(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年2月6日(06.02.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/028294 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/025886

(22) 国際出願日： 2024年7月19日(19.07.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-123842 2023年7月28日(28.07.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社ヤクルト本社 **(KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区海岸１丁目１０番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加藤 康介 **(KATO Kosuke)**; 〒1058660 東京都港区海岸１丁目１０番３０号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 中村 円 **(NAKAMURA Madoka)**; 〒1058660 東京都港区海岸１丁目１０番３０号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 世良田 雅紀 **(SERATA Masaki)**; 〒1058660 東京都港区海岸１丁目１０番３０号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 奥村 剛一 **(OKUMURA Takekazu)**; 〒1058660 東京都港区海岸１丁目１０番３０号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: デロイト トーマツ弁理士法人 **(DELOITTE TOHMATSU IP FIRM)**; 〒1600023 東京都新宿区西新宿６－２４－１ 西新宿三井ビルディング１８階 Tokyo (JP).

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

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** COMPOSITION FOR IMPARTING RESISTANCE TO ENVIRONMENTAL STRESS TO BACTERIUM

(54) 発明の名称： 細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するための組成物

(57) **Abstract:** Provided is a technology for imparting resistance to environmental stress to a bacterium such as a lactic acid bacterium. This composition for imparting resistance to environmental stress to a bacterium contains a cps1 gene group derived from Lacticaseibacillus paracasei. The composition is suitably used for imparting resistance to environmental stress caused by at least one selected from the group consisting of acids, bile components, alcohols, metal ions, hydrophobic substances, and surfactants.

(57) 要約：乳酸菌等の細菌に環境ストレスに対する耐性を付与する技術を提供する。ラクチカゼイバチルス パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）に由来するｃｐｓ１遺伝子群を含み、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するための組成物である。この組成物は、酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、及び界面活性剤からなる群から選ばれた少なくとも１種による環境ストレスに対する耐性を付与するために好適に用いられる。

WO 2025/028294 A1

明　細　書

発明の名称 ： 細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するための組成物

技術分野

[0001]　本発明は、乳酸菌の細胞壁多糖を形成する遺伝子群の利用に関する。

背景技術

[0002]　従来、生きた乳酸菌の摂取により健康増進を図るプロバイオティクスが提唱されてきた。プロバイオティクスによれば、摂取した乳酸菌の作用により、かぜ様症状を軽減するといった報告もある（非特許文献１，２）。

[0003]　一方、近年、微生物の菌体に由来する成分を生体への機能性成分として活用する試みがなされている。例えば、特許文献１、２には、乳酸菌の細胞壁に存在する細胞壁由来多糖には、免疫調節系細胞が産生するＩＬ６やＩＬ１２などのサイトカインの産生量を調節する機能性があることが記載されている。非特許文献３～６によれば、そのような機能性を有する乳酸菌の菌体やこれに由来の細胞壁多糖の分子的実体としては、分子量１０万を超える高分子量多糖であることが明らかにされつつある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２００３－７３２８６号公報

特許文献2：特開２０１５－１２９１１４号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Kan Shida, Tadashi Sato, Ryoko Iizuka, Ryotaro Hoshi, Osamu Watanabe, Tomoki Igarashi, Kouji Miyazaki, Masanobu Nanno, and Fumiyasu Ishikawa「Daily intake of fermented milk with Lactobacillus casei strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers」Eur J Nutr (2017) 56:45-53.

非特許文献2：Michael Gleeson, Nicolette C. Bishop, Marta Oliveir a, and Pedro Tauler「Daily Probiotic’s (Lactobacillus casei Shirota) Reduction of Infection Incidence in Athletes」International Journal o f Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 2010, 1-10.
非特許文献3：Masato Nagaoka, Masami Muto, Koji Nomoto, Takesi Ma tuzaki, Tunekazu Watanabe, and Teruo Yokokura「Structure of Polysacch aride-Peptidoglycan Complex from the Cell Wall of Lactoba cillus casei YIT9018」J. Biochemistry (1990), 108 (4), p568-571.
非特許文献4：S. Matsumoto, T. Hara, T. Hori, K. Mitsuyama, M. Na gaoka, N. Tomiyasu, A. Suzuki, and M. Sata「Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cyto kines in lamina propria mononuclear cells」Clin. Exp. Immunol. (2005) , 140 (3), p417-426.
非特許文献5：S. Matsumoto, T. Hara, M. Nagaoka, A. Mike, K. Mits uyama, T. Sako, M. Yamamoto, S. Kado, and T. Takada「A component of p olysaccharide peptidoglycan complex on Lactobacillus induced an impr ovement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer」Immunology (2008), 128, e170-e180.
非特許文献6：Emi Yasuda, Masaki Serata, and Tomoyuki Sako「Suppre ssive Effect on Activation of Macrophages by Lactobacillus casei Str ain Shirota Genes Determining the Synthesis of Cell Wall-Associated Polysaccharides」Appl. Environ. Microbiol. (2008), 74 (15) , p4746-4755.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] プロバイオティクスでは、生育中または摂取時に細菌が低pHに晒されるなどの環境ストレスによって乳酸菌の活性や菌体の完全性が損なわれかねないという問題があった。

[0007] 本発明の目的は、乳酸菌等の細菌に環境ストレスに対する耐性を付与する技術を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究した結果、乳酸菌の細胞壁多糖の形成にかかわる遺伝子群には、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するはたらきがあることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、その第１の観点においては、ラクチカゼイバチルス パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）に由来するｃｐｓ１遺伝子群を含み、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するための組成物を提供するものである。

[0010] 本発明にかかる、上記第１の観点による組成物にあっては、前記ｃｐｓ１遺伝子群は、ｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、及びｃｐｓ１Ｊ遺伝子を含むものであってもよい。

[0011] 本発明にかかる、上記第１の観点による組成物にあっては、

前記ｃｐｓ１Ａ遺伝子は、配列番号１に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｂ遺伝子は、配列番号２に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｃ遺伝子は、配列番号３に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｄ遺伝子は、配列番号４に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｅ遺伝子は、配列番号５に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｆ遺伝子は、配列番号６に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｇ遺伝子は、配列番号７に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｈ遺伝子は、配列番号８に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｉ遺伝子は、配列番号９に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、配列番号１０に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってもよい。

[0012] 本発明にかかる、上記第１の観点による組成物にあっては、

前記ｃｐｓ１Ａ遺伝子は、配列番号１１に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｂ遺伝子は、配列番号１２に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｃ遺伝子は、配列番号１３に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｄ遺伝子は、配列番号１４に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｅ遺伝子は、配列番号１５に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｆ遺伝子は、配列番号１６に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｇ遺伝子は、配列番号１７に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｈ遺伝子は、配列番号１８に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｉ遺伝子は、配列番号１９に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、配列番号２０に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってもよい。

[0013] 本発明にかかる、上記第１の観点による組成物にあっては、前記ｃｐｓ１遺伝子群は、ベクターに組込まれた形態で用いられるようにしてもよい。

[0014] 本発明にかかる、上記第１の観点による組成物にあっては、耐性を付与すべき前記環境ストレスが酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、及び界面活性物質からなる群から選ばれた少なくとも１種による環境ストレスであってもよい。

[0015] 一方、本発明は、その第２の観点においては、上記の組成物を用いて前記ｃｐｓ１遺伝子群を対象となる細菌に導入する工程を含むことを特徴とする細菌の環境ストレス耐性付与方法を提供するものである。

[0016] 本発明にかかる、上記第２の観点による方法にあっては、酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、及び界面活性物質からなる群から選ばれた少なくとも１種による環境ストレスに対する耐性を付与するものであってもよい。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、乳酸菌の細胞壁多糖の形成にかかわる遺伝子群を用いて、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与することができる組成物及び方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]試験例１においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の菌体をグラム染色して顕微鏡観察したときの観察像の一例を示す図表である。

[図2]試験例２においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の菌体の抗体反応性を調べたときの蛍光顕微鏡観察像の一例を示す図表である。

[図3]試験例３において限外ろ過前の総細胞壁多糖液、限外ろ過後の保持液と通過液について、それぞれをゲルろ過カラムクロマトグラフィにより分離・分析した結果を示す図表である。

[図4]試験例４においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸耐性について調べた結果を示す図表であり、塩酸でｐＨを調整した低ｐＨ緩衝液で処理したときの生残率を各種処理時間ごとに示す図表である。

[図5]試験例５においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸耐性について調べた結果を示す図表であり、ｐＨ無調整の培地又は塩酸を添加してなる低ｐＨ培地（ｐＨ４．５）で培養したときの増殖倍率の培養時間にわたる推移を示す図表である。

[図6]試験例５においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸耐性について調べた結果を示す図表であり、ｐＨ無調整の培地又は乳酸を添加してなる低ｐＨ培地（ｐＨ４．７）で培養したときの増殖倍率の培養時間にわたる推移を示す図表である。

[図7]試験例５においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸耐性について調べた結果を示す図表であり、ｐＨ無調整の培地又は乳酸を添加してなる低ｐＨ培地（ｐＨ４．７）で培養したときの１２時間経過時点の増殖倍率の結果を示す図表である。

[図8]試験例５においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸耐性について調べた結果を示す図表であり、ｐＨ無調整の培地又は酢酸を添加してなる低ｐＨ培地（ｐＨ４．７）で培養したときの１２時間経過時点の増殖倍率の結果を示す図表である。

[図9]試験例６においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の胆汁耐性について調べた結果を示す図表であり、デオキシコール酸を濃度０．１％（ｗ／ｖ）で含有せしめたＰＢＳ（ｐＨ７．０）で５分間処理したときの生残率の結果を示す図表である。

[図10]試験例６においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の胆汁耐性について調べた結果を示す図表であり、ウシ胆汁粉末を含有せしめたＰＢＳ（ｐＨ７．０）で６０分間処理したときの生残率の結果を各種濃度ごとに示す図表である。

[図11]試験例６においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の胆汁耐性について調べた結果を示す図表であり、ウシ胆汁粉末を含有せしめたＰＢＳ（ｐＨ７．０）で処理したときの生残率の結果を各種濃度及び各種処理時間ごとに示す図表である。

[図12]試験例７においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の酸・胆汁耐性について調べた結果を示す図表であり、塩酸で調製した低ｐＨ緩衝液（ｐＨ３．０）で６０分間処理したときの生残率、もしくは、更にウシ胆汁粉末を濃度０．２％（ｗ／ｖ）で含有せしめたＰＢＳ（ｐＨ７．０）で処理したときの生残率の結果を示す図表である。

[図13]試験例８においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株のアルコール耐性について調べた結果を示す図表である。

[図14]試験例９においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の金属イオン耐性について調べた結果を示す図表である。

[図15]試験例１０においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株の界面活性物質に対する耐性について調べた結果を示す図表である。

[図16]試験例１１においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株のヘキサデカンへの吸着性について調べた結果を示す図表であり、菌体培養液をヘキサデカンで処理した後に水層を回収して濁度（ＯＤ６１５）を測定した結果を示す図表である。

[図17]試験例１１においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株のヘキサデカンへの吸着性について調べた結果を示す図表であり、菌体培養液をヘキサデカンで処理した後の水層を回収してその水層中に含まれる菌数を測定した結果を示す図表である。

[図18]試験例１２においてYIT 9029株及びΔｃｐｓ株のゼータ電位について調べた結果を示す図表である。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明にかかる組成物は、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するためのものである。

[0020] ここで「環境ストレスに対する耐性」とは、細菌が環境ストレスに晒されたとき、生死性、増殖性、遺伝子発現性、タンパク質発現性、酵素活性などにかかわる生物活性を低下させずに、もしくは生物活性が低下したとしてもその程度が抑えられるよう、耐える能力をいう。「付与する」とは、そのような能力が細菌に備わることをいい、より具体的には、本発明にかかる組成物で細菌を処理したとき、処理しないときより上記したような細菌の生物活性が改善していることをいう。ある態様において、本発明にかかる組成物によって細菌に環境ストレスに対する耐性が付与されたかどうかは、本発明にかかる組成物で処理した細菌と処理しない対照の細菌とで、それらを所定のストレス環境に供して、細菌の生物活性を試験してみることによって評価することができる。

[0021] 本発明にかかる組成物によって細菌に耐性を付与すべき、その環境ストレスとしては、胃酸や胆汁などの消化液、細菌の発酵に伴い産生される代謝物、殺菌剤、静菌剤などの環境ストレスが挙げられる。また、細菌にとって環境ストレスの原因となる物質的実体として、例えば、酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、界面活性物質などが挙げられる。

[0022] ここにいう、環境ストレスの原因物質としての酸とは、限定されないが、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸、リン酸などの無機酸、および乳酸、酢酸、ギ酸、クエン酸、シュウ酸などの有機酸などが挙げられる。

[0023] また、環境ストレスの原因物質としての胆汁成分とは、限定されないが、例えば、コール酸、グリココール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、胆汁などが挙げられる。

[0024] また、環境ストレスの原因物質としてのアルコールとは、限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、１－プロパノール、イソプロパノール（２

－プロパノール）、１－ブタノール、２－ブタノール、グリセロールなどの低級アルコールおよび、炭素数６以上の高級アルコールなどが挙げられる。

[0025] また、環境ストレスの原因物質としての金属イオンとは、限定されないが、例えば、銅イオン、銀イオン、亜鉛イオン、コバルトイオン、ニッケルイオンなどが挙げられる。

[0026] また、環境ストレスの原因物質としての疎水性物質とは、限定されないが、例えば、ヘキサン、オクタン、デカン、ドデカン、テトラデカン、ヘキサデカン、ベンゼン、フェノール、トルエン、安息香酸、ニトロベンゼン、スチレン、キシレン、クレゾール、ヒドロキノン、アセトン、クロロホルム、ジエチルエーテルなどが挙げられる。上記疎水性物質としては、極性が低いものがより好ましい。

[0027] また、環境ストレスの原因物質としての界面活性物質とは、限定されないが、例えば、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（ＣＴＡＢ：Hexadecyltrimethylammonium bromide）、ベンザルコニウム塩化物、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、ラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ：Sodium lauryl sulfate）、塩酸アルキルジアミノエチルグリシン、胆汁酸、脂肪酸などが挙げられる。上記界面活性物質としては、陽イオン性であるものがより好ましい。

[0028] 本発明にかかる組成物は、ラクチカゼイバチルス パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）に由来するｃｐｓ１遺伝子群を含むものである。そして、これを対象とする細菌に導入して、その細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するものである。よって、別の観点からみれば、本発明は、上記の組成物を用いてｃｐｓ１遺伝子群を対象となる細菌に導入する工程を含む、細菌の環境ストレス耐性付与方法を提供するものである。上記ｃｐｓ１遺伝子群は、より具体的には、ｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、及びｃｐｓ１Ｊ遺伝子を含む遺伝子群である。上記ｃｐｓ１遺伝子群のＤＮＡ配列は、米国国立生

物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号ＡＢ４７０６４９．１として登録されており、当業者に利用可能である。以下、本発明に用いる上記遺伝子群のことを単に「ｃｐｓ１遺伝子群」という場合がある。

[0029] ここで、上記ｃｐｓ１Ａ遺伝子は、配列番号１に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１１に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ａ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0030] また、上記ｃｐｓ１Ｂ遺伝子は、配列番号２に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１２に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0031] また、上記ｃｐｓ１Ｃ遺伝子は、配列番号３に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１３に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0032] また、上記ｃｐｓ１Ｄ遺伝子は、配列番号４に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１４に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の

相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0033] また、上記ｃｐｓ１Ｅ遺伝子は、配列番号５に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１５に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0034] また、上記ｃｐｓ１Ｆ遺伝子は、配列番号６に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１６に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0035] また、上記ｃｐｓ１Ｇ遺伝子は、配列番号７に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１７に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0036] また、上記ｃｐｓ１Ｈ遺伝子は、配列番号８に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１８に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の

相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0037] また、上記ｃｐｓ１Ｉ遺伝子は、配列番号９に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号１９に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0038] また、上記ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、配列番号１０に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであってよい。また、配列番号２０に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってよい。相同性は９０％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上などであってよい。一定以上の相同性を有していれば、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子の機能性を発現し得るからである。

[0039] 上記ｃｐｓ１遺伝子群や、これに含まれるｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子については、当業者に周知の、例えばＰＣＲやＤＮＡ合成などの手段を使用して、そのポリヌクレオチド配列を備えたＤＮＡを合成することができる。また、常法のクローニングベクターを利用して、クローニングや増幅、シークエンス確認などを行うことができる。クローニングベクターとしては、例えば、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ、Ｔ－Ｖｅｃｔｏｒ ｐＭＤ２０、ｐＹＳＳＥ３などが挙げられる。

[0040] 上記ｃｐｓ１遺伝子群や、これに含まれるｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、当業者に周知の遺伝子導入手段によって、これを細菌の細胞内に導入することができる。例えば、ケミカルトランスフォーメーション、エレクトロポレーション、ウイルスベクター、Ｃｒｉｓｐｒ／Ｃａｓ９などの手段が挙げられ得る。限定されないが、ある態様においては、特定の細菌に適した外来遺伝子導入用ベクターが知られているので、そのようなベクターに遺伝子の配列を含むＤＮＡを挿入したうえ、そのベクターを細菌の細胞内に導入するようにしてもよい。細菌の細胞内への導入は、例えば、エレクトロポレーションなどで行うことができる。外来遺伝子導入用ベクターとしては、限定されないが、例えば、ｐＬＰ１０、ｐＹＡＰ３００、ｐＹＡＰ３１０などが挙げられる。

[0041] 本発明にかかる組成物は、上記ｃｐｓ１遺伝子群や、これに含まれるｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子を、例えば、上述したような外来遺伝子導入用ベクターに組込んだ該ベクターの形態で含むような組成物であればよく、特にその組成物自体の形態に制限はない。例えば、固形物状であってもよく液体状であってもよく、その他の形態であってもよい。

[0042] 本発明において、環境ストレスに対する耐性を付与する対象となる細菌としては、特に制限はないが、例えば、乳酸菌が挙げられる。乳酸菌としては、特に制限されず、例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）、ラクチカゼイバチルス・カゼイ（Lacticaseibacillus casei）等のラクチカゼイバチルス属細菌、ラクトバチルス・ガセリ（Lactobacillus gasseri）、ラクトバチルス・アシドフィルス（Lactobacillus acidophilus）、ラクトバチルス・クレモリス（Lactobacillus cremoris）、ラクトバチルス・ヘルベティカス（Lactobacillus helveticu

s）、ラクトバチルス・デルブルッキィー　サブスピーシーズ．ブルガリカス（Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus）、ラクトバチルス・デルブルッキィー　サブスピーシーズ．デルブルッキィー（Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii）、ラクトバチルス・ジョンソニー（Lactobacillus johnsonii）等のラクトバチルス属細菌、リジラクトバチルス・サリバリウス（Ligilactobacillus salivarius）等のリジラクトバチルス属細菌、リモシラクトバチルス・ファーメンタム（Limosilactobacillus fermentum）等のリモシラクトバチルス属細菌、リコリラクトバチルス・マリ（Liquorilactobacillus mali）等のリコリラクトバチルス属細菌、ラクチプランチバチルス・プランタルム（Lactiplantibacillus plantarum）等のラクチプランチバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Streptococcus thermophilus）等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス　サブスピーシーズ．ラクチス（Lactococcus lactis subsp. lactis）、ラクトコッカス・ラクチス　サブスピーシーズ．クレモリス（Lactococcus lactis subsp. cremoris）、ラクトコッカス・プランタルム（Lactococcus plantarum）、ラクトコッカス・ラフィノラクチス（Lactococcus raffinolactis）等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）、エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）等のエンテロコッカス属細菌、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（Bifidobacterium longum）、ビフィドバクテリウム・アニマーリス（Bifidobacterium animalis）、ビフィドバクテリウム・ズイス（Bifidobacterium suis）、ビフィドバクテリウム・インファンティス（Bifidobacterium infantis）、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス（Bifidobacterium adolescentis）、ビフィドバクテリウム・カテヌラータム（Bifidobacterium catenulatum）、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム（Bifidobacterium pseudocatenulatum）、ビフィドバクテリウム・ラクチス（Bifidobacterium lactis）、ビフィドバクテリウ

ム・グロボサム（Bifidobacterium globosum）等のビフィドバクテリウム属細菌等が挙げられる。なお、本明細書において「乳酸菌」とは、一般にビフィズス菌と称される種類の菌も含む意味である。また、乳酸菌は１種類を単独で用いてもよく、２種以上を組み合わせて用いてもよい。

[0043] なお、近年、ラクトバチルス属の乳酸菌は再分類されている。すなわち、従来ラクトバチルス（Lactobacillus）属に属していた乳酸菌について、その菌属が細分化され、ならびに菌種の一部において属名が変更されることになった。

[0044] （乳酸菌の再分類について）

・Zheng et al., A taxonomic note on the genus Lactobacillus : Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020 Apr; 70(4):2782-2858DOI 10.1099/ijsem.0.004107.

[0045] よって、本明細書では再分類以降の新分類の表記で示すものとする。また、例えば、旧分類においてラクトバチルス・カゼイ（Lactobacillus casei）又はラクトバチルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）に分類されていた乳酸菌のなかで、新たにラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）として分類され得るものは、本願のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）に含まれるものとする。

[0046] 上記ｃｐｓ１遺伝子群や、これに含まれるｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子が導入された細菌は、その細菌の種類に応じて、適宜、好適な培地、培養方法、保存方法等がそれぞれ知られているので、そのように細菌に適した公知の方法に従い、遺伝子導入がなされた菌（形質転換体）についても、増殖させたり、維持したりすることができる。例えば、乳酸菌である

ラクチカゼイバチルス パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）について、好ましい培養培地としては、Rogosa培地（Rogosa et al., A Selective Medium for the Isolation and Enumeration of Oral Lactobacilli. Journal of Dental Research, 1951 Oct; 30(5): 682-689. doi:10.1177/00220345510300051201）、de Man Rogosa Sharpe（MRS）培地（de Man et al., A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1960 Apr; 23(1): 130-135. doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x）、牛乳、脱脂乳、豆乳、果汁、野菜汁等が挙げられる。また、市販製品として、「Difco Lactobacilli MRS broth」（Becton, Dickinson and Company）、「ＧＡＭブイヨン」（日水製薬株式会社）、「変法ＧＡＭブイヨン」（日水製薬株式会社）、「ＭＲＳブロス」（Merck KGaA）等が挙げられる。培養は、液体培地に播種して３０～４２℃の条件下に撹拌培養又は静置培養したり、あるいは平板培地上に塗布して同様の温度条件下に静置培養したりするなどであり得る。液体培地での培養後には、遠心分離等により培養上清を取り除くことで菌体を回収することができる。また、回収した菌体に新鮮な水や水性緩衝液などを加えて懸濁して、更に遠心処理等により上清を取り除くことで、その菌体を洗浄することができる。

[0047] 本発明により遺伝子導入がされた菌（形質転換体）については、種々、所望の要請に応じて、各種の食品素材や製剤素材等とともに、適宜、飲食品、医薬品、サプリメント等として利用することができる。そのような形態への調製は、飲食品の製造上の公知の手段、ないしは医薬品又はサプリメントの製剤上の公知の手段などによって、行うことができる。

実施例

[0048] 以下に実施例を挙げて本発明について更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

[0049] 〔１．材料と方法〕

（１）供試菌株

＜１＞ YIT 9029株

ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）YIT 9029株。ラクトバチルス・カゼイ YIT 9029（FERM BP-1366、受託日：昭和56年5月1日）としてブダペスト条約の国際寄託当局である独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター（〒292-0818　日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2－5－8 120号室）に国際寄託されている。以下では、この菌株を「YIT 9029株」という場合がある。

[0050] ＜２＞　Δｃｐｓ株の造成

ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）YIT 9029株のゲノムには、細胞壁多糖合成関連遺伝子群（cell wall-associated polysaccharide synthesis（ｃｐｓ）遺伝子群）（以下、「ｃｐｓ１遺伝子群」という場合がある。）として知られる、全長約１１ｋｂの領域が存在している（Appl. Environ. Microbiol. (2008), 74 (15), p4746-4755.）。表１には、ｃｐｓ１遺伝子群に含まれる１０遺伝子、遺伝子産物のアミノ酸配列の長さ、アミノ酸配列から予測される機能について、まとめて示す。

[0051] YIT 9029株を宿主として、その細胞壁多糖合成関連遺伝子群（ｃｐｓ１遺伝子群）の全長約１１ｋｂを二重交叉法により完全欠失させた菌株を造成した。以下では、この菌株を「Δｃｐｓ株」という場合がある。

[0052] [表1]

表1cps1遺伝子群

遺伝子	配列番号（cDNA配列）	アミノ酸配列長さ	配列番号（アミノ酸配列）	予測される機能
cps1A	配列番号1	309 a.a.	配列番号11	Chain length determination
cps1B	配列番号2	252 a.a.	配列番号12	Capsular polysaccharide biosynthesis
cps1C	配列番号3	393 a.a.	配列番号13	Rhamnosyltransferase
cps1D	配列番号4	385 a.a.	配列番号14	Glycosyltransferase
cps1E	配列番号5	324 a.a.	配列番号15	Glycosyltransferase
cps1F	配列番号6	419 a.a.	配列番号16	-
cps1G	配列番号7	221 a.a.	配列番号17	Galactoside acetyltransferase
cps1H	配列番号8	478 a.a.	配列番号18	Polysaccharide repeat unit transporter
cps1I	配列番号9	295 a.a.	配列番号19	Glycosyltransferase
cps1J	配列番号10	238 a.a.	配列番号20	Sugar transferase

[0053] ＜２．１＞　挿入断片の作製

YIT 9029株から抽出したゲノムより、ｃｐｓ１Ａ遺伝子の上流約１ｋｂ塩基長のＤＮＡについては配列番号２１と２２に示すプライマーを用い、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子の下流約１ｋｂ塩基長のＤＮＡについては配列番号２３と２４に示すプライマーを用いて、それぞれのＤＮＡ断片をＰＣＲにより増幅した。このとき、得られた２種類の増幅産物の一方の末端には、後述するプラスミドベクターｐＹＳＳＥ３を線状化したときに生じる両端各１８塩基と等しい配列が付加されるようにプライマーを設計し（配列番号２２と２３）、同時に、得られた２種類の増幅産物の他の一方の末端に互いの配列の末端１６～２３塩基長のオーバーラップ領域が付加されるように設計されたプライマーを使用した（配列番号２１と２４）。次に、このオーバーラップ領域を利用して両配列をＰＣＲにより連結し（配列番号２３と２２に示すプライマーを使用）、合計約２ｋ塩基長の挿入断片を得た。確実に連結されたことを、連結部前後の２５０ｂｐ

を増幅する配列番号２５と２６に示すプライマーを用いたＰＣＲで確認した。

[0054] ＜２．２＞ 挿入断片を含むプラスミドの作製と選別

ＰＣＲ増幅産物として造成した挿入断片のクローニングには、ｐＹＳＳＥ３を使用した。ｐＹＳＳＥ３は、生育選択マーカーとして大腸菌と乳酸菌の両方で機能するエリスロマイシン耐性遺伝子を備え、大腸菌での複製領域を備えた遺伝子クローニング用プラスミドベクターである。ＰＣＲにより線状化したこのｐＹＳＳＥ３に、「In-Fusion HD Cloning Kit」（タカラバイオ株式会社）」を使用したシームレスクローニングにより上記ＰＣＲ増幅産物を連結した。

[0055] 挿入断片の確認は、ｐＹＳＳＥ３ベクター配列に由来する配列番号２７と２８に示すプライマーを用いたコロニーＰＣＲで行った。また、挿入断片の塩基配列を、上記配列番号２５～２８に示すプライマーをシークエンスプライマーとして用いてシーケンスし、配列に間違いがないことを確認した。

[0056] ＜２．３＞ プラスミドのYIT 9029株への導入と組換え体の選別

定常期のYIT 9029株を２０ｍＬの乳酸菌培養用培地「Difco Lactobacilli MRS broth」（Becton, Dickinson and Company）（以下、「ＭＲＳ」という場合がある。）の液体培地に５％（ｖ／ｖ）接種し、３７℃で２時間培養した。氷冷１５分間の後、７，０００ｒｐｍ、５分間遠心分離を行い、２０ｍＬの１ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７）で菌体を洗浄した。再度遠心後、１０ｍＬの１０％（ｖ／ｖ）グリセロールで菌体を洗浄した。再度遠心後、２００μＬの１０％（ｖ／ｖ）グリセロールで懸濁し、１．５ｍＬチューブに移して１５，０００ｒｐｍ、５分間の遠心分離を行った。１００μＬの１０％（ｖ／ｖ）グリセロールに懸濁後、うち４０μＬに作製したプラスミドを１μＬ添加しピペッティングで混合した。混合液をエレクトロポレーション用２ｍｍ幅キュベットに添加し、エレクトロポレーション装置「Gene Pulser II」（Bio Rad Laboratories, Inc.）で２５μＦ、２００Ω、１．５ＫＶの条件でパルスを印加した。パルス印加後の混合液を１ｍＬのＭＲＳ液体

培地に懸濁し、３７℃で１時間培養した後、２０μｇ／ｍＬのエリスロマイシンを含むＭＲＳ寒天培地の表面にコンラージ棒で２００μＬ／プレート塗布した。３７℃で３日間培養し、発生したコロニーの一部をコロニーＰＣＲに供試して目的の部位でゲノムに挿入されているかを確認した。プラスミドの挿入が確認されたコロニーを拾い、２０μｇ／ｍＬのエリスロマイシンを含むＭＲＳ液体培地で３７℃、２４時間培養した。

[0057] ＜２．４＞ 遺伝子破壊株の取得及び遺伝子破壊の確認

導入したプラスミドがゲノムに挿入されたことを、目的とする遺伝子破壊株Δｃｐｓ株において欠失したｃｐｓ１遺伝子群の下流側の配列に由来するプライマー（配列番号２９）と、上記ｐＹＳＳＥ３ベクター配列に由来する配列番号２８に示すプライマーを用いたＰＣＲ、または同様にしてｃｐｓ１遺伝子群の上流側の配列に由来するプライマー配列番号３０と、上記ｐＹＳＳＥ３ベクター配列に由来する配列番号２７に示すプライマーを用いたＰＣＲで確認した。確認できた菌株を、エリスロマイシンを含まないＭＲＳ液体培地で２代継代した。培養液を播種した変法Rogosa平板培地上で形状が野性株と比較して歪なコロニーを選別し、上記配列番号２９と３０に示すプライマーを用いたコロニーＰＣＲを実施し、ｃｐｓ１遺伝子群全体の欠失及び同箇所でそれ以上の欠失がないことを確認した。

[0058] [表2]

表2プライマーの配列

増幅・伸長配列の特長	プライマー配向	配列(5'→3')	配列番号
YIT 9029株ゲノム: cps1Aの上流約1 kbの増幅、ならびにcps1Jの下流約1 kbの増幅物との連結	Forward	5'-CACTGCGAAAAAAATCTAACTC TTTCCCCACCTAATC-3'	配列番号21
	Reverse	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGCA ATCAACGTGTAGTAATGC-3'	配列番号22
YIT 9029株ゲノム: cps1Jの下流約1 kbの増幅、ならびにcps1Aの上流約1 kbの増幅物との連結	Forward	5'-ACCCGGGGATCCTCTAGAGAC CATAATCATTCTTTTTGAGTG-3'	配列番号23
	Reverse	5'-GGGATTAGGTGGGGAAAGAG TTAGATTTTTTTCGCAGTGTAAAAAG-3'	配列番号24
連結部前後 250 bの増幅	Forward	5'-TTTGATATAGACTCCGTTATCGG-3'	配列番号25
	Reverse	5'-TCATTCTGACGGGTTTATAGG-3'	配列番号26
pYSSE3由来配列	Forward	5'-TTAAGTTGGGTAACGCCAGG-3'	配列番号27
	Reverse	5'-GGATAACAATTTCACACAGGA-3'	配列番号28
Δcps株において欠失したcps1遺伝子群の上流と下流の配列	Forward	5'-CGATTGTCACCAAAAACATC-3'	配列番号29
	Reverse	5'-GGAAGGGATACACCCTAAATC-3'	配列番号30

[0059] （２）菌の培養と洗浄

ＭＲＳ液体培地で２４時間培養した定常期の菌を、新鮮なＭＲＳ液体培地の１０～３０ｍＬに、０．１％（ｖ／ｖ）接種し、３７℃で２４時間培養した。得られた菌液を１０，０００×ｇで１５分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に元の培養液と等量の純水を添加し、ピペッティングにより菌を懸濁した。同様の条件で遠心分離と懸濁を１回繰り返して、更に遠心分離後の沈殿を洗浄菌体とした。

[0060] （３）総細胞壁多糖液の調製

乳酸菌から細胞壁多糖を抽出してなる多糖抽出液の調製は、次のようにして行った。まず、５ｍＭ Tris-maleate buffer（ｐＨ７．０）に１．５Ｍの濃度となるようにＬ－アラビノース（富士フイルム和光純薬株式会社）を溶解した。これに上記の洗浄菌体を懸濁し、細胞壁溶解酵素により処理した。具体的には、懸濁液１ｍＬあたり１００μｇの「Lysozyme from chicken egg white lyophilized powder」（Sigma-Aldrich Co.）及び１０μＬ（１００Ｕ）の「Mutanolysin (recombinant)」（A&A Biotechnology）を添加した。これを５０℃で清透化するまで２時間以上処理した。処理後、１０，０００×ｇで１５分間遠心分離し、上清を０．２２μｍ滅菌フィルター「33 mm Millex-GP」（Merck KGaA）に通して菌体デブリを取り除い

た。得られた溶解液を遠心式限外濾過フィルターユニット「Amicon Ultra-15 10 kDa MWCO」（Merck KGaA）（公称分画分子量：１万）に添加し、５，０００×ｇで３０分間遠心濾過した。保持液に１１ｍＬの滅菌水を添加し、５，０００×ｇで３０分間遠心濾過することを２回繰り返した。得られた約１ｍＬの保持液を回収し、９ｍＬの５．５ｍM Tris-maleate buffer ｐＨ７．０（糖を含まない）を添加したうえ、蛋白質分解酵素及び核酸分解酵素で処理した。具体的には、溶液１ｍＬあたり２０μｇのプロテアーゼ製剤「Pronase Protease, Streptomyces griseus」（Merck KGaA）及び２０μｇのトリプシン（Sigma-Aldrich Co.）を添加し、３７℃で２４時間処理した。反応液を１００℃で１０分間処理して、酵素失活化後、溶液１ｍＬあたり１μＬの「Benzonase Nuclease」（Merck KGaA）を添加し、３７℃で２４時間処理した。反応液を１００℃で１０分間処理して、酵素失活化後、反応液を遠心式限外濾過フィルターユニット「Amicon Ultra-15 10 kDa MWCO」（Merck KGaA）（公称分画分子量：１万）に添加し、５，０００×ｇで３０分間遠心濾過した。保持液に１１ｍＬの純水を添加し、５，０００×ｇで３０分間遠心濾過することを２回繰り返した。全量約１ｍＬの保持液を透析チューブ「Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO=6-8,000」（Spectrum Medical Industries）に添加し、室温で２４時間透析した。その透析後のチューブ内液を総細胞壁多糖液とした。

[0061] （４）ゲル濾過クロマトグラフィによる多糖含有調製物の分離・分析

ＨＰＬＣシステム「Alliance 2695 Separations Module」（Waters Corporation）を使用し、表３の条件で分離、分析した。得られたクロマトグラムは解析アプリケーション「Empower」（Waters Corporation）又は「Empower 3」（Waters Corporation）で解析した。標準品として、プルランP100、P200、P400、P800（昭和電工株式会社）、Polyethylene oxide M. W. 1,000,000（PEO; Thermo Fisher Scientific）、及びPolyethylene glycol 2,000,000（PEG; 富士フイルム和光純薬株式会社）を使

用した。標準品の分子量（メーカー記載）とＨＰＬＣでの溶出時間から検量線を作成し、サンプルのピークの分子量を推定した。

[0062] [表3]

表3ゲル濾過クロマトグラフィによる分離条件

システム	Alliance 2695 Separations Module HPLCシステム (Waters Corporation)
カラム	Shodex OHpak SB-G + SB-806 HQ (φ6.0 mm×50 mm + φ8.0 mm×300 mm)
移動相	50 mM NaCl
流速	0.5 mL/min
カラム温度	60 °C
検出器	Waters 2414 Refractive Index Detector及び Waters 2489 UV/Visible Detector
RI検出器温度	30 °C

[0063] 〔２．試験と結果〕

［試験例１］（顕微鏡観察）

YIT 9029株及びΔｃｐｓ株のＭＲＳ液体培地による培養液を純水で１０倍希釈し、剥離防止スライド「ＭＡＳコートスライドグラス」（松浪硝子工業株式会社）に１μＬ塗布した。風乾後、ブンゼンバーナーで炎熱固定を施し、グラム染色を行った。光学顕微鏡「Leica DM5500 B」（Leica Biosystems, Inc.）を用いて標本を明視野観察した。

[0064] その結果、図１に示されるように、ＭＲＳ液体培地で培養したYIT 9029株とΔｃｐｓ株の顕微鏡像を観察すると、Δｃｐｓ株ではYIT 9029株と比較して菌体の自己凝集が高い頻度で観察された

[0065] ［試験例２］（抗体反応性）

YIT 9029株及びΔｃｐｓ株のＭＲＳ液体培地による培養液を純水で１０倍希釈し、１０，０００×gで５分間遠心分離した。ペレットを０．０１Ｍリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に懸濁し、１００℃で１０分間処理した。１０，０００×gで５分間遠心分離後、ペレットを２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）及び１０倍希釈した細胞壁多糖に対する特異抗体を含むＰＢＳ

に懸濁し、３７℃で３０分間反応させた。１０，０００×gで５分間遠心分離後、ペレットをＰＢＳに懸濁し、再度１０，０００×gで５分間遠心分離後、ペレットを２％（ｗ/ｖ）ＢＳＡ及び５００倍希釈した二次抗体「Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgM」（Thermo Fisher Scientific, Inc.）を含むＰＢＳに懸濁し、３７℃で３０分間反応させた。１０，０００×gで５分間遠心分離後、ペレットをＰＢＳに懸濁する操作を２回行い、懸濁液を１ｃｍ×１ｃｍ桝入ＭＡＳコートスライドガラス（松浪硝子工業株式会社）の各桝に１μＬ塗布した。風乾後、蛍光染色用封入剤「VECTASHIELD Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H-1200」（Vector Laboratories, Inc.）を４．５μＬ／桝滴下し、カバーガラスを上からかけた。光学顕微鏡「Leica DM5500 B」（Leica Biosystems, Inc.）を用いて標本を位相差（×２８０）、明視野（×７００）、及び蛍光観察し、イメージングシステム「Leica MMAFシステム」（Leica Biosystems, Inc.）を用いてデジタル画像を取得した。蛍光画像は蛍光色素分子「Alexa Fluor 555」（励起光５５５ｎｍ、放出蛍光５８５ｎｍ）をモノクロームで撮影した後、視認のし易さを考慮して緑色に変換し、イメージングシステム「Leica MMAFシステム」上で位相差又は明視野画像とオーバーレイした。

[0066] その結果、図２に示されるように、YIT 9029株では２次抗体による蛍光が全ての菌体の周囲で観察されたが、同条件で処理を行ったΔｃｐｓ株では全く観察されなかった。

[0067] ［試験例３］（総細胞壁多糖液の分離・分析）

総細胞壁多糖液に滅菌水を添加して１０ｍＬとし、遠心式限外ろ過フィルターユニット「Amicon Ultra-15 100kDa MWCO」（Merck KGaA）（公称分画分子量：１０万）にて５，０００×ｇで２～５分間遠心濾過して１ｍＬ以下にした。保持液に１１ｍＬの純水を添加し、５，０００×ｇで２～５分間遠心濾過することを更に２回繰り返した。得られた保持液を「１００Ｋ残留液」とした。また、各遠心濾過工程で得られた通過液（計約３０ｍＬ）のボリュームを減らすため、遠心式限外ろ過フィルターユニット「Amicon Ultra-

15 10 kDa MWCO」（公称分画分子量：１万）にて５，０００×ｇで約１ｍＬとなるまで遠心濾過を繰り返して、その保持液を「１００Ｋ通過液」とした。

[0068] 図３には、限外ろ過前の総細胞壁多糖液、限外ろ過後の１００Ｋ残留液と１００Ｋ通過液について、それぞれをゲルろ過カラムクロマトグラフィにより分離・分析した結果を示す。

[0069] 図３に示されるように、YIT 9029株の総細胞壁多糖液では、公称分画分子量（ＮＭＷＬ）が１０万（１００Ｋ）の限外濾過フィルター（以下、「１００Ｋフィルター」という場合がある。）で分画すると、高分子量側にピークを示すものの一部が、その１００Ｋフィルターを通過することが明らかとなった（図３において左欄のクロマトグラム参照）。すなわち、１００Ｋ残留液には、クロマトグラム上でピークトップが１７分台の溶出時間を示すピークが認められ、１００Ｋ通過液には、クロマトグラム上でピークトップが１６分台の溶出時間を示すピークが認められた。なお、標準品を使用した検量線によれば、この１６分の溶出時間は分子量約１８０万のものの溶出時間に相当し、１７分の溶出時間は分子量約１００万のものの溶出時間に相当していた。

[0070] 一方、Δｃｐｓ株では、１００Ｋ残留液のクロマトグラム上においてピークトップが１７分台のピークが認められたものの、１００Ｋ通過液のクロマトグラム上においてピークトップが１６分台のピークは検出されなかった（図３において右欄のクロマトグラム参照）。

[0071] 以上のことから、YIT 9029株の総細胞壁多糖液をゲルろ過カラムクロマトグラフィにより分離・分析したときにみられる高分子量側のピークには、性質を異にする物質のピークが重なっていたものと考えられた。また、それはΔｃｐｓ株ではみられない現象であることから、１００Ｋフィルターを通過する物質はｃｐｓ１遺伝子群により形成される細胞壁多糖ではないかと考えられた。また、１００Ｋフィルターを通過する物質であることから、枝分かれやその枝の糖鎖長が少なく、直鎖状の構造を有する多糖であると推測された。

[0072] ［試験例４］（酸耐性の評価　その１）

ｃｐｓ１遺伝子群を欠失したことで正常な細胞壁多糖を形成できなくなったΔｃｐｓ株について、親株であり正常な細胞壁多糖を持つYIT 9029株を対照として、酸に対する耐性の評価を行った。

[0073] 具体的には、次のようにして試験を行った。すなわち、YIT 9029株又はΔｃｐｓ株のＭＲＳ液体培地による培養液を調製し、それぞれの９０．９μＬを、各種ｐＨに調整した９ｍＬの０．２Ｍグリシン－塩酸緩衝液（３７℃）に添加してボルテックスミキサーで混合した後、３７℃で静置した。各種所定の時間経過後に処理液を１ｍＬ採取して０．０１Ｍ ＰＢＳ（ｐＨ７．２～７．４）に添加し、その後適宜ＰＢＳで希釈した試料を調製して、ＭＲＳ平板培地に塗布した。試料を塗布した寒天培地を好気条件下の３７℃で２日間以上培養し、発生したコロニーの数を計測して、希釈倍率から菌液１ｍＬあたりのcolony forming unit（ＣＦＵ）数を算出した。このＣＦＵ数を生菌数として、処理前の培養液の生菌数と、各処理時間経過後において求められた生菌数から生残率を算出した。なお、ｐＨ無調整の０．２Ｍ グリシン水溶液（ｐＨ６．２）による処理ではYIT 9029株とΔｃｐｓ株のどちらも少なくとも処理開始後４時間目まで生残率が低下しないことを確認した（ともにほぼ１００％）。また、各種ｐＨに調整した処理液の処理開始後のｐＨ変動はすべて０．１未満であった。

[0074] 図４には、５回の独立した試験での生残率の結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0075] 図４に示されるように、塩酸でｐＨ２．６～３．０に調整したグリシン－塩酸緩衝液で菌体を処理した場合、YIT 9029株と比較して、Δｃｐｓ株では生残率に有意な減少が認められた。特に、ｐＨ２．８とｐＨ３．０の処理では、YIT 9029株の生菌数の減少が１％未満の場合（処理開始から６０分間経過後）でもΔｃｐｓ株は生菌数が３０％以上減少した

[0076] ［試験例５］（酸耐性の評価　その２）

ｃｐｓ１遺伝子群を欠失したことで正常な細胞壁多糖を形成できなくなったΔｃｐｓ株について、親株であり正常な細胞壁多糖を持つYIT 9029株を対照として、低ｐＨ条件下での増殖性の評価を行った。

[0077] 具体的には、次のようにして試験を行った。すなわち、塩酸、乳酸、又は酢酸でｐＨを４．５～４．７に調整したＭＲＳ液体培地、又はｐＨ無調整のＭＲＳ（ｐＨ６．２～６．３）に、別途、ＭＲＳ液体培地で２４時間培養した定常期のYIT 9029株又はΔｃｐｓ株を接種して、３７℃で３～２４時間培養した。各種所定の時間経過後に培養液の一部を採取し、試験例４と同様にして生菌数を測定して、接種した生菌数を分母とした増殖倍率を算出した。

[0078] 結果を図５～図８に示す。

[0079] 図５には、塩酸を添加してなる低ｐＨ培地で培養したときの結果を示す。なお、図５には、５回の独立した培養試験で増殖曲線の結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0080] 図５に示されるように、ｐＨ無調整の培地（ｐＨ６．３）ではYIT 9029株とΔｃｐｓ株とで増殖倍率に差が認められなかった。これに対して、塩酸を添加してｐＨ４．５に調整した培地では、Δｃｐｓ株の増殖倍率が培養開始３時間後以降の全ての測定時間で有意に低かった。菌株間の増殖倍率の比（YIT 9029株／Δｃｐｓ株）は、培養開始１２時間時点で最大の２．２となり、２４時間時点では１．４となった。

[0081] 図６及び図７には、乳酸を添加してなる低ｐＨ培地で培養したときの結果を示す。なお、図７には、５回の独立した培養試験での結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0082] 図６に示されるように、増殖曲線を検討したところ（ｎ＝１）、ｐＨ無調整の培地（ｐＨ６．３）ではYIT 9029株とΔｃｐｓ株とで増殖倍率に明らかな差が認められなかった。これに対して、乳酸を添加してｐＨ４．７に調整した培地では、Δｃｐｓ株の増殖倍率が培養開始３時間後以降の全ての測定時間で低かった。菌株間の増殖倍率の比（YIT 9029株／Δｃｐｓ株）は、培養開始１５時間時点で最大の２．７となり、２４時間時点では１．７となった。

[0083] 図７に示されるように、培養１２時間時点での増殖性を比較したところ（ｎ＝５）、ｐＨ無調整の培地（ｐＨ６．３）ではYIT 9029株とΔｃｐｓ株とで増殖倍率に差はほとんどなく、菌株間の増殖倍率の比（YIT 9029株／Δｃｐｓ株）はわずか１．２であった。これに対して、乳酸を添加してｐＨ４．７に調整した培地では、菌株間の増殖倍率の比（YIT 9029株／Δｃｐｓ株）は２．２となり、試験例４において塩酸を培地に添加したときと同様の結果となった。

[0084] 図８には、酢酸を添加してなる低ｐＨ培地で培養したときの結果を示す。なお、図８には、５回の独立した培養試験での結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0085] 図８に示されるように、培養１２時間時点での増殖性を比較したところ（ｎ＝５）、ｐＨ無調整の培地（ｐＨ６．２）ではYIT 9029株とΔｃｐｓ株とで増殖倍率に有意な差が認められなかった。これに対して、酢酸を添加してｐＨ４．７に調整した培地では、Δｃｐｓ株の増殖倍率が有意に低く、菌株間の増殖倍率の比（YIT 9029株／Δｃｐｓ株）は１．６であった。

[0086] ［試験例６］（胆汁耐性の評価）

ｃｐｓ１遺伝子群を欠失したことで正常な細胞壁多糖を形成できなくなったΔｃｐｓ株について、親株であり正常な細胞壁多糖を持つYIT 9029株を対照として、胆汁に対する耐性の評価を行った。

[0087] 具体的には、次のようにして試験を行った。すなわち、まず、デオキシコール酸ナトリウム（Sigma Aldrich）、又はウシ胆汁粉末（「Difco Oxgall」、Becton, Dickinson and Company）をリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨは約７．３）に既定量添加し、０．２２μｍフィルターで滅菌したものを調製した。

[0088] 各処理液の成分濃度及びｐＨは次のとおりである。

・デオキシコール酸：０．１％（ｗ/ｖ）、ｐＨ７．０

・ウシ胆汁（粉末１０％（ｗ／ｖ）相当）：０．０２～０．８％（ｗ／ｖ）、ｐＨ７．０

[0089] 別途、YIT 9029株又はΔｃｐｓ株のＭＲＳ液体培地による培養液を調製し、それぞれの１００μＬを、３７℃に保温した各処理液９．９ｍＬに添加してボルテックスミキサーで混合した後、３７℃で静置した。各種所定の時間経過後に処理液の一部を採取し、試験例４と同様にして生菌数を測定して、処理前の培養液の生菌数と、各処理時間経過後において求められた生菌数から生残率を算出した。

[0090] 結果を図９～図１１に示す。

[0091] 図９には、デオキシコール酸による処理を５分間施したことによる影響を調べた結果を示す。なお、図９には、５回の独立した試験での生残率の結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0092] 図９に示されるように、YIT 9029株と比較してΔｃｐｓ株の生残率が有意に低かった。具体的には、YIT 9029株はΔｃｐｓ株よりも生残率の平均値が約８倍高かった。

[0093] 図１０には、ウシ胆汁による処理を６０分間施したことによる影響を調べた結果を示す。なお、図１０には、５回の独立した試験での生残率の結果を平均してその標準偏差とともに示す。

[0094] 図１０に示されるように、YIT 9029株と比較してΔｃｐｓ株の生残率が低い傾向が認められた。特に、ウシ胆汁濃度０．２％（ｗ／ｖ）では有意に低かった。

[0095] 図１１には、ウシ胆汁の各種濃度における、生残率の経時変化の詳細について調べた結果を示す（ｎ＝１）。

[0096] 図１１Ａ～図１１Ｃに示されるように、菌株やウシ胆汁濃度によらず処理開始５分間経過以内に生残率が急激に減少し、その後６０分間経過までは緩やかに減少した。このとき、YIT 9029株に比べてΔｃｐｓ株の生残率が低く、約２～６倍の差が認められた。

[0097] ［試験例７］（酸・胆汁耐性の評価）

ｃｐｓ１遺伝子群を欠失したことで正常な細胞壁多糖を形成できなくなったΔｃｐｓ株について、親株であり正常な細胞壁多糖を持つYIT 9029株を対照として、酸・胆汁に対する耐性の評価を行った。

[0098] 具体的には、次のようにして試験を行った。すなわち、まず試験例４で調製したｐＨ３．０の０．２Ｍグリシン－塩酸緩衝液、又は試験例６で調製したウシ胆汁濃度０．２％（ｗ／ｖ）のリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．０）を準備した。別途、YIT 9029株又はΔｃｐｓ株のＭＲＳ液体培地による培養液を調製し、それぞれの１ｍＬを、３７℃に保温した０．２Ｍグリシン－塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）の９ｍＬに添加してボルテックスミキサーで混合した後、３７℃で静置した。６０分間経過後に処理液の一部を採取し、この試料について試験例４と同様にして生残率を算出した。また、つづけてウシ胆汁で処理する場合には、更に、その処理液の１ｍＬを採って、３７℃に保温したウシ胆汁濃度０．２％（ｗ／ｖ）のリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．０）の９ｍＬに添加してボルテックスミキサーで混合した後、３７℃で静置した。６０分間経過後に処理液の一部を採取し、この試料について試験例４と同様にして生残率を算出した。

[0099] 結果を図１２に示す。

[0100] 図１２に示されるように、塩酸で調製した０．２Ｍグリシン－塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）での６０分間の処理により、Δｃｐｓ株のみ生残率が減少した。更に、続けて濃度０．２％（ｗ／ｖ）のウシ胆汁での６０分間の処理後には、YIT 9029株の生残率は７３％であったのに対して、Δｃｐｓ株の生残率は１９％にまで減少した。

[0101] ［試験例８］（アルコール耐性の評価）

・アルコールでの菌体処理

ＭＲＳ液体培地で１２時間培養した対数増殖期のYIT 9029株またはΔｃｐｓ株の培養液（ともに約８×１０^{8}ＣＦＵ／ｍＬ）１００μＬを、各種濃度でアルコール（メタノール、エタノール、イソプロパノール、又は１－ブタノール）を含有する水溶液９．９ｍＬに添加し、室温で１０分間静置した。処理前

後で生菌数を測定し、添加した生菌数を分母とした比を生残率とした。独立した３回の試験により得られた生残率の平均値を求めた。なお、生菌数の測定下限値は２００ＣＦＵ／ｍＬであった（生残率は約０．００２％）。測定下限値未満となったデータについては、グラフ上は生残率０．００１％として示したが、平均値の計算には含めなかった。

[0102] ・生菌数測定

培養液を生理食塩水で適宜希釈した後、事前に作製したＭＲＳ平板培地にスパイラルプレーターEDDY JET 2（IUL Instruments GmbH）を用いて希釈菌液を塗布した。３７℃で２日間以上培養した培地に生育したコロニーを自動コロニーカウンターProtoCOL 3（Synoptics Ltd.）を用いて計数し、得られたＣＦＵ数を生菌数とした。

[0103] ・結果

図１３に示されるように、いずれのアルコールの場合でも、Δｃｐｓ株に比べてYIT9029株のほうが、生残率が高い傾向が認められた。

[0104] ［試験例９］（金属イオン耐性の評価）

・金属イオン存在下での増殖性の評価

ＭＲＳ液体培地に酸化銅微粉末（CuO(II), nanopowder, <50 nm particle size, Sigma）を０．００２５％～０．０１％（ｗ／ｖ）添加した。これに定常期のYIT 9029株またはΔｃｐｓ株のＭＲＳ培養液をそれぞれ０．０５％（ｖ／ｖ）又は０．１％（ｖ／ｖ）接種して３７℃で培養した（培養開始時生菌数はともに約１．５×10^6ＣＦＵ／ｍＬ）。２４時間まで経時的に生菌数とｐＨを測定した。培養開始時生菌数を１とした場合の増殖倍率を計算し、独立した５回の試験により得られた増殖倍率の平均値を求めた。

[0105] ・生菌数測定

試験例８と同様にして測定した。

[0106] ・結果

図１４に示されるように、ＣｕＯを添加しなかった場合には、培養８時間までは増殖倍率に差はなく、１５時間以降はYIT 9029株の方が有意な増加があ

るものの、その差は約２倍であった。一方で、ＣｕＯを添加した場合には、Δｃｐｓ株で増殖の遅延が認められ、試験した全ての濃度において、培養１５時間目で有意な差が認められた。その時の増殖倍率は、ＣｕＯ添加濃度０．００２５％（ｗ／ｖ）、０．００５％（ｗ／ｖ）、０．０１％（ｗ／ｖ）で、それぞれYIT 9029株がΔｃｐｓ株の約４倍、９倍、２３倍となった。培養２４時間目では、ＣｕＯ添加濃度０．００２５％（ｗ／ｖ）と０．００５％（ｗ／ｖ）でもΔｃｐｓ株の増殖倍率はYIT 9029株と２倍以内の差にまで追いついたが、ＣｕＯ添加濃度０．０１％ｖでは８時間目以降、２４時間目までYIT 9029株と有意な差があり、増殖倍率の比はそれぞれの時間でYIT 9029株がΔｃｐｓ株の約２倍、２３倍、６倍となった。

[0107] 以上から、YIT 9029株に比べΔｃｐｓ株においては銅イオンに対する耐性が弱まることが明らかとなった。

[0108] なお、ｐＨに関し、菌株間に大きな差が認められたＣｕＯ添加濃度０．００５％（ｗ／ｖ）と０．０１％（ｗ／ｖ）の培養１５時間目のｐＨは、ＭＲＳ培地でΔｃｐｓ株の増殖が停滞し始めるｐＨ４．８には到達していなかった。特に、増殖倍率の差が最大となったＣｕＯ添加濃度０．０１％（ｗ／ｖ）の１５時間目のΔｃｐｓ株のｐＨの平均値は５．８と比較的高くなっており、菌株間の増殖倍率の差は、酸耐性についての菌株間の差異に起因したものではなく、銅イオンの存在に対する耐性の差異であるものと考えられた。

[0109] また、別途、ＣｕＯ存在下で培養後の菌株の形態を顕微鏡観察した結果、Δｃｐｓ株ではＣｕＯ添加濃度０．００２５％（ｗ／ｖ）でほぼ全ての細胞に変形（縮れや球状化）が認められた。一方で、YIT 9029株では、ＣｕＯ添加濃度０．００２５％（ｗ／ｖ）では変形した細胞は認められず、ＣｕＯ添加濃度０．００５％（ｗ／ｖ）で少数（約１０%程度）の細胞に変形が見え始め、ＣｕＯ添加濃度０．０１％（ｗ／ｖ）でほぼ全ての細胞に顕著な変形が認められた。

[0110] ［試験例１０］（界面活性物質に対する耐性の評価）

・界面活性物質存在下での増殖性の評価

陽イオン界面活性剤としてHexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB, Sigma) とベンザルコニウム塩化物（武田薬品工業株式会社）を純水による２倍の段階希釈により０．６３～８０μＭの濃度に調整した。また、陰イオン界面活性剤としてラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）も同じく純水で０．０６～８ｍＭの濃度に調整した。各溶液を９６穴プレートに５０μＬ／ウェルずつ分注した。そこにYIT 9029株またはΔｃｐｓ株を約１×１０^{6}ＣＦＵ／ｍＬとなるように接種したＭＲＳ液体培地を５０μＬ／ウェル添加し、３７℃で２４時間培養した。培養後、９６穴プレート上面および下面から目視で観察し、物質毎に菌体による沈殿が生じなかった最小濃度を最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）とした。独立した３回の試験により得られたＭＩＣ値の幾何平均値を求めた。

[0111] ・結果

図１５に示されるように、陽イオン性の界面活性物質であるＣＴＡＢ又はベンザルコニウム塩化物の場合には、YIT 9029株のＭＩＣの平均値は、ともにΔｃｐｓ株に比べて２．０～２．５倍であり、YIT 9029株に比べΔｃｐｓ株においては陽イオン性の界面活性物質に対する耐性が弱まることが明らかとなった。一方、陰イオン性の界面活性物質であるラウリル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）の場合では、YIT 9029株のＭＩＣの平均値は、Δｃｐｓ株に比べて１．３倍であり、YIT 9029株に比べΔｃｐｓ株においては陰イオン性の界面活性物質に対する耐性が弱まる傾向が見られた。

[0112] ［試験例１１］（ヘキサデカンへの接着性）

・ヘキサデカンでの菌体処理

ＭＲＳ液体培地で２４時間培養した定常期のYIT 9029株又はΔｃｐｓ株を１０，０００×ｇ、１５分間の遠心分離で沈殿させた。上清を取り除き、等量のPUM buffer (16.9 g/L K_2HPO_4、7.26 g/L KH_2PO_4、1.8 g/L 尿素、0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) に懸濁した後、遠心と懸濁を再び行った。分光光度計PiCOSCOPE PAS-110（ウシオ電機株式会社）を使用し、懸濁液の６１５ｎｍ（最大吸収波長；測定波長域５７５－６６０ｎｍ）の波長における濁度（ＯＤ６１５）が

約０．５となるようにPUM bufferで希釈した。１．２ｍＬの懸濁液を１５ｍＬサンプルチューブに分注し、上からヘキサデカンを０．２～４．８ｍＬ添加した。ボルテックスミキサーで３０秒間攪拌した後、３０分間静置した。外観観察後、水層を分取し、ＯＤ６１５と総菌数を測定した。

[0113] ・総菌数測定

ＭＲＳ液体培地による培養液又は菌を含む水層をリン酸緩衝生理食塩水で５０倍希釈し、１ｃｍ×１ｃｍの撥水印刷枠付きのスライドガラス（松浪硝子工業株式会社）の一枠に２．７μＬの希釈液を添加した。カバーガラスを掛け、デジタルマイクロスコープVHX-8000（株式会社キーエンス）で、倍率４００倍で１００視野以上撮影した。視野を連結し、枠全体の面積（１００ｍｍ^2）の１／６（１６．６５ｍｍ^2）の範囲内の菌体を自動抽出して計数した。

[0114] ・結果

試験後の外観について、攪拌後に生じたエマルション滴はΔｃｐｓ株のほうが目視で分かるほど大きかった。また、分取した水層についてもΔｃｐｓ株のほうが濁度の減少（透明度の増加）が大きかったことが目視で認められた。

[0115] 図１６に示されるように、両菌株ともヘキサデカンの比率の増加に伴って水層のＯＤ６１５の減少が認められたが、YIT 9029株と比較してΔｃｐｓ株に有意な減少が認められた。

[0116] 図１７に示されるように、水層中の菌数を調べたところ、ＯＤ６１５と同様に、両菌株ともヘキサデカンの比率の増加に伴って水層中の菌数の減少が認められたが、YIT 9029株と比較してΔｃｐｓ株に有意な減少が認められた。

[0117] なお、Δｃｐｓ株における菌体の移動先を調べた結果、エマルション滴の内部（水層）に高密度で蓄積し、一方、油層中に菌体はほぼ認められなかった。

[0118] 以上のとおり、Δｃｐｓ株はヘキサデカンとの親和性がYIT 9029株よりも高くなることが明らかとなった。これは、Δｃｐｓ株では細胞壁多糖が形成されずに、菌体表面の疎水性が高まっているためではないかと考えられた。

[0119] ［試験例１２］（ゼータ電位の測定）

ＭＲＳ液体培地に菌株の、前培養液を１％（v／v）接種し、３７℃で２４時間培養した。次に、１０，０００×gで５分間遠心分離し、培養に使用したＭＲＳ液体培地と等量の超純水（Milli-Q）で沈殿を洗浄する操作を２回行った。分光光度計PiCOSCOPE PAS-110（ウシオ電機株式会社）で測定した６１５ｎｍにおける濁度（ＯＤ６１５）が１．０となるように超純水（Milli-Q）で調整し、これを菌懸濁液とした。ゼータ電位の測定直前に１．８ｍＬの５ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０、ｐＨ４．８、又はｐＨ４．０）に菌懸濁液を０．２ｍＬ添加し、これをキャピラリーセルDTS1070（Malvern Instruments Ltd.）に１ｍＬ充填した。セルを超音波で１５秒間処理後、Zetasizer Nano（Malvern Instruments Ltd.）で１サンプルあたり３回測定してゼータ電位の平均値を算出した。

[0120] その結果、図１８に示されるように、２回の試験で大きな差はなく、全体としてｐＨの低下に伴って負のゼータ電位の絶対値が小さくなった。そしてｐＨの変化に伴いYIT 9029株は－０．８～－４．７ｍＶ、Δｃｐｓ株は－４．４～－１４．２ｍＶの範囲で電位が変動した。同一のｐＨではΔｃｐｓ株の電位の絶対値はYIT 9029株よりも常に約３～４倍大きかった。

[0121] 以上のとおり、Δｃｐｓ株では、YIT 9029株に比べ、ゼータ電位の負方向への変動がより大きくなることが明らかとなった。これは、Δｃｐｓ株では細胞壁多糖が形成されずに、菌体表面の特性がH^+イオン誘因量を高めている（菌体周辺ｐＨの低下）ためではないかと考えられた。

[0122] ［調製例１］（ｃｐｓ１遺伝子群導入用プラスミドベクターの造成）

細胞壁多糖合成関連遺伝子群（ｃｐｓ１遺伝子群）を組込んだプラスミドベクターを造成した。

[0123] 具体的には、まず、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（Lactic aseibacillus paracasei）YIT 9029株のゲノムＤＮＡを鋳型にしたＰＣＲにより、上述した１０個の遺伝子からなるｃｐｓ１遺伝子群を含む、全長約１１ｋｂのゲノム領域に相当するＤＮＡを取得した。表４には使用したプライマー

セットを示す。配列番号３１に示すプライマーは、ｃｐｓ１Ａ遺伝子の上流のリボソーム結合部位配列を含む領域の配列とその５’末端側にＳｍａＩ切断部位を含む配列を有するプライマーであり、配列番号３２に示すプライマーは、ｃｐｓ１Ｊ遺伝子下流の領域の相補鎖の配列とその５’末端側にＰｓｔＩ切断部位を含む配列を有するプライマーである。

[0124] [表4]

表4プライマーの配列

増幅・伸長配列の特長	プライマー配向	配列(5’→3’)	配列番号
YIT 9029株ゲノム:cps1遺伝子群を含む約11kbの増幅	Forward	5’-TAACCCGGGTGGACTTGATTACACAAGC-3’	配列番号31
	Reverse	5’-TAACTGCAGACACTCTTTTTACACTGCG-3’	配列番号32

[0125] 上記プライマーセットを用い、KOD Plus DNAポリメラーゼ（東洋紡株式会社製）を使用して製品添付の方法に従ってＰＣＲ反応を行った。反応後には、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の処理を行って、増幅したＤＮＡを精製した。このＤＮＡを、制限酵素ＳｍａＩとＰｓｔＩ（タカラバイオ社製）で切断（３７℃で２０時間）した後、再度フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の処理を行って、ｃｐｓ１遺伝子群からなるＤＮＡ断片を精製した。

[0126] 一方、プラスミドベクターとしてはｐＹＡＰ３００を準備した。このプラスミドベクターにはファージＦＳＷ由来のａｔｔＰサイトとｉｎｔ遺伝子が備わり、ラクチカゼイバチルス・カゼイ（Lacticaseibacillus casei）のゲノム上のａｔｔＢサイトに部位特異的に組込まれるようになっている。 このプラスミドＤＮＡを制限酵素ＳｍａＩとＰｓｔＩ（タカラバイオ社製）で切断（３７℃で２０時間）し、線状化した。反応後には、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の処理を行って、線状化したプラスミドＤＮＡを精製した。その後、１０倍濃度の、ＣＩＰバッファー（東洋紡株式会社製）２０μＬと水を加えて容量を２００μＬとし、これにカーフインテスティンフォスファターゼ（ＣＩＰ）（東洋紡株式会社製）３μＬを加え、３７℃で２時間インキュベートし、末端を脱リン酸化した。反応後には、フェノール・クロロホル

ム抽出及びエタノール沈殿の処理を行って、線状化したプラスミドＤＮＡを精製した。

[0127] 上記ｃｐｓ１遺伝子群からなるＤＮＡ断片とｐＹＡＰ３００とのライゲーションは、以下のようにして行った。ｃｐｓ１遺伝子群からなるＤＮＡ断片と線状化したｐＹＡＰ３００プラスミドＤＮＡをそれぞれおよそ0.01～0.1 μgずつ混合し、これに等容量のDNAライゲーションキットVer.2.1（タカラバイオ社製）I液を加えて16℃で30分間インキュベートした後、氷中に置いた。このようにしてｐＹＡＰ３００ベクター中の転写プロモーターの下流にｃｐｓ１Ａ遺伝子からｃｐｓ１Ｊ遺伝子までの遺伝子が挿入されるように結合し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセルに添加して形質転換を行い、５００μｇ／ｍＬエリスロマイシンを含むＬＢ寒天培地に塗布して、３７℃で２日間培養した。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、その大きさと制限酵素切断による断片の大きさから目的の組換えプラスミドが得られたことを確認した。

[0128] ［調製例２］（ｃｐｓ１遺伝子群導入株の造成）

調製例１で得られたｃｐｓ１遺伝子群導入用ベクターを用いて、ラクチカゼイバチルス・カゼイ（Lacticaseibacillus casei）ATCC334にｃｐｓ１遺伝子群を導入した。

[0129] 具体的には、ラクチカゼイバチルス・カゼイ（Lacticaseibacillus casei）ATCC334をＭＲＳ液体培地に増殖させ、対数増殖期にある培養液を５，０００×ｇ、４℃で５分間遠心して集菌し、菌体を氷冷した２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．０）と１０％グリセロールでそれぞれ1回ずつ洗浄し、洗浄菌体を（初めの培養液のクレット値）ｘ２μＬの１０％グリセロールに懸濁した。菌懸濁液５０μＬと、上記組換えプラスミドＤＮＡ溶液３μＬを混合し、２ｍｍ幅のエレクトロポレーション用キュベットに入れ、ジーンパルサーＩＩ（バイオラッド社製）を用いて、１．５ｋＶ、２００Ω、キャパシタンス２５μＦでエレクトロポレーションを行った。

[0130] エレクトロポレーション後、ＭＲＳ液体培地１ｍＬを加えて３７℃で２時間培養後、エリスロマイシンを２０μｇ／ｍＬの濃度で加えたＭＲＳ寒天培地に

塗布し、３７℃で２～３日間インキュベートして、エリスロマイシン耐性のコロニーを得た。得られたコロニーの一部をとり、目的のプラスミドが目的の位置に挿入していることを、ラクチカゼイバチルス・カゼイATCC334のゲノム上のａｔｔＢサイト近傍の領域から選択された配列を有するプライマーと、調製例１で調製したＤＮＡの末端に比較的近い領域から選択された配列を有するプライマーとを用い、コロニーＰＣＲ法によって確認した。

[0131] 以上のようにして得られたラクチカゼイバチルス・カゼイATCC334に由来する菌株は、そのゲノム上のａｔｔＢサイトに、YIT 9029株から取得された、ｃｐｓ１Ａ遺伝子（配列番号１）、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子（配列番号２）、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子（配列番号３）、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子（配列番号４）、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子（配列番号５）、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子（配列番号６）、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子（配列番号７）、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子（配列番号８）、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子（配列番号９）、及びｃｐｓ１Ｊ遺伝子（配列番号１０）の１０個の遺伝子を含む、ｃｐｓ１遺伝子群導入株であった。

請求の範囲

[請求項1] ラクチカゼイバチルス パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei）に由来するｃｐｓ１遺伝子群を含み、細菌に環境ストレスに対する耐性を付与するための組成物。

[請求項2] 前記ｃｐｓ１遺伝子群は、ｃｐｓ１Ａ遺伝子、ｃｐｓ１Ｂ遺伝子、ｃｐｓ１Ｃ遺伝子、ｃｐｓ１Ｄ遺伝子、ｃｐｓ１Ｅ遺伝子、ｃｐｓ１Ｆ遺伝子、ｃｐｓ１Ｇ遺伝子、ｃｐｓ１Ｈ遺伝子、ｃｐｓ１Ｉ遺伝子、及びｃｐｓ１Ｊ遺伝子を含むものである、請求項１記載の組成物。

[請求項3] 前記ｃｐｓ１Ａ遺伝子は、配列番号１に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｂ遺伝子は、配列番号２に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｃ遺伝子は、配列番号３に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｄ遺伝子は、配列番号４に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｅ遺伝子は、配列番号５に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｆ遺伝子は、配列番号６に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｇ遺伝子は、配列番号７に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｈ遺伝子は、配列番号８に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｉ遺伝子は、配列番号９に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものであり、

前記ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、配列番号１０に示すポリヌクレオチド配列又はこれと９０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を有するものである、請求項２記載の組成物。

[請求項4] 前記ｃｐｓ１Ａ遺伝子は、配列番号１１に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｂ遺伝子は、配列番号１２に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｃ遺伝子は、配列番号１３に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｄ遺伝子は、配列番号１４に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｅ遺伝子は、配列番号１５に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｆ遺伝子は、配列番号１６に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｇ遺伝子は、配列番号１７に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｈ遺伝子は、配列番号１８に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｉ遺伝子は、配列番号１９に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであり、

前記ｃｐｓ１Ｊ遺伝子は、配列番号２０に示すアミノ酸配列又はこれと９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものである、請求項２記載の組成物。

[請求項5] 前記ｃｐｓ１遺伝子群は、ベクターに組込まれた形態で用いられる、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。

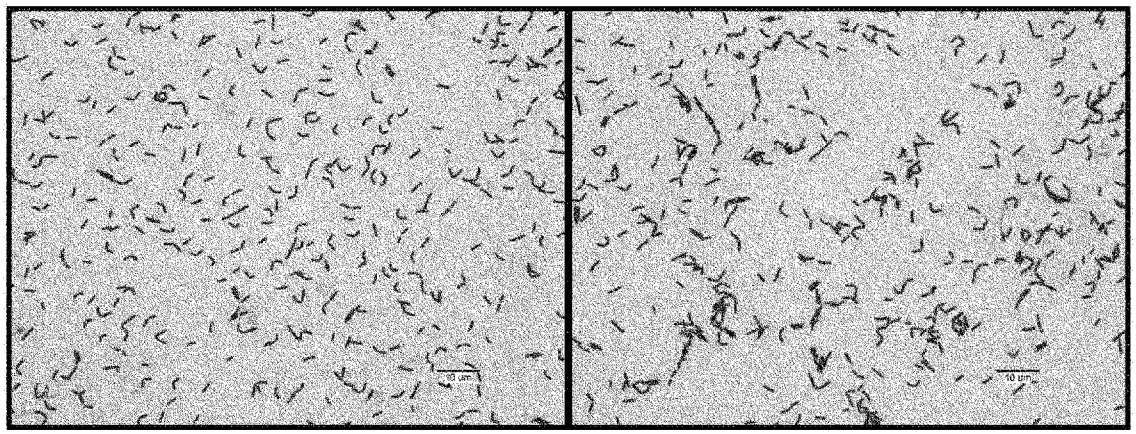
[請求項6] 耐性を付与すべき前記環境ストレスが酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、及び界面活性物質からなる群から選ばれた少なくとも１種による環境ストレスである、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。

[請求項7] 請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物を用いて前記ｃｐｓ１遺伝子群を対象となる細菌に導入する工程を含むことを特徴とする細菌の環境ストレス耐性付与方法。

[請求項8] 酸、胆汁成分、アルコール、金属イオン、疎水性物質、及び界面活性物質からなる群から選ばれた少なくとも１種の環境ストレスに対する耐性を付与する、請求項７に記載の環境ストレス耐性付与方法。

[図 1]

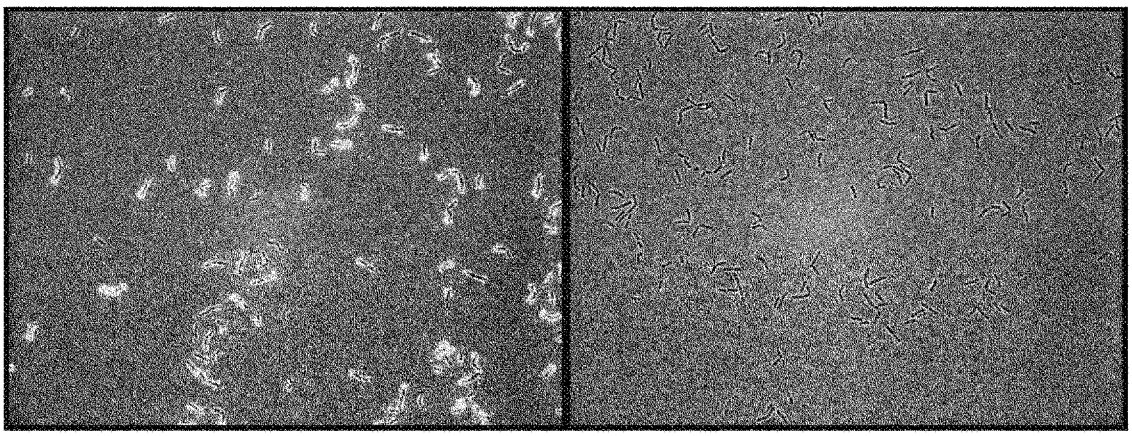
FIG.1



左図：YIT9029株、右図：Δcps株；スケールバーは10 μm

[図 2]

FIG.2

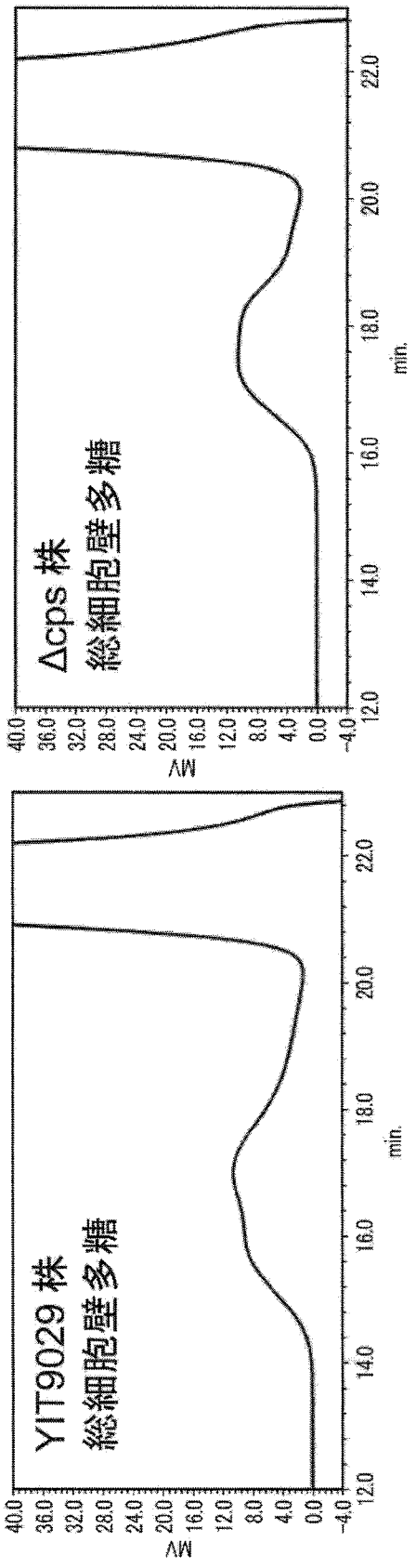


左図：YIT9029株、右図：Δcps株；明視野と蛍光画像の重ね合わせ；緑色が2次抗体の蛍光

[図 3]

規則 26,
14.08.2024

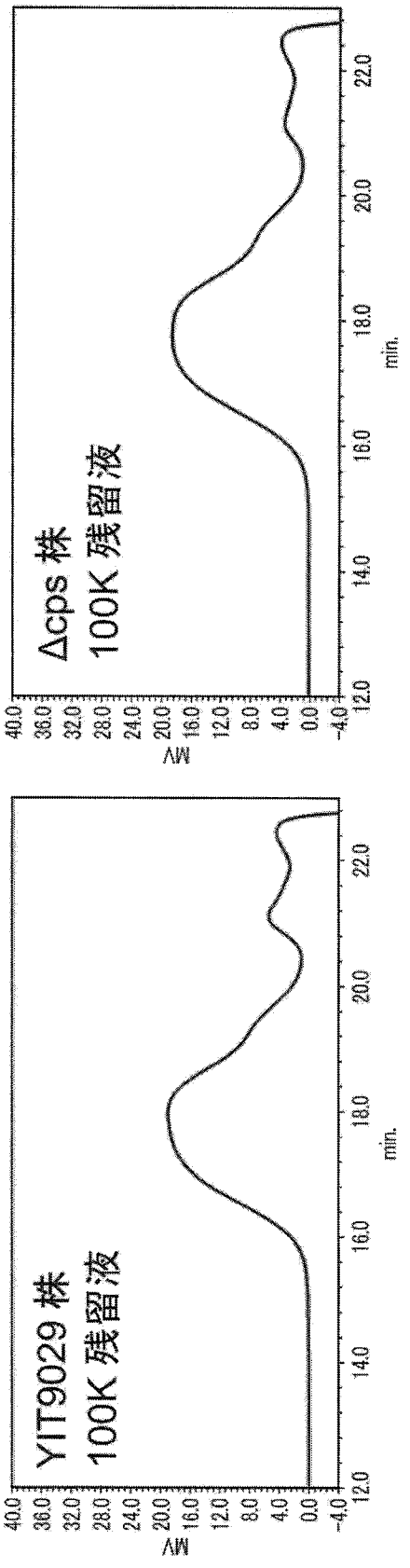
FIG.3-1



規則 26,
14.08.2024

[図 3の続き]

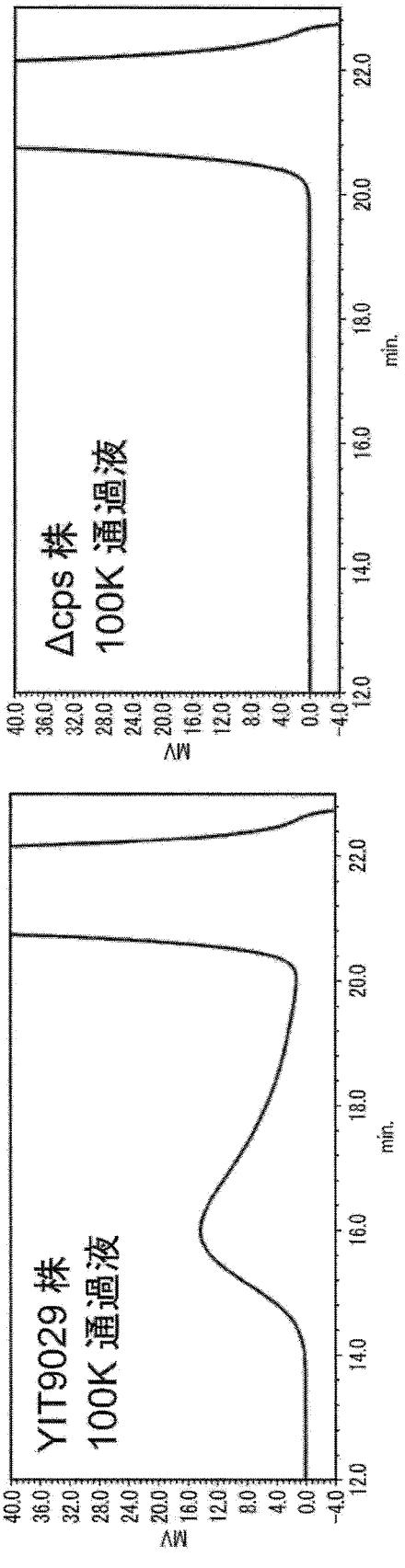
FIG.3-2



規則 26,
14.08.2024

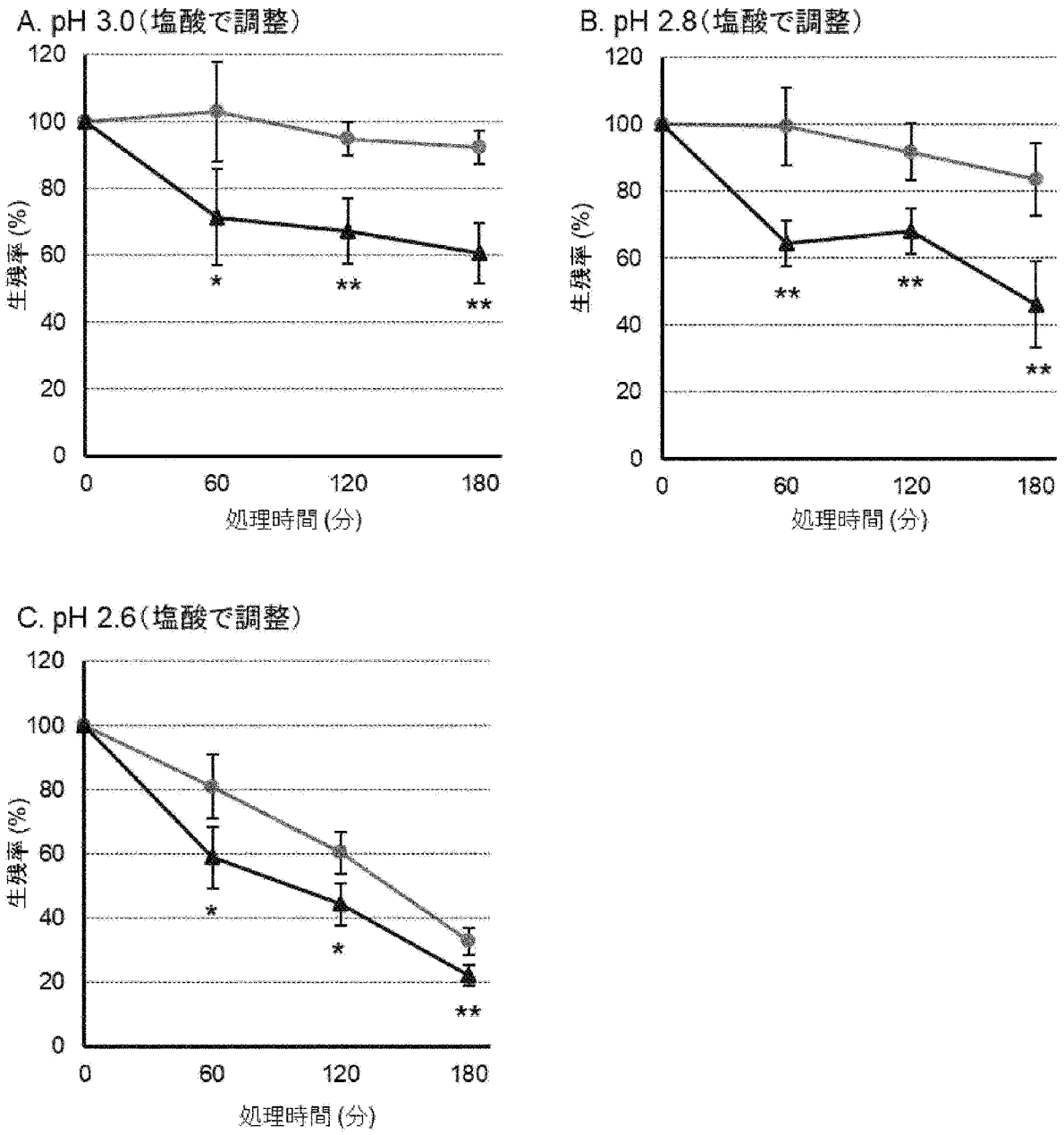
[図 3の続き]

FIG.3-3



[図 4]

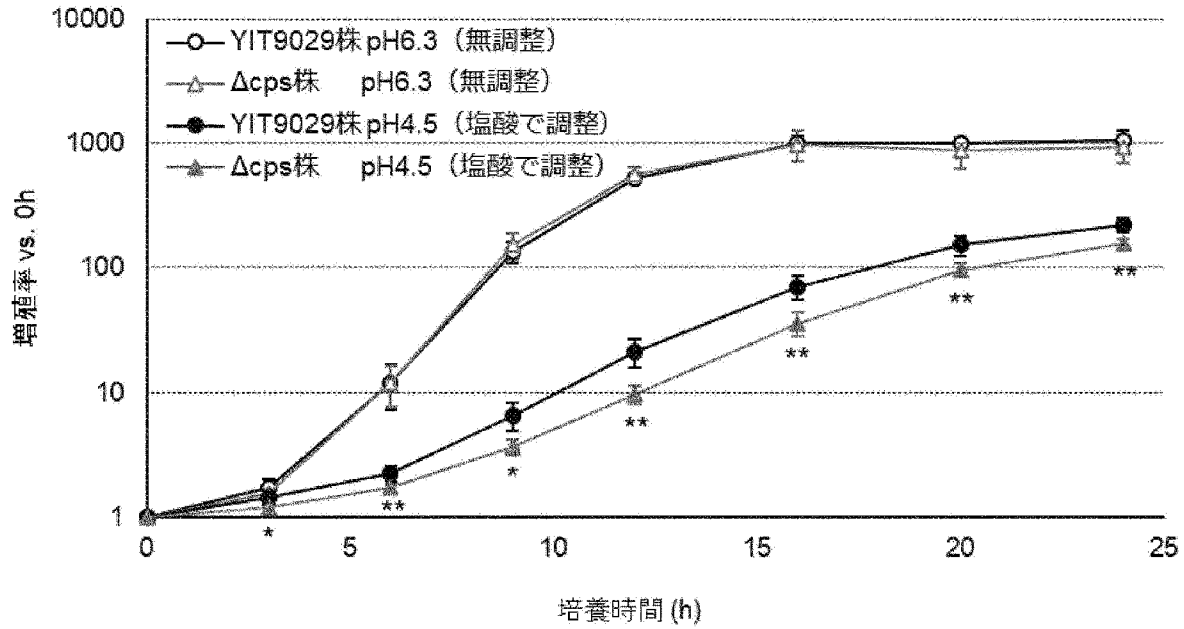
FIG.4



塩酸でpH調整した緩衝液で処理する前の生菌数（CFU/mL）を100 %とした場合の各処理時間での生菌数（CFU/mL）の比；A：pH 3.0、B：pH 2.8、C：pH 2.6；丸：YIT9029株、三角：Δcps株；5回の独立した試験の平均値±標準偏差； Wilcoxonの順位和検定 vs. YIT9029株、*：p<0.05、**：p<0.01

[図 5]

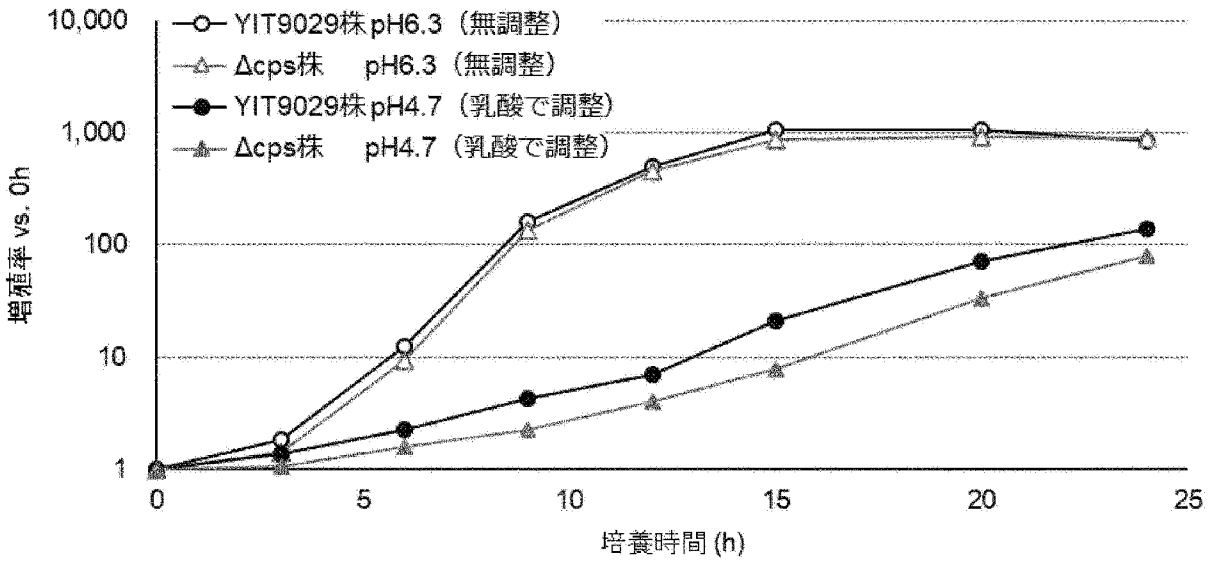
FIG.5



増殖倍率は接種生菌数を 1 とした時の比率；接種生菌数は YIT9029 株: 2.4～2.8 × 10^6 CFU/mL、Δcps 株: 1.4～1.8 × 10^6 CFU/mL; ○: YIT9029 株（pH 無調整）、●: YIT9029 株（塩酸で初期 pH 4.5 に調整）、△: Δcps 株（pH 無調整）、▲: Δcps 株（塩酸で初期 pH 4.5 に調整）; 5 回の独立した試験の平均値±標準偏差; *p<0.05, **p<0.01, Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株.

[図 6]

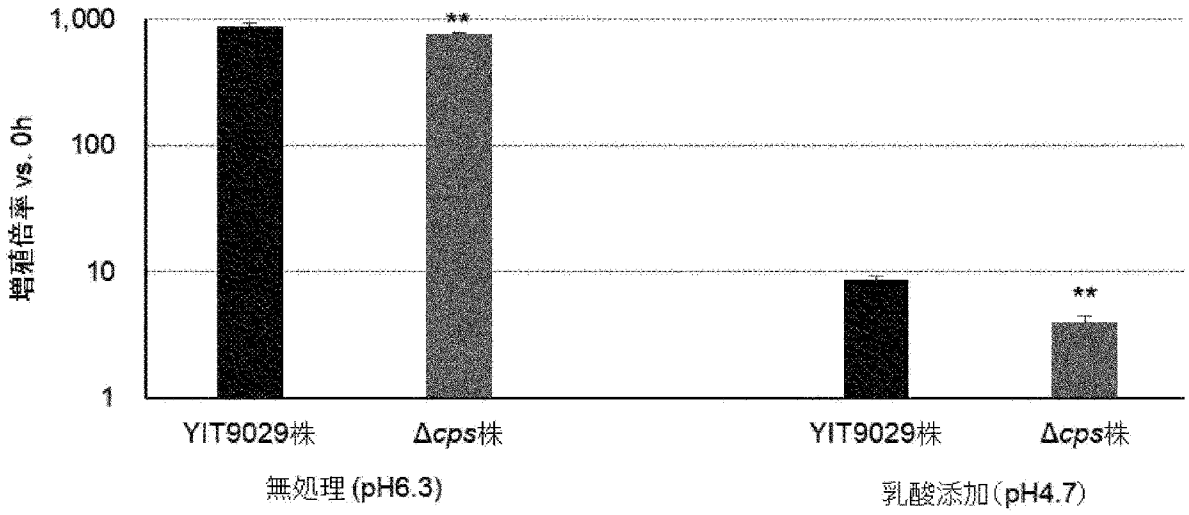
FIG.6



増殖倍率は接種生菌数を 1 とした時の比率；接種生菌数は YIT9029 株: 2.3 × 10^6 CFU/mL、Δcps 株: 1.5 × 10^6 CFU/mL; ○: YIT9029 株（pH 無調整）、●: YIT9029 株（乳酸で初期 pH 4.7 に調整）、△: Δcps 株（pH 無調整）、▲: Δcps 株（乳酸で初期 pH 4.7 に調整）; 各点 n=1.

[図 7]

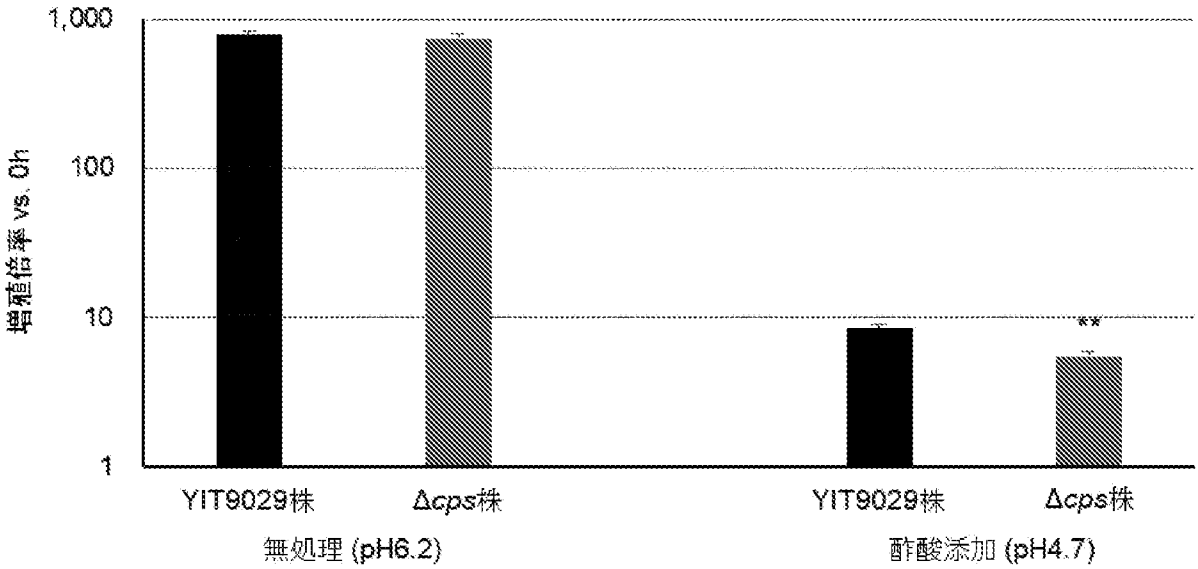
FIG.7



増殖倍率は接種生菌数を 1 とした時の比率；接種生菌数は YIT9029 株: 1.0×10^6 CFU/mL、Δcps 株: 1.2×10^6 CFU/mL; n=5 の平均値±標準偏差； $^{**}p<0.01$, Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株.

[図 8]

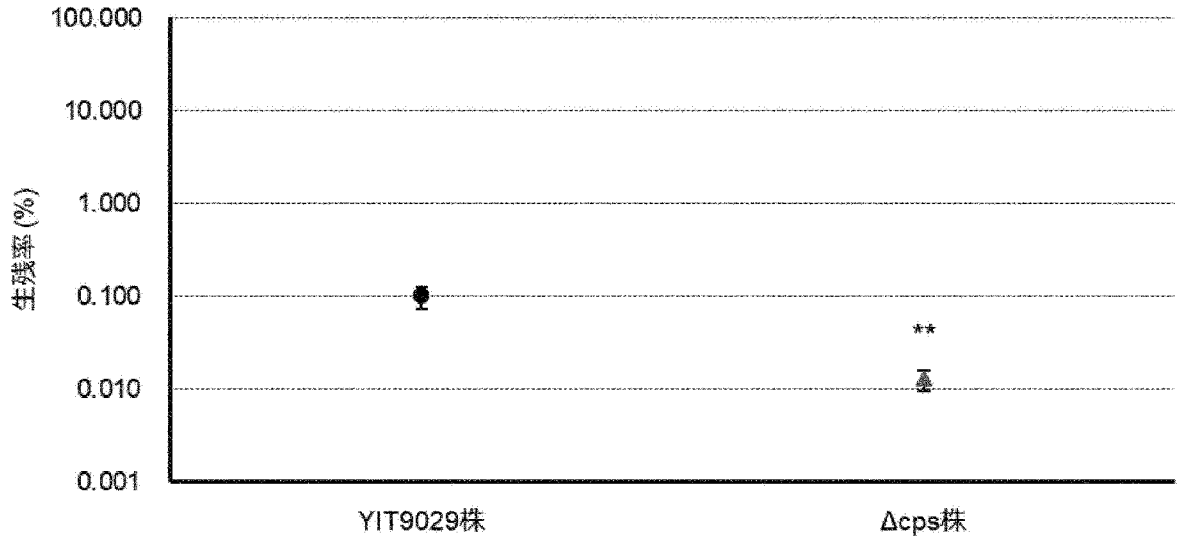
FIG.8



増殖倍率は接種生菌数を 1 とした時の比率；接種生菌数は YIT9029 株: 1.0×10^6 CFU/mL、Δcps 株: 1.2×10^6 CFU/mL; n=5 の平均値±標準偏差； $^{**}p<0.01$, Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株.

[図 9]

FIG.9

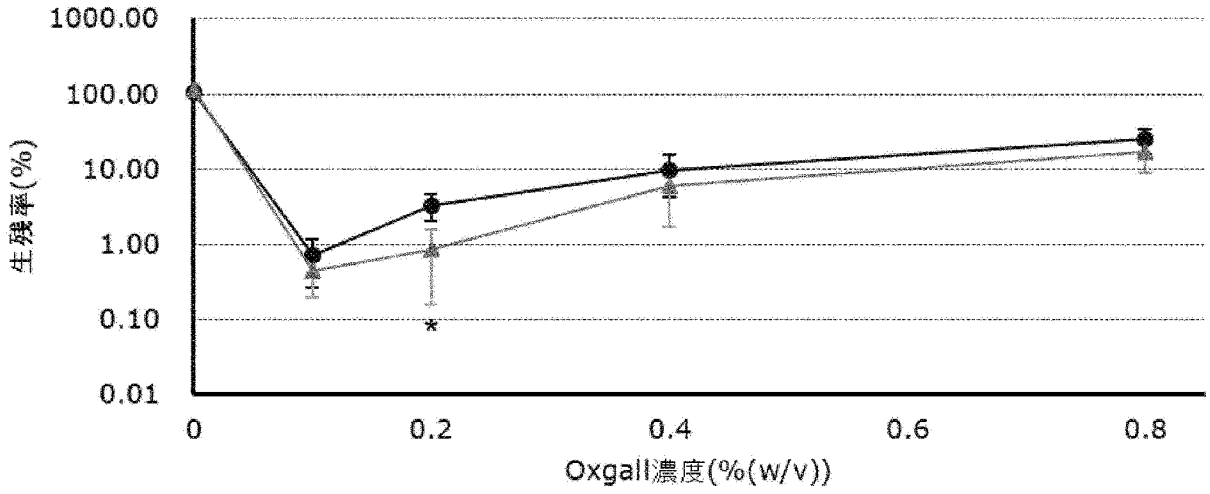


0.1 %(w/v) デオキシコール酸処理による生残率

n=5の平均値±標準偏差; **p<0.01, Wilcoxon順位和検定 vs. YIT9029株.

[図 10]

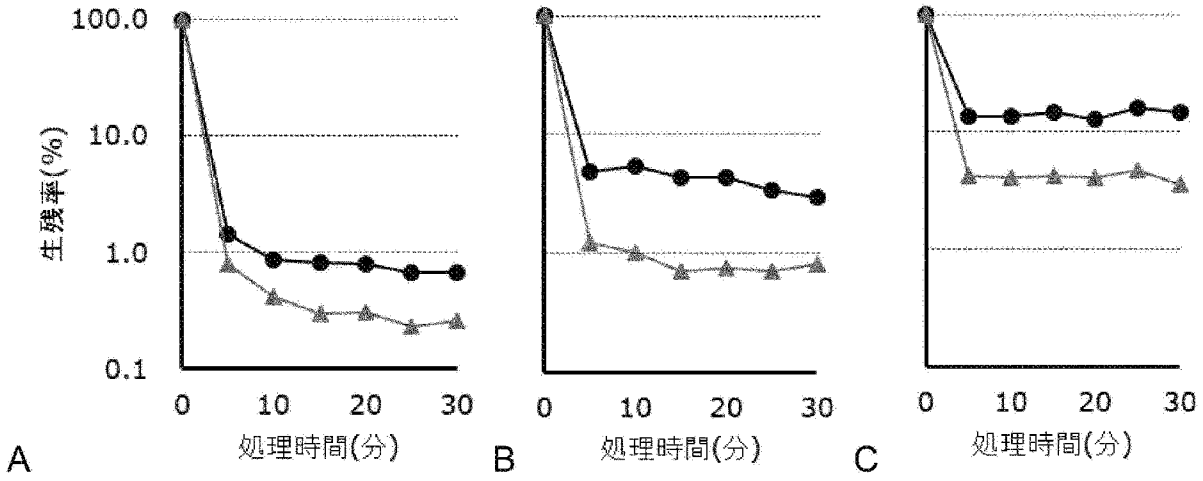
FIG.10



●: YIT9029 株、▲: Δcps 株; 処理時間は 60 分間; 5 回の独立した試験の平均値±標準偏差; *p<0.05, Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株.

[図 11]

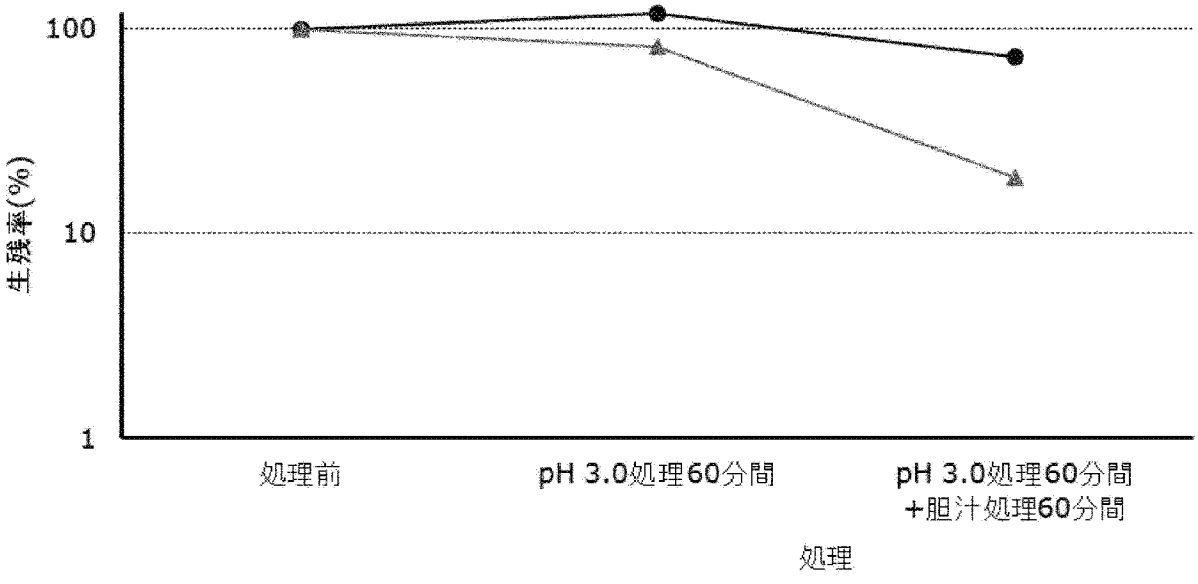
FIG.11



ウシ胆汁粉末濃度はA: 0.1 %(w/v) 、B: 0.2 %(w/v) 、C: 0.4 %(w/v); ●: YIT9029株、▲: Δcps株; 縦軸の尺度はCとD、Eで共通; 各点n=1

[図 12]

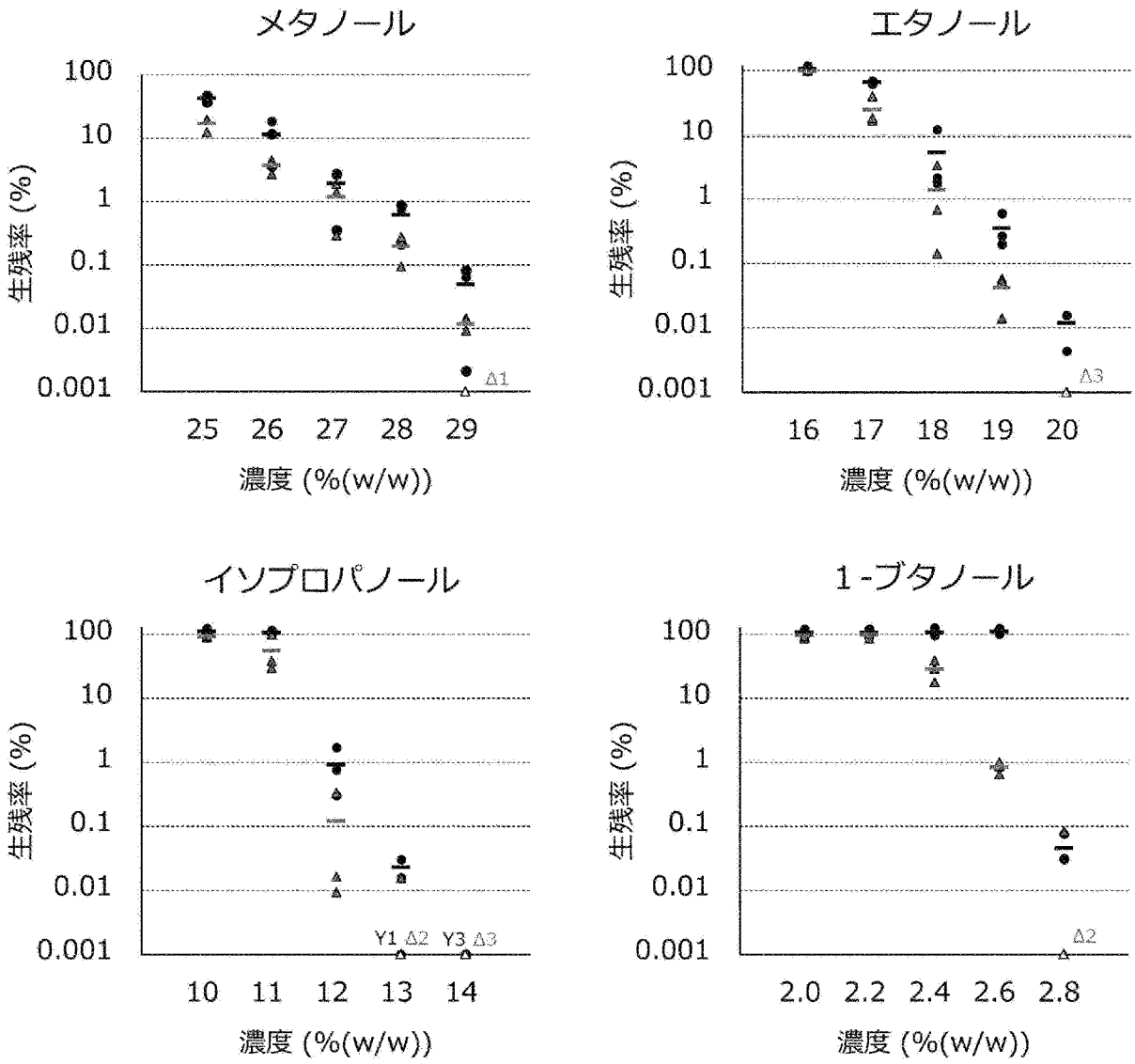
FIG.12



●: YIT9029株、▲: Δcps株; 各点n=1

[図 13]

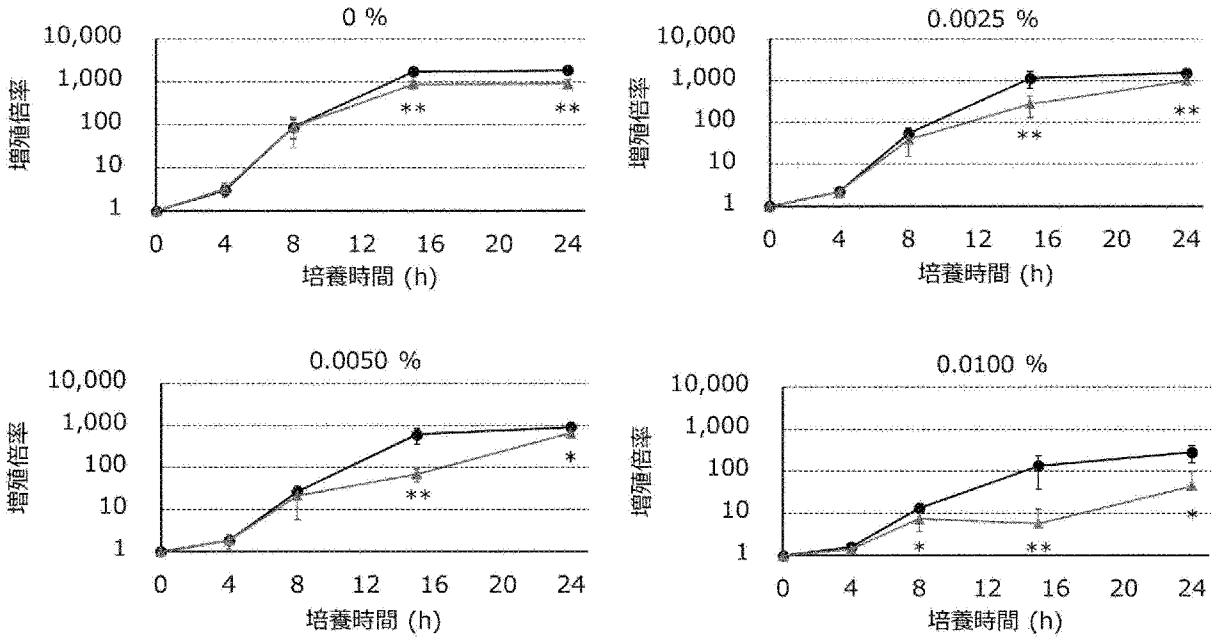
FIG.13



処理前の生菌数を 100 %とした場合の各処理後の生菌数の比率; 各点は試験毎の測定値、●: YIT9029 株、▲: Δ*cps* 株; —は 3 回の独立した試験の平均値(測定下限値未満の値は含まない)、 黒: YIT9029 株、灰: Δ*cps* 株; 生残率 0.001 %線上の白抜きのプロットは測定下限値未満の値、近傍の数字は測定下限値未満となった回数(3 回中)、Y: YIT9029 株、Δ: Δ*cps* 株

[図 14]

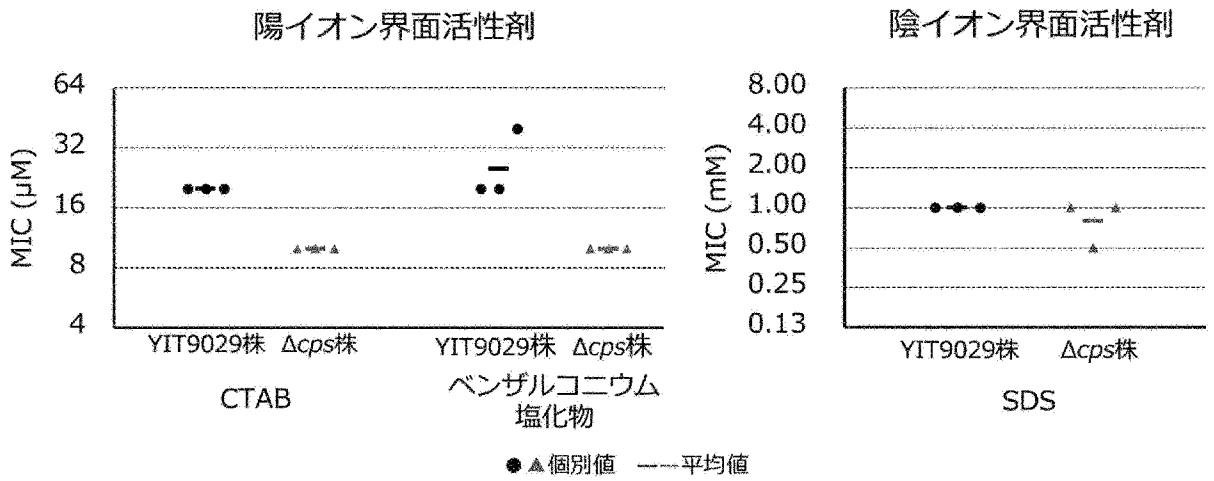
FIG.14



値は接種生菌数を 1 とした場合の生菌数の倍率; ●: YIT9029 株、▲: Δ*cps* 株; 5 回の独立した試験の平均値±標準偏差、0.0100 %の Δ*cps* 株の 15、24 時間の下側エラーバーは負の値のため非表示; *: $p<0.05$、**: $p<0.01$、Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株

[図 15]

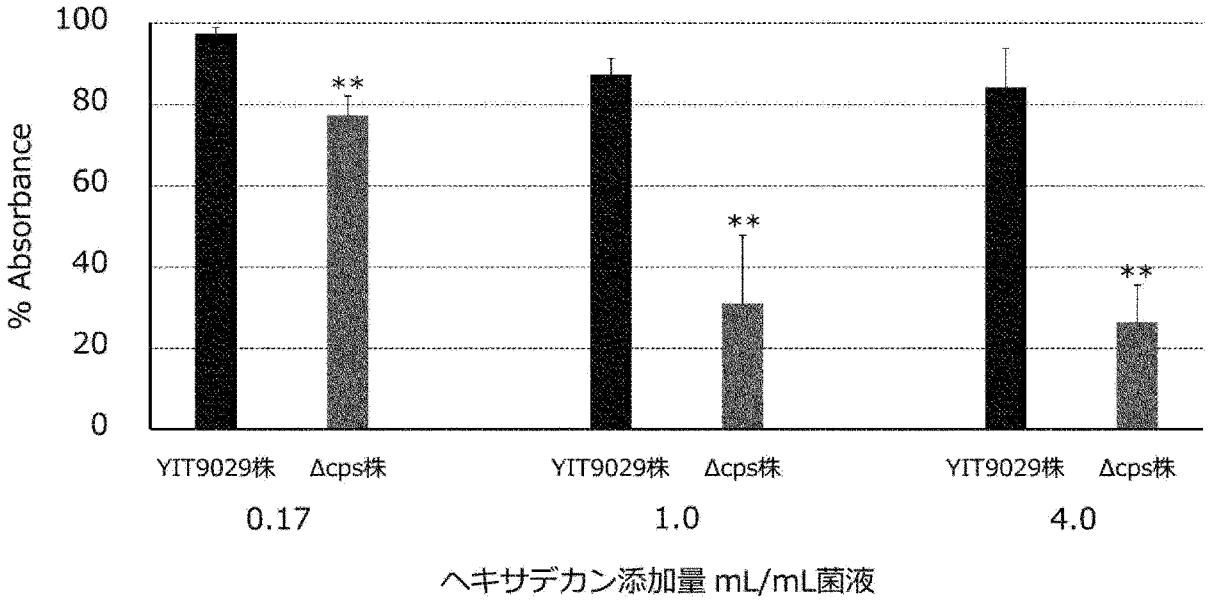
FIG.15



3 回の独立した試験の結果; 各点は試験毎の MIC; 平均値は n=3 の幾何平均値

[図 16]

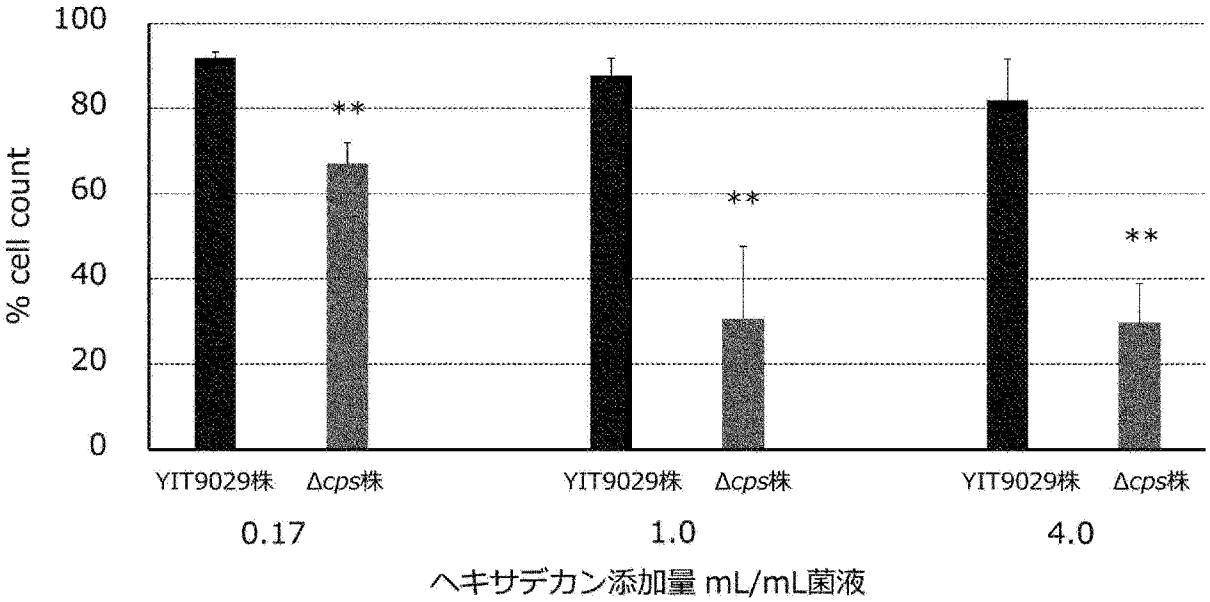
FIG.16



処理前の OD_{615} を 100 %とした場合の比率; 5 回の独立した試験の平均値+標準偏差; ** p<0.01 Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株

[図 17]

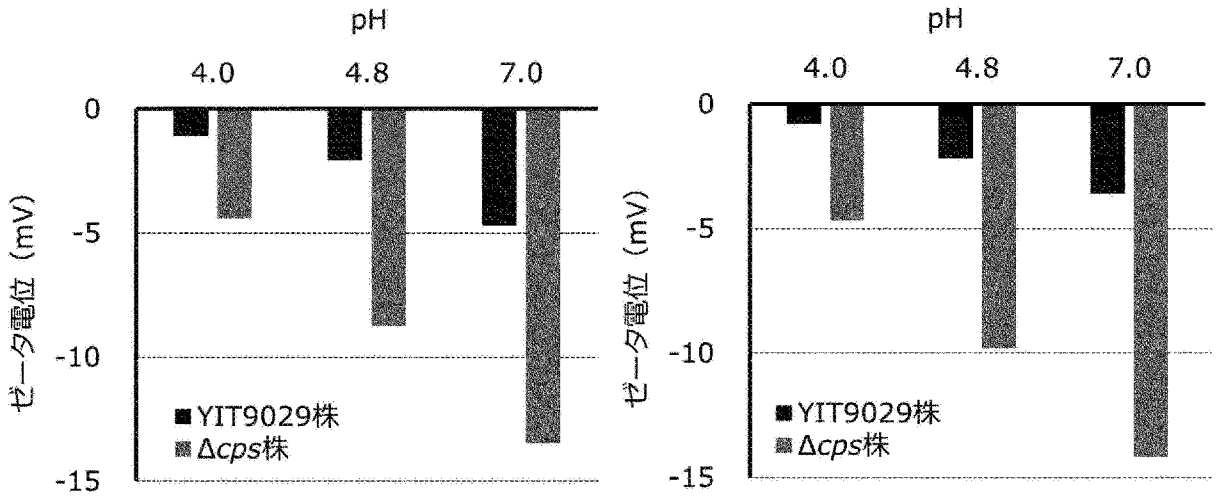
FIG.17



処理前の菌数を 100 %とした場合の比率; 5 回の独立した試験の平均値+標準偏差; ** p<0.01 Wilcoxon 順位和検定 vs. YIT9029 株

[図 18]

FIG.18



2 回の独立した試験：左図：1 回目、右図：2 回目

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/025886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/31(2006.01)i; ***C12N 1/20***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 15/63***(2006.01)i
FI: C12N15/31 ZNA; C12N1/20 Z; C12N1/21; C12N15/63 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/31; C12N1/20; C12N1/21; C12N15/63

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YASUDA, Emi et al, Suppressive Effect on Activation of Macrophages by Lactobacillus casei Strain Shirota Genes Determining the Synthesis of Cell Wall-Associated Polysaccharides, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, August 2008, vol. 74, no. 15, pp. 4746-4755, doi:10.1128/AEM.00412-08 particularly, abstract, drawings, materials and methods	1-8
A	MIZUKOSHI, Harumi et al., Structural determination of the cell wall polysaccharide LCPS-1 in Lacticaseibacillus paracasei strain Shirota YIT 9029, Carbohydrate Research, 05 September 2022, vol. 521, 108670 (pp. 1-11), https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108670 particularly, abstract	1-8
A	MENG, Fanqiang et al., LsrR-like protein responds to stress tolerance by regulating polysaccharide biosynthesis in Lactiplantibacillus plantarum, International Journal of Biological Macromolecules, 25 November 2022, vol. 225, pp. 1193-1203, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.180 in particular, abstract, drawings	1-8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 October 2024	**08 October 2024**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AN, Jieran et al., Molecular Organization and Functional Analysis of a Novel Plasmid-Borne cps Gene Cluster from Lactiplantibacillus plantarum YC41, Microbiology Spectrum, 06 March 2023, vol. 11, Issue 2, pp. 1-13, doi: 10.1128/spectrum.04150-22 particularly, abstract, p. 2, second paragraph	1-8
A	JP 2014-3969 A (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 16 January 2014 (2014-01-16) claims, examples	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/025886

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/025886

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-3969 A	16 January 2014	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/025886

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/31(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i
FI: C12N15/31 ZNA; C12N1/20 Z; C12N1/21; C12N15/63 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/31; C12N1/20; C12N1/21; C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	YASUDA, Emi et al, Suppressive Effect on Activation of Macrophages by Lactobacillus casei Strain Shirota Genes Determining the Synthesis of Cell Wall-Associated Polysaccharides, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2008.08, Vol.74, No.15, pp.4746-4755, doi:10.1128/AEM.00412-08 特に要旨，図，材料と方法	1-8
A	MIZUKOSHI, Harumi et al., Structural determination of the cell wall polysaccharide LCPS-1 in Lacticaseibacillus paracasei strain Shirota YIT 9029, Carbohydrate Research, 2022.09.05, Vol.521, 108670 (pp.1-11), https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108670 特に要旨	1-8
A	MENG, Fanqiang et al., LsrR-like protein responds to stress tolerance by regulating polysaccharide biosynthesis in Lactiplantibacillus plantarum, International Journal of Biological Macromolecules, 2022.11.25, Vol.225, pp.1193-1203, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.180 特に要旨，図	1-8

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
01.10.2024	08.10.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

田ノ上　拓自 4B 6115

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	AN, Jieran et al., Molecular Organization and Functional Analysis of a Novel Plasmid-Borne cps Gene Cluster from Lactiplantibacillus plantarum YC41, Microbiology Spectrum, 2023.03.06, Vol.11, Issue2, pp.1-13, doi: 10.1128/spectrum.04150-22 特に要旨，第2頁第2段落	1-8
A	JP 2014-3969 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 16.01.2014 (2014-01-16) 特許請求の範囲，実施例	1-8

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/025886

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/025886

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2014-3969 A	16.01.2014	（ファミリーなし）	