

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6154320号
(P6154320)

(45) 発行日 平成29年7月5日 (2017.7.5)

(24) 登録日 平成29年6月9日 (2017.6.9)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 35/747 (2015.01)

A 6 1 K 35/747

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00

請求項の数 27 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-515509 (P2013-515509)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月16日 (2011.6.16)
 (65) 公表番号 特表2013-537402 (P2013-537402A)
 (43) 公表日 平成25年10月3日 (2013.10.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/040674
 (87) 国際公開番号 W02011/159880
 (87) 国際公開日 平成23年12月22日 (2011.12.22)
 審査請求日 平成26年5月19日 (2014.5.19)
 (31) 優先権主張番号 61/356,165
 (32) 優先日 平成22年6月18日 (2010.6.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/433,598
 (32) 優先日 平成23年1月18日 (2011.1.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512322106
 ノース カロライナ ステート ユニバー
 シティ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 695-8210, ローリー, メイン
 キャンパス ドライブ 920, スイ
 ート 400
 (73) 特許権者 511124183
 ノースウェスタン ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 イリノイ 60208,
 エバンストン, クラーク ストリート
 633
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

微生物の受託番号 ATCC PTA-11587

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症応答を減少させるための、リポテイコ酸が減少した組み換えラクトバチルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Lactobacillus acidophilus (L. acidophilus) 細菌の表面上でのリポテイコ酸 (LTA) の提示を減少させるように遺伝子改変されて
 いる組換え体 Lactobacillus acidophilus 細菌であって、ホス
 ホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように遺伝子改変されており、前
 記遺伝子改変が、前記ホスホグリセロールトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド
 配列からの核酸の置換または欠失を含む、組換え体 Lactobacillus aci
dophilus 細菌。

【請求項 2】

前記ホスホグリセロールトランスフェラーゼが配列番号 1 に示す核酸配列と少なくとも
 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードさ
 れる、請求項 1 に記載の組換え体 L. acidophilus 細菌。

【請求項 3】

前記ホスホグリセロールトランスフェラーゼが配列番号 1 からなるヌクレオチド配列に
 よってコードされる、請求項 1 に記載の組換え体 L. acidophilus 細菌。

【請求項 4】

プロバイオティック細菌である、前記請求項 1 または 3 に記載の組換え体 L. aci
dophilus 細菌。

【請求項 5】

10

20

前記遺伝子改変が *Lactobacillus acidophilus* NCFM で実施された、請求項 1 または 4 に記載の組換え体 *L. acidophilus* 細菌。

【請求項 6】

前記 *Lactobacillus acidophilus* が、ATCC 受託番号 PT A-11587 の下で寄託されている *Lactobacillus acidophilus* NCK2025 である、請求項 1 または 4 に記載の組換え体 *L. acidophilus* 細菌。

【請求項 7】

Lactobacillus acidophilus (*L. acidophilus*) 細菌を、前記細菌の表面上のリポテイコ酸 (LTA) の提示を減少させるように遺伝子改変することを含む、組換え体 *L. acidophilus* 細菌の作製方法であって、ここで、前記組換え体 *L. acidophilus* 細菌がホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように改変されており、前記遺伝子改変が、前記ホスホグリセロールトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からの核酸の置換または欠失を含む、方法。

10

【請求項 8】

前記ホスホグリセロールトランスフェラーゼが、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

20

前記組換え体 *L. acidophilus* 細菌がプロバイオティック細菌である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記遺伝子改変が *Lactobacillus acidophilus* NCFM で実施された、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 *Lactobacillus acidophilus* が、ATCC 受託番号 PT A-11587 の下で寄託されている *Lactobacillus acidophilus* NCK2025 である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

30

前記 *Lactobacillus acidophilus* が、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの発現を減少させるように改変されている、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

被験体において炎症を減少させる医薬の製造における、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え体 *L. acidophilus* 細菌の使用であって、前記医薬の治療的有効量を前記被験体に投与することの特徴とする、使用。

【請求項 14】

被験体の胃腸管の炎症性障害を処置または予防する医薬の製造における、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え体 *L. acidophilus* 細菌の使用であって、前記医薬の治療的有効量を被験体に投与することの特徴とする、使用。

40

【請求項 15】

前記被験体が動物である、請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 16】

前記被験体が哺乳動物である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記被験体がヒトである、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記被験体が家畜である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 19】

50

前記被験体が農業動物である、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 2 0】

前記被験体が胃腸障害を有する、請求項 1 3 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 1】

前記胃腸障害が、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記 L. acidophilus 細菌が前記被験体における 1 つまたはそれより多くの抗炎症性サイトカインの生成を増加させる、請求項 1 3 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 2 3】

前記抗炎症性サイトカインが $IL-10$ である、請求項 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 4】

前記 L. acidophilus 細菌が前記被験体における 1 つまたはそれより多くの炎症誘発性サイトカインの生成を減少させる、請求項 1 3 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記炎症誘発性サイトカインが、 $IL-12$ 、 $IL-6$ 、 $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$ およびその任意の組合せからなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の使用。

20

【請求項 2 6】

前記医薬の前記治療的有效量が 10^8 から 10^{12} CFU/日である、請求項 1 3 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組換え体 L. acidophilus 細菌を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、炎症を減少させるための方法および組成物に関する。

【0002】

EFS ウェブを通してテキストファイルとして提出される配列リストへの参照

情報変換用米国標準コード (ASCII) に従って、配列リストの公式コピーは、2011 年 6 月 16 日の作成日および 15.7 KB のサイズの、406734 seq list. txt のファイル名で、EFS ウェブを通してテキストファイルとして明細書と同時に提出される。EFS ウェブを通して出願される配列リストは、明細書の一部であり、本明細書で参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

40

腸管の免疫ホメオスタシスの維持は、細菌マイクロフローラ、腸上皮および宿主の自然免疫細胞の平衡のとれた相互作用を含む。これらの免疫学的相互作用の調節解除は、免疫機能不全を生じ、潰瘍性大腸炎 (UC) およびクローン病を含むヒト炎症性腸疾患 (IBD) に一般的である明白な炎症をもたらすことができる。IBD の細胞性および分子機構は完全には理解されていないが、炎症性サイトカイン (例えば $IL-12$) によって誘導される慢性の腸管炎症が中心的な役割を演ずることをデータは示す。これらのサイトカインは、疾患進行に強く関与する病原性 $CD4^+T$ 細胞の分化を開始する。したがって、研究は、これらの細胞の調節が実験的大腸炎を軽減することを示す。さらに、 $IL-12$ のように、 $IL-12p40$ サブユニットを利用する活性化樹状細胞 (DC) から分泌される $IL-23$ も、IBD を含む様々な自己免疫性疾患の発達と関係づけられている。 $IL-$

50

23の炎症性の性質は、Th17の誘導に帰されている。さらに、このサイトカインは、DCでのTNF α およびIL-6などの炎症性サイトカインの産生も活性化する。全体として、IL-12p40サブユニットシグナル伝達を妨害することは炎症をかなり低減すること、およびIL-12とIL-23の両方がIBDを引き起こす炎症性カスケードに関与することを研究は示す。これらのサイトカインの両方と対照的に、IL-10は炎症性シグナルに対する調節効果を及ぼし、それによって、炎症性サイトカインによって導き出される免疫応答を調整する。

【0004】

プロバイオティック微生物は宿主の免疫細胞と相互作用することができ、特異的なプロバイオティック*Lactobacillus*属の種はDCを刺激して炎症性サイトカイン（すなわちIL-12）および調節性IL-10を産生させることができる。乳酸桿菌は、ヒト胃腸管の正常な居住者であり、小腸の天然微生物叢の主要な構成要素である。これらの細菌は有益な片利共生者とみなされ、一部の種および株はヒトによる消費の長い歴史のために安全と一般に認識されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

IBDなどの炎症性胃腸障害の処置を向上させるために、当技術分野でさらなる方法および組成物が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

被験体における炎症を低減するための方法および組成物が提供される。本組成物は、細胞表面のリポテイコ酸の提示（display）を減少させるように遺伝子改変された組換え体細菌を含む。方法は、細胞表面のリポテイコ酸の提示を減少させるように改変された組換え体細菌を被験体に投与することを含む。組換え体細菌の投与は、所望の治療的応答を促進する。組換え体細菌は、単一の用量または一連の用量で投与することができる。方法は、例えば炎症性腸疾患、大腸炎またはクローン病を処置または予防することを含む、様々な炎症性障害を処置または予防することにおいて有益である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1（AおよびB）は、LTA生合成に関与する経路および遺伝子を示す。C～Dは、オーバーラップ伸張によるスプライシング（SOEing）PCR（Horton, RM（1995年）*Mol Biotechnol.* 4月；3巻（2号）：93～9頁）を用いて増幅および連結された標的ORFの内部領域に隣接する2つの非連続断片を示す。生じた断片をpORI28にクローニングし、温度感受性ヘルパープラスミドpTRK669を含む*L. acidophilus* NCK1392に形質転換した。標的領域に隣接するプライマーによるPCRを用いて、欠失突然変異についてERM感受性細胞をスクリーニングし、欠失を含む領域を配列決定することによって確認した。

【図2】図2（A）は、NCK56（*L. acidophilus* NCFMとも呼ばれる）またはNCK2025で処理されたDCの表現型を示す。骨髓由来DCは、NCK56またはNCK2025と24時間共培養された。細胞を対応する抗体で染色し、固定し、その後FACSCaliburによって分析した。パネルBは、単独で、またはNCK56もしくはNCK2025のいずれかと1：1で、1および6時間培養されたDCを示す。RNAを抽出し、逆転写し、TLR1およびTLR2のためのプライマーを用いてリアルタイムPCRを実施した。示すデータは、単独で1時間のDC、またはこれらの細胞とNCK56もしくはNCK2025との共培養を表す。パネルCは、サイトカイン分析を示す。NCK56またはNCK2025で処理されたDCおよび未処理のDCの上清に放出されたサイトカインを、ELISAによってアッセイした。パネルDは、T細胞増殖を示す。C57BL/6マウスの群（5匹／群）を、4日間連続でNCK56またはNCK2025で経口処理した。〔³H〕チミジン組込みを用いてT細胞増殖をアッセイする

10

20

30

40

50

ために、腸間膜LN-T細胞を得、NCK56またはNCK2025で処理されたDCおよび未処理のDCと4日間共培養した。一部の実験では、抑制されたT細胞増殖を回復させるために、NCK2025と共培養したDCに由来する上清に抗IL-10抗体を加えた。サイトカインをアッセイするために、マウスの各群に由来する腸間膜LN-T細胞を、*L. acidophilus*株で処理されたか未処理のDCと共培養した。

【図3A】図3は、DSSによって誘発された大腸炎のNCK2025による改善を示す。パネルAは、NCK56もしくはNCK2025 (5×10^8 cfu/100 μ l/マウス) またはPBSを4日間連続で経口接種されたC57BL/6マウス (n=10) を示す。マウスのこれらの群を飲料水に溶解させた3%DSSに5日間、その後プレーン水に7日間曝露させ、H&E染色、体重減、下痢および潜血陽性を含む大腸炎の進行について経時的に評価した。パネルB~Eは、結腸のH&N染色を示す。Bは、未処理のマウスを示し、Cは、DSS処理されたマウスを示し、Dは、NCK56-DSS処理されたマウスを示し、Eは、NCK2025-DSS処理されたマウスを示す。Fは、大腸炎スコアを表す。FOBは糞便の潜血陽性を、DAIは疾患活動性指数を表す。データは、少なくとも3つの独立した実験の代表である。パネルGは、結腸のサイトカイン分析を示す。NCK56またはNCK2025またはDSSで処理されたマウス (5匹/群) の結腸を冷PBSで洗浄し、細断し、37℃で18時間培養した。サイトカインは、ELISAによってアッセイした。

10

【図3B】図3は、DSSによって誘発された大腸炎のNCK2025による改善を示す。パネルAは、NCK56もしくはNCK2025 (5×10^8 cfu/100 μ l/マウス) またはPBSを4日間連続で経口接種されたC57BL/6マウス (n=10) を示す。マウスのこれらの群を飲料水に溶解させた3%DSSに5日間、その後プレーン水に7日間曝露させ、H&E染色、体重減、下痢および潜血陽性を含む大腸炎の進行について経時的に評価した。パネルB~Eは、結腸のH&N染色を示す。Bは、未処理のマウスを示し、Cは、DSS処理されたマウスを示し、Dは、NCK56-DSS処理されたマウスを示し、Eは、NCK2025-DSS処理されたマウスを示す。Fは、大腸炎スコアを表す。FOBは糞便の潜血陽性を、DAIは疾患活動性指数を表す。データは、少なくとも3つの独立した実験の代表である。パネルGは、結腸のサイトカイン分析を示す。NCK56またはNCK2025またはDSSで処理されたマウス (5匹/群) の結腸を冷PBSで洗浄し、細断し、37℃で18時間培養した。サイトカインは、ELISAによってアッセイした。

20

30

【図4A】図4は、NCK2025によって確立された大腸炎の緩和を示す。パネルA~Dは、大腸炎を開始するために滅菌水に溶解した3%DSSの5日周期を最初に受けた3群のC57BL/6マウス (10匹/群) を示し、群の2つはその後4日間連続でNCK56またはNCK2025で経口処理された。マウスを屠殺して結腸を調査したプロトコルの13日目まで、疾患の進行を監視した。パネルB~Dは、結腸H&N染色を示す。パネルBは、DSS処理されたマウスを示し、パネルCは、DSS-NCK56処理されたマウスを示し、パネルDは、DSS-NCK2025処理されたマウスを示す。パネルEは、大腸炎スコアを表す。FOBは糞便の潜血陽性を、DAIは疾患活動性指数を表す。データは、少なくとも3つの独立した実験の代表である。パネルFは、結腸のサイトカイン分析を示す。マウスの各群の結腸を洗浄し、細断して、37℃で18時間培養した。サイトカインは、ELISAによってアッセイした。

40

【図4B】図4は、NCK2025によって確立された大腸炎の緩和を示す。パネルA~Dは、大腸炎を開始するために滅菌水に溶解した3%DSSの5日周期を最初に受けた3群のC57BL/6マウス (10匹/群) を示し、群の2つはその後4日間連続でNCK56またはNCK2025で経口処理された。マウスを屠殺して結腸を調査したプロトコルの13日目まで、疾患の進行を監視した。パネルB~Dは、結腸H&N染色を示す。パネルBは、DSS処理されたマウスを示し、パネルCは、DSS-NCK56処理されたマウスを示し、パネルDは、DSS-NCK2025処理されたマウスを示す。パネルEは、大腸炎スコアを表す。FOBは糞便の潜血陽性を、DAIは疾患活動性指数を表す。デ

50

ータは、少なくとも3つの独立した実験の代表である。パネルFは、結腸のサイトカイン分析を示す。マウスの各群の結腸を洗浄し、細断して、37℃で18時間培養した。サイトカインは、ELISAによってアッセイした。

【図5】図5は、NCK2025によるTreg細胞の誘導を示す。パネルA～Bは、NCK56もしくはNCK2025 (5×10^8 cfu / 100 μ l / マウス) またはPBSを4日間連続で経口接種されたC57BL / 6マウス (5匹 / 群) を示す。5日目にマウスを屠殺し、切り離した結腸を洗浄した。結腸の単細胞懸濁液をマウスの各群から調製して、Percoll勾配によって濃縮した。リンパ球を対応する抗体またはアイソタイプが一致する抗体で染色し、FACSCaliburによって分析した。実験は、少なくとも7回繰り返した。

10

【図6】図6は、IL-10^{-/-}マウスでの大腸炎の誘導を示す。A～B: C57BL / 6 IL-10^{-/-}マウス群 (10匹 / 群) を従来通りに1週間収容した。マウスにNCK56またはNCK2025を4日間連続で接種し、次に、大腸炎の開始を速め、誘導するために、低用量のピロキシカムを1週間与え、続いて高用量のピロキシカムを1週間与えた。体重減少を測定し、2週後にマウスを屠殺し、結腸断面のスライスおよび組織切片をH&E染色のために調製した。Cは、ピロキシカム単独で処理したマウスを示し、Dは、NCK56-ピロキシカムで処理したマウスを示し、Eは、NCK2025-ピロキシカムで処理したマウスを示す。スコアは、0から4のスケールで盲目的に判定した。

【図7A】図7は、NCK56もしくはNCK2025による処理後または未処理のマウスにおけるDSSで誘導した大腸炎での遺伝子の調節を示す。パネルA～Bは、大腸炎のDSS誘導の前の4日間、NCK56、NCK2025を与えられたか未処理のままのマウス (5匹 / 群) を示す。近位または遠位の結腸領域を切り離し、RNAを抽出した。cDNAマイクロアレイ分析は、マウスの結腸で免疫調節 / 刺激、シグナル伝達、増殖、アポトーシス、血管形成および接着にかかわる経路での、差次的遺伝子発現パターンを明らかにする。値は、対照マウスと比較して実験条件に曝露させた遺伝子の発現の増加の倍率 (> 1.0) または発現の減少の倍率 (< 1.0) を表す。

20

【図7B】図7は、NCK56もしくはNCK2025による処理後または未処理のマウスにおけるDSSで誘導した大腸炎での遺伝子の調節を示す。パネルA～Bは、大腸炎のDSS誘導の前の4日間、NCK56、NCK2025を与えられたか未処理のままのマウス (5匹 / 群) を示す。近位または遠位の結腸領域を切り離し、RNAを抽出した。cDNAマイクロアレイ分析は、マウスの結腸で免疫調節 / 刺激、シグナル伝達、増殖、アポトーシス、血管形成および接着にかかわる経路での、差次的遺伝子発現パターンを明らかにする。値は、対照マウスと比較して実験条件に曝露させた遺伝子の発現の増加の倍率 (> 1.0) または発現の減少の倍率 (< 1.0) を表す。

30

【図7C】図7は、NCK56もしくはNCK2025による処理後または未処理のマウスにおけるDSSで誘導した大腸炎での遺伝子の調節を示す。パネルA～Bは、大腸炎のDSS誘導の前の4日間、NCK56、NCK2025を与えられたか未処理のままのマウス (5匹 / 群) を示す。近位または遠位の結腸領域を切り離し、RNAを抽出した。cDNAマイクロアレイ分析は、マウスの結腸で免疫調節 / 刺激、シグナル伝達、増殖、アポトーシス、血管形成および接着にかかわる経路での、差次的遺伝子発現パターンを明らかにする。値は、対照マウスと比較して実験条件に曝露させた遺伝子の発現の増加の倍率 (> 1.0) または発現の減少の倍率 (< 1.0) を表す。

40

【図8A】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8B】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8C】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8D】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8E】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8F】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

【図8G】図8は、配列番号1～16の配列を提供する。

50

【図 8 H】図 8 は、配列番号 1 ～ 1 6 の配列を提供する。

【図 8 I】図 8 は、配列番号 1 ～ 1 6 の配列を提供する。

【図 8 J】図 8 は、配列番号 1 ～ 1 6 の配列を提供する。

【図 8 K】図 8 は、配列番号 1 ～ 1 6 の配列を提供する。

【図 8 L】図 8 は、配列番号 1 ～ 1 6 の配列を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明はこれから添付図を参照して以下により完全に記載され、そこにおいて、全てではないがいくつかの本発明の実施形態が示される。実際、これらの発明は多くの異なる形で具現化することができ、本明細書に示される実施形態に限定されるものと解釈されるべきでない。むしろ、これらの実施形態は、この開示が、適用可能な法的要件を満たすように提供される。類似の数は、全体に類似のエレメントを指す。

10

【0009】

ここに示す本発明の多くの改変形態および他の実施形態は、上記記載および関連図に提示される教示の助けをかりて、これらの発明が関係する当業技術者に思いつくであろう。したがって、本発明は開示される具体的な実施形態に限定されず、改変形態および他の実施形態が添付の請求項の範囲内に含まれるものとされていることを理解すべきである。本明細書で特定の用語が使用されるが、それらは一般のおよび記述的な意味だけで用いられ、限定目的で用いられるものではない。

【0010】

20

概要

炎症性障害を処置または予防するための方法および組成物を含む、被験体で炎症を減少させるための方法および組成物が提供される。そのような方法および組成物は、細菌細胞の表面で L T A の提示を減少させるように改変された組換え体細菌を用いて、胃腸管で炎症を低減するために使用することができる。胃腸管の顕在的炎症は、潰瘍性 (uncreative) 大腸炎およびクローン病を含むヒト I B D を代表する。細胞表面で L T A の提示を減少させることによって、本発明の組換え体細菌は、対応する野生型細菌細胞よりかなり多くの正味の炎症性応答を低減する。したがって、それを必要とする被験体で抗炎症サイトカインの生成を刺激し、炎症誘発性サイトカインの生成を制限することによって炎症性応答を低減する、様々な組換え体細菌およびそれらの使用方法が提供される。

30

【0011】

L T A 提示の減少した組換え体細菌細胞

細胞表面上の L T A の提示を減少させる方法および組成物が提供される。ここで用いられるように、細胞表面上の L T A の提示の減少は、適当な対照と比較したときの、細胞表面で提示される L T A のレベルのいかなる統計的に有意な減少も含む。そのような減少には、例えば、細胞表面で提示される L T A の量の少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 100 % の減少を含めることができる。細胞表面の L T A の量のアッセイ方法には、例えば、ブタノールおよび疎水性相互作用クロマトグラフィー (Morath S, Geyer A および Hartung T (2001 年) J Exp Med 193 巻 (3 号) : 393 ~ 397 頁) または酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) (Tadler ら (2005 年) J Clin Lab Anal. 1989 年 ; 3 巻 (1 号) : 21 頁) が含まれる。

40

【0012】

本明細書で用いる用語「表面」、「細胞表面」または「細菌表面」は、原形質膜を含む、その外側の細菌細胞の領域を指す。グラム陽性細菌は、その中にタイコ酸が散在する原形質膜の外側のペプチドグリカンの層を含む。グラム陰性細菌は、ペプチドグリカン層を覆う外膜をさらに含む。したがって、本発明による表面上の L T A の提示は、グラム陽性細菌の原形質膜もしくはペプチドグリカン層、またはグラム陰性細菌の原形質膜、ペプチドグリカン層もしくは外膜の中、またはその上であってよい。

【0013】

50

細胞表面上のLTAの提示を減少させるように遺伝子改変されている組換え体細菌細胞が提供される。本明細書で用いるように、用語「組換え体細菌」または「組換え体細菌細胞」は、対象の遺伝子に関して少なくとも1つの遺伝子変更が実行された細菌もしくは複数の細菌細胞、またはそのように変更された細胞の系統を引いてその遺伝子変更を含む細胞を指す。したがって、本明細書で用いるように、用語「遺伝子改変された」または「遺伝子改変」は、対象の遺伝子または核酸配列に関して実行された欠失、付加または置換などの遺伝子変更を指す。一部の実施形態では、遺伝子変更は、人の手による組換え技術に起因する変更である。

【0014】

一部の実施形態では、遺伝子変更は、細菌細胞のゲノムへの異種ポリヌクレオチドの導入を含む。本明細書で用いるように、配列に関して「異種」とは、外来の種を起源とするか、同じ種を起源とする場合には故意のヒト介入によって組成および／またはゲノム遺伝子座がその天然形から実質的に改変される配列である。例えば、異種ポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターは、ポリヌクレオチドが由来する種と異なる種に由来するか、または同種／類似種に由来する場合には、一方または両方はそれらの原形および／またはゲノム遺伝子座から実質的に改変されるか、または、プロモーターは作動可能に連結するポリヌクレオチドの天然のプロモーターでない。

【0015】

対象のいかなる細菌も、本明細書に記載される方法および組成物で用いることができる。具体的な実施形態では、細菌はプロバイオティック細菌を含む。本明細書で用いられる用語「プロバイオティック」は、「適当量で投与されるときに宿主に健康上の有益性を付与する生きている微生物（FAO2001：isapp.net/docs/ProbioticDefinition.pdfのウェブサイトを参照）または被験体の腸管の健康および均衡に寄与する少なくとも1つの生物体」を指す。具体的な実施形態では、それは「フレンドリー」、「有益」または「善玉」細菌とも呼ばれ、それは、被験体によって摂取されると健康な腸管の維持を助け、病気および／または疾患の1つまたはそれより多くの症状の部分的または完全な緩和に役立つ。本明細書で用いるように、「プロバイオティック特性」は、腸の機能および安定性の強化；感染性および非感染性の疾患に対する保護の改善；免疫系調整；乳糖不耐性の緩和；消化および栄養素吸収の改善；血中コレステロールの低減；アレルギーリスクの低減；および尿路感染リスクの低減を含む。一部の実施形態では、プロバイオティック特性は、プロバイオティック細菌を受けとる被験体での抗炎症サイトカイン生成の増加、プロバイオティック細菌を受けとる被験体での炎症誘発性サイトカイン生成の減少、またはプロバイオティック細菌を受けとる被験体での抗炎症サイトカイン生成と炎症誘発性サイトカイン生成との比の増加を含む。

【0016】

一部の実施形態では、本明細書に記載される細菌は、1つまたはそれより多くのプロバイオティック特性を強化するように改変されている。例えば、一部の実施形態では、胃腸上皮への接着を増加させるように改変され、細胞表面上のLTAの提示を減少させるようにさらに改変されている細菌が提供される。他の実施形態では、酸または胆汁への耐性を増加させるように改変され、細胞表面上のLTAの提示を減少させるようにさらに改変されている細菌が提供される。

【0017】

他の実施形態では、細菌は乳酸菌である。本明細書で用いるように、「乳酸菌」は、以下から選択される属からの細菌を意味する：Aerococcus属、Carnobacterium属、Enterococcus属、Lactococcus属、Lactobacillus属、Leuconostoc属、Oenococcus属、Pediococcus属、Streptococcus属、Melissococcus属、Allioicoccus属、Dolosigranulum属、Lactosphaera属、Tetragenococcus属、Vagococcus属およびWeissella属（Holzapfelら（2001年）Am. J. Clin. Nutr. 73巻：365S～373S

10

20

30

40

50

頁；Sneath編（1986年）Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2巻、Lippincott、Williams and Wilkins、Hagerstown、MD）。

【0018】

さらに他の実施形態では、*Lactobacillus*属が用いられる。「*Lactobacillus*属」は、それらに限定されないが、*L. casei*、*L. paracasei*、*L. reuteri*、*L. rhamnosus*、*L. johnsonii*、*L. gasserii*、*L. acidophilus*、*L. plantarum*、*L. fermentum*、*L. salivarius*、*L. bulgaricus*およびWoodら（HolzapfelおよびWood編（1995年）The Genera of Lactic Acid Bacteria、2巻、Springer、New York）によって概説される多数の他の種を含む*Lactobacillus*属からの任意の細菌を意味する。具体的な実施形態では、細菌は*L. acidophilus* NC FMである。

10

【0019】

LTAの提示が減少した細菌の生成、そのような細菌の種培養の調製および基質、特にミルクなどの食物基質を発酵させる方法は、それらに限定されないが、Maeyra-MaekinenおよびBigret（1993年）Lactic Acid Bacteria. SalminenおよびvonWright編 Marcel Dekker, Inc. New York. 65～96頁；Sandine（1996年）Dairy Starter Cultures CoganおよびAccolas編 VCH Publishers、New York. 191～206頁；Gilliland（1985年）Bacterial Starter Cultures for Food. CRC Press、Boca Raton、Floridaに記載されるものを含む公知の技術に従って実行することができる。

20

【0020】

本明細書に記載される細菌細胞は、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning, A Laboratory Manual（2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York）に一般に記載されるような適する培地で培養することができる。

【0021】

一部の実施形態では、本明細書に記載される菌株は、本明細書に記載されるような細胞表面のLTAの提示の減少をもたらす少なくとも1つの遺伝子変更を含む細菌の、生物学的に純粋な培養である。さらなる実施形態では、細菌は1つまたはいくつかのヌクレオチドの付加、欠失および／または置換を含む。これらの株には、それらに限定されないが以下のものが含まれてよい：*Lactobacillus acidophilus*、*L. gasserii*、*L. johnsonii*または*L. plantarum*。「生物学的に純粋な」は、他の細菌細胞が90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%含まれないことを意味する。他の実施形態では、本明細書に記載される菌株は他の菌株と一緒に見出されて、混合培養を形成する。

30

【0022】

「対照」または「対照細胞」または「対照細菌」は、組換え体細菌細胞の表現型の変化を測定するための参照点を提供する。対照細菌は、例えば：（a）野生型細菌、すなわち、対象細菌をもたらした遺伝子変更のための出発材料と同じ遺伝子型のもの；または（b）出発材料と同じ遺伝子型であるが、ヌル構築物で（すなわち、マーカー遺伝子を含む構築物などの、対象の形質に及ぼす既知の影響がない構築物で）形質転換されている細菌、を含むことができる。

40

【0023】

LTA関連のポリペプチドおよびポリヌクレオチド

細胞表面上のLTA提示の減少した組換え体細菌を、少なくとも1つのLTA関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの活性レベルが調整される（すなわち増加または減少する）ように変更した。本明細書で用いるように、用語「LTA」は、リポテイコ酸、膜内に糖脂質が固定され、ポリ（グリセロリン酸）（Group）鎖が壁内に伸長している両性高分子を指す。一部の実施形態では、用語「LTA」または「リポテイコ酸」には、壁テイコ酸（WTA）、細胞壁のペプチドグリカン層と共有結合しているテイコ酸が含ま

50

れる。L T Aの生合成は、細胞の内側の膜に固定される糖脂質を形成する、グリコシルトランスフェラーゼを通した炭水化物ユニットの移動から始まる。糖脂質は膜タンパク質を通して細胞から輸送され、細胞の外側の細胞膜に固定される。最後に、ホスホグリセロールトランスフェラーゼは固定された糖脂質にグリセロリン酸（G r o - P）単位を輸送して、細長いL T A（図1）を形成する。したがって、本発明のL T A関連のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、細胞表面上のL T Aの生成、組成、輸送、アセンブリーおよび提示に関与するポリヌクレオチドおよびポリペプチドを包含すると理解される。一部の実施形態では、細菌を投与される被験体で炎症性応答を調整するために、細菌表面のL T Aの提示が低減される。

【0024】

10

これらのL T A関連の配列の断片および変異体を、本明細書に記載される方法を実施するために用いることもできる。本明細書で用いるように、用語「遺伝子」および「組換え体遺伝子」は、オープンリーディングフレームを含む核酸分子、特にL T Aの生成、アセンブリーまたは提示に関与するタンパク質をコードするものを指す。一実施形態では、L T A関連のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、配列番号1および2、またはその活性断片もしくは変異体を含む。さらなる実施形態では、L T A関連のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、配列番号3～16、またはその活性断片もしくは変異体を含む。

【0025】

L T A関連のポリヌクレオチドは、L T A関連のタンパク質をコードするコード配列だけでなく、プロモーターなどの調節配列の両方を含む。L T A関連のポリヌクレオチドは、リボゾーム結合部位などの、L T A関連のm R N Aの正しい翻訳のために必須の部位をさらに含むことができる。

20

【0026】

L T A、細胞壁、細胞膜、細胞表面と関連するかまたは分泌される、単離ポリペプチドおよびタンパク質、ならびにその変異体および断片が包含される。本発明の目的上、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は互換的に用いられる。

【0027】

本明細書で用いる用語「発現」は、本発明の核酸断片に由来するセンス（m R N A）またはアンチセンスR N Aの転写を指す。発現は、m R N Aのポリペプチドへの翻訳を指すこともできる。

30

【0028】

L T Aの提示を減少させること

標的のL T A関連のポリヌクレオチドの発現レベル（濃度および／または活性）を調整する方法および組成物が提供される。本明細書で用いるように、「標的配列」は、発現レベルを調整することを望む任意の配列を含む。標的配列には、ポリペプチドをコードする配列とそれをコードしない配列の両方が含まれる。機能的L T A関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、細菌の表面上のL T Aの生成、アセンブリー、輸送または提示を担うタンパク質、配列またはR N Aをコードすると理解される。したがって、発現が低減されたL T A関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その野生型対応物と比較したとき、表面上のL T Aの提示が減少した細菌をもたらすであろう。一部の実施形態では、表面上のL T Aの提示が減少した細菌は、大腸炎などのI B Dを起こしている被験体の炎症性応答を低減または予防することができる。

40

【0029】

ポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドの発現レベルを「低減する」または「低減すること」は、標的配列のポリヌクレオチドまたはポリペプチドレベルが、適当な対照中の同じ標的配列のポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルより統計学的に低いことを意味するものとする。特定の実施形態では、現在開示されている対象物により標的配列のポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルを低減することは、適当な対照中の同じ標的配列のポリヌクレオチドレベル、またはそれによってコードされるポリペプチドのレベルの少なくとも95%の減少、少なくとも90%

50

の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも10%の減少、または少なくとも5%の減少をもたらす。他の実施形態では、標的配列のポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルを低減することは、適当な対照と比較したとき、ポリヌクレオチドレベル、またはそれによってコードされるポリペプチドのレベルの約3%～15%、10%～25%、20%～35%、30%～45%、40%～55%、50%～65%、60%～75%、70%～90%、70%～80%、70%～85%、80%～95%、90%～100%の減少をもたらす。RNA転写産物のレベル、コードされたポリペプチドのレベルまたはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの活性のアッセイ方法は、本明細書の他の場所で議論される。

10

【0030】

一部の実施形態では、対象のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを増加させることによって、細胞表面上のLTAの提示を減少させることができる。ポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドの発現レベルを「増加させる」または「増加させること」は、標的配列のポリヌクレオチドまたはポリペプチドレベルが、適当な対照中の同じ標的配列のポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルより統計的に高いことを意味するものとする。特定の実施形態では、現在開示されている対象物により標的配列のポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルを増加させることは、適当な対照中の同じ標的配列のポリヌクレオチドレベル、またはそれによってコードされるポリペプチドのレベルの少なくとも95%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも10%の増加、または少なくとも5%の増加をもたらす。他の実施形態では、標的配列のポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルを増加させることは、適当な対照と比較したとき、ポリヌクレオチドレベル、またはそれによってコードされるポリペプチドのレベルの約3%～15%、10%～25%、20%～35%、30%～45%、40%～55%、50%～65%、60%～75%、70%～90%、70%～80%、70%～85%、80%～95%、90%～100%の増加をもたらす。RNA転写産物のレベル、コードされたポリペプチドのレベルまたはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの活性のアッセイ方法は、本明細書の他の場所で議論される。

20

30

【0031】

表面上のLTAの提示が減少している組換え体生物体は、様々な技術を用いて構築することができる。本発明では、LTAアセンブリ経路の1つの酵素の少なくとも1つ、例えばホスホグリセロールトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を、本明細書に記載されるように減少させることができる。

【0032】

一実施形態では、ホスホグリセロールトランスフェラーゼを含むLTA関連のポリペプチドのレベルが低減される。特定の実施形態では、配列番号2に示すホスホグリセロールトランスフェラーゼまたはその活性断片もしくは変異体の発現が低減される。ホスホグリセロールトランスフェラーゼは、糖脂質へのGro-P単位の移動に関与し、それによってLTA鎖を伸長させるポリペプチドである。様々なホスホグリセロールトランスフェラーゼポリペプチドおよびこれらのポリペプチドをコードする遺伝子が公知である。本明細書で用いるように、ホスホグリセロールトランスフェラーゼは、LTA合成酵素(LtaS)、グリセリンホスホトランスフェラーゼ、グリセロホスホトランスフェラーゼ、およびLTAのポリグリセロールホスフェート骨格の形成のためにGro-P単位の移動を触媒する任意の他のポリペプチドを包含する。ホスホグリセロールトランスフェラーゼは、アルカリ性ホスファターゼスーパーファミリー(Md o B [COG1368] ホスホグリセロールトランスフェラーゼ)のメンバーである。例えば、NCBI受託番号NZ__AC

40

50

G X 0 1 0 0 0 0 6 8 . 1 および N C _ 0 1 0 6 0 9 . 1 を参照。これらの参照の各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0033】

別の実施形態では、L T A 関連のポリペプチドは、グリコシルトランスフェラーゼを含むことができる。この実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼのレベルは、本明細書の他の場所に記載されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを低減する方法のいずれかを用いて低減される。一実施形態では、配列番号 4 または 6 に示すグリコシルトランスフェラーゼまたはその活性断片もしくは変異体の発現が低減される。グリコシルトランスフェラーゼは、糖脂質および L T A の脂質アンカーの合成に参与するポリペプチドである。グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドおよびこれらのポリペプチドをコードする遺伝子が公知である。本明細書で用いるように、用語グリコシルトランスフェラーゼは、糖脂質または L T A の脂質アンカー、例えば Y g p P、U g t、B g s A、I a g A、L a f A または L a f B などの合成を触媒する任意のポリペプチドを指す。グリコシルトランスフェラーゼは、グリコシルトランスフェラーゼ _ G T B _ タイプのスーパーファミリー [c 1 1 0 0 1 3] のメンバーである。様々なグリコシルトランスフェラーゼが公知である。例えば、N C B I 受託番号 N C _ 0 1 0 6 0 9 . 1 および E F 1 3 8 8 3 5 . 1 を参照。これらの参照の各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0034】

テイコ酸における D - A l a 置換の特質およびレベルは、細胞表面上の L T A の提示を減少させることができる。D - アラニル - L T A の合成は、d l t オペロン、D l t A、D l t B、D l t C または D l t D によってコードされる 4 つのタンパク質を必要とする。したがって、一部の実施形態では、L T A 関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、配列番号 9 ~ 1 6 を含む、D l t オペロンに示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含むことができる。したがって別の実施形態では、D l t A、D l t B、D l t C または D l t D のレベルは、本明細書の他の場所に記載される L T A 関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを低減する方法のいずれかを用いて低減される。d l t オペロンの様々なメンバーが公知である。例えば、N C B I 受託番号 A A F 0 9 2 0 1 (D l t A) ; N C B I 受託番号 A A B 1 7 6 5 8 . 1 (D l t B) ; N C B I 受託番号 C A R 8 6 6 7 4 . 1 (D l t C) ; および N C B I 受託番号 C A Q 6 5 9 8 1 . 1 (D l t D) を参照。これらの参照の各々は、参照により本明細書に組み込まれる。L T A の構造は、公知の技術を用いて N M R および M S で測定することができる。例えば、Morath S、Geyer A および Hartung T (2 0 0 1 年) J Exp Med 1 9 3 巻 (3 号) : 3 9 3 ~ 3 9 7 頁を参照。

20

30

【0035】

L T A 関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現の減少は、当技術分野で周知の様々な技術によって達成することができる。例えば、遺伝子発現は突然変異によって減少させることができる。突然変異は、その突然変異が、細胞表面上の L T A の提示が減少するように機能的 L T A 関連のタンパク質の発現の減少につながるか、L T A 関連のポリヌクレオチドの発現の減少をもたらす限り、挿入、欠失、置換またはその組合せであってよい。L T A の提示の減少した細菌は、被験体の炎症性応答を低減し、それによって大腸炎などの炎症性腸疾患を処置または予防するために用いることができる。

40

【0036】

染色体上の特定の部位に突然変異を導入するために、組換え D N A 技術を用いることができる。そのような突然変異は、突然変異させられた遺伝子が、細胞表面上の L T A の提示が減少するように機能的 L T A 関連のタンパク質の発現の減少につながるか、L T A 関連の遺伝子の発現の減少をもたらす限り、挿入、欠失、1 つのヌクレオチドの別のヌクレオチドによる置換またはその組合せであってよい。そのような突然変異は、いくつかの塩基対の欠失によって作ることができる。一実施形態では、そのような突然変異の結果、他の塩基対は正しいリーディングフレーム内にもはやないので、1 つの単一の塩基対の欠失は、L T A 関連のタンパク質を機能しないようにし、それによって細菌表面上の L T A の

50

提示を減少させることができた。他の実施形態では、多数の塩基対、例えば100塩基対が除去される。さらに他の実施形態では、LTA関連遺伝子の全長を欠失させる。LTA関連遺伝子の発現を低減するために、オープンリーディングフレームに終止コドンを導入する突然変異、またはオープンリーディングフレームでフレームシフトを引き起こす突然変異を用いることができた。

【0037】

LTAの提示を減少させるためにLTA関連遺伝子の発現を減少させる他の技術は、当技術分野で周知である。例えば、技術には、部位特異的突然変異誘発、制限酵素消化とその後の再ライゲーション、PCRに基づく突然変異誘発技術、対立遺伝子の交換、対立遺伝子の置換、RNA干渉または翻訳後修飾による遺伝子配列の改変を含めることができる。プラスミドにLTA関連の遺伝子をクローニングすること、制限酵素による遺伝子の消化、その後のエンドヌクレアーゼ処理、再ライゲーション、および相同組換えなどの標準組換えDNA技術は全て当技術分野で公知であり、Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. ISBN 0-87969-309-6) に記載されている。Clontechから販売されているTRANSFORMERキットを用いて、*in vitro*部位特異的突然変異誘発によって部位特異的突然変異を生成することができる。PCR技術は、(DieffenbachおよびDreksler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-3 および ISBN 0-87969-447-5) に広範囲に記載されている。

【0038】

コード領域での突然変異、およびプロモーターなどの調節配列を含む正しい転写および翻訳のために必須のそれらの配列での突然変異も、本発明の範囲内に入るとみなされる。

【0039】

特定の実施形態では、組換え体細菌は、表面上のLTAの提示が減少するように、部位特異的突然変異誘発によって改変される。他の実施形態では、LTAの提示が減少した細菌は、細菌集団から単離される。本明細書で用いる単離という用語は、その天然の環境から分離される細菌を指すと理解されよう。これは、例えば、混合細菌集団または環境試料からの精製によるものであってよい。単離細菌は、その細菌の天然の環境の他の細菌種および構成要素を実質的に含まない。天然の環境の他の細菌種および構成要素を実質的に含まない細菌には、天然の環境の混入細菌種または構成要素の約30%未満、20%、10%、5%または1%を有する細菌調製物が含まれる。

【0040】

アッセイ

開示されるポリペプチドおよび／または核酸分子の発現を検出するアッセイには、LTAの検出および／または定量を含めることができる。LTAの検出のための方法は、本明細書の他の場所に記載されている。細菌細胞表面上のLTAの提示の減少は、細菌にさらされる宿主細胞の抗炎症応答の増加または炎症誘発性応答の減少をもたらすことができる。本発明のLTA関連のポリペプチドの発現を評価するために、例えば抗炎症応答または炎症誘発性応答を測定するアッセイを用いることもできる。炎症性応答を測定する方法も、本明細書の他の場所に記載されている。

【0041】

断片および変異体

文脈に従い、「断片」はポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の一部、またはポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の一部をコードするポリヌクレオチドを指す。断片は元のタンパク質の活性を保持することができ、したがって、そのような「活性」断片には、例えば、ホスホグリセロールトランスフェラーゼ活性を保持する配列番号2の断片などの、LTA関連のタンパク質の断片が含まれる。活性ホスホグリセロールトランスフェラーゼをコードする配列番号1の断片などの、LTA関連のヌクレオチド配列の断片は、生物学的に活性であるタンパク質断片をコードすることができる。さらに、LTA関連のタンパク質の断片には、配列番号2、4、6、8、10、12、14および

16の断片が含まれる。生物学的に活性なヌクレオチド断片は、LTA関連のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの一部を単離し、LTA関連のタンパク質のコードされた部分を発現させ、LTA関連のタンパク質のコードされた部分の活性を評価することによって調製することができる。他の実施形態では、LTA関連のタンパク質のヌクレオチド配列の断片は、生物学的に活性なポリペプチドをコードする必要がないが、発現されたときに標的のLTA関連のポリペプチドの発現を抑制する（すなわちセンス、アンチセンス、miRNAまたはsiRNA抑制）ポリヌクレオチドを含むことができた。LTA関連のポリヌクレオチドの断片には、配列番号1、3、5、7、9、11、13および15の断片が含まれる。LTA関連の核酸分子の断片は、少なくとも約15、20、50、75、100、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000ヌクレオチド、または本明細書で開示される完全長LTA関連のヌクレオチド配列に存在するヌクレオチドの総数まで含む。

10

【0042】

アミノ酸配列の断片には、LTA関連のタンパク質、または部分長のタンパク質のアミノ酸配列に十分に同一であるかそれに由来するアミノ酸配列を含み、LTA関連のタンパク質の少なくとも1つの活性を示す（すなわち、細胞表面で提示されるLTAのレベルを調整する）が、本明細書で開示される完全長LTA関連のタンパク質より少ないアミノ酸を含むペプチドが含まれる。LTA関連のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば長さが10、25、50、100、150、200個の連続したアミノ酸であるか、または本発明の完全長LTA関連のタンパク質（すなわち、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16）に存在するアミノ酸の総数までであるポリペプチドであってよい。そのような生物学的に活性な部分は組換え技術によって調製することができ、ホスホグリセロールトランスフェラーゼ活性などの天然のLTA関連のタンパク質の機能的活性の1つまたはそれより多くについて評価することができる。ここで用いられるように、断片は、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16の少なくとも5つの連続したアミノ酸を含む。しかし、本発明は、6、7、8または9個を超えるアミノ酸のタンパク質中の任意の断片などの他の断片を包含する。

20

【0043】

一部の実施形態では、本明細書の他の場所で提供されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列の変異体の発現を低減するように改変されている組換え体細菌が提供される。「変異体」は、十分に同一の配列を意味する。したがって、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14もしくは16中のLTA関連のタンパク質をコードするヌクレオチド配列と十分に同一である核酸分子、または配列番号1、3、5、7、9、11、13もしくは15のヌクレオチド配列もしくはその相補配列を含む核酸分子の発現を低減するように改変された細菌を包含する。変異体ポリヌクレオチドには、1つまたはいくつかの付加、欠失または置換を含む配列がさらに含まれる。変異体には、本発明のヌクレオチド配列によってコードされる変異体ポリペプチドも含まれる。さらに、本発明のポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16に示されるアミノ酸配列と十分に同一であるアミノ酸配列を有する。「十分に同一の」は、1つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が、第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して十分であるか最小限の数の同等または同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドを含み、このように、共通の構造ドメインを提供すること、および／またはLTA関連の生体活性などの共通の機能的活性を示すことを意味する。保存的な変異体には、遺伝子コードの変性のために異なるヌクレオチド配列が含まれる。

30

40

【0044】

一般に、配列番号2、4、6、8、10、12、14もしくは16のアミノ酸配列のいずれかと、または配列番号1、3、5、7、9、11、13もしくは15のヌクレオチド配列のいずれかと、それぞれ少なくとも約45%、55%または65%の同一性、好ましくは少なくとも約70%または75%の同一性、より好ましくは少なくとも約80%、8

50

5 % または 90 %、最も好ましくは少なくとも約 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 99.5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列またはヌクレオチド配列は、本明細書で十分に同一であると定義される。本発明によって包含される変異体タンパク質は生物学的に活性であり、すなわち、それらは配列番号 2 のホスホグリセロールトランスフェラーゼ活性などの、天然のタンパク質の所望の LTA 関連の生体活性を保持する。例えば、Varcamonti ら (2003 年) Appl. Environ. Microbiol. 69 巻: 1287 ~ 1289 頁を参照。タンパク質の生物学的に活性な変異体は、そのタンパク質とわずか 1 ~ 15 アミノ酸残基、わずか 1 ~ 10、例えば 6 ~ 10、わずか 5、わずか 4、3、2 アミノ酸残基、または 1 アミノ酸残基が異なることさえもある。

10

【0045】

LTA 関連のポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、切断および挿入を含む様々な方法で変更することができる。突然変異誘発およびポリヌクレオチド変更のための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Kunkel (1985 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 巻: 488 ~ 492 頁; Kunkel ら (1987 年) Methods in Enzymol. 154 巻: 367 ~ 382 頁; 米国特許第 4,873,192 号; Walker および Gastra 編 (1983 年) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) およびその中の引用文献を参照。対象のタンパク質の生体活性に影響しないアミノ酸置換に関する指針は、参照により本明細書に組み込まれる Dayhoff ら (1978 年) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) のモデルに見出すことができる。1 つのアミノ酸を類似した特性を有する別のものと交換することなどの、保存的な置換を生成することができる。当業技術者は、本明細書で開示される LTA 関連のポリペプチドの活性は、本明細書の他の場所に記載されるものなどの、慣用されるスクリーニングアッセイによって評価することができることを理解する。

20

【0046】

本明細書で用いるように、「天然配列」のポリペプチドは、自然に由来する対応するポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。そのような天然配列のポリペプチドは、自然から単離することができるか、組換えおよび／または合成手段によって生成することができる。用語「天然配列」は、具体的にはポリペプチドの天然に存在する切断された、可溶性のまたは分泌された形、天然に存在する変異形、および天然に存在する対立遺伝子変異体を包含する。

30

【0047】

本明細書で用いるように、2 つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列との関連で「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウでの最大対応のために整列させたときに同じである、2 つの配列中の残基を指す。配列同一性の百分率がタンパク質に関して用いられるとき、同一でない残基位置はしばしば保存的なアミノ酸置換で異なり、ここでは、類似した化学特性 (例えば、電荷または疎水性) を有する他のアミノ酸残基のためにアミノ酸残基が置換され、したがってその分子の機能的特性を変化させないと認識される。配列が保存的な置換で異なる場合、置換の保存的な性質について補正するために、配列同一性パーセントを上方向に調整することができる。そのような保存的な置換で異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われる。この調整のための手段は、当業者に周知である。一般的に、これは、保存的な置換を、完全ではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングすることを含み、それによって配列同一性百分率を増加させる。したがって、例えば、同一のアミノ酸が 1 のスコアを与えられ、非保存的な置換が 0 のスコアを与えられる場合、保存的な置換は 0 から 1 の間のスコアを与えられる。保存的な置換のスコアリングは、例えば、プログラム PC/GENE (Intelligentics, Mountain View, California) で実施される通りに計算される。

40

【0048】

50

本明細書で用いるように、「配列同一性の百分率」は、比較ウィンドウで2つの最適に整列させた配列を比較することによって判定される値を意味し、そこで、比較ウィンドウでのポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適整列の参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。両方の配列で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が起こる位置の数を判定してマッチしている位置の数を与え、マッチしている位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛け算して配列同一性の百分率を与えることによって、百分率は計算される。

【0049】

特に明記しない限り、本明細書で提供される配列同一性／類似性の値は、以下のパラメーター：50のギャップウェイトおよび3の長さウェイト、およびnws gap dna. cmpスコアリングマトリックスを用いるヌクレオチド配列のための同一性%および類似性%；8のギャップウェイトおよび2の長さウェイト、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを用いるアミノ酸配列のための同一性%および類似性%；を用いるGAPバージョン10、またはその任意の同等のプログラムを用いて得られる値を指す。「同等プログラム」は、問題の任意の2つの配列について、GAPバージョン10によって生成される対応する整列と比較したときに、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のマッチおよび同一の配列同一性パーセントを有する整列を生成する、任意の配列比較プログラムを意味する。

【0050】

処置および予防の方法

本明細書の他の場所に記載される組換え体細菌の投与を含む、被験体で炎症を減少させる方法が提供される。一部の実施形態では、LTAの提示が減少した組換え体細菌の投与は、被験体で大腸炎などのIBDの症状を改善することができる。他の実施形態では、LTAの提示が減少した組換え体細菌の投与は、被験体で大腸炎などのIBDの開始を予防することができる。一部の実施形態では、例えば配列番号1またはその活性断片もしくは変異体の発現の減少を含む、例えばホスホグリセロールトランスフェラーゼを含むLTA関連のタンパク質の発現が減少した組換え体細菌は、細胞表面上のLTAの提示が減少し、確立された大腸炎の症状を改善することおよび大腸炎の開始を予防することができる。下記の実施例1を参照されたい。一部の実施形態では、被験体において胃腸管で炎症を局所的に処置および／または予防する方法、胃腸管の炎症性障害を処置および／または予防する方法、ならびに腸で疼痛を局所的に処置する方法が提供される。

【0051】

本明細書で「処置」は、胃腸障害を有する被験体の健康状態または症状を治癒させるか、治すか、緩和するか、軽減するか、変更するか、直すか、改善するか、向上させるかまたは影響を及ぼすことと定義される。処置される被験体は、例えば炎症性腸疾患を起こしているか、炎症性腸疾患を起こす危険があることを含む、胃腸障害を起こしているか起こす危険があってよい。

【0052】

組換え体細菌の投与は、予防的目的または治療的目的のいずれのためであってよい。「予防する」ことは、組換え体細菌が予防的に提供されること、すなわち細菌がいかなる症状にも先立って提供されることを意味する。組換え体細菌の予防的投与は、任意の以降の症状を予防するか弱める役目を果たす。治療的に提供される場合、細菌は症状の開始時（または直後に）提供される。物質の治療的投与は、任意の実際の症状を弱くする役目を果たす。

【0053】

「被験体」は、動物を意味する。具体的な実施形態では、被験体は哺乳動物、例えば霊長類またはヒトである。他の実施形態では、被験体には、ネコもしくはイヌなどの家畜、または反芻動物、ウマ、ブタ、家禽もしくはヒツジなどの農業動物が含まれる。具体的な実施形態では、本発明の医薬製剤による処置を受ける被験体は、ヒトである。一部の実施

形態では、処置を受けるヒトは、新生児、小児、幼児、思春期直前の子供、若者または成人であってよい。本発明の被験体は、胃腸障害の症状を起こしていてもよく、または胃腸障害の危険があってもよい（例えば抗生物質処置を受けた被験体）。

【0054】

胃腸障害

本発明の方法および組成物は、炎症性胃腸障害の処置に関する。本明細書で用いるように、用語「炎症性胃腸障害」または「胃腸障害」または「胃腸管の炎症性障害」は、免疫系または免疫系の細胞によって媒介される、胃腸管または腸の疾患を指す。炎症性胃腸障害には、例えば炎症性腸疾患（IBD）、例えばクローン病および潰瘍性大腸炎、リンパ性大腸炎、顕微鏡的大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、自己免疫性腸疾患、アレルギー性胃腸疾患および好酸性胃腸疾患、ならびに下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛または便秘が含まれる。特定の実施形態では、本発明の方法は、肥満、またはIBD、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛または便秘を含む肥満の症状の処置または予防に関する。例えば、参照により本明細書に組み込まれるKadooka Yら（2010年）Eur J Clin Nutr. 64巻（6号）：636～43頁を参照。

【0055】

一部の実施形態では、炎症の減少には、腸管の完全性の刺激；腸管の透過性の低減；ムチンの合成、分泌および／または質の向上；腸管上皮の成熟および分化の向上；栄養吸収の向上；抗微生物活性を運搬する可溶性因子の生成の増加；感染抵抗性の刺激、向上または支援；ウイルスまたは細菌性感染に対する細胞性または体液性応答の支援；細胞傷害性の増加（抗ウイルス性と抗腫瘍の両方）；全身および／または粘膜ワクチン接種応答の支援；細胞性および／または体液性免疫の増加または支援；自然免疫（好中球、食細胞、マクロファージおよびナチュラルキラー細胞活性を含む）の増加または支援；適応的TおよびB細胞免疫の増加または支援；ヘルパーT細胞1（Th1）サイトカインパターンの刺激（IL-1、IL-2、IFN-ガンマ、IL-12、TNF-アルファ；ヒト白血球抗原-D r（HLA-D r）の発現の増加）；炎症の抑制または全身および粘膜炎症媒介物質（サイトカインおよび／またはケモカインを含む）の生成；全体および／またはアレルギー特異的なIgEを低減することによる感作の低減；アレルギー性サイトカインの産生の低減；Th2支援免疫グロブリンプロファイルの低減；ならびにその組合せを含めることができる。

【0056】

本明細書で用いるように、用語「抗炎症性サイトカイン」は、そのサイトカインの受容体を有する細胞で抗炎症応答を導き出す、天然に存在するか組み換え型のタンパク質、その類似体またはその断片を指す。本発明の抗炎症性サイトカインは、炎症誘発性サイトカイン応答を制御する免疫調節性分子であってよい。本発明の抗炎症性サイトカインには、インターロイキン（IL）-1受容体アンタゴニスト、IL-4、IL-10、IL-11およびIL-13、IL-16、IFN-アルファ、TGF-ベータ、G-CSFが含まれる。

【0057】

本明細書で用いるように、用語「炎症誘発性サイトカイン」は、炎症を有利にする免疫調節性サイトカインを指す。本発明の炎症誘発性サイトカインには、IL1-アルファ、IL1-ベータ、TNF-アルファ、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-17、IL-18、TNF-アルファ、LT、LIF、オンコスタチンまたはIFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマが含まれる。

【0058】

一部の実施形態では、組換え体細菌の投与は、抗炎症性サイトカイン生成の増加をもたらす。本明細書で用いるように、抗炎症性サイトカイン生成の「増加」または「増加させる」ことは、適当な対照と比較したときの、抗炎症性サイトカインレベルの統計的に有意な任意の増加を含む。そのような増加には、例えば、抗炎症性サイトカインレベルの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90

10

20

30

40

50

%、100%、150%、200%またはそれ以上の増加を含めることができる。そのような増加には、例えば、抗炎症性サイトカインレベルの少なくとも約3%~15%、10%~25%、20%~35%、30%~45%、40%~55%、50%~65%、60%~75%、70%~85%、80%~95%、90%~105%、100%~115%、105%~120%、115%~130%、125%~150%、140%~160%、155%~500%またはそれ以上の増加を含めることもできる。抗炎症性サイトカインレベルのレベルのアッセイ方法は公知である。例えば、Leng S.ら、(2008年) J Gerontol A Biol Sci Med Sci 63巻(8号): 879~884頁を参照。抗炎症性サイトカインの生成のアッセイ方法には、多重ビーズアッセイ、ELISPOTおよびフローサイトメトリーが含まれる。例えば、Maeckerら(2005年) BMC Immunology 6巻: 13頁を参照。

10

【0059】

方法および組成物には、炎症性応答を減少させるか予防することができる、炎症誘発性サイトカイン生成を減少させるものも含まれる。本明細書で用いるように、炎症誘発性サイトカイン生成のレベルの減少は、適当な対照と比較したときの、被験体での炎症誘発性サイトカイン生成のレベルの統計的に有意ないかなる減少も含む。そのような減少には、例えば、炎症誘発性サイトカインのレベルの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の減少を含めることができる。サイトカインレベルのアッセイ方法は公知であり、例としては、Leng S.ら、(2008年) J Gerontol A Biol Sci Med Sci 63巻(8号): 879~884

20

【0060】

炎症性サイトカイン生成は、抗炎症性サイトカイン生成と炎症誘発性サイトカイン生成の比をアッセイすることによって測定することもできる。具体的な態様では、抗炎症性サイトカイン生成と炎症誘発性サイトカイン生成の比は、適当な対照と比較して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、300、600、900、1000倍またはそれ以上増加する。他の態様では、抗炎症性サイトカイン生成と炎症誘発性サイトカイン生成の比は、適当な対照と比較して約1から5倍、約5から10倍、約10から20倍、約20から30倍、約30から40倍、約40倍から60倍、約60倍から80倍、約80倍から約100倍、約100から200倍、約200倍から300倍、約300から400倍、約400から約500倍、約500から約500倍、約500倍から約700倍、約700倍から800倍、約800倍から約1000倍またはそれ以上増加する。抗炎症性サイトカイン生成と炎症誘発性サイトカイン生成の比の判定方法は、例えばLeng S.ら、(2008年) J Gerontol A Biol Sci Med Sci 63巻(8号): 879~884頁に見出すことができる。サイトカインの生成のアッセイ方法には、多重ビーズアッセイ、ELISPOTおよびフローサイトメトリーが含まれる。例えば、Maeckerら(2005年) BMC Immunology 6巻: 13頁を参照。

30

40

【0061】

炎症性障害

一部の実施形態では、本明細書の他の場所に記載される組成物および方法を用いて炎症を減少させることによって、免疫性および炎症性の障害を処置または予防することができる。例えば、本明細書に記載される方法および組成物によって処置または予防することができるであろう障害には、それらに限定されないが以下のものが含まれる: 関節炎(慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎)、乾癬、アトピー皮膚炎を含む皮膚炎; 慢性自己免疫性じんま疹、多発筋炎/皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、全身の強皮症および硬化、呼吸窮迫症候群、成人呼吸不全症候群(ARDS)、髄膜炎、アレルギー性鼻炎、脳炎、ブドウ膜炎、大腸炎、糸球体腎炎、アレルギー性状態、湿疹、喘息

50

、T細胞の浸潤および慢性炎症性応答を含む状態、アテローム硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着欠乏、全身性ループスエリテマトーデス（SLE）、ループス（腎炎、非腎臓、円板状、脱毛症を含む）、若年性糖尿病、多発硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカインおよびTリンパ球によって媒介される急性および後発性過敏性に関連する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばヴェーゲナー肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎（ANCAを含む）、無形成性貧血、クームス陽性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、免疫性溶血性貧血、例えば自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、悪性貧血、赤芽球癆（PRCA）、第V因子欠乏、血友病A、自己免疫性好中球減少、汎血球減少、白血球減少、白血球漏出を含む疾患、CNS炎症性障害、多臓器損傷症候群、重症筋無力症、抗原抗体複合体媒介性の疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、ランバートーイートン筋無力症症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スチーブンス・ジョンソン症候群、固形臓器移植拒絶（高パネル反応性抗体価、組織でのIgA沈着、その他のための前処置を含む）、移植片対宿主病（GVHD）、水疱性類天疱瘡、天疱瘡（全て落葉状、尋常性を含む）、自己免疫性多腺性内分泌障害、ライター病、スティッフマン症候群、巨細胞性動脈炎、免疫複合体性腎炎、IgA腎症、IgM多発性ニューロパシーまたはIgM媒介性神経病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫性血小板減少、自己免疫性精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫性疾患、原発性甲状腺機能低下症；自己免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）、亜急性甲状腺炎、特発性の甲状腺機能低下症、アジソン病、甲状腺機能亢進症、自己免疫性多腺症候群（または多腺内分泌症候群）、インスリン依存型糖尿病（IDDM）とも呼ばれるI型糖尿病およびシーハン症候群を含む自己免疫性内分泌疾患；自己免疫性肝炎、リンパ系間質性肺臓炎（HIV）、閉塞性細気管支炎（非移植性）対NSIP、ギラン・バレー症候群、大血管血管炎（リウマチ性多筋痛および巨細胞（高安の）動脈炎を含む）、中間血管血管炎（川崎病および結節性多発動脈炎を含む）、強直性脊椎炎、ベルジェ病（IgA腎症）、急速進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変症、セリアック病（グルテン性腸症）、寒冷グロブリン血、ALSまたは冠状動脈疾患。

【0062】

具体的な実施形態では、被験体で炎症を減少させることによって、心臓の障害を処置または予防する。本明細書で用いるように、心臓の障害には、それらに限定されないが以下のものが含まれる：心不全、例えば、それらに限定されないが、心臓肥大、左心不全および右心不全；虚血性心疾患、例えば、それらに限定されないが、狭心症、心筋梗塞、慢性虚血性心疾患および突然心臓死；高血圧性心疾患、例えば、それらに限定されないが、全身（左側）の高血圧性心疾患および肺（右側）の高血圧性心疾患；心臓弁膜症、例えば、それらに限定されないが、カルシウム沈着によって引き起こされる弁変性、例えば石灰化大動脈弁狭窄症、先天的二尖性の大動脈弁のカルシウム沈着および僧帽弁の輪状カルシウム沈着、ならびに僧帽弁の粘液腫様変性（僧帽弁脱出）、リウマチ熱およびリウマチ性心疾患、感染性心内膜炎および非感染性増殖、例えば全身性ループスエリテマトーデスの非細菌性血栓性心内膜炎および心内膜炎（リブマン・サックス心内膜炎）、カルチノイド心疾患および人工弁の合併症；心筋疾患、例えば、それらに限定されないが、拡張型心筋症、肥大型心筋症、収縮性心筋症および心筋炎；心膜疾患、例えば、それらに限定されないが、心膜流出および心膜血腫および心外膜炎、例えば急性心外膜炎および治癒した心外膜炎、およびリウマチ様心疾患；新生物心疾患、例えば、それらに限定されないが、原発性心臓腫瘍、例えば粘液腫、脂肪腫、乳頭状弾性線維腫、横紋筋腫および肉腫、ならびに非心臓性新生物の心臓への影響；先天心疾患、例えば、それらに限定されないが、左右シャント後期のチアノーゼ、例えば心房中隔欠損症、心室中隔欠損症、動脈管開存および房室中隔欠損症、右左シャント早期のチアノーゼ、例えばファローの四徴症、大動脈の転位、総動脈幹、三尖弁閉鎖および全体の肺静脈結合異常、閉塞性先天奇形、例えば大動脈の縮窄、肺動脈狭窄症および閉鎖症、ならびに大動脈狭窄症および閉鎖症、ならびに心臓

移植に関わる障害。

【0063】

医薬組成物

一部の実施形態では、L T Aの提示が減少した細菌株は、栄養補助剤および／または食品添加物などの機能性食品組成物の形で被験体に投与される。具体的な実施形態では、医薬組成物は、ホスホグリセロールトランスフェラーゼ（配列番号1および2に示すポリヌクレオチドおよびポリペプチドなど）をコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を減少させるように改変されている組換え体細菌を含む。他の実施形態では、抽出物が医薬組成物の形で被験体に投与される。本明細書の他の場所に記載されるように、投与は単一用量または多回用量投与を含むことができる。

10

【0064】

医薬組成物は、液体製剤または固体製剤であってよい。医薬組成物が固体製剤である場合は、それは錠剤、吸引錠剤、噛み錠剤、チューインガム、カプセル、小袋、粉末、顆粒剤、被覆粒子、被覆錠剤、腸溶被覆錠剤、腸溶被覆カプセル、融解ストリップまたはフィルムとして製剤化することができる。医薬組成物が液体製剤である場合は、それは経口溶液、懸濁液、乳剤またはシロップとして製剤化することができる。前記組成物は、それらに限定されないが、乳酸発酵食品、発酵乳製品、耐性デンプン、食物繊維、炭水化物、タンパク質およびグリコシル化タンパク質からなる群から独立して選択される担体材料をさらに含むことができる。

20

【0065】

本明細書で用いるように、用語「医薬組成物」は、要求される効果、すなわち胃腸管の炎症性障害の治療または予防が達成される限り、食品組成物、栄養補助食品、機能性食品、医療食品または栄養製品として製剤化することができる。前記食品組成物は、飲料、ヨーグルト、ジュース、アイスクリーム、パン、ビスケット、クラッカー、シリアル、ヘルスバー、スプレッドおよび栄養製品からなる群から選択することができる。食品組成物は、乳酸発酵食品、発酵乳製品、耐性デンプン、食物繊維、炭水化物、タンパク質およびグリコシル化タンパク質からなる群から選択される担体材料をさらに含むことができる。

【0066】

本発明により用いられるか本発明により生成される、本発明による医薬組成物は、不活性のビヒクルまたは薬剤として許容されるアジュバント、担体、保存料などの周知である他の物質を含むこともできる。

30

【0067】

本開示は、組換え体細菌のお互いの組合せ、および／または胃腸管の炎症性障害の処置で有益な1つまたはそれより多くの他の剤との組合せも含む。例えば、本発明の細菌は、胃腸管の炎症性障害の処置のための従来の抗炎症剤、例えばプレドニゾン、メサラミン、アザチオプリン、TNF阻害剤、メトトレキセートまたは6-メルカプトプリンの有効な用量と併用投与することができる。用語「併用投与」は、活性剤の同時投与と逐次的投与の両方を指す。当然ながら併用療法は本明細書で提供される剤に限定されず、炎症性障害の処置のための任意の組成物が含まれる。

【0068】

治療的有效量

「治療的有效用量」、「治療的有效量」または「有効量」は、被験体に投与されるときに炎症性応答を減少させるか、炎症性応答の増加を予防する、L T Aの提示が減少した組換え体細菌の量を意味する。「陽性治療応答」は、例えば、炎症性胃腸障害の症状の少なくとも1つの状態を向上させることを指す。

【0069】

治療薬の有効量は、意図する目標に基づいて決定される。用語「単位用量」は、被験体で使用するのに適する物理的に別個の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち適当な経路および処置療法に関連して所望の応答を生成するように計算される、治療組成物の所定量を含む。処置回数と単位用量の両方によって投与される量は、処置される被験体、被

50

験体の状態および所望の保護によって決まる。治療組成物の正確な量も、医者の判断によって決まり、各個体に固有である。一般に、組換え体細菌の投薬量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状态および過去の病歴などの因子によって異なる。具体的な実施形態では、約 10^4 から約 10^{12} CFU、 10^5 から 10^{11} CFU、 10^6 から 10^{10} CFU、 10^8 から 10^{10} CFU または 10^8 から 10^{12} CFU の範囲で細菌を投与することが望ましいかもしれない。

【0070】

本発明の一部の実施形態では、本方法は細菌の多回用量の投与を含む。本方法は、本明細書に記載される細菌を含む組成物の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40またはそれ以上の回数の治療的有效用量の投与を含むことができる。一部の実施形態では、用量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、14日、21日、30日または30日を超える期間中に投与される。組成物の多回用量の投与の頻度および継続期間は、炎症性応答を低減または予防し、それによって胃腸障害を処置または予防するようなものである。さらに、本発明の組換え体細菌の治療的有效量による被験体の処置には、単回処置を含めることができるか、一連の処置を含めることができる。処置のために用いられる細菌の有効投薬量は、特定の処置の過程で増減することができることも理解される。投薬量の変化は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載される炎症を検出するための診断アッセイの結果から得ること、および明らかにすることができる。

【0071】

寄託

出願人は、2011年1月10日に、American Type Culture Collection (ATCC)、Manassas, VA 20110 USAに、ATCC寄託番号PTA-11587でLactobacillus acidophilus NCK2025を寄託した。2011年1月10日にATCCに寄託された細菌培養は、本出願の出願日の前からNorth Carolina State University、100 Schaub Hall、Campus Box 7624、Raleigh, North Carolina、27695によって維持されていた寄託物からとられた。この寄託物へのアクセスは、出願の係属中、請求により、特許商標庁長官および長官によってその権利があると決定される者が利用できる。出願中のいかなる請求項の許可の後、出願人は米国特許法施行規則第1.808章に従って寄託物を一般に利用できるようにする。Lactobacillus acidophilus NCK2025のこの寄託物は、公的な受託所であるATCC受託機関において、30年間か、最近の請求から5年間か、または特許施行期間のいずれかのうちで最も長い期間にわたって維持され、その期間中に生存能力が無くなった場合には交換される。さらに、出願人は、寄託後のサンプルの生存能力の表示を提供することを含む、米国特許法施行規則第1.801~1.809章の要件の全てを有するか満たす。出願人は、生物学的材料の移動または商業でのその輸送に関する法律によって課されるいかなる規制も回避する権限を有しない。

【0072】

上で提供される記載を考慮して、以下の実施形態が提供される：
番号をつけた実施形態：

1. 細菌の表面上のリポテイコ酸 (LTA) の提示を減少させるように遺伝子改変されている、組換え体または単離された細菌。
2. ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように遺伝子改変されている、実施形態1の組換え体または単離された細菌。
3. 配列番号1に示す核酸配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている、実施形態1または2の組換え体または単離された細菌。

4. 配列番号1に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている、実施形態1または2の組換え体または単離された細菌。
5. プロバイオティック細菌である、前記実施形態のいずれか一つの組換え体または単離された細菌。
6. 前記プロバイオティック細菌が乳酸細菌である、実施形態5の組換え体または単離された細菌。
7. 前記乳酸細菌が *Lactobacillus* である、実施形態6の組換え体または単離された細菌。
8. 前記 *Lactobacillus* が *Lactobacillus acidophilus* である、実施形態7の組換え体細菌。 10
9. 前記遺伝子改変が *Lactobacillus acidophilus* NCFM で実施された、実施形態8の組換え体または単離された細菌。
10. 前記 *Lactobacillus acidophilus* が、ATCC受託番号PTA-11587の下で寄託されている *Lactobacillus acidophilus* NCK2025である、実施形態8の組換え体または単離された細菌。
11. 細菌を、前記細菌の表面上のリポテイコ酸(LTA)の提示を減少させるように遺伝子改変することを含む、組換え体または単離された細菌の作製方法。
12. 前記組換え体または単離された細菌が、ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように改変されている、実施形態11の方法。
13. 前記組換え体または単離された細菌が、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている、実施形態11または12の方法。 20
14. 前記組換え体細菌がプロバイオティック細菌である、実施形態11~13のいずれか一つの方法。
15. 前記プロバイオティック細菌が乳酸細菌である、実施形態14の方法。
16. 前記乳酸細菌が *Lactobacillus* である、実施形態15の方法。
17. 前記 *Lactobacillus* が *Lactobacillus acidophilus* である、実施形態16の方法。
18. 前記遺伝子改変が *Lactobacillus acidophilus* NCFM で実施された、実施形態17の方法。 30
19. 前記 *Lactobacillus acidophilus* が、ATCC受託番号PTA-11587の下で寄託されている *Lactobacillus acidophilus* NCK2025である、実施形態17の方法。
20. 前記 *Lactobacillus acidophilus* が、配列番号1に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように改変されている、実施形態17~19のいずれか一つの方法。
21. 被験体において炎症を減少させる方法であって、実施形態1~10のいずれか一つの組換え体または単離された細菌の治療的有効量を前記被験体に投与することを含む方法。 40
22. 被験体の胃腸管の炎症性障害を処置または予防する方法であって、実施形態1~10のいずれか一つの組換え体または単離された細菌の治療的有効量を被験体に投与することを含む方法。
23. 前記被験体が動物である、実施形態21または22のいずれか一つの方法。
24. 前記被験体が哺乳動物である、実施形態23の方法。
25. 前記被験体がヒトである、実施形態24の方法。
26. 前記被験体が家畜である、実施形態23の方法。
27. 前記被験体が農業動物である、実施形態23の方法。
28. 前記被験体が胃腸障害を有する、実施形態21~27のいずれか一つの方法。
29. 前記胃腸障害が、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥 50

満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 28 の方法。

30. 前記細菌が前記被験体における 1 つまたはそれより多くの抗炎症性サイトカインの生成を増加させる、実施形態 21 ~ 29 のいずれか一つの方法。

31. 前記抗炎症性サイトカインが IL-10 である、実施形態 30 の方法。

32. 前記細菌が前記被験体における 1 つまたはそれより多くの炎症誘発性サイトカインの生成を減少させる、実施形態 21 ~ 31 のいずれか一つの方法。

33. 前記炎症誘発性サイトカインが、IL-12、IL-6、IFN γ 、TNF α およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 32 の方法。

34. 前記細菌の前記治療的有効量が約 10^8 から 10^{12} CFU/日である、実施形態 21 ~ 33 のいずれか一つの方法。

35. 実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つの組換え体または単離された細菌を含む医薬組成物。

36. 医薬として使用するための、実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つの組換え体または単離された細菌。

37. 実施形態 23 ~ 27 のいずれか一つの被験体などの被験体の胃腸管の炎症性障害の処置または予防で使用するための、実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つの組換え体または単離された細菌。

38. 前記細菌が前記被験体における抗炎症性サイトカイン生成の増加を引き起こす、実施形態 36 または 37 の使用のための組換え体または単離された細菌。

39. 前記抗炎症性サイトカインが IL-10 である、使用のための実施形態 38 の組換え体または単離された細菌。

40. 前記細菌が前記被験体における 1 つまたはそれより多くの炎症誘発性サイトカインの生成を減少させる、実施形態 36 ~ 39 のいずれか一つの使用のための組換え体または単離された細菌。

41. 前記炎症誘発性サイトカインが、IL-12、IL-6、IFN γ 、TNF α およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 40 の使用のための組換え体または単離された細菌。

42. 前記細菌が治療的有効量で被験体に投与されるために製剤化され、前記細菌の治療的有効量が約 10^8 から 10^{12} CFU/日である、実施形態 36 ~ 41 のいずれか一つの使用のための組換え体または単離された細菌。

43. 前記胃腸障害が、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 36 ~ 42 のいずれか一つの使用のための組換え体または単離された細菌。

44. 医薬の製造における、実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つの細菌の使用。

45. 被験体、例えば実施形態 23 ~ 27 のいずれか一つの被験体の胃腸管の障害の処置または予防のための医薬の製造における、44 の細菌の使用。

46. 炎症性障害の処置のための医薬の製造における、実施形態 44 または 45 の細菌の使用。

47. 前記障害が、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 46 の細菌の使用。

48. 医薬としての、実施形態 1 ~ 10 のいずれか一つの細菌の使用。

49. 前記医薬が、被験体、例えば実施形態 23 ~ 27 のいずれか一つの被験体の胃腸管の障害の処置または予防のためである、実施形態 48 の細菌の使用。

50. 前記障害が炎症性障害である、実施形態 48 または 49 の細菌の使用。

51. 前記胃腸障害が、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される、実施形態 50 の細菌の使用。

10

20

30

40

50

【0073】

番号のついていない実施形態

第一の態様により、細菌の表面上のリポテイコ酸（LTA）の提示を減少させるように遺伝子改変されている、組換え体または単離された細菌が提供される。

【0074】

一実施形態では、組換え体または単離された細菌は、ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように遺伝子改変されている。具体的な実施形態では、組換え体または単離された細菌は、非改変対照と比較したとき、ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を約3%~15%、10%~25%、20%~35%、30%~45%、40%~55%、50%~65%、60%~75%、70%~90%、70%~80%、70%~85%、80%~95%、90%~100%だけ減少させるように遺伝子改変されている。

10

【0075】

さらなる実施形態では、組換え体または単離された細菌は、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15のいずれかに示す核酸配列またはその断片もしくは変異体と、少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている。

【0076】

さらなる実施形態では、組換え体または単離された細菌は、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15のヌクレオチド配列またはその断片もしくは変異体を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている。

20

【0077】

第二の態様により、細菌を、細菌の表面上のリポテイコ酸の提示を減少させるように遺伝子改変することを含む、組換え体または単離された細菌の作製方法が提供される。具体的な実施形態では、細菌は部位特異的突然変異誘発によって改変される。

【0078】

さらなる実施形態では、前記組換え体または単離された細菌は、ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現を減少させるように改変されている。

【0079】

ホスホグリセロールトランスフェラーゼの発現の減少は、DNA、RNAまたは翻訳後のレベルでの破壊の結果であってよいことが理解され、発現のそのような減少を達成するのに適する方法は当技術分野で公知であり、本明細書でさらに詳細に議論される。

30

【0080】

別の実施形態では、前記組換え体または単離された細菌は、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15のいずれかに示す核酸配列またはその断片もしくは変異体と、少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように遺伝子改変されている。

【0081】

さらなる実施形態では、*Lactobacillus acidophilus* は、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15に示すヌクレオチド配列またはその断片もしくは変異体を含むポリヌクレオチドの発現を減少させるように改変されている。

40

【0082】

さらなる実施形態では、組換え体または単離された細菌は、プロバイオティック細菌である。具体的には、乳酸細菌。より具体的には、*Lactobacillus*、特に *Lactobacillus acidophilus*。さらにより具体的には、遺伝子改変は *L. acidophilus* NC FMで実施される。

【0083】

具体的な実施形態では、組換え体または単離された細菌は、ATCC受託番号PTA-

50

11587の下で寄託されている *Lactobacillus acidophilus* NCK2025である。

【0084】

第三の態様では、本明細書の他の場所に記載される組換え体または単離された細菌の治療的有効量を被験体に投与することを含む、被験体で炎症を減少させる方法が提供される。

【0085】

一実施形態では、炎症の減少は、冠状動脈疾患または心不全などの心臓の疾患を処置または予防する。

【0086】

第四の態様では、本明細書の他の場所に記載される組換え体または単離された細菌の治療的有効量を被験体に投与することを含む、胃腸管の炎症性障害を処置または予防する方法が提供される。

【0087】

一実施形態では、被験体は動物、より具体的には哺乳動物である。

【0088】

別の実施形態では、被験体はヒトである。

【0089】

さらなる実施形態では、被験体は家畜である。

【0090】

さらなる実施形態では、被験体は農業動物である。

【0091】

さらなる実施形態では、被験体は胃腸障害を有する。

【0092】

具体的な実施形態では、胃腸障害は、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【0093】

細菌は、被験体で1つまたはそれより多くの抗炎症性サイトカインの生成を増加させることができることが理解されよう。

【0094】

具体的な実施形態では、抗炎症性サイトカインはIL-10である。

【0095】

別の実施形態では、細菌は、被験体で1つまたはそれより多くの炎症誘発性サイトカインの生成を減少させる。

【0096】

さらなる実施形態では、炎症誘発性サイトカインは、IL-12、IL-6、IFN γ 、TNF α またはその任意の組合せからなる群から選択される。

【0097】

さらなる実施形態では、細菌は治療的有効量で投与され、そこで、細菌の治療的有効量は約 10^8 から 10^{12} CFU/日である。

【0098】

第五の態様により、本明細書に記載される組換え体または単離された細菌を含む医薬組成物が提供される。

【0099】

第六の態様により、医薬として使用するための、本明細書に記載される組換え体または単離された細菌が提供される。

【0100】

第七の態様により、被験体の胃腸管の障害の処置または予防で使用するための、本明細書に記載される組換え体または単離された細菌が提供される。

10

20

30

40

50

【0101】

具体的には、障害は炎症性障害である。

【0102】

より具体的には、胃腸障害は、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【0103】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法によって用いるための組換え体または単離された細菌は、被験体において抗炎症性サイトカイン生成を増加させる。

【0104】

一実施形態では、抗炎症性サイトカインはIL-10である。

【0105】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法によって用いるための組換え体または単離された細菌は、被験体において1つまたはそれより多くの炎症誘発性サイトカインの生成を減少させる。

【0106】

さらなる実施形態では、炎症誘発性サイトカインは、IL-12、IL-6、IFN γ 、TNF α またはその任意の組合せからなる群から選択される。

【0107】

細菌は治療的有效量で提供され、そこで、細菌の治療的有效量は約 10^8 から 10^{12} CFU/日であることが理解されよう。

【0108】

第八の態様により、医薬の製造における、本明細書の他の場所に記載される細菌の使用が提供される。

【0109】

具体的な実施形態では、医薬は、被験体の胃腸管の障害を処置または予防するためのものである。

【0110】

さらなる実施形態では、障害は炎症性障害である。

【0111】

さらなる実施形態では、胃腸障害は、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【0112】

第九の態様により、医薬としての、本明細書に記載される細菌の使用が提供される。

【0113】

具体的な実施形態では、医薬は、被験体の胃腸管の障害を処置または予防するためのものである。

【0114】

さらなる実施形態では、障害は炎症性障害である。

【0115】

さらなる実施形態では、障害は、炎症性腸疾患、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、肥満、下痢、鼓脹、膨満、腹部けいれん、腹部疼痛、便秘およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【0116】

本明細書に記載される任意の態様に関して、被験体は、任意の適する被験体、例えば上の第四の態様に関して記載される被験体であってよいことが明らかとなる。

【0117】

さらなる態様が上に記載される。特別に記載されていないか明らかに不適合でない限り、1つの特定の態様に関して記載される任意の特徴が全ての他の態様に等しく適用できる

10

20

30

40

50

ことは、当分野の技術者に容易に明らかになる。

【0118】

以下の実施例は例示として提供され、限定するためではない。

【実施例】

【0119】

(実施例1)

*Lactobacillus acidophilus*でLTAの提示を減少させること。*L. acidophilus* NCFM (NCK56)で；遺伝子LBA0444～LBA0447が同定され、LTA生合成でのそれらの推定上の役割についてアノテートされた(図1B)。遺伝子LBA0444およびLBA0448は、推定上のrho非依存性ターミネーターが隣接しており(Kingsford C, Ayanbule KおよびSalzberg S (2007年) Genome Biology 8巻(2号): R22頁)、これらの2つの遺伝子が同時転写されてオペロンとして機能することを示す。LBA0444～LBA0447遺伝子はLTA生合成で推定上の役割を有するが、LBA0448はこのカスケードで役割を果たさないようである仮定的タンパク質である。

【0120】

*Lactobacillus*属の種は、次にT細胞免疫応答を誘導するDCで様々なシグナルを効果的に活性化することができる(Mohamadzadeh Mら、(2005年) Proc Natl Acad Sci USA 102巻(8号): 2880～2885頁; Konstantinov SRら、(2008年) Proc Natl Acad Sci USA 105巻(49号): 19474～19479頁)。DC機能の改変に関与する分子機構をさらに調査するために、我々は*L. acidophilus* NCK56でホスホグリセロールトランスフェラーゼ遺伝子(LBA0447)を特異的に欠失させた。このゲノム領域のPCR分析は、欠失突然変異体NCK2025が2kbpを失ったことを示した(図1C～D)。この領域の配列決定は、LBA0447の消去を確認した。親NCK56および突然変異体NCK2025の細胞壁抽出物のクロマトグラフ分析は、ホスホグリセロールトランスフェラーゼ遺伝子が欠失している突然変異体におけるLTAの不在を実証した。

【0121】

NCK2025処理DC。DCとNCK56またはLTA陰性突然変異体(NCK2025)との共培養は、NCK2025がDC表面でMHC II、CD40、CD80およびCD86を下方制御することを示した(図2A)。さらに、NCK56によるDCの処理はTLR1および2の転写を誘導したが、これらの2つのパターン認識受容体(PRR)はNCK2025処理DCでは活性化されなかった(図2B)。両方の株は、DCでIL-10生成を誘導した；しかし、このサイトカインの生成は、NCK2025と共培養したDCで有意に増加した(図2C)。同時に、IL-12およびTNF α は、NCK2025処理DCで有意に低減された(図2C)。腸間膜LN由来のT細胞をNCK56またはNCK2025で処理した骨髓由来DCと共培養することによって、T細胞増殖を判定した。T細胞増殖は、NCK56と比較して、T細胞と共培養されたNCK2025処理DCで有意に抑止された(図2D)。興味深いことに、NCK2025処理DCの上清に抗IL-10抗体を加えることはT細胞の増殖を部分的に回復させ、IL-10がDC:T細胞共培養でT細胞の増殖を調節する重要な因子であり得ることを示している。DC:T細胞共培養から収穫された上清の分析は、IL-10はT細胞で高度に誘導されたが、IFN γ 、IL-2およびTNF α は、NCK2025で処理されたマウスのT細胞から最小限に放出されたことを示した(図2E)。

【0122】

DSSによって誘導された大腸炎のNCK2025による改善。NCK2025の免疫調節特性を*in vivo*で判定するために、3%DSSへの曝露の前(予防的)か後(治療的)の4日間連続でNCK56またはNCK2025で処理したマウスで、DSSによって誘導された大腸炎を分析した。データは、DSSがベースライン(図3B)と比較して未処理のC57BL/6マウス(図3A、C)で臨床的および組織学的大腸炎を誘導

したことを示す。臨床的には、マウスは9日目後に体重が減り始め、13日目までにおよそ10%の全体重減少があり、10日目から11日目頃に重度の出血性下痢を起こした(図3A)。対照的に、NCK2025によるマウスの経口接種は、体重減少を有意に予防し、下痢および潜血陽性を低減させた(図3A)。全体として、「疾患活動性指数」(DAI)は2日目から有意に低減された。さらに、NCK2025によるマウスの前処理は、組織学的大腸炎スコアを90%(21.5 ± 1.4 から 2.3 ± 0.5 まで)まで低減した(図3B~F)。したがって、図3Eは、粘膜に限られた限定的な炎症を有する、無傷の非潰瘍上皮を表す。NCK2025による大腸炎の予防におけるLTA欠失の役割に特に対処するために、第3群のマウスをNCK56で処理した。野生型L. acidophilus NCK56は大腸炎の開始を予防せず(図3Aおよび3D)、マウスは無処理マウスと類似した臨床的および組織学的大腸炎を起こした。結腸組織によって発現されるサイトカインを解明するために、結腸をマウスの各群から抽出して一晩培養した。結腸サイトカインの分析は、IL-6、IL-12、TNF α およびIFN γ のレベルがNCK56およびDSSで処理されたマウスに由来する結腸でより高かったことを示す(図3G)。対照的に、IL-10生成は、NCK2025処理マウスに由来する結腸培養で有意に上昇した。IL-12、IL-6、IFN γ およびTNF α は、NCK2025処理マウスの結腸で有意に低減された(図3G)。

【0123】

さらに、DSSによって誘導された大腸炎でNCK2025に対してNCK56を接種されたマウスの遠位および近位領域での遺伝子の調査は、免疫刺激性(すなわち、CD40、CCL11)、シグナル伝達(すなわち、Stat1、Stat4)および増殖/アポトーシス/血管形成/プロテイナーゼ(すなわち、TIMP1、FASL、ICAM1)遺伝子の上方制御を明らかにし、NCK2025ではなくNCK56で処理されたマウスでの活性炎症性応答を示唆している(図7Aおよび7B)。興味深いことには、様々な調節、シグナル伝達および抗炎症性の遺伝子[すなわち、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PLA2G7)、血清反応因子(SRF)、TGF β 、(p21活性化キナーゼPAK1、RAF1、マトリックスメタロプロテイナーゼの組織阻害剤(TIMP1)、Tyk2]が、NCK56またはDSS単独ではなくNCK2025で処理されたマウスの結腸遠位(近位でない)領域で高く調節された(図7A)。このことは、DSSによって誘導された大腸炎がより重度である遠位結腸でそれらの調節機能を発揮するために、そのような遺伝子がかかり活性化されることを意味する。

【0124】

DSSによって誘導された大腸炎に及ぼすNCK2025の治療的効果。確立された大腸炎を有するマウスでNCK2025曝露の効果に取り組むために、マウスを3%DSSに先ず曝露させた後に、NCK56またはNCK2025で処理した。疾患の症状が起こると、マウスはNCK56またはNCK2025を4日連続で受けた(図4A)。データは、NCK56とNCK2025の両方が、確立された大腸炎を有意に異なる程度に弱毒化したことを示す。NCK2025によるマウスの処理は、体重の安定化ならびに下痢および血液損失の急速な解消をもたらしたが、NCK56処理マウスは、より遅い速度であるものの体重が減り続け、下痢および血液損失を解消するのが有意により遅かった(図4A)。組織学的分析は進行中の活動的な大腸炎および潰瘍を明らかにし、13日目のDSS処理マウスでは 16.8 ± 2.2 の大腸炎スコアであった(図4B、E)。NCK2025で処理されたマウスは有意に向上した大腸炎スコア(8.4 ± 2.2 、 $p = 0.01$)を有し、稀な潰瘍、再生した陰窩構造体および主に粘膜に限定された炎症を含む、加速された治癒を実証した(図4D、E)。再び、NCK56処理は組織学的大腸炎スコアを穏やかに向上させ(14.7 ± 2.0 、 $p = NS$)、上皮の原状回復があったが、粘膜および粘膜下組織の中では陰窩再生が限定的で進行中の活動的炎症があった(図4C、E)。興味深いことに、NCK2025処理マウスのサイトカイン分析は、これらのマウスの結腸でIL-10の上方制御ならびにIL-12、TNF α 、IL-6およびIFN γ の最小限の放出を示す(図4F)。対照的に、NCK56またはDSS単独で処理されたマ

10

20

30

40

50

ウスの結腸では $IL-12$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IFN\gamma$ および $IL-6$ が高度に誘導され、 $IL-10$ はこれらの群のマウスで最小限に放出された (図 4 F)。

【0125】

$NCK2025$ による結腸 $CD4^+FoxP3^+T$ 細胞の誘導。自身へのおよび片利共生の微生物叢への脱制御された免疫応答を抑制することにおける、 $CD4^+Treg$ 細胞の役割が最近強調されている (Fontenot JD、Gavin MA および Rudensky AY (2003 年) Nat Immunol 4 巻 (4 号) : 330~336 頁)。したがって、 $NCK56$ と比較して、 $C57BL/6$ マウスでそれが結腸 $CD4^+FoxP3^+Treg$ 細胞を増強するかどうか判定するために、 DC および処理マウスの結腸微小環境で $IL-10$ を誘導する $NCK2025$ を調査した。実際に、 $NCK56$ と比較して、 $NCK2025$ で処理されたマウスの結腸で $Treg$ 細胞が有意に誘導されたことを図 5 A および B は示し、これらの細胞のサプレッサー効果が粘膜で DSS によって誘導される誇張された炎症に影響を与えることができることを示唆している。

【0126】

$IL-10$ の調節効果。*in vitro* 試験からのデータ、ならびに *in vivo* サイトカイン分析は、大腸炎を改善する $NCK2025$ の効果が粘膜での $IL-10$ の誘導に依存することを示唆する (Kuhn R、Lohler J、Rennick D、Rajewsky K および Muller W (1993 年) Cell 75 巻 (2 号) : 263~274 頁)。これらの観察を確認するために、「予防的」および治療的な試験を $IL-10^{-/-}$ マウスで上記のように実施した。 $IL-10^{-/-}$ マウスは片利共生細菌への曝露の結果自然発生の $Th1$ 媒介性の大腸炎を起こし、ヒトクローン病に類似する深部の経壁潰瘍病変を伴う (Berg DJ ら、(1996 年) J Clin Invest 98 巻 (4 号) : 1010~1020 頁)。大腸炎の開始の前に、マウスを $NCK56$ または $NCK2025$ (または対照群として無処理) により 4 日間連続で接種した。大腸炎の開始は、前記のようにピロキシカム処理によって誘導した。臨床的には、体重減少を 28 日間監視し、組織学的大腸炎の程度を評価するために屠殺の後結腸を単離した。 $NCK56$ または $NCK2025$ のいずれによっても、誘導された大腸炎の最初の 2 週間に見られる、予想された体重減少からの保護はなかった (図 6 A)。総合すると、3 群の全ては類似した組織学的大腸炎および大腸炎スコアを生じ (図 6 B~E)、 $NCK2025$ の免疫調節特性のために内在性 $IL-10$ が必要とされることを示唆した。

【0127】

考察

腸管の免疫寛容を制御する免疫機構の崩壊は、慢性 IBD につながる (Macdonald TT および Monteleone G (2005 年) Science 307 巻 (5717 号) : 1920~1925 頁; MacDonald TT および Gordon JN (2005 年) Gastroenterol Clin North Am 34 巻 (3 号) : 401~412 頁、vii~viii)。 CD を有する患者の粘膜固有層での $IFN\gamma^+T$ 細胞の数の増加は、無制御の腸炎症および組織破壊 (Powrie F (1995 年) Immunity 3 巻 (2 号) : 171~174 頁) につながる、 IBD の発病における $Th1$ 分極化の関与を強く示唆する (Fuss IJ ら、(1996 年) J Immunol 157 巻 (3 号) : 1261~1270 頁; 25~27; Neurath MF、Duchmann R および Meyer zum Buschenfelde KH (1996 年) Dtsch Med Wochenschr 121 巻 (22 号) : 735~741 頁 (in ger); Neurath MF ら、(1996 年) J Exp Med 183 巻 (6 号) : 2605~2616 頁)。 $CD8^+$ (Cheroutre H (2006 年) Gastroenterology 131 巻 (2 号) : 667~670 頁; Vezys V および Lefrancois L (2002 年) J Immunol 169 巻 (12 号) : 6677~6688 頁) および $CD4^+T$ 細胞 (Elson CO ら、(2005 年) Immunol Rev 206 巻 : 260~276 頁; Wirtz S および Neurath MF (2000 年) Int J Colorectal Dis 15 巻 (3 号) : 144~160 頁) の両方は、高度活性化 DC から放出される炎症性サイトカイン (すなわち $IL-12$) によって末梢で活性化されるときに、腸管の炎症を誘発する。したがって、効果的な免疫療法は、調節シグナルによって一般に持続する免疫寛容崩壊の基礎をなす免疫シ

10

20

30

40

50

グナル伝達機構に関する深い知識を必要とする (Wirtz SR、(1999年) J Immunol 162巻(4号): 1884~1888頁)。

【0128】

近年では、*L. acidophilus* ゲノムの配列決定および注釈が、最終的に治療的適用につながる、粘膜の細胞性および分子事象に影響を及ぼすことができるこの細菌の細胞表面構成要素の遺伝子操作を可能にした (Konstantinov SRら、(2008年) Proc Natl Acad Sci USA 105巻(49号): 19474~19479頁; Altermann Eら、(2005年) Proc Natl Acad Sci USA 102巻(11号): 3906~3912頁)。*L. acidophilus* の細胞壁および細胞表面タンパク質は、細胞形状の維持およびDCを含む免疫細胞の活性化のために重要である構成要素を含む (Konstantinov SRら、(2008年) Proc Natl Acad Sci USA 105巻(49号): 19474~19479頁)。細菌と自然免疫細胞 (innate cell) (すなわちDC) との間の複雑なクロストークおよび大腸炎とのその関連性を研究するために、*L. acidophilus* でLTAのグリセロール鎖を合成するホスホグリセロールトランスフェラーゼをコードする遺伝子を欠失させた。データは、*L. acidophilus* のLTA陰性変異株であるNCK2025が、マウスDCで調節シグナル (すなわちIL-10) およびより少ない副刺激分子 (CD40、CD86) を誘導し、事実上これらの細胞を調節DCに変換したことを示す (Belkaid YおよびOldenhove G (2008年) Immunity 29巻(3号): 362~371頁)。そのような調節DCとCD4⁺T細胞との以降の相互作用は、T細胞活性化をかなり変化させた。さらに、NCK2025処理は、DSSで誘導された大腸炎を改善し、この細菌株による動物の前処置が、結腸組織学、体重減少、低減された下痢および潜血陽性によって実証されるようなDSSチャレンジに抵抗する調節免疫を誘導したことを示している。

【0129】

粘膜の中で明白な炎症性応答を調節する機構の1つは、IL-10である (Kraus TAら、(2005年) J Clin Invest 115巻(8号): 2234~2243頁; Kraus TAおよびMayer L (2005年) Curr Opin Gastroenterol 21巻(6号): 692~696頁)。このサイトカインが、DCだけでなくNCK2025処理マウスの結腸組織によっても高度に分泌されることを我々のデータは明らかに示し、この現象はDSS大腸炎の治療のための予防的戦略でも治療的戦略でも見られる。IL-10が、抗炎症性効果を発揮するその能力を通して自然免疫応答および適応免疫応答の両方を調整することが以前に示されている (Moore KW、de Waal Malefyt R、Coffman RLおよびO'Garra A (2001年) Annu Rev Immunol 19巻: 683~765頁; Trinchieri G (2007年) J Exp Med 204巻(2号): 239~243頁)。DCにおけるMHC II、副刺激分子およびIL-12の生成を下方制御することによって、このサイトカインはT細胞を機能的に抑制し、その全てはT細胞の分化および活性化に強く関与している (Moore KW、de Waal Malefyt R、Coffman RLおよびO'Garra A (2001年) Annu Rev Immunol 19巻: 683~765頁; de Waal Malefyt R、Abrams J、Bennett B、Figdor CGおよびde Vries JE (1991年) J Exp Med 174巻(5号): 1209~1220頁)。さらに、IL-10は、リンパ球でJak1、Tyk2およびStat3経路を含む多数のシグナル伝達カスケードを開始するその活性化IL-10受容体を通して (Finbloom DSおよびWinestock KD (1995年) J Immunol 155巻(3号): 1079~1090頁)、CD8⁺細胞傷害性T細胞 (CTL)、B細胞およびTh1分極化も調節する (Moore KW、de Waal Malefyt R、Coffman RLおよびO'Garra A (2001年) Annu Rev Immunol 19巻: 683~765頁)。これらの観察は、粘膜寛容の調節および維持が、病原性CD4⁺T免疫応答を著しく改変するIL-10によってきわどく支配されることを実証し、ここで提示される知見と一貫する。さらに、重度の大腸炎を起こすIL-10欠損マウスを用いて、無害な抗原に応じてのIL-10の重要な役割が最近実証された (Kuhn R、Lohler J、Rennick D、Rajewsky KおよびMuller W (1993年) Cell 75巻(2号): 263~274頁)。上で見ら

れるように、NCK2025の免疫調節効果は、IL-10^{-/-}で確立された大腸炎を完全に元に戻すのに十分でなかった；しかし、予防的／治療的な方法で与えられたときにそれは大腸炎の誘導を実際に抑止し、炎症の開始の調節におけるIL-10の重要な役割を鮮明にした。

【0130】

重要なことに、IL-10分泌Treg細胞が、効率的なT細胞免疫の誘導を次に調節して付随的な組織傷害を制御する(Matarese G、De Rosa VおよびLa Cava A (2008年) Trends Immunol 29巻(1号):12~17頁) DCの炎症特性を制御するという考えを、益々多くの証拠が裏づける(Lund JM、Hsing L、Pham TTおよびRudensky AY (2008年) Science 320巻(5880号):1220~1224頁)。この点に関しては、L. acidophilus LTA陰性変異株処置が、マウスの結腸でCD4⁺ FoxP3⁺ Treg細胞数を増加させたことを我々は示す。FoxP3遺伝子での突然変異がTh1およびTh2サイトカインシグナルの無制御の増殖およびかなりの上昇をもたらすヒトと齧歯動物の両モデルで以前に実証されているように、これらの観察は炎症性障害におけるTreg細胞の重要な役割を強く裏づける(Fontenot JD、Gavin MAおよびRudensky AY (2003年) Nat Immunol 4巻(4号):330~336頁)。IL-10を調節することができる追加の機構ならびに自然免疫細胞およびT細胞に対するその以降の効果は、未定のままである。L. acidophilusでのLTA合成に参与する遺伝子全体の完全な欠失は、腸管の微小環境にかなりの影響を及ぼして、調節シグナル(すなわちIL-10、Treg細胞)を誘導し、誘導された炎症性免疫応答の間に細胞共存を回復することができる誘導細菌をもたらす。L. acidophilusは、DC機能を著しく変更するS層タンパク質の特異な提示を表す(Konstantinov SRら、(2008年) Proc Natl Acad Sci USA 105巻(49号):19474~19479頁、Mohamadzadeh M、Duong T、Sandwick SJ、Hoover TおよびKlaenhammer TR (2009年) Proc Natl Acad Sci USA 106巻(11号):4331~4336頁)。L. acidophilusのS層は3つのS層A、BおよびX遺伝子からなり(Goh YJら、(2009年) Appl Environ Microbiol 75巻(10号):3093~3105頁、Goh YJおよびKlaenhammer TR (2009年) Front Biosci 14巻:1362~1386頁)、そこで、「自己集合」S層タンパク質AまたはBはこの細菌の表面を覆う主要なタンパク質である。腸に永久に定着しない外来細菌での遺伝子改変は、プロバイオティック微生物を投与することによって免疫応答が調節されている(すなわち活動的IBD)か、平静が保たれている(すなわち腸管感染)場合に、より多くの治療選択肢を提供することができる。これは、経口免疫応答の調節を最適化することができる治療用ビヒクルの開発を促進する。したがって、自己免疫性疾患に対してそのようなプロバイオティック介入を確立することは、より良い臨床転帰を達成するために、様々な免疫学的観点から慎重に編成されなければならない。

【0131】

第1に、炎症は通常の免疫の一部であるので、炎症の支配的な調節は恒常的であるべきでない(Nathan C (2002年) Nature 420巻(6917号):846~852頁)。腸に定着する細菌は、腸管の調節／副刺激免疫の均衡を維持するために必要とされる免疫応答を害し得る。例えば、感染の間、炎症過程は、感染からの回復を促進する病原体の認識、ならびに自然免疫応答および適応免疫応答の活性化を可能にする。したがって、微生物排除を達成し、様々な免疫カスケードおよび病原体の存在による不必要な組織傷害をさらに予防するために、連続する事象を編成する炎症は、適切に段階づけられ、調節されなければならない。そのような炎症過程は、炎症性応答の拡大、抑制または調節を引き起こすことができる特異的なチェックポイントおよびフィードバックループを通して制御することができる。そのような正および負のフィードバックループは、炎症性応答を媒介し、その制御で調節的な役割を最終的に演ずる様々な分子に依存する。重要なことに、細菌のクリアランスの方へシグナルを動員する能動免疫は、炎症性シグナルによって部分的に誘導される調節シグナル(すなわちIL-10)によって制御される最適な細胞性同時

刺激を必要とする。

【0132】

第2には、一過性調節免疫を達成するために、細菌種を含む手段は慎重に選択され、用いられなければならない。この点に関しては、炎症を弱めるための、広く用いられているプロバイオティック微生物 *L. acidophilus* NCFMのLTA欠失誘導体の遺伝子構築は、我々の手法で助けになった。この細菌は新しい遺伝子またはDNA配列を抱えず、腸に永久に定着しないので、それは、経口的に接種されたときに調節免疫応答を誘導するための理想的なビヒクルの役割をすることができる。このことは、炎症を低減させる目標が達成されると、腸で「正常な」免疫を再確立するためにプロバイオティックサプリメントのいずれも停止することができることを意味する。最後に、これらの研究は、感染などの疾患で効果的な免疫活性化に必要な副刺激シグナルを無視することなく、*L. acidophilus*でのLTAの欠失がどのように自然免疫細胞で調節機構を開始するかを証明する。

10

【0133】

全体として、標的の予防的または治療的な戦略は、細胞性相互作用が深く理解され、自己免疫、炎症または抗炎症性応答で頂点に達する重要な分子が同定されるときに有効になる。

【0134】

方法

試薬。ピロキシカムおよびスリンダクは、Sigma (St. Louis, MO) から得られた。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) は、MP Biochemicals (Solon, OH) から得られた。NS-398は、Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) から得られた。CD4、CD25、FoxP3、CD3、CD11c、CD11b、CD40、CD80、CD86、IL-10 およびマウスGM-CSFのためのモノクローナル抗体は、Invitrogen (Carlsbad, California) およびeBioscience (San Diego, CA) から購入された。

20

【0135】

細菌株。*L. acidophilus*のNCK56およびNCK2025を1%で接種し、de Man、RogosaおよびSharpeブロス (MRS、Difco) において37°Cで15時間増殖させた。その後、各培養の1mlを50mlの新鮮なMRSに移し、37°Cで18時間インキュベートした。*L. acidophilus*株のコロニー形成単位 (CFU) の数は、600nmで光学濃度を測定することによって判定した (Greene JDおよびKlaenhammer TR (1994年) Appl Environ Microbiol 60巻 (12号) : 4487~4494頁)。細胞を遠心分離によって収穫し、滅菌PBSで2回洗浄し、20%グリセロールを含むPBSに 5×10^8 CFU/mlで再懸濁し、その後 *in vitro*で未熟なDC (1:1) を刺激するために用いるまで、-80で保存した。マウスの経口接種のために、48時間増殖させた細菌を滅菌PBSで2回洗浄し、PBSに 5×10^9 /mlで再懸濁し、マウスの経口接種のために用いた (5×10^8 cfu / 100 μ l PBS / マウス)。

30

40

【0136】

マウス。6~8週齢のC57BL/6、およびIL-10^{-/-} (C57BL/6バックグラウンド) マウスが、Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) およびGermantown, NYから購入された。マウスは、Northwestern Universityの動物管理施設で、特定病原体除去、無ヘリコバクター条件の下で、マイクロアイソレーターケージで維持した。IL-10^{-/-}マウスの結腸で、炎症のいかなる自然発生の徴候も観察されなかった。実験は、Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH-72-23) のNIHガイドラインに従って公認機関で実施され、動物プロトコルは地域の倫理委員会の承認を得た。

50

【0137】

ホスホグリセロールトランスフェラーゼを標的にする。標準の組込みおよび切除方法、手段および株を用いて、ホスホグリセロールトランスフェラーゼ (LBA0447) の欠失により、*L. acidophilus* NCK56 の突然変異株を構築した (Pfeiler EA および Klaenhammer TR (2009 年) Appl Environ Microbiol 75 巻 (18 号) : 6013 ~ 6016 頁、Russell WM および Klaenhammer TR (2001 年) Appl Environ Microbiol 67 巻 (9 号) : 4361 ~ 4364 頁)。LBA0447 に隣接する 2 つの標的断片、Del1_SphI および Del2_BglII を含む、pORI28 欠失ベクターを構築した。二重交差組込みおよび切除事象の後、ゲノムで LBA0447 の 1, 984 bp の欠失を有する NCK2025 が回収された。NCK2025 の LBA0447 領域での PCR アンプリコンおよび DNA 配列決定は、約 2 kbp の欠損を確認し、欠失を囲む遺伝子で追加の突然変異を明らかにしなかった。

10

【0138】

LTA 生化学分析。*L. acidophilus* の NCK56 (5×10^8 / cfu / 10 ml) および NCK2025 (5×10^8 / cfu / 10 ml) を、ERM なしの deMan、Rogosa および Sharpe プロス (MRS、Difco、Lawrence、KS) の冷凍保存株 (-80°C) から 37°C で増殖させた。その後、NCK56 および NCK2025 での LTA の発現を、以前に記載されているように分析した (Morath S、Geyer A および Hartung T (2001 年) J Exp Med 193 巻 (3 号) : 393 ~ 397 頁)。簡潔には、株 NCK56 と NCK2025 の両方の冷凍抽出物を pH 4.7 のクエン酸緩衝液 (0.05 M) で溶解し、その後 15 分間のシンジケート化が続いた。室温で 20 分間攪拌しながら、細菌溶解物 (30 ml) を n-ブタノールの等量と混合した。40 分の遠心分離 (17, 200 $\times$ g) の後、2 回目の抽出のために新鮮なクエン酸緩衝液を添加する前に水相を収集した。この再抽出を 2 回実行し、3 つの水相をプールして凍結乾燥した。クロマトグラフィー出発緩衝液 (35 ml、0.1 M 酢酸アンモニウム中の 15% n-プロパノール、pH 4.7) への試料の再懸濁の後、全ての試料を遠心分離 (26, 900 $\times$ g で 1 時間) にかけて、濾過した (0.2 μm)。両方の細菌株からの凍結乾燥材料を 0.7% トリフルオロ酢酸で溶解し、各株からの 0.45 mg の抽出物を HPLC によって分析した。吸光度を 260 nm で連続的に監視して、クロマトグラフを得た。

20

30

【0139】

細胞培養。マウス大腿骨を切り取り、周囲の組織から機械的に精製し、冷たい PBS を用いて骨髓を洗い流した。赤血球を溶解するために、細胞をトリス緩衝塩化アンモニウムで処理した。その後、CD19、CD3、MHC II および Gr-1 に対する特異抗体 (PharMingen、San Diego、CA) によって、B 細胞、T 細胞、IA⁺ 細胞および Gr-1⁻ 顆粒球を明確に取り出した。残りの細胞は IA⁻ であり、6 穴プレートで、マウス GM-CSF だけ (25 ng/ml) を含む 10% ウシ胎児血清 (FBS) を加えた RPMI 1640 完全培地で 6 日間培養した。一日おきに、培養に GM-CSF を含む新鮮な培地を供給した。6 日目に細胞を収穫して、異なる実験のために用いた。T 細胞の活性化および増殖を試験するために、NCK56 または NCK2025 を 4 日連続で C57BL/6 マウスに投与した (5×10^8 CFU / 100 μl / マウス)。1 週後に、マウスを屠殺して、各群のマウスの腸間膜 LN を単離した。腸間膜 T 細胞は、負磁気ビーズ除去によって濃縮した。T 細胞の活性化および増殖をアッセイするために、NCK56 または NCK2025 で処理された DC および未処理の DC (96 穴プレートに 10^4 / ウェル) を、無血清培地で 5 日間、単離腸間膜 LN CD4⁺ T 細胞 (10^5 / ウェル) と段階的な用量で培養した。その後、96 穴プレートの各ウェルの 25 μl を収穫して、サイトカイン分析のために冷凍した。次に最後の 16 時間、細胞をウェルにつき 0.5 μCi [³H] チミジンでパルスした (New England Nuclear) (Pulendran B ら、(2004 年) Eur J Immunol 34 巻 (1 号) : 66 ~ 73 頁)。一部の実験では、抗 IL-10 抗体 (最終濃度 100 ng/ml) を DC : T 細胞共

40

50

培養でそれぞれ用いた。

【0140】

DSS誘導大腸炎。ワクチン接種／予防試験のために、C57BL／6マウスの群（マウス10匹／群）に、NCK56またはNCK2025（ 5×10^8 cfu／100 μ l PBS／マウス）を4日間連続で経口接種した。これらの群のマウスおよび対照マウスは、6日周期の飲料水中の3％DSSを1回受け、続いて通常の飲料水を1日受け、その後8日目に屠殺された。非接種群でDSSの第1周期の後に急性の大腸炎が観察された。体重減少、下痢および糞便の潜血陽性（FOB）を含む疾患の進行が、試験の全期間中に監視された。その後、マウスを屠殺し、結腸断面スライスロールを10％ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。組織切片（4 μ m）をヘマトキシリン－エオジン（H & E）で染色し、以前に記載されているように盲目的にスコアリングした（Cooper HSら、（1993年）Lab Invest 69巻（2号）：238～249頁、Murthy SNら、（1993年）Dig Dis Sci 38巻（9号）：1722～1734頁）。0から28のスケールに基づく格付けは、炎症性浸潤の程度、びらん、潰瘍または壊死の存在、ならびに病変の深さおよび表面伸展を考慮する。処理試験のために、3群のC57BL／6マウス（10匹／群）は大腸炎を開始するために5日周期の3％DSSを最初に受け、群の2匹はその後4日間連続でNCK56またはNCK2025による経口栄養（ 5×10^8 cfu／100 μ l PBS／マウス）を通して処理された。上のようにマウスが屠殺されて結腸が調査されたプロトコルの13日目まで、疾患の進行が監視された。

【0141】

結腸組織培養。結腸組織培養を、前述のとおり実施した（Sellon RKら、（1998年）Infect Immun 66巻（11号）：5224～5231頁）。簡潔には、3％DSS適用の前か後にL. acidophilus株で処理された各マウス群の結腸組織を、冷PBSで完全に洗った。組織を1cm片に切断し、280 rpmで30分間、ゲンタマイシン（50 μ g／ml）を含む完全RPMI 1640中で振盪させた。5％ウシ胎仔血清（FCS）、50 μ g／mlゲンタマイシンおよび1％ペニシリン／ストレプトマイシン／アムホテリシンBを追加したRPMI 1640培地で、結腸組織を37℃で18時間培養した。上清を次に収集し、サイトカイン分析のために用いるまで－80℃で保存した。

【0142】

IL-10^{-/-}大腸炎。C57BL／6 IL-10^{-/-}の群（10／群）を、病原体除去ハウジングから従来のハウジングに移し、1週間順応させた。次にマウスにNCK56またはNCK2025（ 5×10^8 cfu／100 μ l PBS／マウス）を4日間連続で接種し、次に、大腸炎の開始を速め、同調させるために、以前に記載されているように（Berg DJら、（2002年）Gastroenterology 123巻（5号）：1527～1542頁）、低用量のピロキシカムを1週間与え、続いて高用量のピロキシカムを1週間与えた。標準飼料を2週間与えた後（28日目）、マウスを屠殺し、結腸断面スライスロールを10％ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。以前に記載されるとおり（Berg DJら、（2002年）Gastroenterology 123巻（5号）：1527～1542頁）、組織切片（4 μ m）をH & Eで染色し、0から4のスケールで盲目的にスコアリングした。

【0143】

フローサイトメトリー。L. acidophilus処理および未処理のDC（ 5×10^5 ）を表面マーカーモノクローナル抗体と一緒に4℃で30分間インキュベートし、0.1％FCSを加えた大量のPBSで洗浄し、0.1％パラホルムアルデヒドで固定し、標準のCELLQUEST獲得分析ソフトウェア（Becton Dickinson）を用いることによってFACSCalibur 4レーザーサイトメトリーで分析した。1条件につき少なくとも10⁴個のゲート付事象が得られた。一部の実施形態では、結腸リンパ球を導くために、マウスの群（マウス5匹／群）に、NCK56またはNCK2025（ 5×10^8 cfu／100 μ lの無菌PBS／マウス）を4日間連続で接種した。以

前に記載されるとおり (Haddad Wら、(2003年) J Exp Med 198巻(3号): 369~377頁)、マウスを屠殺し、結腸を洗い、単一の細胞を粘膜固有層から単離した。リンパ球をPercolを用いて濃縮し、抗CD4 FITC、CD25 APC抗体および7AADで染色した。その後、染色された細胞を固定し、透過性化させ、抗FoxP3 PEまたはアイソタイプ抗体で染色し、FACSCaliburによって分析した。

【0144】

リアルタイムPCR。RNeasyミニキット(Qiagen、MD)を用いて、骨髄DCから全RNAを単離した。5µgのRNAからcDNAを合成するために高容量cDNA逆転写キットを用い、TLR1およびTLR2遺伝子の発現は、Power Syberグリーン2×PCRマスターミックスを備えたABI7500リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いてリアルタイム半定量PCRで判定した。ゲノムDNAの増幅を排除するために、TLR1(フォワード-TTAATGAGTGTGGTGAATGCAGTTG; リバース-GAGCATTTGCCACATGGGTATAG) およびTLR2(フォワード-CAAGCGTCAAACTCTCAGAGGAT; リバース-ACACCCCAAGAGCATCACAATG) のためのプライマーを、イントロン接合部にわたる領域のために選択した。結果は、内因性の対照(フォワード-GTCGTGGATCTGACGTGCC; リバース-TGCCCTGCTTCACCACTTC)としてGapdhを用いるddCT法を用いる対照試料と比較した、増加倍数を反映する。

【0145】

低比重cDNAマイクロアレイ: DSS単独、NCK56-DSSまたはNCK2025-DSSで処理された各群のマウス(5×/群)の結腸遠位および近位領域をPBSで洗い流し、RNA安定化のためにRNALater(Qiagen、MD)に直ちに浸漬した。RNeasyミニキット(Qiagen、MD)でRNAを抽出し、Agilent Nanochip Bioanalysis(Agilent、Santa Clara、CA)を用いて質を評価した。用いた全ての試料は、7を超えるRNAインテグリティ番号(RIN)を有していた。マイクロアレイのための逆転写およびハイブリダイゼーションは、製造業者(Eppendorf DualChip microarray、Germany)によって記載されているとおりに実行した。簡潔には、最初にオリゴ(dT)_{12~18}プライマー(Invitrogen)と一緒に70℃で10分間試料をインキュベートし、続いてRTミックス(Superscript III、dNTP(Invitrogen)、ビオチン標識ATPおよびCTP(Perkin Elmer、Waltham、Massachusetts))を加え、42℃で90分間、次に70℃で15分間インキュベートすることによって、6µgのRNAを逆転写した。RNアーゼHを加え、試料を37℃で20分間、続いて95℃で3分間インキュベートして反応を終了させた。生じたcDNAをハイブリダイゼーションチャンバーに加え、エッペンドルフサーモミキサーで1400rpmで混合しながら60℃で一晩インキュベートした。製造業者(Eppendorf、Germany)によって記載されているとおりに、スライドを洗浄し、Silverquant検出系を用いてビオチン組込みを検出することによってRNAレベルを判定した。分析は、Silverquant分析ソフトウェア(Eppendorf、Germany)を用いて、試料と同じ結腸領域からの対照との比較によって実施された。

【0146】

本明細書で指摘した全ての刊行物および特許出願は、本発明が関連する分野の技術者のレベルを示すものである。全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的におよび個々に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0147】

上記の発明は理解の明快性のために例示および例として多少詳細に記載されたが、添付

10

20

30

40

50

【図 1】

A

ホスホグリセロールトランスフェラーゼ

ジアシル
グリセロール

グリコシルトランスフェラーゼ

糖脂質

膜タンパク質

細胞質

LTA

糖
グリセロール
脂肪酸アシル
糖

遺伝子	<i>L. acidophilus</i> NCfM ORF
グリコシルトランスフェラーゼ	LBA0444, LBA0445
膜タンパク質	LBA0446
ホスホグリセロールトランスフェラーゼ	LBA0447

B

C

プライマー F

プライマー R

プライマー F

プライマー R

D

3000 bp

2000 bp

1600 bp

1000 bp

3042 bp (NCK56)

LBA0447Δ

1058 bp (NCK2025)

【图 2】

A

Flow cytometry histograms showing the expression of maturation markers (MHCIIFITC, CD40PE, CD80PerCep, CD86APC) on DC-NCK2025 (black), DC-NCK56 (grey), and DC alone (white). The x-axis represents fluorescence intensity, and the y-axis represents cell count.

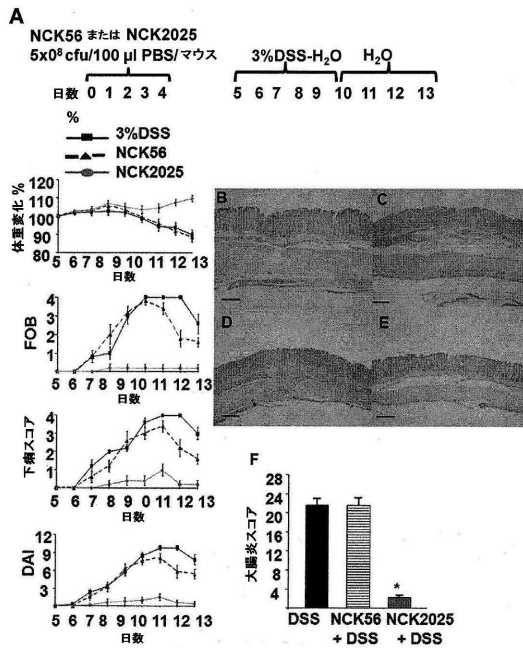
B

Bar graphs showing the production of cytokines (pg/ml) by DC alone, DC-NCK56, and DC-NCK2025. The y-axis represents cytokine concentration in pg/ml. The legend indicates: ■ IL-12, ■ IL-10, ■ IL-6, ■ TNFα.

Condition	IL-12 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNFα (pg/ml)
DC 单独	~1	~1	~10	~100
DC-NCK56	~72	~8	~850	~1750
DC-NCK2025	~15	~42	~600	~700

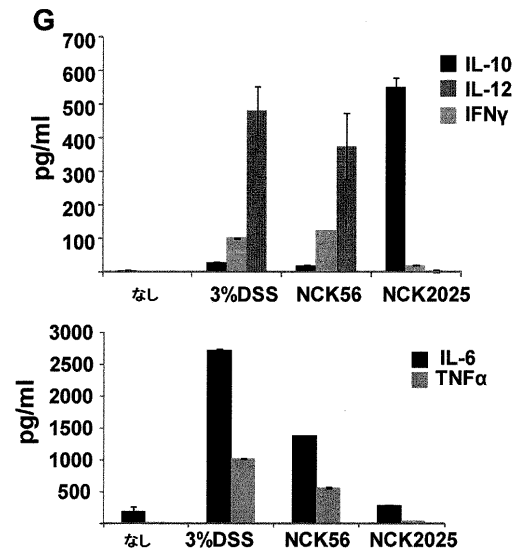
【図 3 A】

Figure 3A



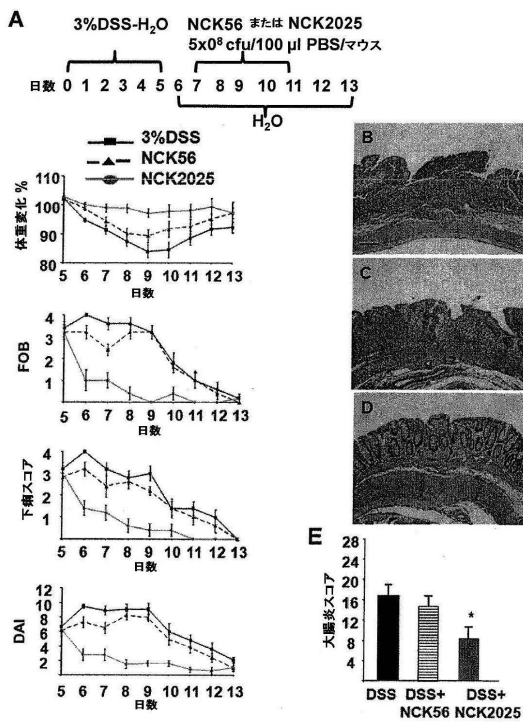
【図 3 B】

Figure 3B



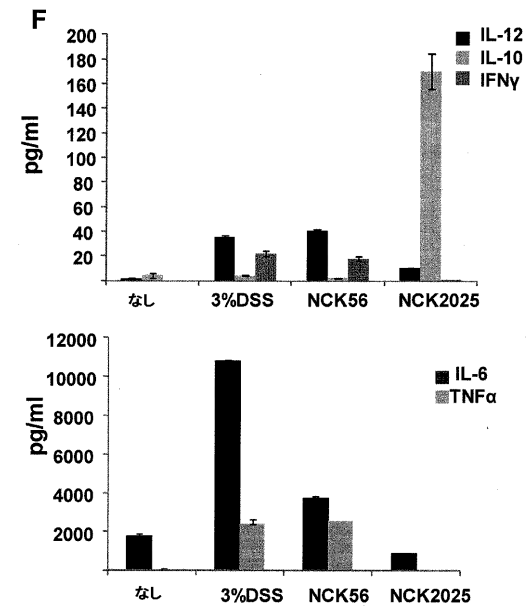
【図 4 A】

Figure 4A



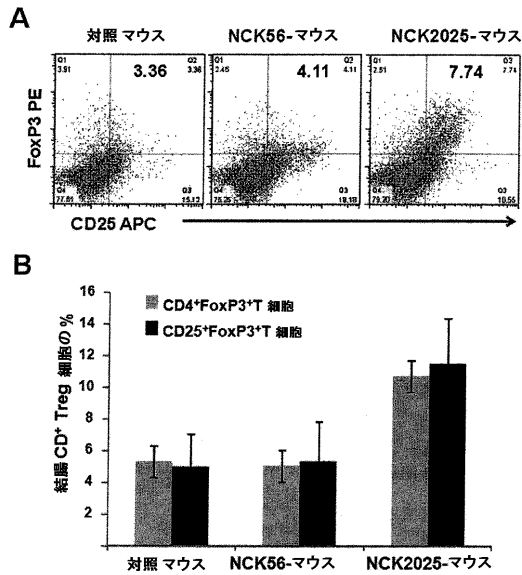
【図 4 B】

Figure 4B



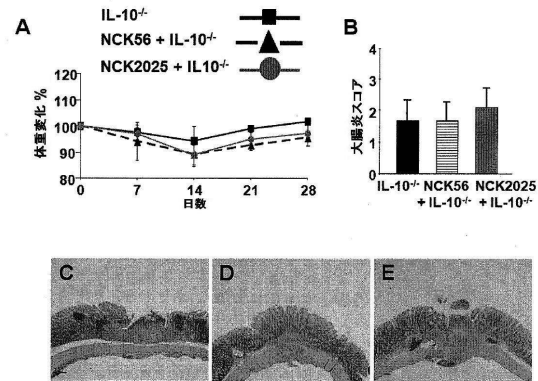
【図 5】

Figure 5



【図 6】

Figure 6



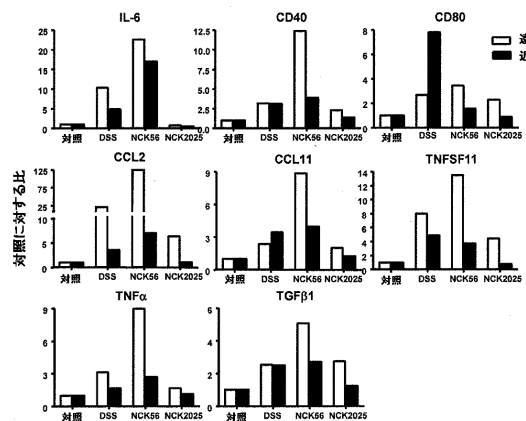
【図 7 A】

Figure 7A

	近位			遠位		
	DSS	NCK56	NCK2025	DSS	NCK56	NCK2025
免疫細胞						
CD3	13.99	46.26	8.09	2.73	17.83	1.96
CD4	14.44	67.45	10.04	2.14	13.43	3.75
CD8	24.43	107.13	22.07	3.97	16.95	2.09
CD45	18.14	27.90	6.70	4.05	8.56	1.21
CD6	7.15	25.51	6.08	3.30	6.71	2.07
CD44	1.17	0.99	1.41	4.72	2.55	2.78
CD44	1.13	1.35	1.47	1.98	1.52	1.01
CD44	1.28	1.21	1.49	2.01	2.09	1.43
CD4	0.91	1.06	1.08	2.76	2.17	2.24
CD44	3.23	10.42	8.50	3.29	4.83	2.12
CD44	1.07	1.76	2.41	1.12	1.24	0.95
CD4	0.97	1.41	1.78	1.16	1.11	1.10
CD44	2.23	4.49	2.62	3.08	2.77	1.80
シグナル伝達						
CD4	0.72	0.95	0.95	1.02	0.88	1.07
CD44	1.09	1.03	1.36	1.06	1.20	0.86
CD44	1.07	0.93	1.08	1.09	1.31	1.01
CD44	0.72	0.83	1.06	1.32	1.22	0.93
CD44	0.70	0.61	1.33	1.34	1.33	1.08
CD44	6.89	13.72	4.44	1.95	2.84	1.64
CD44	0.99	1.38	1.79	1.21	1.28	1.04
CD44	0.74	1.40	1.11	1.84	1.20	1.40
CD44	1.01	1.65	1.46	1.38	1.24	1.31
CD44	1.06	1.47	1.95	1.88	1.49	1.25
CD44	23.09	56.33	27.62	4.74	20.73	1.78
CD44	0.91	1.42	1.91	1.36	1.63	1.16
免疫因子						
CD44	4.17	10.87	3.33	2.79	0.54	1.76
CD44	28.59	129.23	23.96	3.13	14.98	1.53
CD44	2.19	4.64	2.58	2.32	3.53	1.19
CD44	3.83	17.92	4.11	2.49	4.09	1.61
CD44	4.36	13.18	1.63	2.18	2.40	0.93
CD44	3.96	4.60	3.02	4.41	2.38	1.18
CD44	3.49	6.26	2.70	3.08	2.66	1.65
CD44	0.85	0.61	0.72	1.66	0.83	1.06
CD44	65.09	146.68	32.46	4.92	44.98	2.17
CD44	0.80	0.69	0.79	2.34	2.16	1.46
CD44	7.87	28.37	9.26	2.11	12.61	0.34
CD44	0.92	0.56	1.08	1.17	1.23	0.98
CD44	0.99	1.45	1.16	0.57	0.57	1.09
CD44	1.90	1.52	1.46	0.83	1.15	0.86
CD44	1.03	1.62	1.73	2.92	1.84	1.38
CD44	5.49	21.85	6.72	2.23	3.89	1.41
CD44	0.86	0.66	1.32	3.67	1.37	0.98
CD44	9.19	17.39	5.77	1.62	3.15	1.42
CD44	3.65	7.37	3.40	2.87	3.57	2.17
CD44	3.46	9.28	3.37	1.36	3.80	1.36
CD44	0.89	1.26	1.70	2.01	1.76	1.78
CD44	0.88	1.79	1.79	3.57	3.35	2.15
CD44	1.05	1.46	1.71	2.36	0.93	0.71
CD44	3.42	11.64	3.54	2.71	2.08	0.54
CD44	1.57	3.27	2.14	1.40	2.73	2.07
CD44	1.16	1.71	2.25	1.03	1.30	1.10
CD44	1.21	2.14	1.89	1.38	1.91	1.18
CD44	1.10	2.35	2.62	2.44	1.47	0.86
増殖/アポトーシス/血管新生/接着						
CD44	1.37	2.03	1.84	1.31	1.45	0.89
CD44	2.82	8.42	5.16	2.45	8.23	0.38
CD44	1.48	2.39	1.78	1.37	1.84	1.25
CD44	1.37	4.03	1.10	2.66	1.93	0.82
CD44	4.13	7.71	2.81	1.43	2.86	1.07
CD44	0.66	0.77	0.95	0.98	1.09	0.88
CD44	5.77	18.07	4.99	5.36	4.30	1.36
CD44	0.75	1.78	1.51	3.32	1.84	1.38
CD44	6.81	23.84	8.93	3.80	8.08	1.00
CD44	5.74	18.52	4.40	1.99	6.78	1.30
CD44	1.44	4.03	2.46	1.29	1.74	1.33
CD44	5.24	19.10	4.26	1.49	9.10	1.65

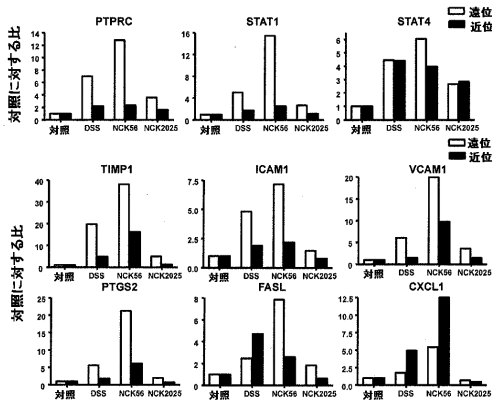
【図 7 B】

Figure 7B



【図 7 C】

Figure 7C



【図 8 B】

Figure 8B

271 - G D V G N Y Y R M A D L F V S A S D - 288
865 - A C T G A A C C C A A G G T C T T A C T T A T A T A G A A G C T T T G C T G C A G T A C A C C A T G T - 918
289 - T E T Q G L T Y I E A L A A G T P C - 306
919 - G T A G T T T A C G A C A C T G A T T A C A C T A A A A T T T T T G A T A A T G A T G C T T T G G A - 972
307 - V V Y D T D Y T E N I F D N D V F G - 324
973 - C G T A C T T T T G T T A C A C A G A A A T T T C A G A A A T T A T T G A A T T A T T G A A - 1026
325 - R T F V T Q K E M L Q E I I E L L K - 342
1027 - A A A G G A C A C A A T A G A A T T C C A A G A T C T T T T A C A A A T A A A T T G C A G A A G A T T - 1080
343 - K G H N R I P Q D L L Q N K L Q K I - 360
1081 - T C A T C G G A C A A T T T G C T A C A A T T G C A T G A T T T T T A A A T A C G G A T T G A T - 1134
361 - S S E Q F A T N V H D F Y K Y A I D - 378
1135 - C A T T A T C A A C C T A A C A T G A A G A A A T A - 1161
379 - H Y Q P K H E E I - 387

配列番号 5 および 6
LBA0445 グリコシルトランスフェラーゼ
GenBank 登録番号 AAV42335

1 - A T G A T T A G A A T T A A T A T T T C T C A C A A G C T G A T T C A G T T A A G G T C A A G G A G T G - 54
1 - M I R I N M F S Q A D S V K G Q G V - 18
55 - G G C T C A G C T C A C A T G A A T T G A T C A A A T T A T T G A G A A C C C G C T T A G T A G A T G A G - 108
19 - G S A Y N E L I K L L R T R L V D E - 36
109 - T T T T A T G T A A C A A T T A A T A G A T A T G T A A T G A T T A A C G C A C T A T C A T A C A - 162
37 - F Y V T I N R Y G N S D L T H Y H T - 54
163 - A T T A A T C C A A C T T A T T T C G T A A A T A G T T T T C A C T A G C T C T G G A A G A A A A T A - 216
55 - I N P T Y F V N S F S P A R G R K I - 72
217 - G G A T A T G T T C A C T T T T G C C T G A T C A T T A G A T G A T C G C T T A A G T T G C C G G G A - 270
73 - G Y V H F L P D T L D G S L K L P G - 90
271 - A T A G C T A A A A T T G G T T T A T G A T T A C G T G A T T G A T T T A T A A G C G A A T G A T - 324
91 - I A K N V V Y D Y V I D F Y K R M D - 108
325 - C A A A T C G T A G T T G T A A T C C A A T T T T A T T G A T A A A T T G G T T G A T T A T T G G C A T T - 378
109 - Q I V V V N P I F I D K L V D Y G I - 126
379 - G A A C G C A T A G G G T T A A T A C A C T T C T A A T T T T T G T T T A A A G A A G A A T T T A T - 432
127 - E R D R V K Y I P N F V S K E E F Y - 144
433 - G A A G A A T C A T T G C C A A G A A A G C C T T T C G A C A T G A A T T A A G A T T C C A C T T - 486
145 - E E S L A S K N A F R H E L K I P L - 162

【図 8 A】

Figure 8A

配列番号 3 および 4
LBA0444 グリコシルトランスフェラーゼ
GenBank 登録番号 AAV42334

1 - A T G A A T A T T G G T C T T T A T A C G A T A C A T A T T T C C C A A A T A A G T G C G T A G C T - 54
1 - M N I G L Y T D T Y F P Q I S G V A - 18
55 - A C T T C T A T T A G G A C G C T A A A G A T G C C T T G A A A G A C A G G G C A T A A T G T A T T T - 108
19 - T S I R T L K D A L E R Q G H N V F - 36
109 - A T T T T T A C A A C T A C A G A T C C A A A T G T A G A A A G G G C A C T G T T G A G C C A A A T G T T - 162
37 - I F T T T T D P N V E K G T V E F N V - 54
163 - T T T C G T T T T A G C A G T A C C T T T T G T T C A T T C A C A G A T C G T A G A A T T G C A T T T - 216
55 - F R F S S I P F V S F T D R R I A F - 72
217 - A G A G G C T T A T T T A A G C A A C T A A G T A G T A A G G A A T T T G G A T A T T G T A - 270
73 - R G L F E A T K V A K E V N L D I V - 90
271 - C A T A C A A A C T G A A T T T G C T T T A G G T A C A A T T G G C A A A T G T A G C C C A C C A A - 324
91 - H T Q T E F A L G T I G K Y V A H Q - 108
325 - T T A G A T A T T C C T G C A A T T C A C A C T A C A C A A T G T A A G A A T T A T T T G C A T - 378
109 - L D I P A I H T Y H T M Y E D Y L H - 126
379 - T A T A T T T A A A T G G T C A C T T A T T G C G A C C A T A T C A T G T T A A C A A T T C G T A A A A - 432
127 - Y I L N G H L L R P Y H V K Q F V K - 144
433 - A G C T A T T T A A A A A T A T G G A T G C T G T A T T G C C C A A G T G A C G T G A G A A G A T - 486
145 - S Y L K N M D G C I A P S G R V E D - 162
487 - T T G T A A A G C A T A T G C C G T G C A A A T T C C A A T T A G G G T A A T T C T A C T G G A G T A - 540
163 - L L K R Y G V Q I P I R V I P T G V - 180
541 - G A T T T G C A G G G A A T G A A T G G C G A T G C T G A A C G T G A T G A C G T C A G G A A T T A G G A - 594
181 - D L Q G M N G D A E R D V R Q E L G - 198
595 - A T C G A C A A A G A T G C T C T G T A A T T T A A C T T T A A G T A G A A T T G C A G C A G A A A A G - 648
199 - I D K D A P V I L T L S R I A A E K - 216
649 - A A A T A A A T C A T A T T T T A A T G T A T G C C A G C A A T T G T A G A A G A A T T C C A A A T - 702
217 - K I N H I L N V M P A I V E E F P N - 234
703 - A T T A A A T T G T A A T T G C C G T G A T G G A C T G A T G T T A A A G T C T G A A A G A C A A - 756
235 - I K F V I A G D G P D V K V L K E Q - 252
757 - G T T G A C G T T T A C T T T A G A A G A T T A T G T T T A T T G T C G T A A G C T T G A T C A T - 810
253 - V E R L T L E D Y V L F V G N V D H - 270
811 - G G A G A T G A G G C A A T T A T T A T C G A A T G C C G A T C T T T T G T T C T C C A G G T A C - 864

【図 8 C】

Figure 8C

487 - G A T A A G T T T G T T G T T T T G G T G A T G G A C A A G T T C A A G A C G T A A A G A A T T G A T - 540
163 - D K F V V F G D G Q V Q E R K G I D - 180
541 - G A T T T G T A A A A T G C T A A A G T A A T C C A G A T T T C A G T T A T T T G G C T G G T - 594
181 - D F V K M A K A N P D V Q F I W A G - 198
595 - G G A T T T G T T T G C C A A A T T A C A G A T G A T A A T C A C T A T A A A G A A T T G T G - 648
199 - G F S F G K I T D G Y N H Y K E M V - 216
649 - G A T A A T C C A C T G A A A A T T G A T T T T A C A G A A T C G T A G A T C G T A C A A A A T T A - 702
217 - D N P P E N L I F T G I V D R T K L - 234
703 - G T T A A G T A T T G A A T T G C T G A T T A T T T G T T T A C C A T C A T A G A T G A A C T A - 756
235 - V K Y L N I A D L F V L P S Y D E L - 252
757 - T T C C A A T G T C T G T T T T G A A G C G T T A G T T G T G G G A C C A G T C T T T T G C G C - 810
253 - F P M S V L E A F S C G T P V L L R - 270
811 - G A T C T T G A C T T A T A A G C A A T T A T T G A T G C T A T T A T A G A T G A A A A G A C - 864
271 - D L D L Y K A I I D G Y Y M S G K D - 288
865 - T T T A G T G A A A T G A A T C A A A T T T G C A A A A C G T A A T T A A A A T C C A A A T T A T T G - 918
289 - F S E M N Q I L Q N V I K N P Q L L - 306
919 - A A A A A T A T A G T A T T A T C G T T G A A G C C A G C A A G A A T T C A G A A G A A C G A - 972
307 - K K Y S D L S L K A S Q E Y S E E R - 324
973 - T T A G C T A A A A T T G G A A T G A A T T T A T C A T A G C A A T A A A T T G G C C A A G A A - 1026
325 - L A K I W N B F Y H E Q Y K L G K E - 342
1027 - C T A G G A C A A A T T C A T - 1041
343 - L G Q I H - 347

配列番号 7 および 8
LBA0446 内在性膜タンパク質
GenBank 登録番号 AAV42336

1 - A T G A A T A A A A A C A T A T G T G G G C A C T T G G T T G T T T G C A A T C A G T G C T T T - 54
1 - M N K K K H M W G I L V V L A I S V F - 18
55 - G T A C T T T A C A G A T C T A A G T C T A C C A C T A T T C T G A C A T T T T G A A G G C T G C T - 108
19 - V L Y T D L K S T P L S D I L S D I L S - 36
109 - C A T G G C T T G A A T G T T G A G C A T T G A T A A T G T G T T T G C T T A A T G C T T T T G T C T - 162
37 - H G L N V G A L I M V F C L M L S - 54
163 - T A T G T A T G O A A G C A G G A A T T C T G C C G T T T T A G C A C A T G A A A A C A G A G C C T - 216
55 - Y V C E A G I L A V L A H R K S E P - 72

【図 8 D】

Figure 8D

```
217 - AAGCGATCGCATGGTCTTTTACGTATCCCTATTATTCAAGCACTATTAAAT - 270
73 - K R S A W S F L R I P I I Q A L F N - 90

271 - GCGATAAATCTTATGTCTACAGAGGACAGCTTCGCACTTCGAGCTATGATT - 324
91 - A I T P M S T G G Q P S Q L A A M I - 108

325 - CAAATGGGAATGGAAGTGTGCGTACGACTTCTATTTTGTTAATGAAATTTATT - 378
109 - Q M G M E G G R S T S I L L M K F I - 126

379 - ATTATCAATAGTGTGTTTATTTGCGTATGATTACCAITTTTATTTGGTTTC - 432
127 - I Y Q I V V L F A Y V P T I L F G F - 144

433 - CATATGTAATGACCAAGTTTGCAGGTCTCGCTATTTTTATGCAATTGSCTTT - 486
145 - H M V M T K P A G L A I F I A I G F - 162

487 - TTAATCCATTCAGTTCATTTATCTTTTGTGGCAATTATGTTTGCCTATCGC - 540
163 - L I H V S S I I F L L A I M F A Y R - 180

541 - TTTACTAAAGAACTACTAATTTGGATTATGGATTATTTGGCTAAATTTATGAAA - 594
181 - F T K R T T N N W I M D L L A K P M K - 198

595 - AAAGAACGCGTTGAAAAATGGCGTACGCGCACTTTAGAAAAAATAGATACATTT - 648
199 - K E R V E K W R T A T L E K I D T F - 216

649 - TATGCTGAAAGCCAAAGTTTAAAAAGAGAGAAGAAGTTAATTATGCTTCG - 702
217 - Y A E S Q K L K K E K K K L I M A S - 234

703 - ATTTTAAAGCTTCTACAATTTACTCTTTTCTCACTCAATCCATTATGATTTTG - 756
235 - I L T I L Q L L F F Y S I P F M I L - 252

757 - TCAGCTCTTAATGTTCATGTTCAATGCTTATGTTTACGCAGATGAATATTATG - 810
253 - S A L N V P C S W L S V T Q M N I M - 270

811 - ATTATTATGTTTATGGAATTTTCAATTCAGGCGCATCCGTTGGAGCAGAA - 864
271 - I I M F M A I I P I F G A S G G A E - 288

865 - TATAGTTTTCAGAGCTTATTTTCAACATTTATTTCTACGATGCTGCTTAATT - 918
289 - Y S F Q T L F S T F I S T H G A L I - 306

919 - TTGGCAATGTTTATCTGCGGTTTTCACCTTATTTCTTGGAAATGATCTTAGGA - 972
307 - L A M F I W R F S T Y F F G M I L G - 324

973 - ATATTGGTTGGATTTTTAAAGCTAAAAAGATAAAGCTCAGAAAGTAAT - 1023
325 - I F G W I F K P K K I K S S E S N - 341
```

【図 8 F】

Figure 8F

```
865 - GATACGATTAGCTTTTGATAATTTCTTTAACCAGGTAGGACAAGTAAACCTTCA - 918
289 - D T I S F D N F F N Q V G Q G K T S - 306

919 - GATGCTGAATGATGTTAGAAATTCATTATATGTTTGCAGTCTGGTCAAGCT - 972
307 - D A E M M L E N S L Y G L Q S G S A - 324

973 - ATGCTACTTATGTCAGCTCAAAATACGTTTGAAGTGCAACGCGATTTTGCAC - 1026
325 - M S T Y G T S N T F E S A P A I L H - 342

1027 - CAACAGCAGGTATATCACTGTCAGTATGATGTTGTCAGGATCGTTCTCGG - 1080
343 - Q Q A G Y T T A V M H G G A G S P F W - 360

1081 - AATAGAAATATGCATATAAATCAITTTGGTTATCAATATTTTATGCCATTATCA - 1134
361 - N R N N A Y K S F G Y F M P L S - 378

1135 - TTTTATGAAATTAACCCAGCTTATATATGATATGCTTTAAAGATAAGATT - 1188
379 - F Y E N K K P S Y Y I G Y G L K D K I - 396

1189 - TTTCTTGATCAATCAATTAATATATTGAACGTTTACACAGCCATTTTATTTA - 1242
397 - F F D Q S I K Y I E R L P Q P F Y L - 414

1243 - AAGATGATCAGTAACATTAATCATTTCCATACATATTTGACAAGAAATCAA - 1296
415 - K M I T V T N H Y P Y D I D K K N Q - 432

1297 - TCCATTGCTAAGACTAATCTGGGGATGAACTGTTGATGTTTACGTTTCAACA - 1350
433 - S I A K T N T T G D E T V D G Y V Q T - 450

1351 - GCGCATTTATCTGATCAAGCAATTTGGAAGACTAATGAGCTGGATGAAGAAGACT - 1404
451 - A H Y L D Q A I G E L M S W M K K T - 468

1405 - GGACTAGATAAAAAAGACATTTGATTGTTTATGCGCATCACTATGTTATTTCT - 1458
469 - G L D K K T L I V F Y G D H Y G I S - 486

1459 - GGAATCACCATAAGCTAGTGCAACAATCTTTAGAAAAAATCAITTTAATGAT - 1512
487 - G N H H K A S A Q L L K K K S P N D - 504

1513 - TTTGATAATTTGCAAGTTTCAAAGAGTGCCTTTAATGTTTCATATGAAGGATTA - 1566
505 - F D N L Q F Q R V P L M F H M K G L - 522

1567 - AAGGTCGATAAATCATCTATTGTTGGTGGTGAATTTGATGTTTACCACTTTG - 1620
523 - K G G I N H T Y G G E I D V L F T L - 540

1621 - TTAATTTTACTCGGTATTAAGATAGCGATATCTTCAATTTGGCTACGATTTA - 1674
541 - L N L L G I K D S D T I Q F G Y D L - 558

1675 - CTTAGCAAAAACGCAACCCAAATTTAGTCCCAAGAAATGGAGACTTTTATTACA - 1728
559 - L S K N A P Q I V A Q R N G D F I T - 576

1729 - CCAGAAATCAAAAAGTTGGTAGCGATTATTTATCACTAAGACTGGTAAAGA - 1782
577 - P E Y S K V G S D Y Y Y T K T G K R - 594

1783 - ATTAAGCCTAATAAGAAATTAAGAGCTGAATTTGACGGCAATTTCTAACACTGTG - 1836
```

【図 8 E】

Figure 8E

配列番号 1 および 2
LBA0447 ホスホグリセロールトランスフェラーゼ
GenBank 登録番号 AAV42337

```
1 - ATGGAACGTACCAAACTTTTAAATGGTTGACGCAAACTAAGCTGGGATT - 54
1 - M E R T K S P F K W L T Q T K L G F - 18

55 - TTTACAATAGTTTATGATTGTTTGGCTAAAAACATATATATTTATTTAACT - 108
19 - F T I V L V L F W L K T Y Y I Y L T - 36

109 - AAGTCAACTTGGTGCAGTTGGTCTATGCGACAAATTTTGGCTTTTAAATTAAC - 162
37 - K F N L G A V G P M Q Q F L L L I N - 54

163 - CCTATTCCATCAGGGATGCTGCTACTAGGTATTTGGCTTTTAAAGGGACGA - 216
55 - P I P S G M L L L G I G L F F K G R - 72

217 - AAATCTTATGGATTATTTCTGATAATCGATTTTAACTAAACGCTGTGGCTTTT - 270
73 - K S Y W I I L I I D F L L T L W L F - 90

271 - TCTAATATTTTATATATCGAGAATTTTCTAATTTCTGTCTTTTCAATTAAT - 324
91 - S N I L Y Y R E F S N F L S F S I I - 108

325 - AAGCATCAGATCGACATCCGATTAATCGGAAAGATTTGAGGAAATAACT - 378
109 - K T S G S T S D N L G K S I A G I T - 126

379 - TTAGCAAGTGATTTTATAGCATTTTGGATATGCGATTATTTATGCTTATTA - 432
127 - L A S D F L A F L D I A V I I A L L - 144

433 - GCTACTAAAGTTTATAAATGGATGCGCTCCATTAAAGTTAAAGTGAGTCTT - 486
145 - A T K V I K M D V R P L K L K V S L - 162

487 - TTAATTGAATTTTGGCACTTAGTTTAAATGGGACTTAATTTATGATGGCCAA - 540
163 - L I E F L A L S L M G L N L L M A Q - 180

541 - AAAGATAGATCAGGCTCTTTAACTAGAACCTTTGATAATACTATATTTGTTAA - 594
181 - K D R S G L L T R T F D N N Y I V K - 198

595 - TATCTAGGAATTAATGAATACGCTATTATGATGGATTAAGAACGCCCAACA - 648
199 - Y L G I N E Y A I Y D G Y K T A Q T - 216

649 - AGCGCCCAATGGCTAAGGCAACGATCTGATTAAATCTGTACGTAATTAAT - 702
217 - S A Q M A K A N V S D L K S V R N Y - 234

703 - TTAATGCAAAACAGGTAAACCTTAATCCAGAAATACGGGTGTAGCAAAAGGA - 756
235 - L N A N K V K P N P E Y T G V A K G - 252

757 - AAAAACGTTTATGATTACCTTGAAGTTTTCACAAATTTTAAATGGCTAT - 810
253 - K N V L V I H L E S F Q Q F L I G Y - 270

811 - AAATGGAAGGGTAAGAAGTAACACCTAATTTAAATAAATATATCATCAAAA - 864
271 - K W K G K E V T P N L N K I Y H Q K - 288
```

【図 8 G】

Figure 8G

```
595 - I K P N K K L K A E L T A I S N T V - 612

1837 - ACAACGACGCTTCTTTATCAGATCGTGAATTAACGGAATTTATACGGTTT - 1890
613 - T T Q L S L S D R V I N G N L L R F - 630

1891 - TATGCTCTAAGTGGTTTACTAAGTTTAAAGCAAGACGATGATTAATAAG - 1944
631 - Y R P K W P T K V K P K D Y D Y N K - 648

1945 - GAACCATCGTTAAACGTTTATTTAATGATCCAAAGTAAACCTCTCTATGTTAT - 1998
649 - E P S L K R L F N D P S K T S L W Y - 666

1999 - CAAATCATAAAAAGACGACGCAAAAGATTTTAAACCTGATGCGCTGAGTTG - 2052
667 - Q N H K K T T Q K D F K T D A P E L - 684

2053 - AAAAAA - 2058
685 - K K - 686
```

配列番号 9 および 10
LBA1926 D-アラニン-D-アラニルキアロブテインリガーゼ, DltA
GenBank 登録番号 AAV43723

```
1 - ATGATTCAAGATGTTTATTAAGAAATGACGAGATAGCTGAAATGAACCAT - 54
1 - M I Q D V I K R I D E I A E N E P D - 18

55 - CGTGTAGTTTACGATTATCTCGGTGAACCAATACATATGTTGACCTTAAAG - 108
19 - R V V Y D Y L G E T N T Y G D L K K - 36

109 - CGTTCAACGCTTGGGCACACAAGATTGCTAGTATGGATATCCGACACATGCA - 162
37 - R S N A W A H K I A S M D I P E H A - 54

163 - CCAATCATGATCTGGGGTGGTCAACATTTGAAATGATTGCTAGTTTCTTAGT - 216
55 - P I M I W G G Q T F E M I A S F L G - 72

217 - TGTGTTAACTCAGGCCACGATATATCCAAATGCAAGTTATTCATATGCTGAA - 270
73 - C V K S G H A Y I P I A S Y S N A E - 90

271 - CGTTTAAATGATTCAAGATGTTTCAAAATCACCTATGTTTGGAAATGAT - 324
91 - R L T M I Q D V S K S P M V L E I D - 108

325 - CCAATGCCAGACGTTAATTTAGACGCAATCAAGGTACTTAAAGCTAATGAAGT - 378
109 - P L F D V N L D G I K V L K A N E V - 126

379 - GAAGATGGCGACTTTACAGTTGATGAAGTAATTTGTTGAAGCGACGAAAT - 432
127 - E D G D F T V D E S N F V E G D E N - 144

433 - TACTATATATCTTTACTTCAAGTACTACTGGTAAGCCAAAGGGTGTACAAATC - 486
145 - Y Y I I F T S G T T G K P K G V Q I - 162

487 - AGTCATGATAATTTGTTGAGTTTGTAACTGGGAATTCATGATTTTAATTTG - 540
```

【図 8 H】

Figure 8H

163 - S H D N L L S F V N W E L S D F N L - 180
541 - CCAGAACACCAAGCTTTTGGCACAAGCTCCATCTCATTTGACTTGTCAAGT - 594
181 - P E H P S F L A Q A P Y S F D L S V - 198
595 - ATGAGCCTTTATCTCGCACTTGTTCAGCAGGAAGCTTGTGTTTACCACAT - 648
199 - M S L Y P A L V S A G K L V V L P H - 216
649 - GATGTTACGCCAAACTTTGGTCAATTGTTCCAACTTTACCAAAAATGCAATTT - 702
217 - D V T Q N F G Q L F Q T L P K M Q F - 234
703 - AATGTTTGGGTATCAACTCCATCTTTGCACAAATGTGTCTTAGATAAAACC - 756
235 - N V W V S T P S F A Q M C F L D K T - 252
757 - TTTGATGAGAACATCATCCAGACTTAACTCACTTCTTATCTGTGGTGAAGAA - 810
253 - F D A E H H P D L T H F L F C G E E - 270
811 - TTACCACATAGTGAAGCTGATATGCTTAAAGAGAAGTTCCAGAAAGTCATATT - 864
271 - L P H S E A D M L K K K F P E S H I - 288
865 - TTTAATACTTACGGTCTACTGAAACTACAGTGTCTGTGACTCAAGTAGAGATC - 918
289 - F N T Y G P T E T T V A V T Q V E I - 306
919 - ACTGATGAARATCTTGAAAGTATGATGTCTACCAATTGGTAGAGTAAAAGAA - 972
307 - T D E I L E K Y D R L P I G R V K E - 324
973 - GACACTAAGATTACTATTGATACTTCAAGGGAGATAAGCCTGGCGAAGGTGAA - 1026
325 - D T K I T I D T S K G D K P G E G E - 342
1027 - ATCATTATCAGTGGTCTGAGCGTTTCAAAGGGTACATGAATAACCCGTGAAG - 1080
343 - I I I S G P S V S K G Y M N N P E K - 360
1081 - ACCGAAGCTGCTTCTTCAAATGAGGGCAGACAGTATCGCAGCTACCGTAGT - 1134
361 - T E A A F F Q N E G D K Y R S Y R S - 378
1135 - GGAGATGCTGGATTCTTGTAGGTGATATGCTATTTATCGCGGTAGAATCGAC - 1188
379 - G D A G F F D M L F Y R G R I D - 396
1189 - TTCCAAATCAAGTTCATGTTGACAGAAATCGAAGTGAAGAAATTAATTCTAC - 1242
397 - F Q I K F N G Y R I E L E E I N F Y - 414
1243 - TTGTCAAAGAAATGAATTTGTACGTTATGTTGTCGACGACCTAAATACAATAA - 1296
415 - L S K N E F V R Y G V A A P K Y N K - 432
1297 - GATCATATCTGAAGCAAAATGTGTGCTGAAATCGAATGAAGCATGCGCTTCGT - 1350
433 - D H T V K Q I V A E I E L K H G V R - 450
1351 - CGTAAGTATCTGATGACAACTTACTAAGTTGATCTGTAAGACTTAGCTAAG - 1404
451 - R K Y S T D A Q L T K L I R E D L A K - 468
1405 - AACGTGATGCTTACATGATTTCCACAGCGTTATGTTTACCAAGATACATTACCA - 1458
469 - N V M P Y M I P Q R Y V Y Q D T L P - 486

【図 8 J】

Figure 8J

757 - TTTGACTTTGCAGGTTACTCACTATTGCTGTATCAATTTCACTTTCATGGGT - 810
253 - F D F A G Y S L F A V S I S Y F M G - 270
811 - ATTCAATCCCAATGAACCTTCAACAAACATTTATTTCTAGAATATTAAGAC - 864
271 - I H T P M N F N K P F I S K N I K D - 288
865 - TTCTGGAAACGTTGGCACATTACACTTTCATCTCGTTCGATGATATATCTAC - 918
289 - F W N R W H I T L S F W F R D Y I Y - 306
919 - ATGCGATTCACTTCTTTGCAAGTAAAAAAGTGTGTTAAGAATCGTATTAGA - 972
307 - M R F T F F A M K K K L F K N R I R - 324
973 - TTGTCACAGATTCAATTTCCATTTATCTTGATAAGGGATTCTGGCATGGG - 1026
325 - L S Q V S Y F L L F L I M G F W H G - 342
1027 - TTAACATGGTATTATATTGTTTATGGTATATTCATGCCACTGCTATCTGTCTC - 1080
343 - L T W Y Y I V Y G I F H A T A I C V - 360
1081 - AACGATATGTGGCTAAGATTTAAGAGAAAGCATAGAAACAAATCCACATAAC - 1134
361 - N D M W L R F K R K H K K Q I P H N - 378
1135 - AAGTTTACTGAATGGTTTGGCAATTTCTTAACTTCAATATGGTATGTTCAAGT - 1188
379 - K F T E W F A I F L T T P N M V C F S - 396
1189 - TTCTTGATTTTCTCAGGATTCTTATGCTCAATTTGGTGTGGCTGGAAG - 1236
397 - F L I F S G F L S Q Q L W F G W K - 412

配列番号 13 および 14

LBA1924 D-アラニンーポリ(ホスホリブール)リガーゼサブユニット 2, DHC
GenBank 登録番号 AAV43721

1 - ATGGACATTAACAAGCGTATTAGACATTTTAAACGATTTAACTGGTGAAGAT - 54
1 - M D T K Q G V L D I L N D L T G E D - 18
55 - TTATCAGATCAATGATGAAGAAACCTTTTGATAATGGTTGATGAGCTCAATG - 108
19 - L S D Q M D E N I F D N G L M D S M - 36
109 - GCAAGTGTACAAATGCTTTTGAAGTTTACAGAAATTTGATATTGATGTTCTCT - 162
37 - A S V Q M L L S L Q E K F D I D V P - 54
163 - GTATCAGATTTAATCGTGAAGAATGGGACACTCCTTAACAAGATTGTTCCAAAG - 216
55 - V S E F N R E E W D T P N K I V A K - 72
217 - GTGGAAAGCTTAGAAATAGAG - 237
73 - V E S L E N E - 79

【図 8 I】

Figure 8I

1459 - ATTTCTCAAAACGGTAAGGTGGATATTAAGGCGATTATTAAGGAGGTTAATAAG - 1512
487 - I S Q N G K V D I K A V I K E V N K - 504

配列番号 11 および 12

LBA1925 D-アラニル転移タンパク質 DltB
GenBank 登録番号 AAV43722

1 - GTGAATTTTAATTTCACTTAACCTTACAACCTTACTCAAAATCCGCAATATTTTGT - 54
1 - M N F N F I N L Q P Y S N P Q Y F V - 18
55 - TACTGTATGATCGGTAAATCCCTATTATTATGGACITTTACTATGGTCACTGT - 108
19 - Y L M I A L I P I I I G L Y Y G H R - 36
109 - CTCAGACATATGAAGCGATTCTCAATTGTTTCTTATCTTGTATTTTGAC - 162
37 - L K T Y E A I F S I V F L F L I F D - 54
163 - GGTAGTCACTGGCAACAGGTGTAACTTGTCAATCTGGCTGGTTATGAATTT - 216
55 - G S H W Q Q G V N L L I W L V Y E F - 72
217 - GCTTTGACGTTTGTCTTATCAGTATTATCGTCATCATGTAAATAAGACTTTGG - 270
73 - A L T F A Y Q Y Y R H H G K N K T W - 90
271 - GTATTTAGCTTGGCTGTAATTTTAGCGATTATTCGCGTGGCTGCACTTAAGTAT - 324
91 - V F S L A V I L A I I P L A A V K Y - 108
325 - TTGACCGCATTCCTCACTTAATCACTCAACTTTGTATTGGATTTTATAGTATT - 378
109 - L T A P P L N S I N F V I G F L G I - 126
379 - TCTTACGTAACTTTCAAACAGTGCAAGTATTATGGAATCGGTGACGCTGCG - 432
127 - S Y V T F K T V Q V I M E M R D G A - 144
433 - ATTAAGAAGGTGGATCTGTAACTATGCAAGATTTCTTACTCTTCTCCCACT - 486
145 - I K K V D P V T Y A R F L L V F P T - 162
487 - ATTTCACTCAGTCTCAATGATGATATCGTATGTAAGAAGATACAGATAA - 540
163 - I S S G P I D R Y R R F K K D K - 180
541 - GTTCTACAAGAGACCATATATTACAGATTTACAATATGCTGTAAAGATTTTG - 594
181 - V P T R D A Y I T D L Q Y A V R Y L - 198
595 - TTCAAGGATTTTATACAATTTATATTGGTGGTCTTCTTGGTACTATTGG - 648
199 - F Q G F L Y K F I I G W F F G T Y W - 216
649 - CTTCTAAGATTAGTCCGCTGCTTTAGCGGTGGGAAATGCTAATGTTGGTTTG - 702
217 - L P K I S A A A L A V G N A N G G L - 234
703 - AAGTTATCATGGTGGCTTCTTGTCTACATGTATTGTACAGTATGTACCTGTTC - 756
235 - K L S W W L L A Y M Y C Y S M Y L F - 252

【図 8 K】

Figure 8K

配列番号 15 および 16

LBA1923 D-アラニル転移タンパク質 DltD
GenBank 登録番号 AAV43720

1 - ATGAGTAATAAACCGCGCTGTGGCAATTTTGGCCAGTCTTTTGGCGCTTTT - 54
1 - M S N K R R L W Q I F G P V L C A F - 18
55 - ATCCCTTTTATAGTTGTATTCTTATTCCTCCCTGGGAAGAACTTTTCTAAGCAA - 108
19 - I L L L L V V F L I P W E R T P S K Q - 36
109 - ACTATCTATGAAGCAGCTGCGCTCAACAAATAGTACTGTATTGAAGGCGACTACA - 162
37 - T I Y E A A A S Q N S T V F K G S T - 54
163 - ATGAAGCAAGAAGCTTATAAAGATGGTATGTACCAATTTCTATGGTCAAGTGAA - 216
55 - M K Q Q E A Y K D G Y V P F Y G S S E - 72
217 - TTGCTAGATTGTATCCACTTACCCTAGTGTATTGTGAAAGATATCAGAGA - 270
73 - L S R F D P L H P S V I A E K Y H R - 90
271 - AATTACGTCATTTCTTCTAGTGGACAGGTAGTCAATCTTTGGCTCAATTC - 324
91 - N Y R P F F L L G G P G S Q S L A Q F - 108
325 - TTGGGGATGCAAGGTACAACTAAACAGCTTAAACAAAGGCTGTATGATGATT - 378
109 - L G M Q G T T K Q L K N K K A V V I - 126
379 - ATTTCAACCAATGGTTTACCAAGAAAGCCAGATCCTAATGCATTTGCTTTA - 432
127 - I S P Q W F T K K G Q D P N A F A L - 144
433 - TATTATTCACCACTCAAGCATGTAACTTCTTGTAAAGTGTGAAGATTAAG - 486
145 - Y Y S P L Q A C N F L L S A K N N K - 162
487 - ACTGATCGTTATGCTGCTAAGCGTCTGCTTGTATGCCAGATGTAAAGGGTGAA - 540
163 - T D R Y A A K R L L D M P D V K G E - 180
541 - ATTAGAAACAGTCTTAAGCAATTTGCTGAGGTAAAGAGTAACTACTTTTGAA - 594
181 - I R N S L K Q I A A G K K L T T F E - 198
595 - AGATTTTATTAAGAAATCGTGTAGAATGTACGTAAAGCAAGTAACTTCTTT - 648
199 - R F Y L E N R R R M L R N E D N F F - 216
649 - AGTTCATTCATTTACGCGATCGTGTAAATGAAGTTCAAATAGAGCTAAAGTA - 702
217 - S S F Q L R D R V N K I Q N R A K V - 234
703 - TTACCTAATCACTATTCTGTAGCTGCTTTGAACAGGTGGCTGAAGACAGGCT - 756
235 - L F N T Y S V A A L N K V A E E Q A - 252
757 - GCAGCACATCACTTCAAACTTGGGAATTGACAACTTCTTCTATAGAAGT - 810
253 - A A H T T S N N L G I D N T F Y R T - 270
811 - CGTTTGGCTAGAAAGGTATTAAGAGACTCAAGGGTAGTCAAGCTCACTTTGAT - 864

【図 8 L】

Figure 8L

```
271 - R L P R K V L K R L K G S Q R H F D - 288
865 - TACGTTAGATCTGTTGAATATGGCGACTTCCAGTTAATGCTGGAACAATTGCCC - 918
289 - Y V R S V E Y G D F Q L M L E Q F A - 306
919 - AAGCAACATACATAATGTGTGTTTCATTATTCCACCAATTAATGGTAAGTGGATG - 972
307 - K Q H T N V L F I I P P I N G K W M - 324
973 - AAGTATACCTGGTTTATCACAAAAATGTATCAAGATCAGTTGCTAAAATTGAA - 1026
325 - K Y T G L S Q K M Y Q E S V A K I E - 342
1027 - CAACAATTGACTAGTCAAGGTTTTGAAAAATTTGCAGATCTTTCTAAACGTGGT - 1080
343 - Q Q L T S Q G G F E N I A D L S K R G - 360
1081 - AATGAAAAGTACTTCATGCAAGATACATTACACCTTGGTTGGAAAGCGCTGGTA - 1134
361 - N E K Y F M Q D T I H L G W K G W V - 378
1135 - GCTGTTGATCAAGCTGTTAGACCAATTTATGAAGTTGCCTAACGAACGTTACAAC - 1188
379 - A V D Q A V R P F M K L P N E R Y N - 396
1189 - TATGATATGCTAACTACTACTTCTCAAAGAAGTGGCAGAATAAAGATAACGTT - 1242
397 - Y D M S N Y Y F S K K W Q N K D N V - 414
1243 - AAACGTGFAAATTTAAATAATAAGATCGTTTAAAGTGAAG - 1284
415 - K R V N L N N K D R L K V K - 428
```

【配列表】

0006154320000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 1/04 (2006.01) A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 3/04 (2006.01) A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 1/12 (2006.01) A 6 1 P 1/12
A 6 1 P 1/10 (2006.01) A 6 1 P 1/10
- (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
- (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
- (72)発明者 クレーンハンマー, トッド アール.
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27606, ローリー, ベイカーズフィールド ドライ
 ブ 6509
- (72)発明者 ファイラー, エリカ
 アメリカ合衆国 テネシー 37745, グリーンビル, グレープバイン トレイル 260
- (72)発明者 モハマザデ, マンスール
 アメリカ合衆国 イリノイ 60614, シカゴ, エヌ. ボスワース アベニュー 273
 3

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 J. Dairy Sci., 2009, Vol. 92, No. 3, pp. 870-886
 PNAS, 2007, Vol. 104, No. 20, pp. 8478-8483
 "phosphoglycerol transferase [Lactobacillus acidophilus NCFM]" [27-JAN-2005] Retrived
 from GenBank [online] Accession no.AAV42337.1 [retrieved on 25 MAY 2016] URL:[http://w
 ww.ncbi.nlm.nih.gov/protein/58254100?sat=34&satkey=6685751]
 J. Bacteriol., 1984, Vol. 160, No. 3, pp. 976-981
 Mol. Microbiol., 2007, Vol. 65, No. 4, pp. 1078-1091
 J. Bacteriol., 2009, Vol. 191, No. 1, pp. 141-151
 PNAS, 2011, Vol. 108, suppl. 1, pp. 4623-4630
 Immunotherapy, 2011, Vol. 3, No. 3, pp. 337-347
 Microbiol. Immunol., 2010, Vol. 54, pp. 143-151
 J. Bacteriol., 1993, Vol. 175, No. 18, pp. 5925-5933

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/09
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)