

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6541576号
(P6541576)

(45) 発行日 令和1年7月10日 (2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日 (2019.6.21)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

A 2 3 L 33/135 (2016.01)

A 2 3 L 33/135

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 Q 1/68

A 6 1 K 35/745 (2015.01)

A 6 1 K 35/745

請求項の数 8 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-551544 (P2015-551544)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月3日 (2014.12.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/081987
 (87) 国際公開番号 W02015/083743
 (87) 国際公開日 平成27年6月11日 (2015.6.11)
 審査請求日 平成29年6月20日 (2017.6.20)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-251362 (P2013-251362)
 (32) 優先日 平成25年12月4日 (2013.12.4)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 000006884
 株式会社ヤクルト本社
 東京都港区東新橋1丁目1番19号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (72) 発明者 松本 星隆
 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
 会社ヤクルト本社内
 (72) 発明者 三浦 みか
 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
 会社ヤクルト本社内
 (72) 発明者 木脇 真祐美
 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
 会社ヤクルト本社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の酸耐性調節方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

f a d D 遺伝子を有する微生物において、f a d D 遺伝子の発現を制御することを特徴とする、微生物の酸耐性調節方法。

【請求項 2】

酸耐性が、低温状態で機能が維持される酸耐性である請求項 1 記載の酸耐性調節方法。

【請求項 3】

f a d D 遺伝子の発現を阻害又は抑制し、酸耐性を増強する、請求項 1 又は 2 記載の酸耐性調節方法。

【請求項 4】

相対転写量が 1 % 以下である、請求項 3 記載の酸耐性調節方法。

【請求項 5】

相対転写量が 0 . 1 % 以下である、請求項 3 又は 4 記載の酸耐性調節方法。

【請求項 6】

微生物がビフィドバクテリウム属細菌である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の酸耐性調節方法。

【請求項 7】

微生物がビフィドバクテリウム・ブレーベである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の酸耐性調節方法。

【請求項 8】

f a d D 遺伝子及び / 又はその発現産物の有無及び / 又は発現量を測定することを特徴とする酸耐性を有する微生物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物の酸耐性調節方法及び酸耐性を有する微生物のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、微生物の中でも、生きた状態で腸管に到達し、宿主に対して有効な保健効果を示す有用微生物が注目されている。これら有用微生物には、ある種のラクトバチルス属細菌やビフィドバクテリウム属細菌が含まれる。これまでに、ラクトバチルス属細菌では、便秘や下痢の改善等の整腸作用の他に、乳がんの発症リスクの軽減作用（特許文献1）やインターロイキン12産生誘導能（特許文献2）、ビフィドバクテリウム属細菌では、コレステロール吸収抑制作用（特許文献3）やエラスターゼ活性抑制作用（特許文献4）等といった多くの保健効果が報告されている。

10

【0003】

これらの有用微生物が消化管内で有効に働き保健効果を発揮するには、生きたままの状態では消化管内に到達する必要があるが、消化管内に到達するまでには、温度、pH、酸素、浸透圧、酸など、有用微生物にとって様々な生育阻害環境や生育阻害物質が存在している。したがって、これらの微生物を利用するに際しては、その微生物が生育阻害環境や生育阻害物質に対して耐性を有しているか否かが重要である。特に、酸はこれらの菌が消化管内に到達できるか否かの大きな要因となる。よって、酸耐性を有することは、有用微生物にとって有利な性質の一つであるといえる。

20

【0004】

有用微生物の中でも、特にビフィドバクテリウム属細菌は、偏性嫌気性菌であり、酸素や低pH、高酸度に弱く、発酵飲食品においては製造時の増殖や保存時の生残性等、取り扱いに困難な点が多い。ビフィドバクテリウム属細菌の保健効果を得るには、できるだけ多くの菌が生きたまま腸に到達する必要があると考えられており、特に飲食品中での菌の生残性、すなわち飲食後の腸への到達率を高めることが重要なファクターとされている。このため、酸耐性が増強され、腸への到達度を高めたビフィドバクテリウム属細菌の必要性は高いと言える。

30

【0005】

酸耐性を有する有用微生物として、ラクトバチルス属細菌のラクトバチルス カゼイ Y I T 9 0 2 9（特許文献5）、ビフィドバクテリウム属細菌のビフィドバクテリウム プレーベ Y I T 1 2 2 7 2（特許文献6）等が知られている。これら酸耐性を有する有用微生物は、各種発酵乳製品や生菌製剤等の形態で多数の市販品が販売されている。特に発酵乳飲食品は、優れた嗜好性を有していることから、継続的に飲用しやすく、これら有用微生物の投与に適したものである。

一方、微生物の酸耐性を弱くする必要性も存在し、微生物の酸耐性を所望の形で調節することは極めて重要である。

40

【0006】

微生物の酸耐性調節機構としては、ATP依存性のプロトンポンプによる菌体外へのプロトンの汲み出しが挙げられる。しかし、ATP依存による本機構は、微生物を低温保存した際に、微生物の細胞内ATPが涸渇し、機能なくなると推測され、低温状態でも機能する酸耐性調節機構を利用して微生物の酸耐性を調節することが望まれている。

【0007】

f a d D 遺伝子は、幾つかの微生物においてその存在が確認され、脂肪酸をアシルCoAに変換する酵素であるlong-chain-fatty-acid CoA ligaseとしてその機能が推定されている遺伝子である。

50

しかしながら、f a d D 遺伝子と酸耐性との関係はこれまでに知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2011/049154号

【特許文献2】特開2009-155221号公報

【特許文献3】国際公開第2007/029773号

【特許文献4】国際公開第2011/083738号

【特許文献5】特開2003-219861号公報

【特許文献6】国際公開第2011/105335号

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、微生物においてf a d D 遺伝子の発現を制御することにより酸耐性を調節する方法、及びf a d D 遺伝子の発現量等を指標とする酸耐性を有する微生物のスクリーニング方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、偏性嫌気性菌で通常酸耐性を有さないビフィドバクテリウム属細菌の中で、酸耐性を有する特定のビフィドバクテリウム プレーベ株及びその系統株の遺伝子を網羅的に解析したところ、酸耐性を有する株ではf a d D 遺伝子の転写量が顕著に抑制されており、f a d D 遺伝子の発現を制御することによって微生物の酸耐性を調節できると、f a d D 遺伝子の発現量等を指標として酸耐性を有する微生物のスクリーニングが可能であることを見出した。

20

【0011】

すなわち、本発明は、以下の1)～16)に係るものである。

1) f a d D 遺伝子を有する微生物において、f a d D 遺伝子の発現を制御することを特徴とする、微生物の酸耐性調節方法。

2) 酸耐性が、低温状態で機能が維持される酸耐性である1)の酸耐性調節方法。

3) f a d D 遺伝子の発現を阻害又は抑制し、酸耐性を増強する、1)又は2)の酸耐性調節方法。

30

4) 相対転写量が1%以下である、3)の酸耐性調節方法。

5) 相対転写量が0.1%以下である、3)又は4)の酸耐性調節方法。

6) 微生物がビフィドバクテリウム属細菌である1)～5)の酸耐性調節方法。

7) 微生物がビフィドバクテリウム・プレーベである1)～6)の酸耐性調節方法。

8) 1)～7)の方法により酸耐性が調節された改変微生物。

9) 1×10^8 c e l l / m L 以上の菌数に培養した後、低温保存した改変微生物を37で60分間、胃酸で処理した場合に、当該改変微生物の生存率が改変前の微生物の生存率に比べ5倍以上高い性質を有する、8)の改変微生物。

10) 1×10^8 c e l l / m L 以上の菌数に培養した後、低温保存した改変微生物を37で60分間、胃酸で処理した後、さらに37で60分間、胆汁酸で処理した場合に、当該改変微生物の生存率が改変前の微生物の生存率に比べ10倍以上高い性質を有する、9)の改変微生物。

40

11) f a d D 遺伝子の転写を制御するプロモーターの配列を改変することによる、8)～10)の改変微生物。

12) f a d D 遺伝子の転写を制御するプロモーターにおいて、開始コドン塩基から68bp上流の塩基配列が、チミン(T)からシトシン(C)に変異している、8)～11)の改変微生物。

13) 8)～12)の改変微生物を含有する飲食品。

14) 8)～12)の改変微生物を含有する医薬品。

50

15) *fadD* 遺伝子及び / 又はその発現産物の有無及び / 又は発現量を測定すること
を特徴とする酸耐性を有する微生物のスクリーニング方法。

16) 15) の方法により得られた酸耐性を有する微生物。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、育種改良により酸耐性を有する変異株を取得することなく、酸耐性が
増強された改変微生物を容易に作出することができる。ここで得られる酸耐性は、*fadD*
D 遺伝子の発現調節によって獲得されるものであり、微生物の培養後の ATP に依存する
酸耐性とは異なることから、低温状態でもその機能が発揮されるものである。また、この
改変微生物は、生体内での生残性が改善されていることから、微生物の持つ保健効果をよ
り確実に発揮することができる。さらに、この改変微生物は、低温保存下での生残性が改
善されることから、製品の保存期間を延長することができるようになる。さらに、製品の
製造時に、より酸度の高い状態まで培養可能なため、初期培養の菌数を増加させることが
でき、1 回の培養で多くの菌数を回収することができる。

また、本発明によれば、酸耐性が弱まった改変微生物を容易に作出することができる。
このような改変微生物は、胃酸で多くが死滅することから、微生物の持つ保健効果を胃で
は発揮させない微生物として使用することができる。

また、本発明のスクリーニング方法によれば、酸耐性を有する微生物を簡易にスクリー
ニングすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ビフィドバクテリウムにおける *fadD* 遺伝子の転写を制御するプロモーター領
域の塩基配列を比較した図。開始コドン塩基から 1 bp 上流の塩基番号を - 1 として表記
。四角で囲んだ部分が変異が存在する箇所。

【図2】*fadD* 遺伝子の相対転写量 (対 YIT 4008 株) を示すグラフ。

【図3】*fadD* 遺伝子発現用プラスミド DNA の作成図。

【図4】質粒転換体の *fadD* 遺伝子の相対転写量 (対 YIT 4008 株) を示すグラフ
。

【図5】酸・胆汁酸連続処理後の生存率を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明における *fadD* 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 1) 及びこれと高い類似
性を有する複数のヌクレオチド配列が、NCBI データベースにて登録されており、脂肪
酸をアシル CoA に変換する酵素である *long-chain-fatty-acid*
CoA ligase としてその機能が推定されている。

【0015】

本発明において、*fadD* 遺伝子の発現を制御するとは、*fadD* 遺伝子の発現を阻害
又は抑制すること、或いは *fadD* 遺伝子の発現を増強又は新たに導入することが包含さ
れる。*fadD* 遺伝子の発現を阻害又は抑制することにより、酸耐性を増強することがで
き、*fadD* 遺伝子の発現を増強又は新たに導入することにより、酸耐性を弱くすること
ができる。

本発明において、*fadD* 遺伝子の発現を制御する対象微生物としては、特に限定され
ないが、酸耐性の増強が求められる有用なグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母等が好
適に挙げられる。中でもグラム陽性細菌が好ましく、特に生体への安全性が確認されてい
るラクトバチルス属細菌、ビフィドバクテリウム属細菌が好ましい。

ラクトバチルス属細菌としては、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・パラカゼ
イ、ラクトバチルス・ゼアエ、ラクトバチルス・ラムノーサス等のラクトバチルス・カゼ
イグループに属する細菌の利用が好ましく、特にラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチル
ス・ラムノーサスを好適に利用することができる。

また、ビフィドバクテリウム属細菌としては、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ピフ

10

20

30

40

50

イドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ビフィドバクテリウム・ピフィダム、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム、ビフィドバクテリウム・アンギュラタム等が挙げられ、特にビフィドバクテリウム・プレーベを好適に利用することができる。

ヒトにとって有用な生理効果を示すビフィドバクテリウム属細菌は、偏性嫌気性菌であり、酸素や低pH、高酸度に弱く、製造時の増殖や保存時の生残性等、取扱いに困難な点が多いことから、本発明の適用対象となる微生物として好適である。

【0016】

本発明において、fadD遺伝子の発現を阻害又は抑制するとは、典型的には、(i) fadD mRNAへのfadD遺伝子の転写を阻害又は抑制する、(ii) fadDタンパク質へのfadD mRNAの翻訳を阻害又は抑制することが挙げられるが、これらに限定されない。

【0017】

fadD遺伝子の発現を阻害するには、当該遺伝子を破壊、欠損すればよく、この方法としては、全く別のDNA断片を遺伝子の内部に挿入する挿入失活法や段階的な相同組換えによって標的遺伝子の一部又は全部を欠失する段階的二重交叉法が挙げられ、特に段階的二重交叉法が好ましい。

具体的には、fadD遺伝子の一部又は全部を欠失する場合には、欠失領域をはさむ両側の領域を染色体DNAから分離するか、あるいはPCR法によって増幅して分離し、例えばpYSS E3のような大腸菌では増殖するが対象とする微生物中では複製が出来ないプラスミドベクターにそれらDNA断片を本来の向きと同じ向きに並んだ状態でクローニングする。次に、得られる組換えプラスミドDNAを、欠失を起こさせようとする微生物にエレクトロポレーション法等を用いて導入し、生じる抗生物質耐性のクローンから、PCR法等によって目的の欠失領域の上流又は下流のクローニングした領域との相同領域で組換えを起こしてプラスミドが染色体上に挿入したクローンを選択する。こうして得たクローンを、抗生物質を含まない培地で継代培養を繰り返すことによって、プラスミドが再び近接して存在する相同領域間の組換えによって染色体から離脱し、菌の増殖に伴って消失することによって、抗生物質耐性をなくしたクローンを選択する。こうして得たクローンからPCR法等によってfadD遺伝子領域を欠失したクローンを分離することができる。

【0018】

fadD遺伝子の発現を抑制するには、当該遺伝子のmRNAの5'末端領域と相補的な短いRNAを合成することによる、いわゆるRNA干渉による方法や、該遺伝子の発現を制御する領域又は制御遺伝子を破壊若しくは欠損等して改変する方法を用いることができ、特に該遺伝子の発現を制御する領域の改変が好ましい。具体的には、fadD遺伝子の転写を制御するプロモーターの配列を改変することによって、該遺伝子のmRNAへの転写量を多くしたり、少なくしたりすることができる。ここで、fadD遺伝子のmRNAへの転写量を少なくするとは、相対転写量が1%以下、好ましくは0.1%以下になることをいう。相対転写量とは、同種の微生物の中でfadD遺伝子野生型である微生物のfadD遺伝子の発現量(例えば、mRNAの発現量)で、fadD遺伝子改変型である微生物のfadD遺伝子の発現量を除いたものをいう。ここで、fadD遺伝子野生型である微生物とは、fadD遺伝子又はそのプロモーターの塩基配列が変異しておらず、fadD遺伝子の発現が増強若しくは導入又は阻害若しくは抑制されていない微生物をいい、fadD遺伝子改変型である微生物とは、fadD遺伝子又はそのプロモーターの塩基配列を改変する等により、fadD遺伝子の発現が増強若しくは導入又は阻害若しくは抑制された微生物をいう。

また、ここで、プロモーターの配列を改変とは、プロモーター領域において、DNA断片を構成する一部の塩基(例えば、1~20個程度、好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個の塩基)が置換、欠失される場合、又は1~数個の塩基(例えば、1~1

10

20

30

40

50

0 個、好ましくは 1 ~ 5 個の塩基) が付加若しくは挿入される場合をいい、例えば、f a d D 遺伝子のプロモーターにおいて、開始コドン塩基から 6 8 b p 上流の塩基配列をチミン (T) からシトシン (C) に置換することをいう。

【 0 0 1 9 】

一方、f a d D 遺伝子の発現を増強するには、該遺伝子を導入した組換えプラスミドを対象とする微生物に導入すること、該遺伝子を染色体の別の場所に部位特異的組換えによって組み込むことによって微生物内での該遺伝子のコピー数を増加させること、該遺伝子のプロモーター配列を改変し、m R N A への転写量を多くすることによって発現を増加させること等の方法が挙げられ、特に該遺伝子のコピー数を増加させる方法が好ましい。

【 0 0 2 0 】

f a d D 遺伝子の他の微生物への導入方法としては、D N A の取り込み能を利用したコンピテンス法、プロトプラストを利用したプロトプラスト P E G 法及び高電圧パルスを利用したエレクトロポレーション法等を利用すればよい。また、f a d D 遺伝子を微生物染色体に組み込む場合には、相同組換えを利用した方法、部位特異的に組み込む方法を用いることができる。

【 0 0 2 1 】

また、f a d D 遺伝子のコピー数を増加させる方法の具体例としては、1 個の微生物細胞あたり複数個のコピー数を持つプラスミドに、f a d D 遺伝子とその遺伝子の本来のプロモーター配列とリボソーム結合部位を含めてクローニングするか、別の遺伝子から分離した、あるいは化学合成によって作成したプロモーターとリボソーム結合部位の下流に該遺伝子のポリペプチドをコードする領域だけをつなげてクローニングした組換えプラスミドを作成し、微生物細胞内にエレクトロポレーション法などによって導入することが挙げられる。これによって、微生物細胞内での該遺伝子のコピー数を上げることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明において、f a d D 遺伝子の発現が制御され、酸耐性が増強されるように調節された改変微生物は、酸耐性が増強されているため、当該微生物が元来有する種々の生理効果を効果的に発揮する飲食品や医薬品として利用することができる。また、酸耐性が弱まるように調節された改変微生物は、例えば当該微生物が元来有する種々の生理効果を胃に到達する前に発揮し、胃では作用しない微生物として利用することができる。

ここで、酸耐性とは、対象微生物が有するあらゆる酸、特に胃酸や胆汁酸に対する耐性を意味し、より具体的には低温状態でも機能する酸耐性を意味する。すなわち、低温状態では機能なくなると推測される A T P 依存による酸耐性とは明確に異なる。

ここで、低温状態とは、0 ~ 1 0 の状態にあることを云う。具体的には低温状態で保存 (低温保存) することが挙げられ、例えば 1 0 以下で 7 日以上、5 以下で 1 4 日以上、4 で 1 4 日以上保存することが挙げられる。

酸耐性の増強とは、微生物の f a d D 遺伝子やそのプロモーターを改変等することで f a d D 遺伝子の発現が阻害又は抑制されることにより、改変前の微生物に対して改変微生物の酸耐性が増強していることを意味する。より具体的には、 1×10^8 c e l l / m L 以上の菌数に培養した改変微生物を 4 、7 日間の条件で低温保存した後、3 7 で 6 0 分間、胃酸で処理した場合に、改変微生物の生存率 (胃酸処理前の生菌数に対する胃酸処理後の生菌数の割合) が改変前の微生物に比べ 5 倍以上、好ましくは 1 0 倍以上高い性質が挙げられる。又は 4 、1 4 日間の条件で保存した際には 3 0 倍以上、好ましくは 5 0 倍以上、4 、1 9 日間の条件で保存した際には 1 0 0 倍以上、好ましくは 1 5 0 倍以上高い性質が挙げられる。また、 1×10^8 c e l l / m L 以上の菌数に培養した改変微生物を 4 、7 日間の条件で低温保存した後、3 7 で 6 0 分間、胃酸で処理した後、さらに 3 7 で 6 0 分間、胆汁酸で処理した場合に、改変微生物の生存率 (胃酸及び胆汁酸の連続処理前の生菌数に対する胃酸及び胆汁酸連続処理後の生菌数の割合) が改変前の微生物に比べ 1 0 倍以上、好ましくは 3 0 倍以上高い性質が挙げられ、又は 4 、1 4 日間の条件で保存した際には 1 0 0 倍以上、好ましくは 2 0 0 倍以上高い性質が挙げられる。ここで、胃酸及び胆汁酸としては、例えば国際公開第 2 0 1 1 / 1 0 5 3 3 5 号に記載の、

10

20

30

40

50

人口胃液（pH 3.3）、人工胆汁（1.0% 牛胆汁（Ox gall））を用いることができる。

【0023】

本発明の改変微生物を飲食品や医薬品とする場合、菌体は、生菌又は加熱菌体（死菌体）のいずれでもよく、又凍結乾燥したものであってもよく、あるいはこれら微生物を含む培養物、菌体処理物として利用することもできるが、生菌の状態で利用することが好ましい。

【0024】

医薬品として使用する場合、本発明の改変微生物を固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬品製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散在、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤、賦形剤等の慣用の添加剤を適宜添加することもできる。

【0025】

また、本発明の改変微生物は、上記のような製剤とするだけでなく、飲食品に配合して使用することもできる。飲食品に配合する場合は、そのまま、または種々の栄養成分と共に含有せしめればよい。この飲食品は、微生物の酸耐性が所望の形で調節されているため、当該微生物が元来有する種々の生理作用を効果的に発揮する保健用食品又は食品素材として利用できる。具体的に本発明の方法により得られた改変微生物を飲食品に配合する場合は、飲食品として使用可能な添加剤を適宜使用し、慣用の手段を用いて食用に適した形態、すなわち、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳に添加して使用したり、水、果汁、牛乳、清涼飲料、茶飲料等の飲料に添加して使用してもよい。なお、飲食品には、動物の飼料も含まれる。

【0026】

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

【0027】

本発明の方法により得られた酸耐性が増強されるように調節された微生物は、低温状態でも高い酸耐性を有することから、酸が存在する製品中での菌の生残性が高い。そのため、低温保存中の生菌数の低下や死滅速度の増加が抑制され、製品規格の維持が容易となり、ラクトバチルス属細菌等の微生物が有する整腸作用等の一般的な生理効果を効果的に発揮させることができる。また、抗がん作用、ヘリコバクター・ピロリの除菌作用等の特異的な生理効果を元来有するラクトバチルス属細菌やビフィドバクテリウム属細菌に対して、本発明の方法により酸耐性を増強することで、該菌株を様々な飲食品に利用することが可能になると共に、該菌株の生残性が改善することで該菌株が有する生理効果を増強させることが可能となる。

また、本発明の方法により得られた酸耐性が弱まるように調節された微生物は、胃酸で多くが死滅することから、当該微生物が元来有する種々の生理効果を胃に到達する前に発

10

20

30

40

50

揮し、胃では作用しない微生物として利用することができる。

【0028】

上述したように、f a d D 遺伝子の発現が阻害又は抑制された場合に微生物の酸耐性が増強されることから、f a d D 遺伝子及び／又はその発現産物の発現量等を指標として酸耐性を有する微生物のスクリーニングが可能である。すなわち、f a d D 遺伝子及び／又はその発現産物の有無及び／又は発現量を測定することにより、当該酸耐性を有する微生物をスクリーニングすることができる。遺伝子の発現産物としては、m R N A やポリペプチド等が挙げられ、該ポリペプチドとしては、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

ここで、f a d D 遺伝子及び／又はその発現産物の測定は、f a d D 遺伝子や当該遺伝子由来のm R N A を検出し得るプローブやプライマーを用いて、微生物における標的とする遺伝子の有無、コピー数や発現量をサザンハイブリダイゼーション法やノーザンハイブリダイゼーション法、D N A マイクロアレイやR T - P C R 法により行うことができる。また、ポリペプチドの量を紫外吸収法、B C A 法（ピシンコニン酸法）、ローリー法のような分光光度法や電気泳動法により行うことができる。そして、f a d D 遺伝子やその発現産物の有無、それらの発現量により、目的の微生物（酸耐性を有する微生物）を選択すればよい。

【0029】

尚、上述した遺伝子の改変や微生物のスクリーニングを効率よく行うためには、配列番号 1 に示すポリヌクレオチド又はその一部を含む組換えベクター、配列番号 1 に示すポリヌクレオチドの一部断片からなるP C R 及びR T - P C R 用プライマー、配列番号 1 に示すポリヌクレオチド又はその一部を増幅することができるP C R 及びR T - P C R 用プライマー、配列番号 1 に示すポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド又はその一部からなるハイブリダイゼーション用の核酸断片を用いることが好ましい。

ここで、使用されるプライマー等の核酸断片としては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたヌクレオチド等が一般的に使用できるが、当該ヌクレオチドとしては、配列番号 1 に示す塩基配列に対応する部分ヌクレオチド配列であって、10～50個の連続した塩基、好ましくは15～35個の連続した塩基が好ましい。

以下、実施例によって本発明の内容をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0030】

実施例 1 f a d D 遺伝子のプロモーター領域の変異箇所の確認

酸耐性を有するビフィドバクテリウム ブレーベ Y I T 12272 (F E R M B P - 11320) と、その系統株であるビフィドバクテリウム ブレーベ Y I T 4008 (F E R M B P - 4538) およびビフィドバクテリウム ブレーベ Y I T 4065 (F E R M B P - 6223) の f a d D 遺伝子の周辺の塩基配列を、定法に従ってダイターミネーター法により解読し、比較した。その結果、Y I T 12272 では、f a d D 遺伝子のプロモーターにおいて、開始コドン塩基から 68 b p 上流の塩基配列が、チミン (T) からシトシン (C) に変異しており、その転写量が変化している可能性が考えられた。f a d D 遺伝子のプロモーターにおける変異箇所を図 1 に示す。

【0031】

実施例 2 f a d D 遺伝子の転写量解析

酸耐性を有するビフィドバクテリウム ブレーベ Y I T 12272、その系統株である Y I T 4008 および Y I T 4065 を M I L S 培地 (I w a t a a n d M o r i s h i t a , L e t t e r i n A p p l i e d M i c r o b i o l o g y , v o l 9 , 165 - 168 , 1989) を用いて 37 で嫌氣的に培養した。嫌気培養は気相を窒素置換してブチル栓をし、静置培養にて行った。

対数増殖期の各菌株より R N e a s y M i n i K i t (Q I A G E N 社製) を用いて T o t a l R N A を調製した。さらに、本 R N A 1 μ g を用いて P r i m e S c r i

10

20

30

40

50

p t 1 s t s t r a n d c D N A S y n t h e s i s K i t (T a K a R a 社製)により、c D N A 溶液を調製した。各菌株から調製したc D N A 溶液を鋳型とし、S Y B R P r e m i x E x T a q (T a K a R a 社製)と表1に示したプライマーを用いて、A B I P R I S M 7 5 0 0 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社製)によりリアルタイムPCR(95・30秒の反応後、95・5秒および60・34秒の反応を40サイクル)を行い、f a d D 遺伝子および16S r R N A 遺伝子の転写量を測定した。なお、16S r R N A 遺伝子の転写量を内部標準としてサンプル間の補正を行った。

【0032】

【表1】

10

標的	フォワード	リバース
f a d D	CACCTCCTATGACTGGGATCTGAC (配列番号2)	TGACGATATTGCGGATTGTTC (配列番号3)
16 r R N A	ATCGGGCTTTGCTTGGTG (配列番号4)	GAGCATCCGGCATTACCAC (配列番号5)

【0033】

20

各菌株におけるf a d D 遺伝子の転写量を、f a d D 遺伝子が野生型であるY I T 4008に対する相対値として図2に示した。Y I T 4065におけるf a d D 遺伝子の転写量はY I T 4008と同程度であったが、f a d D 遺伝子の上流に変異が生じたY I T 12272では転写量が大きく低下しており、Y I T 4008と比較した相対転写量は、0.1%以下であり、Y I T 4065と比較しても0.1%以下であった。

【0034】

実施例3 野生型のf a d D 遺伝子を導入した形質転換体の取得および形質転換体のf a d D 遺伝子の相対転写量

f a d D 遺伝子の酸耐性に与える影響を調べるために、Y I T 4008由来のf a d D 遺伝子プロモーターおよびf a d D 遺伝子をY I T 12272に導入した形質転換体 H M 0 1 0 2 株を作製した。

30

まず、Y I T 4008のゲノムDNAを鋳型とし、K O D - P l u s - (T O Y O B O 社製)と表2に示したプライマーを用いて、i C y c l e r (B i o - R a d 社製)によりPCR(96・15秒、60・30秒、72・150秒の反応を30サイクル)を行い、f a d D 遺伝子の全長とその上流300bpおよび下流100bpを含むDNA断片(配列番号6)を増幅した。

【0035】

【表2】

名称	シーケンス
fadD-u300-Eco-Fw	CGGAATTCAGGCGGAACAATCGGGGCAAA (配列番号7)
fadD-d100-Eco-Rv	CGGAATTCAGCAACTAGAACGCCTCGGCT (配列番号8)

40

下線部は、制限酵素の認識配列を示す

【0036】

増幅したDNA断片と特開平10-262670号公報に記載されたp B E 4ベクターを、同文献に記載の定法に従って制限酵素E c o R I にて消化した。両消化断片を用いて、D N A L i g a t i o n K i t V e r . 2 . 1 (T a K a R a 社製)によりラ

50

イゲーショ反応を行い、オリジナルプロモーター支配下での *f a d D* 遺伝子発現用プラスミド DNA を作製した。本プラスミド DNA の作製図を図 3 に示した。

【 0 0 3 7 】

本プラスミド DNA をエレクトロポレーション法により、*Bifidobacterium* *Y I T 1 2 2 7 2* に導入した。エレクトロポレーションは、*GENE PULS E R I I* (*B i o - R a d* 社製) を用い、 $200\ \Omega$ 、 $25\ \mu F$ 、 $18\ kV/cm$ の条件で行った。その後、 $3\ \mu g/mL$ のエリスロマイシンを添加した *M I L S* 寒天培地にエレクトロポレーション反応液を塗抹し、アネロパック (三菱ガス化学社製) を用いて 37 で 72 時間の嫌気培養を行った。生じたコロニーを形質転換体 *H M 0 1 0 2* 株として取得し、定法に従ってアルカリ法によりプラスミド DNA を抽出し、導入したプラスミド DNA が保持されていることを確認した。

10

【 0 0 3 8 】

一方、*H M 0 1 0 2* 株の対照として、*p B E 4* ベクターのみを *Y I T 1 2 2 7 2* に導入した *H M 0 1 0 1* 株も、同様の方法で作製した。

【 0 0 3 9 】

Y I T 1 2 2 7 2、*H M 0 1 0 1* 株および *H M 0 1 0 2* 株の 3 株について、実施例 2 に記載の方法で *f a d D* 遺伝子の発現量を測定した。なお、形質転換体である *H M 0 1 0 1* 株および *H M 0 1 0 2* 株の培養は、*M I L S* 培地の酵母エキス濃度を 1.5% とした *Y - M I L S* 培地を用い、終濃度が $3\ \mu g/mL$ となるようにエリスロマイシンを添加して行った。

20

【 0 0 4 0 】

各株の *f a d D* 遺伝子の転写量を測定した結果、*Y I T 1 2 2 7 2* および *H M 0 1 0 1* 株と比較して、野生型の *f a d D* 遺伝子プロモーターおよび *f a d D* 遺伝子を導入した *H M 0 1 0 2* 株では、*f a d D* の転写量が高いことが判明した。各株における *f a d D* 遺伝子の転写量を、*Y I T 4 0 0 8* での転写量に対する相対値として図 4 に示した。

【 0 0 4 1 】

実施例 4 形質転換体の酸耐性測定

形質転換体の酸耐性をより明らかに確認するために低温保存後の酸耐性を測定した。上記実施例 3 に記載の培地で、 $1 \times 10^8\ c e l l / m L$ 以上の菌数となるよう一晩嫌気培養した *H M 0 1 0 1* 株 (培養後菌数: $8.5 \times 10^8\ c e l l / m L$) および *H M 0 1 0 2* 株 (培養後菌数: $8.8 \times 10^8\ c e l l / m L$) の各培養液を 4 で嫌気静置保存した。保存 0 日目、7 日目、14 日目、19 日目および 29 日目において、胃酸・胆汁酸連続処理を行い、両株の酸耐性を比較した。

30

胃酸・胆汁酸連続処理は、特許文献 6 に記載の人工胃液および人工胆汁を用いて以下のように行った。まず予め 37 で保温した人工胃液 ($pH\ 3.3$) $10\ mL$ に、 4 で保存した培養液 $0.5\ mL$ を添加して攪拌し、 37 で 60 分間の胃酸処理を行った。さらに、胃酸処理後の溶液 $2\ mL$ に対して、人工胆汁 ($1.0\%\ O x g a l l$) $1\ mL$ と反応緩衝液 (0.5% の塩化ナトリウム、 0.1% の塩化カリウム、 0.3% の炭酸水素ナトリウムを含有する $pH\ 8.0$ の緩衝液) $5\ mL$ を添加して攪拌し、 37 で 60 分間の胆汁酸処理を連続的に行った。胃酸処理 0 分後、同 60 分後、胃酸・胆汁酸連続処理 120 分後の各処理液 $1\ mL$ を適宜希釈した後、*T O S* プロピオン酸寒天培地 (ヤクルト薬品工業社製) に塗抹し、アネロパック (三菱ガス化学社製) を用いて 37 で 72 時間、嫌氣的に培養した。出現したコロニー数に総希釈倍率を乗じて培養液 $1\ mL$ 当たりの生菌数を求め、酸処理 0 分後の生菌数に対する、各処理後の生菌数の割合を生存率とした。

40

ここで、*H M 0 1 0 2* 株は野生型の *f a d D* 遺伝子、*H M 0 1 0 1* 株は変異型の *f a d D* 遺伝子を有し、それ以外の遺伝子は全く同一であることから、*H M 0 1 0 2* 株は *f a d D* 遺伝子改変前微生物、*H M 0 1 0 1* 株は *f a d D* 遺伝子改変微生物に相当する。

【 0 0 4 2 】

胃酸処理後および胃酸・胆汁酸連続処理後の両株の生菌数および生存率の測定結果を図 5 に、*H M 0 1 0 2* 株に対する *H M 0 1 0 1* 株の生存率の比を表 3 に示した。その結果、

50

低温保存の日数が経過するにつれて、野生型の f a d D 遺伝子プロモーターを導入した H M 0 1 0 2 株では、胃酸処理および胃酸・胆汁酸連続処理後の生存率が大幅に低下したが、H M 0 1 0 1 株では、生存率の低下の幅が小さく、酸耐性が H M 0 1 0 2 株と比較して増強されていた。H M 0 1 0 1 株の酸耐性が増強されていることは、生存率の比においても示された。このように、酸耐性の増強は、低温状態に置いた場合により顕著に観察された。

【 0 0 4 3 】

【表 3】

保存日数	胃酸処理後の 生存率の比	胃酸・胆汁酸連続 処理後の生存率の比
7 日 目	1 0 . 5	3 0 . 7
1 4 日 目	7 6 . 8	2 3 2
1 9 日 目	1 8 7	*
2 9 日 目	*	*

10

生存率の比 = H M 0 1 0 1 株の生存率 / H M 0 1 0 2 株の生存率

* H M 0 1 0 2 株の菌数が検出限界以下であったため、比を計算することができない

20

【 0 0 4 4 】

以上の結果から f a d D 遺伝子の転写増大は、微生物、特にビフィドバクテリウム プレーベにおける酸耐性を低下させる方向へ働き、逆に f a d D 遺伝子の転写を阻害又は抑制することは、微生物、特にビフィドバクテリウム プレーベにおける酸耐性を増強させる方向へ働くことが明らかになった。このため、f a d D 遺伝子の転写量を低下させることは、培養後の細胞内 A T P 量に依存することなく、微生物の酸耐性の増強に利用できると考えられる。

【図1】

YIT 4008 -300 AGGCGGAACA ATCGGGGCAA AAGACCCGCA TTTTTCGTCT TCGATCCCT GCTGCGTCAA
 YIT 4065 -300 AGGCGGAACA ATCGGGGCAA AAGACCCGCA TTTTTCGTCT TCGATCCCT GCTGCGTCAA
 YIT 12272 -300 AGGCGGAACA ATCGGGGCAA AAGACCCGCA TTTTTCGTCT TCGATCCCT GCTGCGTCAA

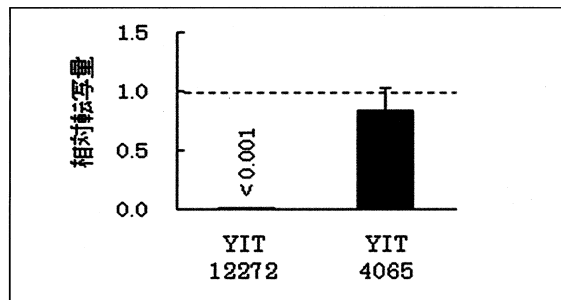
YIT 4008 -240 CTGATTGGA TGACATCTAG GCAGTAGTC AACGATCTCC AACCACTATC GGCAGTCTGT
 YIT 4065 -240 CTGATTGGA TGACATCTAG GCAGTAGTC AACGATCTCC AACCACTATC GGCAGTCTGT
 YIT 12272 -240 CTGATTGGA TGACATCTAG GCAGTAGTC AACGATCTCC AACCACTATC GGCAGTCTGT

YIT 4008 -180 TACCCAAACA TCAGAGGCGC AGTGTCATC CACCACATAG AACCTCCAA AACCTACGGT
 YIT 4065 -180 TACCCAAACA TCAGAGGCGC AGTGTCATC CACCACATAG AACCTCCAA AACCTACGGT
 YIT 12272 -180 TACCCAAACA TCAGAGGCGC AGTGTCATC CACCACATAG AACCTCCAA AACCTACGGT

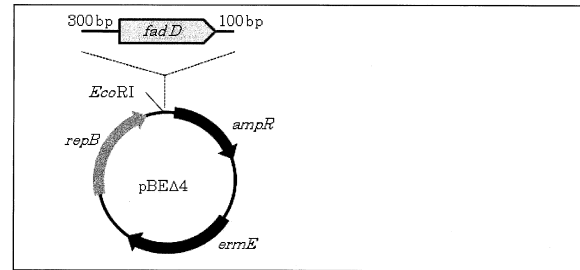
YIT 4008 -120 TGGTAGGCT TTTCTACGG TTGGTAAGG TGACGAGTTC GATGTGAAC ATTACAATCT
 YIT 4065 -120 TGGTAGGCT TTTCTACGG TTGGTAAGG TGACGAGTTC GATGTGAAC ATTACAATCT
 YIT 12272 -120 TGGTAGGCT TTTCTACGG TTGGTAAGG TGACGAGTTC GATGTGAAC ATTACAATCT

YIT 4008 -60 AAGGTTTGAG AGCGTTCGGC TTATGCTCGA ACGGCACTGA AAGGTTTACA GGAGCAAGAG
 YIT 4065 -60 AAGGTTTGAG AGCGTTCGGC TTATGCTCGA ACGGCACTGA AAGGTTTACA GGAGCAAGAG
 YIT 12272 -60 AAGGTTTGAG AGCGTTCGGC TTATGCTCGA ACGGCACTGA AAGGTTTACA GGAGCAAGAG

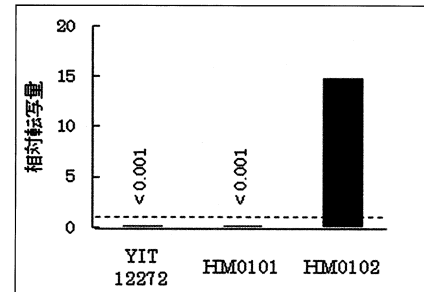
【図2】



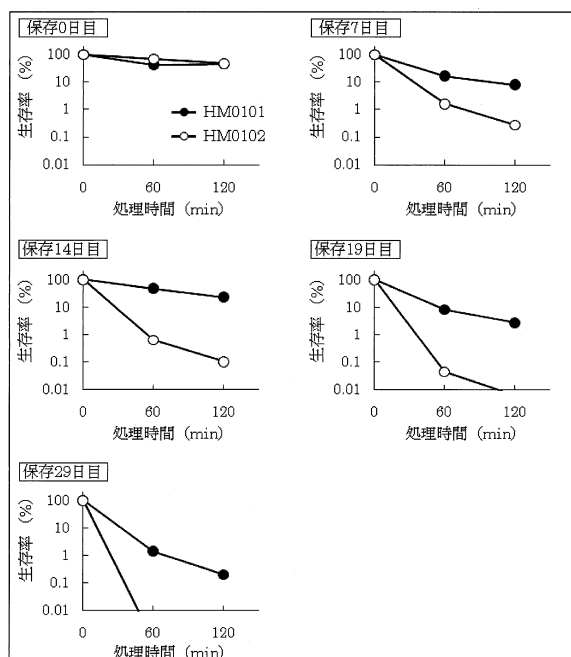
【図3】



【図4】



【図5】



【配列表】

0006541576000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 1/14 (2006.01) A 6 1 P 1/14

(72)発明者 飯野 透
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2013/105807(WO,A1)
特表2012-506715(JP,A)
特表2012-504963(JP,A)
特開2007-175016(JP,A)
国際公開第2011/105335(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
C12N 1/00
A23L 5/00-35/00
C12N 15/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPIDS/WPIX(STN)