

(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
2017年8月24日(24.08.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/142080 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/46 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01) *A61P 1/10* (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) *C12N 9/50* (2006.01)
A61K 36/062 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005986
- (22) 国際出願日: 2017年2月17日(17.02.2017)
- (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 2016-028942 2016年2月18日(18.02.2016) JP
- (71) 出願人: 天野エンザイム株式会社(AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 Aichi (JP). 国立大学法人広島大学 (HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: 黒田 学(KURODA, Manabu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 山口 庄太郎(YAMAGUCHI, Shotaro); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 加藤 範久(KATO, Norihisa); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目4番4号 国立大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 田中 順也, 外(TANAKA, Junya et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(54) Title: INTESTINAL FLORA IMPROVEMENT AGENT

(54) 発明の名称: 腸内菌叢改善剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an intestinal flora improvement agent that can improve intestinal flora, using an enzyme to cause beneficial bacteria such as lactobacillales and bifidobacteria to increase in number. A protease that comprises a polypeptide of an amino acid sequence indicated by SEQ ID NO: 1 causes beneficial bacteria such as lactobacillales and bifidobacteria to increase in number in the intestine, and demonstrates a superior intestinal flora improvement effect.

(57) 要約: 本発明の目的は、酵素を使用して、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、腸内菌叢を改善できる腸内菌叢改善剤を提供することである。配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドからなるプロテアーゼには、腸内で乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、優れた腸内菌叢改善効果を奏し得る。



WO 2017/142080 A1

明 細 書

発明の名称：腸内菌叢改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、腸内菌叢を改善できる腸内菌叢改善剤に関する。

背景技術

[0002] 近年、腸内環境と各種疾患の因果関係が盛んに研究されており、腸内環境の改善が各種疾患の予防又は改善に有効であることが明らかにされている。腸内には、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌と、大腸菌等の悪玉菌が混在しており、善玉菌が優勢な菌叢を形成することが健全な腸内環境を形成する上で重要である。

[0003] 従来、プロバイオティックスやプレバイオティックス等が開発され、善玉菌を優勢にして腸内菌叢を改善する素材が種々提案されているが、アミラーゼやプロテアーゼ等の消化酵素の投与によっても、腸内菌叢を改善できることが報告されている。例えば、非特許文献1には、アミラーゼ、プロテアーゼ、及びキシラナーゼからなる特定のブレンド酵素を飼料と共に給餌した豚において、大腸内で乳酸桿菌の菌数が増加し、大腸菌の菌数が減少したことが報告されている。また、非特許文献2には、バシラス・アミロリクエファシエンス由来のアミラーゼ、バシラス・ズブチリス由来のプロテアーゼ、及びトリコデルマ由来のキシラナーゼからなる特定のブレンド酵素（Nopcozyme II; Diasham Resources Pte Ltd.）を飼料と共に給餌した豚において、乳酸桿菌の菌数が増加し、サルモネラや大腸菌の菌数が減少したことが報告されている。

[0004] このように、従来、腸内菌叢を改善できる酵素製剤としては、アミラーゼ、プロテアーゼ、及びキシラナーゼからなる特定のブレンド酵素が知られているが、これらの酵素の内、どの酵素が腸内菌叢の改善に寄与しているかについては明らかにされていない。また、このようなブレンド酵素の使用は、

酵素製造のコストの上昇を招くという欠点もある。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Yi et al., Asian Astralas. J. Anim. Sci., 2013, 26: 1181-1188

非特許文献2: Zhang et al., J. Amin. Sci., 2014, 92: 2063-2069

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 近年、健康増進に関する関心の高まりを受けて、善玉菌を優勢にして腸内菌叢を改善する新たな素材の開発が望まれているが、酵素を利用した腸内菌叢改善剤については、従来報告されている酵素製剤以外で、どのような酵素が有効であるかについては類推すらし得ないのが現状であった。

[0007] このような状況の下、本発明の目的は、酵素を使用して、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、腸内菌叢を改善できる腸内菌叢改善剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドからなるプロテアーゼには、腸内で乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、優れた腸内菌叢改善効果を奏し得ることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて、更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0009] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 以下の(1)～(3)の少なくとも1種のポリペプチドからなるプロテアーゼを有効成分とする、腸内菌叢改善剤。

(1)配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列か

らなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が 80%以上であり、
且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

項 2. 項 1 に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の内服用医薬品。

項 3. 項 1 に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の食品用添加剤。

項 4. 項 1 に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の飲食品。

項 5. 以下の(1)～(3)の少なくとも 1 種のポリペプチドからなるプロテアーゼを腸内菌叢の改善が必要とされる者に経口適用する、腸内菌叢の改善方法。

(1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が 80%以上であり、
且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

項 6. 腸内菌叢の改善処置に使用される、以下の(1)～(3)の少なくとも 1 種のポリペプチドからなるプロテアーゼ。

(1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が 80%以上であり、
且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

項 7. 以下の(1)～(3)の少なくとも 1 種のポリペプチドからなるプロテアーゼの、腸内菌叢改善剤の製造のための使用。

(1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が 80%以上であり、且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、特定のプロテアーゼを使用することにより、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の菌数を増加させ、腸内菌叢を改善できるので、腸内環境の健全化、健全な腸内環境の保持、腸内環境が不健全になることが一因となって生じる疾患・症状の予防又は治療に有効である。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 腸内菌叢改善剤

本発明の腸内菌叢改善剤は、特定のプロテアーゼを有効成分とすることを特徴とする。以下、本発明の腸内菌叢改善剤について詳述する。

[0012] [プロテアーゼ]

本発明の腸内菌叢改善剤は、以下の(1)～(3)の少なくとも 1 種のポリペプチドからなるプロテアーゼを有効成分として使用する。このように、特定のプロテアーゼを選択し、これを使用することにより、腸内の乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌を増加させ、腸内菌叢を効果的に改善することが可能になる。

(1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が80%以上であり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

[0013] 前記(1)に示すポリペプチドは、アスペルギルス・オリゼ由来の酸性プロテアーゼであり、前記(2)及び(3)に示すポリペプチドは、前記(1)に示すポリペプチドの変異体である。

[0014] 前記(2)のポリペプチドにおいて、導入されるアミノ酸の改変は、置換、付加、挿入、及び欠失の中から1種類の改変のみ（例えば置換のみ）を含むものであってもよく、2種以上の改変（例えば、置換と挿入）を含んでいても良い。前記(2)のポリペプチドにおいて、導入される置換、付加、挿入又は欠失されるアミノ酸は、1個又は数個であればよく、例えば、1～81個、好ましくは1～48個、又は1～32個、更に好ましくは1～16個、1～10個、又は1～8個、特に好ましくは1～3個、1又は2個或いは1個が挙げられる。

[0015] また、前記(3)のポリペプチドにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性は、80%以上であればよいが、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上が挙げられる。

[0016] ここで、前記(3)のポリペプチドにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性とは、配列番号1に示すアミノ酸配列と比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE [sg i 32 bit edition, Version 2.0.12; available from National Center for Biotechnology Information (NCBI)] のbl2seq program (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., Vol. 174, p247-250, 1999) により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Gap inser

tion Cost value: 11、Gap extension Cost value: 1に設定すればよい。

[0017] また、前記(2)及び(3)のポリペプチドにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列に対してアミノ酸置換が導入されている場合、導入されるアミノ酸置換の好適な一態様として保存的置換が挙げられる。即ち前記(2)及び(3)のポリペプチドにおける置換としては、例えば、置換前のアミノ酸が非極性アミノ酸であれば他の非極性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が非荷電性アミノ酸であれば他の非荷電性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が酸性アミノ酸であれば他の酸性アミノ酸への置換、及び置換前のアミノ酸が塩基性アミノ酸であれば他の塩基性アミノ酸への置換が挙げられる。

[0018] 前記(2)及び(3)のポリペプチドにおいて、「配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有する」とは、下記条件でプロテアーゼ活性を測定した際に、前記(1)のポリペプチドとプロテアーゼ活性が同等（即ち、前記(1)のポリペプチドのプロテアーゼ活性を100%とした場合に、プロテアーゼ活性が80～120%程度を示すこと）であることを意味する。

（プロテアーゼの活性の測定法）

まず、0.6重量%カゼイン溶液（pH 3.0）5 mLを試験管にとり37℃に保温する。続いて、プロテアーゼ活性の測定対象となるサンプルを含む酵素溶液（溶媒は水を使用）1 mLを加えて37℃で正確に10分間おいた後、0.44 mol/Lトリクロロ酢酸溶液5 mLを加え、反応を停止させる。37℃で30分間おいたのち、ろ紙ろ過して得られたろ液2 mLを別の試験管にとり、0.55 mol/L炭酸ナトリウム5 mL、3倍希釈フォリン試液1 mLを順に加える。37℃で30分間おいた後に吸収波長660 nmにおける吸光度を測定する。ブランク操作は、トリクロロ酢酸溶液添加後に酵素溶液を加える。また別途10～40 µg/mLのチロジン溶液を用いて、前述のろ液に対する操作と同様の操作をすることによりチロジン検量線を作成する。本条件下、1分間にチロジン1 µgに相当するフォリン試液呈

色物質の増加をもたらす酵素量を1Uとする。算出には以下式を用いる。

[数1]

サンプル 1 g 又は 1 mL 当たりのプロテアーゼ活性 (U/g 又は U/mL) = (AT - AB) × F × (1 1/2) × (1/10) × 1/W

AT : 吸収波長 660 nm の吸光度

AB : ブランク操作における吸収波長 660 nm の吸光度

F : チロジン検量線より求めた吸光度差が 1 のときのチロジン量 (μg)

1 1/2 : 反応停止後のトータル液量への換算係数

1/10 : 反応時間 1 分当たりへの換算係数

W : 酵素溶液 1 mL 中のサンプルの量 (g 又は mL)

[0019] 前記(1)～(3)のポリペプチドは、当該ポリペプチドを産生するアスペルギルス・オリゼを培養する方法によって得ることができ、また公知の遺伝子工学的手法によって得ることもできる。

[0020] [プロテアーゼの適用量]

本発明の腸内菌叢改善剤の適用量については、該剤が使用される製品の種類、用途、期待される効果、適用形態等に応じて適宜設定すればよいが、例えば、成人 1 日当たり前記プロテアーゼの摂取又は投与量として、0.1～3,000 mg、好ましくは 1～2,000 mg、より好ましくは 1～1,000 mg、より一層好ましくは 2～500 mg、さらに好ましくは 2～150 mg、最も好ましくは 5～100 mg が挙げられる。

[0021] [腸内菌叢改善剤の用途]

本発明の腸内菌叢改善剤は、前記プロテアーゼの作用によって、腸内でビフィズス菌及び乳酸菌等の善玉菌の菌数を増加させ、善玉菌が優勢な菌叢を形成させることができるので、腸内環境の健全化、健全な腸内環境の保持等の目的で使用される。特に、本発明の腸内菌叢改善剤は、腸内でビフィドバクテリウム属細菌及びラクトバシスル属細菌の菌数を増加させる作用に優れているので、ビフィドバクテリウム属細菌及びラクトバシスル属細菌の腸内菌数増加剤として使用することもできる。

[0022] また、本発明の腸内菌叢改善剤は、善玉菌が優勢な菌叢を形成させることにより腸内環境の健全化が図られるので、腸内環境が不健全になることが一

因となって生じる疾患や症状の予防又は治療の目的で使用することもできる。このような疾患や症状としては、例えば、免疫力の低下、大腸ガン、アレルギー疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肥満、炎症性腸疾患等が挙げられる。

[0023] [腸内菌叢改善剤の使用形態]

本発明の腸内菌叢改善剤は、経口摂取又は経口投与により経口適用される。本発明の腸内菌叢改善剤は、経口摂取又は経口投与され、腸内に到達すると、腸内菌叢を改善する作用を発揮するので、飲食品、内服用医薬品、飼料、ペットフード等の各種製品に配合して使用することができる。

[0024] また、本発明の腸内菌叢改善剤を前記各種製品に配合する場合、当該製品には、必要に応じて、本発明の腸内菌叢改善剤と共に、プロバイオティクス及び／又はプレバイオティクスが含まれていてもよい。

[0025] プロバイオティクスとして使用される微生物としては、例えば、乳酸菌、ビフィズス菌、納豆菌等が挙げられる。乳酸菌としては、具体的には、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィリス、ラクトバチルス・プランタルム等のラクトバチルス属乳酸菌；エンテロコッカス・フェーカリス、エンテロコッカス・フェーシウム、エンテロコッカス・ヒラエ等のエンテロコッカス属乳酸菌；ストレプトコッカス・ボビス、ストレプトコッカス・サーモフィラス等のストレプトコッカス属乳酸菌等が挙げられる。また、ビフィズス菌としては、具体的には、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム等が挙げられる。これらのプロバイオティクスは、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0026] また、プレバイオティクスとしては、例えば、キシロオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、乳果オリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクチュロース等が挙げられる。これらのプレバイオティクスは、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0027] また、本発明の腸内菌叢改善剤が配合される製品の剤型は、固形状、半固形状、液状等のいずれであってもよく、当該製品の種類や用途に応じて適宜設定される。

[0028] 本発明の腸内菌叢改善剤を飲食品に使用する場合、前記プロテアーゼを、そのまま又は他の食品素材や添加成分と組み合わせて所望の形態に調整して、腸内菌叢改善用の飲食品として提供される。このような飲食品としては、一般の飲食品の他、特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品、病者用食品等が挙げられる。これらの飲食品の形態として、特に制限されないが、例えば、錠剤、顆粒、粉剤、カプセル、ソフトカプセル等のサプリメント；栄養ドリンク、果汁飲料、炭酸飲料、乳酸飲料等の飲料等が例示される。

[0029] 本発明の腸内菌叢改善剤を飲食品に使用する場合、飲食品に対する該剤の配合量については、飲食品の形態等に応じて異なるが、例えば、サプリメントの場合であれば、前記プロテアーゼが $0.03 \sim 1,000 \text{ mg/g}$ 、好ましくは $0.3 \sim 700 \text{ mg/g}$ 、より好ましくは $0.3 \sim 350 \text{ mg/g}$ 、より一層好ましくは $0.6 \sim 170 \text{ mg/g}$ 、さらに好ましくは $0.6 \sim 80 \text{ mg/g}$ 、最も好ましくは $1.5 \sim 50 \text{ mg/g}$ となる範囲が挙げられる。また、例えば、飲料の場合であれば、前記プロテアーゼが $0.0003 \sim 10 \text{ mg/mL}$ 、好ましくは $0.003 \sim 7 \text{ mg/mL}$ 、より好ましくは $0.003 \sim 3.5 \text{ mg/mL}$ 、より一層好ましくは $0.006 \sim 1.7 \text{ mg/mL}$ 、さらに好ましくは $0.006 \sim 0.8 \text{ mg/mL}$ 、最も好ましくは $0.015 \sim 0.5 \text{ mg/mL}$ となる範囲が挙げられる。

[0030] 更に、本発明の腸内菌叢改善剤を飲食品の分野で使用する場合、本発明の腸内菌叢改善剤を単独で、又は他の成分と組み合わせて、腸内菌叢改善用の食品用添加剤として提供することもできる。

[0031] また、本発明の腸内菌叢改善剤を内服用医薬品に使用する場合、本発明の腸内菌叢改善剤を単独で、又は他の薬理活性成分、薬学的に許容される基剤や添加剤等と組み合わせて所望の形態に調整して、腸内菌叢改善効果を奏する内服用医薬品として提供される。このような医薬品の形態としては、特に

制限されないが、具体的には、錠剤、顆粒剤、粉剤、カプセル剤、ソフトカプセル剤、シロップ剤、液剤等の経口投与製剤が挙げられる。

[0032] 内服用医薬品の製造に使用される基剤や添加剤としては、例えば、水、アルコール等の水性基剤、油性基材、賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、滑沢剤、清涼化剤、pH調整剤、増粘剤、酸化防止剤、金属封鎖剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、溶解補助剤、香料、防腐剤等が挙げられる。

[0033] 本発明の腸内菌叢改善剤を内服用医薬品として使用する場合、内服用医薬品に対する該剤の配合割合については、内服用医薬品の形態等に応じて、前述する適用量を充足する範囲で適宜設定すればよいが、例えば、固形状又は半固形状の内服用医薬品の場合であれば、前記プロテアーゼが0.03～1,000mg/g、好ましくは0.3～700mg/g、より好ましくは0.3～350mg/g、より一層好ましくは0.6～170mg/g、さらに好ましくは0.6～80mg/g、最も好ましくは1.5～50mg/gとなる範囲が挙げられる。また、液状の内服用医薬品の場合であれば、前記プロテアーゼが0.0003～10mg/mL、好ましくは0.003～7mg/mL、より好ましくは0.003～3.5mg/mL、より一層好ましくは0.006～1.7mg/mL、さらに好ましくは0.006～0.8mg/mL、最も好ましくは0.015～0.5mg/mLとなる範囲が挙げられる。

[0034] また本発明の腸内菌叢改善剤を飼料又はペットフードに使用する場合、本発明の腸内菌叢改善剤を単独で又は他の飼料成分と組み合わせて所望の形態に調整して、腸内菌叢改善効果を奏する飼料又はペットフードとして提供される。飼料又はペットフードに使用される飼料成分としては、例えば、トウモロコシ、小麦、大麦、ライ麦等の穀類；ふすま、米ぬか等のぬか類；コーングルテンミール、コーンジャムミール等の粕類；脱脂粉乳、ホエイ、魚粉、骨粉等の動物性飼料類；ビール酵母等の酵母類；リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等のカルシウム類；ビタミン類；アミノ酸類；糖類等が挙げられる。

[0035] 本発明の腸内菌叢改善剤を飼料又はペットフードとして使用する場合、飼料又はペットフードに対する該剤の配合割合については、飼料又はペットフードの形態や種類、適用対象となる動物の種類等に応じて異なるが、例えば、前記プロテアーゼが0.00067～6.7mg/g、好ましくは0.0067～6.7mg/g、更に好ましくは0.0067～0.67mg/gとなる範囲が挙げられる。

[0036] 2. その他の態様

前述するように、前記プロテアーゼは、腸内菌叢を改善する作用がある。従って、本発明は、更に、前記プロテアーゼを腸内菌叢の改善が必要とされる者に経口適用する、腸内菌叢の改善方法；腸内菌叢の改善処置に使用される、前記プロテアーゼ；並びに、前記プロテアーゼの腸内菌叢改善剤の製造のための使用を提供する。これらの発明における具体的態様については、前記「1. 腸内菌叢改善剤」の欄に記載の通りである。

実施例

[0037] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0038] 試験例1：配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが腸内菌叢に及ぼす影響

1. プロテアーゼの調製

配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドからなるプロテアーゼは、生産菌である微生物を固体培養法で培養して得られた麴抽出液から調製した。具体的には、小麦ふすまからなる固体培養培地にて、アスペルギルス・オリゼを25±5℃にて約3日間培養した。更に、培養後の麴を水に浸漬させることでポリペプチドを抽出し、ケイソウ土ろ過により麴を除いて、ポリペプチド溶液を得た。次いで、ポリペプチド溶液を限外ろ過膜にて濃縮した後に、脱塩によりポリペプチド粗精製液を得た。ポリペプチド粗精製液をメンブランフィルターろ過にて除菌した後、噴霧乾燥機にて噴霧乾燥することで粉末状の粗精製ポリペプチドを得た。更に、この粗精製ポリペプチドを、順

にイオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、脱塩カラムクロマトグラフィー、及び凍結乾燥の精製工程に供し、精製ポリペプチド粉末を得た。また、得られた精製ポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びCBB染色に供し、確認されたポリペプチドのバンドについて、酵素処理した後にLC-MS/MS解析し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを確認した。

[0039] 2. ラットを用いた腸内菌叢の改善効果の評価

SDラット（オス、3週齢、株式会社広島実験動物研究所より入手）を用いて、配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドからなるプロテアーゼの摂取が腸内菌叢に及ぼす影響を調べた。実験は、対照群1及び2と実施群1及び2の4群に分け、対照群1は8匹、対照群2は4匹、実施群1及び2は4匹のラットを用いた。それぞれの群について表1に示す飼料を14日間自由に摂取させた。

[0040] [表1]

成分	対照群 1 % w/w	実施群 1 % w/w	実施群 2 % w/w	対照群 2 % w/w
牛脂	30.00	30.00	30.00	30.00
カゼイン	20.00 (Net protein : 17.40)	20.00 (Net protein : 17.40)	20.00 (Net protein : 17.40)	20.00 (Net protein : 17.40)
L-システイン	0.30	0.30	0.30	0.30
セルロース	5.00	5.00	5.00	5.00
ビタミンミックス ^{#1}	1.00	1.00	1.00	1.00
ミネラルミックス ^{#1}	3.50	3.50	3.50	3.50
ショ糖	20.00	20.00	20.00	20.00
コーンスターチ	20.20	20.1904	20.1616	20.1616
ポリペプチド ^{#2}	-	0.0096	0.0384	-
失活ポリペプチド ^{#3}	-	-	-	0.0384

#1はAIN-93（米国国立栄養研究所（AIN）規定のマウス・ラット用標準精製飼料）である。

#2は配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドからなるプロテアーゼである。

#3は配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドをトリクロロ酢酸処理の条件で失活させたポリペプチドである。

[0041] 飼料摂取 1 4 日後に S D ラットの盲腸内容物中細菌を表 2 に示すプライマーを使用してリアルタイム PCR で解析し、腸内のビフィズス菌 (*Bifidobacterium* spp.) と乳酸菌 (*Lactobacillus* spp.) の菌数を計測した。

[0042] [表2]

	使用したプライマーの塩基配列
Bifidobacterium spp. の検出用	Forward : CGCGTCYGGTGTGAAAG
	Reverse: CCCCACATCCAGCATCCA
Lactobacillus spp. の検出用	Forward : GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
	Reverse: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC

[0043] 3. 結果

得られた結果を表 3 に示す。対照群 1 及び 2 に比べて実施群 1 及び 2 の方が、腸内のビフィズス菌及び乳酸菌の菌数が共に高値であった。即ち、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のプロテアーゼの摂取により、ビフィズス菌及び乳酸菌の増殖が促進され、腸内菌叢が改善されることが確認された。また、単なるペプチドの投与ではなく、酵素活性のあるプロテアーゼを摂取することで、腸内菌叢が改善されることが確認された。

[0044] [表3]

		対照群 1	実施群 1	実施群 2	対照群 2
腸内細菌叢 (% of total bacteria)	ビフィズス菌	0.001±0.000	0.282±0.045	1.826±0.214	0.005±0.002
	乳酸菌	0.90±0.21	2.85±0.68	3.05±0.60	1.21±0.53

請求の範囲

- [請求項1] 以下の(1)～(3)の少なくとも1種のポリペプチドからなるプロテアーゼを有効成分とする、腸内菌叢改善剤。
- (1)配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (3)配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が80%以上であり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- [請求項2] 請求項1に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の内服用医薬品。
- [請求項3] 請求項1に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の食品用添加剤。
- [請求項4] 請求項1に記載の腸内菌叢改善剤を含む、腸内菌叢改善用の飲食品。
- [請求項5] 以下の(1)～(3)の少なくとも1種のポリペプチドからなるプロテアーゼを腸内菌叢の改善が必要とされる者に経口適用する、腸内菌叢の改善方法。
- (1)配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (3)配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が80%以上であり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

[請求項6] 腸内菌叢の改善処置に使用される、以下の(1)～(3)の少なくとも1種のポリペプチドからなるプロテアーゼ。

(1)配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が80%以上であり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

[請求項7] 以下の(1)～(3)の少なくとも1種のポリペプチドからなるプロテアーゼの、腸内菌叢改善剤の製造のための使用。

(1)配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

(3)配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が80%以上であり、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等のプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/46(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K36/062(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P1/10(2006.01)i, C12N9/50(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/46, A23L2/52, A23L33/10, A61K36/062, A61P1/00, A61P1/10, C12N9/50

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GOMI Katsuya, et al., Cloning and Nucleotide Sequence of the Acid Protease-encoding Gene (pepA) from Aspergillus oryzae, Biosci. Biotech. Biochem., 1993, vol.57, no.7, pp.1095-1100, fig. 2	6 1-7
X Y	JP 2010-4760 A (Gekkeikan Sake, Co., Ltd.), 14 January 2010 (14.01.2010), claim 1; table 4 (sequence no.18) (Family: none)	6 1-7
X Y	WO 2012/022745 A1 (NOVOZYMES A/S), 23 February 2012 (23.02.2012), example 6 (Protease SEQ ID NO:3) & US 2013/0280375 A1 & EP 2606114 A1 & CN 103298921 A & DK 2606114 T & ZA 201300700 B	6 1-7

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 April 2017 (10.04.17)

Date of mailing of the international search report
25 April 2017 (25.04.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dai 68 Kai The Japanese Society of Nutrition and Food science Taikai Koen Yoshishu, 30 April 2014 (30.04.2014), page 286, 3L-02a	1-7
Y	JP 2012-188372 A (Meiji Co., Ltd.), 04 October 2012 (04.10.2012), paragraphs [0038], [0040] (Family: none)	1-7
P, Y	WO 2016/071989 A1 (Yaegaki Bio-Industry, Inc.), 12 May 2016 (12.05.2016), claims; paragraphs [0022] to [0047] (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/46(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K36/062(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P1/10(2006.01)i, C12N9/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/46, A23L2/52, A23L33/10, A61K36/062, A61P1/00, A61P1/10, C12N9/50

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)
 Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
 UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	GOMI Katsuya, et al., Cloning and Nucleotide Sequence of the Acid Protease-encoding Gene (pepA) from <i>Aspergillus oryzae</i> , Biosci. Biotech. Biochem., 1993, vol. 57, no. 7, pp. 1095-1100, 図 2	6 1-7
X Y	JP 2010-4760 A (月桂冠株式会社) 2010.01.14, 請求項 1、表 4 (配列番号 18) (ファミリーなし)	6 1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

10.04.2017

国際調査報告の発送日

25.04.2017

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

天野 貴子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9444

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2012/022745 A1 (NOVOZYMES A/S) 2012.02.23, 例6 (Protease SEQ ID NO:3) & US 2013/0280375 A1 & EP 2606114 A1 & CN 103298921 A & DK 2606114 T & ZA 201300700 B	6 1 - 7
Y	第68回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, 2014.04.30, 286頁, 3L-02a	1 - 7
Y	JP 2012-188372 A (株式会社明治) 2012.10.04, 【0038】、【0040】 (ファミリーなし)	1 - 7
P Y	WO 2016/071989 A1 (ヤエガキ発酵技研株式会) 2016.05.12, 特許請求の範囲、[0022]～[0047] (ファミリーなし)	1 - 7