結果から、TRAIL/Apo2-Lのビフィドバクテリウムでの分泌発現においては、cbaH遺伝子のプロモーター領域またはhup遺伝子のプロモーター領域、より好適にはB. breveのhup遺伝子のプロモーター領域と、amyBのシグナル配列の組み合わせが特に優れていることが示された。

実施例 8

[0166] pTB4系ベクターでヒトTRAIL/Apo2-Lを分泌発現するB. longum 105-A

(1) ヒトTRAIL/Apo2-L分泌発現用pTB4系ベクターの構築

TRAIL/Apo2-L分泌発現用の実施例7の発現カセットが、実施例7のpTB6系プラスミド以外のビフィドバクテリウムプラスミド系ベクターにおいても高い能力を持つかどうかを検証した。ビフィドバクテリウムプラスミドレプリコンがpTB4系のpBSM11 (元京都薬科大学・加納康正教授から入手したpBS423 (加納康正、外6名、日本乳酸菌学会2008年度大会・一般講演6) にマルチクローニングサイト (MSC) を挿入したもの; 図2B) のマルチクローニング

サイトのHindIIIとNotIの間に、実施例7の表8の中で上清中の生物活性が一番高かった発現カセットである発現カセットEを挿入した。

[0167] (2) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lタンパク質の検出

発現カセットEでのTRAIL/Apo2-Lの分泌発現について、実施例1と同じようにウェスタンブロッティングにより、pBSM11を用いた形質転換体とpKKT427を用いた形質転換体を比較した。結果は図17に明確に示されている通り、pTB4系のpBSM11を用いた場合も、pTB6系のpKKT427を用いた場合とほぼ同等の分泌発現量であった。

[0168] (3) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lの生物活性測定

ヒト結腸直腸腺癌細胞株C0L0 205 (ATCC CCL-222) を用いたアポトーシスアッセイにより、培養上清中ヒトTRAIL/Apo2-Lの生物活性を測定した。はじめに、培養上清をNAPカラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過により、RPMI 1640培地にバッファー交換した。C0L0 205細胞を 1×10^4 cells/wellで96穴プレートにまき、一晩接着させた。バッファー交換した溶液が各濃度になるよう同バッファーで希釈した。その希釈液をC0L0 205細胞培養液の10%の容量で各ウェルに添加した。24時間培養して、CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) を用いてアッセイを行った。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換されたB. longum 105-Aの培養上清を用いた。陽性対照には、市販の組換え可溶性型hTRAIL/Apo2-L (PeproTech) を用いた。pTB6系のpKKT427を用いた場合の細胞毒性 (Cytotoxicity) を100とした時のpTB4系のpBSM11を用いた場合の細胞毒性の比活性は97であり、培養上清中TRAIL/Apo2-Lの生物活性ほぼ同等であった。

[0169] 以上の結果から、本発明の発現カセットの成果は、pTB6系のpKKT427ベクターを使用した場合に限定されるものでないことがわかる。このことはIL-10の分泌発現の場合として、実施例3にも示される。

実施例 9

[0170] ヒトIFN- β を分泌発現するB. longum 105-A

(1) ヒトIFN- β 分泌発現用ベクターの構築

pKKT427 (図1) のマルチクローニングサイトのHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、ヒトIFN- β cDNA、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている (図3)。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、ここで用いられたヒトIFN- β cDNAは、元のシグナル配列を除いたものである (配列番号19)。ターミネーター配列は、*B. longum* ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイトに一塩基変異を入れた配列番号12を利用した。BamHIサイト前までの発現カセットの組み合わせを表10に示す。

[表10]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup	BL1181	—
	(配列番号13)	(配列番号6)	
B	hup	BL1181	BL1181
	(配列番号13)	(配列番号6)	(配列番号10)
C	cbaH	BL1181	BL1181
	(配列番号1)	(配列番号6)	(配列番号10)
D	hup	BL1181	LEISS
	(配列番号13)	(配列番号6)	(配列番号11)
E	cbaH	BL1181	LEISS
	(配列番号1)	(配列番号6)	(配列番号11)

[0171] (2) 組換え*B. longum* 105-Aの培養上清中ヒトIFN- β タンパク質の検出

実施例1と同様に、菌の培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った。但しここでは、8時間培養後の培養上清および菌体を回収した。一次抗体には、ビオチン化抗ヒトIFN- β ヤギポリクローナルIgG (R&D Systems) を使用した。陽性対照には、市販の組換えhIFN- β 1a (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ) を用いた。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換された*B. longum* 105-Aの培養上清を用いた。図18

に、ウェスタンブロット像を示す。シグナル配列後挿入配列を用いた場合（発現カセットB～E）のみ、主に予想された分子量に、分泌発現が観察された。

[0172] 予想された分子量のバンドを実施例1と同じように解析すると、表11に示されるように培養上清中IFN- β 濃度が算出された。ビフィドバクテリウムでのI型IFNの発現は、知りうる限り、今回が初めての報告である。

[表11]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号	上清中ヒトIFN- β 濃度 (ng/ml)
A	—
B #1	390
B #2	361
C #1	88
C #2	63
D #1	154
D #2	190
E #1	26
E #2	10

[0173] (3) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトIFN- β の生物活性測定

iLite alphabeta Kit (Neutekbio, Galway, Ireland) を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、BとDの培養上清中ヒトIFN- β の生物活性を測定した。はじめに、培養上清をNAPカラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過により、DMEM培地にバッファー交換した。アッセイの結果は図19AおよびBに示されるとおりであった。計算された培養上清中のインターフェロン活性は、Bの#1が 5.6×10^5 IU/ml、#2が 2.4×10^5 IU/ml、Dの#1が 1.9×10^4 IU/ml、#2が 1.3×10^4 IU/mlであった。この結果から、インターフェロンの比活性としては、LEISSよりBL1181のシグナル配列後挿入配列を用いた方が優れていることが判る。

[0174] 以上の結果から、シグナル配列後挿入配列を付加することによって、付加しない場合には分泌発現が検出できなかったIFN- β が高いレベルで分泌発現

できるようになる、シグナル配列後挿入配列の劇的な効果が明らかである。そして、IFNの生物活性に関しては、LEISSよりBL1181のシグナル配列後挿入配列の方が優れていた。

実施例 10

[0175] ヒトR-spondin 2を分泌発現するB. longum 105-A

(1) ヒトR-spondin 2分泌発現用ベクターの構築

pKKT427 (図1) のマルチクローニングサイトのHindIIIとNotIの間に、発現カセットを挿入した。発現カセットは、HindIII、プロモーター領域、シグナル配列、シグナル配列後挿入配列、BamHIサイト、ヒトR-spondin 2 dC cDNA、タグ配列、終止コドン、SpeIサイト、ターミネーター、そしてNotIサイトの順に連結されている (図3)。したがって、発現されるタンパク質にはBamHIのGGATCCがコードするアミノ酸GSが挿入されている。また、ここで用いられたヒトR-spondin 2 cDNAは、ヒトR-spondin 2のシグナル配列およびC末端の電荷に富むアミノ酸が多い領域をコードする配列を除いたdC型 (R-spondin 2 dC) である (配列番号20 ; W02007/013666号)。タグ配列は、V5タグとポリヒスチジンタグを含む人工配列をコードするDNAである (配列番号21)。ターミネーター配列は、B. longum ATCC 15707のhup遺伝子のターミネーターをもとに、該配列が元来持っているSpeIサイトに一塩基変異を入れた配列番号12を利用した。BamHIサイト前までの発現カセットの組み合わせを表12に示す。

[表12]

発現カセット			
記号	プロモーター領域	シグナル配列	シグナル配列後挿入配列
A	hup (配列番号13)	amyB (配列番号7)	—
B	cbaH (配列番号1)	BL1181 (配列番号6)	LEISS (配列番号11)
C	cbaH (配列番号1)	BL1181 (配列番号6)	BL1181 (配列番号10)

[0176] (2) 組換えB. longum 105-Aの培養上清中ヒトR-spondin 2タンパク質の検出

実施例1と同様に、菌の培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った。但しここでは、8時間培養後の培養上清および菌体を回収した。検出用抗体には、HRP標識抗ポリヒスチジンマウスモノクローナル抗体 (R&D Systems) を使用した。陽性対照には、精製組換えR-spondin 2 dCタンパク質 (W02007/013666号) を用いた。陰性対照 (Ctrl) には、発現カセットが入っていないpKKT427で形質転換されたB. longum 105-Aの培養上清を用いた。図20に、ウェスタンブロット像を示す。菌体内の残存がかなりあったものの、予想された分子量に、分泌発現が観察された。

[0177] 予想された分子量のバンドを実施例1と同じように解析すると、表13に示されるように培養上清中R-spondin 2濃度が算出された。この結果から、シグナル配列後挿入配列LEISSは、分泌させるタンパク質量としては、BL1181より優れていることが判る。ビフィドバクテリウムでのR-spondinsの発現は、知りうる限り、今回が初めての報告である。

[表13]

各発現カセットの培養上清中発現レベル

記号	上清中ヒト R-spondin 2 dC 濃度 (ng/ml)
A	-
B #1	169
B #2	152
C #1	108
C #2	97

[0178] 以上の結果から、本発明によってR-spondin 2がビフィドバクテリウムで分泌発現しうることが判った。

実施例 11

[0179] ヒトTRAIL/Apo2-L発現ビフィドバクテリウムのin vivo腫瘍成長抑制効果 (1)
2)

7週齢の雌のBALB/cヌードマウス (Charles River Laboratories Japan, Yo

kohama, Japan) に、 5×10^6 の COLO 205 細胞 (ATCC CCL-222) を皮下移植し、よく確立された腫瘍を得た。その腫瘍組織を採取し、切断することによって、約 3 mm^3 角の COLO 205 腫瘍片を得た。その腫瘍片を 7 週齢の雌の BALB/cヌードマウスに皮下移植し、担癌マウスを得た。マウスは、腫瘍サイズが平均 243 mm^3 に達した時 (day 0) に群分けされた ($n = 8$)。腫瘍体積は、Day 0 で 100% に正規化された。Day 1、4、8 および 11 に、注射器を用いて約 $2 \times 10^8 \text{ cfu}$ の菌 $50 \mu\text{l}$ を腫瘍内に投与した。なお、別の 2 群には、同容量のビヒクル (PBS) のみ、または発現カセットが入っていない空の pKKT427 で形質転換された組換え *B. longum* 105-A を腫瘍内に投与した。使用したビフィドバクテリウム菌は、遠心および PBS への再懸濁によって調製した。全てのマウスには、体内のビフィドバクテリウムの栄養補助のために、週 3 回 1 ml の 20% ラクトロース (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を腹腔に投与した。

[0180] 図 2 1 は、発現カセットが入っていない空の pKKT427 で形質転換された陰性対照の組換え *B. longum* 105-A (Ctrl) と比較して、hup プロモーター領域と amyB シグナル配列で可溶化型 ヒト TRAIL/Apo2-L を分泌発現する *B. longum* 105-A (表 8 の A) (TRAIL) が、確立した腫瘍の成長を明らかに抑制したことを示す。データは、平均 + SEM で表示されている。

[0181] 図 2 2 は、同じ実験の体重変化を示す。全群で餌の交換によると考えられる体重の増減が見られるが、TRAIL/Apo2-L 発現菌投与群で体重の減少が小さかった。

実施例 12

[0182] ヒト TRAIL/Apo2-L 発現ビフィドバクテリウムの in vivo 腫瘍成長抑制効果 (2)
L

7 週齢の雌の BALB/cヌードマウス (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan) に、 5×10^6 の COLO 205 細胞を皮下移植し、よく確立された腫瘍を得た。その腫瘍組織を採取し、切断することによって、約 3 mm^3 角の COLO 205 腫瘍片を得た。その腫瘍片を 7 週齢の雌の BALB/cヌードマウスに皮下移植し、担癌マウスを得た。マウスは、腫瘍サイズが平均 444 mm^3 に達した時 (day

0) に群分けされた。腫瘍体積は、Day 0で100%に正規化された。Day 0に注射器を用いて約 2×10^8 cfuの菌50 μ lを腫瘍内に投与した。使用したビフィドバクテリウム菌は、遠心およびPBSへの再懸濁によって調製した。マウスには、体内のビフィドバクテリウムの栄養補助のために、週3回1 mlの20%ラクツロース (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を腹腔に投与した。

[0183] 図23は、陰性対照の組換え*B. longum* 105-A (Ctrl) (n = 4)と比較して、*cbaH*プロモーター領域と*amyB*のシグナル配列で可溶化型ヒトTRAIL/Apo2-Lを分泌発現する*B. longum* 105-A (表8のC) (TRAIL) (n = 5)が、確立した腫瘍の成長をわずか単回の投与で抑制したことを示す。データは、平均 + SEMで表示されている。

[0184] 実施例11および12の結果から、可溶化型TRAILを発現するビフィドバクテリウムが、腫瘍治療に有用である可能性が示された。

[0185] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、その全文を参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0186] 本発明により、ビフィドバクテリウムにおいてポリペプチドを効率的に分泌発現させ得る発現カセットが提供される。かかる発現カセットは、ポリペプチドを分泌発現する組換え微生物の作製に有用である。またかかる組換え微生物は、ヒトを含む動物の疾患の治療および／または予防をするための医薬品または医薬品を構成する成分として利用され得る。そして疾患に対する新たな治療法および／または予防法を提供し得る。また、上記発現カセットおよび組換え微生物は、工業的なポリペプチドの生産にも利用され得る。

配列表フリーテキスト

[0187] 配列番号8：合成ペプチド（シグナル配列後挿入配列）

配列番号9：合成ペプチド（シグナル配列後挿入配列）

配列番号10：合成DNA（シグナル配列後挿入配列）

配列番号11：合成DNA（シグナル配列後挿入配列）

配列番号12：合成ターミネーター配列

配列番号 14 : 合成DNA

配列番号 15 : 合成DNA (マウスインターロイキン10成熟ペプチドC149Y変異体cDNA)

配列番号 16 : 合成DNA (ヒトインターロイキン2成熟ペプチドC145S変異体cDNA)

配列番号 17 : 合成DNA (ヒトインターロイキン4成熟ペプチドT13D/R121D/Y124D変異体cDNA)

配列番号 20 : 合成DNA (ヒトdC型R-spondin2 成熟ペプチドcDNA)

配列番号 21 : 合成DNA (タグ配列)

請求の範囲

[請求項1] 以下の (i)、(ii) および (iii) を含むことを特徴とする発現カセット。

(i) ビフィドバクテリウム属細菌由来のcbaH遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来のrplJ遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム属細菌由来のhup遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーター、

(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列およびビフィドバクテリウム属細菌由来のamyB遺伝子産物のシグナル配列からなる群より選択されるシグナル配列をコードするDNA、

(iii) ポリペプチドをコードするDNA、または該DNAを挿入するためのクローニング部位

[請求項2] (iii) にポリペプチドをコードするDNAが挿入された、請求項1記載の発現カセット。

[請求項3] (ii) と (iii) との間に、ビフィドバクテリウム属細菌由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAが連結されている、請求項1または2記載の発現カセット。

[請求項4] (ii) と (iii) との間に、配列番号9に示されるアミノ酸配列をコードするDNAが連結されている、請求項1または2記載の発現カセット。

[請求項5] 以下の (i)、(ii)、(iii) および (iv) を含むことを特徴とする発現カセット。

(i) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子のプロモーター、

(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNA、

(iii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配

列に続く 1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNA、

(iv) ポリペプチドをコードするDNA、または該DNAを挿入するためのクローニング部位

[請求項6] (iv) にポリペプチドをコードするDNAが挿入された、請求項 5 記載の発現カセット。

[請求項7] プロモーターが、ビフィドバクテリウム属細菌由来のcbaH遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来のrplJ遺伝子のプロモーターおよびビフィドバクテリウム属細菌由来のhup遺伝子のプロモーターからなる群より選択される、請求項 5 または 6 記載の発現カセット。

[請求項8] ポリペプチドが、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-2 (IL-2)、TRAIL/Apo2-L、I型インターフェロン、インターロイキン-4 (IL-4) 拮抗変異体、およびR-spondinsからなる群より選択される、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の発現カセット。

[請求項9] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、IL-10をコードするDNAとを含有する、請求項 8 記載の発現カセット。

[請求項10] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く 1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、IL-10をコードするDNAとを含有する、請求項 8 記載の発現カセット。

[請求項11] ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグ

ナル配列をコードするDNAと、IL-2をコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項12] ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAと、IL-2をコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項13] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のrplJ遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、IL-4拮抗変異体をコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項14] ビフィドバクテリウム・ブレーベ由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス由来のamyB遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、TRAIL/Apo2-LをコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項15] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、I型インターフェロンをコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項16] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のhup遺伝子プロモーターまたはビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ

酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、I型インターフェロンをコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項17] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、R-spondinsをコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項18] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のcbaH遺伝子プロモーターと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNAと、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来のBL1181遺伝子産物のシグナル配列に続く1～20個の連続するアミノ酸をコードするDNAまたはLEISSTCDAをコードするDNAと、R-spondinsをコードするDNAとを含有する、請求項8記載の発現カセット。

[請求項19] ビフィドバクテリウム属細菌においてポリペプチドを分泌発現させるために使用される、請求項1～18のいずれか1項に記載の発現カセット。

[請求項20] 請求項2～4および6～19のいずれか1項に記載の発現カセットを含有する発現ベクター。

[請求項21] 請求項2～4および6～19のいずれか1項に記載の発現カセットまたは請求項20記載の発現ベクターを含む組換え微生物。

[請求項22] 微生物がビフィドバクテリウム属細菌である、請求項21記載の微生物。

[請求項23] 請求項21または22記載の微生物を含む医薬組成物。

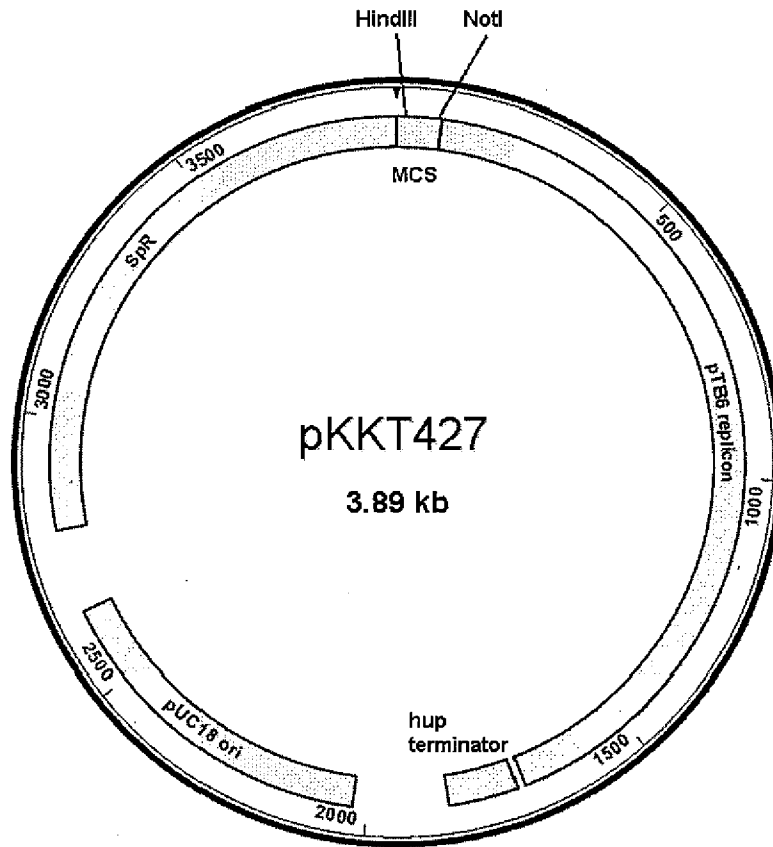
[請求項24] 疾患または障害を治療するための、請求項23記載の医薬組成物。

[請求項25] 疾患または障害が炎症性腸疾患または腫瘍疾患である、請求項24記載の医薬組成物。

[請求項26] 請求項2～4および6～19のいずれか1項に記載の発現カセッ

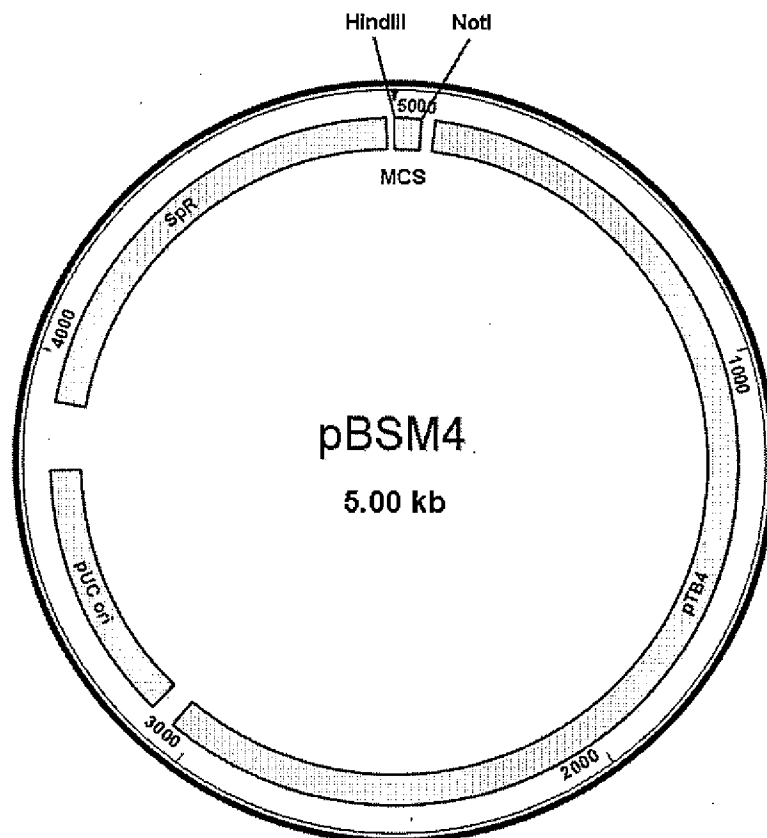
トまたは請求項 20 記載の発現ベクターを含む組換え微生物を培養し、得られる培養物からポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。

[図1]

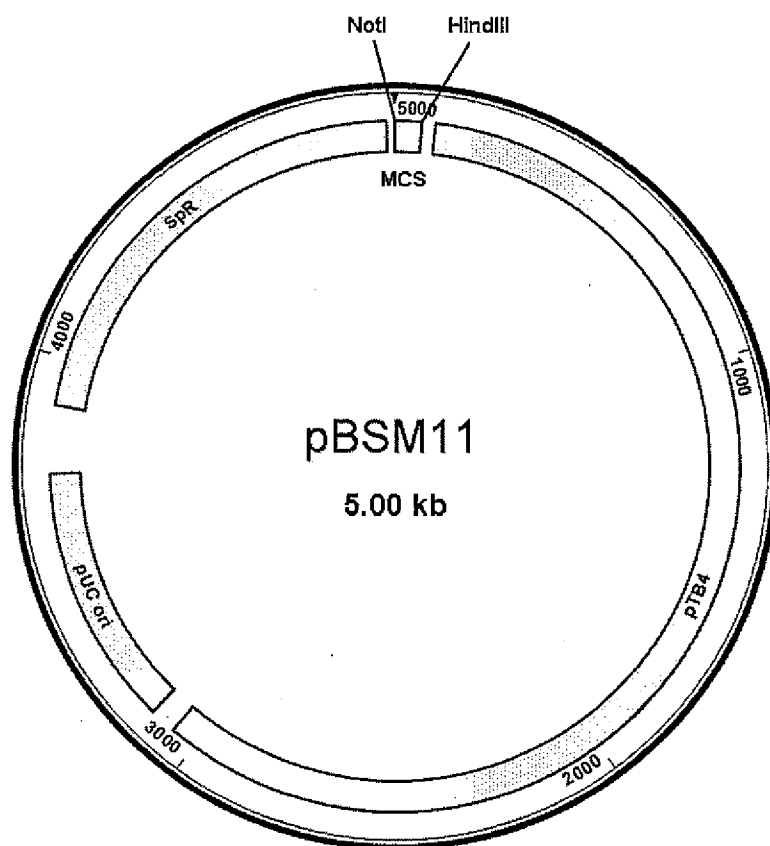


[図2]

A



B



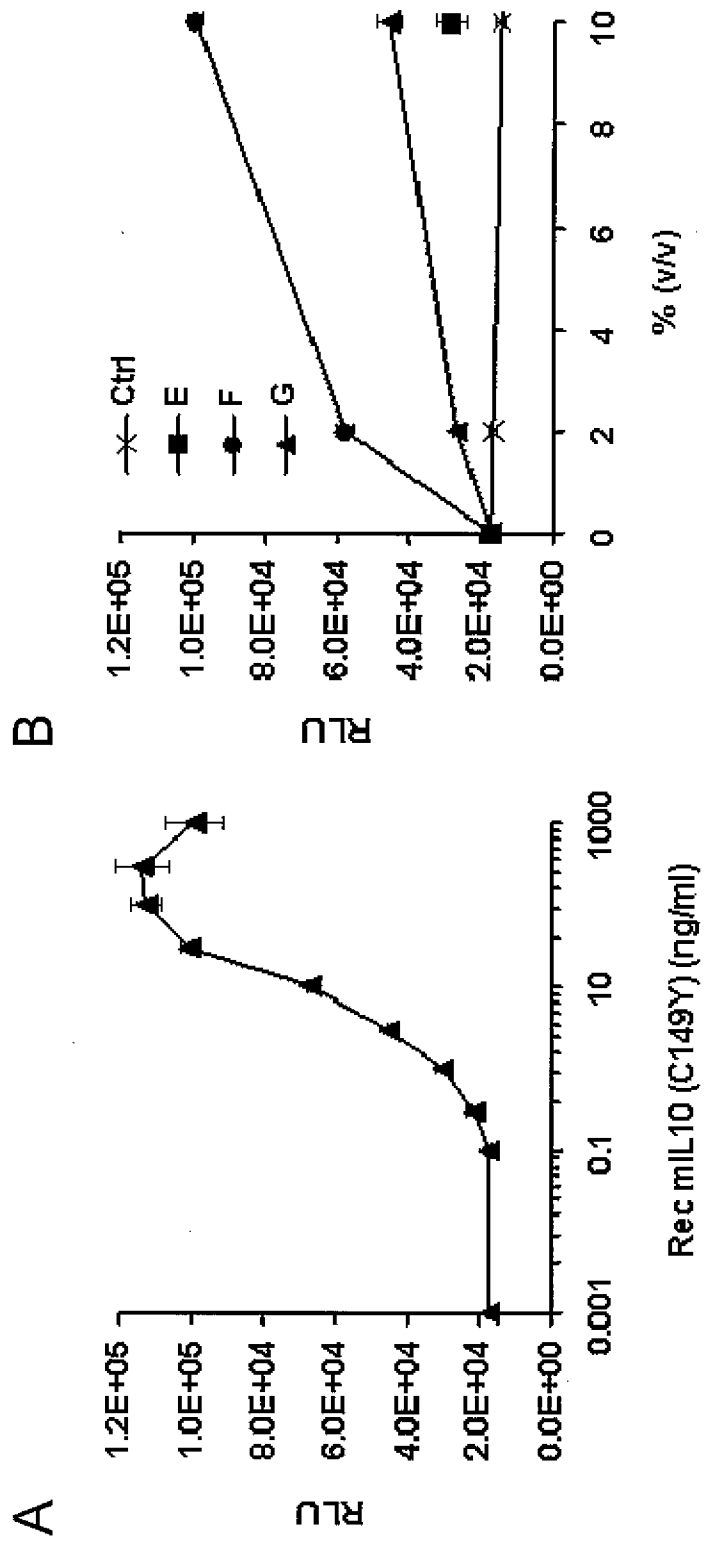
[図3]



シグナル配列後
挿入配列

hup				cbaH			rplJ
amyB	BL1181						
—	— BL1181 LEISS			— BL1181 LEISS			—
<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>H</u>

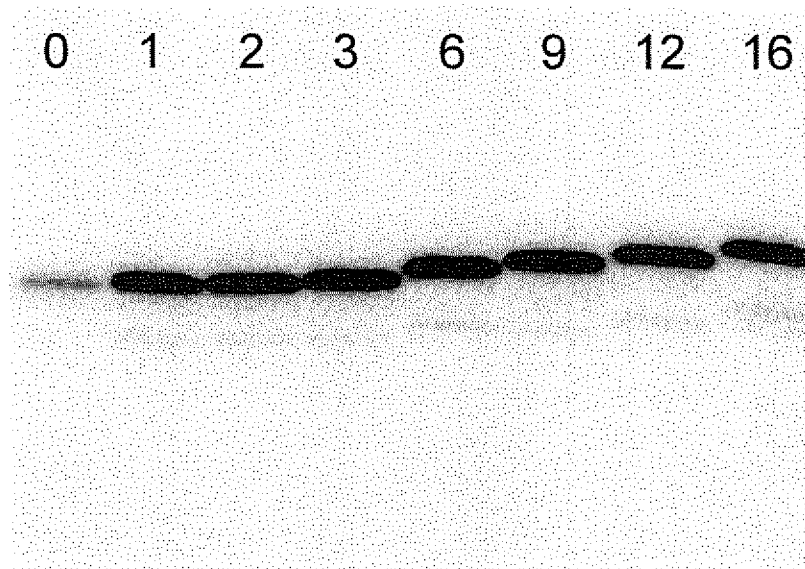
[図5]



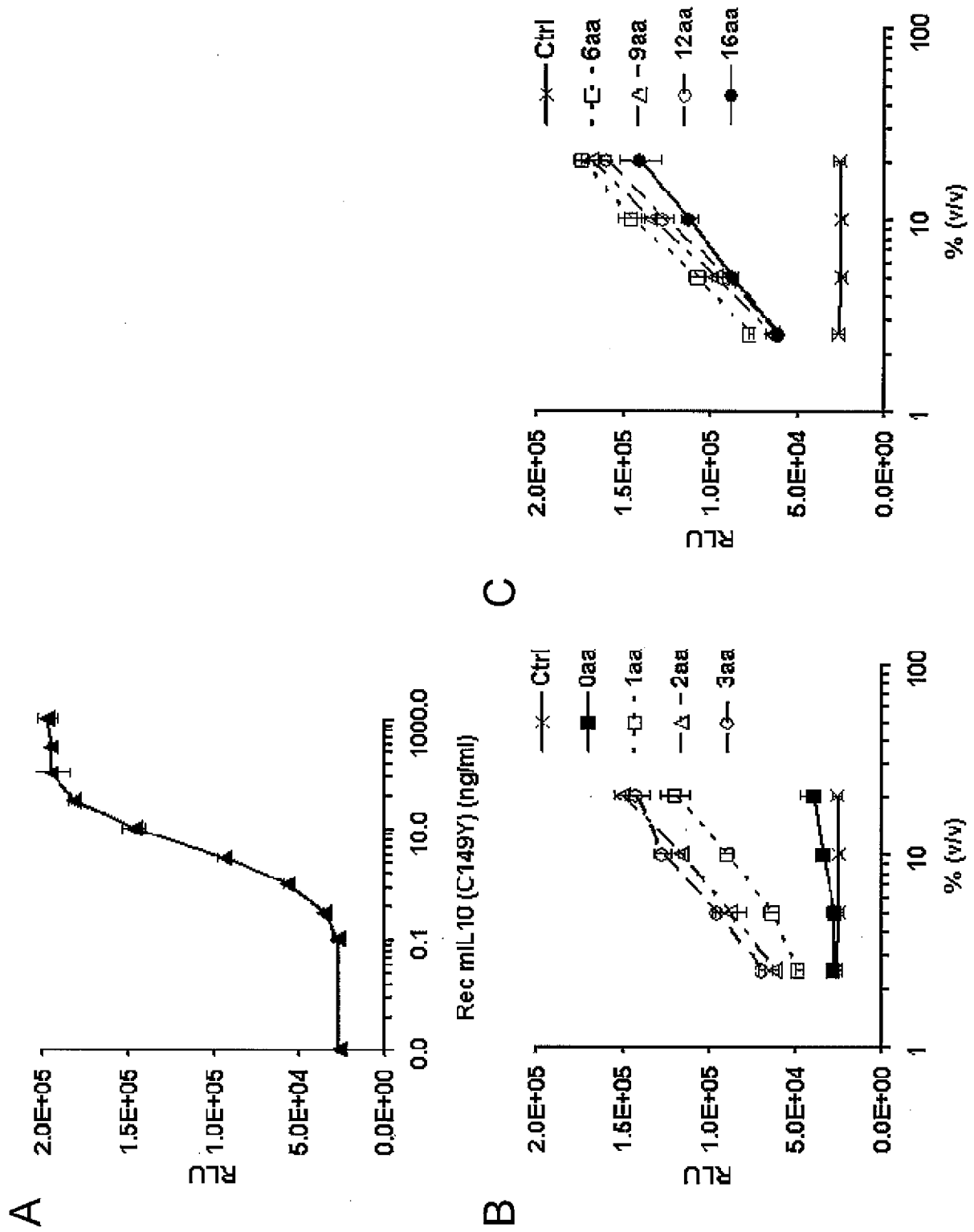
Ctrl	pKKT427	pBSM4			
		#1	#2	#3	#4
					

[図8]

シグナル配列後
挿入配列の長さ



[図9]

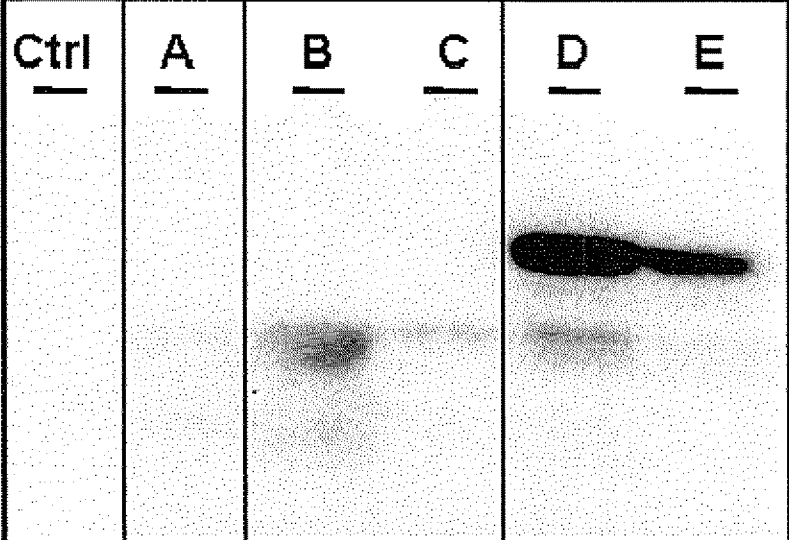


[図10]

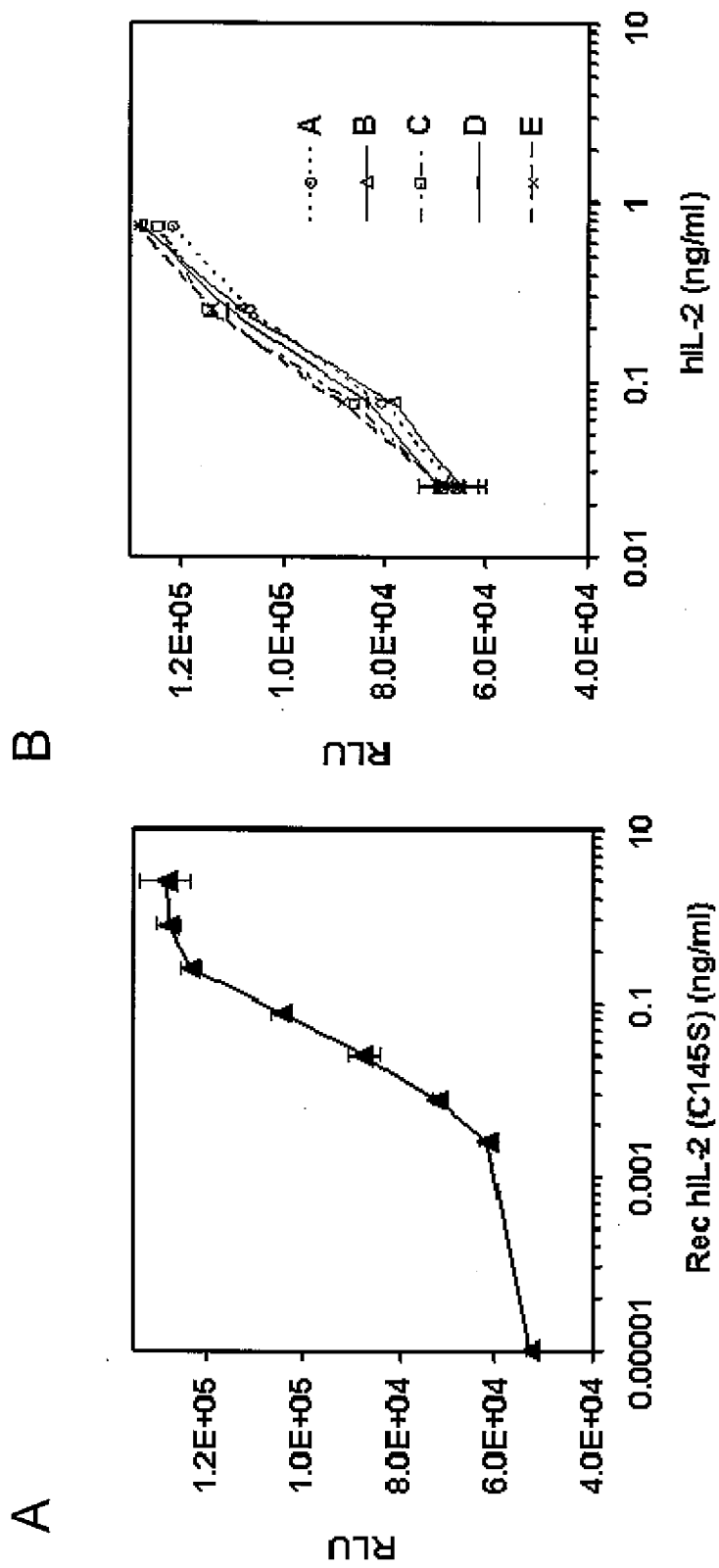
プロモーター領域

シグナル配列

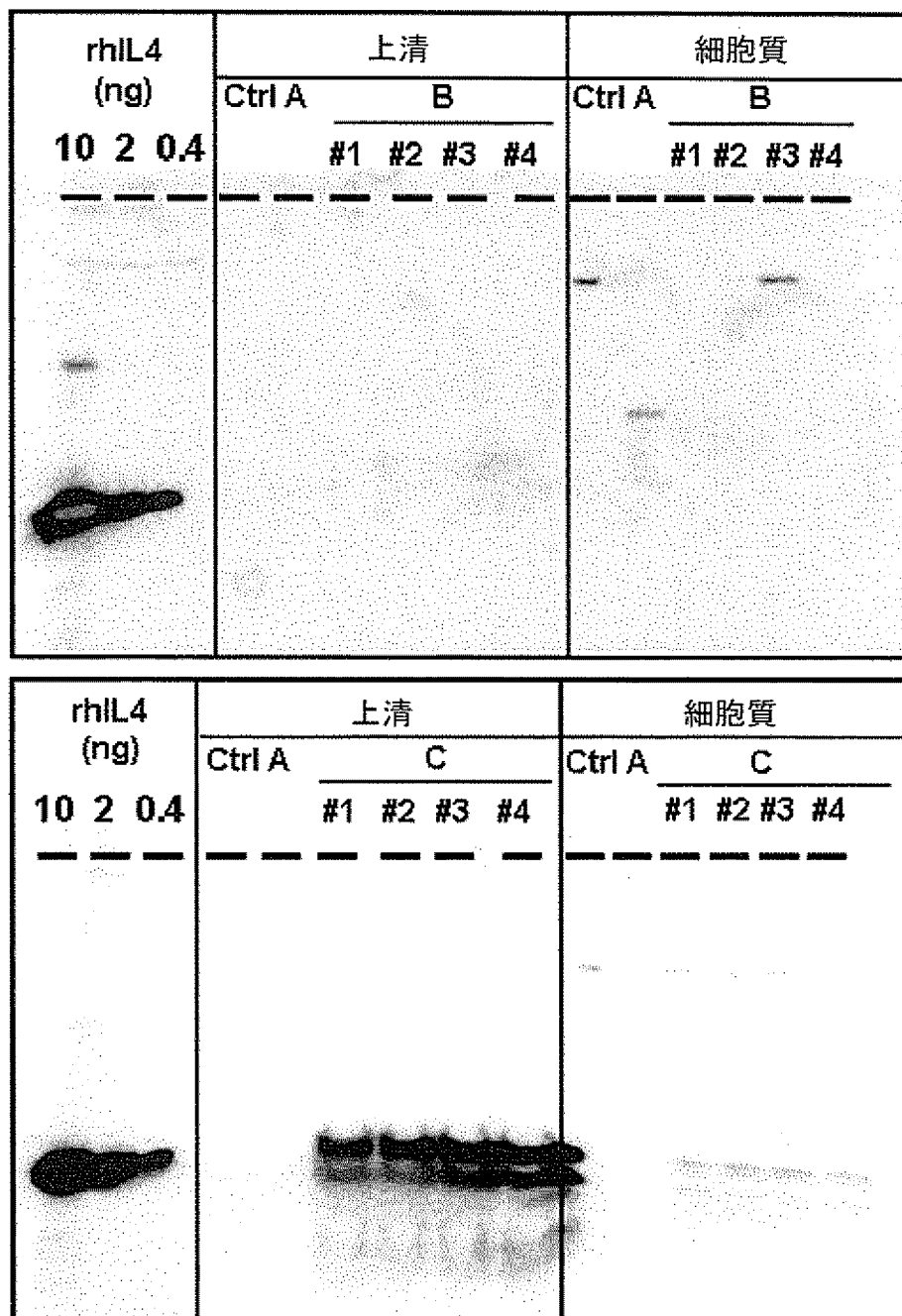
シグナル配列後
挿入配列

—	l-hup	b-hup	cbaH	b-hup	cbaH
—	amyB	BL1181			
—	—	—		BL1181	
<u>Ctrl</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>
					

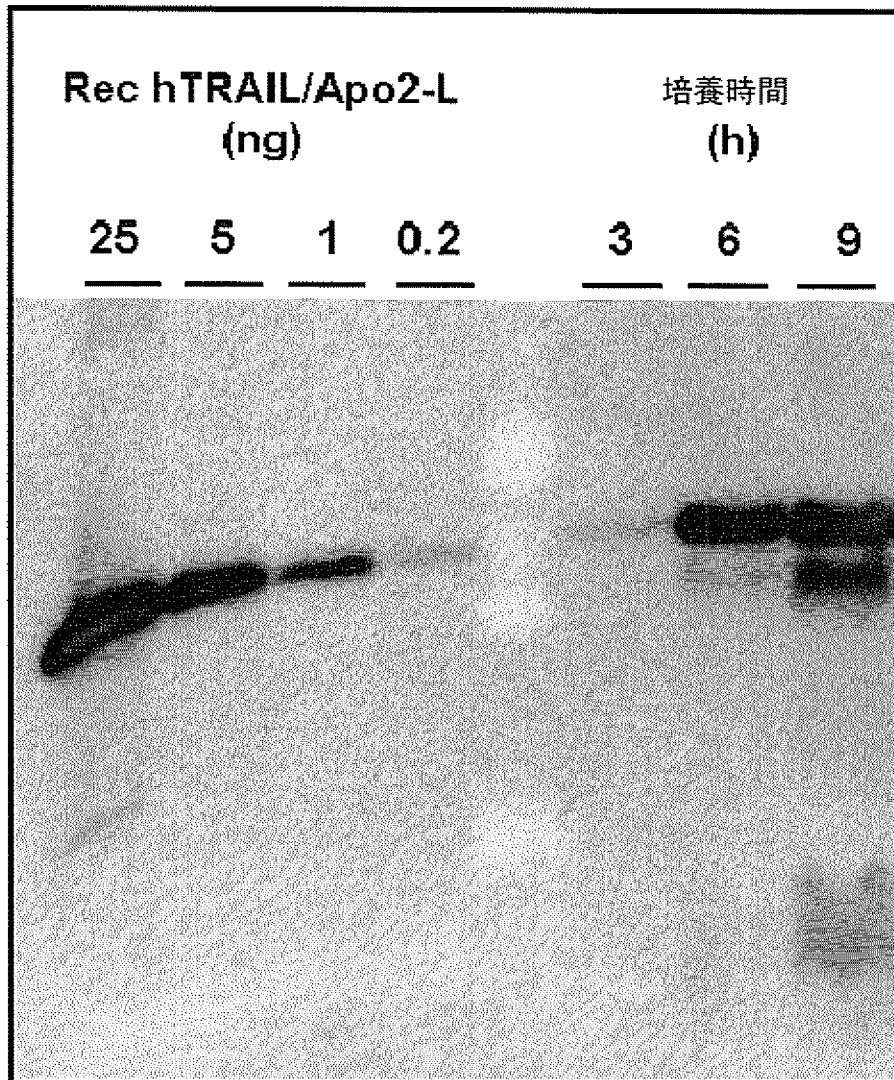
[図11]



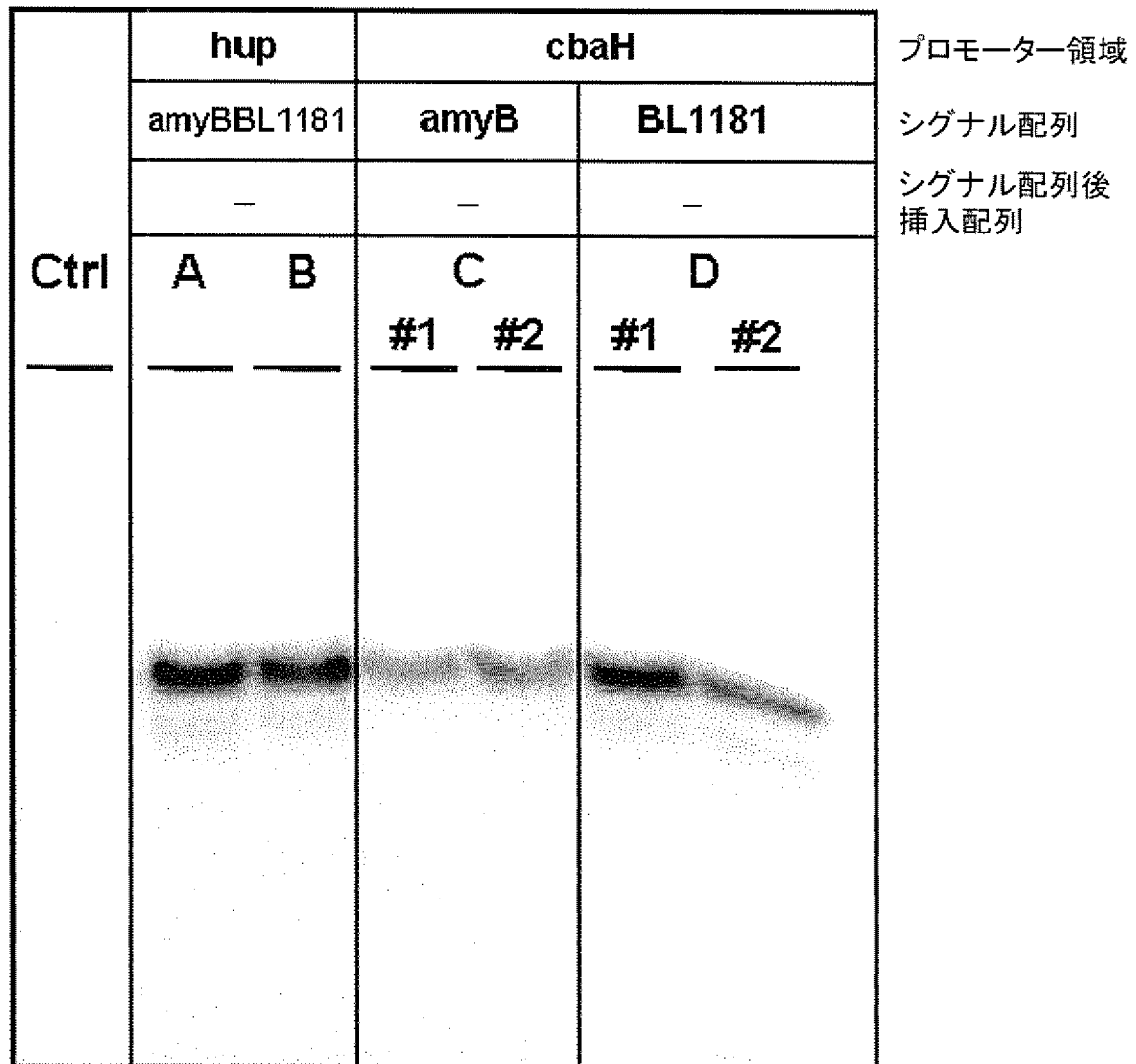
[図12]



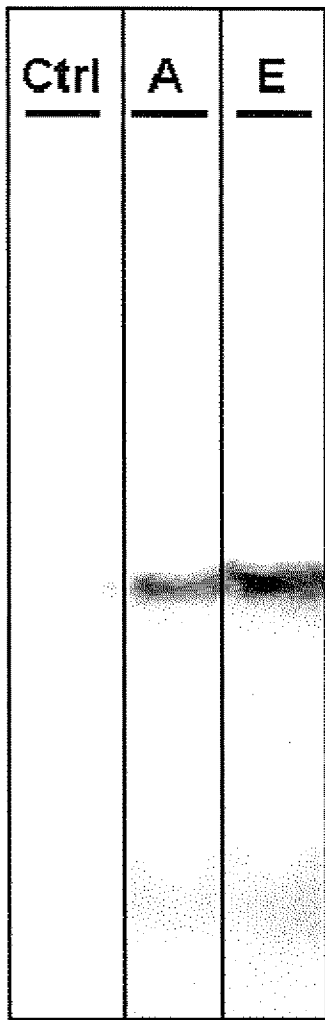
[図13]



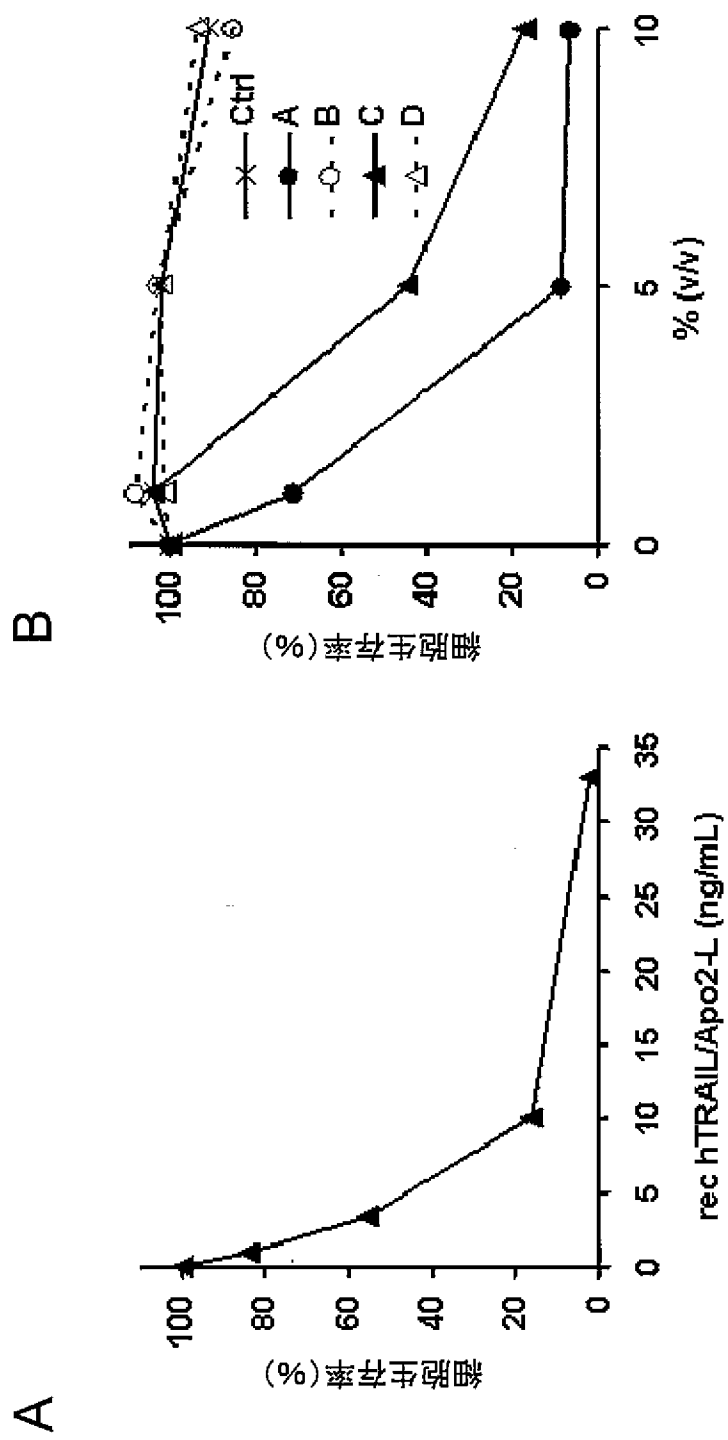
[図14]



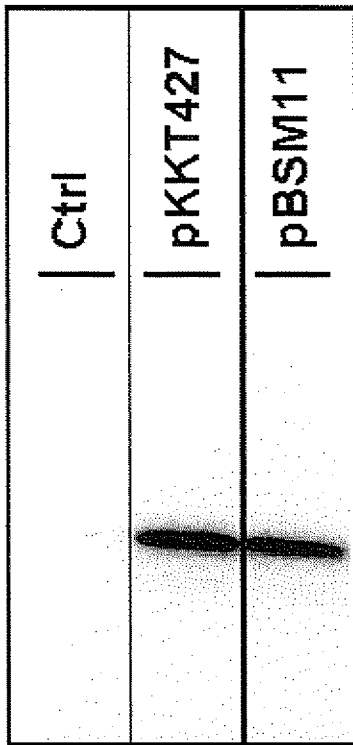
[図15]



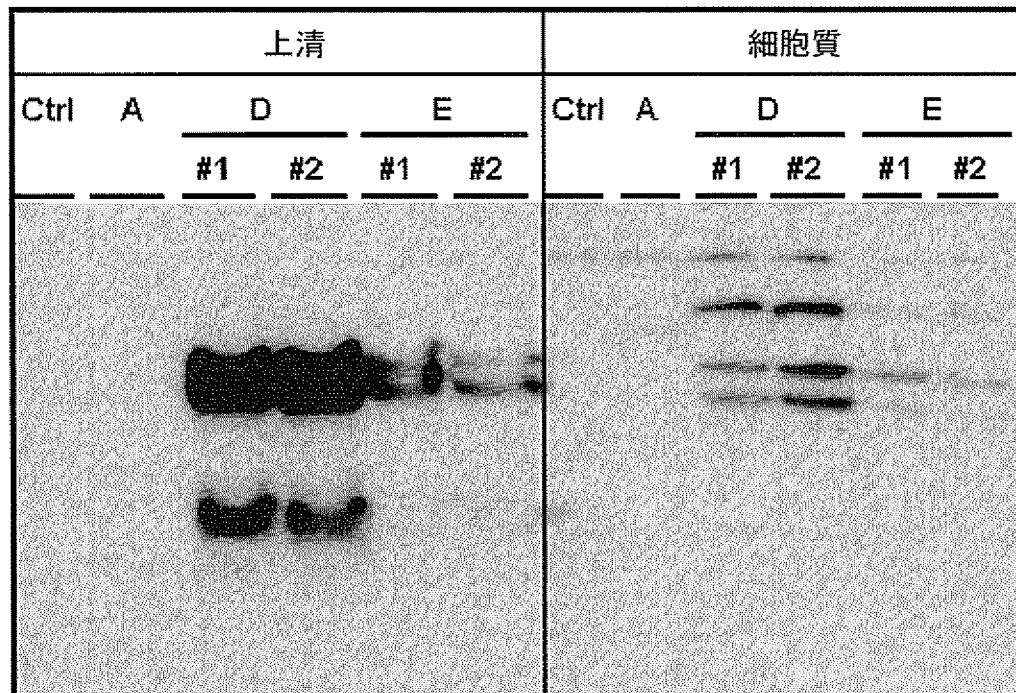
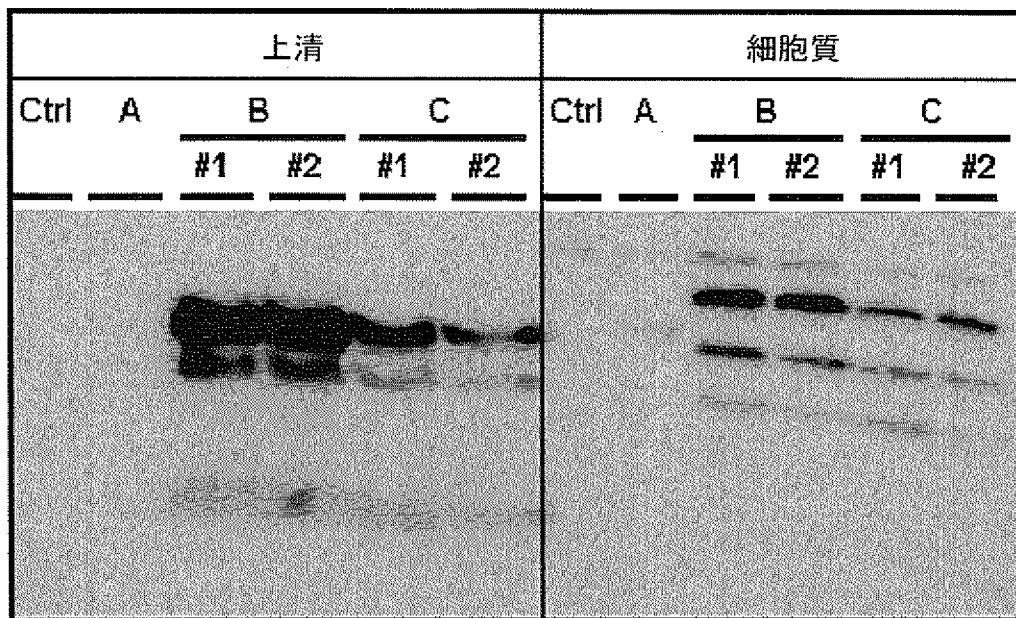
[図16]



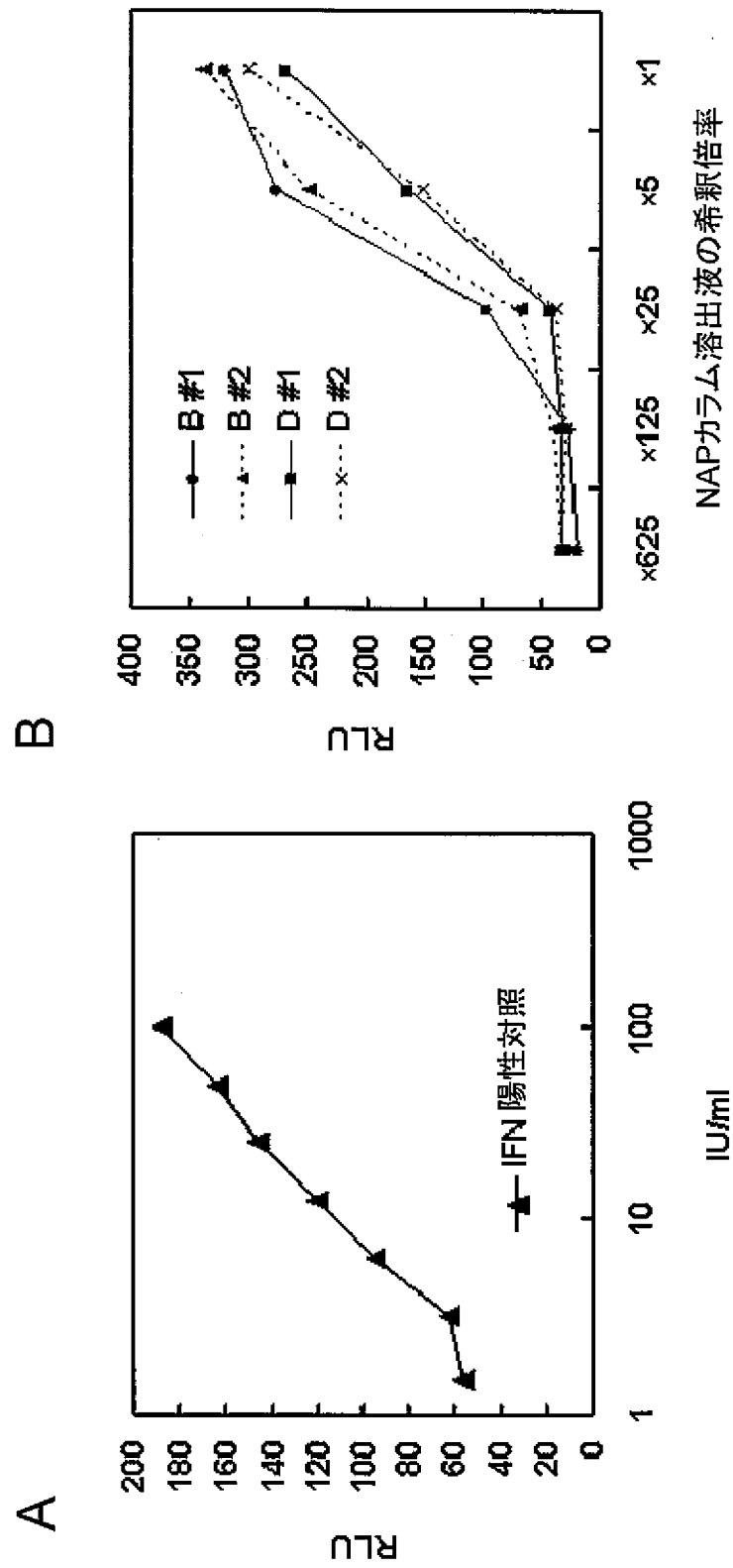
[図17]



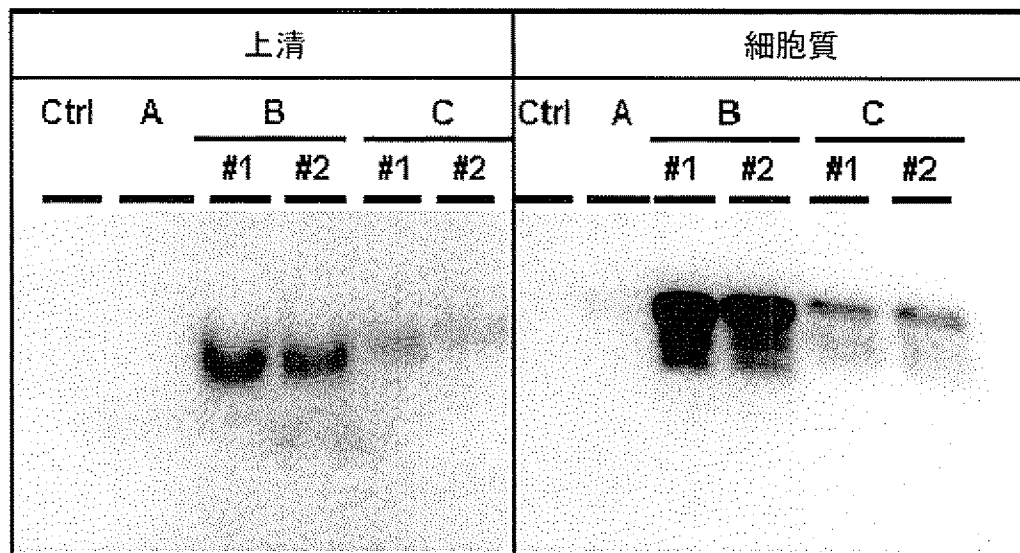
[図18]



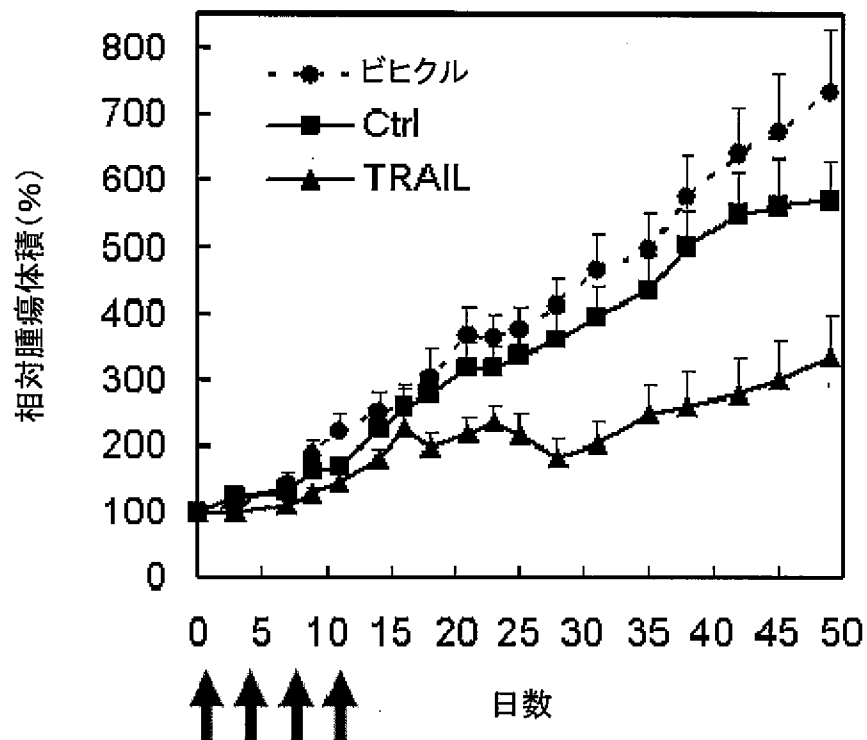
[図19]



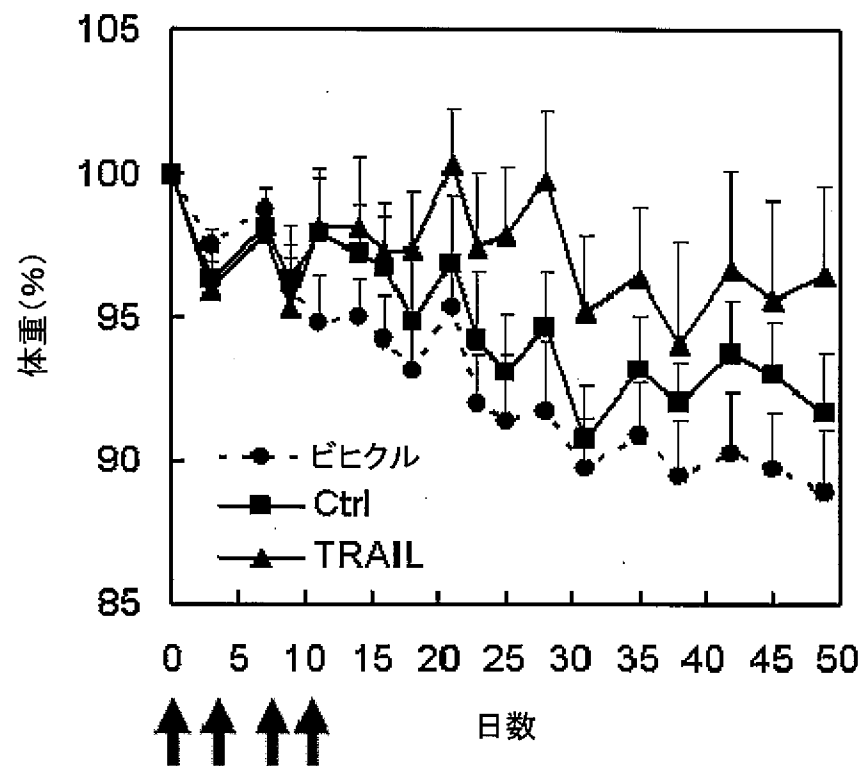
[図20]



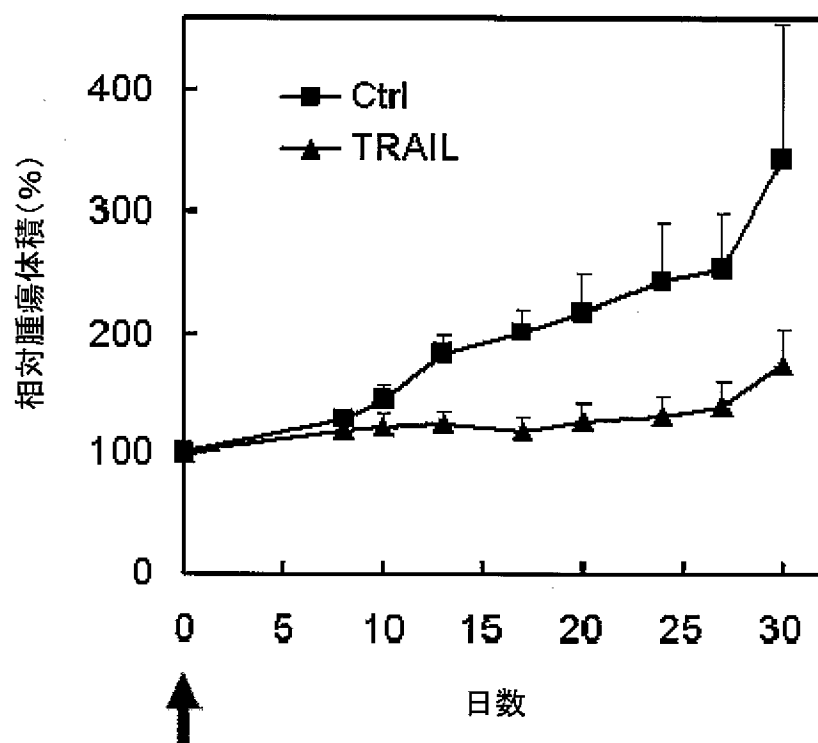
[図21]



[図22]



[図23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P35/00
(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K35/74, A61P1/04, A61P35/00, C12N1/21, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANAKA, H. et al., Bile salt hydrolase of Bifidobacterium longum-biochemical and genetic characterization. Appl Environ Microbiol. (2000) Vol.66 p.2502-2512	1, 2, 4-8, 19-26
Y	REYES ESCOGIDO, M.L. et al., A novel binary expression vector for production of human IL-10 in Escherichia coli and Bifidobacterium longum. Biotechnol Lett. (2007) Vol.29 p.1249-1253	1, 2, 4-8, 19-26
Y	PARK, MyeongSoo et al., Heterologous gene expression and secretion in Bifidobacterium longum Lait (2005) Vol.85 p.1-8	1, 2, 4-8, 19-26

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 August, 2010 (03.08.10)

Date of mailing of the international search report
10 August, 2010 (10.08.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057535

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LE LOIR, Y. et al., A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in <i>Lactococcus lactis</i> . J Bacteriol. (1998) Vol.180 p.1895-1903	1, 2, 4-8, 19-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057535

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1-26 share such a common matter that the inventions relate to an expression cassette which comprises (i) a promoter for a gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, (ii) DNA encoding a signal sequence for a product of a gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* and (iii) DNA encoding a polypeptide or a cloning site into which the DNA is to be inserted. However, the expression cassette does not make any contribution over the prior art, as disclosed in Document 1 shown below, and therefore cannot be regarded as a special technical feature.

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of 1-8, 10-12, 15, 16 and 19-26, and 9, 17 and 18

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Further, in the invention according to claim 1, in a part of the invention in which a promoter for hup gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* is used, the signal sequence is described as a member selected from choices, and expression cassettes respectively utilizing the signal sequences share such a common matter that the each of the expression cassettes comprises (i) a promoter for hup gene, (ii) DNA encoding a signal sequence for a product of a gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and (iii) DNA encoding a polypeptide or an cloning site into which the DNA is to be inserted. However, the expression cassettes are disclosed in Document 1, as stated above. Therefore, the common matter cannot be regarded as a special technical feature.

Consequently, the inventions described in claims 1-26 cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and it is considered that the claims of the present application include the following four inventions.

1. Parts of claims 1-8, 10-12, 15, 16 and 19-26, and claims 9, 17 and 18: an expression cassette comprising a promoter for cbaH gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and an invention relating to the expression cassette.

2. Parts of claims 1-8, claim 13, and parts of claims 19-26: an expression cassette having a promoter for rplJ gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and an invention relating to the expression cassette.

3. Parts of claims 1-8, 10-12, 15, 16 and 19-26: an expression cassette comprising a promoter for hup gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* and a signal sequence for a product of BL1181 gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and an invention relating to the expression cassette.

4. Parts of claims 1-8 and 19-26, and claim 14: an expression cassette comprising a promoter for hup gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* and a signal sequence for a product of amyB gene derived from a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium*, and an invention relating to the expression cassette.

Document 1: Biotechnol Lett. (2007) Vol.29 pp.1249-1253

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K35/74, A61P1/04, A61P35/00, C12N1/21, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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)

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
Y	TANAKA, H. et al., Bile salt hydrolase of Bifidobacterium longum-biochemical and genetic characterization. Appl Environ Microbiol. (2000) Vol.66 p.2502-2512	1,2,4-8,19-26
Y	REYES ESCOGIDO, M.L. et al., A novel binary expression vector for production of human IL-10 in Escherichia coli and Bifidobacterium longum. Biotechnol Lett. (2007) Vol.29 p.1249-1253	1,2,4-8,19-26

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 3 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小川 明日香

4 B

3 8 4 5

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

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	PARK, MyeongSoo et al., Heterologous gene expression and secretion in Bifidobacterium longum Lait (2005) Vol.85 p.1-8	1,2,4-8,19-26
Y	LE LOIR, Y. et al., A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in Lactococcus lactis. J Bacteriol. (1998) Vol.180 p.1895-1903	1,2,4-8,19-26

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1－26に係る発明は、(i) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子のプロモーター、(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配列をコードするDNA、(iii) ポリペプチドをコードするDNA、または該DNAを挿入するためのクローニング部位を含む発現カセットに関するものであることを共通事項としている。しかし、そのような発現カセットは、下記文献1に記載されるように先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、請求項1に係る発明は、プロモーターが選択肢により記載されたものであるが、それぞれのプロモーターを用いたそれぞれの発明は、上記と同じ理由により共通する特別な技術的特徴を有しない。（特別ページに続く。）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1－8、10－12、15、16、19－26の一部、請求項9、17、18

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III 欄の続き)

さらに、請求項 1 に係る発明のうち、ビフィドバクテリウム属細菌由来の **hup** 遺伝子のプロモーターを用いる部分について、シグナル配列が選択肢により記載されており、それぞれのシグナル配列を用いた発現カセットは、(i) **hup** 遺伝子のプロモーター、(ii) ビフィドバクテリウム属細菌由来の遺伝子産物のシグナル配列をコードする DNA、(iii) ポリペプチドをコードする DNA、または該 DNA を挿入するためのクローニング部位を含むことを共通事項としている。しかし、そのような発現カセットは上記のように文献 1 に記載されているから、当該共通事項は特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求項 1－26 に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願請求の範囲には下記のとおり、4 個の発明が記載されているものと認められる。

1. 請求項 1－8、10－12、15、16、19－26 の一部、請求項 9、17、18：ビフィドバクテリウム属細菌由来の **cbaH** 遺伝子のプロモーターを含む発現カセット、及び、それに関する発明
2. 請求項 1－8 の一部、請求項 13、請求項 19－26 の一部：ビフィドバクテリウム属細菌由来の **rplJ** 遺伝子のプロモーターを含む発現カセット、及び、それに関する発明
3. 請求項 1－8、10－12、15、16、19－26 の一部：ビフィドバクテリウム属細菌由来の **hup** 遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来の BL1181 遺伝子産物のシグナル配列を含む発現カセット、及び、それに関する発明
4. 請求項 1－8、19－26 の一部、請求項 14：ビフィドバクテリウム属細菌由来の **hup** 遺伝子のプロモーター、ビフィドバクテリウム属細菌由来の **amyB** 遺伝子産物のシグナル配列を含む発現カセット、及び、それに関する発明

文献 1：Biotechnol Lett. (2007) Vol.29 pp.1249-1253