

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6641262号
(P6641262)

(45) 発行日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(24) 登録日 令和2年1月7日(2020.1.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 07 K	14/195	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)

C 07 K	14/195	Z N A
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10	

請求項の数 16 (全 199 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-507061 (P2016-507061)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月10日 (2014.4.10)
 (65) 公表番号 特表2016-517848 (P2016-517848A)
 (43) 公表日 平成28年6月20日 (2016.6.20)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2014/051123
 (87) 國際公開番号 WO2014/167338
 (87) 國際公開日 平成26年10月16日 (2014.10.16)
 審査請求日 平成29年4月7日 (2017.4.7)
 (31) 優先権主張番号 1306536.2
 (32) 優先日 平成25年4月10日 (2013.4.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
英國(GB)

(73) 特許権者 514079985
 フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド
 4 D PHARMA RESEARCH
 LIMITED
 イギリス国 エイビー25 2ゼットエス
 アバディーン コーンヒルロード ライ
 フサイエンシーズ イノベーションビルディング
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリペプチド及びイムノモジュレーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T L R 5 アゴニストであるロゼブリア属フラジエリン、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び / 又は前記ポリヌクレオチドを含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む、対象における炎症性障害及び / 又は自己免疫性障害の治療及び / 又は予防剤（但し、ロゼブリア・ホミニスの細菌自体を含むものを除く）であって、前記宿主細胞が、前記ロゼブリア属フラジエリンを発現する、
 前記治療及び / 又は予防剤。

【請求項 2】

ロゼブリア属フラジエリンが、ロゼブリア・ホミニスのフラジエリン、又はロゼブリア・インテスチナリスのフラジエリンである、請求項 1 に記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 3】

ロゼブリア属フラジエリンが、
 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；前記ポリペプチドのバリアント、ホモログ、断片又は誘導体であり、かつ、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有するポリペプチド；及びその組合せ；

からなる群から選択され、

10

20

ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチドが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、又は配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；前記ポリペプチドのバリアント、ホモログ、断片、又は誘導体であり、かつ、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、又は配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、又は配列番号11のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドのバリアント、ホモログ、断片、又は誘導体であり、かつ、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、又は配列番号11のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチド；及びその組合せ；

からなる群から選択される、請求項1又は2に記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項4】

障害が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、1型糖尿病、セリック病、アトピー性皮膚炎、鼻炎、過敏性腸症候群（IBS）、大腸炎、炎症性腸障害（IBD）、潰瘍性大腸炎、囊炎、クローン病、機能性消化不良、アトピー性疾患、壞死性腸炎、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～3のいずれかに記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項5】

対象における制御性T細胞の産生を増加する、請求項1～4のいずれかに記載の治療及び／又は予防剤。

20

【請求項6】

対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF-の産生を増加する、請求項1～5のいずれかに記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項7】

対象の1又は2以上の細胞における免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生を増加する、請求項1～6のいずれかに記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項8】

免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーが、CD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSigleC-H及び／又は同等種である、請求項7に記載の治療及び／又は予防剤。

30

【請求項9】

免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生が樹状細胞による、請求項7又は8に記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項10】

対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のIFN遺伝子の発現を減少させる、請求項1～9のいずれかに記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項11】

TLR5アゴニストであるロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞と、薬学的及び／又は栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む、F1t3L誘導樹状細胞を活性化するための医薬組成物及び／又は栄養補助剤（但し、ロゼブリア・ホミニスの細菌自体を含むものを除く）であって、前記宿主細胞が、前記ロゼブリア属フラジェリンを発現する、

前記医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

40

【請求項12】

ロゼブリア属フラジェリンが、ロゼブリア・ホミニスのフラジェリン、又はロゼブリア・インテスチナリスのフラジェリンである、請求項11に記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

50

【請求項 13】

ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞がカプセル化されている、請求項 11 又は 12 に記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

【請求項 14】

対象における障害を治療するのに使用するための、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤であって、前記障害が、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、前記医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

【請求項 15】

対象の食欲を刺激するのに使用するための、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤。 10

【請求項 16】

請求項 11 ~ 15 のいずれかに記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤を製造する方法であって、

前記方法が、TLR5 アゴニストであるロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、薬学的及び栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合するステップを含み（但し、ロゼブリア・ホミニスの細菌自体を、前記賦形剤、担体又は希釈剤と混合するステップを除く）、前記宿主細胞が、前記ロゼブリア属フラジエリンを発現し、前記ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ポリヌクレオチド、及び／又は前記ベクター、及び／又は前記ベクターを含む前記宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチドを含む前記宿主細胞が、カプセル化されていてもよい、
前記方法。 20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、種々の治療及び栄養利用のための、ロゼブリア属 (Roseburia) フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞に関する。 30

【背景技術】**【0002】**

ヒトの腸は、子宮内では無菌であると考えられるが、出生直後、種々の母親及び環境微生物に曝露される。その後、出産様式、環境、食事及び宿主遺伝子型などの因子が影響を及ぼす、動的期間の微生物の定着及び遷移が起こり、それら因子の全てが、特に若年期に腸内微生物叢の組成に対して強い影響を及ぼす。続いて微生物叢は安定化し、成人様となる (Spor, A., Koren, O. & Ley, R. 2011, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome", Nature reviews.Microbiology, vol. 9, no. 4, pp. 279-290)。ヒト腸内微生物叢は、2つの主要な細菌門、バクテロイデス門 (Bacteroidetes) 及びフィルミクテス門 (Firmicutes) に実質的に属する、500 ~ 1000 を超える様々なフィロタイプを含む (Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. 2005, "Diversity of the human intestinal microbial flora", Science (New York, N.Y.), vol. 308, no. 5728, pp. 1635-1638)。ヒトの腸の細菌定着から生じる共生関係の成功により、種々の代謝、構造、保護及び他の有益な機能が得られる。定着した腸の増強された代謝活性は、そうでなければ消化されない食事成分が分解され、副産物の遊離により宿主に対する重要な栄養源が得られることを確実にする。同様に、腸内微生物叢 40

の免疫学的重要性が十分に認識されており、片利共生細菌の導入に続いて機能的に再構築される、障害のある免疫系を有する無菌動物において例示される (Macpherson, A.J., Huziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. 2001, "IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms", *Microbes and infection / Institut Pasteur*, vol. 3, no. 12, pp. 1021-1035、Macpherson, A.J., Martinic, M.M. & Harris, N. 2002, "The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 59, no. 12, pp. 2088-2096、Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", *Cell*, vol. 122, no. 1, pp. 107-118)。 10

【 0 0 0 3 】

本質的に微生物定着が影響を及ぼす、分泌型腸 IgA の產生とははっきりと異なり (Chung, H. & Kasper, D.L. 2010, "Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis", *Current opinion in immunology*, vol. 22, no. 4, pp. 455-460、Macpherson, A.J. 2006, "IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine", *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 308, pp. 117-136)、T 細胞発生及び分化は、特定の片利共生微生物による定着を必要とすると考えられている。クロストリジウム属 (*Clostridium*) 種、とりわけ胞子形成性分節型糸状菌 (*SFB*, segmented filamentous bacteria) が、腸及び結腸 Th1、Th17 及び Treg の分化及び成熟に対する強力な刺激であると考えられている (Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses", *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 677-689、Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 485-498)。最近の研究では、クロストリジウムクラスター IV 及び XIVa、及び改変 Schaedler フローラ (*ASF*, Altered Schaedler Flora) の細菌を含む他の腸内細菌が、Treg の新規生成を誘導することができ、一方で、バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) による単一の定着が、Treg の拡大を促進することにより、無菌マウスにおいて Th1 / Th2 不均衡を是正できることが実証されている (Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", *Cell*, vol. 122, no. 1, pp. 107-118、Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2011, "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses", *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 794-806、Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 331, no. 6015, pp. 337-341)。これらのデータは、他の常在腸内細菌の重要な免疫調節効果を暗示する。明らかに、T 細胞分化経路に対する片利共生細菌の効果は多様であり、すでに仮定されているように、特定の細菌に関連することが分かっている TLR リガンドのアレイによる影響を受け得る (Nutsch, K.M. & Hsieh, C.S. 2012, "T cell tolerance and immunity to commensal bacteria", *Current opinion in immunology*, vol. 24, no. 4, pp. 385-391)。例えば、SFB が T 細胞応答に影響を与える機構は現在未知であるが、フラジェリン遺伝子の存在を確認した最近のゲノム研究は、TLR5 - フラジェリン相互作用を介して媒介された自然応答が重要であろうことを示唆 40 45 50

している (Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T.D., Ohno, H., Um esaki, Y. & Hattori, M. 2011, "Complete genome sequences of rat and mouse segmen ted filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation", *Cell host & microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 273-284、Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., G evers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R. & Ivanov, I.I. 2011, "The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensi ve auxotrophy and adaptations to the intestinal environment", *Cell host & microb e*, vol. 10, no. 3, pp. 260-272)。さらに、B. フラギリスのT reg 増強効果が、P SA、及びTLR2シグナリング事象による媒介に関連付けられた (Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. & Mazmanian, S.K. 2011, "The To II-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 332, no. 6032, pp. 974-977)。

【0004】

微生物叢組成の劇的な変化が、炎症性腸疾患 (IBD, inflammatory bowel disease) などの胃腸障害において報告されている。例えば、クロストリジウムクラスターXIVa細菌のレベルが、IBD患者において減少し、一方で大腸菌 (*E. coli*) の数が増加し、これは、腸内での共生生物及び病原生物の均衡のシフトを示唆している (Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. 2007, "Molec ular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human in flammatory bowel diseases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of t he United States of America*, vol. 104, no. 34, pp. 13780-13785、Scanlan, P.D., S hanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J.R. 2006, "Culture-independent analyses o f temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial sub groups in Crohn's disease", *Journal of clinical microbiology*, vol. 44, no. 11, p p. 3980-3988、Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., Dore, J., Leclerc, M . & McSweeney, C.S. 2010, "Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease pati ents as revealed by a custom phylogenetic microarray", *Inflammatory bowel diseas es*, vol. 16, no. 12, pp. 2034-2042、Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Pret er V., Arijs I., Ballet V., Claes K., Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeire S. 2013, "Predominant dysbiosis in patients with ulcerative colitis i s different from Crohn's disease patients", *Inflammatory Bowel Diseases*. 8th Con gress of ECCO, Feb 14-16, 2013)。興味深いことに、この微生物腸内毒素症はまた、T エフェクター細胞集団の不均衡に関連付けられる。

【0005】

ロゼブリア属は、フィルミクテス門の系統発生学的クラスターXIVaに属する。現在、ロゼブリア属内で、ロゼブリア・セシコラ (*Roseburia cecicola*)、ロゼブリア・ファエシス (*Roseburia faecis*)、ロゼブリア・ホミニス (*Roseburia hominis*)、ロゼブリア・インテスチナリス (*Roseburia intestinalis*)、ロゼブリア・イヌリニボランス (*Rose buria inulinivorans*) の5つの種が同定され、特徴付けられている (Stanton and Savag e 1983、Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. Pt 10, pp. 2437-2441)。これらの細菌は有鞭毛片利共生嫌気性生物であり、また主要なブチレート産生体である (Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanto n, T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia ho minis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from huma n faeces", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vo l. 56, no. Pt 10, pp. 2437-2441)。ヒトの腸に定着しているこれらの細菌の正確な数

は、正確に推定されていないが、口ゼブリア属種が、健康なヒトの腸内で優性であり、IBD患者において過小提示される (Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijs I., Ballet V., Claes K., Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeyre S. 2013, "Predominant dysbiosis in patients with ulcerative colitis is different from Crohn's disease patients", Inflammatory Bowel Diseases. 8th Congress of ECCO, Feb 14-16, 2013)。

【0006】

マウスの腸への定着及び適応に関する細菌遺伝子、特にフラジエリン、並びに口ゼブリア属細菌による定着に応答している宿主免疫遺伝子の役割が開示される。本発明者らは、R.ホミニス及びR.インテスチナリスなどの口ゼブリア属菌の特定のフラジエリン構造が、他の有鞭毛腸内細菌に対して、上皮細胞と樹状細胞の両方において異なるシグナリング応答を誘導することを示す。宿主適応応答、とりわけ Treg 応答を指向することにおける、TLR5 - R.ホミニスなどのTLR5 - 口ゼブリア属菌相互作用の重要性が示される。本明細書に記載のR.ホミニスに対する完全ゲノム配列及び注釈が、GenBankにおいて受託番号CP003040(バージョン1)で示されている。本明細書に記載のR.インテスチナリス(16S rRNA遺伝子株L1-82に対するGenBank受託番号:AJ312385)に対して、参照ゲノム配列が、GenBankにおいて受託番号ABYJ02000000(バージョン2)で示されており、配列ABYJ02000001 ~ ABYJ02000409からなる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Spor, A., Koren, O. & Ley, R. 2011, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome", Nature reviews.Microbiology, vol. 9, no. 4, pp. 279-290

【非特許文献2】Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. 2005, "Diversity of the human intestinal microbial flora", Science (New York, N.Y.), vol. 308, no. 5728, pp. 1635-1638

【非特許文献3】Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. 2001, "IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms", Microbes and infection / Institut Pasteur, vol. 3, no. 12, pp. 1021-1035

【非特許文献4】Macpherson, A.J., Martinic, M.M. & Harris, N. 2002, "The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine", Cellular and molecular life sciences : CMLS, vol. 59, no. 12, pp. 2088-2096

【非特許文献5】Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", Cell, vol. 122, no. 1, pp. 107-118

【非特許文献6】Chung, H. & Kasper, D.L. 2010, "Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis", Current opinion in immunology, vol. 22, no. 4, pp. 455-460

【非特許文献7】Macpherson, A.J. 2006, "IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine", Current topics in microbiology and immunology, vol. 308, pp. 117-136

【非特許文献8】Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses",

10

20

30

40

50

Immunity, vol. 31, no. 4, pp. 677-689

【非特許文献 9】Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", Cell, vol. 139, no. 3, pp. 485-498

【非特許文献 10】Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2011, "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses", Immunity, vol. 34, no. 5, pp. 794-806

10

【非特許文献 11】Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species", Science (New York, N.Y.), vol. 331, no. 6015, pp. 337-341

【非特許文献 12】Nutsch, K.M. & Hsieh, C.S. 2012, "T cell tolerance and immunity to commensal bacteria", Current opinion in immunology, vol. 24, no. 4, pp. 385-391

【非特許文献 13】Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T.D., Ohno, H., Umesaki, Y. & Hattori, M. 2011, "Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation", Cell host & microbe, vol. 10, no. 3, pp. 273-284

20

【非特許文献 14】Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., Gevers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R. & Ivanov, I.I. 2011, "The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment", Cell host & microbe, vol. 10, no. 3, pp. 260-272

【非特許文献 15】Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. & Mazmanian, S.K. 2011, "The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota", Science (New York, N.Y.), vol. 332, no. 6032, pp. 974-977

30

【非特許文献 16】Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. 2007, "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104, no. 34, pp. 13780-13785

【非特許文献 17】Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J.R. 2006, "Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease", Journal of clinical microbiology, vol. 44, no. 11, pp. 3980-3988

40

【非特許文献 18】Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., Dore, J., Leclerc, M. & McSweeney, C.S. 2010, "Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray", Inflammatory bowel diseases, vol. 16, no. 12, pp. 2034-2042

【非特許文献 19】Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijs I., Balliet V., Claes K., Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeire S. 2013, "Predominant dysbiosis in patients with ulcerative colitis is different from Crohn's disease patients", Inflammatory Bowel Diseases. 8th Congress of ECCO, Feb 14-16, 2013

50

【非特許文献 20】Stanton and Savage 1983

【非特許文献 21】Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 56, no. Pt 10, pp. 2437-2441

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

驚くべきことに、本発明者らは、ロゼブリア属フラジエリンタンパク質が、免疫応答をモジュレートする上で重要であることを発見した。 10

【0009】

さらに、本発明者らは、驚くべきことに、ロゼブリア・ホミニス又はロゼブリア・インテスキナリスから誘導され、又は誘導可能であるフラジエリンタンパク質が、免疫応答をモジュレートする上で重要であることを発見した。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、対象における（腸などの）組織又は器官の炎症をモジュレートするのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。すなわち本発明は以下に関する。

(1) 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートするのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(2) ロゼブリア属フラジエリンが、

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12、若しくはそのバリエント、ホモログ、断片又は誘導体と少なくとも 75 % の同一性を有するポリペプチド、及びその組合せ

からなる群から選択され、

ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列が、

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12、若しくはそのバリエント、ホモログ、断片、又は誘導体と少なくとも 75 % の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、又は配列番号 11、若しくはそのバリエント、ホモログ、断片、又は誘導体と少なくとも 75 % の同一性を有するポリヌクレオチド配列；

及びその組合せ

からなる群から選択される、上記(1)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(3) 組織又は器官の炎症を軽減する、上記(1)又は(2)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(4) 組織又は器官の上皮細胞による炎症を軽減する、上記(3)に記載の使用のための

10

20

30

40

50

、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(5) 上皮細胞が消化管の上皮細胞である、上記(4)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(6) 対象におけるT細胞の産生をモジュレートするのに使用するためのロゼブリア属フラジェリン、又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞であつて；好ましくは、対象における制御性T細胞の産生を増加する、ロゼブリア属フラジェリン、又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

(7) 免疫寛容を修復するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

(8) 対象の免疫系を調節し、免疫寛容を修復するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

(9) 対象の適応免疫系を調節するのに使用するための、上記(8)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(10) 対象の自然免疫系を調節するのに使用するための、上記(8)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(11) 対象における、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である障害を治療するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(12) 障害が対象の消化管又はその切片に影響を与える、上記(11)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(13) 障害が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、1型糖尿病、セリアック病、アトピー性皮膚炎、鼻炎、過敏性腸症候群(IBS)、大腸炎、炎症性腸障害(IBD)、潰瘍性大腸炎、囊炎、クローン病、機能性消化不良、アトピー性疾患、壞死性腸炎、及びそれらの組合せからなる群から選択される、上記(11)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(14) 対象の組織又は器官における樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートするのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリ

10

20

30

40

50

ンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(15) 樹状細胞及び／又は上皮細胞を活性化させる、上記(14)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(16) 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGFの產生を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(17) IL-10の產生が樹状細胞による、上記(16)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(18) IL-10及び／又はTGFの產生を上方調節する、上記(16)又は(17)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(19) 対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSingle-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関与する細胞表面マーカーの產生を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(20) CD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSingle-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関与する細胞表面マーカーの產生が樹状細胞による、上記(19)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(21) CD40及び／又はI-A/I-Eの產生を上方調節する、上記(19)又は(20)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(22) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(23) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(24) 対象における腸内微生物叢を改善するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細

10

20

30

40

50

菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(25) 対象における食欲を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(26) 対象における食欲を刺激する、上記(24)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

(27) 対象の血液におけるコレシストキニン(Cck)及び／又はグルカゴン(Gcg)のレベルが減少する、上記(25)又は(26)に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(28) 対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(29) 対象における消化管の健康状態を改善するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(30) カプセル化されている、上記(1)～(29)のいずれかに記載の、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。

(31) ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物。

(32) ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞がカプセル化されている、上記(31)に記載の医薬組成物。

(33) ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞と、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む栄養補助剤。

(34) ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞がカプセル化されている、上記(33)に記載の栄養補助剤。

(35) ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を含む飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

10

20

30

40

50

(36) カプセル化されている、上記(35)に記載の飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

(37) 上記(31)に記載の医薬組成物を製造する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合するステップを含み、

前記ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む前記宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む前記宿主細胞がカプセル化されていてもよい、前記方法。 10

(38) 上記(33)に記載の栄養補助剤を製造する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合するステップを含み、

前記ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む前記宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む前記宿主細胞がカプセル化されていてもよい、前記方法。 20

(39) 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートする方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を対象に投与するステップを含み、

前記対象における組織又は器官の炎症がモジュレートされる、前記方法。

(40) 対象におけるT細胞の産生をモジュレートする方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、 30

前記対象におけるT細胞、特に制御性T細胞の産生がモジュレートされる、前記方法。

(41) 対象の免疫系を調節する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象の免疫系が調節される、前記方法。

(42) 対象における障害を治療する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、 40

前記障害が炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、前記方法。

(43) 対象における樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートする方法であって、前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象における樹状細胞及び／又は上皮細胞がモジュレートされる、前記方法。 50

(44) 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/又はTGFの産生を調節する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を対象に投与するステップを含み、

前記対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/又はTGFの産生が調節される、前記方法。

(45) 対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び/又はSingle-H及び/又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生を調節する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を対象に投与するステップを含み、

前記対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び/又はSingle-H及び/又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生が調節される、前記方法。

(46) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現を調節する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現が調節される、前記方法。

(47) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節する方法であって、前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現が調節される、前記方法。

(48) 対象における腸内微生物叢を改善する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象における腸内微生物叢が改善される、前記方法。

(49) 対象における食欲を調節する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象における食欲が調節される、前記方法。

(50) 対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び/又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を調節する方法であって、

10

20

30

40

50

前記方法が、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

前記対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現が調節される、前記方法。

(51) 対象における消化管の健康状態を改善する方法であって、

前記方法が、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、

10

前記対象における消化管の健康状態が改善される、前記方法。

(52) 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(53) 対象におけるT細胞の産生をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

20

(54) 対象の免疫系を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(55) 対象における障害の治療のための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用であって、前記障害が炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、前記使用。

30

(56) 対象の組織又は器官における樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(57) 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGFの産生を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

40

(58) 対象の1又は2以上の細胞におけるCD40及び／又はI-A/I-Eの産生を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(59) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド

50

配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(60) 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(61) 対象における腸内微生物叢を改善するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。 10

(62) 対象における食欲を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。 。

(63) 対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。 20

(64) 対象における消化管の健康状態を改善するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

(65) 対象における免疫寛容を修復するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。 30

(66) 対象における免疫寛容を修復する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を投与するステップを含み、前記対象における免疫寛容が修復される、前記方法。

(67) 実質的に本明細書に記載の使用のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞。 40

(68) 実質的に本明細書に記載の、医薬組成物、又は栄養補助剤、又は飼料、食品、栄養補助食品若しくは食品添加物、又は医薬組成物を製造する方法、又は栄養組成物を製造する方法、又はロゼブリア属フラジエリン、及び／若しくは前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／若しくは前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／若しくは前記ベクターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／若しくは前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞を使用する方法、又はロゼブリア属フラジエリン、及び／若しくは前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／若しくは前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／若しくは前記ベ 50

クターを含む細菌を含む宿主細胞、及び／若しくは前記ポリヌクレオチド配列を含む細菌を含む宿主細胞の使用。

【0011】

別の態様において、本発明は、対象におけるT細胞（例えば、TLR5を発現可能な制御性T細胞などの制御性T細胞）の産生をモジュレートするのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。 10

【0012】

本発明は、免疫寛容を修復するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、対象の免疫系を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。 20

【0014】

別の態様において、本発明は、対象における障害を治療するのに使用するための、前記障害が炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。 30

【0015】

本発明は、別の態様において、対象の組織又は器官における（骨髄樹状細胞などの）樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートするのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0016】

本発明は、さらなる態様において、対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF- β の産生を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。 40

【0017】

さらなる態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSingle-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関与する細胞表面マーカーの産生を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又 50

は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0018】

別の態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上のI型IFN遺伝子（例えば、IFN-1、IFN-3、Ifi202b、Ifi203、IFI44、IFTI、MXI、OASI、OAS2、OAS3、OASL、Irif3及びIrif4からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない）の発現を調節する（例えば、下方調節する）のに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0019】

本発明は、さらなる態様において、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上の炎症誘発性遺伝子（例えば、IL1-、IL4、IL5、IL6、IL8、IL12、IL13、IL17、IL21、IL22、IL23、IL27、IFN、CCL2、CCL3、CCL5、CCL20、CXCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びTNF-からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない）の発現を調節する（例えば、下方調節する）のに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0020】

本発明は、別の態様において、対象における腸内微生物叢を改善するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0021】

別の態様において、本発明は、対象における食欲を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0022】

さらなる態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン（Cck）をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン（Gcg）をコードする遺伝子の発現を調節する（例えば、下方調節する）のに使用するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本発明は、さらなる態様において、対象における消化管の健康状態を改善するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【 0 0 2 4 】

本発明は、別の態様において、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌と、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物に関する。

10

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本発明は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌と、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物に関する。

20

【 0 0 2 6 】

さらなる態様において、本発明は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌と、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物に関する。

【 0 0 2 7 】

本発明は、さらなる態様において、本発明による医薬組成物を製造する方法（process）であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌を、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含み、前記ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ベクター、及び／又は前記ベクターを含む前記宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む前記宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）前記ロゼブリア属菌がカプセル化されていてもよい、方法に関する。

30

【 0 0 2 8 】

さらなる態様において、本発明は、本発明による医薬組成物を製造する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌を、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含み、前記ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ベクター、及び／又は前記ベクターを含む前記宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む前記宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）前記ロゼブリア属菌がカプセル化されていてもよい、方法に関する。

40

50

ロゼブリア・インテスチナリスなどの)前記ロゼブリア属菌がカプセル化されていてよい、方法に関する。

【0029】

別の態様において、本発明は、対象における(腸などの)組織又は器官の炎症をモジュレートする方法(method)であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を対象に投与することを含み、対象における(腸などの)組織又は器官の炎症がモジュレートされる、方法に関する。 10

【0030】

本発明は、別の態様において、対象におけるT細胞(例えば、TLR5を発現可能な制御性T細胞などの制御性T細胞)の産生をモジュレートする方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象におけるT細胞(例えば、TLR5を発現可能な制御性T細胞などの制御性T細胞)の産生がモジュレートされる、方法に関する。 20

【0031】

本発明は、さらなる態様において、対象の免疫系を調節する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象の免疫系が調節される、方法に関する。 20

【0032】

さらなる態様において、本発明は、対象における障害を治療する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、前記障害は、炎症性障害及び/又は自己免疫性障害である、方法に関する。 30

【0033】

別の態様において、本発明は、対象における(骨髄樹状細胞などの)樹状細胞及び/又は上皮細胞をモジュレートする方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象における(骨髄樹状細胞などの)樹状細胞及び/又は上皮細胞がモジュレートされる、方法に関する。 40

【0034】

さらなる態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/TGF の産生を調節する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌を対象に投与すること 50

を含み、対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/又はTGFの産生がモジュレートされる、方法に関する。

【0035】

本発明は、別の態様において、対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び/又はSingle-H及び/又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生を調節する方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌を対象に投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び/又はSingle-H及び/又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの産生が調節される、方法に関する。

【0036】

別の態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上のI型IFN遺伝子(例えば、IFN-1、IFN-3、Ifi202b、Ifi203、IFI44、IFTI、MXI、OASI、OAS2、OAS3、OASL、Irif3及びIrif4からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない)の発現を調節する(例えば下方調節する)方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上のI型IFN遺伝子(例えば、IFN-1、IFN-3、Ifi202b、Ifi203、IFI44、IFTI、MXI、OASI、OAS2、OAS3、OASL、Irif3及びIrif4からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない)の発現が調節される、方法に関する。

【0037】

さらなる態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上の炎症誘発性遺伝子(例えば、IL1-、IL4、IL5、IL6、IL8、IL12、IL13、IL17、IL21、IL22、IL23、IL27、IFN、CCL2、CCL3、CCL5、CCL20、CXCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びTNF-からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない)の発現を調節する(例えば、下方調節する)方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上の炎症誘発性遺伝子(例えば、IL1-、IL4、IL5、IL6、IL8、IL12、IL13、IL17、IL21、IL22、IL23、IL27、IFN、CCL3、CCL5、CCL20、CXCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びTNF-からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない)の発現が調節される、方法に関する。

【0038】

本発明は、さらなる態様において、対象における腸内微生物叢を改善する方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象における腸内微生物叢が改善される、方法に関する。

【0039】

別の態様において、本発明は、対象における食欲を調節する方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象における食欲が調節される、方法に関する。 10

【0040】

本発明は、別の態様において、対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン（Cck, cholecystokinin）をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン（Gcg, glucagon）をコードする遺伝子の発現を調節する（例えば、下方調節する）方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン（Cck）をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン（Gcg）をコードする遺伝子の発現が調節される、方法に関する。 20

【0041】

さらなる態様において、本発明は、対象における消化管の健康状態を改善する方法であって、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象における消化管の健康状態が改善される、方法に関する。 30

【0042】

本発明は、さらなる態様において、対象における組織又は（腸などの）器官の炎症をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。

【0043】

本発明は、別の態様において、対象におけるT細胞（例えば、TLR5を発現可能な制御性T細胞などの制御性T細胞）の産生をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。 40

【0044】

さらなる態様において、本発明は、対象の免疫系を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は 50

前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。

【0045】

本発明は、さらなる態様において、対象における障害の治療のための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用であって、前記障害が炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、使用に関する。 10

【0046】

本発明は、別の態様において、対象の組織又は器官における（骨髓樹状細胞などの）樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートするための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。

【0047】

別の態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF- β の産生を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。 20

【0048】

本発明は、さらなる態様において、対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSiglec-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に関与する細胞表面マーカーの産生を調節するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。 30

【0049】

さらなる態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上のI型IFN遺伝子（例えば、IFN-1、IFN-3、Ifi202b、Ifi203、IFI44、IFTI、MXI、OASI、OAS2、OAS3、OASL、Irif3及びIrif4からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない）の発現を調節する（例えば、下方調節する）ための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。 40

【0050】

別の態様において、本発明は、対象の1又は2以上の細胞における、1又は2以上の炎 50

症誘発性遺伝子（例えば、IL1-、IL4、IL5、IL6、IL8、IL12、IL13、IL17、IL21、IL22、IL23、IL27、IFN、CCL2、CCL3、CCL5、CCL20、CXCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びTNF-からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子であるが、これらに制限されない）の発現を調節する（例えば、下方調節する）ための医薬の製造のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

10

【0051】

本発明は、さらなる態様において、対象における腸内微生物叢を改善するための医薬の製造のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

【0052】

本発明は、別の態様において、対象における食欲を調節するための医薬の製造のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

20

【0053】

本発明は、さらなる態様において、対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン（Cck）をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン（Gcg）をコードする遺伝子の発現を調節する（例えば、下方調節する）ための医薬の製造のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

30

【0054】

本発明は、別の態様において、対象における消化管の健康状態を改善するための医薬の製造のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

40

【0055】

別の態様において、本発明は、医薬における使用のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの）口ゼブリア属菌の使用に関する。

【0056】

さらなる態様において、本発明は、免疫寛容を修復することにおける使用のための、口ゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌ

50

クレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

【0057】

別の態様において、本発明は、対象における免疫寛容を修復するための医薬の製造のための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。 10

【0058】

本発明は、別の態様において、対象における免疫寛容を修復する方法であって、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を投与することを含み、対象における免疫寛容が修復される、方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】R. ホミニスゲノムの配列及び注釈。R. ホミニス A 2 - 183 の完全ゲノム配列を生成した。これは、4つのリボソームオペロン、66個のRNA及び3,273個の予測タンパク質を有する、単一の3,592,125 bp 染色体によって表される。（A）プライマーが標的とする領域中に示されたPCR実験（表S1）の位置を有するR. ホミニス環状ゲノムマップ。外側トラック0から開始したゲノムマップ上のトラックは以下の通りである。トラック0（青色）- 番号付けした目盛によって示されるリアルタイムPCR実験。トラック1（淡青色）- フォワードCDS。トラック2（淡青色）- リバースCDS。トラック3（灰色）- rRNA。トラック4（緑色）- tRNA。トラック5（赤色）- リアルタイムPCRが標的とするSTSマーキング領域。グラフ1 - GC含量。グラフ2 - GCバイアス。（B）R. ホミニスゲノムの機能的注釈は、最大数の遺伝子が、炭水化物、タンパク質代謝及びアミノ酸及び誘導体に属することを示す。 30

【図2】R. ホミニスは、運動性、モビリゼーション及び走化性を上方調節することによって、腸内環境に応答する。無菌GF C3H/HeN雄マウスに、28日間、強制飼養によってR. ホミニス培養液を与え、無菌対照動物と比較した。14日目及び28日目に、R. ホミニス処置動物（N = 5）及び対照動物（N = 4）を犠牲死させ、回腸、結腸及び盲腸を回収した。（A）コンジュゲーション／モビリゼーション輸送に関与する遺伝子のリアルタイムPCR検証。（B）運動性及び走化性に関与する遺伝子のリアルタイムPCR検証。（C）UV照射標準マウス食餌の存在下、インビトロにて増殖したR. ホミニスの、アフィニティー精製F1a1抗体、F1a2特異的抗血清及び抗DNAギラーゼA抗体で免疫染色したウエスタンプロット（レーン1：食餌なし、レーン2：0.01g食餌／R. ホミニス培養液10mL、レーン3：0.02g食餌／10mL、レーン4：0.05g食餌／10mL、レーン5：0.1g食餌／10mL、レーン6：0.2g食餌／10mL、レーン7：0.5g食餌／10mL、レーン8：1g食餌／10mL）。鞭毛（黒矢印）を示している電子顕微鏡（EM）写真。定着マウスの内腔成分から、及びF1aA1及びF1aA2特異的抗血清を用いてインビトロで増殖したR. ホミニスからの細菌に対して実施した免疫細胞化学。本来の倍率×1000。（D）ブチレート代謝に関与する遺伝子のリアルタイムPCR検証。（E）ヒト腸上皮細胞へのインビトロ曝露の間の、R. ホミニス転写物のリアルタイムPCR解析。リアルタイムPCR結果は、倍数変化として表す。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001。 40

【図3】R. ホミニスとの单一連関後、マウス腸内に示差的に発現した転写物の同定。（ 50

A) G F (N = 4) に対して、R . ホミニス定着マウス (N = 5) 中の、示差的に発現した遺伝子のアフィメトリックスマイクロアレイ解析。棒グラフは、14及び28日後、より高く、及びより低く発現した遺伝子の数を表している。(B) 14日目及び28日目にて、G F と R . ホミニス定着マウス間の機能的有意差を有する、示差的に発現した遺伝子から生成したヒートマップ。(C) R . ホミニス定着と G F マウスとの間で有意に異なることを示した遺伝子のリアルタイム PCR 検証。リアルタイム PCR 結果は、倍数変化として表す。* P < 0 . 0 5 、 ** P < 0 . 0 1 、 *** P < 0 . 0 0 1 。

【図4】ロゼブリア・ホミニスによる、Foxp3 + T reg 細胞の誘導。R . ホミニスで14日間処置した従来の C 3 H / He N の固有層(対照と R . ホミニス処置との間 P = 0 . 0 4 2 5) 及び腸間膜リンパ節(P = 0 . 0 6 8 3) 中の Foxp3 + T reg 細胞のフローサイトメトリー解析。
10

【図5】結腸T細胞マーカーが、R . ホミニス单一定着によって有意に誘導される。(A)無菌及びR . ホミニス单一定着 C 3 H / He N (N = 8) 及び C 5 7 B 1 / 6 (N = 3) マウスにおける、抗 CD 3 及び抗 Foxp3 での上行結腸固有層細胞の免疫蛍光解析。(B) G F 及び R . ホミニス処置 C 3 H / He N マウスの上行結腸における、(i) 抗 Ly 6 G 、(ii) 抗 CD 11 b 、(iii) 抗 CD 3 及び(iv) 抗 CD 3 と抗 Foxp3 で標識した、固有層細胞の免疫蛍光解析。G F マウス (N = 7 ~ 8) 及び R . ホミニス処置マウス (N = 8 ~ 1 0) における、視野あたりの陽性細胞数として表すデータ。* P < 0 . 0 5 。本来の倍率 × 6 3 0 。

【図6】R . ホミニスフラジエリン RH 1 は、腸上皮細胞及びマウス骨髓誘導樹状細胞において特定の効果を有する。(A)異なる細菌フラジエリン、サルモネラ・エンテリティディス (Salmonella enteritidis) (SE) 、大腸菌 K 1 2 (EC) 、 RH 1 及び RH 2 で処置した Caco - 2 腸上皮細胞 (N = 1) 中の、示差的に発現した遺伝子から発生したヒートマップ。(B)従来の C 3 H / He N 、対照(青色)からの、フローサイトメトリーによって決定した、組換えフラジエリン (SE 、 K 1 2 、 RH 1 、 RH 2 、緑色)との 24 時間インキュベーション後の、 CD 11 c + B 2 2 0 + CD 3 1 7 + F l t 3 L - 誘導樹状細胞による、(i) CD 4 0 、(ii) I - A / I - E 及び(iii) CD 1 0 3 の発現。ヒストグラムは、3つの実験からのデータを示す。(C)それぞれ CD 1 1 c + B 2 2 0 + CD 3 1 7 + 細胞及び CD 1 1 c + CD 1 1 b + B 2 2 0 - 細胞上でゲーティングした従来の C 3 H / He N からの、組換えフラジエリン (SE 、 K 1 2 、 RH 1 、 RH 2) 処置 F l t 3 L - 及び GMCSF - 誘導樹状細胞集団の頻度。総、生及びシングレット細胞の百分率、3つの実験からの平均値 ± SEM として表したデータ。(D)サイトカイン IL - 1 0 及び IL - 1 2 のタンパク質発現を、 C 3 H / He N 及び C 5 7 B 1 / 6 から誘導した、対照(未刺激 DC ; N = 3) 及び RH 1 処置 DC (N = 3) からの上清中の、 C B A によって測定した。データは、平均値 ± S D で表す。*** P < 0 . 0 0 1 。

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
5510
5511
5512
5513
5514
5515
5516
5517
5518
5519
5520
5521
5522
5523
5524
5525
5526
5527
5528
5529
5530
5531
5532
5533
5534
5535
5536
5537
5538
5539
55310
55311
55312
55313
55314
55315
55316
55317
55318
55319
55320
55321
55322
55323
55324
55325
55326
55327
55328
55329
55330
55331
55332
55333
55334
55335
55336
55337
55338
55339
55340
55341
55342
55343
55344
55345
55346
55347
55348
55349
55350
55351
55352
55353
55354
55355
55356
55357
55358
55359
55360
55361
55362
55363
55364
55365
55366
55367
55368
55369
55370
55371
55372
55373
55374
55375
55376
55377
55378
55379
55380
55381
55382
55383
55384
55385
55386
55387
55388
55389
55390
55391
55392
55393
55394
55395
55396
55397
55398
55399
553100
553101
553102
553103
553104
553105
553106
553107
553108
553109
553110
553111
553112
553113
553114
553115
553116
553117
553118
553119
553120
553121
553122
553123
553124
553125
553126
553127
553128
553129
553130
553131
553132
553133
553134
553135
553136
553137
553138
553139
553140
553141
553142
553143
553144
553145
553146
553147
553148
553149
553150
553151
553152
553153
553154
553155
553156
553157
553158
553159
553160
553161
553162
553163
553164
553165
553166
553167
553168
553169
553170
553171
553172
553173
553174
553175
553176
553177
553178
553179
553180
553181
553182
553183
553184
553185
553186
553187
553188
553189
553190
553191
553192
553193
553194
553195
553196
553197
553198
553199
553200
553201
553202
553203
553204
553205
553206
553207
553208
553209
553210
553211
553212
553213
553214
553215
553216
553217
553218
553219
553220
553221
553222
553223
553224
553225
553226
553227
553228
553229
553230
553231
553232
553233
553234
553235
553236
553237
553238
553239
553240
553241
553242
553243
553244
553245
553246
553247
553248
553249
553250
553251
553252
553253
553254
553255
553256
553257
553258
553259
553260
553261
553262
553263
553264
553265
553266
553267
553268
553269
553270
553271
553272
553273
553274
553275
553276
553277
553278
553279
553280
553281
553282
553283
553284
553285
553286
553287
553288
553289
553290
553291
553292
553293
553294
553295
553296
553297
553298
553299
553300
553301
553302
553303
553304
553305
553306
553307
553308
553309
553310
553311
553312
553313
553314
553315
553316
553317
553318
553319
553320
553321
553322
553323
553324
553325
553326
553327
553328
553329
553330
553331
553332
553333
553334
553335
553336
553337
553338
553339
553340
553341
553342
553343
553344
553345
553346
553347
553348
553349
553350
553351
553352
553353
553354
553355
553356
553357
553358
553359
553360
553361
553362
553363
553364
553365
553366
553367
553368
553369
553370
553371
553372
553373
553374
553375
553376
553377
553378
553379
553380
553381
553382
553383
553384
553385
553386
553387
553388
553389
553390
553391
553392
553393
553394
553395
553396
553397
553398
553399
553400
553401
553402
553403
553404
553405
553406
553407
553408
553409
553410
553411
553412
553413
553414
553415
553416
553417
553418
553419
553420
553421
553422
553423
553424
553425
553426
553427
553428
553429
553430
553431
553432
553433
553434
553435
553436
553437
553438
553439
553440
553441
553442
553443
553444
553445
553446
553447
553448
553449
553450
553451
553452
553453
553454
553455
553456
553457
553458
553459
553460
553461
553462
553463
553464
553465
553466
553467
553468
553469
553470
553471
553472
553473
553474
553475
553476
553477
553478
553479
553480
553481
553482
553483
553484
553485
553486
553487
553488
553489
553490
553491
553492
553493
553494
553495
553496
553497
553498
553499
553500
553501
553502
553503
553504
553505
553506
553507
553508
553509
553510
553511
553512
553513
553514
553515
553516
553517
553518
553519
553520
553521
553522
553523
553524
553525
553526
553527
553528
553529
553530
553531
553532
553533
553534
553535
553536
553537
553538
553539
553540
553541
553542
553543
553544
553545
553546
553547
553548
553549
553550
553551
553552
553553
553554
553555
553556
553557
553558
553559
553560
553561
553562
553563
553564
553565
553566
553567
553568
553569
553570
553571
553572
553573
553574
553575
553576
553577
553578
553579
553580
553581
553582
553583
553584
553585
553586
553587
553588
553589
553590
553591
553592
553593
553594
553595
553596
553597
553598
553599
553600
553601
553602
553603
553604
553605
553606
553607
553608
553609
553610
553611
553612
553613
553614
553615
553616
553617
553618
553619
553620
553621
553622
553623
553624
553625
553626
553627
553628
553629
553630
553631
553632
553633
553634
553635
553636
553637
553638
553639
553640
553641
553642
553643
553644
553645
553646
553647
553648
553649
553650
553651
553652
553653
553654
553655
553656
553657
553658
553659
553660
553661
553662
553663
553664
553665
553666
553667
553668
553669
553670
553671
553672
553673
553674
553675
553676
553677
553678
553679
553680
553681
553682
553683
553684
553685
553686
553687
553688
553689
553690
553691
553692
553693
553694
553695
553696
553697
553698
553699
553700
553701
553702
553703
553704
553705
553706
553707
553708
553709
553710
553711
553712
553713
553714
553715
553716
553717
553718
553719
553720
553721
553722
553723
553724
553725
553726
553727
553728
553729
553730
553731
553732
553733
553734
553735
553736
553737
553738
553739
5537340
5537341
5537342
5537343
5537344
5537345
5537346
5537347
5537348
5537349
5537350
5537351
5537352
5537353
5537354
5537355
5537356
5537357
5537358
5537359
5537360
5537361
5537362
5537363
5537364
5537365
5537366
5537367
5537368
5537369
5537370
5537371
5537372
5537373
5537374
5537375
5537376
5537377
5537378
5537379
5537380
5537381
5537382
5537383
5537384
5537385
5537386
5537387
5537388
5537389
5537390
5537391
5537392
5537393
5537394
5537395
5537396
5537397
5537398
5537399
5537400
5537401
5537402
5537403
5537404
5537405
5537406
5537407
5537408
5537409
5537410
5537411
5537412
5537413
5537414
5537415
5537416
5537417
5537418
5537419
5537420
5537421
5537422
5537423
5537424
5537425
5537426
5537427
5537428
5537429
5537430
5537431
5537432
5537433
5537434
5537435
5537436
5537437
5537438
5537439
5537440
5537441
5537442
5537443
5537444
5537445
5537446
5537447
5537448
5537449
5537450
5537451
5537452
5537453
5537454
5537455
5537456
5537457
5537458
5537459
5537460
5537461
5537462
5537463
5537464
5537465
5537466
5537467<br

の代表的処視野である。本来の倍率×100。[補足図]

【図S1】R.ホミニスは、單一定着マウスの上行結腸に優先的に定着する。(A) R.ホミニスは、A2-183 (R.ホミニス特異的プローブ; FITC)、Eub338 (ユニバーサル16Sプローブ; Cy3) 及びDAPI (核; 青色) を用いてFISHによつて検出した、宿主上皮細胞への細菌の近接した連関で、マウス腸の上行結腸に定着する。A2-183+Eub338及びEub338+DAPIの重ね合わせも示す。赤色チャネルに対するガンマを、標識化された細菌を示すために、Eub338+DAPI重ね合わせにて増加させた。本来の倍率×630。(B) R.ホミニス特異的プライマーを用いるPCRが、定着後糞DNA中で強い陽性シグナルを示し、一方でGF動物の糞は、任意の細菌の存在に対して陰性であった。(C) R.ホミニス/g糞の定着レベルを示しているリアルタイムPCR解析。糞から単離した細菌DNAを、培養液中で増殖したR.ホミニスの公知の標準濃度に対して比較した。同様の細菌レベルが、全ての單一定着マウス中で検出され、およそ 1×10^{10} 細菌/g糞であった。試験したGF動物の糞は、任意の細菌の存在に対して陰性であった。

【図S2】上行結腸において、28日目に上方調節された遺伝子上で実施した遺伝子オントロジー解析。データの遺伝子オントロジー(GO)に基づく機能的通訳を、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)を用いて実施した。有意に濃縮されたGO条件を見つけるために、有意に異なる転写物($P < 0.05$)を、GOカテゴリー「生物学的過程」に配置した。「アクチン重合」(GO:0030041)と、「I-カッパBキナーゼ/NF-カッパBカスケードの負の調節」(GO:0043124)に対するGO生物学的過程が影響を受けた。

【図S3】大腸菌との单一連関後、マウス腸内で示差的に発現した転写物の同定。(A)ある期間にわたる大腸菌及びR.ホミニス定着マウスにおける示差的に発現された遺伝子のアフィメトリックスマイクロアレイ解析。棒グラフは、それぞれ22及び28日後に、より高く、及びより低く発現した遺伝子数を表す。(B)22日目対10日目での、大腸菌定着マウス中、機能的有意差を有して示差的に発現した遺伝子から作製されたヒートマップ。

【図S4】R.ホミニスとの单一連関後、TLR5KOマウス腸内で示差的に発現した転写物の同定。(A)28日目での、R.ホミニス定着TLR5KO(N=3)及び野生型マウス(N=3)の上行結腸中の、示差的に発現した遺伝子から生成したヒートマップ。(B)28日目での、R.ホミニス定着TLR5KO及び野生型マウスの上行結腸中の、示差的に発現した免疫関連遺伝子から生成したヒートマップ。(C)28日目での、R.ホミニス定着TLR5KO及び野生型マウスの回腸中に示差的に発現した遺伝子から生成したヒートマップ。(D)28日目での、R.ホミニス定着TLR5KO及び野生型マウスの回腸中に示差的に発現した免疫関連遺伝子から生成したヒートマップ。

【図S5】上行結腸中、28日目で下方調節された遺伝子上で実施した遺伝子オントロジー解析。「食物に対する応答の負の調節」(GO:0032096)、「食欲の負の調節」(GO:0032099)及び「カテコールアミン分泌の調節」(GO:0050433)などの、食欲調節に関与したGO生物学的過程がもっとも影響を受けた。

【図S6】R.ホミニス定着は、満腹遺伝子及び体重に影響を与える。乾燥体重及び脂質枝肉解析を実施した。(A) R.ホミニス関連マウスの乾燥枝肉重量は、GF動物に比べて有意に重かった。(B) 枝肉脂質解析は、総肥満がまた、14日目における、R.ホミニス処置動物において有意に高かったことを示した。データは平均値±SDで示す。

【図1A】細胞溶解後不溶性の組換えフラジエリンをクローニングするために使用した、クローニングベクターpCR-Blunt II-TOPOの表示。これは、平滑末端PCR産物の高効率DNAクローニングを可能にする。これは、大腸菌内での選択のための、カナマイシンとゼオシン耐性遺伝子をコードし、挿入物に、切断のための多重制限部位が隣接する。

【図2A】細胞溶解後不溶性の組換えフラジエリンをクローニングするために使用した、発現ベクターT7-MAT-Tag-FLAG-の表示。多重クローニング部位(MCS)に、MAT(金属アフィニティータグ)配列及びFLAGペプチド(Asp-Tyr-Lys-Asp-

A s p - A s p - A s p - L y s) 配列が隣接し、さらにアフィニティーカラムによってさらに精製可能な二重タグ化フラジェリンの産生をもたらす。この発現ベクターは、MAT-ORF-FLAG組換えフラジェリンの IPTG 誘導性、高レベル発現のための、pT7/1ac (ファージ T7 1ac オペロン) プロモーター、任意の大腸菌宿主内の基底状態にて、転写を抑制する内部 lacI 遺伝子、及びアンピシリン選択のための AmpR 遺伝子をコードする。

【図 3 A】 pCR-Blunt II-TOPO クローニングベクターでクローニングし、pT7-MAT-Tag-FLAG-2 発現ベクターを通して発現した、組換えフラジェリンの SDS-PAGE 上での可視化。レーンの記述： 1 、タンパク質標準 (kDa) ； 2 、 RH1 。

【図 B1A - B1B】組換えフラジェリンの SDS - 解析を示す図である。 (A) K12 (大腸菌 K12) ； ER (エウバクテリウム・レクタル (Eubacterium rectale) 33656) ； RI1 (ロゼブリア・インテスチナリス F1a1) ； RI2 (ロゼブリア・インテスチナリス F1a2) ； (B) RH1 (ロゼブリア・ホミニス F1a1) ； RH2 (ロゼブリア・ホミニス F1a2) ； RI3 (ロゼブリア・インテスチナリス F1a3) ； RI4 (ロゼブリア・インテスチナリス F1a4) 。

【図 C1 - C4】 フラジェリンヌクレオチド配列を確認する多重配列アラインメント及び受託番号。

【図 D . 2】異なるフラジェリンによる CCL20 遺伝子誘導の比較分析。 HT - 29 と Caco - 2 細胞を、 100ng / mL の濃度にて、単一組換えフラジェリンで 2 時間刺激した。全 RNA を抽出し、遺伝子 CCL20 と - アクチンに対する、リアルタイム定量 PCR 解析にかけた。実験を、 3 つの異なる場合にて三重に実施した。表 D2 は、 HT - 29 にて対応のある t 検定で計算した、各処置間の有意な差を示す。

【図 D . 3】 HT - 29 及び Caco - 2 細胞におけるフラジェリン媒介ケモカイン分泌。表 D3a 、 D3b 、 D3c 及び D3d は、対応のある t 検定にて計算した各処置間の有意な差を示す。

【図 D4】抗 TLR5 特異的抗体での TLR5 の中和。

【図 D5A】組換えフラジェリンで刺激した GM-CSF / IL - 4 誘導樹状細胞の頻度、未刺激 GM-CSF / IL - 4 誘導樹状細胞と比較した倍数変化として示されたデータ。

【図 D5B】組換えフラジェリンで刺激した、 F1t3L 誘導樹状細胞の頻度、未刺激 F1t3L 誘導樹状細胞と比較した倍数変化として示されたデータ。

【図 D6A - B】 R. ホミニスで処置された BOY/J WT 及び TLR5KO マウスの固有層中の、 FoxP3 + Treg のフローサイトメトリー解析。

【発明を実施するための形態】

【 0060 】

フラジェリン

フラジェリンは、細菌鞭毛の主成分であり、ほぼ全ての有鞭毛細菌上で大量に存在する。典型的には、フラジェリンは、細菌の鞭毛内にフィラメントを形成するために、中空シリンドラ内に配置される球状タンパク質である。

【 0061 】

フラジェリン構造タンパク質及び遺伝子配列の多様性は、十分に認識されており、細菌種、地理的及び臨床及び環境起源によって様々である。数千のフラジェリン及び関連フラジェリン遺伝子が存在する。消化管細菌における重要なフラジェリンのいくつかには、 FLA 、 Flc 、 FlgC 、 Flie 、 FlaB 、 MoA 及び Flig のフラジェリンが含まれる。

【 0062 】

種々の型の FLA (Fla) ポリペプチドが存在する。 FlaA1 、 FlaA2 、 FlaA3 、 FlaA4 及び FlaB が FLA ポリペプチドの例である。

【 0063 】

ポリペプチド FlaA1

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「ポリペプチド F 1 a A 1」は、フラジェリンタンパク質 F 1 a A 1 を意味する。そのようなポリペプチドの例としては、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスキナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスの F 1 a A 1 ポリペプチド、配列番号 2 又は配列番号 6 として示されるポリペプチド配列、配列番号 2 若しくは配列番号 6、又はそのバリエント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は 99% 同一性を有するポリペプチドが挙げられる。

【 0 0 6 4 】

配列番号 2 は以下の配列を有する。

MVVQHNLTAMNANRQLGITTGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKASDNAQDGVSLIQVAEGAL
SETHSILQRMNELATQAANDNTTSRRTAVQQEINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGSLCGQAITIDIS
DMSATGLGVSGLVVSSFSAAKGKAMSAAQDAISYVSSMRSKLGALQRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIDTDMAEEMVE
YSKNNILAQAGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ

10

【 0 0 6 5 】

配列番号 2 は、受託番号 N C B I 4 8 2 9 7 . 1 として N C B I に寄託されている。

【 0 0 6 6 】

用語「ポリペプチド F 1 a A 1」及び「F 1 a A 1 ポリペプチド」は、本明細書で互換的に使用される。

【 0 0 6 7 】

用語「F 1 a A 1」、「F 1 a 1」及び「R H 1」は、本明細書で互換的に使用されうる。

20

【 0 0 6 8 】

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 は、配列番号 2 に、又はそのバリエント、ホモログ、断片若しくは誘導体に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は 99% の同一性を有する。一態様において、配列番号 2 (又はその等価物) の 79 ~ 117 位及び 408 ~ 439 位、並びに 411、412、420 位のアミノ酸が重要であると考えられる。一態様において、配列番号 2 (又はその等価物) の 411、412、420 位のアミノ酸はそれぞれ、アラニン (A)、グルタミン (Q) 及びセリン (S) である。

【 0 0 6 9 】

30

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 は、配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチドである。

【 0 0 7 0 】

F 1 a A 1 ポリペプチドは、特定の微生物から誘導されうる。一態様において、F 1 a A 1 ポリペプチドは、フィルミクテスなどの細菌から誘導される。さらなる態様において、F 1 a A 1 ポリペプチドは、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスキナリス又はロゼブリア・イヌリニボランスなどのロゼブリア属種から誘導される。

【 0 0 7 1 】

ロゼブリア・ホミニス及びロゼブリア・インテスキナリスは、ヒト消化管中の細菌の優性群に属し、主要なブチレート産生体でもある、フィルミクテス門内の系統発生学クラスター-XIVa の最近報告された片利共生消化管嫌気性生物である。ロゼブリア・ホミニスの例は、受託番号 N C I M B 1 4 0 2 9 T ロゼブリア・ホミニス A 2 - 1 8 3 T (D S M = 1 6 8 3 9 T) として、Rowett Research Instituteにより、2004 年 10 月 21 日に、N C I M B (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria)、N C I M B Ltd、Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, UK, AB21 9YA に、ブダペスト条約の条項の下、寄託された株である。細菌種の別の例は、Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., & Flint, H. J. (2006) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2437-2441 に記載されている、ロゼブリア・ホミニスである。ロゼブリア・インテスキナリスの例は、受託番号 N C I M B 1 3 8 1 0 ロゼ

40

50

ブリア・インテスチナリス L 1 - 8 2^T (DSM = 1 4 6 1 0^T) として寄託された株である。細菌種の別の例は、Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., & Flint, H. J. (2006) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2437-2441に記載されている、ロゼブリア・ホミニスである。

【0072】

本明細書で使用される用語「ポリペプチド F 1 a A 1 をコードするポリヌクレオチド配列」は、フラジエリンタンパク質 F 1 a A 1 をコードするポリヌクレオチド配列を意味する。そのようなポリヌクレオチド配列の例としては、R. ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス又はロゼブリア・イヌリニボランスの遺伝子 F 1 a A 1 、配列番号 1 又は配列番号 5 として示したポリヌクレオチド配列、配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 1 若しくは配列番号 5 、又はそのバリアント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 97% 、 98% 、又は 99% の同一性を有するポリヌクレオチド配列、配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、又は配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチド、又はそのバリアント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 97% 、 98% 、又は 99% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が挙げられる。
10

【0073】

配列番号 1 は以下の配列を有する。

20

```
ATGGTAGTACAGCACAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTAGGTATCACAAACAGGCACAGGGCTAAGTCCTC  
TGAGAAGTTATCTTCTGGTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCGAGCAGGTCTACGATTCCGAGAAGATGAGAA  
GCCAGGTTAGAGGCTTAAATAAGCTTCTGACAACCGCACAGGATGGGTATCCCTTATTCAAGTAGCTGAGGGTGCATTA  
AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATCACACCTCAGACAG  
AACTGCAGTTCAGCAGGAGATCAACCAGTTAGCATCTGAGATCACCAGAATCGCTTCTACAACACTCAGTTAACACAAATGA  
ACCTGATCGATGGTAACCTCACAGTAAGAAGCTTCAGGTAGGTTCCCTTGCGGACAGGCTATCACAAATCGATATCTCT  
GATATGTCTGCTACAGGTCTTGGCGTTAGCGGATTAGTAGTATCTTCTCTGCAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC  
TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTTCTATGCCTCTAACGCTGGGTGCATTACAGAACAGACTTGGACACACAATCTCCC  
ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTACAGATATGGCTGAAGAGATGGTTGAG  
TACAGCAAGAACACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTCAGGCTAACCGAGTCTACTCAGGGTGTATTATC  
CTTATTACAGTAA
```

30

【0074】

配列番号 1 は、受託番号 D Q 7 8 9 1 4 0 . 1 として N C B I に寄託されている。

【0075】

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 又は配列番号 5 として示したポリヌクレオチド配列、又はそのバリアント、ホモログ、断片若しくは誘導体に対して少なくとも 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 97% 、 98% 又は 99% の同一性を有する。

【0076】

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチド、又は配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチド、若しくはそのバリアント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 97% 、 98% 、又は 99% の同一性を有するポリペプチドをコードする。

40

【0077】

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 は、切斷型 F 1 a A 1 ポリペプチドである。例えば、切斷型ポリペプチドは、配列番号 2 又は配列番号 6 として示したポリペプチドの、少なくとも 20 、 30 、 40 、 50 、 75 、 100 、 125 、 150 、 175 又は 200 アミノ酸を含む。

【0078】

50

理論に束縛されることを望まずに、T L R 5 の認識及び活性化に関するフラジエリンタンパク質の2つの必須領域は、配列番号2のアミノ酸79～117(N-D1ドメイン)と、配列番号2のアミノ酸408～439(C-D1ドメイン)である。理論に束縛されることを望まずに、アミノ酸A411、Q412、S420が重要なアミノ酸である。

【0079】

切断型F1aA1ポリペプチドの例としては、配列番号2のアミノ酸79～117及びアミノ酸408～439を含むポリペプチド、配列番号2のアミノ酸79～117及びアミノ酸408～439と、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の同一性を有するポリペプチド、配列番号2のアミノ酸79～117及びアミノ酸408～439と、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の同一性を有し、411位のアミノ酸(又はそれに等価物)がアラニン(A)であり、及び/又は214位のアミノ酸がグルタミン(Q)及び/又は420位のアミノ酸がセリン(S)である、ポリペプチド、配列番号2のアミノ酸79～439を含むポリペプチド、配列番号2のアミノ酸79～439を含み、411位のアミノ酸(又はそれに等価物)がアラニン(A)である、ポリペプチド、配列番号2のアミノ酸79～439と、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の同一性を有するポリペプチド、及び配列番号2のアミノ酸79～439と、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の同一性を有し、411位のアミノ酸(又はそれへの等価物)がアラニン(A)であり、及び/又は214位のアミノ酸がグルタミン(Q)及び/又は420位のアミノ酸がセリン(S)である、ポリペプチドが挙げられる。
10

【0080】

一態様において、切断型F1aA1ポリペプチド中の配列番号2の411、412、420位のアミノ酸(又はそれへの等価物)が、それぞれアラニン(A)、グルタミン(Q)及びセリン(S)である。

【0081】

一実施形態において、ポリペプチドF1aA1をコードするポリヌクレオチド配列は、切断型F1aA1ポリペプチドをコードする。

【0082】

一実施形態において、ポリペプチドF1aA1は融合ポリペプチドである。例えば、ポリペプチドは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)に融合する。
30

【0083】

口ゼブリア属

口ゼブリア属細菌は、強く嫌気性で、哺乳動物腸に常在する、わずかに曲がった棒状細胞である。この細菌は、ブチレート産生性であり、凹面側に沿って1つの末端にクラスターとして存在する複数の鞭毛を介して活発に運動する(Stanton and Savage 1983)。現在、口ゼブリア属内で、口ゼブリア・セシコラ、口ゼブリア・ファエシス、口ゼブリア・ホミニス、口ゼブリア・インテスキナリス及び口ゼブリア・イヌリニボランスの5つの種が同定され、特徴付けられている(Stanton and Savage 1983、Duncan et al 2006)。
40

【0084】

Stanton and Savage(1983 - Roseburia cecicola gen. nov., sp. nov., a motile, obligately anaerobic bacterium from a mouse cecum. Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33, 618-627.)が、口ゼブリア・セシコラを記述する。

【0085】

Duncan et al. (2006 - Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, 56, 2437-2441)が、口ゼブリア・ファエシスを記述する。

【0086】

Duncan et al. (2006 - Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis
50

sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, 56, 2437-2441) が、ロゼブリア・ホミニスを記述する。

【0087】

Duncan et al. (2002 - Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2002, 52, 1615-1620) が、ロゼブリア・インテスチナリスを記述する。

【0088】

Duncan et al. (2006 - Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, 56, 2437-2441) が、ロゼブリア・イヌリニボランスを記述する。 10

【0089】

ロゼブリア属フラジェリン

本明細書で使用される用語「ロゼブリア属フラジェリン」は、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスなどのロゼブリア属細菌から誘導され、又は誘導可能であるフラジェリンタンパク質を意味する。

【0090】

ロゼブリア属フラジェリンは、f1aA1、f1aA2、f1aA3、f1aA4又はその組合せであってもよい。 20

【0091】

用語「F1aA1」、「F1a1」、「f1aA1」及び「f1a1」は、本明細書で互換的に使用される。

【0092】

用語「F1aA2」、「F1a2」、「f1aA2」及び「f1a2」は、本明細書で互換的に使用される。

【0093】

用語F1aは、f1aA1、f1aA2、f1aA3、f1aA4又はf1iCであってもよいポリペプチドを包含するために本明細書で使用される。 30

【0094】

一実施形態において、本発明は、少なくとも1つのロゼブリア属フラジェリンの使用を包含する。例えば、本発明は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのロゼブリア属フラジェリンの組合せの使用を包含する。

【0095】

一部の実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンの組合せには、少なくとも2つ、3つ、4つ又は少なくとも5つの異なるロゼブリア属種から誘導され、又は誘導可能であるフラジェリンが含まれる。

【0096】

ロゼブリア属フラジェリンの例としては、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスなどのロゼブリア属細菌から誘導され、又は誘導可能であるフラジェリンが挙げられる。一実施形態において、フラジェリンは、ロゼブリア・ホミニスから誘導され、又は誘導可能である。別の実施形態において、フラジェリンは、ロゼブリア・インテスチナリスから誘導され、又は誘導可能である。

【0097】

ロゼブリア属フラジェリンの例としては、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、若しくは配列番号12、又はそのバリエント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%の同一性を有するポリペプチド配列が挙げられる。 50

【 0 0 9 8 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、又は配列番号12として示したポリペプチド配列を有する。

【 0 0 9 9 】

ロゼブリア・ホミニスのフラジェリンの例は、ロゼブリア・ホミニスF1a1及びF1a2である。

【 0 1 0 0 】

ロゼブリア・ホミニスF1a1の例は、配列番号2として示す。ロゼブリア・ホミニスF1a1はまた、RHF1aA1、RH F1a A1、Rh F1a 1、RH F1a 1、RH 1、又はRh 1としても本明細書で引用される。
10

【 0 1 0 1 】

配列番号2は以下の配列を有する。

MVVQHNLTAMNANRQLGITTGAQAKSSEKLSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKASDNAQDGVSILQVAEGAL
SETHSILQRMNELATQAANDNTTSDRTAQQEINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGSLCGQAITIDIS
DMSATGLGVSGLVVSSFSAAKGAMSAAQDAISYVSSMRSKLGALQRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIDTDMAEEMVE
YSKNNILAQAGQSMSLAQANQSTQGVLSLLQ

【 0 1 0 2 】

配列番号2は、受託番号A B I 4 8 2 9 7 . 1としてN C B Iに寄託されている。

【 0 1 0 3 】

ロゼブリア・ホミニスF1a2の例は、配列番号4として示す。ロゼブリア・ホミニスF1a2はまた、RHF1aA2、RH F1a A2、Rh F1a 2、RH F1a 2、Rh 2、又はRH 2としても本明細書で引用される。
20

【 0 1 0 4 】

配列番号4は以下の配列を有する。

MVVNHNMAAICESRQLRYNVKKMEKSSKKLATGYKLNTANDDAAGLQISETMRHHVKGLNKASRNSQDGISMQLTADAAL
QETQDVLRMVELTTQAANDINTDSRRRAIQDELDQLNKEVDRIAYTTFNQQYMLAEGTPQAAPGYYRIQSGALNGQAIDIH
FVNASKESLGTDKVNVSASHAKASESITMVQDAIEQAAWRDEFGSQQERLEHAVRNTDNTSQNTQSAESGIRDTNMM
MEMVLYSTNRILVHASQSILAQYNDDAKSVLEILK

【 0 1 0 5 】

ロゼブリア・インテスチナリスのフラジェリンの例としては、ロゼブリア・インテスチナリスF1a1、F1a2、F1a3、及びF1a4が挙げられる。

【 0 1 0 6 】

ロゼブリア・インテスチナリスF1a1の例は、配列番号6に示す。ロゼブリア・インテスチナリスはまた、RIF1aA1、RIF1a A1、RiF1a 1、RIF1a 1、Ri 1、又はRI 1としても引用される。
30

【 0 1 0 7 】

配列番号6は以下の配列を有する。

MRINYNSAAIANKHLLGIEDNLSASMERLSSGLKINHSKDNPAGMAISNKMKAQIDGLNRASQNASDGISVIQIADGAL
SETTSILQRMRELSQLQAASDATMTPADKEAIQKEITSKDEVDRISTDTEYNSKTLGSDLTRVYTKNATRVDISDHVK
AGQYQLSIDTAATQAGPVTAQNQNYNSTAPVGASGTMISINGKVEIEAADTYAEAFEKIRNAAETGETTVKIEKNGALSFTA
EQYGMSSILEIAFDDKQLANALGFTADGGNSVVEDPENKGSYVYGQIQNGKVIVPSGTDAEVTLTKPSDGTGFGDTATV
KT DGNKITVTDRAFGEMSFLADAGYTGKLDFDVTIGTMALHIGANEDQETRVRIPEVSCSKSLYIDDADVTTVNGAGRGI
TQFDDAISKVSEVRSRLGAYQNRLESTVSSLDFEENMTGAQSRLTDADMASEMTDYTHQNVLNQAAISVLTQANDLPQ
40

【 0 1 0 8 】

ロゼブリア・インテスチナリスF1a2の例は、配列番号8に示す。ロゼブリア・インテスチナリスF1a2は本明細書でまた、RIF1aA2又はRIF1a A2又はRi 2又はRI 2としても引用される。

【 0 1 0 9 】

配列番号8は以下の配列を有する。

MVNVHNMALICESRQLRCNVKNMEKSSKKLATGYKLLGANDDAAGLQISETMRHQTRGLNKASRNSQDGISMQLTADAAL
QETQEVLDRMTDLTTQAANDINTDADRRAIQDEIDQLNQEVDRIAYTTNFNQQYILADGTPQARPGYYMIFTGSLAGQGI
EIKFVNASKESLGVDKVDSHAKATESIAVVQNAIEKAASFRDTFGAQQRLEHALRGTDNTSESTQRAESSRRDTNMN
MEMVQYSTNRILVQASQSILAQYNDDAKYVLEMLKQLQILQ

【 0 1 1 0 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 3 の例は、配列番号 1 0 に示す。ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 3 は本明細書でまた、R i F 1 a 3 又は R I F 1 a 3 又は R i 3 又は R I 3 としても引用される。

【 0 1 1 1 】

配列番号 1 0 は以下の配列を有する。

MVQHNMTAMNANRMLGVTTSAQAKSSEKLSSGYINRAGDDAAGLTISEKMRSQIRGLNKASDNAQDGISLIVQAEGAL
SETHSILQRMNELATQAANDTNTTADRGAIQDEINQLTSEINRISSTTQFNTQNLIDGTFANKNLQVGSICGQRTVSID
SMSAGSLNVSANLVKNTFSAAGEAMSNIQGAISAISTQRSYLGALQNRLEHTISNLDNISENTQSAESRIDTDMAEEM
VTYSKNNILAQAGQSMALAQANQSTQGVLSLLQ

【 0 1 1 2 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 の例は、配列番号 1 2 に示す。ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 は本明細書でまた、R i F 1 a 4 又は R I F 1 a 4 又は R i 4 又は R I 4 としても引用される。

【 0 1 1 3 】

配列番号 1 2 は以下の配列を有する。

MAMVQHNMSAMNANRNILGVTTGMQAKSSEKLSSGYKINRAADDAGLSISEKMRSQIRGLNKASDNAQDGISLIVQTAEG
ALNESHSILQRMRELSVQAANGTETDDDREAVQNEVSQLQEELTRISETTEFTMKLLDGSQSGSTSSTGSGPKFGVVDATLDGALVTSNVKGIVKATAAAATTKAGQETAIWAADGKTLTLNLSKNKVYTQDEIDDLIANAKQEDSSATGAPAEVKVSL
KNGIFNADADTTAGTVTAGGVKAWSDEGTVTGFVGADTSFTANKYGAEFNDTVFKFKFDKAAGKEEVETNTAIEIDGAN
AVTAGEYTIHLAAGKEYTAEDLEDVLKTAGFDVFKLQAGKATDTIDAAIKVSAQRGRMGAIQNRLE
HTISNLDTAAENTQTAESRIDTDMAEEMVEYSKNNILAQAGQSMALAQANQSTQGVLSLLQ

【 0 1 1 4 】

用語「ポリペプチド F 1 a A 1」、「F 1 a A 1 ポリペプチド」、「ポリペプチド F 1 a 1」及び「F 1 a 1 ポリペプチド」は本明細書で互換的に使用される。用語「ポリペプチド F 1 a 2」及び「F 1 a 2 ポリペプチド」は本明細書で互換的に使用される。用語「ポリペプチド F 1 a 3」及び「F 1 a 3 ポリペプチド」は本明細書で互換的に使用される。用語「ポリペプチド F 1 a 4」及び「F 1 a 4 ポリペプチド」は本明細書で互換的に使用される。

【 0 1 1 5 】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリンは、F 1 a 1、F 1 a 2、F 1 a 3 及び F 1 a 4 からなる群から選択される。一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、F 1 a 2、F 1 a 1、F 1 a 4 及びその組合せからなる群から選択される。さらなる実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは F 1 a 2 である。

【 0 1 1 6 】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリンは、ロゼブリア・ホミニス F 1 a 1、ロゼブリア・ホミニス F 1 a 2、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 3、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 からなる群から選択される。一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、ロゼブリア・ホミニス F 1 a 2、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4、及びその組合せからなる群から選択される。さらなる実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、ロゼブリア・ホミニス F 1 a 2、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 及びその組合せから選択される。別の実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 である。

10

20

30

40

50

【0117】

一実施形態において、本発明は、ロゼブリア属フラジエリンをコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド配列の使用を包含している。例えば、本発明は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の組合せの使用を包含している。

【0118】

一実施形態において、本発明は、少なくとも1つのロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の使用を包含している。例えば、本発明は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのロゼブリア属フラジエリンをコードするポリペプチド配列の組合せをコードするポリヌクレオチド配列の使用を包含している。10

【0119】

ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、F1aA1、F1aA2、f1a3、f1a4又はその組合せをコードしてもよい。

【0120】

一部の実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の組合せには、少なくとも2つ、3つ、4つ又は5つの異なるロゼブリア属種から誘導され、又は誘導可能であるフラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0121】

一部の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、少なくとも2つ、3つ、4つ又は5つの異なるロゼブリア属種から誘導され、又は誘導可能であるロゼブリア・ラジエリンの組合せをコードする。20

【0122】

別の実施形態において、本発明は、少なくとも1つのロゼブリア属フラジエリンと、ロゼブリア属フラジエリンをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列の組合せの使用を包含する。

【0123】

ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の例としては、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスなどのロゼブリア属細菌から誘導され、又は誘導可能であるフラジエリンが挙げられる。一実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・ホミニスから誘導され、又は誘導可能であるロゼブリア属フラジエリンをコードする。別の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・インテスチナリスから誘導され、又は誘導可能であるロゼブリア属フラジエリンをコードする。30

【0124】

ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の例としては、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、若しくは配列番号12、又はそのバリアント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも75%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9若しくは配列番号11、又はそのバリアント、ホモログ、断片、若しくは誘導体に対して少なくとも75%同一性を有するポリヌクレオチド配列が挙げられる。40

【0125】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、又は配列番号12として示した配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を有する。

【0126】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、又は配列番号11として示したポリヌクレオチド配列を有する。50

【0127】

ロゼブリア・ホミニスのフラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の例は、ロゼブリア・ホミニスF1a1及びF1a2をコードしているポリヌクレオチド配列である。

【0128】

ロゼブリア・ホミニスF1a1をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号1として示す。

【0129】

配列番号1は以下の配列を有する。

ATGGTAGTACAGCACAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTTAGGTATCACAAACAGGCGCACAGGCTAAGTCCTC
TGAGAAGTTATCTTCTGGTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCAGCAGGCTTACGATTTCCGAGAAGATGAGAA 10
GCCAGGTTAGAGGCTAAATAAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGGTATCCCTTATTCAAGTAGCTGAGGGTGCATTA
AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATACAACCTCAGACAG
AACTGCAGTTCAGCAGGAGATCAACCAGTTAGCATCTGAGATCACCGAGAACGTTCTACAACACTCAGTTAACACAATGA
ACCTGATCGATGGTAACCTCACAAGTAAGAAGCTTCAGGTAGGTTCCCTTGGGACAGGCTATCACAAATCGATATCTCT
GATATGTCTGCTACAGGTCTTGGCGTTAGCGGATTAGTAGTATCTCCTCTGCAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC
TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTCTATGCCTTAAGCTGGGTGCATTACAGAACAGACTTGAGCACACAATCTCCC
ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTATACAGATATGGCTGAAGAGATGGTTGAG
TACAGCAAGAACACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTCAGGCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTATTATC
CTTATTACAGTAA

【0130】

ロゼブリア・ホミニスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号3として示す。

【0131】

配列番号3は以下の配列を有する。

ATGGTGGTTAACATAATGGCGCAATCTGTGAGAGCAGGCAGCTGCGCTATAACGTGAAGAAGATGAAAAATCTTC
CAAAAAGCTTGCACAGGGTACAAGCTGAACACAGCAAATGATGATGCGGCAGGCTTGCAGATATCAGAGACGATGCGGC
ATCATGTGAAAGGGCTGAACAAAGCCTCCCGAACATTACAGGACGGCATCAGTATGCTGCAGACGGCGGATGCAGCGCTC
CAAGAGACGCAGGATGTTCTCGATCGTATGGTGGAGCTGACGACGCAGGCCAATGACATCAACACAGACTCGGATCG
CAGGGCTATTCAAGGATGAGTTGGATCAGCTGAACAAGGAAGTGGACCGCATGCCATACGACGCACTTCAATCAGCAGT
ATATGTTGGCGGAGGGAACGCCGCAGGCCGACCCGGATATTACCGCATACTGCGGGGACTGAACCGACAGGCATA 30
GATATCCATTGTTGAAATGCGAGCAAGGAGAGGCGCTTGGCACAGACAAAGTGAATGTATCTCGCATGCGAAGGCGTGG
ATCCATCACGATGGTCAGGACGCGATTGAACAGGCAGGCTCTGGAGAGACGAGTTGGCAGCCAGCAGGAGCGTCTGG
AACATGCCGTGCGCAATACGGACAACACATCACAAATACGCAGAGTGCAGGAGTCAGGGATCAGAGACACCAACATGAAT
ATGGAGATGGTATTATATTGACCAACCGGATTCTGGTGCATGCATCCCAGAGTATTCTGGCACAGTATAATGATGATGC
AAAATCAGTGCCTGAGATTTGAAATAG

【0132】

ロゼブリア・インテスチナリスのフラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の例は、ロゼブリア・インテスチナリスF1a1、F1a2、F1a3及びF1a4をコードするポリヌクレオチド配列である。

【0133】

ロゼブリア・インテスチナリスF1a1をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号5として示す。

【0134】

配列番号5は以下の配列を有する。

ATCGTGGCGGAGACAATAGAAGGAGAACAGAACGAAATTACAATGTGTCAGCAGCGATTGCGAATAAACATT
ACTTGGAAATTGAGGATAATTAAAGTCATCGATGGAACGGCTTCATCGGACTTAAGATCAACCAATTCCAAGGACAATC
CGCAGGAATGGCTATTCCAACAAGATGAAAGCACAGATTGATGGTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATGGATGGT
ATTCTGTTATTCAAGATCGCAGATGGTGCCTGAGTGAACGACCAGTATTTCAGCGTATGAGAGAACCTTCATTAAAGATGAAGTTG
GGCAGCGAGTGTGCAACAATGACACCCGGGATAAAGAAGCAATCCAGAAAGAACACTTCATTAAAGATGAAGTTG
ACCGTATTCTACAGATAACAGAAAACACTTTAGATGGTCATTAGATAACAGGGTTACACCAAAAT 50

GCAACAAGAGTGGACATTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTCATTGATACTGCAGCTACACAGGCCGG
 ACCGGTAACAGCAAATCAGAATTATAATTCCACAGCACCCTCGGTGCGTCGGAAACAATGAGTATTAAATGGTTCTAAAG
 TAGAGATAGAGGCAGCCGACACCTATCGGGAGGCTTTGAGAAGATCAGAAATGCAGCAGAGACTGGTAAACAAACCGTT
 AAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTCATTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATCTTAGAGATCGCATTNNNTGAT
 GATAAGCAGCTTGCTAATGCACTTGGATTACAGCAGACGGAGGAAACAGTGGTGTAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAG
 CTATGTATACGGACAGATTCAAAGTGATCGTACCTCCGGTACAGATGCCAGTAACGCTCACAAAACCGA
 GTGATGGAACCGGATTGGTACAGCTACGGTAAAACAGATGGAAATAAGATTACGGTACAGACAGAGGCCGGATT
 GAGATGTCATTCTGCTGATGCAGGTTACCGGTAAGCTGGATTTGATGTCACGGATATCGAACGATGGCACTTCA
 TATTGGAGCAAATGAGGATCAGGAAACAAGAGTGCCTTGGAGGTTACAGCTGGATTTGATGTCACGGATATCGAACGATGGCACTTCA
 ACCTGACGACTGTAATGGAGCAGGGAGGTTACACAGTGGTACGATGCCATTCAAAGGTCAGTGAAGTGCCTTC
 AGACTTGGTGCATACCAAGATCGTCTTGAGAGTACGGTATCAAGCCTGGATACGTTGAAGAAAATATGACAGGAGCCCA
 GTCACGACTGACAGATGCCGATATGGCATCGGAAATGACAGATTACACATCAGAATGTATTAAATCAGGCAGCAATCT
 CTGTTTGACACAGGCAAACGATCTGCCACAGCAGGTATTGAGATTGAGTAA
10

【 0 1 3 5 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号 7 として示す。

【 0 1 3 6 】

配列番号 7 は以下の配列を有する。

ATGGTAGTTAACATAATGGCATTGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTGAAGAACATGGAGAAGTCTTC
 AAAAAGCTGGCAACAGTTATAAATTGCTGGAGCAAATGATGATGCCAGGATTACAGATATCAGAAACCATGCGTC
 ATCAGACCAGAGGTCTAACAAAGCATCCAGAAATTGCAAGATGGAATTAGTATGCTGCAGACAGCAGATGCGATT
 CAGGAGACACAGGAAGTGTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGAGCTAATGATATCAATACGGATGCCGATCG
 TCGTCAATTCAAGGATGAAATCGATCAGTTAACATCGGAAGTGGATCGTATTGATATACGACGAATTAAATCAGCAGT
 ATATATTAGCGGATGGAACTCCGCAGGCAAGACCAGGATACTATATGATACAGACAGGAAGTCTTGCAGGACAGGGAAATA
 GAGATTAAGTTGTTAACATGCGAGCAAAGAGAGCTTGGGTGACAAGGTTGATGATCATCGATGCAAAAGCGACAGA
 ATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAGGCAGCTCGTTAGAGATACTTGGGACAACAGGAGCGTTAG
 AACACGCATTGCGTGGAACGGATAACATCAGAAAGTACACAGAGGGCAGAATCAAGTAGACCGCATACCAACATGAAT
 ATGGAGATGGTACAATATTCTACAAACCGTATTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTAGCACAGTACAATGATGATGC
 AAAATATGTGTTGGAAATGTTAAATAG
20

【 0 1 3 7 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 3 をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号 9 として示す。

【 0 1 3 8 】

配列番号 9 は以下の配列を有する。

ATGGTAGTACAGCACAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGGCCTTACAACAAGCGCACAGGCAAATCTTC
 AGAGAAATTATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGCAGGTGATGACGCTGCTGGTTAACATTCTGAGAAGATGAGAA
 GCCAGATCCGTGGATTAAACAAAGCTCTGACAACGCACAGGATGGTATTCCTTAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCATTA
 TCTGAGACACATTCTATCTACAGCTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGATAACAAACTGCTGATAG
 AGGAGCTATTCAAGGATGAGATCAACCAAGTTAACATCTGAGATTAACAGAAATCTTCTACAACACTCAGTTCAAACTCAGA
 ACCTCATCGATGGTACATTGCAAATAAAAACCTCAGGTTGGTCTATCTGAGGACAGAGAATTACTGTTCTATCGAC
 AGTATGTCTGCTGGTAGCTTAAATGATCTGCTAACCTAGTAAAGGTTAACACTTTCAGTGCAGCAGGTGAAGCAATGTC
 CAATATTCAAGGGTCTATTCTGCAATTCTACACAGCGTTCTACTTAGGAGCTTCAAGATCGTCTGGAGCATAACAA
 TCTCCAACCTGGACACATTCTGAGAATACTCAGTCTGTAATCTGATCCGTACAGATATGGCTGAAGAGATG
 GTTACTTACAGCAAGAACATATTCTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTGCTCAGGCTAACCAAGTCAACTCAGGGTGT
 ACTTTCTCTGTTACAGTAA
40

【 0 1 3 9 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 をコードするポリヌクレオチド配列の例を、配列番号 11 として示す。

【 0 1 4 0 】

配列番号 11 は以下の配列を有する。

50

ATGGCAATGGTAGTACAGCACAACATGTCGCAATGAATGCGAACAGAAATTAGGTGTTACAACAGGAATGCAGGCCAA
 ATCATCAGAGAAGTTATCTCCGGTTACAAGATCAACCGTGCAGCAGATGATGCGAGCAGGACTTCTATTCTGAGAAGA
 TGAGAAGCCAGATCCGGTTAAATAAGCATCTGACAATGCACAGGATGGTATCTCTTAATCCAGACCGCTGAGGG
 GCATTAATGAGTCCCACCTCTATTACAGAGAATGAGAGAGTTACCGTACAGGCAGCCAACGGTACAGAGACAGATGA
 CGACCGCGAGGCAGTACAGAACGAGGTTCCAGTTACAGGAAGAGCTGACAAGAAATTCTGAGACAAACAGAGTTCAACA
 CGATGAAGCTGCTGGATGGTCTCAGAGTGGAAAGTACATCTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTGGTGTAGATGCA
 ACATTAGACGGTGACTTGAACATCTAACGTGAAAGGTATTAAAGTAGCAACAGCAGTGCACAAACAACAAAGGCAGG
 TCAGGAGACTGCTATCTGGCTGCTGATGAAAGACATTAACCTTAAATCTTCGAAAAATAAGGTATATACACAGGACG
 AAATTGATGACTTGATGCAAATGAAAACAGGAAGACAGTTCTGCAACGGGTGACCGGCTGAAGTGAAAGTATCTTA
 AAGAATGGTATTTAAATGAGATGCAAGACACAACGCCCCGAACTGTAACAGCCGGTGGTGTGAAGGCAGTATCTGATGA 10
 AGGAACAGTAACGGATTGATTTGTTGGTGCAGATACAATTCACTTACGGCAAATAAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATACTG
 TATTAAATTCAAATTGATAAGGCAGCAGGCAAAGAAGTAGAGACAAATACAGCAATTGAAATTGATGGAGCAAAT
 GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTGATCTTCAGCAGGCAAAGAATACGGCAGAAGATTAGAAGATGTTCTAA
 AACGGCAGGATTGACTTGTAAATTAAAGTGGAAATACACCAGATGAGCCAAATACTTTATTGCAACCAGTGGCG
 CATCAACTGTGACTGATATTACAATGGGTGCTGGCACCGCCGGAGCTGGCTTGGAAAGTACAGATGCTATGTGGGGGCAA
 GCTGGTTATGACAGTTCTTCTGGTCTGGCATTACCTGCAGATTGGTCAAATGAAGGTCAAGGCTGAGTTCTCT
 ATCGATGACATGAGTGCAAGAGCACTTGGCGTAGATGGCAACAAAGTTGATTAAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGC
 AACTGATACCATTGATGCAATCAAGAAAGTATCTGCACAGCGTGGTAGAATGGGTGCGATCCAGAACCGTCTGGAGC
 ACACCATCAGCAACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGACTGCAGAGTCCCCTGATCCGTGATACAGATATGGCAGAA
 GAGATGGTTGAGTACTCCAAGAACACATTCTGCACAGGCAGGTCACTATGCTGCACAGGCGAACCGAGTCTACACA 20
 GGGTGTACTCTCCTTATTACAGTAA

【0141】

一態様において、ポリヌクレオチド配列は、F1a1、F1a2、F1a3及びF1a4からなる群から選択される、ロゼブリア属フラジエリンをコードする。一実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、F1a2、F1a1、F1a4及びその組合せからなる群から選択されるロゼブリア属フラジエリンをコードする。さらなる実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア属フラジエリンF1a2をコードする。

【0142】

一態様において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・ホミニスF1a1をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・ホミニスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a1をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a3をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a4をコードするポリヌクレオチド配列からなる群から選択される。一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・ホミニスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a1をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a4をコードするポリヌクレオチド配列又はその組合せからなる群から選択される。さらなる実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・ホミニスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスキナリスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列及びその組合せからなる群から選択される。別の実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・インテスキナリスF1a2をコードするポリヌクレオチド配列である。 30

【0143】

フラジエリンの治療効果は、機能アッセイによって本発明者らによって評価された。

【0144】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリンは、切断型ロゼブリア属フラジエリンである。例えば、切断型ロゼブリア属フラジエリンは、配列番号2、配列番号4、配列番 40

号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12 として示したポリペプチドの、少なくとも 20、30、40、50、75、100、125、150、175、又は 200 アミノ酸を含む。

【 0 1 4 5 】

一実施形態において、切断型ロゼブリア属フラジェリンは、切断型ロゼブリア・ホミニスのフラジェリン又は切断型ロゼブリア・インテスチナリスのフラジェリンである。

【 0 1 4 6 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列は、切断型 F 1 a A 1、F 1 a 2、F 1 a 3 又は F 1 a 4 をコードする。例えば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 又は配列番号 12 として示したポリペプチドの、少なくとも 20、30、40、50、75、100、125、150、175、又は 200 アミノ酸を含む切断型ロゼブリア属フラジェリンをコードする。10

【 0 1 4 7 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列は、切断型 F 1 a A 1 又は F 1 a 3 をコードする。

【 0 1 4 8 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは融合ポリペプチドである。例えば、ポリペプチドは、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) に融合している。

【 0 1 4 9 】

【表1】

細菌及び株	略語	スクレオチド配列番号	スクレオチド配列	アミノ酸配列番号	アミノ酸配列
ロゼブリア・ホミニスA2-183(fla1)	RhFlaA1 又は RHFla1 又は RhFla1 又は RHFla1 又は Rh1 又はRH1	配列番号1	ATGGTAGTACAGCACAATTCTTACA GCAATGAACGCTAACAGACAGTTA GGTATCACAAACAGGGCACAGGCT AAGTCTTGAGAAGTTATCTTCTG GTACAAAGATCAACCAGGCAGCAG ATGACCGAGCAGGTCTTACGATT CCGAGAAGATGAGAAGCCAGGTTA GAGGCTTAAATAAAGCTTCTGACA ACGCACAGGATGGTGTATCCCTTA TTCAGGGTAGCTGAGGGTGCATTAA GTGAGACACACTCCCATCTTACAGC GTATGAATGAGTTAGCAACTCAGG CAGCAAACGATACCAATACAACCT CAGACAGAAACTGCAGTTAGCAG AGATCAACCAGTTAGCATCTGAGA TCACCAAGATGGCTTCTACAACCTC AGTTCAACACAATGAACCTGATCG ATGGTAACCTCACAAAGTAAGAAC TTCAGGGTAGGTTCCCTTGGGAC AGGCTATCACAAATCGATATCTCTG ATATGGTCTGCTACAGGTCTGGCG TTAGCGGATTAGTAGTATCTTCCCT CTCTGCAAGCTGGTAAGGCAATGTC TGCAGCTCAGGATGCTATCAGCTA CGTATCTCTATGCCCTTAAGCTG GGTCATTACAGAACAGACTTGA CACACAATCTCCCACCTGGACAAAC ATTCTGAGCACACATCTCTGCA GAGTCTCGTATCCGTGATACAGAT ATGGCTGAAGGAGATGGTTGAGTAC	配列番号2	MVVAQHNL TAMMNANRQLGIT TGAQAKSSEKLSGGYKINRA ADDAAGLTISEKMRSSQVRGL NKASDNAQDGVSLLIQVAEG ALSETHSILQRMMELATQAA NDTNNTSDRTAVQQEINQLA SEITRIASTTQFNTMNLIDGN FTSKKLQVGSLCQQAITIDIS DMSATGLGVSSGLVVSSFSAA AGKAMSAQAQDAISYVSSSMR SKLGALQNRLLEHTISHLDNIS EHTSSAESRIRDTDMAEEM VEYSKNNILAQAGQSMSLAQ ANQSTQGVLSLLQ

	RhFlaA2 又 RhFla2 RhFla2 RhFla2 Rh2 又 Rh2	配列番号3 配列番号4	<p>AGCAAGAACACATCCTTGCTCAG GCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAG GCTAACCGTCTACTCAGGGTGTAA TTATCCCTTATTACAGTAA</p> <p>ATGGTGGTTAATCATATAATGGCG GCAAATCTGTGAGAGCAGGCAGCT GCGCTATAACGTGAAGAAAGATGGA AAAATCTTCCAAAAGCTTGCAC AGGGTACAAGCTGAACACAGCAA TGATGATGCCAGGGCTTGCAGAT ATCAGAGACGATGCCGCATCATGT GAAAGGGCTGAACAAAGCCTCC GGAATTCACAGGGACGGCATCAGTA TGCTGCAGACGGGGGATGCAGCG CTCCAAGAGACGGCAGGATGTTCTC GATCGTATGGGGAGCTGACGGAC GCAGGGCAGCCAATGACATCAACAC AGACTCGGATTCGGCAGGGCTATTCA GGATGAGTTGGATCAGCTGAACAA GGAAGTGGACCCGCATCGCCCTATAC GACGCCACTTCAATCAGCAGTATAT GTTGGGGAGGGAACGCCGAG CGGCACCGGGATATTACCGCATAAC AGTCGGGGCACTGAACGGACAG GCCATAGATATCCATTGGTAAATG CGAGCAAGGGAGGCCCTGGCACCA GACAAAGTGAATGTATCTTCGCAT GCCGAAGGGCTCGGAATCCATCAC GATGGTTCAGGACGGGATTGAACA GGCGGGCCTCTGGAGAGCAGGAGT TCGGCAGCCAGCAGGCGTCTG GAACATGCCGTGGCAATACGGAC AACACATCACAAATACGCAGAGT GCGGAGTCAGGGATCAGAGACAC CAACATGAATATGGAGATGGTATT</p>	MVV/NHNMAAICESRQLRYN VKMKEKSSKKLATGYKLNTA NDDAAGLQISETMRHHVKG LNKASRNSQDGISMLQTAD AALQETQDVLDRMVELTTQ AANDINTDSDRRAIQDELDQ LNKEVDRIAYTTHFNQQYML AEGTPQAAPGYYRIQSGAL NGQAIIDHFVNASKESLGTGD KVNVSSHAKASESITMVQDA IEQQAALWRDEFGSQQERLE HAVRNTDNITSQNTQSAESG IRDTNMMNMEMVLYSTNRILV HASQSILAQYNNDDAKSVLEIK
				10
				20
				30
				40

ロゼブリア・イン テスチナリスL1- 82(fla1)	RiFlaA1 又は RiFlaA1 RiFla1 又は RiFla1 又は Ri1 又はR11	配列番号5 配列番号6	<p>ATATTGACCAACCGGATTCTGGT GCATGCATCCAGAGTTCTGGC ACAGTATAATGATGATGCCAAATCA GTGCTTGAGATTTGAATAG</p> <p>ATGCGTGGCGGAGACAATTAGAAG GAGAAACAGAAATGAGAAATTAAATT CAATGTGTCAGCAGCGATTGCCGA TAACATTACTTGAATTGAGGAT AATTAAAGTGCATCGATGGAAACGG CTTCATCGGGACTTAAGATCAAC CATTCAGGACAATTGGGAGGA ATGGCTATTCCAACAAGATGAAA GCACAGATTGATGGTTAAACCGG GCTTCCAGAACATTGCATCGGATG ATTCTGTTATTCAAGATCGCAGAT GTGCCTGAGTGAACAGGACCAGTA TTTACAGCGTATGAGAGAACCTTC CGTCAGGCAGCGGAGTGTGATGCAA CAATGACACCGGCGGATAAAGAAG CAATCCAGAAAGAAATTCACTTCATT AAAAGATGAAGTTGACCGTATTTCT ACAGATACAGGATAAACAGCAA ACACTTTAGATGGTTCAATTAGATA CCAGGGTTACACCAAAATGCCAA CAAGAGTGGGACATTCTGATCATG TGAAAGCAGGACAGTATCAGCTT CCATTGATACTGCAGCTACACAGG CCGGACCGGTAACAGCAAATCAGA ATTATACTCCACAGCACCGGGTGC GTGGCTCCGGAAACAATTGAGTATA ATGGTTCAAAGTAGAGATAGAGG CAGCCGACACCTATGCCGGAGGCTT TTGAGAAGATCAGAAATTGCAGCAG AGACTGGTGAACAAACCGGTTAAGA TTGAAAAGAATGGAGCACCTTCATT</p> <p>MRINYNVSAAIANKHLLGIED NLSASMERLSSGLKINHSKD NPAGMAISNKMKAQIDGLNR ASQNASDGSIVSIQIADGALSE TTSILQRMRMRELSVQAASDAT MTPADKEAIQEITSLKDDEV DRISTDTEYNSTKLDDGSLD TRVYTKNAATRVDISDHVKAG QYQLSIDTAATQAGPVVTANQ NYNSTAPVGASGTMISINGS KVEIEAADTYEAFEKIRNA ETGETTVKIEKNNGALSFTA QYGMSSILEIAFDDKQLANA LGFTADGGNSVVEDPENKG SYVYQQIQNQNGKVIVPSGTD EVTLTKPSDGTGFGDTTATVK TDGNKITVTDRAFGFEMSLFA DAGYTGKLDFDVTDIGTMAL HIGANEQETRVRIPEVSCK SLYDDDAADVTTVNGAGRIT QFDDAISKVSEVRSRSLGAYQ NRLESTVSSLDTFEEMMTGA QSRL TDADMASEMTDYTHQ NVLNQAAISVLTQANDLPQ</p>

	Rifla2 又は Rifla2 又は	配列番号7	MVVNHNMALICESRQLRCN VKNMEKSSKKLATGYKLGA NDAAGLQISETMRHQTRG
TACCGCAGAACAGTACCGGAATGTC AAGCATCTTAGAGATCCGATTNN GATGATAAGCAGCTTGCATAATGCA CTTGGATTACAGCAGACGGAGGA AACAGTGTGTAAGAGATCCAGAG AATAAAGGCAGCTATGTATACCGGA CAGATTCAAAATGGCAAAGTGATC GTACCCCTCCGGTACAGATGCCGAA GTAACCGCTCACAAAACCGAGTGAT GGAACCGGATTGGTGTATACAGCT ACGGTAAAAACAGATGAAAATAAG ATTACGGTTACAGACAGAGGCCGGA TTTGAGATGTCAATTCTGCTGATG CAGGTATACGGGTAAAGCTGGATT TTGATGTCACGGATATCGGAACGA TGGCACCTCATATTGGAGCAAATG AGGATCAGGAAACAAGAGTGCGTA TTCCGGAGGTTCTGCAAGAGGCC TTTACATTGATGATGCAAGACGTGA CGACTGTAAATTGGAGCAGGCAGA GGTATCACACAGTTGACGATGCC ATTCCAAGGTCAAGTGAAGTGCCT TCAAGACTGGTGCATACCAGAAT CGTCTGAGAGTACGGTATCAAGC CTGGATACGGTTGAAGAAAATATG ACAGGAGCCCAGTCAGACTGACA GATGCGGATATGGCATCGGAAATG ACAGATTACACATCAGAAATGTAT TAAATCAGGCAGCAATTCTCTGTTT GACACAGGCAAACGATCTGCCACA GCAGGTATTGAGATTCTGCAGTA A	ATGGTAGTTAACATCAATAATGGCAT TGATCTGTGAGAGTAGACAGTTAC GATGTAATGTGAAGAACATGGAGA	配列番号8	

82(fla2)	Ri2又はR12	<p>AGTCCTCAAAAAAGCTGGCAACAG GTTATAATTGCTTGGGCAATGA TGATGCAGCAGGATTACAGATATC AGAAACCATTGGTCATCAGACAG AGGTCTTAACAAAGCATCCAGAAA TTCGCAAGATGGAATTAGTAGCT GCAGACAGCAGATGCGACATTACA GGAGACACAGGAAGTGGTGGATC GAATGACGGGATCTGACAACACAGG CAGCTAAATGATATCAATACGGATG CGGATCGTCAGTCAAATTCAAGGAAG AAATTCGATCAGTCAAATTCAAGGAAG TGGATCGTATTGCATATAACGACGA ATTTTAACAGCAGTATATTAGC GGATGGAACCTCCGCAAGGCAAGAC CAGGATACTATATGATAACAGACAG GAAGTCTTGGGGACAGGGATA GAGATTAAGTTGTTAATGCGAGC AAAGAGAGCTTGGGTGGACAAG GTTGATGTATCATCGCATGCCAAA GCCGACAGAACTCTATAGCAGTGGTA CAGAAATGCAATTGAAAAGGCAGCT TCGTTTAGAGATACATTGGGCA CAACAGGAGCGGGATAATACATCA TTGGTGGGAACGGGATAATACATCA GAAAGTACACAGAGGGCAGAATCA AGTAGACGGGATACCAACATGAAAT ATGGAGATGGTACAATATTCTACAA ACCGTATTTAGTACAGGCATCTCA GAGTATTTAGCACAGTACAATGAT GATGCAAAATATGTGTTGGAAATG TTAAAATAG</p> <p>LNKASRNSQDGISMLQTAD AALQETQEVLDRTMTDLTTQ AANDINTDADRRRAIQDEIDQL NQEVDRIAYTTNFNQQYILA DGTPQARPGYYMIQTGSLA GQGIEIKFVNASKESLGVDK VDVSSHAKATESIAVVQNAI EKAASFRTDFGAQQERLEH ALRGTDNTSESTQRQAESSR RDTNMNMEMVQYSTMNRILV QASQSILAQYNDDAKYVLEM LKQVLQILQ</p>	<p>MVVQHNMTAMNANRMLGV TTSAQAKSSEKLSSGYRINR AGDDAAGLTISEKMRSQIRG</p>	
	ロゼブリア・イン テスチナリスL1- RiflA3又は RiflA3又は	配列番号9	配列番号10	20
		ATGGTAGTACAGCACAATTGACC GCAATGAAATGCGAACAGAACGTTA GGCGTTACAAACAAGCGCACAGGC		30

82(fla3)	Ri3又はRi3	<pre> AAAATCTTCAGAGAAATTATCCTCT GGTACAGAATCAACCGTGCAGGT GATGACGCTGGTTAACAAATT TCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATC CGTGGATTAAACAAAGCTTCTGAC AACGCCACAGGATGGTATTTCCCTTA ATCCAGGTTGCTGAGGGTGCAATTA TCTGAGACACATTCTATCTTACAGC GTATGAATGAGTTAGCTACTCAGG CTGCTAACGATAACCATACAACTG CTGATAGAGGAGCTATTCAAGGATG AGATCAACCACTGTTAACATCTGAGA TTAACAGAAATCTCTTACAACCTCA GTTCAATACTCAGAACCTCATCGAT GGTACATTGGCAAATAAAACCTTC AGGTTGGTTCTATCTGTGGACAGA GAATTACTGTTCTATCGACAGTAT GTCTGCTGGTAGCTTAATGTATCT GCTAACCTAGTAAAGGTTAACACTT TCAGTGAGCAGGTGAAGCAATGT CCAATATTCAAGGGTGCCTATTCTG CAATTCTACACAGCGTTCTTACTT AGGAGGCTCTCAGAAATCGTCTGGA GCATACAATCTCCAACCTGGACAA CATTTCTGAGAAATACTCAGTCAGT GAATCTCGTATCCGTGATACAGAT ATGGCTGAAGGAGATGGTTACTTAC AGCAAGAACAAATTCTTGCTCAG GCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAG GCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTAA CTTCTCTGTACAGTAA </pre>	<pre> LNKASDNAQDGISLQVAEG ALSETHSILQRMNELATQAA NDTNTTADRGAIQDEINQLT SEINRISSTTQFNTQNLIDGT FANKNLQVGSICGQRITVSID SMSAGSLSNVSANLVKVNTF SAAGEAMSNIQGAISIASTQ RSYLGALQNRLEHTISNLDN SENTQSAECSRIRDTDMAEE MVTYSKNNILAQAGQSMLA QANQSTQQGVLSLLQ </pre>	配列番号12	MAMVVQHNMSAMINANRNL GVTTGMQAKSSEKLISSGYKI NRADDAAAGLSSIEKMRSQLI RGLNKASDNAQDGISLQTA
口ゼブリア・イン テスチナリスL1- 82(fla4)	RiFla4 又は RIFla4 又は Ri4 又はRi4	配列番号11			

	TCTTCCGGTTACAAGATCAACCGT GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTT TCTATTCTGAGAAGATGAGAAGC CAGATCCGGGTTAAATAAAGCA TCTGACAATGCACAGGGATGGTATC TCTTTAACAGACCCGCTGAGGGG GCATTAATGAGTCCCCACTCTATTT TACAGAGAATGAGAGAGTTATCCG TACAGGCAGCCAAACGGGTACAGAGA CAGATGACGACCGGGGAGGCAGTA CAGAACGGAGTTCCCAAGTTACAG GAAGAGGCTGACAAGAAATTCTGAG ACAACAGAGTTCAACACGATGAAG CTGCTGGATGGTTCTCAGAGTGGA AGTACATCTTCACCCGGGTCAAGGT CCGAAAGTTGGTGTGTTAGATGCA ACATTAGACGGTGCACTTGTAA TCTAACGTGAAAGGTATTAAGTA GCAAACAGCAGCTGCCACAAACA AAGGCAGGTCAAGGAGACTGCTATC TGGGCTGCTGATGGAAAAGACATTA ACTTTAAATCTTCGAAAAATAAGG TATATACACAGGACGAAATTGATG ACTTGATCGCAAATGCAAAACAGG AAGACAGTTCTGCAACGGGTGCAC CGGCTGAAGTGAAGGTATCTTAA AGAAATGGTATTTTAAATGCAGATGC AGACACAACTGCCGGAAACTGTAAC AGCCGGTTGGTGTGAAGGCAGTAT CTGATGAAGGAACAGTAACTGGAT TTGTTGGTGCAGATACAATTTCATT TACGGCAAAATAAGTATGGAGCAGA GTTCAATGATACTGTATTAAATT AAATTGATAAGGCAGGCAGGCAA GAAGAAGTAGAGACAAATACAGCA	EGALNESHSILQRMRELCSVQ AANGTETDDDRDREAVQNEVS QLQEELTRISSETTEFNTMKLL DGSQSGSTSSTGSGPKFGV VDATLDGALVTSNVKGIVVA TAATTTKAGQETAIWAADG KTLTLNSKNKVYQTQDEIDDL IANAKQEDSSATGAPAEVKV SLKNGIFNADADTTAGTVTA GGVKAVSDEGTGTVGFVGAD TISFTANKYGAEFNDTIVFKF KFDKAAGKEEVETNTAIEID GANAVTAGEYTHLAAAGKEY TAEDEDVLKTAGFDVDVKL SGNTPDEPNLTFATSGASTV TDITMGAGTTAGAGLGLSTDA MWGQAGYDSVSSGAGITLQ IGANEQQTMSFSIDMSARA LGVDGNKVDLSTQAGAQKA TDTIDAIIKVSQAQRGRMGA IQNRLLEHTISNLDTAENTQT AESRIRDTDMAEEMVEYSK NNILAQAQQSMSLAQANQST QGVLSLLQ	10
			20
			30
			40

ATTGAAATTGATGGAGCAAATGCG
GTAACAGCAGGTGAATAACAATT
CATCTTGCAGCAGGCAAAGAATAT
ACGGCAGAACGATTAGAAGATGTT
CTTAAACCGGCAGGATTGCACTTT
GATGTTAACATTAAAGTGAAATACAC
CAGATGAGCCAAATACCTTATTGCG
AACCAAGTGGCAGTCAACTGTGAC
TGATATTACAATGGGTGCTGGCAC
CGCCGGAGCTGGTCTTGGAAAGTA
CAGATGCTATGTTGGGGCAAGCT
GGTTATGACAGTTATCCTCTGGTG
CTGGCATTACCTTGCAGATTGGTG
CAAATGAAGGTCAAGACCATGAGTT
TCTCTATCGATGACATGAGTGCACAA
GAGGCACTTGGGTAGATGGCAACAA
AAGTTGATTAAAGCACACAGGCTG
GGCACAGAAAGCAACTGATAACCA
TTGATGAGCAATCAAGAAAGTAT
CTGCACAGCGTGGTAGAATGGGT
GGGATCCAGAACCGTCTGGAGCA
CACCATTAGCAACCTTGTATACAGC
AGCAGAGAAATACCCAGACTGCAGA
GTCCCGTATCCGTGATACAGATAT
GGCAGAAGAGATGGTTGAGTACTC
CAAGAACAAACATTCTGCACAGGC
AGGTCAAGTCTATGCTTGCACAGGC
GAACCAAGTCTACACAGGGTACT
CTCCATTACAGTAA

10

20

30

40

50

【0150】

【表2】

表B-本明細書に記載のロゼブリア属フラジエリンの受託番号の要約

細菌及び株	略語	ゲノム又は遺伝子受託番号 (GenBank)	タンパク質受託番号 (NCBI参照配列)
ロゼブリア・ホ ミニス A2- 183(fla1)	RhFlaA1又はRHFlaA1又はRhFla1又はRHFla1又は Rh1又はRH1	DQ789140.1	ABI48297.1
ロゼブリア・ホ ミニス A2- 183(fla2)	RhFlaA2又はRHFlaA2又はRhFla2又はRHFla2又は Rh2又はRH2	DQ789141.1	ABI48298.1
ロゼブリア・イ ンテスチナリス L1-82(fla1)	RiFlaA1又はRiFlaA1 RiFla1又はRiFla1又はRi1又は Ri1	ABYJ02000009.1	EEV02820
ロゼブリア・イ ンテスチナリス L1-82(fla2)	RiFla2又はRiFla2又はRi2又はRi2	ABYJ02000032.1	EEV02466
ロゼブリア・イ ンテスチナリス L1-82(fla3)	RiFla3又はRiFla3又はRi3又はRi3	ABYJ02000104.1	EEV00779
ロゼブリア・イ ンテスチナリス L1-82(fla4)	RiFla4又はRiFla4又はRi4又はRi4	ABYJ02000202.1	EEU99488

【0151】

モジュレーション／調節

用語「モジュレーション」及び「調節」は、本明細書において互換的に使用される。

【0152】

一実施形態において、用語「モジュレーション」は、増加、及び／又は誘導、及び／又は促進、及び／又は活性化を意味する。他の実施形態において、用語「モジュレーション」は、減少、及び／又は軽減、及び／又は阻害を意味する。

【0153】

一実施形態において、用語「調節」は、上方調節を意味する。他の実施形態において、用語「調節」は、下方調節を意味する。

10

【0154】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）F1aポリペプチド、及び／又はロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）F1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌が、組織又は器官の炎症を軽減する。

【0155】

例えば、（腸などの）消化管又はその部分の炎症が軽減される。

20

【0156】

本明細書で使用される用語「炎症」は、発赤、腫れ、痛み、圧痛、熱及び免疫系の過剰反応によって引き起こされた、炎症過程による組織又は器官の乱れた機能の1又は2以上を意味する。

【0157】

対象における炎症の軽減は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前後の、対象中の組織、血清及び／又は便試料中の、炎症誘発性サイトカイン及びケモカインのレベルを決定することによって決定することができる。例えば、IL-1、IL-4、IL5、IL6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-17、IL-21、IL-22、IL23、TNF、IFN、CXCL1、CXCL10、CCL2、CCL20血清、及び便カルプロテクチン、SA1009/S A1008カルシウム結合タンパク質、及び1型インターフェロン、CD163、CD14などのCDマーカー、NF-B、STAT及びMAPキナーゼなどの炎症性転写因子、c-応答性タンパク質（CRP）、赤血球沈殿速度（ESR）、補体タンパク質、血清アルブミン、標的組織及び器官の組織学的評価、疾患活性指標のうちの1又は2以上のレベルをモニタリングすることができる。さらに、ヒトの研究において、生活の質（QoL）質問を、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前後に実施することができる。

30

【0158】

一実施形態において、対象において炎症する組織又は器官の量は、ロゼブリア属フラジ

40

50

エリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前に、対象において炎症する組織又は器官の量と比較した場合、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、又は 50 % 低い。

【 0 1 5 9 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、組織又は器官の上皮細胞による炎症を軽減する。 10

【 0 1 6 0 】

例えば、上皮細胞は、(腸などの)消化管又はその部分の上皮細胞である。

【 0 1 6 1 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、対象における T 細胞の産生を増加させる。 20

【 0 1 6 2 】

一実施形態において、T 細胞は、TLR5 (Toll 様受容体 5) を発現可能な制御性 T 細胞などの制御性 T 細胞 (Treg とも呼ばれる) である。

【 0 1 6 3 】

理論に束縛されることを望まずに、Treg 数の増加が、炎症、自己免疫及びアレルギー／アトピー状態を駆動する Th1、Th17 及び Th2 などの他のエフェクター T 細胞 (また T efffs とも呼ばれる) の効果に対抗するであろう。したがって、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの) F 1 a ポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの) F 1 a ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌のその性質は、Teff / Treg 細胞バランスが欠損する多くの疾患、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎に取り組むために活用可能である。 40

【 0 1 6 4 】

一実施形態において、対象における T 細胞の産生は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における T 細胞の数と比較した場合、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 % 又は 50 % 多い T 細胞、又は 50

100%を超えて多いT細胞が存在するように、増加される。

【0165】

本明細書で使用される用語「免疫系」は、適応免疫系及び／又は自然免疫系を意味しる。

【0166】

一態様において、本発明は、対象の適応免疫系を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌に関する。 10

【0167】

本明細書で使用される場合、用語「適応免疫系」は、「特異的免疫系」としても公知であり、病原体増殖を排除又は阻止する、高度に特殊化した全身の細胞及び過程を意味する。適応免疫応答は、脊椎動物免疫系に、(免疫を生じるために)特定の病原体を認識し、記憶し、病原体に遭遇するたびに、より強力な攻撃を開始する能力を付与する。

【0168】

本明細書で使用される場合、「適応免疫系を調節すること」は、適応免疫系の活性を誘導すること、及び／又は活性のベースラインレベルに対して、活性のレベルを増加させることによって、免疫ホメオスタシス機構を促進することを意味する。好ましくは、適応免疫系は、免疫調節に対してモジュレートされ(免疫活性化には向かわず、したがって炎症を減少させる)。 20

【0169】

適応免疫系に関連する、とりわけT細胞の機能に関係する欠損及び障害は、多くの炎症及び自己免疫疾患に関連する。Th1、Th2及びTh17に関連するT細胞応答は、アトピー性、炎症性及び自己免疫疾患に関連する。制御性T細胞(Treg)集団を改善又は増加させる治療が、過剰なTh1、Th2及びTh17細胞応答によって駆動された疾患を制御する上で重要である。 30

【0170】

本発明の別の態様は、対象の自然免疫系を調節するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌に関する。

【0171】

本明細書で使用される場合、用語「自然免疫系」は、非特異的免疫系としても公知であり、他の生物による感染に対する即時防御を非特異的に宿主に付与する細胞及び機構を含む。これは、自然系の細胞が、包括的に病原体を認識し、それに応答するが、適応免疫系とは異なり、宿主に持続性又は保護免疫を付与しないことを意味する。 40

【0172】

本明細書で使用される場合、用語「自然免疫系を調節すること」は、自然免疫系の活性を誘導すること、及び／又は免疫ホメオスタシスを促進するように、活性のベースラインレベルに対する活性のレベルを増加させることを意味する。

【0173】

上皮バリア、デフェンシン、ケモカイン及びサイトカインなどの自然免疫ペプチドの欠損、又は不完全なTLRシグナリングのいずれかに起因する、自然免疫機能の欠損又は異常調節は、腸を含む種々の体器官において、炎症性疾患のリスクの増加と関連する。その 50

ような疾患には、炎症性腸疾患が含まれる。

【0174】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は免疫寛容を修復する。

【0175】

本明細書で使用される場合、用語「免疫寛容」は、免疫系が自己抗原などの抗原を攻撃しない過程を意味する。

【0176】

本明細書で使用される場合、用語「免疫寛容を修復すること」は、抗原に対する免疫寛容のレベルが、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、より高くなるような、対象における1又は2以上の(自己抗原などの)抗原に対する免疫寛容の修復を意味する。

【0177】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、樹状細胞及び／又は上皮細胞を活性化する。

【0178】

本明細書で使用される場合、用語「樹状細胞を活性化する」は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における(樹状細胞などの)細胞による、1又は2以上の(I-A/I-E細胞マーカー、CD80及びCD86及びCD40などの)細胞マーカーの上方調節、及び／又は1又は2以上の(IL-10及びTGFなどの)サイトカインの産生の増加を意味する。

【0179】

本明細書で使用される用語「I-A/I-E」は、MHCクラスIIの細胞マーカーを意味する。

【0180】

CD40は、免疫において必須の役割を有し、共刺激分子の最も十分に特徴付けられたものの1つである。この受容体、腫瘍壊死因子受容体ファミリーの一メンバーは、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞によって発現される。CD40は、そのリガンドCD40Lに結合し、このリガンドは、炎症状態の下、T細胞及び他の非免疫細胞上に

10

20

30

40

50

一過性に発現する。

【0181】

CD40Lは、T細胞マーカーの一例である。CD3、CD4、CD25、FoxP3、CTLA-4、Ly6g及びCD11bが、さらなるT細胞マーカーの例である。

【0182】

CD80及びCD86は、(樹状細胞などの)抗原提示細胞上に発現し、T細胞応答の発達及び共刺激に必要である。T細胞上のCD28及びCTLA-4分子は、CD80及びCD86共刺激抗原に対する受容体として働く。

【0183】

CD3、CD4、CD25、FoxP3、CTLA-4、Ly6g及びCD11bが、10結腸制御性T細胞のマーカーの例である。

【0184】

理論に束縛されること望まずに、Ly6g(例えば、Ly6g6c及びLy6g6e)の枯渇が、腸及び気道の両方で、感染リスクを増加させ、好中球減少症などの疾患に関連する。したがって、一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、好中球減少症を処置するのに使用される。20

【0185】

本発明の別の態様は、対象における免疫ホメオスタシスを維持するのに使用するための、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌に関する。本明細書で使用される場合、「免疫ホメオスタシスを維持すること」は、変化している状態に応答して、経口寛容又は免疫安定性を維持するための、体の免疫系の自己調節を意味する。経口寛容は、健康な腸における、食物及び片利共生細菌に対する通常の免疫応答を意味する。これらは、セリック病、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患において欠損する。したがって、一態様において、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、セリック病、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患を処置するのに使用される。30

【0186】

一実施形態において、対象の細胞(複数可)上の細胞マーカーの数が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞(複数可)上の細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%40

、40%又は50%多く、細胞(複数可)上の細胞マーカー、又は細胞(複数可)上の100%を超えて多く、細胞(複数可)上の細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに又はあるいは、細胞マーカーを有する対象における細胞の数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における細胞マーカーを有する細胞の数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【0187】

一態様において、細胞はT細胞である。

【0188】

別の態様において、細胞は、(腸の細胞などの)消化管の細胞である。

【0189】

さらなる態様において、細胞は、結腸及び/又は小腸制御性T細胞であり、CD4又はCD8陽性のいずれかであってもよい。

【0190】

一態様において、細胞マーカーは、T細胞マーカーである。別の態様において、細胞マーカーは、結腸T細胞マーカーである。

【0191】

タイプI-A/I-Eであるマーカーは、細胞マーカーの例である。CD40は、樹状細胞上に両方見られる細胞マーカーの別の例である。

【0192】

一実施形態において、対象におけるサイトカインのレベルは、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるサイトカインレベルと比較した場合、サイトカインレベルが、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%高く、又は100%を超えて高く、増加する。

【0193】

樹状細胞の例としては、骨髄樹状細胞及び腸粘膜樹状細胞が挙げられる。

【0194】

本明細書で使用される用語「上皮細胞を活性化する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における発現レベルと比較した場合の、対象における上皮細胞による1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現における増加を意味する。

【0195】

本明細書で使用される用語「炎症誘発性遺伝子」は、発現すると、炎症を促進する遺伝子を意味する。炎症誘発性遺伝子の例としては、IL1-、IL4、IL5、IL6、

10

20

30

40

50

I L 8、I L 12、I L 13、I L 17、I L 21、I L 22、I L 23、I L 27、I F N、C C L 2、C C L 3、C C L 5、C C L 20、C X C L 5、C X C L 10、C X C L 12、C X C L 13及びTNF-_αをコードする遺伝子が挙げられるが、これらに制限はされない。

【0196】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、サイトカインの産生を上方調節する。

10

【0197】

本明細書で使用される用語「サイトカインの産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるサイトカインのレベルと比較した、対象におけるサイトカインのレベルの増加を意味する。

20

【0198】

一実施形態において、対象におけるサイトカインのレベルは、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、サイトカインレベルが、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%高い、又は100%を超えて高いように、増加する。

30

【0199】

別の実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、IL-10及び／又はTGF-_βの産生を上方調節する。

40

【0200】

本明細書で使用される用語「IL-10の産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるIL-10のレベルと比較した、対象におけるIL-10のレベルの増加を意味する。

【0201】

50

一実施形態において、対象におけるIL-10のレベルは、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%高い、又は100%を超えて高いように、増加する。

【0202】

10

一部の態様において、IL-10は、特定のCD103+サブセット中、骨髓由来樹状細胞及び腸粘膜樹状細胞などの樹状細胞によって產生される。

【0203】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチド、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)F1aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、対象の1又は2以上の細胞における、免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの產生を上方調節する。

20

【0204】

免疫応答及び抗原認識に関する細胞表面マーカーの例としては、CD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD103、CD80、CD86、CD83及び／又はSiglec-H及び／又は種同等物が挙げられる。

【0205】

細胞表面マーカー(例えば、CD317/BST-2)が、異なる種において異なる名前で呼ばれてもよく、又は細胞表面マーカーは、特定の種の細胞においてまだ同定されていなくてもよい。本明細書で使用される用語「種同等物」は、これらの細胞表面マーカーを包含する。

30

【0206】

本明細書で使用される用語「CD40の產生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD40のレベルと比較した、対象におけるCD40のレベルの増加を意味する。例えば、細胞マーカーCD40を有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上のCD40マーカーの数が増加する。

40

【0207】

一実施形態において、対象の細胞(複数可)上のCD40細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞(複数可)上の細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%

50

、30%、40%又は50%多く、細胞(複数可)上の細胞マーカー、又は100%を超えて多く、細胞(複数可)上の細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらには、又はあるいは、細胞マーカーCD40を有する対象における細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における細胞マーカーを有する細胞数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【0208】

本明細書で使用される用語「I-A/I-Eの産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるI-A/I-Eのレベルと比較した、対象におけるI-A/I-Eのレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上のI-A/I-E細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び/又は細胞上のI-A/I-E細胞マーカーの数が増加する。

【0209】

一実施形態において、対象の細胞(複数可)上のI-A/I-E細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞(複数可)上のI-A/I-E細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞(複数可)上のI-A/I-E細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞(複数可)上のI-A/I-E細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、I-A/I-E細胞マーカーを有する対象における細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるI-A/I-E細胞マーカーを有する細胞数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、I-A/I-E細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、I-A/I-E細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【0210】

本明細書で使用される用語「CD317/BST-2の産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又はポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又はポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、

10

20

30

40

50

及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD317/BST-2のレベルと比較した、対象におけるCD317/BST-2のレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上のCD317/BST-2細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上のCD317/BST-2細胞マーカーの数が増加する。

【0211】

一実施形態において、対象の細胞（複数可）上のCD317/BST-2細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又はポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞（複数可）上のCD317/BST-2細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞（複数可）上のCD317/BST-2細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上のCD317/BST-2細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、CD317/BST-2細胞マーカーを有する対象における細胞数は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記F1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD317/BST-2細胞マーカーを有する細胞数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、CD317/BST-2細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、CD317/BST-2細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【0212】

本明細書で使用される用語「CD103の産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又はポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD103のレベルと比較した、対象におけるCD103のレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上のCD103細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上のCD103細胞マーカーの数が増加する。

【0213】

一実施形態において、対象の細胞（複数可）上のCD103細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞（複数可）上のCD103細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞（複数可）上のCD103細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上のCD103細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、CD103細胞マーカーを有する対象における細胞数は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1

10

20

30

40

50

a A 1 又は F 1 a A 2 などの) ポリペプチド F 1 a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び / 又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの) 前記 F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における C D 1 0 3 細胞マーカーを有する細胞数と比較した場合、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 多く、C D 1 0 3 細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【 0 2 1 4 】

10

本明細書で使用される用語「 C D 8 0 の產生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び / 又はポリペプチド F 1 a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び / 又はポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における C D 8 0 のレベルと比較した、対象における C D 8 0 のレベルの増加を意味する。例えば、1 又は 2 以上の C D 8 0 細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び / 又は細胞上の C D 8 0 細胞マーカーの数が増加する。

【 0 2 1 5 】

20

一実施形態において、対象の細胞(複数可)上の C D 8 0 細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び / 又はポリペプチド F 1 a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び / 又は前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞(複数可)上の C D 8 0 細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 多く、細胞(複数可)上の C D 8 0 細胞マーカーが、又は 1 0 0 % を超えて多く、細胞(複数可)上の C D 8 0 細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、C D 8 0 細胞マーカーを有する対象内の細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び / 又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの) ポリペプチド F 1 a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び / 又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの) 前記 F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における C D 8 0 細胞マーカーを有する細胞数と比較した場合、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 多く、C D 8 0 細胞マーカーを有する細胞が、又は 1 0 0 % を超えて多く、C D 8 0 細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

【 0 2 1 6 】

40

本明細書で使用される用語「 C D 8 6 の產生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び / 又はポリペプチド F 1 a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び / 又はポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象内の C D 8 6 のレベルと比較した、対象内の C D 8 6 のレベルの増加を意味する。例えば、1 又は 2 以上の C D 8 6 細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び / 又は細胞上の C D 8 6 細胞マーカーの数が増加する。

50

【0217】

一実施形態において、対象の細胞（複数可）上のCD86細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞（複数可）上のCD86細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞（複数可）上のCD86細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上のCD86細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、CD86細胞マーカーを有する対象内の細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD86細胞マーカーを有する細胞の数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、CD86細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、CD86細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

10

20

【0218】

本明細書で使用される用語「CD83の產生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又はポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD83のレベルと比較した、対象におけるCD83のレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上のCD83細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上のCD83細胞マーカーの数が増加する。

30

【0219】

一実施形態において、対象の細胞（複数可）上のCD83細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞（複数可）上のCD83細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞（複数可）上のCD83細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上のCD83細胞マーカーが存在するように、上方調節される、さらに、又はあるいは、CD83細胞マーカーを有する対象内の細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるCD83細胞マーカーを有する細胞の数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、CD83細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、CD83細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

40

50

【0220】

本明細書で使用される用語「*Siglec-H*の産生を上方調節する」は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象内の*Siglec-H*のレベルと比較した、対象内*Siglec-H*のレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上*Siglec-H*細胞マーカーを有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上の*Siglec-H*細胞マーカーの数が増加する。

10

【0221】

一実施形態において、対象の細胞（複数可）上の*Siglec-H*細胞マーカーの数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象の細胞（複数可）上の*Siglec-H*細胞マーカーの数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、細胞（複数可）上の*Siglec-H*細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上の*Siglec-H*細胞マーカーが存在するように、上方調節される。さらに、又はあるいは、*Siglec-H*細胞マーカーを有する対象内の細胞数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又はポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における*Siglec-H*細胞マーカーを有する細胞の数と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多く、*Siglec-H*細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、*Siglec-H*細胞マーカーを有する細胞が存在するように、増加する。

20

【0222】

一部の態様において、CD40、I-A/I-E、CD317/BST-2、CD80、CD86、CD83及び／又は*Siglec-H*の産生は、（FLT3Lにより拡大した寛容性CD103⁺樹状細胞などの）樹状細胞によってである。

30

【0223】

一実施形態において、対象の1又は2以上の細胞中の、1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現が下方調節される。

【0224】

40

一実施形態において、1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現レベルは、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%少ないように減少する。

【0225】

50

I型IFN遺伝子の例としては、IFN-1、IFN-3、Ifi202b、Ifi203、IFI44、IFTI、MXI、OASI、OAS2、OAS3、OASL、Irif3及びIrif4が挙げられるが、これらに制限はされない。

【0226】

一実施形態において、対象の1又は2以上の細胞中の、1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現が下方調節される。

【0227】

一実施形態において、1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現レベルは、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%少ないように減少する。
10

【0228】

本明細書で使用される用語「腸内微生物叢」は、宿主動物の消化管に生息する微生物を意味する。これらの微生物は、広く様々な、代謝、構造、保護及び他の有利な機能を果たす。
20

【0229】

本明細書で使用される場合、用語「腸内微生物叢を改善すること」は、対象(例えば宿主)の腸内に存在する微生物の数及び/又は型を増加させること、及び/又はそれらの代謝、構造、保護及び他の有利な機能に関して、前記微生物の活性を増加させることを意味する。例えば、クロストリジウムクラスターXIVa細菌の数(すなわちレベル)が増加し、大腸菌の数が減少し、そのような腸内微生物叢における改善が、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与されると、炎症性腸疾患(IBD)の対象において起こりうる。
30

【0230】

一実施形態において、対象(例えば宿主)の腸に存在する微生物の数は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、微生物の数が、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%多い、又は100%を超えて多いように増加する。さらに、又はあるいは、対象(例えば宿主)の腸に存在する微生物の型は、ロゼブリア属フラジエリン、及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び/又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び/又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象における型と比較
40
50

した場合、少なくとも 5 %、10 % 又は 15 % 多く、微生物の型が存在するように増加する。

【0231】

本明細書で使用される用語「食欲を調節すること」は、食物を食する対象の望みをモジュレート（すなわち増加又は減少）するための機能を意味する。

【0232】

一実施形態において、対象における食欲は、刺激（すなわち増加）される。

【0233】

理論に束縛されることを望まずに、ロゼブリア属フラジェリン、及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) 前記ポリペプチド F1a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌は、(満腹ホルモンをコードする遺伝子などの) 食欲を抑制することに関係する遺伝子の発現を下方調節することによって、対象の食欲における刺激効果を發揮する。Ag t、Cartpt、Cck、Cxcl12 及び Gcg は、食欲を調節することに関係する遺伝子の例であり、1 又は 2 以上のこれらの遺伝子の下方調節は、食欲の抑制に関係する。

【0234】

Cck 及び Gcg は、満腹ホルモンの例である。

【0235】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリン、及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) 前記ポリペプチド F1a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌は、ロゼブリア属フラジェリン、及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) 前記ポリペプチド F1a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は (細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象と比較した場合、対象が少なくとも 5 %、10 % 又は 15 % 多くの食物を摂取するように、対象の食欲を刺激する。さらに、又はあるいは、ロゼブリア属フラジェリン、及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌は、ロゼブリア属フラジェリン、及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は (F1aA1 又は F1aA2 などの) ポリペプチド F1a をコードするポリヌクレオチド配列、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び / 又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び / 又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び / 又は (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の対象と比較した場合、投与の 1 カ月後に、対象の体重が、少なくとも 2 %、5 % 又は 10 % 多いように、対象における食欲を刺激する。

10

20

30

40

50

【0236】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、対象の血中の、コレシストキニン(C c k , cholecystokinin) 及び／又はグルカゴン(G c g , glucagon) のレベルを減少させる。

【0237】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の対象と比較した場合、少なくとも 5 %、 10 %、 15 % 又は 20 % まで対象の血中の、コレシストキニン(C c k) 及び／又はグルカゴン(G c g) のレベルを減少させる。

【0238】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、対象の 1 又は 2 以上の細胞中の、コレシストキニン(C c k) をコードする遺伝子の発現、及び／又はグルカゴン(G c g) をコードする遺伝子の発現を下方調節する。

【0239】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)前記ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a 、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などの)ポリペプチド F 1 a をコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の対象における発現レベルと比較した場合、発現レベルが、少なくとも 5 %、 10 %、 15 % 又は 20 % 少ないように、コレシストキニン(C c k) をコードする遺伝

10

20

30

40

50

子の発現を減少させる。

【0240】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の対象における発現レベルと比較した場合、発現レベルが、少なくとも5%、10%、15%又は20%少ないように、グルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を減少させる。
10

【0241】

本明細書で使用される用語「消化管の健康状態を改善すること」は、消化管又はその部分における炎症レベルを減少させること、及び／又は腸内微生物叢を改善することを意味する。
20

【0242】

一実施形態において、消化管における炎症レベルは、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌が対象に投与される前の対象の消化管における炎症レベルと比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%低い。
30

【0243】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌は、T1r5、T1r1、Vnn1、Defb37、Pla2g、Muc16、Itln、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3、Magi3、Marve1d3、Mpp7、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igsf8及びTcfe2aから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を調節する。これらの遺伝子の多くは、腸バリア遺伝子であり、抗細菌性であり、したがって腸内病原体の浸潤性を減少させ、生存能力のある病原体の数も減少させる。
40

【0244】

一実施形態において、対象の1又は2以上の細胞中の、TLR関連遺伝子(例えば、T1r5、T1r1及びVnn1)、抗細菌ペプチドをコードする遺伝子(例えば、Defb37、Pla2g、Muc16及びItln)、腸バリア機能遺伝子(例えばSprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3及びMagi3)、自然免疫遺伝子(例えばDefcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igsf8及びTcfe2a)からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子の発現が上方調節される。
50

【0245】

一実施形態において、T L R 関連遺伝子（例えば、Tlr5、Tlr1及びVnn1）、抗細菌ペプチドをコードする遺伝子（例えば、Defb37、Pla2g、Muc16及びItln）、腸バリア機能遺伝子（例えば、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3及びMagi3）、自然免疫遺伝子（例えばDefcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igssf8及びTcfe2a）からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子の発現が、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較する場合、レベルが少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%高い、又は100%を超えて高いように、増加する。
。

【0246】

一実施形態において、Tlr5、Tlr1、Vnn1、Defb37、Pla2g、Muc16、Itln、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3、Magi3、Marveld3、Mpp7、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igssf8及びTcfe2aからなる群から選択される1又は2以上の遺伝子の発現が、対象の1又は2以上の細胞において上方調節される。
。

【0247】

一実施形態において、Tlr5、Tlr1、Vnn1、Defb37、Pla2g、Muc16、Itln、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3、Magi3、Marveld3、Mpp7、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igssf8及びTcfe2aからなる群から選択される1又は2以上の遺伝子の発現レベルが、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較する場合、レベルが少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%高い、又は100%を超えて高いように、増加する。
。

【0248】

一実施形態において、対象の1又は2以上の細胞における、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ及びホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ[ATP]をコードする遺伝子からなる群から選択される1又は2以上の遺伝子の発現がモジュレートされる。
。

【0249】

一実施形態において、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ及びホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ[ATP]をコードする遺伝子から選択される1又は2以上の遺伝子の発現レベルが、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスな
。

どの) ロゼブリア属菌が対象に投与される前の、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 % 又は 50 % 高い又は低いように、モジュレートされる。

【 0 2 5 0 】

さらなる態様において、本発明は、F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などのフラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）の発現が、形質転換前の等価の微生物と比較して増強される（ファーミキューティス、例えば R . ホミニス又は R . インテスキナリスなどのロゼブリア属などの）形質転換された微生物、及び本明細書で記述したような種々の治療的及び栄養学的使用のためのそれらの使用に関する。例えば、形質転換された微生物は、その微生物が、F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などのフラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）をコードする遺伝子の発現を上方調節可能であるように、（プロモーターなどの）ヌクレオチド配列で形質転換されてもよい。別の例において、形質転換された微生物は、その微生物が、F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などのフラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）をコードする遺伝子を過剰発現可能であるように、（プロモーターなどの）調節配列に作動可能に連結した F 1 a A 1 又は F 1 a A 2 などのフラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターで形質転換されてもよい。10

【 0 2 5 1 】

本明細書で使用される、用語「発現ベクター」は、宿主において、コード配列の発現に影響を与えることが可能な、1 又は 2 以上の好適な制御配列（複数可）に作動可能に連結する、DNA コード配列（例えば遺伝子配列）を含む DNA 構築物を意味する。そのような制御配列には、転写をもたらすためのプロモーター、そのような転写を制御するための任意のオペレータ配列、好適な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び翻訳の終結を制御する配列が含まれる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、又は単に可能性あるゲノム挿入物であってもよい。好適な宿主に形質転換されると、ベクターは、複製され、宿主ゲノムと独立して機能するか、又はいくつかの例において、そのゲノム自体に統合される。プラスミドは、発現ベクターの最も一般的に使用される形態である。しかしながら、本記述は、等価の機能を果たす、当技術分野で公知の、又は公知になる発現ベクターの他の形態も含むことを意図する。20

【 0 2 5 2 】

用語「作動可能に連結する」は、要素が、機能的に関係することを可能にする配置である、並置を意味する。例えば、プロモーターは、コード配列の転写を制御する場合に、コード配列に作動可能に連結する。30

【 0 2 5 3 】

組織

一実施形態において、組織又は器官は、消化管又はその部分（例えば食道、胃又は小腸又は大腸などの腸及び結腸）、又は（鼻腔及び肺などの）別の粘膜部位である。

【 0 2 5 4 】

一実施形態において、組織又は器官は、消化管又はその部分である。

【 0 2 5 5 】

消化管の部分の例としては、食道、胃及び（小腸（例えば十二指腸、空腸及び回腸）及び / 又は大腸（例えば盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸及び S 字結腸などの）腸が挙げられる。40

【 0 2 5 6 】

対象

一実施形態において、対象は单胃動物である。

【 0 2 5 7 】

单胃動物の例としては、家禽、ヒト、ラット、ブタ、イヌ、ネコ、ウマ及びウサギが挙げられる。

【 0 2 5 8 】

50

別の実施形態において、対象は、単胃哺乳動物などの哺乳動物である。

【0259】

単胃哺乳動物の例としては、（ヒト、ラット及びブタなどの）雑食性動物、（イヌ及びネコなどの）肉食性動物、及び（ウマ及びウサギなどの）草食性動物が挙げられる。

【0260】

一実施形態において、対象はヒトである。

【0261】

典型的に、T L R 5 は、前記対象の細胞において発現されうる。

【0262】

障害

10

ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリアを、対象における障害を処置することにおいて使用してよく、そこで前記障害は、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である。

【0263】

一実施形態において、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害は、前記対象の消化管、又はその部分に影響を与える。

20

【0264】

一実施形態において、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害は、対象の粘膜部位に影響を与える。粘膜部位の例としては、消化管又はその部分（例えば食道、胃又は小腸又は大腸及び結腸などの腸）、鼻腔及び肺が挙げられる。

【0265】

一実施形態において、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害は、リウマチ様関節炎、乾癬、多発性硬化症、I型糖尿病、セリック病、アトピー性皮膚炎、鼻炎、過敏性腸症候群（IBS, irritable bowel syndrome）、大腸炎、炎症性腸障害（IBD）、潰瘍性大腸炎、回腸囊炎、クローン病、機能性消化不良、アトピー性疾患、壞死性腸炎及びこれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0266】

一態様において、炎症性障害は大腸炎である。さらなる態様において、炎症性疾患はクローン病、潰瘍性大腸炎又は回腸囊炎である。

【0267】

一態様において、炎症性障害及び／又は自己免疫性障害は、腸に影響を与える。

【0268】

一態様において、腸障害はIBSである。IBSの正確な病因は、解明されるべきまま残っている。最近の研究により、IBS患者における腸内微生物叢における粘膜炎症と変更と、腸感染との疾患相関を記述された。

40

【0269】

さらなる態様において、腸障害はクローン病である。

【0270】

一態様において、障害は自己免疫性障害である。

【0271】

一態様において、自己免疫性障害は、潰瘍性大腸炎、回腸囊炎、リウマチ様関節炎、乾癬、多発性硬化症、I型糖尿病、（セリック病を含む）アレルギー、アトピー性皮膚炎及び鼻炎からなる群から選択される。

【0272】

特に、免疫寛容を回復することにおけるその機能のために、自己免疫性疾患、リウマチ

50

様関節炎、乾癬、多発性硬化症、I型糖尿病が、特に関連する。

【0273】

本明細書で使用される用語「医薬」は、ヒト及び獣医学医薬品における、ヒト及び動物利用両方に対する医薬を包含する。加えて、本明細書で使用される用語「医薬」は、治療的及び／又は有益な効果を提供する、任意の物質を意味する。本明細書で使用される用語「医薬」は、承認が必要な物質に制限される必要はなく、化粧品、栄養補給食品、（例えば餌及び飲料を含む）食物、プロバイオティクス培養、栄養補助剤及び天然医薬品において使用可能である。さらに、本明細書で使用される用語「医薬」は、動物餌、例えば家畜餌及び／又はペットフードへの組込のために設計された産物を包含する。

【0274】

予防適用

本発明による、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリアを、予防適用において使用してもよい。予防適用において、本発明によるロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリアを、疾患を発症するリスクを少なくとも部分的に減少させるのに十分な量で、特定の疾患の疑いのある、又はリスクのある患者に投与する。そのような量は、「予防的有効用量」であると定義される。正確な量は、対象の健康状態と体重などの、いくつかの特定の因子に依存する。

【0275】

カプセル化

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aの前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌は、カプセル化されている。

【0276】

さらなる実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌を含む医薬組成物は、カプセル化されている。

【0277】

別の実施形態において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は

10

20

30

40

50

(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌を含む栄養補助剤は、カプセル化されている。

【0278】

さらなる実施形態において、飼料、食物製品、栄養補助食品又は食物添加物は、カプセル化されている。

【0279】

本明細書で使用される用語「カプセル化される」は、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は宿主細胞、及び／又は(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌が、標的部位上で効果を持つことができるよう、分解又は著しい分解なしに、標的部位(例えば腸)に伝達されうるよう、物理的分離によって、不適合環境から、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は宿主細胞、及び／又は(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌を保護するための手段を意味する。

10

【0280】

カプセル化の目的が、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は宿主細胞、及び／又は(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌の、その周辺からの単離である時にさえ、保護コーディング又はシェルは、望む活性の時間にて破裂されなければならない。保護コーティング又はシェルの破裂は典型的に、圧力、酵素攻撃、化学反応及び物理的崩壊などの化学的及び物理的刺激の適用をおよそ通して引き起こされる。

20

【0281】

例えば、カプセル化は、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は宿主細胞、及び／又は(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌が、腸内での効果を產生するのに効果的である量で、腸(すなわち標的部位)に伝達され得るように、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列、及び／又はベクター、及び／又は宿主細胞、及び／又は(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌が接種されることを確かにする。

30

【0282】

医薬組成物

医薬組成物は、任意の医薬組成物であってもよい。一態様において、医薬組成物は、経口、腸内又は直腸内に投与されるべきである。例えば、組成物は食用組成物であってもよい。「食用」は、ヒト又は動物による消費が認められた材料を意味する。

【0283】

医薬組成物は、医学及び獣医学におけるヒト又は動物での使用のためであってもよい。

【0284】

本明細書で記述した種々の異なる形態の医薬組成物のためのそのような好適な賦形剤の例は、「Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller」に見出されうる。

40

【0285】

治療的使用のための許容される担体又は希釈剤は、医薬技術分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。

【0286】

好適な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適の希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール及び水が挙げられる。

【0287】

医薬担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図する投与経路及び標準の医薬実施に関して

50

選択可能である。医薬組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤として、又は担体、賦形剤又は希釈剤に加えて、任意の好適な結合剤（複数可）、滑沢剤（複数可）、懸濁剤（複数可）、コーティング剤（複数可）、可溶化剤（複数可）を含んでもよい。

【0288】

好適な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、グルコースなどの天然糖、無水ラクトース、フリー・フローラクトース、ベータ・ラクトース、トウモロコシ甘味剤、アカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウムなどの天然及び合成ガム、カルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールが挙げられる。

【0289】

好適な滑沢剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩酸ナトリウムなどが挙げられる。

10

【0290】

保存剤、安定化剤、色素及びさらには香味剤を、医薬組成物中で提供してもよい。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤及び懸濁剤を使用されてもよい。

【0291】

栄養補助剤

栄養学的に許容される担体、希釈剤及び賦形剤には、ヒト又は動物消費のために好適な、食物業界で標準として使用されるものが含まれる。典型的な栄養学的に許容される担体、希釈剤及び賦形剤が当業者に知られている。

20

【0292】

飼料／産物

本発明のさらなる態様は、ロゼブリア属フラジエリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの）ロゼブリア属菌を含む飼料、食品、栄養補助食品及び食品添加物に関する。

30

【0293】

本明細書で使用される用語「飼料」、「食品」、「食品添加物」及び「栄養補助食品」は、固体、ジェル状又は液体でありうるすべての消費可能な産物をカバーする意図がある。

【0294】

好適な食品には、例えば機能性食品、食物組成物、ペットフード、家畜餌、健康食品に、飼料などが含まれうる。一態様において、食品は健康食品である。

【0295】

本明細書で使用される用語「機能性食品」は、栄養学的効果を提供可能であるのみでなく、さらなる有益な効果を消費者に伝達可能でもある食物を意味する。したがって、機能性食品は、純粋に栄養学的な効果以外に、特定の機能、例えば医学的又は生理学的利益を食物に付与する、（本明細書で記述されたものなどの）成分又は内容物が内部に配合された通常の食物である。

40

【0296】

本発明に適用可能な特定の食品の例としては、乳に基づく産物、加工食デザート、例えば乳又は水で再構成するための粉末、チョコレート乳飲料、モルト飲料、加工食、ヒトに対するインスタント食又は飲料、又はペット又は家畜に対して意図された完全又は部分的食餌を表している食物組成物が挙げられる。

【0297】

一態様において、本発明による飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、単胃動物

50

などのヒト、ペット又は家畜用である。飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ又は家禽からなる群から選択される動物用であってもよい。さらなる実施形態において、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、成体種、とりわけヒト成人用である。

【0298】

本明細書で使用される用語「乳に基づく産物」は、様々な脂肪含量を有する任意の液体又は半固体牛乳、又は乳清に基づく産物を意味する。乳に基づく産物は、例えば牛乳、山羊乳、羊乳、スキムミルク、全乳、加工なしで粉末乳及び乳清から還元されたミルク、又はヨーグルト、凝固乳、凝乳、酸乳、酸全乳、バターミルク及び他の酸乳産物などの加工製品でありうる。別の重要な群には、乳清飲料、発酵乳、コンデンスマルク、幼児又は乳児乳、フレーバーミルク、アイスクリーム、スイーツなどの乳含有食物などの乳飲料が含まれる。

10

【0299】

本発明の飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、本明細書において食品又は栄養学的補助食品又は食品添加物とも呼ばれる補助食品であってもよく、又はそれに添加してもよい。

【0300】

本発明による飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物をまた、とりわけ早期離乳期間及び成長肥育期間において、動物栄養素（例えばブタ栄養素）中で使用してもよい。飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、例えばフィード変換効率を増加させることを通して、免疫機能を増強し、感染性疾患を減少及び予防し、微生物叢組成物を有利に変更し、動物の成長と能力を改善することが予期される。

20

【0301】

プロバイオティクス又は生きた生物学的治療薬

ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌は、プロバイオティクス又は生きた生物学的治療薬中で使用してもよい。

30

【0302】

本発明の別の態様は、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F1aA1又はF1aA2などの）ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は（細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌を含む、プロバイオティクス組成物に関する。

40

【0303】

本明細書で使用される用語「プロバイオティクス」は、宿主の健康又は福祉において有利な効果を有する微生物細胞調製物又は微生物細胞の成分を意味する（Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, et al "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999;10:107-10）。

【0304】

一態様において、プロバイオティクス組成物は、代謝的に活性な、すなわち生及び／又は凍結乾燥、又は非生熱殺、放射照射又は溶解プロバイオティクス細菌の経口投与可能な組成物である。プロバイオティクス組成物は、他の内容物を含んでもよい。プロバイオティクス組成物は、経口、すなわち錠剤、カプセル又は粉末の形態で投与可能である。プロバイオティクス組成物には、細菌種R.ホミニス又はR.インテスチナリスが含まれうる

50

。それらが嫌気性生物であるので、カプセル化産物がR.ホミニス及びR.インテスチナリスに対して好ましい。(例えばビタミンCなどの)他の内容物が、酸素スカベンジャー及び(インビオにて、定着及び生存を改善するような)プレバイオティクス基質として含まれてもよい。あるいは、本発明のプロバイオティクス組成物は、ミルク又は乳清に基づく発酵乳製品などの食物又は栄養学的産物として、又は医薬産物として経口投与されてもよい。

【0305】

プロバイオティクス細菌の好適な一日用量は、約 1×10^3 ～約 1×10^{11} コロニー形成単位(CFU, colony-forming unit)、例えば、約 1×10^7 ～約 1×10^{10} CFU、別の例では、約 1×10^6 ～約 1×10^{10} CFUである。

10

【0306】

一態様において、プロバイオティクス組成物は、細菌種及び/又はその細胞成分を、活性内容物として、組成物の重量に関して、 1×10^6 ～約 1×10^{11} CFU/g、例えば約 1×10^8 ～約 1×10^{10} CFU/gで含む。用量は1g、3g、5g及び10gであってもよい。

【0307】

典型的に、プロバイオティクスは、少なくとも1つの好適なプレバイオティクス化合物と組み合わされていてもよい。プレバイオティクスは通常、上部消化管中で分解又は吸収されない、オリゴ糖又は多糖などの消化不能炭水化物、又は糖アルコールである。公知のプレバイオティクスには、イヌリン及びトランスガラクト-オリゴ糖などの市販製品が含まれる。

20

【0308】

一態様において、本発明のプロバイオティクス組成物は、総重量組成物に関して、約1～約30重量%(例えば5～20重量%)の量で、プレバイオティクスを含む。炭水化物は、フルクト-オリゴ糖(又はFOS)、短鎖フルクト-オリゴ糖、インスリン、イソマルト-オリゴ糖、ベクチン、キシロ-オリゴ糖(又はXOS)、キトサン-オリゴ糖(又はCOS)、ベータ-グルカン、アラビアゴム加工及び耐性スター、ポリデキストロース、D-タガトース、アカシア纖維、イナゴマメ、オート麦及びシトラス纖維からなる群から選択されてもよい。一態様において、プレバイオティクスは、短鎖フルクト-オリゴ糖(単に、本明細書以下FOSs-c.cと示す)であり、前記FOSs-c.cは、ビート糖の変換によって一般に得られ、3つのグルコース分子が結合するサッカロース分子を含む、消化可能炭化水素ではない。

30

【0309】

投与

本発明の医薬組成物、栄養補助剤、飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、経口、腸内、膣内、非経口、筋肉内、腹腔内、動脈内、くも膜下、気管支内、皮下、皮内、静脈内、経鼻、バッカル又は舌下投与経路用に適合させることもできる。

【0310】

一態様において、本発明の医薬組成物、栄養補助剤、飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、経口、腸内、膣内、非経口、経鼻、バッカル又は舌下投与経路用に適合される。

40

【0311】

さらなる態様において、本発明の医薬組成物、栄養補助剤、飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、経口投与用に適合される。

【0312】

経口投与用には、圧縮錠剤、丸剤、錠剤、ゲル剤、ドロップ剤、及びカプセル剤が特に有用である。

【0313】

他の投与形態には、静脈内、動脈内、くも膜下、皮下、皮内、腹腔内、又は筋肉内で注射されてもよい、及び無菌又は滅菌可能な溶液から調製される、溶液又はエマルジョンが

50

含まれる。本発明の医薬組成物はまた、座薬、ペッサリー、懸濁液、エマルジョン、ローション、軟膏、クリーム、ゲル、スプレー、溶液又は打ち粉の形態であってもよい。

【0314】

経皮投与の他の手段は、皮膚パッチを使用することによる。例えば、活性内容物を、ポリエチレングリコール又は液体パラフィンの水性エマルジョンからなるクリーム内に組み込むことが可能である。別の例において、活性内容物はまた、必要に応じてそのような安定剤及び保存剤と一緒に、白ワックス又は白軟パラフィン基体からなる軟膏内に組み込むことも可能である。

【0315】

医薬組成物、栄養補助剤、飼料、食品、栄養補助食品又は食品添加物は、単位剤形、すなわち単位用量を含む別個の部分、又は単位用量の複数又はサブユニットの形態で製剤化されてもよい。10

【0316】

用量

当業者は、不必要な実験なしに対象に投与するための、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ロゼブリア属菌の適切な用量を、簡単に決定可能である。典型的に、医師は、個々の患者に対してもっとも好適であろう実際の用量を決定するだろうし、使用した特定の細菌株の活性、その株の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与様式と時間、排出速度、薬物組合せ、特定の状態の重症度、及び個々の実施されている治療を含む種々の因子に依存するであろう。本明細書で開示された用量は、平均の場合の例示である。もちろん、より高い、又はより低い用量範囲にメリットがある個々の例も存在してよく、そのようなものは本発明の範囲内である。20

【0317】

組合せ

一態様において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ロゼブリア属菌は、少なくとも1又は2、又は3又は4又は5の他の活性剤と組み合わせて投与される。そのような場合において、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、及び／又は(F1aA1又はF1aA2などの)ロゼブリア属菌は、1又は2以上の他の活性剤と、連続して(consecutively)、同時に又は連続して(sequentially)投与されうる。3040

【0318】

少なくとも1又は2、又は3又は4又は5の他の活性剤は、ロゼブリア属フラジェリン、(F1aA1又はF1aA2などの)ポリペプチドF1a、前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列(複数可)、(F1aA1又はF1aA2などの)前記ポリペプチドF1aをコードするポリヌクレオチド配列(複数可)、は前記ポリヌクレオチド配列(複数可)を含むベクター(複数可)、前記ベクター(複数可)を含む宿50

主細胞（複数可）、前記ポリヌクレオチド配列（複数可）を含む宿主細胞（複数可）、及び（例えばR・ホミニス及び／又はR・インテスチナリスなどのロゼブリア属菌）微生物からなる群から選択されうる。

【0319】

少なくとも1又は2、又は3又は4又は5の他の活性剤は、（例えばR・ホミニス及び／又はR・インテスチナリスなどのロゼブリア属菌）微生物であってもよい。好適な微生物の例としては、ロゼブリア・ホミニスA2-183及びロゼブリア・インテスチナリスL1-82が挙げられる。

【0320】

配列同一性又は配列相同性

10

用語「ポリペプチド」、「ポリペプチド配列」、「タンパク質」及び「アミノ酸配列」は、本明細書で互換的に使用される。

【0321】

用語「ポリヌクレオチド配列」及び「ヌクレオチド配列」は、本明細書で互換的に使用される。

【0322】

本発明はまた、本明細書に記述したポリペプチドのアミノ酸配列（複数可）とある程度の配列同一性又は配列相同性を有する配列（例えばバリアント、ホモログ及び誘導体）、又はそのようなポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列（本明細書以下、「ホモログ配列（複数可）」と呼ぶ）の使用を包含する。したがって、用語「ホモログ」は、対象アミノ酸配列及び対象ヌクレオチド配列と特定の相同性を有するエンティティを意味する。したがって、用語「相同性」は、「同一性」と等しくてもよい。

20

【0323】

本文脈において、ホモログ配列は、対象配列と、少なくとも50、60、70、75、80、85又は90%同一、一部の実施形態において、少なくとも95、96、97、98又は99%同一であってもよいアミノ酸又はヌクレオチド配列を含むと取られる。相同性はまた、類似性に関して考慮可能でもある（すなわち同様の化学特性／機能を有するアミノ酸残基）けれども、本発明の文脈において、配列同一性に関して、相同性を表すことが好みしい。

【0324】

30

一部の実施形態において、ホモログ配列は、対象配列と比較して、1又は数個の付加、欠失及び／又は置換を有する、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列を含むと取られる。

【0325】

一部の実施形態において、本発明は、そのアミノ酸配列が、本明細書において提示されるタンパク質、又は親タンパク質のアミノ酸配列中の2、3、4、5、6、7、8、9又は10などのそれ以上のアミノ酸、又は10を超えるアミノ酸などの、1又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加によって、この（親）タンパク質から誘導され、親タンパク質の活性を有するタンパク質の使用に関する。

【0326】

一部の実施形態において、本発明は、そのアミノ酸配列が、本明細書において提示されるタンパク質をコードする、又は親タンパク質のアミノ酸配列中の2、3、4、5、6、7、8、9又は10などのそれ以上のアミノ酸、又は10を超えるアミノ酸などの、1又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加によって、この（親）タンパク質から誘導され、親タンパク質の活性を有するタンパク質をコードする、核酸配列（又は遺伝子）の使用に関する。

40

【0327】

本文脈において、ホモログ配列は、本明細書で記述したポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（対象配列）に対して、少なくとも50、60、70、75、85又は90%同一、一部の実施形態において、少なくとも95、96、97、98又は99%同一であってもよいヌクレオチド配列を含むと取られる。典型的に、ホモログは、対象配列と同

50

一又は等価の、ドメイン（複数可）等をコードする配列を含むであろう。ホモロゲはまた、類似性に関して考慮可能でもある（すなわち同様の化学特性／機能を有するアミノ酸残基）けれども、本発明の文脈において、配列同一性に関して、相同性を表すことが好ましい。

【0328】

ホモロゲアミノ酸配列及び／又はヌクレオチド配列は、ポリペプチドの機能的活性を維持し、及び／又は活性を増強するポリペプチドを提供及び／又はコードしてもよい。

【0329】

一部の態様において、本明細書で記述したようなアミノ酸配列は、対象配列と、少なくとも50、60、70、75、80、85又は90%の同一性、一部の実施形態において、少なくとも95、96、97、98又は99%の同一性を有する。
10

【0330】

一部の態様において、本明細書で記述したようなヌクレオチド配列は、対象配列と、少なくとも50、60、70、75、80、85又は90%の同一性、一部の実施形態において、少なくとも95、96、97、98又は99%の同一性を有する。

【0331】

相同性比較は、目によって、又はより通常、簡単に利用可能な配列比較プログラムの助けて実施可能である。これらの市販コンピュータプログラムは、2又は3以上の配列間の%相同性を計算可能である。

【0332】

%相同性は、連続配列上で計算されてよく、すなわち1つの配列を他の配列とアラインメントし、1度に1残基、1つの配列中の各アミノ酸を、他の配列中の相当するアミノ酸と直接比較する。これは、「ギャップのない」アラインメントと呼ばれる。典型的に、そのようなギャップのないアラインメントは、比較的短い残基数上でのみ実施される。
20

【0333】

これは非常に単純で、一貫性のある方法であるが、例えば配列の別の同一対において、1つの挿入又は欠失が、続くアミノ酸残基をアラインメントから押し出してしまい、したがって潜在的に、グローバルアラインメントが実施される時に、%相同性の大きな減少をもたらすであろうことを考慮にいれることができない。結果として、ほとんどの配列比較法が、総相同性スコアに過度に不利益をもたらすことなしに、可能性のある挿入及び欠失を考慮する最適アラインメントを産するように設計される。これは、局所相同性を最大化することを試みるために、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することによって達成される。
30

【0334】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同数の同一のアミノ酸に対して、可能な限り少ないギャップを有する配列アラインメント - 2つの比較した配列間のより高い関連性を反映している - が、多くのギャップを有するものよりもより高いスコアを達成するであろうように、アラインメント内に発生した各ギャップを、「ギャップペナルティ」として割り当てる。「アフィンギャップコスト」は、ギャップの存在に対して比較的高いコストをチャージし、ギャップ内の各続く残基に対してより小さいペナルティーをチャージするように、典型的に使用される。これは、もっとも一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高ギャップペナルティはもちろん、より少ないギャップを有する最適化アラインメントを生成するであろう。ほとんどのアラインメントプログラムが、ギャップペナルティを改変可能とする。典型的に、デフォルト値を、配列比較のためにそのようなソフトウェアを使用する時に使用する。
40

【0335】

最大%相同性の計算はしたがって、ギャップペナルティを考慮して、最適アラインメントの生成をまず必要とする。そのようなアラインメントを実施するための好適なコンピュータプログラムは、Vector NTI (Invitrogen社) である。配列比較を実施可能なソフトウェアの例としては、例えばBLASTパッケージ (Ausubel et al 1999 Short Protocols in M
50

olecular Biology, 4th Ed - Chapter 18を参照のこと)、BLAST2 (FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8及びtatiana@ncbi.nlm.nih.govを参照のこと)、FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 203-410) 及びAlignXが挙げられるが、これらに制限はされない。少なくともBLAST、BLAST2及びFASTAが、オフライン及びオンライン検索のために利用可能である(例えばAusubel et al 1999, pages 7-58 to 7-60を参照のこと)。

【0336】

最終%相同性は、同一性に関して測定可能であるけれども、アライメント工程それ自身は典型的に、全部かゼロかの対比較に基づかない。代わりに、スケール化した類似性スコアマトリックスが一般に、化学類似性又は進化的距離に基づいた各対比較に対してスコアを割り当てて使用される。一般に使用されるそのようなマトリックスの例は、BLOSUM62マトリックス - プログラムのBLASTスイートに対するデフォルトマトリックスである。Vector NTIプログラムは一般に、公的デフォルト値、又は供給される場合、カスタムシンボル比較表のいずれかを用いる(さらなる詳細はユーザーマニュアルを参照のこと)。いくつかの適用のために、Vector NTIパッケージに対するデフォルト値を使用するのが好ましい。

【0337】

あるいは、パーセンテージ相同性は、CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244) に類似の、アルゴリズムに基づいた、Vector NTI (Invitrogen社) における、マルチプルアライメントフィーチャを使用して計算してもよい。

【0338】

ソフトウェアが最適アライメントを生成すると、%相同性、例えば%配列同一性を計算可能である。ソフトウェアは典型的に、配列比較の一部としてこれを実施し、数的結果を生じる。

【0339】

配列同一性を決定するときに、ギャップペナルティが使用されるべきであり、次いで以下のパラメータを、例えば対アライメントのために使用可能である。

【0340】

【表3】

BLAST用	
ギャップ開始	0
ギャップ伸長	0

10

20

30

【0341】

【表4】

CLUSTAL用	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	Kトリプル
ギャップペナルティ	15	10	
ギャップ伸長	6.66	0.1	

40

50

【0342】

一実施形態において、CLUSTALは、以上で定義したように設定したギャップペナルティ及びギャップ伸張とともに使用してもよい。

【0343】

一実施形態において、ヌクレオチド配列に関する同一性の程度は、少なくとも20連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも30連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも40連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも50連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも60連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも100連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも200連続ヌクレオチドにわたり、例えば、少なくとも300連続ヌクレオチドにわたり、決定される。

【0344】

一実施形態において、ヌクレオチオ配列に関する同一性の程度は、全配列にわたって決定されてもよい。

10

【0345】**組換え体**

一態様において、本発明における使用のための、ロゼブリア属フラジェリンポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列は、組換え配列、すなわち組換えDNA技術を使用して調製された配列である。

【0346】

これらの組換えDNA技術は、当業者の能力内である。そのような技術は、文献、例えばJ. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.中に説明されている。

20

【0347】**合成**

一態様において、本発明における使用のためのロゼブリア属フラジェリンポリヌクレオチド配列は、合成配列、すなわちインビトロ化学的又は酵素的合成によって調製された配列である。これは、メチルトロピック酵母ピチア (Pichia) 及びハンセヌラ (Hansenula) などの、宿主生物に対する最適コドン使用で作成した配列を含むが、これに制限はされない。

【0348】**酵素の発現**

本発明における使用のためのヌクレオチド配列を、組換え複製可能ベクター内に組み込んでよい。ベクターは、タンパク質形態で、適合可能な宿主細胞内及び／又は適合可能な宿主細胞から、ヌクレオチド配列を複製及び発現するために使用してもよい。

30

【0349】

発現は、制御配列、例えば調節配列を使用して制御してもよい。

【0350】

ヌクレオチド配列の発現による、宿主組換え細胞によって産生されたタンパク質は、使用した配列及び／又はベクターに依存して、分泌されるか、又は細胞内に含まれてもよい。コード配列は、特定の原核生物又は真核生物細胞膜を通して、物質コード配列の分泌を指向するシグナル配列で設計されてもよい。

40

【0351】**発現ベクター**

一態様において、本発明は、少なくとも1つのロゼブリア属フラジェリンをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を含む(発現ベクターなどの)ベクターに関する。

【0352】

用語「発現ベクター」は、インビボ又はインビトロ発現可能な構築物を意味する。

【0353】

一実施形態において、発現ベクターは、好適な宿主生物のゲノム内に組み込まれる。一態様において、用語「組み込まれた」は、ゲノム内への安定な組込をカバーする。

【0354】

50

本記述のヌクレオチド配列は、その中でヌクレオチド配列が、好適な宿主細胞又は宿主生物によるヌクレオチド配列の発現を提供可能である調節配列に作動可能に連結されるベクター内に存在してもよい。

【0355】

本発明での使用のためのベクターは、本記述のポリペプチドの発現を提供するために、本明細書で記述されたような、好適な宿主細胞又は宿主生物内に形質転換されてもよい。

【0356】

ベクター、例えばプラスミド、コスミド又はファージベクターの選択は、しばしば、導入されるべき宿主細胞に依存するであろう。

【0357】

本発明における使用のためのベクターは、抗生物質耐性、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン耐性を授ける遺伝子などの、1又は2以上の選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよい。あるいは、選択は、(国際公開第W091/17243号パンフレットに記載されるように)共形質転換によって実施されてもよい。

【0358】

ベクターは、例えばRNAの産生のために、インビトロで使用されてよく、又は宿主細胞をトランスフェクトする、形質転換する、形質導入する、又は感染するために使用してもよい。

【0359】

したがって、さらなる実施形態において、本記述は、複製可能ベクター内に、本記述のヌクレオチド配列を導入することと、適合可能な宿主細胞内にベクターを導入することと、ベクターの複製を引き起こす条件下で、宿主細胞を増殖させることとによって、本記述のヌクレオチド配列を作製する方法を提供する。

【0360】

ベクターにはさらに、問題の宿主細胞中でベクターが複製可能にするヌクレオチド配列を含んでもよい。そのような配列の例は、プラスミドpUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1及びpIJ702の複製起点である。

【0361】

発現ベクターは、少なくとも2、3、4又は5つのロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0362】

発現ベクターの例としては、pGEX-6P-1、pCR-Blunt II-TOP0及びT7-MAT-Tag-FLAG-が挙げられる。

【0363】

発現ベクターpGEX-6P-1は、組換えフラジェリンをクローニングするために使用してもよい。発現ベクターpGEX-6P-1は、GSTタグ化組換タンパク質の化学的に誘導可能な、高レベル発現のためのtacプロモーターと、任意の大腸菌宿主内での使用のための内部lacI_q遺伝子と、アンピシリン選択のためのAmpR遺伝子と、開裂のためのPreScission Protease部位と、望むのならば、融合産物からのタンパク質と、を含む。

【0364】

クローニングベクターpCR-Blunt II-TOP0は、組換えフラジェリン、とりわけ細胞溶解後に不溶性であるものをクローニングするために使用してもよい。典型的に、本ベクターは、平滑末端PCR産物の高効率DNAクローニングを許容する。ベクターは、大腸菌内での選択のためのカナマイシン及びゼオシン耐性遺伝子を含み、挿入物が、切除のための多重制限部位によって隣接する。

【0365】

発現ベクターT7-MAT-Tag-FLAG-は、組換えフラジェリン、とりわけ細胞溶解後に不溶性であるものをクローニングするために使用してもよい。多重クローニング部位(MCS,

10

20

30

40

50

multi cloning site) が、さらにアフィニティーカラムで精製可能である、二重タグ化フラジエリンの產生をもたらす、金属アフィニティータグ (M A T , Metal Affinity Tag) 配列と、F L A Gペプチド (A s p - T y r - L y s - A s p - A s p - A s p - A s p - L y s) 配列に隣接する。本発現ベクターはまた、M A T - O R F - F L A G 組換えフラジエリンのI P T G 誘導可能、高レベル発現のためのp T 7 / l a c (ファージT 7 l a c オペロン) プロモーターと、任意の大腸菌宿主中の基底状態での転写を抑止するための内部l a c I 遺伝子と、アンピシリン選択のためのA m p R 遺伝子とも含む。

【 0 3 6 6 】

調節配列

一部の適用において、本発明における使用のためのヌクレオチド配列は、選択した宿主細胞によってなどの、ヌクレオチド配列の発現を提供可能である、調節配列に作動可能に連結する。例として、本発明は、そのような調節配列に作動可能に連結した、本発明のヌクレオチド配列を含むベクターをカバーし、すなわちベクターは発現ベクターである。

【 0 3 6 7 】

用語「作動可能に連結した」は、記述した成分が、それらの意図する様式で、機能することを可能にする関係である並置を意味する。コード配列に「作動可能に連結した」調節配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合可能な条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。

【 0 3 6 8 】

用語「調節配列」は、プロモーターと、エンハンサーと、他の発現調節シグナルを含む。

【 0 3 6 9 】

用語「プロモーター」は、当技術分野で通常の意味で、例えばR N A ポリメラーゼ結合部位で使用される。

【 0 3 7 0 】

本記述のフラジエリンをコードするヌクレオチド配列の増強した発現が、異種調節領域、例えばプロモーター、分泌リーダー及びターミネーター領域の選択によって達成されてもよい。

【 0 3 7 1 】

一実施形態において、本明細書によるヌクレオチド配列は、少なくともプロモーターに作動可能に連結する。

【 0 3 7 2 】

他のプロモーターはまた本記述のポリペプチドの発現を指向するために使用されてもよい。

【 0 3 7 3 】

細菌、真菌又は酵母宿主細胞内のヌクレオチド配列の転写を指向するための好適なプロモーターの例が、当技術分野で周知である。

【 0 3 7 4 】

プロモーターはさらに、好適な宿主における発現を確かにする、又は増加するための特徴を含みうる。例えば、特徴は、P r i b n o w B o x 又はT A T A ボックスなどの保存領域でありうる。

【 0 3 7 5 】

構築物

「コンジュゲート」、「カセット」及び「ハイブリッド」などの用語と同義である、用語「構築物」は、プロモーターに直接的又は間接的に結合した、本発明による使用のための、ヌクレオチド配列を含む。

【 0 3 7 6 】

間接的結合の例は、本記述のプロモーターとヌクレオチド配列の中間、S h 1 - イントロン又はA D H イントロンなどの、イントロン配列などの好適なスペーサー基の提供である。これは、直接的又は間接的結合を含む、本記述に関連した用語「融合した」にも当て

10

20

30

40

50

はまる。場合によって、本用語は、それらが両方その天然の環境中にある場合、野生型遺伝子プロモーターに通常関連したタンパク質をコードするヌクレオチド配列の天然の組合せをカバーしない。

【 0 3 7 7 】

構築物は、遺伝的構築物の選択を可能にする、マーカーを含むか、又は発現してもよい。

【 0 3 7 8 】

一部の適用のために、本記述の構築物は、少なくとも、プロモーターに作動可能に連結した、本記述のヌクレオチド配列を含む。

【 0 3 7 9 】

宿主細胞

10

本記述に関連した用語「宿主細胞」は、本明細書で記述したようなヌクレオチド配列及び／又は発現ベクターを含む任意の細胞を含む。典型的に、宿主細胞は、本明細書で定義したような特定の特性を有するタンパク質の組換え産生が可能である。

【 0 3 8 0 】

宿主細胞の例としては、ロゼブリア種などの細菌、及びコンピテントセルが挙げられる。ロゼブリア種の例は、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスである。コンピテントセルの例としては、(大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S 及び／又は大腸菌 B 2 1 R o s e t t a などの) コンピテント大腸菌セルが挙げられる。

20

【 0 3 8 1 】

したがって、本記述のさらなる実施形態は、本記述のヌクレオチド配列を形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞を提供する。さらに、又はあるいは、本記述のさらなる実施形態は、形質転換前の等価の微生物と比較して、本記述のフラジエリンをコードするヌクレオチド配列(例えば、ホモログ遺伝子又は内因性遺伝子などの遺伝子)の発現を上方調節(過剰発現)可能である、ヌクレオチド(例えば、異種プロモーター又は内因性などのプロモーター)で形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞を提供する。細胞は、前記ベクターと適合可能であるように選択されるであろうし、細菌(例えば原核生物)、真菌又は酵母細胞であってもよい。

【 0 3 8 2 】

30

本記述のフラジエリンをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞に対して異種又は相同であってもよい。典型的に、フラジエリンをコードするヌクレオチド配列が、宿主細胞に相同である場合、宿主細胞には、ヌクレオチド配列の多重コピーが含まれる。さらに、又はあるいは、フラジエリンをコードするヌクレオチド配列は、異種プロモーターに作動可能に連結し、典型的に前記プロモーターは、フラジエリンをコードする相同ヌクレオチド配列を上方調節(過剰発現)可能である。

【 0 3 8 3 】

1つの例において、宿主細胞は、異種又は外来プロモーターの制御下、(相同又は内因性ヌクレオチド配列などの) 本記述のフラジエリンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【 0 3 8 4 】

一実施形態において、宿主細胞を、F 1 a 1、F 1 a 2、F 1 a 3 及び F 1 a 4 からなる群から選択される、少なくとも1つのフラジエリン(例えばロゼブリア属フラジエリン)をコードする1又は2以上のヌクレオチド配列で形質導入又はトランスフェクトする。別の実施形態において、宿主細胞を、F 1 a 2、F 1 a 1 及び F 1 a 4 からなる群から選択される、少なくとも1つのフラジエリン(例えばロゼブリア属フラジエリン)をコードする1又は2以上のヌクレオチド配列で形質導入又はトランスフェクトする。さらなる実施形態において、宿主細胞を、フラジエリン(例えば、ロゼブリア属フラジエリン) F 1 a 2 をコードするヌクレオチド配列で形質導入又はトランスフェクトする。

【 0 3 8 5 】

50

宿主細胞は、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列の多重コピーを含んでもよい。

【0386】

宿主細胞は、1、2、3、4又は5つのロゼブリア属フラジエリンをコードする、少なくとも1、2、3、4又は5つのポリヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0387】

一実施形態において、宿主細胞は、1つのロゼブリア属種から誘導した、又は誘導可能な、少なくとも1つのロゼブリア属フラジエリンと、異なるロゼブリア属種から誘導した、又は誘導可能な、少なくとも1つのロゼブリア属菌をコードする、少なくとも1つのさらなるポリヌクレオチド配列と、を含む。例えば、宿主細胞は、R.ホミニスフラジエリン（例えばF1a1又はF1a2）をコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド配列と、R.インテスチナリスフラジエリン（例えばF1a1又はF1a2）をコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド配列と、を含む。10

【0388】

宿主細胞は、ロゼブリア属フラジエリンをコードする、少なくとも1、2、3、4又は5つのポリヌクレオチド配列を含む、少なくとも1、2、3、4又は5つの発現ベクターを含んでもよい。

【0389】

一実施形態において、宿主細胞は、1つのロゼブリア属種から誘導した、又は誘導可能なロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターと、異なるロゼブリア属種から誘導した、又は誘導可能な、ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つのさらなる発現ベクターと、を含む。例えば、宿主細胞は、R.ホミニスフラジエリン（例えばF1a1又はF1a2）をコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現ベクターと、R.インテスチナリスフラジエリン（例えばF1a1又はF1a2）をコードする、ポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現ベクターと、を含む。20

【0390】

フラジエリンをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞に対して、内因性又は外因性であってもよい。典型的に、フラジエリンをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞に対して内因性である場合、宿主細胞は、ヌクレオチド配列の多重コピーを含む。さらに、又はあるいは、フラジエリンをコードするヌクレオチド配列は、外因性プロモーターに作動可能に連結し、典型的に前記プロモーターは、フラジエリンをコードする内因性ヌクレオチド配列を上方調節（過剰発現）可能である。30

【0391】

好適な細菌宿主生物は、グラム陽性又はグラム陰性細菌種である。

【0392】

一実施形態において、宿主細胞は微生物である。

【0393】

一実施形態において、宿主細胞は、乳酸菌種、ラクトコッカス属（*Lactococcus*）種、ビフィドバクテリウム属（*Bifidobacterium*）種、ラクトバチルス属（*Lactobacillus*）種又はプロピオニバクテリウム属（*Propionibacterium*）種である。40

【0394】

乳酸菌の例としては、ラクトバチルス属種、ロイコノストック属（*Leuconostoc*）種、ペジオコッカス属（*Pediococcus*）種、ラクトコッカス属種、ストレプトコッカス属（*Streptococcus*）種、アエロコッカス属（*Aerococcus*）種、カルノバクテリウム属（*Carnobacterium*）種、エンテロコッカス属（*Enterococcus*）種、オエノコッカス属（*Oenococcus*）種、スプロラクトバチルス属（*Sporolactobacillus*）種、テトラゲノコッカス属（*Tetragenococcus*）種、バゴコッカス属（*Vagococcus*）種及びウェイセラ属（*Weisella*）種が挙げられるが、これらに制限はされない。

【0395】

10

20

30

40

50

ラクトバチルス属種の例としては、ラクトバチルス・パラカセイ (*Lactobacillus paracasei*)、*L.* アシドフィルス (*L. acidophilus*)、*L.* フエルメンタム (*L. fermentum*)、*L.* ブレビス (*L. brevis*)、*L.* ガセリ (*L. gasseri*)、*L.* プランタラム (*L. plantarum*)、*L.* ブルカリカス (*L. bulgaricus*)、*L.* ヘルベチカス (*L. helveticus*)、*L.* ロイテリ (*L. reuteri*)、*L.* カセイ (*L. casei*)、*L.* ジエンセニ (*L. jensenii*)、*L.* ラムノサス (*L. rhamnosus*)、*L.* クリスピタス (*L. crispatus*)、*L.* ジヨンソニ (*L. johnsonii*)、*L.* サリバリウス (*L. salivarius*)、*L.* アセトトレランス (*L. acetotolerans*)、*L.* アシディファリナエ (*L. acidifarinae*)、*L.* アシディビスシス (*L. acidipiscis*)、*L.* アギリス (*L. agilis*)、*L.* アルギダス (*L. algidus*)、*L.* アリメンタリウス (*L. alimentarius*)、*L.* アミロリチクス (*L. amylolyticus*)、*L.* アミロフィルス (*L. amylophilus*)、*L.* アミロトロフィカス (*L. amylotrophicus*)、*L.* アミロボラス (*L. amylovorus*)、*L.* アニマリス (*L. animalis*)、*L.* アントリ (*L. antri*)、*L.* アポデミ (*L. apodemi*)、*L.* アビアリウス (*L. aviarius*)、*L.* ビフェルメンタンス (*L. bifermentans*)、*L.* ブチネリ (*L. buchneri*)、*L.* カメリアエ (*L. camelliae*)、*L.* カテナホルミス (*L. catenaformis*)、*L.* セチ (*L. cetti*)、*L.* コレオホミニス (*L. coleohominis*)、*L.* コリノイデス (*L. collinoides*)、*L.* コンポストチ (*L. composti*)、*L.* コンカバス (*L. concavus*)、*L.* コリニホルミス (*L. coryniformis*)、*L.* クルストラム (*L. crustorum*)、*L.* クルバタス (*L. curvatus*)、*L.* デルブルエキ亜種デルブルエキ (*L. delbrueckii subsp. delbrueckii*)、*L.* デルブルエキ亜種ブルガリカス (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*)、*L.* デルブルエキ亜種ラクチス (*L. delbrueckii subsp. lactis*)、*L.* デキストリニカス (*L. dextrinus*)、*L.* ジオリボランス (*L. diolivorans*)、*L.* エクイ (*L. equi*)、*L.* エクイゲネロシ (*L. equigenerosi*)、*L.* ファラギニス (*L. farruginis*)、*L.* フアルシミニス (*L. farciminis*)、*L.* ホルニカリス (*L. fornicalis*)、*L.* フルクチボランス (*L. fructivorans*)、*L.* フルメチ (*L. frumenti*)、*L.* フチエンシス (*L. fuchuensis*)、*L.* ガルウンアルム (*L. galUnarum*)、*L.* ガストリカス (*L. gastricus*)、*L.* ガネンシス (*L. ghanensis*)、*L.* グラミニス (*L. graminis*)、*L.* ハメシ (*L. hammei*)、*L.* ハムステリ (*L. hamsteri*)、*L.* ハルビネンシス (*L. harbinensis*)、*L.* ハヤキテンシス (*L. hayakitensis*)、*L.* ヒルガルジ (*L. hilgardii*)、*L.* ホモヒオチ (*L. homohiochii*)、*L.* イネルス (*L. iners*)、*L.* イングルビエイ (*L. ingluviei*)、*L.* インテスキナリス (*L. intestinalis*)、*L.* カリキセンシス (*L. kalixensis*)、*L.* ケフィラノファシエンス (*L. kefirano faciens*)、*L.* ケフィリ (*L. kefiri*)、*L.* キムチ (*L. kimchii*)、*L.* キタサトニス (*L. kitasatonis*)、*L.* クンケエイ (*L. kunkeei*)、*L.* レイチマンニ (*L. leichmannii*)、*L.* リンデリ (*L. lindneri*)、*L.* マレフェルメンタンス (*L. malefermentans*)、*L.* マイル (*L. mail*)、*L.* マニホチボランス (*L. manihotivorans*)、*L.* ミンデンシス (*L. mindensis*)、*L.* ムコサエ (*L. mucosae*)、*L.* ムリヌス (*L. murinus*)、*L.* ナゲリ (*L. nagelii*)、*L.* ナムレンシス (*L. namurensis*)、*L.* ナンテシス (*L. nantensis*)、*L.* オリゴフェルメンタンス (*L. oligofermentans*)、*L.* オリス (*L. oris*)、*L.* パニス (*L. panis*)、*L.* パンセリス (*L. pantheris*)、*L.* パラブレビス (*L. parabrevis*)、*L.* パラブチネリ (*L. parabuchneri*)、*L.* パラコリノイデス (*L. paracollinoides*)、*L.* パラファラギニス (*L. parafarraginis*)、*L.* パラケフィリ (*L. parakefiri*)、*L.* パラリメンタリウス (*L. paralimentarius*)、*L.* パラプランタラム (*L. paraplantarum*)、*L.* ペントサス (*L. pentosus*)、*L.* ペロレンス (*L. perolens*)、*L.* ポンティス (*L. pontis*)、*L.* プシタチ (*L. psittaci*)、*L.* レニニ (*L. rennini*)、*L.* リマエ (*L. rimae*)、*L.* ロゴサエ (*L. rogosae*)、*L.* ロシアエ (*L. rossiae*)、*L.* ルミニス (*L. ruminis*)、*L.* サエリムネリ (*L. saerimneri*)、*L.* サケイ (*L. sakei*)、*L.* サンフランシスセンシス (*L. sanfranciscensis*)、*L.* サツメンシス (*L. satsumensis*)、*L.* セカリフィルス (*L. secaliphilus*)、*L.* シャーペアエ (*L. sharpeae*)、*L.* シリギニス (*L. siliginis*)、*L.* スフィチエリ (*L. spicheri*)、*L.* スエビカス (*L. suebicus*)、

10

20

30

40

50

L. サイランデンシス (*L. thailandensis*)、*L. ウルツネンシス* (*L. ultunensis*)、*L. バクシノステルカス* (*L. vaccinostercus*)、*L. バギナリス* (*L. vaginalis*)、*L. ヴェルスモルデンシス* (*L. versmoldensis*)、*L. ビニ* (*L. vini*)、*L. ビツリナス* (*L. vitulinus*)、*L. ゼアエ* (*L. zeae*) 及び *L. ジマエ* (*L. zymae*) が挙げられる。

【0396】

プロピオニバクテリウム属菌の例としては、プロピオニバクテリウム・フレウデンレチ
亜種シェルマニ (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (PAB)、プロ
ピオニバクテリウム・アシジファシエンス (*Propionibacterium acidifaciens*)、プロピ
オニバクテリウム・アシジプロピオニシ (*Propionibacterium acidipropionici*)、プロ
ピオニバクテリウム・アクネス (*Propionibacterium acnes*)、プロピオニバクテリウム
・オウストラリエンセ (*Propionibacterium australiense*)、プロピオニバクテリウム
・アビダム (*Propionibacterium avidum*)、プロピオニバクテリウム・シクロヘキサンカム
(*Propionibacterium cyclohexanicum*)、プロピオニバクテリウム・フレウデンレルクリ
亜種フレウデンレルクリ (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*)
、プロピオニバクテリウム・グラニュロサム (*Propionibacterium granulosum*)、プロピ
オニバクテリウム・ジェンセニ (*Propionibacterium jensenii*)、プロピオニバクテリウ
ム・ミクロアエロフィルム (*Propionibacterium microaerophilum*)、プロピオニバクテ
リウム・プロピオニカム (*Propionibacterium propionicum*) 及びプロピオニバクテリウ
ム・ソエニ (*Propionibacterium thoenii*) が挙げられるが、これらに制限はされない。
10

【0397】

一実施形態において、プロピオニバクテリウム属菌は、プロピオニバクテリウム・フレ
ウデンレチ亜種シェルマニ (PAB) である。

【0398】

ビフィドバクテリウム属菌の例としては、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス
(*Bifidobacterium adolescentis*)、B. ブレブ (*B. breve*)、B. ロンガム (*B. longum*)
、B. アニマリス (*B. animalis*)、B. インファンティス (*B. infantis*)、B. スル
モフィルム (*B. thermophilum*)、B. ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウ
ム・カテヌラタム (*Bifidobacterium catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・シュード
カテヌラタム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・アン
グラタム (*Bifidobacterium angulatum*) 及び B. ラクチス (*B. lactis*) が挙げられるが、
これらに制限はされない。
30

【0399】

別の実施形態において、宿主細胞は、フィルミクテス門、例えばロゼブリア・ホミニス
、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスキナリス又は
ロゼブリア・イヌリニボランスなどのロゼブリア属種である。一実施形態において、宿主
細胞は、ロゼブリア属フラジェリンをコードする、少なくとも 1 つの異種ポリヌクレオチ
ド配列を含む。さらに、又はあるいは、宿主細胞は、ロゼブリア属フラジェリンをコード
するホモログポリヌクレオチド配列の、少なくとも 2 つのコピーを含み、例えば、宿主細
胞は、ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド配列の、少なくとも 3、
4、5 つのホモログコピーを含む。
40

【0400】

本記述のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の性質、及び / 又は発現したタン
パク質のさらなる処理の望ましさに依存して、酵母又は他の真菌などの真核生物宿主を
使用してもよい。一般に、酵母細胞は、取扱がより簡単であるので、真菌細胞よりも使用さ
れる。しかしながら、いくつかのタンパク質は、酵母細胞からの分泌が乏しいか、いくつ
かの場合で、正しく処理されない(例えば酵母中の高糖付加)。これらの例において、異
なる真菌宿主生物を選択すべきである。

【0401】

酵母、真菌及び植物宿主細胞などの好適な宿主細胞の使用が、本記述の組換え発現産物
における最適な生物学的活性を授けるために必要であろうように、翻訳後修飾(例えば、
50

ミリストイル化、グリコシル化、短化、脂質化及びチロシン、セリン又はスレオニンリン酸化)を提供してもよい。

【0402】

宿主細胞は、プロテアーゼ欠損又はプロテアーゼマイナス株であってもよい。これは例えば、「*a1p*」と呼ばれるアルカリプロテアーゼ遺伝子を欠失したプロテアーゼ欠損株アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*) J a L 1 2 5であってもよい。本株は、国際公開第97/35956号パンフレットで記述されている。

【0403】

用語「宿主細胞」は、その天然環境中であるそれらの自然のプロモーターの制御下にある時に、それらの天然の環境における、自然のヌクレオチドコード配列はカバーしない。

10

【0404】

生物

本記述に関連した用語「生物」は、本明細書によるポリペプチドをコードしているヌクレオチド、及び/又はそれより得た産物を含みうる任意の生物を含み、及び/又はプロモーターは、生物内に存在する場合に、本明細書によるヌクレオチド配列の発現を許容可能である。

【0405】

好適な生物には、(原核生物などの)細菌、真菌、酵母又は植物が含まれる。

【0406】

本記述に関連した用語「トランスジェニック生物」は、本明細書によるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び/又はそれより得た産物を含む、任意の生物を含み、及び/又はプロモーターは、生物内で本明細書によるヌクレオチド配列の発現を許容可能である。一実施形態において、ヌクレオチド配列は、生物のゲノム内に組み込まれる。

20

【0407】

用語「トランスジェニック生物」は、またその天然環境中であるそれらの自然のプロモーターの制御下である時に、それらの天然の環境中の、自然のヌクレオチドコード配列はカバーしない。

【0408】

したがって、本記述のトランスジェニック生物には、本明細書によるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、本明細書による構築物、本明細書によるベクター、本明細書によるプラスミド、本明細書による細胞又はその産物の任意の1つ、又は組合せを含む生物を含む。

30

【0409】

例えば、トランスジェニック生物は、異種プロモーターの制御下、(ホモログヌクレオチド配列などの)本記述のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0410】

宿主細胞/生物の形質転換

先に示唆したように、宿主生物は、原核又は真核生物であり得る。好適な原核宿主には、ロゼブリア・ホミニス、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・インテスチナリス、ロゼブリア・イヌリニボランス、大腸菌及びバチルス・サブチリスが含まれる。

40

【0411】

原核宿主の形質転換における教示が当技術分野でよく報告されており、例えば、Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参照のこと。真核宿主が使用される場合、ヌクレオチド配列は、イントロンの除去によってのように、形質転換前に、好適に変更される必要がある。

【0412】

糸状菌細胞を、プロトプラスト形成とプロトプラスト形質転換、続いて公知の様式での細胞壁の再生を含む工程などの、当技術分野で公知の種々の方法を使用して形質転換して

50

もよい。宿主微生物としてアスペルギルスの使用が、欧州特許第0238023号明細書で記述されている。

【0413】

別の宿主生物は植物でありうる。植物を形質転換するために使用した一般技術の概説は、Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) 及びChristou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994* 17-27)による論文にて見ることができる。植物形質転換におけるさらなる教示は、欧州特許第E P - A - 0449375号明細書にて見られる。

【0414】

真菌、酵母及び植物の形質転換における一般教示は、以下の項目で提示する。

10

【0415】

形質転換された真菌

宿主生物は、かびなどの真菌であってもよい。好適なそのような宿主の例としては、サーモミセス属 (*Thermomyces*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属、ペニシリウム属、ケカビ属 (*Mucor*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)などに属する任意のメンバーが挙げられる。

【0416】

一実施形態において、宿主生物は、糸状菌であってもよい。

【0417】

糸状菌を形質転換することは、糸状菌の形質転換のための標準技術を言及する米国特許第U S - A - 5741665号明細書で議論されており、真菌を培養することは、当技術分野で周知である。N. クラッサ (*N. crassa*) に適用するような技術の広い概説は、例えば、Davis and de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 79-143で見ることができる。

20

【0418】

糸状菌を形質転換することにおいて使用してもよいさらなる教示が、米国特許第A - 5674707号明細書で概説される。

【0419】

さらに、糸状菌における遺伝子発現は、Punt et al. (2002) *Trends Biotechnol* 2002 May;20(5):200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4):273-306にて教示されている。

30

【0420】

本記述は、これらの標準技術の使用によって調製された、本明細書によるトランスジェニック糸状菌の產生を包含する。

【0421】

一態様において、宿主生物は、アスペルギルス・ニゲルなどの、属アスペルギルスのものでありうる。

【0422】

本明細書によるトランスジェニックアスペルギルスをまた、以下の、例えばTurner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editors) Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641-666*)の教示によって調製することもできる。

40

【0423】

形質転換された酵母

別の実施形態において、トランスジェニック生物は酵母でありうる。

【0424】

酵母における異種遺伝子発現の原理の概説は、例えば、*Methods Mol Biol* (1995), 49: 341-54, and *Curr Opin Biotechnol* (1997) Oct;8(5):554-60にて提供される。

【0425】

これに関して、種サッカロミセス・セレビシ (*Saccharomyces cerevisi*) 又はピチア・

50

パストリス (*Pichia pastoris*) (FEMS Microbiol Rev (2000) 24(1):45-66を参照のこと)などの酵母を、異種遺伝子発現のための媒体として使用してもよい。

【0426】

サッカロミセス・セレビシエにおける異種遺伝子発現と、遺伝子産物の分泌の原理の概説は、E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.)によって与えられる。

【0427】

酵母の形質転換のために、種々の形質転換プロトコールが開発されてきた。例えば、本明細書によるトランスジェニックサッカロミセスを、Hinnen et al., (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929) ; Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104) ; 及びIto, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168)の教示に従うことによって調製可能である。

10

【0428】

形質転換された酵母細胞は、栄養要求性マーカードミナント抗生物質耐性マーカーなどの、種々の選択マーカーを使用して選択されてもよい。

【0429】

形質転換された植物 / 植物細胞

本記述に好適な宿主生物は植物であってもよい。これに関して、遺伝的に改変された植物の構築における基礎的な原則は、挿入された遺伝材料の安定的な維持を得るために、遺伝情報を植物ゲノムに挿入することである。一般技術の概説は、Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) 及びChristou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27)による論文に見出される。

20

【0430】

アグロバクテリウムによる植物組織の直接感染が、広く使用されてきており、Butcher D.N. et al., (1980), Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, eds.: D.S. Ingram 及びJ.P. Helgeson, 203-208に記載される簡単な技術である。

【0431】

植物を形質転換するための他の技術には、弾道 (ballistic) 形質転換、シリコンワイスク力炭化物技術 (Frame BR, Drayton PR, Bagnaall SV, Lewnau CJ, Bullock WP, Wilson HM, Dunwell JM, Thompson JA & Wang K (1994) Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation, The Plant Journal 6: 941-948を参考のこと) 及びウイルス形質転換技術 (例えば、Meyer P, Heidmann I & Niedenhof I (1992) The use of cassava mosaic virus as a vector system for plants, Gene 110: 213-217を参考のこと) が含まれる。

30

【0432】

植物形質転換におけるさらなる教示は、欧州特許第 E P - A - 0 4 4 9 3 7 5 号明細書に見出されうる。

【0433】

植物細胞は、細胞を、アミノ酸、植物ホルモン、ビタミンなどなどの必要な増殖因子を供給した好適な培養培地の中で培養することなどの、周知の組織培養方法に従って増殖され、維持される。

40

【0434】

さらなる態様において、本記述は、本明細書によるヌクレオチド配列又は構築物を有する、ヌクレオチド配列又は構築物を、植物などの生物のゲノムに導入することが可能な、ベクター系に関する。ベクター系は、1つのベクターを含んでもよいが、2つのベクターを含んでもよい。2つのベクターの場合、ベクター系は通常、二元ベクター系と呼ばれる。二元ベクター系は、Gynheung An et al., (1980), Binary Vectors, Plant Molecular Biology Manual A3, 1-19にてより詳細に記述される。

【0435】

50

植物細胞の形質転換のために1つの例示的に使用される系は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) からの *Ti* プラスミド、又はアグロバクテリウム・リゾジーン (*Agrobacterium rhizogenes*) からの *Ri* プラスミドを使用する。An et al., (1986), *Plant Physiol.* 81, 301-305 and Butcher D.N. et al., (1980), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, eds.: D.S. Ingrams and J.P. Helgeson, 203-208。植物における、本明細書による、望むプロモーター又は構築物又はヌクレオチド配列の各導入方法の後、さらなるDNA配列の存在及び/又は挿入が必要であってもよい。もし例えれば、形質転換のために、植物細胞の *Ti* - 又は *Ri* - プラスミドを使用する場合、導入した遺伝子の隣接領域として、植物細胞の *Ti* - 又は *Ri* - プラスミド *T* - DNA の、少なくとも右境界、しかしながらしばしば右と左境界を連結可能である。植物細胞の形質転換のために *T* - DNA を使用することは、集中的に研究されてきており、
10 欧州特許第 E P - A - 1 2 0 5 1 6 号明細書 ; Hoekema, in: *The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kinters B.B.*, Alblasterdam, 1985, Chapter V; Fraley, et al., *Crit. Rev. Plant Sci.*, 4:1-46; and An et al., *EMBO J.* (1985) 4:277-284に記述される。

【0436】

培養及び產生

本記述のヌクレオチド配列、及び/又は本記述物の発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、コードされたポリペプチドの產生に伝導性であり、細胞及び/又は培養培地からポリペプチドの回収を促進する条件下で培養してもよい。
20

【0437】

細胞を培養するために使用した培地は、問題の宿主細胞を増殖させ、ポリペプチドの発現を得るために好適な、任意の従来の培地であってもよい。

【0438】

組換え細胞によって產生されたタンパク質は、細胞の表面上に提示されてもよい。

【0439】

タンパク質は、宿主細胞から分泌されてもよく、周知の手順を使用して、培養培地から従来通り回収されてもよい。

【0440】

分泌

一部の実施形態において、タンパク質を、発現ベクターから培養培地に分泌させ、そこからタンパク質が回収されてもよい。本記述に従って、分泌リーダー配列が、望む発現宿主の基礎に基づいて選択されてもよい。ハイブリッドシグナル配列をまた、本記述の文脈にて使用してもよい。
30

【0441】

異種分泌リーダー配列の典型的な例は、真菌アミログルコシダーゼ (AG) 遺伝子 (g1 a A - 例えはアスペルギルスからの18と24のアミノ酸バージョン)、a - 因子遺伝子 (酵母、例えはサッカロミセス、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 及びハンセンユラ (*Hansenula*))、又は - アミラーゼ遺伝子 (バチルス) から由来するものである。
40

【0442】

例として、大腸菌内での異種タンパク質の分泌が、*Methods Enzymol* (1990) 182:132-43で概説される。

【0443】

検出

アミノ酸配列の発現を検出及び測定するための種々のプロトコールが、当技術分野で公知である。例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、放射免疫アッセイ法 (RIA) 及び蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) が挙げられる。

【0444】

広く種々の標識及びコンジュゲーション技術が当業者によって知られており、種々の核酸及びアミノ酸アッセイにて使用可能である。
50

【 0 4 4 5 】

Pharmacia Biotech社 (Piscataway、NJ) 、Promega社 (Madison、WI) 及びUS Biochemical社 (Cleveland、OH) などのいくつかの会社が、これらの手順のための市販キット及びプロトコールを提供する。

【 0 4 4 6 】

好適なレポーター分子又は標識には、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光又は発色剤、並びに基質、共因子、阻害剤、磁気粒子などが含まれる。そのような標識の使用を教示している特許には、米国特許第A - 3 , 817 , 837号明細書、同第A - 3 , 850 , 752号明細書、同第A - 3 , 939 , 350号明細書、同第A - 3 , 996 , 345号明細書、同第4 , 277 , 437号明細書、同第A - 4 , 275 , 149号明細書及び同第A - 4 , 366 , 241号明細書が含まれる。10

【 0 4 4 7 】

また、組換え免疫グロブリンを、米国特許第A - 4 , 816 , 567号明細書にて示されたように生成してもよい。

【 0 4 4 8 】**融合タンパク質**

本明細書による使用のためのアミノ酸配列を、例えば抽出及び精製を補助するために、融合タンパク質として生成してもよい。融合タンパク質パートナーの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 、6×His、GAL4 (DNA結合及び/又は転写活性化ドメイン) 及び (-ガラクトシダーゼ) が挙げられる。これはまた、融合タンパク質配列の除去を許容するために、融合タンパク質パートナーと、目的のタンパク質配列の間に、タンパク質分解開裂部位を含んでもよい。20

【 0 4 4 9 】

典型的に、融合タンパク質は、タンパク質配列の活性を妨害しないであろう。

【 0 4 5 0 】

大腸菌内の遺伝子融合タンパク質系は、Curr Opin Biotechnol (1995)6(5):501 - 6にて概説された。

【 0 4 5 1 】

別の実施形態において、アミノ酸配列を、融合タンパク質をコードするために、異種配列にライゲーションしてもよい。例えば、物質活性に影響を与えることが可能な薬剤に対する、ペプチドライプラリーのスクリーニングのために、市販の抗体によって認識される、異種エピトープを発現しているキメラ物質をコードすることが有用であってもよい。30

【 0 4 5 2 】

本発明はさらに、以下の非制限的な実施例によって記述される。

[実施例]**【 0 4 5 3 】**

本発明の実施は、他に指摘しない限り、当業者の能力内である、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学の従来技術を使用するであろう。そのような技術は、文献に説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; and E. M. Shevach and W. Strober, 1992 and periodic supplements, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, NYを参照のこと。これらの40
50

一般的文書のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0454】

材料と方法

ロゼブリア属フラジェリン

フラジェリン多様性

ロゼブリア属細菌、とりわけ、ロゼブリア・ホミニス及びロゼブリア・インテスチナリスからのフラジェリンをクローニングし、発現させ、精製して解析した。

【0455】

図B1A及びB1Bは、組換えフラジェリンのSDS解析を示す。

【0456】

フラジェリンタンパク質命名：

ロゼブリア属

ロゼブリア種

ロゼブリア・ホミニス

ロゼブリア・ホミニスF1aA1（これはまた本明細書において、RhF1aA1又はRh1とも呼ばれる）

ロゼブリア・ホミニスF1aA2（これはまた本明細書において、RhF1aA2又はRh2とも呼ばれる）

ロゼブリア・インテスチナリス

ロゼブリア・インテスチナリスF1aA1（これはまた本明細書において、RiF1aA1又はRi1又はRI1とも呼ばれる）

ロゼブリア・インテスチナリスF1aA2（これはまた本明細書において、RiF1aA2又はRi2又はRI2とも呼ばれる）

ロゼブリア・インテスチナリスF1aA3（これはまた本明細書において、RiF1aA3又はRi3又はRI3とも呼ばれる）

ロゼブリア・インテスチナリスF1aA4（これはまた本明細書において、RiF1aA1又はRi4又はRI4とも呼ばれる）

【0457】

以下を参照のこと。

ELY, B., ELY, T.W., CRYMES, W.B., JR and MINNICH, S.A., 2000. A family of six flagellin genes contributes to the Caulobacter crescentus flagellar filament. Journal of Bacteriology, 182(17), pp. 5001-5004.

IBRAHIM, G.F., FLEET, G.H., LYONS, M.J. and WALKER, R.A., 1985. Method for the isolation of highly purified Salmonella flagellins. Journal of clinical microbiology, 22(6), pp. 1040-1044.

NEVILLE, B.A., FORDE, B.M., CLAESSEN, M.J., DARBY, T., COGHLAN, A., NALLY, K., ROSS, R.P. and O'TOOLE, P.W., 2012. Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by Lactobacillus ruminis and related motile Lactobacilli. PLoS one, 7(7), pp. e40592.

NG, S.Y., CHABAN, B. and JARRELL, K.F., 2006. Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 11(3-5), pp. 167-191.

WATSON, R.O. and GALAN, J.E., 2005. Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. Cellular microbiology, 7(5), pp. 655-665.

【0458】

細菌増殖条件

R. ホミニスA2-183^T (=DSM 16839^T=NCIMB 14029^T)を、Y C F A 培地中37℃にて嫌気的に増殖させた。培養液をスピンドラウンし、ペレットを1mLの、2%システィン(w/v、Sigma-Aldrich社)及び3%アスコルビン酸(w/v、Sigma-Aldrich社)を補充したY C F A 培地中に再懸濁させた。

10

20

30

40

50

【0459】

R. インテスチナリス L 1 - 8 2^T (= D S M 1 4 6 1 0^T = N C I M B 1 3 8 1 0^T) を、 Y C F A 培地中 3 7 にて嫌気的に増殖させた。培養液をスピンドル下し、ペレットを 1 m L の、 2 % システイン (w / v、 Sigma-Aldrich 社) 及び 3 % アスコルビン酸 (w / v、 Sigma-Aldrich 社) を補充した Y C F A 培地中に再懸濁させた。

【0460】

マウス

C 3 H / H e N 及び C 5 7 B 1 / 6 を、 Harlan Laboratories 社より購入した。 G F C 3 H / H e N は、 Jouy-en-Josas (ANAXEM プラットフォーム、 Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France) の INRA ノトバイオート齧歯類ブリーディング施設中で提供され、維持した。 G F T L R 5 K O 及び野生型 C 5 7 B 1 / 6 は、 Andrew Gewirtz (Center for Inflammation, Immunity, and Infection and Department of Biology, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, USA) によって提供され、 Jouy-en-Josas の INRA ノトバイオート齧歯類ブリーディング施設中で維持された。従来の T L R 5 K O 及び野生型 B O Y / J は、 Adam Cunningham (MRC Centre for Immune Regulation, Institute of Microbiology and Infection, Division of Immunity and Infection University of Birmingham UK) より提供された。マネージメント及び実験手順は、それぞれのローカル倫理レビュー委員会によって許可された。

【0461】

動物実験

無菌動物実験を、 Jouy-en-Josas (ANAXEM プラットフォーム、 Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France) の INRA ノトバイオート齧歯類ブリーディング施設にて実施した。 G F C 3 H / H e N 雄マウスを、 対照 (N = 8) と処置 (N = 10) 群に割り当て、個々にプラスチック単離体中にケージした。 0 、 1 、 2 日目に、処置群の動物に、 1 0 0 μ L の R. ホミニス培養液を、強制飼養によって与え、一方で対照動物には 1 0 0 μ L Y C F A 培地を与えた。回腸、上行結腸及び盲腸試料を 1 4 日及び 2 8 日で回収した。 6 匹の G F C 3 H / H e N 雄マウスを、以上で記述したように、大腸菌 MG 1 6 5 5 (K 1 2) で処置し、 3 匹の動物を 1 0 日及び 2 2 日で犠牲死させ、 N = 3 を得た。 3 匹の G F T L R 5 K O マウスと 3 匹の C 5 7 B 1 / 6 WT マウスに、以上で記述したように R. ホミニス培養液を接種させ、 R. ホミニスフラジェリンの機能的重要性を評価した。 2 8 日後、 3 匹の動物を、それらの G F カウンターパートと一緒に犠牲死させた。 2 2 匹の雌 C 5 7 B 1 / 6 マウスに、毎日 5 0 μ L の 1 0⁹ C F U R. ホミニスを、 1 4 日間投与した。対照動物に、培養培地のみを投与した。 8 日から、マウスに、それらの飲み水中 D S S (MW 5 0 k D a, 3 0 g / l) を、 6 日間与えた。動物を 1 4 日目に安樂死させ、組織サンプリングを以上で記述したように実施した。

【0462】

組織培養実験

C a c o - 2 (ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 上皮結腸直腸がん細胞) 及び H T 2 9 (ホモ・サピエンス結腸直腸がん) 細胞を、トランスウェルプレート内で、嫌気ワーカーステーション内で増殖させた。 R. ホミニス A 2 - 1 8 3 培養液又は R. インテスチナリス L 1 - 8 2^T を、指数増殖期に回収し、 1 0 0 μ L の細菌懸濁液 (1 0⁸ C F U / m l) を実験ウェルに加えた。細菌 (非接着及び接着) 及び真核細胞 (C a c o - 2 及び H T - 2 9) を、 2 時間及び 4 時間インキュベーション後に回収し、 RNAlater 中に保存した。組換えフラジェリンでの組織培養実験のために、 5 × 1 0⁴ C a c o - 2 細胞を、 5 % C O₂ の 7 5 % 加湿大気中、 3 7 にて 2 4 ウェルプレート中で増殖させた。細胞が、 5 ~ 6 日目にコンフルエンスに達し、コンフルエンス 3 日後使用した。細胞を、 5 % C O₂ の 7 5 % 加湿大気中、 3 7 にて 2 時間、最終濃度 1 0 0 n g / μ l にて、組換えフラジエリンとともにインキュベートした。

【0463】

F I S H 解析

10

20

30

40

50

FISH解析を、一般的細菌プローブEub338と、新規に設計したR.ホミニスA2-183特異的プローブと、R.インテスチナリスL1-82^T特異的プローブを使用して、中性緩衝化ホルマリン固定腸組織切片上で実施した。

【0464】

R.ホミニスライブラリー構築

小サイズライブラリー構築とバイロシークエンシングのためのR.ホミニスクロモソームDNAを、UltraClean(商標)Microbial DNA Isolation Kit(Mo Bio Laboratories社)を使用して単離し、ホスミドライブラリーのための高分子量DNAを、Wizard Genomic DNA Purificationキット(Promega社)を使用して単離した。

【0465】

10

マイクロアレイ解析

細菌マイクロアレイ

細菌RNAを、マウス盲腸内容物から単離し、さらに製造業者の推奨に従って、市販のキットを使用してさらに処理した。R.ホミニスの大腸菌プラスミドライブラリー中、6000クローンから増幅したPCR産物を、MicroGrid II TAS(BioRobotics社)を使用して、アミノシラン-コート顕微鏡スライド(Corning社)上で二重にアレイした。

【0466】

マウスマイクロアレイ解析

全RNAを回腸と上行結腸組織から抽出し、(使用したAffymetrixキットに依存して)ビオチン標識cRNA/aRNA内に処理し、標準技術を使用して、GeneChip NuGo Mouse Array及びGeneChip Mouse Genome Array(Affymetrix社)にハイブリッド形成した。データ解析を、ソフトウェアパッケージR(<http://www.r-project.org>)とBioconductor(<http://www.bioconductor.org>)にて実施した。

20

【0467】

RT-PCR解析

R.ホミニス-特異的プライマー5'-CCCACTGACAGAGTATGTAATGTAC-3'及び5'-GCACCACCTGTCACCAC-3'を、糞試料のPCR解析のために使用して、腸内定着レベルを検証した。リアルタイムPCR解析を、Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社)にて、7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems社)を使用して実施した。全ての試料を三重で走らせた。GyrAを、標準化の参照遺伝子として使用した。宿主遺伝子発現のために、回腸及び上行結腸から単離された真核生物全RNAを、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems社)を使用して、cDNA内に逆転写した。リアルタイムPCR解析を、QuantiFast SYBR Green PCR Kit(Qiagen社)及びQuantiTect Primer Assays(Qiagen社)にて、7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems社)を使用して実施した。全ての試料を三重で走らせた。Hprtを、標準化のための参照遺伝子として選択した。全てのRT-PCRデータを、P<0.05の有意差カットオフにて、一方向ANOVAにより塩基2を有するログスケール上で解析した。差違を逆変換して倍数変化を計算した。

30

【0468】

ウエスタンプロット

40

ロゼブリア・ホミニスF1aA1及びF1aA2に対する免疫精製ウサギポリクローナル抗体を、(Duck, L.W., Walter, M.R., Novak, J., Kelly, D., Tomasi, M., Cong, Y. & Elson, C.O. 2007, "Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease", Inflammatory bowel diseases, vol. 13, no. 10, pp. 1191-1201)にて記述されたように生成した。ウエスタンプロットのために、R.ホミニスを、種々の量(0.01g~1g 食餌/10mLの培養液)のUV照射標準マウス食の存在下、3時間増殖させ、濾過して食餌成分を除き、8M尿素を含むレムリー緩衝液中に希釈した。試料をNuPAGE(登録商標)Novex(登録商標)4~12% Bis-Trisゲル(Invitrogen社)上にロードし、電気泳動させ、続いてWesternBreeze Chromogenic Immunodetection System(Invitrogen社)を使用してさらに処理した。F1aA1及びF1aA2抗体を、1:1

50

000で使用し、1:300にてローディング対照抗DNAギラーゼA(Abcam社)、続いてアルカリホスファターゼコンジュゲート抗ウサギを使用した。検出を、ローディング対照発色と比べた、基質発色によって行った。

【0469】

免疫蛍光

R. ホミニスフラジエリンの免疫局在化を、F1aA1及びF1aA2フラジエリンタンパク質両方からの定義されたペプチド配列に対して作製させた特定の抗血清を使用して、マウスの結腸内容物にて試験した。腸内容物の塗抹したものを、前もって冷却したメタノールで固定し、抗F1aA1及び抗F1aA2ウサギ抗血清(CovaLabs社)とともに4にて終夜インキュベートし、Allexa口バ抗ウサギ488(Molecular Probes社)を使用して可視化した。
10

【0470】

T細胞マーカーを、連続8 μ mクライオセクション上で試験した。固定した組織切片を、Ly6G - FITC、CD3 - FITC、CD11b - FITC(BD Biosciences社)とともにインキュベートし、FoxP3(Abcam社)及びCD3 - FITC(BD Biosciences社)一次抗体又はイソ特異的IgGで二重標識した。切片を、DAPIで対比染色し、Vectashield(Vector Laboratories社)をマウントした。陽性細胞の定量化のために、それぞれのマウス切片から最小5視野を試験した。

【0471】

組換えフラジエリンのクローニング及び精製

20

フラジエリン遺伝子を、PCR増幅と精製によって、R. ホミニス、R. インテスキナリス、S. トリフィムリウム、S. エンテリティディス、エウバクテリウム・レクタル33656及び大腸菌K12の液体細菌培養液から単離した。Caco-2細胞を、5%CO₂の75%加湿大気中、37にて2時間、最終濃度100 μ g/ μ Lにて、組換えフラジエリンとインキュベートした。

【0472】

腸及びMLN細胞の単離

細胞を、小さな変更を行って、先に記述されるように(Monteleone, I., Platt, A.M., Jaansson, E., Agace, W.W. & Mowat, A.M. 2008, "IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function", European journal of immunology, vol. 38, no. 6, pp. 1533-1547)、小腸及び腸間膜リンパ節から単離した。簡単に、細胞懸濁液を、20%FBSを補充した RPMI中、100U/mLのコラゲナーゼVIII(Sigma-Aldrich社)と共に、37にて20分間(腸間膜リンパ節)又は1時間(腸部分)インキュベートした。単一細胞懸濁液を次いで、(示したように)フローサイトメトリーで解析した。
30

【0473】

骨髄誘導樹状細胞及び培養液の生成

骨髄を、C3H/HeN及びC57BL/6マウスの大腿骨及び脛骨から回収した。GM-CSF誘導樹状細胞のために、骨髄細胞を、10%FCS及び20ng/mL r m GM-CSFを補充したRPMI中、 1×10^6 /mLにて再懸濁させ、100mm²組織培養プレート中、10mL/プレートにて播いた。3日培養後、緩く接着性の細胞を集め、GM-CSF補充培地で、12ウェル組織培養プレート中、 1×10^6 /mLで再プレーティングした。5日目に細胞を100ng/mLフラジエリンで刺激して、6日目に回収した。F1t3L誘導樹状細胞のために、骨髄細胞を、10%FCS及び200ng/mL r m F1t3を補充したRPMI中、 2×10^6 /mLで再懸濁し、2mL/ウェルにて、12-ウェル組織培養プレート中に播いた。細胞を10日間、4日目に各ウェルに加えた、F1t3補充培地で培養した。9日目に細胞を100ng/mLフラジエリンで刺激し、10日目に回収して、フローサイトメトリーによって解析した。
40

【0474】

フローサイトメトリー

50

固有層細胞及び樹状細胞の単一細胞懸濁液を、特定の蛍光団コンジュゲート抗体で染色する前に、4にて15分間、（血清及びCD16 / CD32抗体を含む）ブロッキング緩衝中でインキュベートした。固有層細胞を、マウスCD4 - FITC及びCD25 - APC (eBioscience社)、CD8 - APC - Cy7及びCD3 - PerCP (Biolegend社)に対する抗体で標識した。細胞内FoxP3標識を、製造業者の説明書 (eBioscience社)に従って、細胞外染色と細胞固定／透過性上昇の後に実施した。GMCSF誘導樹状細胞を、抗体CD11c - PE - Cy7、CD11 - PerCP Cy5、I-A/I-E、APC - Cy7、CD80 - PE、CD86 - APC、CD8 - FITC、B220 - BV570で標識した。Flt3誘導樹状細胞を、CD11c - PE - Cy7 -、CD11b - 又はSingle-H - PerCP Cy5 -、I-A/I-E - APC - Cy7、CD317 - - PE、CD40 - APC、CD103 - FITC、B220 - BV570で標識した。細胞を、FACSAria (BD Biosciences社)及びFlowJoソフトウェアバージョン7.2.5を使用して解析した。

【0475】

サイトメトリックビーズアレイ (CBA)

骨髄細胞を、C3H / HeN及びC57BL / 6マウスの大腿骨及び脛骨から単離し、先に記述したように、RPMI培地でFlt3L増殖させた。細胞を、100ng / mL フラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）で、培養の9日後に刺激し、上清を10日目に回収した。実験を、N = 3を作製するために、3つの別の機会で実施した。

【0476】

CBA解析を、Cytometric Bead Array Mouse Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit (BD Bioscience社)を使用して細胞上清上で実施した。標準と試料をFACSArray (BD Biosciences社)内の測定のために、96ウェルプレート上にロードした。結果を、BD FCAPソフトウェア (BD Biosciences社)を使用して解析した。

【0477】

組織学的分析

上行結腸組織試料を、中性緩衝化ホルマリン (Sigma社) 中で固定し、冷硬化樹脂中に包埋し、4 μm組織切片を、標準のヘモトキシン / エオシン法を使用して染色した。各動物からの大腸の、完全横行交差区画領域を、Image Pro Plusソフトウェアによって制御されたQimagingカメラを使用して、Zeiss Axioskop顕微鏡上、×200倍率で撮像した。各視野を次いで、(Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W. & Rennick, D. 1996, "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses", The Journal of clinical investigation, vol. 98, no. 4, pp. 1010-1020)に基づいた方法に従って、0 ~ 4までスコア化した。該グレードでの視野の平均百分率を計算し、処置群をスチューデントのt検定を使用して比較した。

【0478】

さらなる詳細なプロトコールを、補足材料及び方法において記載する。

【0479】

補足情報 (SI) 材料及び方法

細菌増殖条件

R. ホミニスA2 - 183^T (=DSM 16839^T =NCIMB 14029^T)を、YCF A培地中37にて嫌気的に増殖させた。培養液を、Hungateチューブ内に、凍結ストックから接種して、37にて終夜インキュベートした。細菌を、MACS-MG-1000 嫌気ワーカステーション (Don Whitley Scientific社) 中、80% N₂、10% CO₂及び10% H₂のもと、37にて48時間、M2GSC寒天プレート上で増殖させた。ムチンの効果をIII型ブタ胃からの0.5% (w/v) ムチン (Sigma-Aldrich社) をYCF A培地に加えることで調査した。

【0480】

10

20

30

40

50

無菌（G F）マウスへの定着のために、R. ホミニスを、37にて終夜Y C F A 培地中で増殖させた。培養液を、培養液をスピンドルダウンし、ペレットを1mLの、2%システィン（w / v、Sigma-Aldrich社）及び3%アスコルビン酸（w / v、Sigma-Aldrich社）を補充したY C F A 培地中に再懸濁させた。

【0481】

マウス

C 3 H / H e N 及び C 5 7 B 1 / 6 を、Harlan Laboratories社より購入した。G F C 3 H / H e N は、Jouy-en-Josas (ANAXEMプラットフォーム、Institut Micalis、INRA、Jouy-en-Josas、France) の I N R A ノトバイオート齧歯類ブリーディング施設中で提供され、維持した。無菌 T L R 5 K O 及び野生型 C 5 7 B 1 / 6 は、Andrew Gewirtz (Center for Inflammation, Immunity, and Infection and Department of Biology, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, USA) によって提供され、Jouy-en-JosasのI N R A ノトバイオート齧歯類ブリーディング施設中で維持された。マネージメント及び実験手順は、それぞれのローカル倫理レビュー委員会によって許可された。
10

【0482】

マウス実験

18匹のG F C 3 H / H e N 雄マウスを、対照（N = 8）と処置（N = 10）群に割り当て、個々にプラスチック単離体中にケージした。マウスに滅菌した市販の食餌（R 0 3 - 4 0 ; U A R）を不断給餌した。0、1、2日目に、処置群の動物に、100 μLのR. ホミニス培養液を、強制飼養によって与え、一方で対照動物には100 μL Y C F A 培地を与えた。14日目及び28日目に、4匹の対照動物と5匹のR. ホミニス - 処置動物を犠牲死させた。回腸、上行結腸及び盲腸試料を4つの等しい部分に分け、RNAlater (Ambion社)、中性緩衝化ホルマリン（N B F、Sigma-Aldrich社）又は液体窒素に移した。全盲腸をRNAlaterに移した。
20

【0483】

R. ホミニスに対する応答の特異性を示すために、6匹のG F C 3 H / H e N 雄マウスを、大腸菌M G 1 6 5 5 (K 1 2) で処理し、以上で記述したように、3匹の動物を10日及び22日に犠牲死させ、N = 3を得た。

【0484】

3匹のG F T L R 5 K O マウスと、3匹のC 5 7 B 1 / 6 W T マウスに、以上で記述したように、R. ホミニス培養液を接種し、R. ホミニスフラジエリンの機能的重要性を評価した。28日後、これらの動物を、それらのG F カウンターパートと一緒に犠牲死させた。
30

【0485】

22匹の雌C 5 7 B L / 6 マウス（6週齢）を使用して、D S S - 誘導大腸炎の間の、R. ホミニスの治療的效果を評価するために使用した。7 ~ 10日の順応期間の後、マウスに、毎日50 μLの10⁹ C F U R. ホミニスを、14日間投与した。対照動物に、培養培地のみを投与した。8日目から、マウスに、それらの飲み水中D S S (MW 50 kDa、30 g / l)を、6日間与えた。動物を14日目に安楽死させ、組織サンプリングを以上で記述したように実施した。
40

【0486】

組織培養実験

全ての細胞培養試薬は、他に特定しない限り、Sigma-Aldrich社により供給された。嫌気性条件中の組織培養実験のために、熱不活性化ウシ胎児血清（Gibco社）、ペニシリソ、ストレプトマイシン、アンホテリシンB及びL - グルタミンを補充した、1.5mL D M E M (高グルコース、H E P E S) 培地中、2 × 10⁵ C a c o - 2 又はH T 2 9 細胞を、6 ウェルトランスウェルプレート (Corning社) の上コンパートメントに播いた。下コンパートメントは、3.0mLの同一の培地を含んだ。細胞を、コンフルエンス3日後まで、37にて、5%CO₂ 大気中でインキュベートし、H a n k s の溶液で洗浄して、抗生物質とF C S を除去し、L - グルタミン、ナトリウムセレナイト及びトランス
50

フェリンを補充したD M E M 中で、抗生物質なしで24時間ステップダウンした。トランスウェル挿入物を次いで、嫌気性ワークステーション内の嫌気性培養箱に、37で移した。各挿入物の上コンパートメントを、嫌気性D M E M 細胞培地で満たし、一方で下コンパートメントを、酸素化D M E M で満たした。

【0487】

R. ホミニスA 2 - 183 培養液を、3, 500 × g にて5分間の遠心分離によって、指數増殖期で回収した。ペレットを洗浄し、0.8 mL 嫌気性D M E M 中に再懸濁させた。100マイクロリットルの細菌懸濁液(10^8 CFU / mL)を実験ウェルに加えた。対照ウェルに、細菌細胞を含まない同量の培地を入れた。さらなる対照は、Caco-2 又はHT29 細胞なしでインキュベートした細菌細胞を含んだ。細菌及び原核細胞を、2 時間及び4時間インキュベーションの後に回収した。被接触及び接触細菌両方を吸引し、RNAlater (Ambion社) 中に保存した。R. ホミニス細胞の生存力を、Y C F A プレート上へのプレーティングによって試験した。Caco-2 細胞又はHT-29 細胞をウェルから回収し、RNAlater にて保存した。
10

【0488】

R. インテスチナリスL 1 - 82^T (= D S M 14610^T = N C I M B 13810^T) 培養液を、3, 500 × g にて5分間の遠心分離によって、指數増殖期で回収した。ペレットを洗浄し、0.8 mL 嫌気性D M E M 中に再懸濁させた。100マイクロリットルの細菌懸濁液(10^8 CFU / mL)を実験ウェルに加えた。対照ウェルに、細菌細胞を含まない同量の培地を入れた。さらなる対照は、Caco-2 又はHT29 細胞なしでインキュベートした細菌細胞を含んだ。細菌及び原核細胞を、2 時間及び4時間インキュベーションの後に回収した。被接触及び接触細菌両方を吸引し、RNAlater (Ambion社) 中に保存した。R. インテスチナリス細胞の生存力を、Y C F A プレート上へのプレーティングによって試験した。Caco-2 細胞又はHT-29 細胞をウェルから回収し、RNAlater にて保存した。
20

【0489】

組換えフラジエリンでの組織培養実験のために、 5×10^4 Caco-2 細胞を、5 % CO₂ の75% 加湿大気中、37 にて、熱不活性化ウシ胎児血清(Gibco社)、ペニシリソ、ストレプトマイシン、アンホテリシンB及びL-グルタミンを補充したD M E M (高グルコース、H E P E S) 培地中で、24ウェルプレートに播いた。細胞が、5~6 日目にコンフルエンスに達し、コンフルエンス3日後に使用した。処理の前に、細胞をHanks Balanced Salt Solutionで2回洗浄し、L-グルタミン、セレン及びトランスフェリンを補充したD M E M 中で24時間保持した。
30

【0490】

R. ホミニスライブラー構築

小サイズライブラー構築及びバイロシークエンシングのためのR. ホミニスクロモソームDNAを、UltraClean(商標) Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories社) を使用して単離し、ホスミドライブラーのための高分子量DNAを、Wizard Genomic DNA Purificationキット(Promega社)を使用して単離した。DNA完全性を、ゲル電気泳動によって確認した。
40

【0491】

DNAを、Nebulizer Kit (Invitrogen社)を使用して機械的に剪断し、ゲル電気泳動で分画した。所望のサイズのDNA断片をゲルから切り取り、Wizard(登録商標) SV Gel 及びPCR Clean-upシステム(Promega社)を使用して精製した。末端修復を、DNA Terminator End Repair Kit (Lucigen社)で実施した。1.5~3.5 kb 断片を、CloneSmart(登録商標) LCAmp Kit (Lucigen社)を使用してクローニングし、4~8 kb ライブラーを、pJAZZ(登録商標) OC Vector (Lucigen社)を使用して構築した。ホスミドライブラーを、CopyControl(商標) CopyControl (Epicentre Biotechnologies社)を使用して構築した。コロニーを、自動化コロニーピッカー(BioRobotics BioPick社、Genomic Solutions社)を使用して採取し、70 μLの、10%グリセロール及び相当する抗生物質
50

を補充した $2 \times L$ B 培地を含む 384 ウェルマイクロタイプレートに保管した。細胞を 37℃ にて終夜、振とうしながら増殖させ、-80℃ にて保存した。

【0492】

シークエンシング、アセンブリ及び注釈

小サイズライブラリーのシークエンシングの鋳型を、1 μ のクローンバイオマスと、pS MART-LCAmpのクローニング部位の周辺であるプライマー S L 1 及び S R 2 を使用して、PCR によって産生した。PCR 産物を、Multiscreen PCR Clean-up フィルタープレート (Millipore社) を使用して精製した。pJAZZ (登録商標) -OC クローンからの組換えDNAを、Wizard (登録商標) SV96 Plasmid DNA Purification System (Promega社) を使用して単離した。ホスミドDNAを、FosmidMAX (商標) DNA Purification Kit (Epicentre社) を使用して単離した。異なる挿入物サイズを有する R. ホミニス WGS ライブラリーの末端リードを、CEQ8000 (Beckman Coulter社) 及び ABI3770 (Applied Biosystems社) DNAシークエンサーを使用して得た。R. ホミニスからのゲノムDNAをまた、454 GS20 (454 Life Sciences社) 及び 454 FLX sequencers (Roche社) を使用して配列決定した。Sanger 及び 454 データを、MIRA バージョン 3 (http://chevreux.org/projects_mira.html; Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB); 1999。R A S T 注釈パイプライン (<http://rast.nmpdr.org>; Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Diss T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics 2008 Feb 8;9:75-2164-9-75) を、ゲノムの自動化及びマニュアル注釈のためにも、比較ゲノム解析のためにも使用してもよい。R. ホミニス A2-183 の注釈されたゲノム配列を受託番号 C P 0 0 3 0 4 0 下、GenBank に申請した。

【0493】

マイクロアレイ解析

細菌マイクロアレイ

細菌 RNA を、RNeasy Mini Kit (Qiagen社) を使用してマウス盲腸内容物から単離し、さらに MICROBEnrich (商標) Kit (Ambion社) 、 MICROBExpress (商標) Bacterial mRNA Enrichment Kit (Ambion社) 、及び MessageAmp (商標) II-Bacteria RNA Amplification Kit (Applied Biosystems社) で処理した。RNA を、cDNA 合成 (CyScribe First Strand cDNA Labelling Kit; Amersham社) の間、dCTP-Cy3 又は dCTP-Cy5 のいずれかで標識した。標識した産物を、CyScribe GFX Purification Kit (Amersham社) を使用して精製した。PCR 産物を、R. ホミニスの大腸菌プラスミド RA8 ライブラリー中、6000 クローンから増幅し、MicroGrid II TAS (BioRobotics社) を使用して、アミノシラン被覆顕微鏡スライド (Corning社) 上で二重にアレイした。ハウスキーピング遺伝子 rpoD と gyrA の増幅した断片を、無作為に、対照としてアレイに分布させた。マイクロアレイハイブリダイゼーションを、GeneTAC hybridization station (Genomic Solutions社) 中で実施した。色素標識を、第二ハイブリッド形成のためにスワップし、別の RNA 精製を標識し、2回ハイブリダイズし、再現性を確かにし、統計学的に有意な結果を得た。全部で、4つのスライドを、合計 12 のハイブリダイゼーションスポット / 増幅したクローンに対して、各比較のためにハイブリッド形成した。蛍光を、GeneTAC Integrator バージョン 3.0.1 ソフトウェアと共に、GeneTAC LS IV (Genomic Solutions) を使用して 2 チャンネルで測定した。スポット強度をログ変換し、Loess 標準化を適用して、プローブ標識とハイブリダイゼーション効率における差違を取り除いた。1 標本 t 検定を、ログ - 比値上で使用して、異なる発現に対して試験した。データは、倍数変化 > 2 及び P < 0.05 の時に有意であると考えた。

【0494】

マウスマイクロアレイ解析

回腸及び上行結腸組織を RNAlater から除去し、Trizol (Invitrogen社) 中に溶解した。RNA を標準のクロロホルム / イソプロパノールステップを使用して単離した。全 RNA

をさらに、RNaseフリーDNase I (Qiagen社) 消化ステップを含む、RNeasy Kit (Qiagen社) で精製した。RNA完全性を、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies社) を使用して決定した。全RNAを、One-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix社) を使用してビオチン標識cRNA内に、又は3'IVT Express Kit (Affymetrix社) を使用してビオチン標識aRNA内に処理した。GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix社) 上GeneChip NuGo Mouse Array及びGeneChip Mouse Genome Array (Affymetrix社)へのハイブリダイザーションを、Institute of Medical Sciences Microarray Core Facility (University of Aberdeen、UK) にて実施した。チップを、Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix社) でスキャンした。イメージ品質解析を、Gene Chip Operating Software (GCOS) (Affymetrix社) を使用して実施した。さらに、データ解析を、自由に利用可能なソフトウェアパッケージR (<http://www.r-project.org>) 及びBioconductor (<http://www.bioconductor.org>) にて実施した。Bioconductorパッケージリマによって提供された調整F検定を使用して、異なった発現について試験した。データは、Benjamini and Hochberg偽発見法を使用して、 $P < 0.05$ である時に有意であると考慮した。統計解析を、2つの時間点のそれぞれに対して別々に実施した。全ての示差的に発現した遺伝子 ($P < 0.05$) を、MetaCore解析ソフトウェア (GeneGo社、St Joseph、MI) に入力し、経路マップを作製した。統合された経路の濃縮解析を、知識に基づく標準的な経路と外因性代謝経路を使用して実施した。関連する統合された経路のランク付けは、超幾何学的分布を使用して計算したP値に基づいた。P値は、偶然に、マップ内の特定の数の遺伝子と適合するために、入力リストからの該遺伝指數の可能性を提示し、実験における遺伝指數と、マップ上の全ての遺伝子の完全組内のマップ中の遺伝子数とを考慮する。

【0495】

データの遺伝子オントロジー (GO, Gene Ontology) に基づく機能通訳を、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)、本来のウェブアクセス可能なプログラムの拡張バージョンを使用して実施した (Dennis G, Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol 2003;4(5):P3)。有意に異なった転写 ($P < 0.05$) を、特定のGO条件に対して有意に濃縮された遺伝子発現の明るみに出たパターンに対して、GOカテゴリー「Biological Process」を配置した。

【0496】

マイクロアレイデータを、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (受託番号GSE25544; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) に提出した。

【0497】

R T - P C R 解析

R.ホミニス特異的プライマー-5'-CCCACTGACAGAGTATGTAATGTAC-3' 及び5'-GCACCACCTGTC ACCAC-3'を、糞試料の半定量、リアルタイムPCR解析のために使用して、腸内定着レベルを検証した。さらに、細菌PCRプライマーを、オンラインツールPrimer3Plus (Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 2007 Jul;35(Web Server issue):W71-4) を使用して設計し、Sigma-Aldrich社から購入した。リアルタイムPCR解析を、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems社) にて、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems社) を使用して実施した。PCRを、以下のように実施した。95℃にて10分間を1サイクル、続いて95℃にて15秒間及び60℃にて1分間を40サイクル、解離ステップにて終了。全ての試料を三重に走らせた。GyrAを、その試料間での低い変化により、標準化のための参照遺伝子として使用した。

【0498】

宿主遺伝子発現のために、盲腸及び上行結腸から単離した2μgの真核生物全RNAを、無作為プライマーにて、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Bi

10

20

30

40

50

osystems社)を使用して、cDNA内に逆転写した。リアルタイムPCR解析を、Quant-i Fast SYBR Green PCR Kit (Qiagen社)及びQuantiTect Primer Assays (Qiagen社)にて、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems社)を使用して実施した。PCRサイクル条件は、以下のようであった。95℃にて5分間を1サイクル、続いて、95℃にて10秒間と60℃にて30秒間を40サイクル、解離ステップにて終了。全ての試料を三重で走らせた。Hprtを、その試料間での低い変化により、標準化のための参照遺伝子として選択した。

【0499】

全てのRT-PCRデータを、 $P < 0.05$ の有意差カットオフにて、一方向ANOVAにより塩基2を有するログスケール上で解析した。差違を形質転換戻して、倍数変化を計算した。10

【0500】

ウエスタンプロット

ロゼブリア・ホミニスF1a1及びF1a2に対する免疫精製ウサギポリクローナル抗体を、Duck LW, Walter MR, Novak J, Kelly D, Tomasi M, Cong Y, et al. Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2007 Oct;13(10):1191-1201において報告された通りに產生した。簡単に、ニュージーランド白メスウサギを、完全フロイトアジュvant中合成ペプチドで免疫化し、数回ブーストした。R.ホミニスF1a1のために、ペプチドNH2-CRSQVRGLNKASDNA-CONH₂とペプチドNH2-IDGNFTSKKLQVGSLC-COOHとを使用し、一方でR.ホミニスF1a2のためにペプチドC-AQYNDDAKSVLEILK-COOHとペプチドC-GLNKASRNSQDGIS-CONH₂とを使用した。免疫化に続いて、抗体を、ペプチドを1mLの活性化セファロースビーズに結合することによって調製した免疫アフィニティーカラム上で精製した。20

【0501】

ウエスタンプロットのために、R.ホミニスを、種々の量(0.01g~1g食餌/10mLの培養液)のUV照射標準マウス食の存在下、3時間増殖させ、濾過して食餌成分を除き、8M尿素を含むレムリー緩衝液中に希釈した。30μLの各試料を、NuPAGE(登録商標)Novex(登録商標)4~12% Bis-Trisゲル(Invitrogen社)上にロードし、電気泳動させ、続いてWesternBreeze Chromogenic Immunodetection System(Invitrogen社)を使用してさらに処理した。F1a1及びF1a2抗体を、1:1000で希釈し、4℃にて終夜インキュベートし、抗体希釈剤中1:300にて希釈した対照抗DNAギラーゼA(Abcam社)にロードし、続いてアルカリホスファターゼ共役抗ウサギにて1時間、室温にてインキュベートした。検出を、ローディング対照発色と比べた、基質発色によって行った。30

【0502】

FISH解析

中性緩衝化ホルマリン中で固定した組織を、Technovit 8100(Heraeus Kulzer社)中に包埋した。2ミクロン切片を、ロータリーマイクロトーム(Leica/Reichert Autocut社)を使用して切断した。100μm、200μm及び300μmにてスライドごとに3つの切片を組織内に取り、動物あたり9つの切片を得た。40

【0503】

スライドを、50%(v/v)、80%及び96%エタノール中の連続インキュベーションによって脱水し、室温(RT)にて乾燥させた。使用した16S rRNA FISHプローブを、一般細菌プローブEub338(GCTGCCTCCGTAGGAGT; Cy3)と、腸細菌単離物のパネルに対する特異性を広範囲にわたりて試験した、新規に設計したR.ホミニスA2-183特異的プローブ(GTACATTACATACTCTGTCAGTG; FITC)であった。100μLハイブリッド形成緩衝液中の10マイクロリットルプローブ(30ng/μL)を、脱水した試料に適用し、プローブ特異的温度でインキュベートした。スライドを、50℃にて30分間、洗浄緩衝液で洗浄し、氷冷水中に漬けて残留する洗浄緩衝液を除去し、圧縮空気流下乾燥させた。対比染色を、4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(50

D A P I ; Vector Laboratories Inc社)で実施し、スライドに蛍光用のVectashield Mounting Medium (Vector Laboratories Inc社)をマウントして、減衰を防止した。細菌を、Leica DM RBE蛍光顕微鏡 (Leitz GMBH社)を使用して可視化し、Penguin 600CLカメラ (Pixera社)とViewfinder 3.0ソフトウェア (Studio Lite社)で撮影した。高倍率画像 ($\times 630$)を、Apochromaticsシステム (Leica社)を使用してレトリーープした。

【0504】

免疫蛍光

R. ホミニスフラジエリンの免疫局在化を、F1a1及びF1a2フラジエリンタンパク質両方から、定義したペプチド配列に対して作製した特定の抗血清を使用して、R. ホミニスが定着したマウスの、結腸内容物中で試験した。腸内容物をPBS中で希釈し、ガラススライド上に塗り、風乾した。塗ったものを、前もって冷却したメタノール中、5分間 - 20 にて固定し、抗F1a1又は抗F1a2ウサギ抗血清 (1 : 125、CovaLabs社)と4にて終夜インキュベートし、Allexaロバ抗ウサギ488 (1 : 1000、Molecular Probes社)を使用して可視化した。

【0505】

切片を、先に冷却したメタノール中、-20 にて30分間固定した。T細胞マーカーの免疫局在化を、連続低温切開片 (8 μm)上で試験した。切片を、先に冷却したメタノール中、-20 にて30分間 (Ly6G FITC、CD3 FITC、CD11b FITC、すべて1 : 50 (BD Biosciences社))、又は1%パラホルムアルデヒド (PFA)中、RTにて2分間固定した、CD3 FITC (1 : 100、BD Biosciences社)で二重標識したFoxP3 (1 : 500、Abcam社)のために続いてPBS中0.01% Triton X中3分間、いずれかで固定した。すべての切片を、PBS (pH 7.4)中10%関連前免疫血清を含む、10%BSA (Sigma社)でブロックした。メタノール固定組織を、一次抗体と一緒に、RTにて1時間インキュベートした。PFA固定切片を、抗体と共に、4にて終夜インキュベートした。FoxP3を、Allexaヤギ抗ウサギ594 (1 : 1000、Molecular Probes社)を使用して可視化した。切片を、DAPIにて対比標識し、Vectashield (Vector Laboratories社)でマウントした。陽性細胞の定量のために、それぞれのマウス切片から、最小5視野を、以上で記述した、イメージングソフトウェアと顕微鏡設定を使用して試験した。

【0506】

組織学

上行結腸組織試料を、一定に攪拌しながら、室温にて中性緩衝化ホルマリン (Sigma社)中で3時間固定した。試料をPBS中ですすいで、次いで70%エタノールに移し、横断セクショニングまで室温にて保存し、製造業者説明書に従って、Technovit 8100 (Heraeus Kulzer社)を使用して冷硬化樹脂中に包埋した。包埋した組織を、Technovit 3040 (Heraeus Kulzer社)を使用して、Histoblocs上にマウントした。4 μ切片を、ガラスナイフ (TAAB Laboratories Equipment社)を備えたロータリーマイクロトーム (Leica Autocut社)を使用して切断した。組織切片を、標準のヘモトキシン / エオシン法を使用して染色した。各動物からの大腸の、完全横行交差区画領域を、Image Pro Plusソフトウェアによって制御されたQimagingカメラを使用して、Zeiss Axioskop顕微鏡上、 $\times 200$ 倍率でイメージ化した。次いで、Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. J.Clin.Invest., 1996, 98, 4, 1010-1020に基づいた方法に従って、各視野を、0 ~ 4までスコア化した。組織病理スコアは、0 = 浅い腺窩、浸潤性炎症細胞なし又はわずか。完全なままの上皮、ゴブレット細胞は、完全なムチンに見える (病原なし) ; 1 = 腺窩は、わずかに上皮細胞過形成を示しえ、いくつか拡散浸潤炎症細胞が腺窩間でみられ得、内腔上皮が完全なままで見え、ゴブレット細胞がムチンのわずか枯渇を表してもよい ; 2 = 粘膜下層にて、浸潤は見られないけれども、腺窩が、上皮過形成、ゴブレット細胞からのムチンの枯渇、浸潤炎症細胞が明確の異なる証拠を有してよ

10

20

30

40

50

り深くなる；3 = 病変が粘膜のより広い面積に関与し、及び／又はグレード2で見るよりも頻度が高い。病変は粘膜下層には関与しない。内腔上皮細胞は、小さな浸食を示す。病変は貫壁性ではない；4 = 腺窓上皮が浸食して見える。膿瘍が存在してもよい。内腔上皮細胞が異常に見え、しばしば完全に欠損。経粘膜浸潤が観察される - しばしば内腔への上皮細胞の完全な欠損に関連する。

【0507】

既定のグレードでの視野の平均百分率を計算し、処置群をスチューデントのt検定を使用して比較した。

【0508】

組換えフラジェリンのクローニング及び精製

10

フラジェリン遺伝子を、PCR增幅と精製によって、R.ホミニス、R.インテスキナリス、S.トリフィムリウム、S.エンテリティディス、エウバクテリウム・レクタル33656及び大腸菌K12の液体細菌培養液から単離した。R.ホミニスからの精製したフラジェリン断片を、発現ベクターpT7-MAT-Tag-FLAG (Sigma社) 内に挿入し、S.エンテリティディス及び大腸菌K12からのフラジェリン断片を、発現ベクターpGEX-6P-1 (GE Healthcare社) 内に挿入した。組換えフラジェリンを、プラスミドDNAの、それぞれ大腸菌BL21 Rosetta及び大腸菌BL21 (DE3) 細胞への形質転換と、1 mM IPTG (イソプロピルb-D-ガラクトシダーゼ) での誘導によって発現させた。フラジェリンを、製造業者の説明書に従って、FLAGビーズ (Sigma社) とNi-NTA (ニッケル-酢酸ニトリル) ビーズ (Clontech社、Takara社) で、細胞溶解物から回収した。調製物の純度を、クーマシーブルー溶液にて染色したSDS-PAGEによって査定した。フラジェリン断片の活性を、NF-B形質転換したCaco-2細胞株を使用して、製造業者の説明書に従って、Luciferase Assay (Promega社) によって決定した。

20

【0509】

Caco-2細胞を、最終濃度100ng/μLにて、組換えフラジェリンとともに、5%CO₂の75%加湿大気中、37°Cにて2時間インキュベートした。処理の後、細胞を、PBS溶液で2回洗浄し、全RNA単離のために回収した。

【0510】

腸及びMLN細胞の単離

30

細胞を、小さな変更を行って、以前に報告された通り (Monteleone I, Platt AM, Jaenson E, Agace WW, Mowat AM. IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function. Eur J Immunol. 2008;38(6):1533-47)、小腸及び腸間膜リンパ節から単離した。簡単に、細胞懸濁液を、20%FBSを補充した RPMI 中、100U/mLのコラゲナーゼVIII (Sigma-Aldrich社)と共に、37°Cにて20分間（腸間膜リンパ節）又は1時間（腸部分）インキュベートした。単一細胞懸濁液を次いで、（示したように）フローサイトメトリーで解析した。

【0511】

骨髄誘導樹状細胞及び培養液の作製

40

骨髄を、以前に報告された通り (Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ichihara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 1992 Dec 1;176(6):1693-1702、Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. Blood 2000 Nov 1;96(9):3029-3039、Weigel BJ, Nath N, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Chen W, Krieg AM, et al. Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. Blood 2002 Dec 1;100(12):4169-4176、Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH

50

. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. J Immunol 2007 Dec 1;179(11):7577-7584)、C3H/HeN及びC57BL/6マウスの大腿骨及び脛骨から回収した。GM-CSF誘導樹状細胞のために、骨髄細胞を、10% FCS及び20ng/mL rmGM-CSFを補充した RPMI中、 1×10^6 /mLにて再懸濁させ、 100mm^2 組織培養プレート中、10mL/プレートにて播いた。3日培養後、緩く接着性の細胞を集め、GM-CFS補充培地で、12ウェル組織培養プレート中、 1×10^6 /mLで再プレーティングした。5日目に細胞を100ng/mLフラジエリンで刺激して、6日目に回収した。Flt3L誘導樹状細胞のために、骨髄細胞を、10% FCS及び200ng/mL rmFlt3を補充した RPMI中、 2×10^6 /mLで再懸濁し、2mL/ウェルにて、12-ウェル組織培養プレート中に播いた。細胞を10日間、4日目に各ウェルに加えた、Flt3補充培地で培養した。9日目に、細胞を100ng/mLフラジエリンで刺激し、10日目に回収した。細胞を、穏やかにピベッティングすることによって、プレートより回収し、フローサイトメトリーによって解析した。

【0512】

フローサイトメトリー

固有層細胞、腸間膜リンパ節細胞及び樹状細胞の単一細胞懸濁液を、特定の蛍光団共役抗体で染色する前に、4にて15分間、（血清及びCD16/CD32抗体を含む）ブロッキング緩衝中でインキュベートした。固有層細胞を、マウスCD4-FITC及びCD25-APC（eBioscience社）、CD8-APC-Cy7及びCD3-PerCP Cy5.5及びB220-BV570（Biolegend社）に対する抗体で標識した。細胞内FoxP3標識を、製造業者の説明書（eBioscience社）に従って、細胞外染色と細胞固定／透過性上昇の後に実施した。GM-CSF-誘導樹状細胞を、抗体CD11b-PerCP Cy5.5（BD Biosciences社）、CD11c-PE-Cy7、I-A/I-E、APC-Cy7、CD80-PE、CD86-APC、CD8-FITC、B220-BV570（Biolegend社）で標識した。Flt3誘導樹状細胞を、CD11c-PE-Cy7-、CD11b-又はSinglec-H-PerCP Cy5.5（Biolegend社）、I-A/I-E-APC-Cy7、CD317-PE、CD40-Alexa Fluor 647、CD103-FITC、B220-BV570で標識した。細胞を、FACSAria II（BD Biosciences社）及びFlowJoソフトウェアバージョン7.2.5を使用して解析した。

【0513】

サイトメトリックビーズアレイ（CBA）

骨髄細胞を、C3H/HeN及びC57BL/6マウスの大軽骨及び脛骨から単離し、先に記述したように、RPMI培地でFlt3L増殖させた。細胞を、100ng/mLフラジエリン（例えばロゼブリア属フラジエリン）で、培養の9日後に刺激し、上清を10日目に回収した。実験を、N=3を作製するために、3つの別の機会で実施した。

【0514】

CBA解析を、製造業者の説明書に従ってCytometric Bead Array Mouse Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit（BD Bioscience社）を使用して細胞上清上で実施した。標準と試料をFACSArray（BD Biosciences社）内での測定のために、96ウェルプレート上にロードした。結果を、BD FCAPソフトウェア（BD Biosciences社）を使用して解析した。

【0515】

乾燥体重及び脂質枝肉解析

取り出したマウス枝肉を計量し、一定重量まで凍結乾燥し、ついで解析のために粉碎した。脂質含量を、以前に報告された通り（Olivera L, Canul RR, Pereira-Pacheco F, Cockburn J, Soldani F, McKenzie NH, et al. Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins), or starch. J Agric Food Chem 2003 Jan 1;51(1):319-325）、クロロホ

ルム / メタノール (2 : 1 v / v) での抽出 (1 : 1 0 0 w / v) によって決定した。

【 0 5 1 6 】

ロゼブリア属フラジェリンのクローニング

液体細菌培養液からのフラジェリン遺伝子の P C R による増幅

ロゼブリア・ホミニス A 2 - 1 8 3 フラジェリン配列を、 National Center for biotechnology Information (N C B I) ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より検索した。

【 0 5 1 7 】

ロゼブリア・インテスチナリス L 1 - 8 2 ^T (N C I M B = 1 3 8 1 0 ; D S M = 1 4 6 1 0 ^T) フラジェリン配列を、 National Center for biotechnology Information (N C B I) ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より検索した。 フラジェリン遺伝子とタンパク質の受託番号は、表 B にて提供される (表 B - 本明細書で記述したロゼブリア属フラジェリンに対する受託番号の要約) * * * 。

【 0 5 1 8 】

細菌からの全 R N A 単離

全 R N A を、 R N a s e フリー D N a s e I (Qiagen 社) 消化に連結し、 製造業者のプロトコールに基づいた、 RNAeasy ミニキット (Qiagen 社、 Sussex 、 UK) 1 m L のログ相細菌液体培養液から単離した。簡単に、 1 0 0 ミリリットルの液体培養液を、 1 . 5 m L チューブに入れ、 5 , 0 0 0 × g にて 5 分間、 4 にて遠心分離し、 上清を捨てた。細菌ペレットを、 1 0 0 μ L のリソザイム含有 T E 緩衝液 (1 0 m M Tris - H C l 、 1 m M E D T A 、 p H 8 . 0) 中に再懸濁し、 R T (室温) にてインキュベートした。グラム陽性細菌 R H (ロゼブリア・ホミニス) を、 3 m g / m L のリソザイム濃度にて 1 0 分間インキュベートした。 3 5 0 マイクロリットルの、 1 % - メルカプト - エタノールを含む溶解緩衝液をついで、チューブに加えて、ボルテックスすることによって細胞を破壊し、 2 5 0 μ L の 1 0 0 % エタノール (分子グレード、 Merck 社) を加えた。 7 0 0 マイクロリットルの得られた懸濁液を、受領チューブを適合した RNeasy ミニカラムに適用し、 8 . 0 0 0 × g にて 1 5 秒間遠心分離し、キャッチを空にした。再び、 3 5 0 μ l の洗浄緩衝液をカラムに適用し、 8 . 0 0 0 × g にて 1 5 秒間遠心分離し、フロースルーを捨てた。 D N a s e I を加え、 R T にて 1 5 分間インキュベートすることによって実施した。カラムを先に記述したように、 3 5 0 μ L の洗浄緩衝液で、次いで 5 0 0 μ L の R P E 緩衝液で 2 回洗浄した。空のカラムの、 8 . 0 0 0 × g にて 1 分間の遠心分離によるカラムの風乾の後、 4 0 μ L の R N a s e フリー水を、カラム上に直接加え、 R T にて 1 分間インキュベートして、 8 . 0 0 0 × g にて 1 分間遠心分離した。全 R N A を含む溶出液を、 N a n o d r o p 技術を使用して分光光度法で測定し濃度を決定した。 RINH ゲノム部 (University of Aberdeen 、 UK) によって R N A 完全性が、 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社) にて確認された。 9 . 5 ~ 1 0 の間の完全性番号を有する R N A (R I N) が、優れた品質であると考えられた。全 R N A を、後の使用まで、 - 8 0 にて保存した。

【 0 5 1 9 】

逆転写

全 R N A を、 製造業者の説明書に従って、 Quantitect reverse Transcription Kit (Qiagen 社) を使用して逆転写した。簡単に、 1 2 μ L の総容量中 1 マイクログラムの全 R N A を、 1 × g D N A ワイプアウト緩衝液にて、 4 2 で 2 分間、インキュベートし、さらに最終容量 2 0 μ L で、 1 × Quantiscript RT 緩衝液 (3 μ L) 、 R T プライマーミックス (2 μ L) 及び Quantiscript 逆転写酵素 (1 μ L) と混合した。逆転写プログラムは、 4 2 にて 1 5 分間、続いて 9 5 にて 3 分間であり、酵素を不活化させた。得られた相補 D N A (c D N A) 濃度は、 5 0 n g / μ L であり、 c D N A を、後の使用まで - 2 0 にて保存した。

10

20

30

40

50

【0520】

フラジエリン遺伝子のPCR増幅

ゲノムDNAからフラジエリンを増幅するために、フォワード及びリバースプライマーを手動で設計して、Sigma-Aldrich社（Poole、UK）から購入した。フラジエリン断片のPCRによる増幅を、5'末端にBglII制限部位を挿入するフォワードプライマーと、3'末端にてXbaI制限を挿入するリバースプライマーで実施した。

【0521】

ロゼブリア・ホミニス（f1a1）

フォワードプライマー（5' - 3'）：CTCGAGATATGGTAGTACAGCACAA

リバースプライマー（5' - 3'）：CTTAGATCTCTGTAATAAGGATAATA

10

ロゼブリア・ホミニス（f1a2）

フォワードプライマー（5' - 3'）：CTCGAGATATGGTGGTTAACATCAA

リバースプライマー（5' - 3'）：CTTAGATCTTTCAAAATCTCAAGCAC

ロゼブリア・インテスチナリス（F1a1）

フォワードプライマー（5' - 3'）：GCAGGGATCCATGCGTGGCGGAGACAAT

リバースプライマー（5' - 3'）：AATGTGGTGGTGGTGCTGCTGAGAACATGCAA

ロゼブリア・インテスチナリス（F1a2）

フォワードプライマー（5' - 3'）：CTCGAGATATGGTAGTTAACATCAA

リバースプライマー（5' - 3'）：CTTAGATCTTTAACATTCCAACAC

20

ロゼブリア・インテスチナリス（F1a3）

フォワードプライマー（5' - 3'）：CTCGAGATATGGTAGTACAGCACAA

リバースプライマー（5' - 3'）：CTTAGATCTCTGTAACAGAGAAAGTA

ロゼブリア・インテスチナリス（F1a4）

フォワードプライマー（5' - 3'）：CCGGGATCCATGGTAGTACAGCACAAT

リバースプライマー（5' - 3'）：TTAGTGGTGGTGATGATGATGCTGTAACAGAGAAAG

【0522】

鋳型として1μLの細菌培養液を使用して、フラジエリン遺伝子を、PCRによって増幅した。増幅のための温度プログラムを、最適KODポリメラーゼ（Novagen社、Madison、WI）機能に対してFermentas社（Fermentas GMBH社、Germany）から適合し、KODポリメラーゼを使用して、ポリメラーゼ活性化のために95℃にて2分間、続いて34サイクルの増幅、95℃にて20秒間、アニーリング温度にて10秒間、及び70℃にて20秒間、そして70℃にて2分間で終了した。PCRミックスの詳細は表1に提示する。PCR産物を、1%アガロースゲル上で30分間、120Vにて走らせ、目的のバンドを取り、精製した。挿入物をまず、製造業者の説明書に従って、Zero Blunt TOPO PCRクローニングキット（Invitrogen社）を使用して、そして図1A及び表1にて記述したように混合することによって、クローニングベクターpCR（商標）-Blunt II-TOPO内にクローニングした。

30

【0523】

【表5】

表 1:PCR 産物の pCR-BluntII-TOPO クローニングベクターへの挿入に関する混合物の組成。塩溶液とベクター-酵素混合物は、即時使用可能溶液であった。

成分	容量(μL)
PCR 産物	2
塩溶液	1
H ₂ O	2
ベクター-酵素混合物	1
合計	6

10

20

【0524】

PCR 産物の電気泳動分離及び精製

PCR によって増幅した単離フラジエリン産物を見るために、PCR 反応液を、1 × Blue-orange ローディング色素 (Promega社) と混合し、核酸を染色するための 0.5 μg / mL の臭化エチジウムを含む（煮沸し、ゲルトレイに注いだ TAE 緩衝液 (40 mM Tris 塩基、0.1% (v/v) 酢酸、1 mM EDTA) 中に希釈したアガロース 1% から作製した）1% アガロースゲル上にロードした。試料を、ランニング緩衝液として TAE を使用して、120V のもと、30 分間移動した。移動が完了した時に、ゲルを紫外線 (UV) 下で可視化し、産物を、参照標準を使用して同定子、きれいなスカルペルで切除した。ゲルスライスを次いで、先に計量したエッペンドルフチューブに移し、その重量を、空のチューブ重量から差し引いて計量した。PCR 産物を精製した。膜結合溶液をゲルスライスに、10 μL 溶液 / 10 mg アガロースゲルスライスの比で加えた。混合液について、頻繁にボルテックスしながら、65°にて 10 分間、ゲルスライスが完全に溶解するまでインキュベートした。チューブを RT にて簡単に遠心分離して、DNA 精製を進める前に、全ての含有物がチューブの底に存在したことを確かにした。この点から後、PCR を精製することには、製造業者の説明書に従って、Wizard (登録商標) SV Gel 及び PCR Clean-up システム (Promega社、Southampton、UK) を使用することが含まれた。1 SV ミニカラム / PCR 産物を回収チューブ内に配置した。PCR 産物を SV ミニカラムアセンブリに加え、室温 (RT) にて 1 分間インキュベートした。カラムを、16,000 × g にて 1 分間遠心分離し、流出を捨てた。次いで、カラムを 700 μL の膜洗浄溶液を加えることによって洗浄し、RT にて 5 分間遠心分離した。流出液を捨て、アセンブリを 1 分間再び回転させ、RT にて 2 分間乾燥させて、残余エタノールを蒸発させた。カラムについて、未使用の 1.5 mL ヌクレアーゼフリー チューブに移した。PCR 産物を回収するために、25 μL のヌクレアーゼフリー水を、カラムの中心に適用し、DNA を RT にて 1 分間インキュベーションによって溶出し、16,000 × g にて 1 分間回転させた。溶出液の濃度を、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific社) を使用して分光光度法で測定

30

40

50

し、-20で保存した。

【0525】

フラジエリンと発現ベクターの消化

200マイクロリットルの新たに解凍したDH5コンピテントセルを、氷及び4μLのPCR産物ミックス上で維持し、氷上に5分間置いた。熱ショックを、42にて1分間実施し、細胞を5分間氷上に戻し、400μLのSOC培地を加えた。SOC培地(Sigma社)は、主に、大腸菌コンピテントセル形質転換の回収ステップにて使用される、富栄養培地である。SOCの利用が、コンピテントセルの形質転換効率を最大化する。

【0526】

細胞を37にて1時間増殖させ、200μLのミックスを、カナマイシン50μg/mLを補充したLB寒天プレート上にプレーティングした。陽性クローンを、ミニプレップとして調製し、ナノドロップし、BamH1及びXho1にて、2時間消化して、フラジエリンを切除した。図2Aに描写した、発現ベクターpT7-MAT-Tag-FLAG-2(Sigma社)をまた、BamH1及びXho1にて消化した。1%アガロースゲル上の産物の分離の後、消化したベクターと断片の精製の後、すなわちベクターと挿入物を、4にて終夜ライゲーションして、大腸菌DH5aに形質転換した。ライゲーション産物を、アンピシリン100μg/mLを補充したLB寒天にプレーティングした。陽性クローンをミニプレップで調製し、大腸菌BL21(DE3)コンピテントセルに形質転換した。陽性コロニーを、適切なプライマーにて配列決定して、挿入物の存在を確認した。グリセロールアリコートを、陽性クローンから作製した。ロゼブリア属フラジエリンをコードする発現ベクターをさらに、ミニプレップとして調製し、大腸菌コンピテントセルに形質転換して、精製の収率を改善し、Rh1、Rh2及びRi2に対して、大腸菌コンピテントセルは大腸菌BL21Roseettaであり、RI3、Ri1、Ri4、Se、St、K12及びErに対して、大腸菌コンピテントセルは、大腸菌BL21(DE3)であった。

【0527】

ロゼブリア属フラジエリンの発現と精製

フラジエリン遺伝子(RH1又はF1aA1)をコードする形質転換大腸菌(例えばBL21Roseetta)を、180rpmでの振とう下、37にて、ログ相まで、アンピシリン(100μg/mL)を含む1リットルLB培地中で増殖させ、Rosetta細胞に対してクロラムフェニコール(50μg/mL)を補充した。培養液を3時間、同一の条件下で、1mM IPTGで誘導して、フラジエリンタンパク質の特定の発現を可能にした。細菌を、遠心分離4,000×g、4、10分間によってペレットとし、60mLの緩衝液1(50mM Tris(pH7.4)、150mM NaCl)中に再懸濁し、Soniprep150(Sanyo社、日本)で、BL21(DE3)を使用する場合は1分間、Rosettaを使用する場合は3分間、それぞれの分の後に1分間休憩で超音波処理した。細胞溶解物を、9,000×gにて10分間、4にて遠心分離し、上清を捨てた。不溶性タンパク質を含むペレットを、60mLの緩衝液2(50mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、5mM EDTA、0.5% Triton-X100、1mM DTT)中に再懸濁させ、完全な再懸濁まで再び超音波処理し、5,000×gにて15分間、4にて遠心分離した。不溶性画分を2回目、及び3回目で、緩衝液2で洗浄した。不溶性画分を、緩衝液2にて2回及び3回洗浄した。最後の洗浄を、以上で記述したように、Tx-100及びDTTなしの緩衝液2を使用して実施した。タンパク質を可溶化するために、不溶性画分を、4mLの尿素緩衝液(2M尿素、50mM Tris(pH7.4)、150mM NaCl)中に、超音波処理を使用して再懸濁させ、5,000×gにて5分間、RTにて遠心分離した。上清をデカントすることによって捨て、ペレットを、2mLの4M尿素、50mM Tris(pH7.4)、150mM NaCl中に、超音波処理によって再懸濁させ、5,000×g、5分間、RTにて遠心分離した。上清をデカントすることにより回収し、ペレットを、2mLの8M尿素、50mM Tris(pH7.4)、150mM NaCl溶液中に、超音波処理によって再懸濁させ、5,000×g、5分間、RTにて遠心分離した。上清をデカントする

ことにより回収し、4 M 尿素画分に混合し、可溶化フラジエリンを含む 6 M 尿素溶液を作製した。1 ミリリットルの Talon 樹脂 (Clontech社、Takara、UK) を、2 mL の緩衝液 1 (50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl) で 2 回洗浄し、1.000 × g、2 分間、RT にて遠心分離した。上清を捨て、フラジエリンを含む 6 M 尿素画分を加え、4 で 1 時間回転させた。遠心分離後、1.000 × g、2 分間、RT にて樹脂を、2 M 尿素、50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、15 mM イミダゾールを含む緩衝液で 2 回洗浄した。遠心分離後、樹脂を 10 分間、300 μL の溶出緩衝液 (360 mM Tris-HCl、680 mM イミダゾール、360 mM NaCl、0.35 N HCl、1.43 M 尿素) と共にインキュベートし、穏やかに混合し、溶出液を、2.000 × g にて 2 分間、RT での遠心分離の後に回収した。溶出を一度繰り返し、2 つの溶出液を混合した。抗 FLAG M2 磁気ビーズ (Sigma 社) を使用した第二精製ステップを実施して、タンパク質調製物の純度を改善した。400 マイクロリットルの超純水をゆっくりと、Talon 樹脂の溶出液に加え、FLAG ビーズに好適な、0.9 M 尿素の最終濃度を得た。250 マイクロリットルの FLAG 磁気ビーズを、750 μL の緩衝液 1 で、上清を除去するために混合し、磁気スタンド (Ambion 社) 上で放置することで、2 回洗浄した。Talon - 溶出液をビーズに加え、30 分間 4 にて回転させた。ビーズを 1 mL の 0.9 M 尿素、50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl で 5 回洗浄した。溶出は、ビーズに、0.9 M 尿素、50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl を含む、250 μL の 200 μg / mL FLAG ペプチド溶液を加えることと、よく混合することと、RT にて 30 分間インキュベートすることと、からなる。チューブを、磁気スタンド上に配置し、最終産物を回収した。この溶出ステップを一度繰り返し、500 μL の最終産物をさらに、0.9 M 尿素を含む PBS 中、4 にて 1 時間透析して、アリコートとして調製し、-80 にて保存した。調製物の純度を、クーマシブルー 溶液で染色した SDS-PAGE によって査定した (図 3A)。使用の直前、タンパク質アリコートを、20 kDa 分子量カットオフの slide-a-lyser (Pierce 社、UK) 中、緩衝液を二回替えて、PBS に対して 1 時間透析し、タンパク質濃度を、Brandford 方法を使用して測定した。内毒素測定確認値は、< 0.25 EU / mL であった。

【0528】

Flag をコードするヌクレオチド配列を、配列番号 1 に示し、Flag のアミノ酸配列を、配列番号 2 に示す。

ATGGTAGTACAGCACAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTTAGGTATCACAAACAGGCGCACAGGCTAAGTCCTCTGAGAAGTTATCTTGTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCAGCAGGCTTACGATTCCGAGAAGATGAGAA GCCAGGTTAGAGGCTTAATAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGGTATCCCTTATTCAAGTAGCTGAGGGTGCATTA AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATACAACCTCAGACAG AACTGCAGTCAGCAGGAGATCAACCAGTTAGCATCTGAGATCACCAGAATCGCTTCTACAACACTCAGTTAACACAAATGA ACCTGATCGATGGTAACCTCACAAGTAAGAACGTTCAAGTAGGTTCCCTTGCGGACAGGCTATCACAATCGATATCTCT GATATGTCTGCTACAGGTCTTGGCGTTAGCGGATTAGTAGTATCTCCTCTCGCAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTCTATCGCTTAAGCTGGTGCTTACAGAACAGACTTGAGCACACAATCTCCC ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTATACAGATATGGCTGAAGAGATGGTGAG TACAGCAAGAACACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTATTATC CTTATTACAGTAA (配列番号 1)。
MVVQHNLTAMNNRQLGITGQAQKSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKASDNAQDGVLSLIQVAEGAL SETHSILQRNMELATQAANDNTTSRDTAVQQEINQLASEITRIASTTFNTMNLIDGNFTSKKLQVGSLCGQAITIDIS DMSATGLGVSGLVVSSFSAAGKAMSAAQDAISYVSSMRSKLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIDTDMAEEMVE YSKNNILAQAGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ (配列番号 2)。

【0529】

4 つのドメイン D0、D1、D2 及び D3 からなるフラジエリン構造。図 4A を参照のこと。

D0 : N 末端 - ヘリックスは Gln 2 から始まり、Ser 32 (ND0) まで上方に伸 50

びる。C末端 - ヘリックスは、A 1 a 4 5 9 から始まり、S e r 4 9 1 (C D 0) まで下方に伸びる。

D 0 及び D 1 ドメインをつなぎ、2つの鎖 (N s 及び C s) からなり、1つが S e r 3 2 ~ A 1 a 4 4 であり、他が G 1 u 4 5 4 ~ A 1 a 4 5 9 である、スパーク領域。

D 1 : A 1 a 4 4 ~ G 1 n 1 7 6 で伸びるN末端区画と、A s n 4 0 6 ~ G 1 u 4 5 4 で伸びるC末端区画。N - 末端区画は、 - ヘリックス (A 1 a 4 4 ~ A 1 a 9 9) (N D 1 a) からなり、下方に行く第二の、より短い - ヘリックス (N D 1 b) を連結しているループによって続き、鎖は、下方に位置している2つの - ターン、 - ヘアピンにと続き、伸張鎖が上方に行き、鎖の残りが最終的にドメイン D 2 に入る。ドメイン 1 (C D 1) 中の C 末端 - ヘリックスが、A s n 4 0 6 から始まり、G 1 u 4 5 4 まで伸びる。ドメイン D 0 と D 1 は、N - D 0 が外側に向かい、C - D 0 が中央チャネルに曝露されるように、プロトフィラメント構造にパックされる。

D 2 ドメインは、2つの区画 : L y s 1 7 7 ~ G 1 y 1 8 9 のN末端区画と、A 1 a 2 8 4 ~ G 1 u 4 0 5 のC末端区画を有する。これはほとんど、2つのヘリックス 2 8 5 ~ 2 8 9 及び 2 8 8 ~ 2 9 8 を想定している 鎖からなる。

D 3 ドメインは、T y r 1 9 0 ~ V a l 2 8 3 の中央区画を含む。ヘリックス折り畳み (1 9 9 ~ 2 0 9) の1つの短いストレッチを有する 鎖からほとんどなる。

【 0 5 3 0 】

理論に束縛されることを望まずに、T L R 5 の認識及び活性化に関するフラジェリンタンパク質の2つの必須領域が、配列番号 2 の 7 9 ~ 1 1 7 位でのアミノ酸 (N - D 1 ドメイン) と、配列番号 2 の 4 0 8 ~ 4 3 9 位でのアミノ酸 (C - D 1 ドメイン) 、並びに配列番号 2 の 4 1 1 位でのアミノ酸アラニン (A) 、配列番号 2 の 4 1 2 位でのアミノ酸グルタミン (Q) 、及び配列番号 2 の 4 2 0 位でのアミノ酸セリン (S) であると考えられる。

[実施例]

【 0 5 3 1 】

R . ホミニスは、結腸に優先的に定着する。

C 3 H / H e N 無菌 (G F) マウスを、連続した日に、R . ホミニスの3つの強制飼養で接種させた。本発明者らは、フィルミクテス門からの単一細菌種での、無菌マウスの最初の成功した单一定着を報告している。成功した定着は、その酸素応答性細菌を保護するために、3 % アスコルビン酸と2 % システインを含む接種培地を使用して達成した。in situハイブリダイゼーション (F I S H , in situ hybridization) による腸組織の解析により、R . ホミニスが、回腸及び結腸両方に定着することが明らかになったが、結腸において非常に多くの数が発見された。細菌はまた、結腸粘膜に密接に関連して発見される (図 S 1 A) 。定着をさらに、およそ $1 \times 1 0^{10}$ 細菌 / g 粪の数で、R . ホミニス特異的プライマーを使用する P C R によって検証し、定量した (図 S 1 B ~ C) 。試験した G F 動物の糞は、任意の細菌の存在に対して陰性であった。

【 0 5 3 2 】

R . ホミニスゲノムは、宿主相互作用を促進している固有の遺伝子を明らかにする。

R . ホミニスの完全ゲノム配列 A 2 - 1 8 3 を生成し、単一の 3 , 5 9 2 , 1 2 5 b p クロモソーム (図 1 A によって表す) 。 R A S T プラットフォームを使用するゲノムの自動化及び手動注釈により、4つのリボソームオペロンの存在、6 6 種の R N A 及び 3 , 2 7 3 種の予測タンパク質が明らかになった。もっとも大きな群の遺伝子は、炭水化物代謝に関するタンパク質をコードするサブシステムカテゴリー炭水化物 (Subsystem Category Carbohydrates) (2 7 1 の遺伝子) に属し、続いて、タンパク質代謝 (Protein Metabolism) (1 9 7) 及びアミノ酸及び誘導体 (Amino acids and Derivatives) (1 7 5) である (図 1 B) 。他の重要な機能カテゴリーには、運動性及び走化性 (Motility and Chemotaxis) (4 9) 及び休眠及び胞子形成 (Dormancy and Sporulation) (1 2) が含まれた。比較ゲノム解析は、完全細菌ゲノムの間の、ゲノム構造と機能に関して最も近い相関が、エウバクテリウム・レクタル (Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H. 50

, Turnbaugh, P.J., Fulton, R.S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K., Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Crock, L.W., Russell, A., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L. & Gordon, J.I. 2009, "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla" , Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, no. 14, pp. 5859-5864) であり、これらの生物に關係なく、近い分類上の同系性を与えることは驚くべきことではないことが確立された (Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 56, no. Pt 10, pp. 2437-2441、Aminov, R.I., Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Welling, G.W. & Flint, H.J. 2006, "Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to Roseburia sp. or Eubacterium rectale", Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no. 9, pp. 6371-6376)。 1 , 0 9 5 遺伝子での 2 つのゲノムの比較再構築により、これらが、およそ 25 % の遺伝子まで異なることを明らかにした。特に、これらの差違は、宿主との相互作用に関する重要な機能をコードする遺伝子を含した。例えば、I V 型線毛集合タンパク質 P i l B 及び P i l C をコードする運動性及び走化性遺伝子が、E . レクタルには存在するが、R . ホミニスには存在せず、一方で、鞭毛基底本体ロッドタンパク質 F l g C 、鞭毛フック基底本体複合体タンパク質 F l i E 、鞭毛タンパク質 F l a B 及び鞭毛モータースイッチタンパク質 F l i G は、R . ホミニスに固有であった (表 S 1)。 2 つの細菌ゲノムは、4 2 の炭水化物遺伝子まで異なり、それらの異なる栄養学的 requirement を表している。興味深いことに、R . ホミニスは、サルモネラ及び大腸菌細菌種によって提示される F l i C に相同的の鞭毛とは反対に、両 F L A 型である 2 つの鞭毛遺伝子を発現するということで固有である。

【 0 5 3 3 】

表 S 1 R . ホミニスと E . レクタルゲノムの比較解析

比較ゲノム解析により、エウバクテリウム・レクタルが、ゲノム構造及び機能に関して、R . ホミニスの最も近い公知の相關するものであることと、2 つのゲノムが、ゲノムのおよそ 25 % まで異なったことが示された。 (A) R . ホミニスに存在し、E . レクタルに存在しない遺伝子と (B) E . レクタルに存在し、R . ホミニスに存在しない遺伝子。

【 0 5 3 4 】

【表6】

表S1A R.ホミニスに存在するが、E.レクタルには存在しない遺伝子

サブカテゴリー	役割	
アミノ酸及び誘導体		
アラニン、セリン及びグリシン	L-セリンデヒドラターゼ、アルファサブユニット	
アラニン、セリン及びグリシン	L-セリンデヒドラターゼ、ベータサブユニット	
アルギニン、尿素サイクル、ポリアミン	アルギニン経路調節タンパク質ArgR、argレギュロンのリプレッサー	10
アルギニン、尿素サイクル、ポリアミン	NADP特異的グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	
アルギニン、尿素サイクル、ポリアミン	オルニチンデカルボキシラーゼ	
アルギニン、尿素サイクル、ポリアミン	スペルミジン・プロテッシュABCトランスポーター-ペーミアーゼ成分potC	
芳香族アミノ酸及び誘導体	生合成芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼアルファ	
分岐鎖アミノ酸	スレオニンデヒドラターゼ	
グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	20
グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン	L-アスパラギナーゼ	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	硫酸ペーミアーゼ	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	リシンデカルボキシラーゼ	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	アデノシルホモシステイナーゼ	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	メチオニンABCトランスポーター-ATP結合タンパク質	30
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	メチオニンABCトランスポーター-透過酵素タンパク質	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	メチオニンABCトランスポーター-基質結合タンパク質	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	S-リボシルホモシステインリアーゼ	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	ホモセリンキナーゼの予測機能アナログ	
炭水化物		
アミノ糖	ベータ-ヘキソサミニダーゼ	
中央炭水化物代謝	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	40

中央炭水化物代謝	アルドース1-エピメラーゼ	
中央炭水化物代謝	4-ヒドロキシ-2-オキソグルタレートアルドラーーゼ	
中央炭水化物代謝	ピルビン酸フェロドキシンオキシドレクターーゼ、アルファサブユニット	
中央炭水化物代謝	ピルビン酸フェロドキシンオキシドレクターーゼ、ベータサブユニット	
中央炭水化物代謝	ピルビン酸フェロドキシンオキシドレクターーゼ、デルタサブユニット	
中央炭水化物代謝	ピルビン酸フェロドキシンオキシドレクターーゼ、ガンマサブユニット	10
中央炭水化物代謝	リンゴ酸透過酵素	
二糖及びオリゴ糖	ベータ-グルコシドbgIオペロン抗転写終結、BgIGファミリー	
二糖及びオリゴ糖	転写調整剤のガラクトースオペロンレプレッサー、GalR-LacIファミリー	
二糖及びオリゴ糖	ガラクトース/メチルガラクトシドABCトランスポートシステム、透過酵素タンパク質MgIC	
二糖及びオリゴ糖	多重糖ABCトランスポーター、ATP結合タンパク質	
発酵	エノイル-CoAヒドロラーゼ	
発酵	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	20
単糖	2-デヒドロ-3-デオキシグルコン酸キナーゼ	
単糖	2-デヒドロ-3-デオキシホスホグルコン酸アルドラーーゼ	
単糖	2-デオキシ-D-グルコン酸3-デヒドロゲナーゼ	
単糖	アルファ-グルコシダーゼ	
単糖	アルトロネートヒドロラーゼ	
単糖	アルトロネートオキシドレダクターーゼ	
単糖	ベータ-グルクロニダーゼ	
単糖	D-マンノナートオキシドレダクターーゼ	
単糖	マンノナートデヒドロラーゼ	
単糖	ラムノガラクトロナイド分解タンパク質RhiN	
単糖	ウロン酸イソメラーゼ	30
単糖	糖二酸利用調節因子SdaR	
単糖	リボースABCトランスポートシステム、ATP結合タンパク質RbsA	
単糖	リボースABCトランスポートシステム、透過酵素タンパク質RbsC	
単糖	ピリミジン-ヌクレオシドホスホリラーゼ	
単糖	フルクトキナーゼ	
単糖	フルクトースオペロンの転写リプレッサー、DeoRファミリー	
単糖	マンノース-1-リン酸グアニルイルトランスフェラーゼ	
単糖	マンノース-6-リン酸イソメラーゼ	40
単糖	可能性あるアルファ-キシロシドABCトランスポーター、基質結合成分	
1炭素代謝	セリン--ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ	
糖アルコール	グリセロール取込促進剤タンパク質	

糖アルコール	グリセロール-3-ホスフェートABCトランスポーター、ペリプラズムグリセロール-3-ホスフェート結合タンパク質	
サブカテゴリーなし	炭素保存調節因子	
細胞壁及び莢膜	英膜及び細胞外多糖	D,D-ヘプトース7-ホスフェートキナーゼ
	英膜及び細胞外多糖	GDP-L-フコースシンセターゼ
	英膜及び細胞外多糖	dTDP-4-デヒドロラムノース3,5-エピメラーゼ
	英膜及び細胞外多糖	ペプチドグリカンN-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ
	英膜及び細胞外多糖	多糖デアセチラーゼ
	英膜及び細胞外多糖	グルコース-1-ホスフェートチミジリルトランスフェラーゼ
	英膜及び細胞外多糖	ティコ酸転座透過酵素タンパク質TagG
	英膜及び細胞外多糖	dTDP-4-デヒドロラムノースリダクター
	英膜及び細胞外多糖	dTDP-グルコース4,6-デヒドラターゼ
	英膜及び細胞外多糖	TRAP-型輸送系、小透過酵素成分、予測N-アセチルノイロミネートトランスポーター
英膜及び細胞外多糖	グルコース-1-ホスフェートシチジリルトランスフェラーゼ	10
サブカテゴリーなし	N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ	20
クラスター化に基づくサブシステム		
走化性、応答調節因子	PAS/PACセンサを有するジグアニレートシクラーゼ(GGDEFドメイン)	
クラスター化に基づくサブシステム	メタロプロテアーゼ(SporIQ)に関連したステージII胞子形成タンパク質	
シトクローム生合成	グルタミン酸-1-セミアルデヒドアミノトランスフェラーゼ	
タンパク質輸送?	メタロエンドペプチダーゼに関連した膜タンパク質	
タンパク質輸送?	NLP/P60ファミリータンパク質	
タンパク質輸送?	ペプチド鎖放出因子2	
タンパク質輸送?	仮想タンパク質BH3604	30
サブカテゴリーなし	細胞分裂タンパク質FtsW	
サブカテゴリーなし	FIG003307:仮想タンパク質	
サブカテゴリーなし	SSUリボソームタンパク質S1p	
補因子、ビタミン、補欠分子族、色素		
補酵素A	2-デヒドロバント酸2-リダクター	
補酵素A	パントテン酸塩:Na+共輸送体	
Fe-Sクラスター	鉄-硫黄クラスター-アセンブリタンパク質SufD	
NAD及びNADP	L-アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ	
ピリドキシン	ピリドキシン代謝の予測転写調節因子	
テトラピロール	アルファ-リバゾール-5'-ホスフェートホスファターゼ	40
サブカテゴリーなし	予測ヒドロキシメチルピリミジントランスポーターCytX	
DNA代謝		
CRISPs	CRISPR関連タンパク質Cas2	

DNA修復	ウラシル-DNAグリコシラーゼ、ファミリー1	
DNA修復	未知機能のエキソヌクレアーゼABCサブユニットAパラログ	
DNA修復	A/G-特異的アデニングリコシラーゼ	
DNA修復	エキソデオキシリボヌクレアーゼVII小サブユニット	
DNA修復	エキソヌクレアーゼSbcC	
DNA修復	エキソヌクレアーゼSbcD	
DNA修復	予測ATP依存DNAヘリカーゼYjcD	
DNA複製	DNAポリメラーゼIIIサブユニットガンマ及びタウ	10
DNA複製	DNA複製タンパク質DnaC	
サブカテゴリーなし	DNA結合タンパク質HBsu	
休眠及び胞子形成		
胞子DNA保護	小酸溶解性胞子タンパク質、ベータ型SASP	
サブカテゴリーなし	胞子成熟タンパク質A	
サブカテゴリーなし	胞子成熟タンパク質B	
脂肪酸、脂質及びイソプレノイド		
脂肪酸	4'-ホスホパンテチエニルトランスフェラーゼ	
トリアシルグリセロール	リソホスホリパーゼ	
トリアシルグリセロール	リソホスホリパーゼL2	
トリアシルグリセロール	モノグリセリドリパーゼ	
膜輸送		20
ABCトランスポーター	ホスホン酸ABCトランスポーター-ATP結合タンパク質	
ABCトランスポーター	ホスホン酸ABCトランスポーター-透過酵素タンパク質phnE1	
ABCトランスポーター	ホスホン酸ABCトランスポーター-透過酵素タンパク質phnE2	
ABCトランスポーター	ジペプチド輸送ATP結合タンパク質DppD	
ABCトランスポーター	ジペプチド輸送ATP結合タンパク質DppF	
ABCトランスポーター	ジペプチド輸送系透過酵素タンパク質DppB	
ABCトランスポーター	ジペプチド輸送系透過酵素タンパク質DppC	
ABCトランスポーター	ジペプチド結合ABCトランスポーター、ペリプラズム基質結合成分	30
サブカテゴリーなし	予測ECFトランスポーターのモジュールの活性化モジュールの重複ATPase成分BL0693	
サブカテゴリーなし	メチオニン調節ECFトランスポーターの活性化モジュールのATPase成分MtsB	
サブカテゴリーなし	予測ECFトランスポーターの基質特異的成分BL0695	
サブカテゴリーなし	メチオニン調節ECFトランスポーターの基質特異的成分MtsA	
サブカテゴリーなし	予測ピリドキシン関連ECFトランスポーターの基質特異的成分PdxU2	
サブカテゴリーなし	チアミンECFトランスポーターの基質特異的成分ThiT	40
サブカテゴリーなし	予測ECFトランスポーターの活性化モジュールの膜貫通成分BL0694	
サブカテゴリーなし	予測ECFトランスポーターの活性化モジュールの膜貫通成分MtsC	

その他	
植物-原核生物DOEプロジェクト	アスパルチル-tRNA(Asn)アミドトランスフェラーゼサブユニットA
植物-原核生物DOEプロジェクト	アスパルチル-tRNA(Asn)アミドトランスフェラーゼサブユニットB
植物-原核生物DOEプロジェクト	グルタミル-tRNA(Gln)アミドトランスフェラーゼサブユニットA
植物-原核生物DOEプロジェクト	グルタミル-tRNA(Gln)アミドトランスフェラーゼサブユニットB
植物-原核生物DOEプロジェクト	ホスホグルコサミンムターゼ
植物-原核生物DOEプロジェクト	ホスホマンノムターゼ
植物-原核生物DOEプロジェクト	ABCトランスポートシステム、糖結合タンパク質
植物-原核生物DOEプロジェクト	アルファ-L-アラビノフラノシダーゼII前駆体
植物-原核生物DOEプロジェクト	アルファ-N-アラビノフラノシダーゼ
植物-原核生物DOEプロジェクト	アルファ-N-アラビノフラノシダーゼ2
植物-原核生物DOEプロジェクト	COG3533分泌タンパク質
植物-原核生物DOEプロジェクト	L-アラビノースイソメラーゼ
植物-原核生物DOEプロジェクト	アラビノースオペロンの転写リプレッサー
植物-原核生物DOEプロジェクト	ラムノガラクトウロナンアセチルエステラーゼ
サブカテゴリーなし	膜プロテアーゼ推定活性調節因子YbbK
運動性及び走化性	
原核生物における鞭毛運動性	鞭毛基底本体ロッドタンパク質FlgC
原核生物における鞭毛運動性	鞭毛フック基底本体複合体タンパク質FlfE
原核生物における鞭毛運動性	フラジエリンタンパク質FlaB
サブカテゴリーなし	鞭毛モータースイッチタンパク質FlgG
窒素代謝	
サブカテゴリーなし	窒素調節タンパク質P-II
サブカテゴリーなし	Hcp転写調節因子HcpR(Crp/Fnrファミリー)
ヌクレオシド及びヌクレオチド	
プリン	アデニンデアミナーゼ
ピリミジン	ウリジンキナーゼ
サブカテゴリーなし	クラスIIIのリボヌクレオチドリダクター(嫌気)、大サブユニット
リン代謝	
サブカテゴリーなし	エキソポルホスファターゼ

10

20

30

40

サブカテゴリーなし	リン酸トランスポートシステム透过酵素タンパク質 PstA	
サブカテゴリーなし	リン酸トランスポートシステム透过酵素タンパク質 PstC	
サブカテゴリーなし カリウム代謝	ナトリウム依存リン酸トランスポーター	
サブカテゴリーなし タンパク質代謝	カリウム電位依存性チャネルサブファミリーKQT	
タンパク質合成	EngCに関連する可能性あるGTPase	10
タンパク質合成	アスパルチル-tRNA(Asn)シンセターゼ	
タンパク質合成	tRNA-Ala-CGC	
タンパク質合成	tRNA-Gly-CCC	
タンパク質合成	tRNA-Pro-GGG	
タンパク質合成	tRNA-Ser-CGA	
タンパク質合成	tRNA-Ser-GGA	
タンパク質合成	tRNA-Val-CAC	
タンパク質フォールディング	ホルダーゼタンパク質PrsA前駆体	
タンパク質プロセシング及び修飾	[NiFe]ヒドロゲナーゼニッケル取込タンパク質HypA	
タンパク質プロセシング及び修飾	[NiFe]ヒドロゲナーゼニッケル取込関連タンパク質 HypB	20
RNA代謝		
RNAプロセシング及び修飾	ペプチジル-プロイリルcis-transイソメラーゼ	
RNAプロセシング及び修飾	リボヌクレアーゼPタンパク質成分	
転写	システインシンターゼ推定転写調節因子、Rrf2ファミリー	
転写	RNAポリメラーゼシグマ因子SigV	
調節及び細胞シグナリング		
プログラムされた細胞死及び毒性-抗毒素システム	YafQ毒素タンパク質	
サブカテゴリーなし	二機能性オートリシンAtl	30
サブカテゴリーなし	細胞エンベロープ結合転写アテニュエータLytR-CpsA-Psr、サブファミリーF2	
サブカテゴリーなし	芳香族炭化水素利用転写調節因子CatR(LysRファミリー)	
サブカテゴリーなし	カタボライト制御タンパク質A	
サブカテゴリーなし	カタボライト抑制HPr様タンパク質Crh	
呼吸		
サブカテゴリーなし	フェレドキシン	
ストレス応答		
低温衝撃	低温衝撃タンパク質CspG	
病原性、疾患及び防御		40
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	可能性あるCo/Zn/Cd流出システム膜融合タンパク質	
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	転写調節因子、MerRファミリー	

抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	重金属-(Cd/Co/Hg/Pb/Zn)-転座P型ATPase:重金属転座P型ATPase
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	バンコマイシンB型耐性タンパク質VanW
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	テトラシクリン耐性タンパク質TetW

【0535】

10

【表7】

表S1B E.レクタルに存在するが、R.ホミニスには存在しない遺伝子発現

サブカテゴリー	役割	
アミノ酸及び誘導体		
アルギニン、尿素サイクル、ポリアミン	転写調節因子、MerRファミリー、ポリアミントransporter近位	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	硫酸アデニルtransフェラーゼサブユニット2	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	硫酸及びチロ硫酸輸送ATP結合タンパク質CysA	20
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	硫酸輸送システム透過酵素タンパク質CysW	
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	メチオニントransporter-MetT	
炭水化物		
アミノ糖	N-アセチル-D-グルコサミンABC輸送システム、透過酵素タンパク質1	
ジ-及びオリゴサッカライド	ガラクトース/MチルガラクトシドABCトランスポートシステム、ATP結合タンパク質MglA	
ジ-及びオリゴサッカライド	メルトデキストリングルコシダーゼ	
ジ-及びオリゴサッカライド	PTSシステム、マルトース及びグルコース特異的IIB成分	30
ジ-及びオリゴサッカライド	PTSシステム、マルトース及びグルコース特異的IIC成分	
発酵	NADH依存ブタノールデヒドロゲナーゼA	
発酵	アルコールデヒドロゲナーゼ	
单糖	予測ベータ-キシロシドABCトランスポーター、基質結合成分	
1炭素代謝	フマル酸ヒドラターゼクラスI嫌気性	
有機酸	セリン-グリオキシレートアミノtransフェラーゼ	
多糖	グリコーゲン生合成タンパク質GlgD、グルコース-1-リン酸アデニリルトランスフェラーゼファミリー	40
多糖	グリコーゲン脱分岐酵素関連タンパク質	
糖アルコール	グリセロールデヒドロゲナーゼ	
細胞壁及び莢膜		
グラム陽性細胞壁成分	細胞壁表面アンカーファミリータンパク質	
クラスター化に基づくサブシステム		
細胞分裂	FIG001960:細胞分裂に関連するFtsZ相互作用タンパク質	

50

イソプレノイド/細胞壁生合成:推定ウ ンデカプレニルジホスフェートホス ファターゼ	ペニシリン結合タンパク質、推定	
可能性ある有機ヒドロペルオキシド 耐性関連仮説タンパク質	ホモセリンキナーゼ	
サブカテゴリーなし	細胞分裂トポロジー特異性因子MinE	
サブカテゴリーなし	低分子量タンパク質チロシンホスファターゼ	
補因子、ビタミン、補欠分子族、色素		
ビオチン	3-ケトアシル-CoAチオラーゼ	10
ビオチン	ビオチンシンターゼ	
ピリドキシン	4-ヒドロキシスレオニン-4-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	
ピリドキシン	ピリドキサルキナーゼ	
ピリドキシン	ピリドキシン生合成グルタミニアミドトランスフェラーゼ、グルタミナーゼサブユニット	
ピリドキシン	ピリドキシン生合成グルタミニアミドトランスフェラーゼ、シンターゼサブユニット	
テトラピロール	Cob(I)アラミンアデノシルトランスフェラーゼ	
テトラピロール	ウロポルフィリノーゲン-IIIメチルトランスフェラーゼ	
テトラピロール	ビタミンB12ABCトランスポーター、B12結合成分BtuF	20
サブカテゴリーなし	硫黄キャリアタンパク質アデニルイルトランスフェラーゼThiF	
サブカテゴリーなし	チアゾール生合成タンパク質ThiG	
サブカテゴリーなし	チアゾール生合成タンパク質ThiH	
DNA代謝		
CRISPs	CRISPR結合タンパク質Cas7	
DNA修復	組換えDNA修復タンパク質RecT(プロファージ結合)	
DNA複製	ATP-依存DNAヘリカーゼRecQ	
脂肪酸、脂質及びイソプレノイド		30
リン脂質	CDP-ジアシルグリセロール-セリン-O-ホスファチジルトランスフェラーゼ	
リン脂質	ジアシルグリセロールキナーゼ	
イオン捕獲及び代謝		
サブカテゴリーなし	ソルターゼA、LPXTG特異的	
膜輸送		
サブカテゴリーなし	葉酸ECFトランスポーターの基質特異的成分FolT	
運動性及び走化性		
細菌内の社会的流動性及び非鞭毛水泳	IV型繊毛アセンブリタンパク質PilC	40
細菌内の社会的流動性及び非鞭毛水泳	IV型繊毛アセンブリ、ATPasePilB	
ヌクレオシド及びヌクレオチド		

解毒	突然変異誘発因子mutTタンパク質(7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン-トリホスファターゼ)	
プリン	ウラシル-キサンチン透過酵素	
プリン	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	
プリン	アデノシンデアミナーゼ	
ピリミジン	ウリジンホスホリラーゼ	
ファージ、プロファージ、転換要素、プラスミド		
ファージ、プロファージ	ファージテール長テープ-測定タンパク質	
タンパク質代謝		10
タンパク質生合成	リボソームシュードウリジンシンターゼD、バチルス・サブチリスYjbO型に類似	
タンパク質生合成	tRNA(グアニン37-N1)-メチルトランスフェラーゼ	
タンパク質生合成	アラニル-tRNAシンセターゼファミリータンパク質	
タンパク質分解	アミノペプチダーゼC	
タンパク質分解	脱ブロッキングアミノペプチダーゼ	
RNA代謝		
RNAプロセシング及び修飾	COG1720:未同定保存タンパク質	
RNAプロセシング及び修飾	tRNA(Ile)-リシンシンターゼ	
呼吸		20
電子受容性反応	アデニリル硫酸レダクターゼアルファ-サブユニット	
電子受容性反応	アデニリル硫酸レダクターゼベータ-サブユニット	
電子受容性反応	異化型亜硫酸塩リダクターゼ(デスルホビリジン)、アルファ及びベータサブユニット	
ストレス応答		
浸透ストレス	コリン結合タンパク質A	
浸透ストレス	サクロシンオキシダーゼアルファサブユニット	
サブカテゴリーなし	炭素飢餓タンパク質A	
サブカテゴリーなし	転写調節因子、PemKファミリー	
硫黄代謝		30
サブカテゴリーなし	ベータ-ガラクトシダーゼ大サブユニット	
サブカテゴリーなし	ベータ-ガラクトシダーゼ小サブユニット	
病原性、疾患及び防御		
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	アミノグリコシドN6'-アセチルトランスフェラーゼ	
抗生素質及び毒性化合物に対する耐性	細胞質銅ホメオスタシスタンパク質cutC	

【 0 5 3 6 】

R. ホミニスは、運動性、モビリゼーション及び走化性遺伝子を上方調節することによって、腸環境に応答する。

宿主及び食餌との関連に対する応答において、R. ホミニスによって示差的に発現された遺伝子を決定するために、マイクロアレイを、小挿入物サイズシークエンシングライブラリーからの6,000 PCR断片を使用して構築した。続くリアルタイムPCR検証を、図2Aにて図示するように、R. ホミニスゲノムの特定の領域にてクラスター形成する、42の示差的に発現した遺伝子（表S2及びS3）上で実施した。腸環境と食餌成分の効果間を区別するために、細菌RNAを、4つの異なる実験条件から単離した。（i）单一関連マウスの盲腸からのインビオ、（ii）培養培地内で増殖した細菌からのインビトロ

、(iii) 食餌成分の存在下で増殖した細菌からのインビトロ、(iv) コンフルエント Caco-2 及び HT-29 細胞の表面上でインキュベートした細菌から。

【0537】

表 S 2 R. ホミニス特異的プライマーを使用する細菌 RNA 上でのリアルタイム PCR 解析

細菌 PCR プライマーを、Primer3Plus を使用して、示差的に発現した遺伝子に対して設計した。全ての試料を 3 連で泳動させた。GyrA を、標準化のための参照遺伝子として使用した。

【0538】

【表 8】

遺伝子名	Rh14d-対照				Rh28d-対照				Rh14d-インビトロ+食餌 +食餌				Rh28d-インビトロ +食餌				
	FC	P値	FC	P値	FC	P値	FC	P値	FC	P値	FC	P値	FC	P値	FC	P値	
3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ	5.62	0.00393	8.62	0.00000	-0.85	0.69927	1.30	0.38670	6.62	0.00124							
アセチル-CoAアセチルトランスクエラーゼ	10.25	0.00304	18.27	0.00000	1.38	0.51556	2.46	0.01882	7.44	0.00048							
アルドースエピメラーゼファミリー1タンパク質	7.20	0.00002	11.09	0.00001	22.65	0.03173	34.89	0.02105	-0.32	0.30489							
ATPシンターゼアルファ鎖	1.62	0.12713	2.50	0.00003	3.25	0.00645	5.00	0.00000	-2.00	0.00147							
ATPシンターゼアルファ鎖2	11.94	0.00122	5.50	0.00001	2.71	0.18580	1.25	0.72876	4.41	0.06479							
ATPシンターゼベータ鎖	1.85	0.08341	3.14	0.00056	4.00	0.00397	6.80	0.00001	-2.16	0.00241							
ATPシンターゼベータ鎖2	8.27	0.00058	6.13	0.00025	1.64	0.33264	1.21	0.67923	-5.05	0.01400							
ATPシンターゼガンマ鎖	2.31	0.02994	3.58	0.00027	4.22	0.00238	6.52	0.00001	-1.82	0.01276							
ATPシンターゼガンマ鎖2	-9.59	0.00081	-10.55	0.00013	-1.59	0.40064	-1.75	0.29398	-6.02	0.01363							
ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ	13.31	0.00166	19.32	0.00000	1.48	0.39908	2.14	0.02840	9.03	0.00039							
電子輸送フラボタンパク質、アルファサブユニット	6.32	0.00729	15.55	0.00000	-0.80	0.61916	1.96	0.03441	7.94	0.00030							
電子輸送フラボタンパク質、ベータサブユニット	7.94	0.00414	12.31	0.00000	1.13	0.78504	1.76	0.08347	7.00	0.00078							
鞭毛モータ回転タンパク質MotA	-0.94	0.71937	2.37	0.00023	1.69	0.02442	4.25	0.00001	-0.56	1.00000							
鞭毛モータ回転タンパク質MotB	-0.57	0.01030	1.19	0.00938	-0.75	0.14601	1.58	0.01676	-0.76	0.08011							
鞭毛タンパク質FlaA1	-3.05	0.00125	-1.93	0.01193	3.13	0.01261	4.95	0.00249	-9.57	0.00079							
鞭毛タンパク質FlaA2	1.04	0.84732	-1.28	0.05814	1.45	0.29909	1.09	0.77089	-1.39	0.28105							
鞭毛タンパク質FlaA3	1.14	0.41467	1.94	0.00312	1.63	0.08606	2.77	0.00477	-1.43	0.17174							
鞭毛タンパク質FlaB	1.02	0.97319	-4.99	0.00568	1.96	0.40946	-2.60	0.14359	-1.92	0.25258							
グルクロニド透過酵素	-9.34	0.00001	-13.81	0.00022	-13.97	0.00001	-	20.65	0.00003	-1.50	0.13959						

L-スレオニン3-O-ホスフェートデカルボキシラーゼ	1.62	0.00963	3.70	0.00002	1.66	0.07350	3.78	0.00186	-0.98	0.92518
マグネシウムトランスポーター	372.00	0.00123	11.20	0.03391	4.42	0.32048	-0.13	0.18758	84.10	0.01672
メチル基受容走化性タンパク質1	-1.18	0.54522	-1.83	0.02731	-2.90	0.01211	-1.87	0.05778	-0.29	0.00389
メチル基受容走化性タンパク質2	-2.46	0.00400	-2.95	0.00154	1.48	0.10070	1.24	0.33586	-3.65	0.00043
メチル基受容走化性タンパク質3	1.13	0.54189	1.86	0.04504	3.17	0.00033	5.25	0.00055	-2.81	0.00020
メチル基受容走化性感覺トランスマデューサ1	1.33	0.01743	2.15	0.00001	1.58	0.05704	2.56	0.00396	-1.19	0.38997
メチル基受容走化性感覺トランスマデューサ2	2.03	0.00671	2.34	0.00017	4.94	0.00007	5.71	0.00003	-2.44	0.00163
MobA/MobLファミリータンパク質4/推定接合伝達タンパク質	84.83	0.00177	5.77	0.01561	3.67	0.34227	-4.00	0.29305	23.10	0.04583
MobA/MobLタンパク質1	257.93	0.00472	9.27	0.04437	8.72	0.25455	-3.19	0.50297	29.57	0.07733
MobA/MobLタンパク質2	714.11	0.00172	11.64	0.08286	8.17	0.29225	-7.51	0.31871	87.43	0.04300
MobA/MobLタンパク質3	362.26	0.00144	11.10	0.03880	7.77	0.27426	-4.20	0.43208	46.62	0.06260
MobA/MobLタンパク質4	219.75	0.00147	6.52	0.08511	7.99	0.17452	-4.22	0.34388	27.49	0.04519
オリゴペプチドABCトランスポーター、ペリプラスマミックオリゴペプチド結合タンパク質oppA	1.26	0.49437	1.11	0.45125	1.28	0.49171	1.13	0.53525	-1.02	0.92102
オリゴペプチド輸送ATP結合タンパク質oppD	-1.29	0.05256	1.08	0.40875	-1.40	0.07422	-1.00	0.98737	1.09	0.60319
浸透圧感受性K ⁺ チャネルヒスチジンキナーゼKdpD	3.98	0.00004	7.07	0.00000	5.58	0.00005	9.91	0.00001	-0.71	0.12049
リン酸レギュロセンサタンパク質PhoR	2.73	0.00211	1.54	0.04166	3.80	0.00919	2.14	0.07191	-1.39	0.34941
ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ[ATP]	2.30	0.05000	3.22	0.00004	1.15	0.70105	1.61	0.04623	2.00	0.00988
カリウム取込タンパク質、統合膜成分、KtrB	7.74	0.00006	10.81	0.00002	50.92	0.02191	71.15	0.01638	-0.15	0.15959
推定接合伝達タンパク質	183.02	0.00023	9.49	0.01454	8.09	0.08695	-2.39	0.44355	22.63	0.02615

ヒルビン酸-フラボドキシンオキシ ドリダクターゼ	-0.52	0.05848	-0.92	0.52386	-0.36	0.01504	-0.65	0.09510	1.42	0.16352
鞭毛オペロンRNAポリメラーゼシ グマ因子	-0.76	0.02253	1.93	0.00032	-0.82	0.08962	2.08	0.00013	-0.93	0.40060

10

20

30

40

50

【0539】

【表9】

表S3 環状ゲノムマップ上にプロットしたR.ホミニスPCR実験のインデックス。環状ゲノムマップ上で示したような、R.ホミニスPCR実験のリスト

実験	プライマー	開始	終了	長さ	遺伝子
1	gyrA-N-F	7803	7889	87 bp	gyrA
2	1602-F	95664	95740	77 bp	リン酸レギュロンセンサタンパク質PhoR
3	1653-F	153403	153483	81 bp	鞭毛タンパク質FlaA1
4	1686-F	189295	189382	88 bp	鞭毛タンパク質FlaA2
5	1718-F	221205	221279	75 bp	鞭毛タンパク質FlaA3
6	1735-F	250582	250674	93 bp	メチル基受容走化性タンパク質1
7	1769-F	290546	290628	83 bp	メチル基受容走化性感覚トランスデューサ1
8	1770-F	291722	291808	87 bp	メチル基受容走化性タンパク質2
9	1831-N-F	348711	348810	100 bp	MobA/MobLタンパク質4
10	1842-F	364775	364851	77 bp	MobA/MobLタンパク質2
11	1867-2652-F	391044	391120	77 bp	MobA/MobLファミリータンパク質4/推定接合伝達タンパク質
12	2055-F	600837	600928	92 bp	アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ
13	2056-F	602279	602363	85 bp	3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ
14	2057-F	602961	603037	77 bp	ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ
15	2058-F	604411	604504	94 bp	電子輸送フラボタンパク質、ベータサブユニット
16	2059-F	605434	605516	83 bp	電子輸送フラボタンパク質、アルファサブユニット
17	129-F	653987	654066	80 bp	オリゴペプチドABCトランスポーター、オリゴペプチド結合タンパク質oppA
18	132-F	658435	658516	82 bp	オリゴペプチド輸送ATP結合タンパク質oppD
19	805-R	934310	934406	97 bp	浸透圧感受性K ⁺ チャネルヒスチジンキナーゼKdpD
20	807-R	935306	935394	89 bp	アルドースエピメラーゼファミリータンパク質
21	808-R	936111	936190	80 bp	カリウム取込タンパク質、統合膜成分、KtrB
22	909-F	1053529	1053604	76 bp	ピルビン酸-フラボドキシンオキシドリダクターゼ
23	1235-F	1434705	1434785	81 bp	MobA/MobLタンパク質3
24	1296-F	1495460	1495544	85 bp	メチル基受容走化性タンパク質3
25	1297-R	1497854	1497931	78 bp	L-スレオニン3-O-リン酸デカルボキシラーゼ
26	1335-F	1540579	1540671	93 bp	鞭毛モータ回転タンパク質MotA

10

20

30

40

27	1336-F	1541416	1541511	96 bp	鞭毛モータ回転タンパク質MotB
28	1356-F	1559143	1559227	85 bp	鞭毛オペロンのためのRNAポリメラーゼシグマ因子
29	3119-F	2211612	2211705	94 bp	ホスホノールピルビン酸カルボキシキナーゼ[ATP]
30	3117-R	2213046	2213139	94 bp	メチル基受容走化性感覚トランスデューサ2
31	1867-2652-R	2736100	2736176	77 bp	MobA/MobLファミリータンパク質4/推定接合伝達タンパク質
32	1552M-R	2984489	2984566	78 bp	マグネシウムトランスポーター
33	397-R	3153341	3153427	87 bp	ATPシンターゼベータ鎖2
34	398-R	3153616	3153699	84 bp	ATPシンターゼガンマ鎖2
35	399-R	3155799	3155898	100 bp	ATPシンターゼアルファ鎖2
36	404-R	3159387	3159467	81 bp	グルクロナイド透過酵素
37	2399-R	3308172	3308265	94 bp	推定接合伝達タンパク質MobA/MobL
38	2323-R	3366526	3366615	90 bp	鞭毛タンパク質flaB
39	2281-R	3416947	3417042	96 bp	ATPシンターゼベータ鎖
40	2280-R	3418736	3418824	89 bp	ATPシンターゼガンマ鎖
41	2279-R	3418857	3418942	86 bp	ATPシンターゼアルファ鎖
42	641-R	3467164	3467255	92 bp	MobA/MobLタンパク質1

10

20

【 0 5 4 0 】

50 の示差的に発現した遺伝子を単離した（インビオ対インビトロ）。最も驚くべき発見は、コンジュゲーション / モビリゼーション輸送に関する遺伝子、m o b A 及び m o b L 様遺伝子のインビオでの高い上方調節であった（図 2 A）。転写研究におけるこのような遺伝子の存在は、サブシステムカテゴリー特徴における、ファージ（Phages）、プロファージ（Prophages）、転位因子（Transposable Elements）及びプラスミド（Plasmids）に対して同定可能な遺伝子が割り当てられなかつたため、驚くべきことであった。遺伝子検出及び割当におけるこの差は、サブシステムカテゴリー注釈の認識された制限による可能性がある。食餌化合物の刺激効果は、非常にわずかに公表されており、これは、腸環境が本質的に水平遺伝子輸送に関する遺伝子の主要な誘導因子であることを示唆している。

【 0 5 4 1 】

他の腸環境誘導サブシステムには、膜輸送（Membrane Transport）、とりわけマグネシウム輸送と、複数のメチル基受容走化性タンパク質と、鞭毛オペロンの遺伝子を含む運動性及び走化性が含まれた（図 2 B）。R . ホミニスは、複数のフラジエリン遺伝子、f 1 a A 1、f 1 a A 2、f 1 a A 3 及び f 1 a B を有する。マウス腸環境において、フラジエリン発現を、組換えフラジエリンタンパク質 F 1 a A 1 及び F 1 a A 2 に対して作製された特異的抗体（R H 1 及び R H 2）で、インビオ定着マウス、及び食餌の存在下増殖したインビトロ培養液両方から単離した細菌を使用する、ウエスタンプロットと免疫細胞化学によって検証した（図 2 C）。インビオでのフラジエリン発現のこの陽性の検証は、細菌タンパク質の活性の発現を活発に下方調節する他の細菌種は異なり、フィルミクテス門の特定のサブセットのみがインビオにて鞭毛を生成することを示唆している先のレポート（Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. 2008, "Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome", Cell host & microbe, vol. 3, no. 4, pp. 213-223）と一致している。腸環境中の R . ホミニスにおける異化作用代謝遺伝子の発現がまた、腸環境によって影響を受けた（図 2 D）。関連した遺伝子には、アセチル - C o A アセチルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ及びホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ [A T P] が含まれる。

30

40

50

【 0 5 4 2 】

R . ホミニストランスクリプトームにおける宿主適応の効果をさらに調査するために、ヒト腸上皮細胞（Caco - 2 及び HT - 29）のインビトロ刺激を実施した。これは、マウス腸への適合によって誘導された、コンジュゲーション / モビリゼーション輸送遺伝子 m o b A / m o b L タンパク質 1 がまた、両方の細胞株中で増加したことを示した（図 2 E）。インビオデータと一致して、フラジェリン遺伝子 M o t A は、Caco - 2 細胞にて上方調節された。ブチル酸代謝に関与した遺伝子は、2つの細胞株間で差違を示し、下方調節が Caco - 2 細胞で見られ、上方調節が HT - 29 細胞で見られた。

【 0 5 4 3 】

R . ホミニスは、主に結腸内の宿主先天性シグナリング経路に影響を与える

10

G F マウスへの R . ホミニスによる定着が、宿主遺伝子発現の増加と相関し、結腸にて最も高かった（図 3 A 及び表 S 4）。示差的な発現は、定着後 28 日でもっとも見られ、159 個の遺伝子が上方調節され、143 個の遺伝子が下方調節される。14 日に回腸において示差的に発現した遺伝子の数は、上行結腸と同様であり、79 個の遺伝子が上方調節され、119 個の遺伝子が下方調節される。回腸における示差的な発現は、28 日で非常に低く、定着レベルの減少と一致する。ヒートマップ解析によって有意な転写物の明確な分離によって示されるように（図 3 B）、転写的応答が、2つの時間点で異なった。アフィメトリックスデータの陽性のリアルタイム PCR 検証を図 3 C に示す。

【 0 5 4 4 】

表 S 4 R . ホミニス接種動物と G F 動物間のアフィメトリックスデータ

20

アフィメトリックスマイクロアレイ解析を、上行結腸及び回腸組織から単離した RNA 上で実施した。データは、Benjamini and Hochberg 疑発見法を使用して、 $P < 0.05$ の時に有意であると考えた。（A）14 日に上行結腸にて示差的に発現した転写物。（B）28 日に上行結腸にて示差的に発現した転写物。（C）14 日に回腸にて示差的に発現した転写物。（D）28 日にて回腸にて示差的に発現した転写物。

【 0 5 4 5 】

【表 10】

表S4A R.ホミニス接種動物と無菌動物との間で、14日での上行結腸中に示差的に発現した転写物。

ID	記号	名前	FC	P値	B
1424973_at	Cyp3a25	シトクロームP450、ファミリー3、サブファミリー-a、ポリペプチド25	26.35	4.09E-05	8.91
1449375_at	Ces6	カルボキシルエステラーゼ6	22.80	5.71E-16	29.28
1428400_at	2200002K05Rik	RIKENcDNA2200002K05遺伝子	6.22	6.65E-09	17.20
1419393_at	Abcg5	ATP結合力セツト、サブファミリー-G(WHITE)、メンバ-5	5.81	0.002156	4.51
1429726_at	Slc16a9	溶質キャリアーファミリー-16(モノカルボキシル酸トランスクレーター)、メンバ-9	4.38	0.001103	5.26
1430641_at	9030605I04Rik	RIKENcDNA9030605I04遺伝子	4.36	0.000358	6.52
1436575_at	Grin3a	グルタメート受容体イオントロピック、NMDA3A	3.91	0.018503	1.71
1422749_at	Ly6g6c	リンパ球抗原6複合体、座G6C	3.71	0.004044	3.79
NuGO_emt070648_at	Abca12	ATP結合力セツト、サブファミリー-A(ABC1)、メンバ-12	3.69	0.000333	6.62
1428682_at	Zc3h6	ジンクフィンガ-CCCH型含有6	3.28	0.002747	4.26
1431554_a_at	Anxa9	アネキシンA9	3.00	3.25E-05	9.18
1423556_at	Akr1b7	アルド-ケトリダクターゼファミリー-1、メンバ-B7	2.87	0.018503	1.70
1424451_at	Acaa1b	アセチル-補酵素Aアクリルトランスクエラーゼ1B	2.70	0.000404	6.33
1418486_at	Vnn1	バニン1	2.66	0.001531	4.93
1418606_at	Hoxd10	ホメオボックスD10	2.60	0.000102	7.97
1435207_at	Dixdc1	DIXドメイン含有1	2.55	0.014337	2.11
1427072_at	Stard8	STARTドメイン含有8	2.48	0.027058	1.15
1442560_at	NA	NA	2.42	0.006928	3.17
1420998_at	Etv5	Ets/バリアント遺伝子5	2.33	0.017697	1.81
1440925_at	Rhoq	Rasホモログ、遺伝子ファミリー、メンバ-Q	2.32	0.013564	2.22
1428902_at	Chst11	炭水化物ウルホトランスクエラーゼ11	2.30	0.000154	7.46
1416607_at	4931406C07Rik	RIKENcDNA4931406C07遺伝子	2.28	7.26E-11	21.08
1435673_at	Hoxd3	ホメオボックスD3	2.26	0.019944	1.60
1426663_s_at	Slc45a3	溶質キャリアーファミリー-45、メンバ-3	2.21	0.007554	3.07
1419651_at	2610200G18Rik	RIKENcDNA2610200G18遺伝子	2.21	0.000406	6.29

1422188_s_at	NA	NA	2.20	0.000397	6.39
1435468_at	D230025D16Rik	RIKENcDNA230025D16遺伝子	2.15	0.018503	1.71
1417991_at	Dio1	脱ヨウ素酵素、ヨードチロニン、I型 チロシンアミノトランスクフェラーゼ	2.12	0.026066	1.24
1451557_at	Tat	0710001D07Rik	2.11	0.046376	0.38
1428989_at		RIKENcDNA0710001D07遺伝子	2.03	0.04028	0.54
1456680_at	B3gnt6	UDP-GlcNAc-ペータGalベータ-1,3-N-アセチルグルコサミニ ルトランスクエラーゼ6(コア3シントーゼ)	2.01	0.024447	1.35
1443235_at	Eif2ak4	真核翻訳開始因子2アルファキナーゼ4	1.97	0.002156	4.51
1419759_at	Abcb1a	ATP結合カセツト、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバー 1A	1.97	0.009639	2.79
1456389_at	Zeb2	ジンクフィンガ-E-ボックス結合ホメオボックス2	1.96	0.013795	2.16
1440840_at	D630004K10Rik	RIKENcDNA630004K10遺伝子	1.96	0.017697	1.80
1457619_at	Ces6	カルボキシリエステラーゼ6	1.94	0.04028	0.55
1449049_at	Tir1	Toll様受容体1	1.92	0.018503	1.72
NuGO_emt049113_at	Ptprh	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、H	1.89	0.002961	4.17
1424376_at	Cdc42ep1	CDC42エフェクタータンパク質(RhoGTPase結合)1	1.88	0.014337	2.10
1436566_at	Rab40b	Rab40b、メンバー-RASがん遺伝子ファミリー	1.87	0.028805	1.04
1432590_at	LOC621549	NA	1.83	0.012459	2.38
1430543_at	Clip3	CAP-GLYドメイン含有リンカータンパク質3	1.82	6.24E-05	8.47
1435553_at	Pdzd2	PDZドメイン含有2	1.81	0.048735	0.32
1428271_at	Acbd4	アシル-補酵素A結合ドメイン含有4	1.80	0.014378	2.09
1418059_at	Eltd1	EGF、ラクトフィリン7回膜貫通ドメイン含有1	1.79	0.005331	3.47
1456532_at	Pdgfd	血小板由来増殖因子、Dポリペプチド	1.77	0.007554	3.05
1437393_at	Al875142	発現した配列AI875142	1.77	0.03504	0.78
1428332_at	1500004A08Rik	RIKENcDNA1500004A08遺伝子	1.77	0.038684	0.61
1434015_at	Slc2a6	溶質キャリアーファミリー2(促進グルコーストランスポータ ー)、メンバー6	1.75	0.000437	6.19
1449403_at	Pde9a	ホスホジエステラーゼ9A	1.71	0.03504	0.79
1428260_at	Spg3a	症性対まひ3Aホモログ、(ヒト)	1.69	0.011437	2.55
1417803_at	1110032A04Rik	RIKENcDNA1110032A04遺伝子	1.66	0.001103	5.27
1430245_at	Fxr1h	鞭毛X精神遲滞遺伝子1、常染色体ホモログ、	1.66	0.012459	2.36

1422542_at	Gpr34	Gタンパク質共役受容体34	1.65	0.031372	0.95
1427020_at	Scara3	スカベンジャー受容体クラスA、メンバー-3	1.60	0.010425	2.69
1430211_at	4930415O20Rik	RIKENcDNA4930415O20遺伝子	1.57	0.045	0.42
1452809_at	9030607L17Rik	RIKENcDNA9030607L17遺伝子	1.53	0.013564	2.22
NuGO_emt066282_at	Defb37	デフェンシンベータ37	1.51	0.005422	3.44
1451498_at	BC004853	cDNA配列BC004853	1.50	0.037045	0.69
1434140_at	Mcf2l	Mcf.2形質転換配列様	1.49	0.025597	1.30
1452650_at	Trim62	三角モチーフ含有62	1.46	0.026552	1.19
1427492_at	Pof1b	早発卵巣不全1B	1.46	0.004679	3.61
1426601_at	Slc37a1	溶質キャリアーファミリー-37(グリセロール-3-リン酸トランスポーター)、メンバー-1	1.42	0.032433	0.90
1448188_at	Ucp2	未結合タンパク質2(ミトコンドリア、プロトン担体)	1.42	0.008209	2.96
1460409_at	Cpt1a	カルニチンパルミトイルトランスクフェラーゼ1a、肝臓	1.40	0.025932	1.26
1460652_at	Esrra	エストロゲン関連受容体、アルファ	1.39	0.038182	0.65
1453869_at	LOC328277	NA	1.36	0.017271	1.86
1435985_at	Farp2	FERM、RhoGEF及びフレクストリンドメインタンパク質2	1.34	0.037045	0.70
1454706_at	Uvrag	UV照射耐性関連遺伝子	1.34	0.021704	1.51
1451232_at	Cd151	CD151抗原	1.31	0.049274	0.31
1423570_at	Abcg1	ATP結合力セット、サブファミリー-G(WHITE)、メンバ-1	1.30	0.04028	0.55
1418817_at	Chmp1b	クロマチン改変タンパク質1B	1.25	0.010981	2.61
1441059_at	1700049G17Rik	RIKENcDNA1700049G17遺伝子	1.25	0.028805	1.05
NuGO_emt061346_at	NA	NA	1.24	0.026697	1.17
1420503_at	Slc6a14	溶質キャリアーファミリー-6(ニューロトランスマッタトランスポーター)、メンバー-14	1.22	0.012499	2.32
NuGO_emt073103_x_at	NA	NA	1.21	0.01946	1.63
1452592_at	Mgst2	ミクロソームグルタチオンS-トランスクフェラーゼ2	1.18	0.038684	0.60
1441135_at	NA	NA	-1.10	0.01646	1.92
1428482_at	Akap10	Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質10	-1.10	0.022427	1.47
1426679_at	Zfp706	ジンクフィンガータンパク質706	-1.26	0.028805	1.05
1415816_at	Cct7	チャペロニンサブユニット7(eta)	-1.26	0.011936	2.47
1445024_at	Stard7	STARTドメイン含有7	-1.27	0.03504	0.79

1453591_at	5730437N04Rik	RIKENcDNA5730437N04遺伝子	-1.32	0.02652	1.19
1450788_at	Saa1	血清アミロイドA1	-1.32	0.002156	4.54
1436157_at	Ccar1	細胞分裂周期及びアポトーシス調節因子1	-1.33	0.034783	0.81
1450987_a_at	2310004I24Rik	RIKENcDNA2310004I24遺伝子	-1.35	0.0361	0.73
1433850_at	Ppp4r2	タンパク質ホスファターゼ4、調節サブユニット2	-1.36	0.018503	1.71
1434835_at	Wapal	Wingsapart様ホモログ、(ドロソフィラ)	-1.37	0.027058	1.14
NuGO_emt090017_s_at	Cdk7	シクリン依存キナーゼ7(ホモログ、ofXenopusMO15cdk-活性化キナーゼ)	-1.37	0.044186	0.44
1422579_at	Hspe1	ヒートショックタンパク質1(チャペロニン10)	-1.38	0.017697	1.81
1455726_at	Gm71	遺伝子モデル71、(NCBI)	-1.42	0.029302	1.02
1420461_at	Mst1r	マクロファージ刺激1受容体(c-met関連チロシンキナーゼ)	-1.49	0.046838	0.37
1453264_at	Marveld3	MARVEL(膜関連)ドメイン含有3	-1.49	0.005522	3.40
1425030_at	Zfp622	ジンクフィンガータンパク質622	-1.49	0.000586	5.89
1458507_at	2810055G22Rik	RIKENcDNA2810055G22遺伝子	-1.50	0.032433	0.89
1443988_at	Rbm39	RNA結合モチーフタンパク質39	-1.51	0.037045	0.68
1460465_at	A930038C07Rik	RIKENcDNAA930038C07遺伝子	-1.51	0.004627	3.64
1428784_at	Gmip	Gem相互作用タンパク質	-1.51	0.045	0.42
1451621_at	5830417C01Rik	RIKENcDNA5830417C01遺伝子	-1.65	0.014536	2.07
1422837_at	Scel	サイエリン	-1.68	0.0361	0.74
1454617_at	Arrdc3	アレスチンドメイン含有3	-1.71	0.038496	0.62
1452047_at	Cacybp	カルサイクリン結合タンパク質	-1.72	0.018495	1.75
1434724_at	Usp31	ユビキチン特異的ペプチダーゼ31	-1.75	0.024018	1.39
1417032_at	Ube2g2	ユビキチン共役酵素E2G2	-1.76	0.04028	0.56
1448628_at	Scg3	セクレトグランニンIII	-1.77	0.016351	1.93
1443877_a_at	Rapgef6	RapGニアニンヌクレオチド交換因子(GEF)6	-1.82	0.004044	3.80
1427944_at	Caprin2	カプリンファミリーメンバー2	-1.85	0.04248	0.49
1415909_at	Stip1	ストレス誘導ホスホタンパク質	-1.89	0.024018	1.38
1422452_at	Bag3	Bcl2関連アソノジーン3	-1.89	0.026066	1.24
1438041_at	Pde7a	ホスホジエステラーゼ7A	-1.91	0.025597	1.29
1433927_at	Usp1	ユビキチン特異的ペプチダーゼ様1	-1.92	0.024018	1.38

1422860_at	Nts	ニューロテンシン	-1.94	1.84E-07	14.19
1451194_at	Aldob	アルドراーゼ2、Bイソフォーム	-1.94	7.08E-06	10.59
1441662_at	Cyp4x1	シトクロームP450、ファミリー4、サブファミリーX、ポリペプチド1	-1.95	0.00019	7.22
1445490_at	C77805	発現した配列C77805	-1.96	0.003479	4.00
NuGO_emt066852_at	NA	NA	-2.07	0.013658	2.19
1442427_at	NA	NA	-2.11	0.033207	0.86
1430185_at	Akap13	Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質13	-2.12	0.0361	0.74
1452462_a_at	Banp	Btg3関連核タンパク質	-2.16	0.038182	0.64
1446158_at	Exoc6b	エクソシスト複合体成分6B	-2.19	0.010302	2.72
1418113_at	Cyp2d10	シトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーd、ポリペプチド10	-2.24	0.012383	2.42
1426645_at	Hsp90aa1	ヒートショックタンパク質90kDaアルファ(サイトゾル)、 ラスマエンバーラ	-2.30	0.012459	2.34
1420150_at	Spsb1	SplA/リアノジン受容体ドメイン及びSOCSボックス含有1	-2.36	0.015257	2.01
1452382_at	Dnm3os	ダイナミン3、反対鎖	-2.37	0.025932	1.26
1460645_at	Chordc1	システム及びヒスチジンリッチドメイン(CHORD)含有、 亜鉛結合タンパク質1	-2.38	0.002156	4.53
1457477_at	NA	NA	-2.39	0.027058	1.14
1430175_at	Tmtc2	膜貫通及びテトラトリコペプチドリピート含有2	-2.40	0.028805	1.05
1433266_at	2810416A17Rik	RIKENcDNA2810416A17遺伝子	-2.43	0.0361	0.73
1416756_at	Dnajb1	Dnaj(Hsp40)ホモログ、サブファミリーB、メンバー-1	-2.50	0.013658	2.19
1415938_at	Spink3	セリンペプチダーゼ阻害剤、Kazal型3	-2.53	0.012459	2.35
1429273_at	Bmpcr	BMP結合内皮調節因子	-2.53	0.012459	2.34
1450518_at	Hnf4g	幹細胞核因子4、ガンマ	-2.53	0.019018	1.66
1440227_at	BF642829	発現した配列BF642829	-2.58	0.038494	0.63
1451924_a_at	Edn1	エンドセリン1	-2.63	0.011568	2.51
1425952_a_at	Gcg	グルカゴン	-2.65	2.76E-06	11.57
1459253_at	Arrdc3	アレスチンドメイン含有3	-2.69	0.026081	1.23
1416288_at	Dnaja1	Dnaj(Hsp40)ホモログ、サブファミリーA、メンバー-1	-2.75	0.000154	7.45
1435160_at	1110064P04Rik	RIKENcDNA1110064P04遺伝子	-2.76	0.011568	2.52

1460179_at	Dnaja1	Dnaj(Hsp40)ホモログ、サブファミリー-A、メンバ-1	-2.78	0.000251	6.92
1419349_a_at	Cyp2d9	シトクロムP450、ファミリー-2、サブファミリー-d、ボリ	-2.78	0.000134	7.68
NuGO_emt044299_at	Sstr1	ソマトスタン受容体1	-2.80	3.73E-07	13.38
1449493_at	Insl5	インスリン様5	-2.91	5.33E-08	15.35
NuGO_emt054105_at	D630013G24Rik	RIKENcDNA0013G24遺伝子	-2.99	0.004044	3.83
1419185_a_at	Mixipl	MLX相互作用タンパク質様	-3.16	4.43E-06	11.08
1449939_s_at	Dlk1	デルタ様1ホモログ、(ドロソフィラ)	-3.29	9.19E-11	20.69
1458385_at	Hspa4l	ヒートショックタンパク質4様	-3.36	0.032433	0.90
1422639_at	Calcb	カルシトニン閾連ポリペプチド、ベータ	-3.75	0.010981	2.62
1425993_a_at	Hsp110	ヒートショックタンパク質110	-4.08	0.028805	1.05
NuGO_emt091063_at	NA	NA	-6.03	3.11E-07	13.63
1419473_a_at	Cck	コレシストキニン	-10.87	4.94E-11	21.66
1452388_at	Hspa1a	ヒートショックタンパク質1A	-25.30	0.02652	1.19

【0 5 4 6】
【表1-1】

表S4B. R.木ミニス接種動物と無菌動物との間で、28日にて上行結腸中示差的に発現した転写物

ID	記号	名前	FC	P値	B
1416809_at	Cyp3a11	シトクロームP450、ファミリー3,サブファミリー-a、ポリペプチド11	89.84	1.45E-06	12.00
1424973_at	Cyp3a25	シトクロームP450、ファミリー3,サブファミリー-a、ポリペプチド25	52.30	7.31E-07	12.67
1419393_at	Abcg5	ATP結合カセット、カルボキシリエステラーゼ6	42.06	1.60E-09	18.55
1449375_at	Ces6	リンパ球抗原6複合体、座G6C	26.10	1.75E-16	31.66
1422749_at	Ly6g6c	S100カルシウム結合タンパク質G	25.49	2.06E-10	20.64
1448964_at	S100g	カルバモイル-リン酸シンセターゼ1	17.88	4.82E-07	13.11
1455540_at	Cps1	小プロリンリッチタンパク質1A	11.50	0.010507	1.76
1449133_at	Sprn1a	ATP結合カセット、サブファミリー-A(ABC1)、メンバ-12	11.27	0.009303	1.97
NuGO_emt070648_at	Abca12	ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ1	7.97	4.05E-08	15.43
1448485_at	Ggt1	Aクアポリーン8	7.45	0.020934	0.94
1417828_at	Aqp8	オルファクトメジン4	6.67	0.001582	4.30
1437060_at	Olfm4	インドールアミン-ピロール2,3ジオキシゲナーゼ	5.80	0.023469	0.77
1420437_at	Indo	発現した配列AW125753	5.18	0.000637	5.44
1425452_s_at	AW125753	SIC30a10	4.97	0.001639	4.20
1439934_at		溶質キャリアーファミリー30、メンバ-10	4.68	0.000119	7.49
1430641_at	9030605104Rik	RIKENcDNA9030605104遺伝子	4.47	0.000199	6.89
1423556_at	Akr1b7	アルド-ケトリダクターゼファミリー1、メンバ-B7	4.36	0.000304	6.44
1428400_at	2200002K05Rik	RIKENcDNA2200002K05遺伝子	4.31	4.81E-07	13.18
1424626_at	2010003K11Rik	RIKENcDNA2010003K11遺伝子	4.25	0.024887	0.68
1439727_at	Cica6	塩素チャネルカルシウム活性化6	4.09	0.000869	5.07
1450355_a_at	Capg	キヤッピングタンパク質(アクチンフィラメント)、ゲルソリン様	3.90	4.67E-05	8.59
1427119_at	Spink4	セリンペプチダーゼ阻害剤、Kazal型4	3.67	0.007507	2.25
NuGO_emt092118_s_at	NA	NA	3.51	0.040399	-0.04
1451239_a_at	Slc26a1	溶質キャリアーファミリー26(硫酸トランスポーター)、メンバ-1	3.36	0.004508	2.94

1418283_at	Cldn4	バ-1	2.97	0.002809	3.51
1418165_at	Itlna	クラウジン4 インテレクチンa	2.88	0.0005	5.82
1440192_at	1810054D07Rik	RIKENcDNA1810054D07遺伝子	2.86	0.000108	7.65
1426980_s_at	E130012A19Rik	RIKENcDNAE130012A19遺伝子	2.83	0.002052	3.91
1431042_at	Paqr8	プロゲスチン及びアジポQ受容体ファミリーメンバ-VII	2.67	0.000637	5.46
1424688_at	Creb3l3	cAMP応答性ヨウ素結合タンパク質3様3	2.67	0.035165	0.19
NuGO_emt049113_at	Ptprh	タンパク質チロシンホスファターゼ、愛容体型、H	2.54	6.75E-06	10.55
1432358_at	Muc16	ムチン16	2.47	0.044391	-0.20
1419759_at	Abcb1a	ATP結合カセット、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバ-1A	2.46	0.00017	7.13
NuGO_emt033610_at	Nox1	NADPHオキシダーゼ1	2.43	0.035165	0.20
1418661_at	Abhd2	アブヒドロラーゼドメイン含有2	2.41	0.043727	-0.17
1420499_at	Gch1	GTPシクロヒドロラーゼ1	2.38	0.040391	-0.03
1416607_at	4931406C07Rik	RIKENcDNA4931406C07遺伝子	2.31	3.39E-11	22.26
1417991_at	Dio1	脱ヨウ素酵素、ヨードチロニン、型I	2.29	0.006845	2.39
1455455_at	Glt28d2	グリコシルトランスクエラーゼ28ドメイン含有2	2.16	0.015457	1.33
1417164_at	Dusp10	二重特異性ホスファターゼ10	2.13	0.031006	0.40
1428937_at	Atp2b1	ATPase、Ca++輸送、細胞膜1	2.13	1.13E-05	9.98
1429833_at	Ly6g6e	リンパ球抗原6複合体、座G6E	2.10	0.042694	-0.12
1419582_at	Cyp2c55	シトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーC、ポリペチド55	2.06	0.022426	0.83
1448562_at	Upp1	ウリジンホスホリラーゼ1	2.06	0.007369	2.29
1444254_at	NA	NA	2.05	0.009642	1.90
1428936_at	Atp2b1	ATPase、Ca++輸送、細胞膜	2.05	0.000378	6.15
1421268_at	Ugcg	UDP-グルコースセラミドグルコシルトランスクエラーゼ	2.05	0.035029	0.21
1419478_at	Sectm1b	分泌及び膜貫通1B	2.02	0.004814	2.83
1428336_at	Agpat4	1-アシルグリセロール-3-リン酸O-アクリルトランスクエラー ゼ4(リソホスファチジル酸アクリルトランスクエラーゼ、デルタ)	2.02	0.047797	-0.32

1456231_at	Pla2g3	ホスホリパーゼA2、グルーブII	1.99	0.000365	6.21
1421709_a_at	Fmo5	フラビン含有モノオキシゲナーゼ5	1.97	0.02187	0.86
1455104_at	NA	NA	1.95	0.010934	1.71
1417133_at	Pmp22	末梢ミエリントンパク質	1.95	0.027135	0.58
1418206_at	Sdf2l1	間質細胞由来因子2様1	1.94	0.045914	-0.25
1436614_at	Al1843639	発現した配列Al1843639	1.94	0.006795	2.41
1452070_at	Dedd2	死エフェクターDメイシン含有DNA結合タンパク質2	1.92	0.046848	-0.28
1417404_at	Elov6	ELOWLファミリームンバー6、長鎖脂肪酸(酵母)の延長	1.90	0.012549	1.55
1417277_at	Cyp4f16	シトクロームP450、ファミリー4、サブファミリーf、ポリペチド16	1.87	0.000119	7.50
1422983_at	Itgb6	インテグリンベータ6	1.87	0.03266	0.33
1454746_at	Plekhn1	フレクストリソホモログ、Yドメイン含有、ファミリーM(RUNドメインを有する)メンバ-1	1.86	0.001042	4.88
1425079_at	Tm6sf2	膜貫通6スープーファミリーメンバー2	1.85	0.001269	4.60
1455099_at	Mogat2	モノアシルグリセロールO-アクリルトランスクエラーゼ2	1.85	0.024887	0.68
1435749_at	Gda	グアニンデアミナーゼ	1.82	0.002467	3.67
1416488_at	Ccng2	サイクリンG2	1.81	0.003976	3.09
1418256_at	Srf	血清応答因子	1.79	0.033108	0.26
1426744_at	Srebpf2	ステロール調節要素結合因子2	1.76	0.041026	-0.07
1457253_at	Trim40	三角モチーフ含有40	1.75	0.001269	4.61
1433556_at	Centai	センタウリン、アルファ1	1.75	0.009141	2.01
NuGO_emt084792_x_at	NA	NA	1.74	0.020944	0.92
1417823_at	Gcat	グリシンC-アセチルトランスクエラーゼ(2-アミノ-3-ケトブチレート-補酵素Aリガーゼ)	1.74	0.049235	-0.38
NuGO_emt066282_at	Defb37	デフェンシンベータ37	1.74	6.42E-05	8.25
1429550_at	Entpd8	エクトヌクレオシドリホスホエートジホスホヒドロラーゼ8	1.73	0.004814	2.85
1430594_at	Rab11fip1	RAB11ファミリー相互作用タンパク質1(クラスI)	1.73	0.033108	0.27
1420913_at	Slco2a1	溶質キャリアー有機陰イオントランスポーターファミリー、メンバ-2a1	1.73	0.001791	4.09
NuGO_emt043440_at	2210010C17Rik	RIKENcDNA2210010C17遺伝子	1.73	0.01702	1.21

1430674_at	1700016C15Rik	RIKENcDNA1700016C15遺伝子	1.73	0.036022	0.14
1430890_at	2210010C17Rik	RIKENcDNA2210010C17遺伝子	1.72	0.011201	1.68
1417803_at	1110032A04Rik	RIKENcDNA1110032A04遺伝子	1.71	0.000358	6.25
1449873_at	Bmp8a	骨形態形成タンパク質8a	1.71	0.044796	-0.22
1434130_at	Lhfpl2	脂肪腫HMGIC融合パートナー様2	1.71	0.004814	2.83
1448605_at	Rhoc	Rasホモログ、遺伝子ファミリー、メンバ-C	1.70	0.001099	4.79
1432363_at	2410018E23Rik	RIKENcDNA2410018E23遺伝子	1.69	0.04853	-0.34
1427878_at	0610010O12Rik	RIKENcDNA0610010O12遺伝子	1.68	2.48E-05	9.21
1416379_at	Panx1	パネキシン1	1.67	0.002404	3.74
1434059_at	B230312A22Rik	RIKENcDNAB230312A22遺伝子	1.65	0.001763	4.12
1452475_at	Pcsk5	プロタンパク質コンバーターゼサブチリシン/ケキシン型5	1.65	0.036022	0.12
1454399_at	2010003H20Rik	RIKENcDNA2010003H20遺伝子	1.62	0.016629	1.24
1460550_at	Mtmt11	ミオチュー・プラリン関連タンパク質11	1.62	0.010762	1.73
NuGO_emt070892_at	NA	NA	1.62	0.020773	0.95
1436710_at	Zswim4	ジンクフインガー、SWIMドメイン含有4	1.62	0.009718	1.88
1420663_at	Zbtb7b	ジンクフインガー及びBTBドメイン含有7B	1.61	0.042694	-0.13
1418991_at	Bak1	BCL2-アンタゴニスト/キラー-1	1.61	0.01094	1.71
1417990_at	Ppp1r14d	タンパク質ホスファターゼ1、調節因子(阻害剤)サブユニット14D	1.59	0.003746	3.16
1452837_at	Lpin2	リピン2	1.58	0.035702	0.16
NuGO_emt021769_s_at	Slc17a4	溶質キャリアーファミリー-17(リン酸ナトリウム)、メンバ-4	1.57	0.015878	1.30
1418671_at	Capn5	カルペイント	1.57	0.041629	-0.09
1417751_at	Stk10	セリン/スレオニンキナーゼ10	1.57	0.027636	0.55
1452294_at	Pcdh1	プロトカドヘリン1	1.56	0.003042	3.42
1429154_at	Slc35f2	溶質キャリアーファミリー-35、メンバ-F2	1.56	0.004185	3.02
1450982_at	Slc9a3r1	溶質キャリアーファミリー-9(ナトリウム/水素エクスチエンジヤ)、イソフオーム3調節因子1	1.56	0.008755	2.06
1434015_at	Slc2a6	溶質キャリアーファミリー-2(促進グルコーストランスポーター)、メンバ-6	1.55	0.005093	2.72
1418712_at	Cdc42ep5	CDC42エフェクタータンパク質(RhoGTPase結合)5	1.55	0.003976	3.09

1424809_at	Crb3	Crumbshホモログ、3(ドロソフィラ) OTUドメイン含有7B	1.53	0.014107	1.43
1428953_at	Otud7b	シニテカン結合タンパク質(シンテニン)2 メプリン1ベータ	1.53	0.035702	0.17
1424090_at	Sdcbp2	遺伝子モデル440、(NCBI)	1.53	0.023574	0.76
1418215_at	Mep1b	ラミンB1	1.53	0.027636	0.55
1434456_at	Gm440	NLRファミリー、アポトーシス阻害タンパク質1 リバーゼ、メンバーハ	1.53	0.032752	0.32
1423521_at	Lmnb1	細胞死誘導DNA断片化因子、アルファサブユニット様エフェクター-B	1.53	0.007369	2.31
1425298_a_at	Naip1	1.51	0.002438	3.70	
1456619_at	Liph	1.50	0.044796	-0.22	
1418976_s_at	Cldeb	1.49	0.020944	0.93	
1423376_a_at	Dok4	ドッキングタンパク質4 ピリドシン5'-リン酸オキシダーゼ	1.49	0.005089	2.73
1415793_at	Pnpo	膜関連グアニレートキナーゼ、WW及びPDZドメイン含有3	1.48	0.00252	3.63
1435461_at	Magi3	cDNA配列BC042698	1.48	0.001623	4.23
1444951_at	BC042698	SKI様	1.45	0.042694	-0.14
1452214_at	Skil	Krt20 ケラチン20	1.45	0.020383	0.99
1426284_at	A1427122	発現した配列A1427122	1.43	0.021519	0.88
1460406_at	Cdh17	カドヘリン17	1.42	0.016225	1.27
1419331_at	Myo1e	ミオシンE	1.41	0.009399	1.94
1428509_at	Tradd	死ドメインを介してTNFRSF1A関連	1.41	0.043727	-0.17
1429117_at	Ceacam2	CEA関連細胞接着分子2	1.41	0.036022	0.14
1460681_at	NA	NA	1.41	0.048555	-0.36
1455678_at	BC040758	cDNA配列BC040758	1.41	0.026321	0.62
1440218_at	Tspan3	テトラスパニン3	1.40	0.002052	3.91
1416009_at	Ipmk	イノシトールリン酸マルチキナーゼ	1.40	0.033108	0.28
1456200_at	Alas1	アミノレブリン酸シンターゼ1	1.39	0.040391	-0.03
1424126_at	D4Ert22e	DNAセグメント、Chr4、ERATODoli22、発現	1.39	0.038213	0.05
1434482_at	Gtpbp2	GTP結合タンパク質2	1.38	0.035702	0.16
1416690_at	Tmem54	膜貫通タンパク質54	1.38	0.001332	4.53
1417895_a_at	Ces2	カルボキシルエステラーゼ2	1.37	0.020383	0.99
1424245_at					

1434559_at	Stx3	シントキシン3	1.37	0.032755	0.31
1426733_at	Itpk1	イノシトール1,3,4-三リノ酸5/6キナーゼ 溶質キャリヤーファミリー-39(亜鉛トランスポーター、メンバ-4)	1.35	0.010099	1.81
1451139_at	Slc39a4	関連RASウイルス(r-ras)がん遺伝子ホモログ、2 ミオシンXVB	1.34	0.040085	-0.02
1417398_at	Rras2	RIKENcDNA2210016F16遺伝子	1.33	0.020944	0.92
1427203_at	Myo15b	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型23 ミオシンVIIb	1.32	0.047659	-0.30
1428331_at	2210016F16Rik	RhoGニアニンスクレオチド交換因子(GEF)5	1.31	0.042694	-0.13
1427128_at	Ptpn23	Ras関連(RalGDS/AF-6)及びブレクストリンホモログ、ドメイン1	1.30	0.036022	0.13
1420426_at	Myo7b	発現した配列AI788777 異種核リボヌクレオタンパク質U様2	1.30	0.047797	-0.31
1452304_a_at	Arhgef5	Semaドメイン、免疫グロブリンドメイン(Ig)、膜貫通ドメイ n(TM)及び短細胞質ドメイン、(セマホリцин)4A 膜結合O-アクリルトランクスフェラーゼドメイン含有5	1.29	0.024887	0.69
1434303_at	Raph1	プロテオソーム(プロソーム、マクロファイン)サブユニット、ペータ型5 クラリン3	1.28	0.018321	1.10
1433885_at	AI788777	ムチン及びカドヘリン様 溶質キャリヤーファミリー-6(ニユーロトランスマッタラン スポーツター)、メンバ-14	1.28	0.009181	2.00
1415765_at	Hnrpu12	Semaドメイン、免疫グロブリンドメイン(Ig)、膜貫通ドメイ n(TM)及び短細胞質ドメイン、(セマホリцин)4A 膜結合O-アクリルトランクスフェラーゼドメイン含有5	1.27	0.00151	4.40
1448110_at	Sema4a	プロテオソーム(プロソーム、マクロファイン)サブユニット、ペータ型5 クラリン3	1.27	0.043727	-0.18
1423960_at	Mboat5	1.27	0.040399	-0.04	
1415676_a_at	Psmb5	1.27	0.027133	0.59	
1434345_at	Clnr3	1.27	0.036152	0.11	
1426014_a_at	Mucdhl	1.26	0.001582	4.31	
1420503_at	Slc6a14	クロマチン改変タンパク質1B プロリンリッチ13	1.25	0.004961	2.78
1418817_at	Chmp1b	ロイシンジッパー-EF-hンド含有膜貫通タンパク質1	1.25	0.026919	0.60
1423686_a_at	Prr13	主要ポールトタンパク質	1.24	0.036022	0.13
1420826_at	Letm1	GIPCPDZドメイン含有ファミリー、メンバー-2	1.24	0.031006	0.39
1448618_at	Mvp	セリンプロテアーゼ阻害剤、Kunitz型1	1.23	0.048555	-0.36
1417178_at	Gipc2	SAR1遺伝子ホモログ、B(S.セルビシエ)	1.22	0.036022	0.13
1416627_at	Sprint1				
1428163_at	Sar1b				

1416193_at	Car1	カルボン酸無水物1	1.21	0.009728	1.87
1444884_at	Ppt1	パルミトイール-タンパク質チオエステラーゼ1	1.18	0.032755	0.31
1448279_at	Arpc3	アクチン関連タンパク質2/3複合体、サブユニット3	1.14	0.049367	-0.38
1417282_at	Mmp23	マトリックスマタロペプチダーゼ23	-1.14	0.024366	0.72
1429615_at	Zfp91	ジンクフィンガータンパク質91	-1.22	0.038424	0.04
1453577_at	2610018I03Rik	RIKENcDNA2610018I03遺伝子 統合膜タンパク質2B	-1.22	0.04853	-0.35
1417999_at	Itm2b	Kelch様20(ドロソフィラ)	-1.24	0.040433	-0.05
1454994_at	Kih20	ミトコンドリアリボソームタンパク質S5	-1.25	0.022222	0.84
1435563_at	Mirps5	NA	-1.27	0.04853	-0.34
1445561_at	Trpc2	一過性受容体電位陽イオンチャネル、サブファミリーC、メンバーバー2	-1.27	0.002008	3.97
1436854_at	Oat	オルニチニアミノトランスフェラーゼ	-1.27	0.009757	1.86
1416452_at	Itm2c	統合膜タンパク質2C	-1.28	0.007369	2.28
1415961_at	Pcdhb17	プロトカドヘリンベータ17	-1.28	0.048555	-0.35
1448933_at	Gcn1l1	アミノ酸合成1のGCN1遺伝子制御様1(酵母)	-1.29	0.030585	0.42
1440391_at	Saa1	血清アミロイドA1	-1.31	0.001623	4.23
1450788_at	Pappa2	パパライシン2	-1.31	0.038548	0.03
1444451_at	C030010B13Rik	RIKENcDNA030010B13遺伝子	-1.31	0.023793	0.74
1457029_at	Zfp346	ジンクフィンガータンパク質346	-1.33	0.039077	0.01
1417088_at	Zfp287	ジンクフィンガータンパク質287	-1.33	0.022441	0.82
1436220_at	Zfp458	ジンクフィンガータンパク質458	-1.37	0.044011	-0.18
1445824_at	D16Bwg1494e	DNAセグメント、Chr16、Brigham&Women's遺伝子1494発現	-1.37	0.035165	0.19
1420191_s_at	Tgfb1	形質転換増殖因子、ペータ誘導	-1.38	0.039653	0.00
1415871_at	9030416H16Rik	RIKENcDNA9030416H16遺伝子	-1.41	0.012107	1.59
1442731_at	Nupl2	ヌクレオポリン様2	-1.42	0.001582	4.31
1424889_at	Plekhb1	プレクストリニホモログ、ドメイン含有、ファミリーB(エベクチン)メンバーハー1	-1.44	0.047797	-0.32
1416178_a_at	Adam23	Aディスキンテグリン及びメタロペプチダーゼドメイン23	-1.44	0.017961	1.13

NuGO_emt080869_at	NA	NA	-1.45	0.032755	0.31
1452050_at	Camk1d	カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼID	-1.45	0.006002	2.56
1442447_at	Znrf3	亜鉛及びリングフィンガ-3	-1.45	9.00E-06	10.24
1416865_at	Fgd1	FYVE、RhoGEF及びPHDメイン含有1	-1.46	0.049235	-0.37
1442197_at	AI480624	発現した配列AI480624	-1.47	0.033108	0.27
1427020_at	Scara3	スカベンジャー受容体クラSA、メンバ-3	-1.47	0.029906	0.45
1434961_at	Asb1	アンキリンリピート及びSOCSボックス含有タンパク質1	-1.48	0.0093	1.97
1431873_a_at	Tube1	エプシロン-チューブリン1	-1.48	0.033108	0.26
1424367_a_at	Homer2	Homerホモログ、2(ドロソフイラ)	-1.49	0.00269	3.56
1441662_at	Cyp4x1	シトクロームP450、ファミリー4,サブファミリー-x、ポリペチド1	-1.50	0.028455	0.51
1429086_at	Grlh2	Grainyhead様2(ドロソフイラ)	-1.51	0.04298	-0.15
1439078_at	Klh4	Kelch様4(ドロソフイラ)	-1.52	0.020679	0.96
1451194_at	Aldob	アルドラーゼ2、Bイソフォーム	-1.54	0.002438	3.70
1449913_at	Zfp2	ジンクフィンガータンパク質2	-1.55	0.033108	0.29
1431820_at	4632404H12Rik	RIKENcDNA4632404H12遺伝子	-1.56	0.036071	0.12
1437900_at	4930523C07Rik	RIKENcDNA4930523C07遺伝子	-1.56	0.044391	-0.20
1449462_at	3110049J23Rik	RIKENcDNA3110049J23遺伝子	-1.57	0.041709	-0.09
1457373_at	Cdh19	カドヘリン19、型2	-1.57	0.032755	0.31
1423072_at	6720475J19Rik	RIKENcDNA6720475J19遺伝子	-1.58	0.006244	2.51
1422542_at	Gpr34	Gタンパク質共役受容体34	-1.58	0.040399	-0.04
1448475_at	Olfml3	オルファクトメジン様3	-1.58	0.032964	0.30
1417676_a_at	Ptpro	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、O	-1.59	0.001623	4.24
1456763_at	AA536749	発現した配列AA536749	-1.59	0.017774	1.15
1417732_at	Anxa8	アネキシンA8	-1.59	0.027267	0.57
1425510_at	Mark1	MAP微小管アフィニティ-調節キナーゼ1	-1.60	0.004814	2.85
1417234_at	Mmp11	マトリックスマタロペプチダーゼ11	-1.61	0.036152	0.11
1416194_at	Cyp4b1	シトクロームP450、ファミリー4,サブファミリー-b、ポリペチド1	-1.62	0.002404	3.74
1429679_at	Fbxl13	F-ボックス及びロイシンリッチリピートタンパク質13	-1.64	0.010507	1.76

1428260_at	Spg3a	痙性対まひ3Aホモログ、(ヒト)	-1.68	0.007369	2.28
1426413_at	Neurod1	神経発生分化1	-1.68	0.009718	1.88
1455500_at	Rnf213	リングフィンガータンパク質213	-1.68	0.017961	1.13
1456532_at	Pdgfd	血小板由来増殖因子、Dポリペプチド	-1.70	0.008375	2.11
1419754_at	Myo5a	ミオシンVa	-1.71	0.020595	0.97
1460147_at	NA	NA	-1.71	0.037207	0.08
1440014_at	Pacs1	ホスホフリン酸性クラスターソーティングタンパク質1	-1.72	7.34E-05	8.05
1451342_at	Spon1	スポーツジン1、(f-スポーツジン)細胞外マトリックスタンパク質	-1.73	0.045023	-0.23
1438530_at	Tfpi	組織因子経路阻害剤	-1.76	0.001582	4.29
1449563_at	Cntn1	コントакチン1	-1.77	0.029208	0.48
1435829_at	B930008K04Rik	RIKENcDNAB930008K04遺伝子	-1.78	0.004961	2.78
NuGO_emt010210_at	Cacna2d2	カルシウムチャネル、電圧依存、アルファ2/デルタサブユニット2	-1.80	0.035702	0.17
1455633_at	Zfp647	ジンクフィンガータンパク質647	-1.80	0.041245	-0.08
1420416_at	Sema3a	Semaドメイン、免疫グロブリンドメイン、(Ig)、短塩基性ドメイン、分泌(セマホリン)3A	-1.81	0.000506	5.78
1417644_at	Sspn	サルコスパン	-1.83	0.003984	3.08
1419687_at	D930010J01Rik	RIKENcDNAD930010J01遺伝子	-1.83	0.045963	-0.25
1439618_at	Pde10a	ホスホジエステラーゼ10A	-1.83	0.017774	1.16
1440430_at	Eip4	延長タンパク質4ホモログ、(S.セルビシエ)	-1.84	0.023065	0.79
1425069_at	BC018285	cDNA配列BC018285	-1.84	0.042264	-0.11
1419376_at	1110018M03Rik	RIKENcDNA1110018M03遺伝子	-1.85	0.009718	1.88
1434194_at	Mtap2	微小管関連タンパク質2	-1.85	0.007048	2.36
1459707_at	Pacs1	ホスホフリン酸性クラスターソーティングタンパク質1	-1.86	0.004814	2.86
1434475_at	Ppig	ペプチジル-プロピルイソメラーゼG(シクロフィリンG)	-1.86	0.045576	-0.24
1449158_at	Kcnk2	カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー2	-1.87	0.004961	2.77
1460606_at	Hsd17b13	ヒドロキシステロイド(17-ベータ)デヒドロゲナーゼ13	-1.88	0.003153	3.38
1436087_at	Dpp10	ジペプチジルペプチダーゼ10	-1.89	0.043727	-0.17
NuGO_emt029633_at	Npy2r	ニューロペプチドY受容体Y2	-1.90	0.000199	6.88
1418606_at	Hoxd10	ホメオボックスD10	-1.91	0.007866	2.18

1417411_at	Nap1l5	ヌクレオソームアセンブリタンパク質1様5	-1.91	0.047023	-0.29
NuGO_emt034831_at	Nr2e3	核受容体サブファミリー-2、グルーブE、メンバ-3	-1.91	0.040798	-0.06
1434740_at	Scarf2	スカベンジャー受容体クラスF、メンバ-2	-1.91	0.046195	-0.26
1420858_at	Pkia	タンパク質キナーゼ阻害剤、アルファB-細胞CLL/リンパ腫11A(ジンクフィンガータンパク質)	-1.92	0.003616	3.21
1457072_at	Bcl11a	B-細胞FMR1相互作用タンパク質2	-1.93	0.04853	-0.35
1428347_at	Cyfip2	細胞質FMR1ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12	-1.93	0.000484	5.87
1448823_at	Cxcl12	ケモカイン(シオシンVa)	-1.95	0.007369	2.28
1436051_at	Myo5a	2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ2	-1.95	0.000596	5.61
1425065_at	Oas2	RAB23、メンバ-RASがん遺伝子ファミリー	-1.96	0.032484	0.34
1454876_at	Rab23	CARTプレロペプチド	-1.97	0.029208	0.48
NuGO_emt022150_at	Cartpt	アンジオテンシンノーゲン(セルビンペプチダーゼ阻害剤、クラッドA、メンバ-8)	-1.98	0.008035	2.16
1423396_at	Agt	ケラチン23	-1.99	0.031284	0.38
1418213_at	Krt23	SET及びMYNDドメイン含有3	-2.02	0.022766	0.80
1444670_at	Smyd3	DEAH(Asp-Glu-Ala-His)ボックスクスポリペプチド30	-2.03	0.027622	0.56
1453251_at	Dhx30	Rasホモログ、遺伝子ファミリー、メンバ-Q	-2.05	0.031006	0.40
1440925_at	Rhoq	プロトカドヘリンベータ9	-2.07	0.015304	1.34
1422640_at	Pcdhb9	セクレトグラニンII	-2.09	0.010099	1.81
1450708_at	Scg2	ホメオボックスD3	-2.09	0.029426	0.47
1435673_at	Hoxd3	膜貫通タンパク質35	-2.10	0.007507	2.24
1416710_at	Tmem35	セクレトグラニンV	-2.11	0.002438	3.69
1423150_at	Scg5	グアニレートヌクレオチド結合タンパク質3	-2.11	0.020383	0.99
1418392_a_at	Gbp3	Rab40b、メンバ-RASがんgeneファミリー	-2.12	0.003512	3.25
1436566_at	Rab40b	予測遺伝子、EG665123	-2.14	0.035789	0.15
1441231_at	EG665123	ショクロームP450、ファミリー-2,サブファミリー-d、ポリペチド9	-2.14	0.003512	3.25
1419349_a_at	Cyp2d9	発現した配列AI317158	-2.18	0.033108	0.26
1445481_at	Al317158	F-ボックスタンパク質39	-2.19	0.009359	1.95
1443698_at	Fbxo39	溶質キャリアーファミリー-29(スクレオシドランス寄托	-2.22	0.001105	4.77
1424900_at	Slc29a4				

1419185_a_at	Mlxip1	MLX相互作用タンパク質様 CAP-GLYドメイン含有リンカータンパク質ファミリー、メンバ-4	-2.23	0.000867	5.09
1435504_at	Clip4	PHDフィンガータンパク質11	-2.24	0.006244	2.51
1438868_at	Phf11	ニユーロテンシン	-2.28	1.04E-09	19.02
1422860_at	Nts	三角モチーフタンパク質30	-2.28	0.038792	0.03
1451860_a_at	Trim30	RIKENcDNA030050A07遺伝子	-2.33	0.009359	1.95
1434788_at	D930050A07Rik	Ets/バリアント遺伝子1	-2.38	0.000606	5.57
1450684_at	Etv1	低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質11	-2.39	0.000793	5.21
1433536_at	Lrp11	RIKENcDNA09030421J09遺伝子	-2.44	0.044497	-0.20
NuGO_emt060551_at	9030421J09Rik	膜貫通タンパク質86A	-2.45	0.004961	2.76
1428758_at	Tmem86a	NA	-2.54	0.031006	0.39
1445881_at	NA	DNAセグメント、Chr11、LotharHennighausen2、発現	-2.55	0.0093	1.98
1451426_at	D11Lgp2e	溶質キャリヤーファミリー-2(促進グルコーストランスポーター5)	-2.67	0.006738	2.43
1416639_at	Slc2a5	受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1	-2.70	0.001269	4.59
1429313_at	Ror1	RIKENcDNA6720477C19遺伝子	-2.72	0.017774	1.16
1433184_at	6720477C19Rik	アルド-ケトリダクターゼファミリー-1、メンバ-C18	-2.77	0.0113	1.66
1419136_at	Akr1c18	シトクロームP450、ファミリー-2、サブファミリー-d、ポリペチド10	-2.79	0.000483	5.90
1418113_at	Cyp2d10	調節内分泌特異的タンパク質18	-2.83	0.003512	3.26
1417988_at	Resp18	2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ様2	-2.84	0.011794	1.62
1453196_a_at	Oasl2	インターフェロン誘導タンパク質44	-2.86	0.042694	-0.13
1423555_a_at	Ifi44	デルタ様1ホモログ、(ドロソフィラ)	-2.99	5.20E-10	19.73
1449939_s_at	Dlk1	NA	-3.08	0.000637	5.49
NuGO_emt091063_at	NA	アンキリンリピートドメイン、43	-3.13	0.001056	4.85
1436998_at	Ankrdd43	テトラトリコペプチドリピート2を有するインターフェロン誘導タンパク質	-3.14	0.000637	5.44
1418293_at	Ifit2	ソマトスタチン受容体1	-3.16	2.31E-08	16.00
NuGO_emt044299_at	Sstr1				

1421492_at	Ptgds2	プロスタグランジンD2シンターゼ2、造血性テトラトリコペプチドリピート3を有するインターフェロン誘導タンパク質	-3.18	7.03E-05	8.13
1449025_at	Ifit3		-3.34	0.007674	2.21
1455528_at	NA		-3.47	0.002046	3.94
1429273_at	Bmp1r	BMP結合内皮調節因子	-3.55	0.000199	6.93
1425952_a_at	Gcg	グルカゴン	-3.68	3.98E-09	17.68
1448628_at	Scg3	セクレトグラニンIII	-3.77	1.61E-08	16.39
1448201_at	Sfrp2	分泌縮関連タンパク質2	-4.18	0.000257	6.62
1418191_at	Usp18	ユビキチン特異的ペプチダーゼ18	-4.45	0.046848	-0.28
1449493_at	Ins15	インスリン様5	-9.54	5.98E-16	30.51
1419473_a_at	Cck	コレシストキニン	-11.97	1.17E-11	23.32

10

20

30

40

50

【0547】
【表12】

表S4C R.ホミニス接種動物と無菌動物との間で、14日での回腸中に示差的に発現した転写物。

ID	記号	名前	FC	P値	B
1427343_at	Rasd2	RASDファミリー、メンバーアー2	4.21	0.008352	3.02
1420673_a_at	Acox2	アル-補酵素Aオキシダーゼ2、分岐鎖D部位アルブミンプロモータ結合タンパク質	3.37	0.023445	1.29
1418174_at	Dbp	クロモボックスホモログ、2(ドロソフィラPcクラス)	3.26	0.04708	0.16
1434116_at	Cbx2	膜貫通タンパク質171	3.15	0.01298	2.21
1456284_at	Tmem171	cDNA配列BC048355	2.94	0.011378	2.45
1460713_at	BC048355	RIKENcDNA4632433K11遺伝子	2.61	0.035037	0.67
1438689_at	4632433K11Rik	分泌網開連配列タンパク質1	2.41	0.04048	0.41
1460187_at	Sfrp1	Polycombグルーブリングフィンガー-2	2.37	0.021033	1.51
1420645_at	Pcgf2	リンクフィンガ-CCCH型含有7B	2.31	0.003987	4.19
1455547_at	Zc3h7b	チミジンキナーゼ1	2.16	0.008352	2.98
1416258_at	Tk1	Eph受容体B4	2.12	0.017451	1.78
1449845_a_at	Ephb4	4ヒドロキシフェニルビルビン酸ジオキシゲナーゼ様	2.12	0.033002	0.77
1455120_at	Hndl	増殖停止特異的6	2.07	0.023445	1.30
1417399_at	Gas6	Ras応答性要素結合タンパク質1	2.06	0.000167	8.81
1452862_at	Rreb1	NA	2.05	0.03901	0.47
1455246_at	NA	MICAL様2	2.02	0.032868	0.78
1434322_at	Mical2	B細胞CLL/リンパ腫7A	1.99	0.009875	2.69
1428207_at	Bcl7a	ミトコンドリアリボソームタンパク質S2	1.99	0.04708	0.11
1420845_at	Mps2	NA	1.97	0.042267	0.36
1444254_at	NA	カルシウムチャネル、電圧依存、ベータ3サブユニット	1.96	0.025132	1.19
1448656_at	Cacnb3	発現した配列AI480556	1.96	0.032019	0.86
1434908_at	AI480556	CDC42エフェクタータンパク質(RhoGTPase結合)1	1.95	0.029591	0.99
1424376_at	Cdc42ep1	STARD3 N末端様	1.89	0.01298	2.20
1430274_a_at	Stard3nl	ラミニン、ベータ2	1.88	0.008596	2.92
1416513_at	Lamb2		1.87	0.016398	1.89

1416536_at	Mum1	メラノーマ関連抗原(変異)1	1.86	0.025132	1.17
NuGO_emt084041_s_at	Defcr20	デフェンシン関連クリプトジン20	1.84	0.020502	1.55
1418320_at	Prss8	プロテアーゼ、セリン、8(プロスタシン)	1.83	0.021033	1.49
1455163_at	Guf1	GUF1GTPaseホモログ、(S.セルビシエ)	1.80	0.024461	1.22
1436665_a_at	Ltbp4	潜在的形質転換増殖因子ベータ結合タンパク質4	1.80	0.036581	0.57
1420643_at	Lfng	過激フリンジ遺伝子ホモログ、(ドロソフィラ)	1.79	0.0033248	4.57
1428695_at	9130227C08Rik	RIKENcDNA9130227C08Rik遺伝子	1.79	0.036167	0.59
1453018_at	Nvl	核VCP様	1.77	0.035037	0.65
1419101_at	Sin3a	転写al調節因子、SIN3A(酵母)	1.76	0.030882	0.91
1424459_at	Ayt12	アクリルトランスクエラーーゼβ様2	1.74	0.039921	0.43
1415935_at	Smoc2	SPARC関連モジュラーカルシウム結合2	1.73	0.04615	0.19
1424618_at	Hpd	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ	1.73	0.03901	0.47
1426297_at	Tcfe2a	転写因子E2a	1.73	0.002215	5.11
1425391_a_at	Osbpl5	オキソステロール結合タンパク質様5	1.73	0.04615	0.19
1455719_at	Tubb5	チューブリン、ベータ5	1.73	0.032477	0.82
1451912_a_at	Fgfr11	纖維芽細胞増殖因子受容体様1	1.73	0.02321	1.33
1429582_at	Btdbd14a	BTB(POZ)ドメイン含有14A	1.72	0.003987	4.21
1454777_at	Slco2b1	溶質キャリアー有機陰イオントランSPORTER-1 -、メンバ-2b1	1.70	0.01298	2.22
1424101_at	Hnpl	異種核リボヌクレオタンパク質L	1.69	0.044481	0.25
1448691_at	Ubqln4	ユビキリン4	1.65	0.016054	1.92
1417604_at	Camk1	カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼI	1.63	0.033233	0.74
1442757_at	Lrch1	ロイシンリッチリピート及びカルボニンホモログ、(CH) ^D メイン含有1	1.63	0.007505	3.30
1460675_at	Igsf8	免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバ-8	1.62	0.04708	0.13
1418671_at	Capn5	カルペイシン5	1.58	0.04708	0.15
1426897_at	Rcc2	クロモソーム濃縮2の調節因子	1.57	0.035037	0.65
1417594_at	Gkap1	Gキナーゼアンカータンパク質1	1.52	0.019831	1.60
1433539_at	Comm3	COMMドメイン含有3	1.51	0.009875	2.72
1435469_at	Qscn6l1	QuiescinQ6様1	1.51	0.041412	0.38

1448561_at	Ncf2	好中球サイトゾル因子2	1.51	0.044087	0.30
1427022_at	Ddx42	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド42	1.50	0.01872	1.67
1416030_a_at	Mcm7	ミニクロモソーム維持欠損7(S.セルビシエ)	1.49	0.02321	1.34
1450023_at	Gtpbp1	GTP結合タンパク質1	1.48	0.044113	0.27
1417879_at	Nenf	ニューロン由来神経栄養因子	1.48	0.03901	0.46
1424640_at	Arl8a	ADP-リボシル化因子様8A	1.47	0.044113	0.28
1418982_at	Cebpa	CCAATT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP)、アルファ	1.47	0.036167	0.60
1428382_at	Smarcc2	SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存調節因子、サブファミリーC、メンバ-2	1.47	0.044113	0.28
1434134_at	Wdr42a	WDリピートドメイン、4A	1.45	0.009875	2.74
1450519_a_at	Prkaca	タンパク質キナーゼ、cAMP依存、触媒、アルファ	1.44	0.008352	2.99
1451306_at	Cdca7l	細胞分裂周期関連7様	1.44	0.035037	0.65
1426724_at	Cnn3	カルボニン3、酸性	1.44	0.033105	0.76
1424644_at	Tbcc	チューブリン特異的チャペロンC	1.42	0.032128	0.85
1417266_at	Ccl6	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド6	1.42	0.021206	1.47
1415975_at	Carhsp1	カルシウム調節熱安定タンパク質1	1.38	0.014132	2.10
1448277_at	Pold2	ポリメラーゼ(DNA指向)、デルタ2、調節サブユニット	1.38	0.044481	0.24
1433736_at	Hcfc1	Host細胞因子C1	1.35	0.035162	0.64
1435149_at	Plcg1	ホスホリパーゼC、ガンマ1	1.35	0.036167	0.59
1417500_a_at	Tgm2	トランスクルタミナーゼ2、Cポリペプチド	1.33	0.022457	1.39
1428125_at	4921506J03Rik	RIKENcDNA4921506J03遺伝子	1.32	0.030752	0.92
1452100_at	Dullard	デュラルドホモログ、(アフリカツメガエル)	1.32	0.030391	0.94
1448148_at	Gm	グラヌリン	1.30	0.011783	2.33
1451984_at	Hnrpul1	異種核リボヌクレオタンパク質U様1	1.30	0.016884	1.85
1426401_at	Ppp3ca	タンパク質ホスファターゼ3、触媒サブユニット、アルファイソフォーム	1.29	0.009875	2.72
1428380_at	0610007C21Rik	RIKENcDNA0610007C21遺伝子	1.26	0.043354	0.32
1418364_a_at	Ftl1	フェリチン軽鎖1	1.24	0.01702	1.82
1456854_at	Neurl	ニューラライズド様ホモログ、(ドロソフィラ)	-1.18	0.031207	0.89
1448853_at	Synj2bp	シナプトジャニン2結合タンパク質	-1.19	0.04708	0.15

1416281_at	Wdr45l	Wdr45様 溶質キャリヤーファミリー30(亜鉛トランスポーター、メンバ-4	-1.22	0.016971	1.84
1418843_at	Slc30a4		-1.30	0.037239	0.54
1459557_at	Zbtb16	シンクフィンガー及びBTBドメイン含有16	-1.31	0.001423	5.62
1418116_at	Ifrg15	インターフエロソナルファ応答性遺伝子	-1.32	0.038411	0.50
1448762_at	Rad17	RAD17ホモログ、(S.ポンベ)	-1.32	0.044087	0.30
1435461_at	Magi3	膜関連ゲニアニレートキナーゼ、WW及びPDZドメイン含有3	-1.33	0.044113	0.26
1434835_at	Wapal	ウイングスアパート様ホモログ、(ドロソフィラ)	-1.33	0.046851	0.17
1444328_at	NA	NA	-1.34	0.010408	2.57
NuGO_emt073151_at	Nlrp9b	NLRファミリー、ピリンドメイン含有9B	-1.34	0.045959	0.20
1427269_at	Sfrs11	スプライシング因子、アルギニン/セリン-rich11	-1.35	0.02461	1.22
1436157_at	Ccar1	細胞分裂周期及びアポトーシス調節因子1	-1.36	0.021206	1.46
NuGO_emt081039_at	Eif4e1b	真核翻訳開始因子4Eファミリーメンバ-1B	-1.38	0.037239	0.54
1422217_a_at	Cyp1a1	シトクロームP450、ファミリー1,サブファミリー-a、ポリペプチド1	-1.38	0.005253	3.71
1434654_at	Cog3	オリゴマゴルジ複合体3の成分	-1.38	0.03901	0.46
1421680_at	NA	NA	-1.39	0.044113	0.28
1424296_at	Gclc	グルタミン酸-システィンリガーゼ、触媒サブユニット	-1.41	0.023137	1.36
1440722_at	D19Erttd386e	DNAセグメント、Chr19、ERATOD01386、発現	-1.41	0.008352	3.15
1429849_at	4632411B12Rik	RIKENcDNA4632411B12遺伝子	-1.44	0.015927	1.94
1451407_at	Jam4	接合部接着分子4	-1.44	0.015521	1.99
1424324_at	Esco1	凝集性1ホモログ、1の確立(S.セルビシエ)	-1.47	0.010277	2.60
1441403_at	6430501K19Rik	RIKENcDNA6430501K19遺伝子	-1.47	0.019952	1.59
1453160_at	Thrap1	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質1	-1.48	0.034193	0.71
1432962_at	2610024D14Rik	RIKENcDNA2610024D14遺伝子	-1.49	0.018436	1.70
1456896_at	6720462K09Rik	RIKENcDNA6720462K09遺伝子	-1.50	0.011783	2.34
1444705_at	App	アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質	-1.50	0.032477	0.80
1426886_at	Cln5	セルロイド-リポフスチン沈着症、ニューロン5	-1.52	0.01702	1.81
1459059_at	2010308F09Rik	RIKENcDNA2010308F09遺伝子	-1.53	0.008352	2.97
1436616_at	R74740	発現した配列R74740	-1.55	0.011378	2.44

1453269_at	Unc5b	Unc-5ホモログ、B(C.エレガنس)	-1.55	0.018436	1.70
1424536_at	Oas1e	2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ1E	-1.55	0.008352	3.08
1444565_at	NA	NA	-1.56	0.005253	3.70
1448049_at	Jmjdc1c	ジュウモンジドメイン含有1C	-1.58	0.02321	1.33
1441546_at	Mpp6	膜タンパク質、パルミトイル化6(MAGUKp55サブファミリー-メンバ-6)	-1.58	0.009875	2.70
1442605_at	Bach2	BTB及びCNCホモログ、y2	-1.59	0.032477	0.80
1451415_at	1810011O10Rik	RIKENcDNA1810011O10遺伝子	-1.66	0.023445	1.29
1436637_at	Eif4h	真核翻訳開始因子4H	-1.66	0.011571	2.40
1453457_at	Sri	ソルシン	-1.67	0.024152	1.25
1429680_at	Tra2a	トランスクォーマ2アルファホモログ、(ドロソフィラ)	-1.68	0.033105	0.75
1429624_at	Sltm	SAFB様、転写モジュレータ	-1.68	0.036906	0.56
1429870_at	Tnik	TRAF2及びNCK相互作用キナーゼ	-1.72	0.001356	5.94
1444065_at	Cyb5d2	シトクロームb5ドメイン含有2	-1.72	0.000237	8.03
1424208_at	Ptger4	プロスタグラジンE受容体4(亜型EP4)	-1.74	0.029592	0.98
1452837_at	Lpin2	リピン2	-1.74	0.011783	2.33
1448185_at	Herpud1	ホモシスティン誘導性、小胞体ストレス誘導性、ユビキチン様ドメイン、メンバ-1	-1.75	0.002895	4.81
1432719_at	4833412K13Rik	RIKENcDNA4833412K13遺伝子	-1.76	0.04708	0.13
1437868_at	BC023892	cDNA配列BC023892	-1.76	0.044113	0.28
1433101_at	9030419F21Rik	RIKENcDNA9030419F21遺伝子	-1.77	0.008596	2.90
1451621_at	58304117C01Rik	RIKENcDNA58304117C01遺伝子	-1.77	0.00495	3.81
1432423_a_at	C530008M17Rik	RIKENcDNA530008M17遺伝子	-1.78	0.01164	2.38
1429399_at	Rnf125	リングフィンガータンパク質125	-1.84	0.033002	0.77
1453264_at	Marvel3	MARVEL(膜関連)ドメイン含有3	-1.86	4.82E-05	10.38
1454343_at	Pgapdc1	ホスファチジル酸ホスファターゼ型2ドメイン含有1	-1.88	0.003658	4.42
1435571_at	A530065I17Rik	RIKENcDNAA530065I17遺伝子	-1.90	0.015795	1.96
1443164_at	NA	NA	-1.91	0.010163	2.63
1437776_at	Tmcc1	膜貫通及びコイルドドメイン、s1	-1.91	0.028192	1.04
1442111_at	D430033H22Rik	RIKENcDNAD430033H22遺伝子	-1.91	0.007072	3.40

1424451_at	Acaa1b	アセチル補酵素Aアクリルトランスクエラーーゼ1B	-1.92	0.035037	0.67
1459879_at	4921513D23Rik	RIKENcDNA4921513D23遺伝子	-1.92	0.008352	2.99
1428776_at	Slc10a6	溶質キャリアーファミリー-10(ナトリウム/胆汁酸コトランスポーター)(アミノ酸)、メンバ-6	-1.92	0.011378	2.45
1458079_at	Usp40	ユビキチン特異的ペプチダーゼ40	-1.93	0.004696	3.98
1442897_at	2610024E20Rik	RIKENcDNA2610024E20遺伝子	-1.95	0.00402	4.15
1455744_at	Tmem181	膜貫通タンパク質181	-1.97	0.037843	0.52
1449385_at	Hsd17b6	ヒドロキシステロイド(17-ベータ)デヒドロゲナーゼ6	-1.98	0.025132	1.18
1443068_at	D130084N16Rik	RIKENcDNA130084N16遺伝子	-1.98	0.04708	0.11
1419582_at	Cyp2c55	シトクロームP450、ファミリー2,サブファミリーC、ポリペチド55	-1.99	0.042267	0.35
1457801_at	9930024M15Rik	RIKENcDNA9930024M15遺伝子	-2.01	0.04708	0.13
1438331_at	Ypel2	Yippee様2(ドロソフィラ)	-2.02	0.037843	0.51
1428833_at	4930406D14Rik	RIKENcDNA4930406D14遺伝子	-2.04	0.015418	2.01
1419388_at	Tm4sf20	膜貫通4Lsixファミリーメンバ-20	-2.05	0.010163	2.65
1455510_at	Spop	Speckle型POZタンパク質	-2.08	0.023445	1.29
1444178_at	ENSMUSG00000052976	予測遺伝子、ENSMUSG00000052976	-2.09	0.029592	0.97
1443159_at	Txnd1	ヒオレドキシンリダクターゼ1	-2.10	0.04708	0.11
1457161_at	9530029O12Rik	RIKENcDNA9530029O12遺伝子	-2.11	0.019032	1.65
1459887_at	NA	NA	-2.11	0.003987	4.29
1459005_at	NA	NA	-2.13	0.007384	3.34
1439283_at	NA	NA	-2.18	0.007823	3.24
1438338_at	Mdh1	Malateデヒドロゲナーゼ1、NAD(可溶性)	-2.21	0.001446	5.54
1458452_at	NA	NA	-2.21	0.010277	2.59
1442256_at	Prikcd	タンパク質キナーゼC、デルタ	-2.21	0.026633	1.11
1443969_at	Irs2	インスリン受容体基質2	-2.22	0.003987	4.22
1452462_a_at	Banp	Btg3関連核タンパク質	-2.30	0.021033	1.52
1454558_at	5430416B10Rik	RIKENcDNA5430416B10遺伝子	-2.32	1.71E-07	15.68
1430393_at	C030048B08Rik	RIKENcDNA030048B08遺伝子	-2.32	0.001388	5.78
1446929_at	Bach2	BTB&びCNCホモログ、y2	-2.32	0.027369	1.07
NuGO_emt067737_at	9130230L23Rik	RIKENcDNA9130230L23遺伝子	-2.34	0.04708	0.15

1441138_at	Foxn2	フォークヘッドボックスN2	-2.36	0.001356	6.01
1416041_at	Sgk	血清/グルコルチコイド調節キナーゼ	-2.40	0.04048	0.41
1454158_at	Mpp7	膜タンパク質、パルミトイル化7(MAGUKp55サブファミリー メンバ-7)	-2.40	0.011571	2.40
1459253_at	Arrdc3	アレスチンドメイン含有3	-2.46	0.044113	0.27
1444376_at	Sesn1	セストリン1	-2.48	0.036167	0.59
1430362_at	5730409N24Rik	RIKENcDNA5730409N24遺伝子	-2.49	0.032477	0.83
1442069_at	D5Wsu178e	DNAセグメント、Chr5、WayneStateUniversity178、発現	-2.50	0.032477	0.80
1433203_at	6030400A10Rik	RIKENcDNA6030400A10遺伝子	-2.56	0.000747	6.76
1456706_at	1700109H08Rik	RIKENcDNA1700109H08遺伝子	-2.60	0.004825	3.89
1441561_at	Fbxl3	F-ボックス及びロイシシリツチリピートタンパク質3	-2.60	0.034193	0.70
1437884_at	Arl5b	ADP-リボシル化因子様5B	-2.65	0.022457	1.40
1445843_at	Chd2	クロモドメイン、ヘリカーゼDNA結合タンパク質2	-2.66	0.044481	0.24
1428306_at	Ddit4	DNA損傷誘導性転写物4	-2.66	0.008352	3.09
1421009_at	Rsdad2	ラジカルS-アデノシルメチオニンドメイン含有2	-2.69	0.04708	0.14
1440227_at	BF642829	発現した配列BF642829	-2.69	0.026633	1.11
1453595_at	Bcl6	B細胞白血病/リンパ腫6	-2.70	0.004825	3.89
1444775_at	9930033D15Rik	RIKENcDNA9930033D15遺伝子	-2.71	0.0033248	4.61
1439972_at	Etnk1	エタノールアミンキナーゼ1	-2.74	0.032477	0.83
1440536_at	Slc22a5	溶質キャリアーファミリー22(有機陽イオン輸送 protein -、メンバ-5	-2.90	0.021033	1.49
1438660_at	Gcnt2	グルコサミニル(N-アセチル)トランスクエラーゼ2、1-分岐酵 素	-2.95	0.018436	1.70
1437759_at	Pfkp	ホスホフルクトキナーゼ、血小板	-2.97	0.008352	3.11
NuGO_emt050020_at	Amica1	接着分子、CXADR抗原1と相互作用	-2.97	0.000981	6.41
1446950_at	Tox	胸腺細胞選別関連HMGボックス遺伝子	-3.00	0.008352	2.98
1447141_at	AW107722	発現した配列AW107722	-3.14	0.013251	2.17
1459219_at	Rapgef2	Rapグアニヌクレオチド交換因子(GEF)2	-3.21	0.000747	6.75
1449496_at	2010109I03Rik	RIKENcDNA2010109I03遺伝子	-3.22	0.000167	8.69
1458296_at	NA	NA	-3.23	0.001388	5.70

1440749_at	NA	NA				
1440892_at	BC017647	cDNA配列BC017647				
1441115_at	Rnf125	リングフィンガータンパク質125				
1421365_at	Fst	ホリスタチン				
1446972_at	D15Wsu126e	DNAセグメント、Chr15、WayneStateUniversity126、発現	-7.09	0.003054	4.72	

10

20

30

40

50

【0548】

【表13】

表S4D R.ホミニス接種動物と無菌動物との間で、28日にて回腸にて示差的に発現した転写物。

ID	記号	名称	M	P値	B
1458427_at	Brip1	BRCA1相互作用タンパク質C-末端ヘリカーゼ1	-1.72	0.002194	4.97

10

【0549】

自然免疫と腸バリア機能に関与した遺伝子は、上行結腸において、R.ホミニスの存在によって有意に誘導された。GO - プロセス「自然免疫応答」(GO:0045087)が上方調節され、重要なTLR関連遺伝子Tlr5、Tlr1及びVnn1が含まれた。腸内定着の間のR.ホミニスにおける相当する鞭毛遺伝子とフラジエリンタンパク質の誘導を考慮すると、Tlr5の上方調節は、特に興味深いものであり、自然及び適応免疫応答を媒介することにおける、この自然シグナリング経路に対する役割を暗示する。R.ホミニスによって、結腸にて影響がある他の自然免疫遺伝子には、抗細菌ペプチドDefb37、P1a2g3、Muc16及びItln、及び腸バリア機能遺伝子Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3及びMagi3が含まれた。R.ホミニスへの応答において、回腸にて上方調節を示している自然免疫遺伝子には、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igsf8及びTcf2aが含まれた。興味深いことに、本明細書で、R.ホミニスによるNF-B経路の負の調節が示され(GO:0043124)(図S2)、これはB.セタイオタオミクロン(*B. thetaiotaomicron*)(Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S. & Conway, S. 2004, "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA", *Nature immunology*, vol. 5, no. 1, pp. 104-112)と同様に、この炎症カスケードを下方調節することによって、免疫ホメオスタシスに寄与しうる。

20

【0550】

30

これらの応答が、R.ホミニスに特異的であることを実証するために、無菌動物の、別の片利共生細菌に対する応答を調査した。大腸菌MG1655(K12)での定着に対する遺伝子発現応答を、定着後10~14日及び22~28日後、R.ホミニスと比較した。この時間間にわたり、遺伝子発現において大きな差違が、R.ホミニスに対する応答で観察されたが、大腸菌に対しては観察されず、これは、大腸菌の最小のインパクトとは反対に、R.ホミニスが、腸内で、生物学的に非常に活性であることを示唆している(図S3)。上行結腸における遺伝子発現データから推定された大腸菌に対する応答は、主に、B細胞媒介抗体応答であるように見える。

【0551】

40

R.ホミニスは、主に結腸中でT細胞経路に影響を与える

14日に影響を受けた主要な経路は、カテゴリー細胞分化、細胞周期調節及び組織リモデリングにグループ化された。重要なことに、免疫応答は、上行結腸において、28日に誘導される主要な経路であった。本カテゴリー内の有意に影響を受けた経路は、IL-10シグナリング及びCTL4によるT細胞機能の調節を含む、T細胞機能にほとんど関与した(図S5)。これらの経路に含まれた遺伝子は、上方調節及び下方調節両方を示し、これらの経路が、R.ホミニスの存在によって有意に影響を受けた一方で、T細胞分化における正確な正味機能効果はさらなる調査が必要であった。T細胞分化に関連したR.ホミニスの役割を明確にするために、R.ホミニスを有する従来のマウスを、14日間処置し、固有層と腸間膜リンパ節(MLN, mesenteric lymph nodes)両方におけるT細胞サブセットにおけるインパクトを決定した。R.ホミニスでの処置が、両方の場所にて

50

、 $CD3^+ CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ T細胞の集団を増加させた(図4)。査定を、単一関連C3H/HeN及びC57BL/6動物の上行及び下行結腸の固有層中の二重陽性 $CD3^+ FoxP3^+$ の数で実施し、R.ホミニス処置マウスにおける制御性T細胞における有意な増加を確認した(図5A)。「アクチン重合」(GO:0030041)に対するGO-プロセス(Arpc3、Capg、Cdc42ep5及びRhoC)が、R.ホミニス定着マウス中、結腸において28日に上方調節された(図S2)。免疫シナプスでのアクチン重合が、T細胞活性化とエフェクター機能を必要とした。総合で、このデータは、R.ホミニスが、T細胞調節に陽性に影響を与えることによって、結腸における適応免疫応答に、活発に効果を与えることを示唆している。

【0552】

10

表S5 28日にて、R.ホミニス処置マウスと無菌マウス間の上行結腸にて示差的に発現した転写物の、免疫系応答経路解析

示差的に発現した遺伝子($P < 0.05$)を、GeneGo MetaCore解析ソフトウェアに入力し、各群での、有意に濃縮された標準的な経路を決定した。^{*}特定の処置比較にて示差的に発現する、各マップ上の遺伝子の数。^{**}各マップ上の遺伝子の総数。

【0553】

【表14】

調節過程/免疫系応答経路	P値	有意性*	総**
免疫応答_IL-10シグナリング経路	0.00125	10	26
免疫応答_IL-9シグナリング経路	0.00592	11	36
免疫応答_HMGB1/RAGEシグナリング経路	0.00832	14	53
免疫応答_BCR経路	0.00992	14	54
発達_GM-CSFシグナリング	0.01258	13	50
発達_PEDFシグナリング	0.02618	12	49
免疫応答_IL-5シグナリング	0.02840	11	44
免疫応答_NF-κBのTCR及びCD28共刺激活性化	0.03611	10	40
免疫応答_CTL4によるT細胞機能の調節	0.04598	9	36
免疫応答_CD40シグナリング	0.04796	14	65
シグナル変換_JNK経路	0.04921	10	42

20

【0554】

30

上行結腸におけるLy6遺伝子ファミリーの誘導が、これらの結果に関連した。とりわけ、Ly6g6cのGPI-アンカー遺伝子産物が、25倍上方調節され、関連遺伝子Ly6g6cは、28日に2倍に上方調節された。好中球及び形質細胞様樹状細胞を含む、ほとんどの造血細胞が、Ly6ファミリーの1又は2以上のメンバーを発現する。さらに、T細胞活性化、分化及び成熟における、Ly6の可能性のある役割が提案してきた(Mallia, M., Campbell, R.D. & Aguado, B. 2006, "Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands", Protein science : a publication of the Protein Society, vol. 15, no. 10, pp. 2244-2256)。免疫細胞化学により、R.ホミニス定着マウスにおける、Ly6G⁺、CD11b⁺及びCD3⁺FoxP3⁺細胞の存在の増加を確認した(図5B)。

【0555】

40

R.ホミニスフラジエリンは、T細胞分化をモジュレートする。

T細胞の分化における細菌の影響は、TLRリガンドのアレイが提示されたことを反映してもよい。例えば、TLR5シグナリングと、CD4⁺T細胞応答間の連結が細菌、鞭毛病原体に対して示されてきた(Letran, S.E., Lee, S.J., Atif, S.M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F. & McSorley, S.J. 2011, "TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired

50

"CD4 T cell responses to a flagellated pathogen", Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 186, no. 9, pp. 5406-5412)。興味深いことに、実験設定に依存して、フラジエリンは、Th1、Th2、Th17及びTreg応答を含む広範なT細胞応答を用意可能である (Wilson, R.H., Maruoka, S., Whitehead, G.S., Foley, J.F., Flake, G.P., Sever, M.L., Zeldin, D.C., Kraft, M., Garantziotis, S., Nakano, H. & Cook, D.N. 2012, "The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens", Nature medicine, vol. 18, no. 11, pp. 1705-1710)。

【0556】

細菌フラジエリンFlaA1 (RH1) 及びFlaA2 (RH2) の機能性を、固有のR.ホミニスフラジエリン配列に対して作製された、新規可溶性組換えフラジエリンタンパク質を使用して調査した。RH1とRH2の能力を、同一のプロトコールを使用して作製した、様々な片利共生病原性フラジエリンと比較し、対比させて、FLTL又はGM-CSFのいずれかで増殖した腸上皮細胞株と骨髄誘導樹状細胞におけるシグナリング応答を活性化した。

【0557】

同一の濃度の異なる細菌フラジエリンで処置した上皮細胞は、遺伝子発現の異なるパターンを明らかにした(図6A)。重要なことに、内毒素共雑は、組換えタンパク質調製物中で検出されなかった。サルモネラ・エンテリティディス(SE)は、大腸菌K12(EC)又はRH1フラジエリンよりも強力であった。RH1フラジエリンはまた、強力な応答を示したが、片利共生ECに沿って、異なるクラッドにてクラスター化された。応答は、ドミナントネガティブTLR5を発現している上皮細胞を使用して、TLR5依存的であることが示された。反対にRH2は、最小の活性であることが示され、一般に非炎症誘発性ではなく、他の組換え細菌フラジエリンによって誘導された保存遺伝子特性(IL-8、CXCL-1、CXCL-2及びCXCL-10)を活性化しなかった。両方の組換えタンパク質が、インビオにおいて発現したけれども、RH1フラジエリンタンパク質は、インビトロにおいて、RH2よりも生物学的に活性であり、RH1はまた、インビオにて、遺伝子発現レベルにおいて有意に上方調節された。これは、R.ホミニスからのRH1フラジエリンが、片利共生大腸菌及び病原性サルモネラ・エンテリティディスに対して、FLTL及びGM-CSF誘導樹状細胞における異なる応答を誘導したことを説明した(図6B~C)。特に、RH1は、C3H/HeN及びC57BL/6マウス両方からの骨髄誘導DCsによる、IL-A/IL-E及びCD40の上方調節と、IL-10の産生を伴った、そのFLTL増殖DCを活性化する能力において固有であった。IL-10/IL-12比は、C57BL/6 DCにて有意に上昇し(図6D)、これは、CD103⁺Siglec-H⁺であるとわかった。本明細書の観察と一致して、いくつかの最近の報告がまた、フラジエリンがCD103⁺DC集団を活性化可能であることを示した(Flores-Langarica, A., Marshall, J.L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Henderson, I.R., Uematsu, S., Akira, S. & Cunningham, A.F. 2012, "Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103⁺ dendritic cells and drives Foxp3⁺ regulatory T CELL and IgA responses in the mesenteric lymph node", Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 189, no. 12, pp. 5745-5754、Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R. & Pamer, E.G. 2012, "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)/CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense", Immunity, vol. 36, no. 2, pp. 276-287)。

【0558】

R.ホミニスとそのフラジエリンの機能的重要性を評価するために、無菌TLR5KOとWTマウスを单一定着した。R.ホミニスが定着したTLR5KOと野生型両方に対して、示差的に発現した遺伝子を示しているヒートマップが、TLR5の非常に強力な効果

10

20

30

40

50

を明らかにした(図S4)。T細胞経路がまだ、TLR5KOマウスにおけるR.ホミニス定着によって影響を受けたけれども、応答は、よりIL4、IL5、IL-6、IL-9経路に関係し、IL-10及びCTLA-4には関連しなかった(図S6)。さらに、TLR5KOマウスの固有層中の二重陽性CD3⁺FoxP3⁺細胞の数は、単一関連C3H/HeN及びC57BL/6動物(図5A)と対称的に、R.ホミニス処置によって増加しなかった(図6E)。

【0559】

表S6 R.ホミニスが單一定着したTLR5KOマウスとWTマウスとの間で、上行結腸において示差的に発現した転写物の、免疫系応答経路解析。示差的に発現した遺伝子($P < 0.05$)を、GeneGo MetaCore解析ソフトウェアに入力し、各群における、有意に濃縮された標準的な経路を決定した。^{*}特定の処置比較にて示差的に発現する、各マップ上の遺伝子の数。^{**}各マップ上の遺伝子の総数。

【0560】

【表15】

#	マップ	p値	比	
1	免疫応答_IL-9シグナリング経路	0.00001	7	36
2	免疫応答_樹状細胞中のヒスタミンシグナリング	0.00008	7	50
3	免疫応答_HMGB1/RAGEシグナリング経路	0.00012	7	53
4	免疫応答_IL-6シグナリング経路	0.00046	5	31
5	免疫応答_免疫応答におけるヒスタミンH1受容体シグナリング	0.00052	6	48
6	免疫応答_マウス細胞における、MAPKを介したオンコスタチンMシグナリング	0.00082	5	35
7	免疫応答_ヒト細胞における、MAPKを介したオンコスタチンMシグナリング	0.00107	5	37
8	シグナル変換_JNK経路	0.00191	5	42
9	免疫応答_Bリンパ球におけるIL-7シグナリング	0.00213	5	43
10	免疫応答_IL-6及びIL-1によって仲介されたシグナリング経路	0.00362	4	30
11	発達_GM-CSFシグナリング	0.00415	5	50
12	免疫応答_T細胞受容体シグナリング経路	0.00492	5	52
13	走化性_白血球走化性	0.00528	6	75
14	免疫応答_CCL2シグナリング	0.00579	5	54
15	免疫応答_CD28シグナリング	0.00579	5	54
16	免疫応答_NK細胞におけるDAP12受容体の役割	0.00579	5	54
17	免疫応答_FcエプソンRI経路	0.00626	5	55
18	免疫応答_ストレス誘導抗ウイルス細胞応答におけるPKRの役割	0.00728	5	57
19	免疫応答_細胞からのHMGB1放出	0.01114	4	41
20	免疫応答_IL-15シグナリング	0.01176	5	64
21	免疫応答_cPLA2のHTR2A誘導活性化	0.01313	4	43
22	免疫応答_IL-4シグナリング経路	0.01421	4	44
23	免疫応答_IL-5シグナリング	0.01421	4	44
24	免疫応答_マクロファージにおいてFcガンマR-仲介貪食	0.01653	4	46
25	免疫応答_NF-ATシグナリングと白血球相互作用	0.01653	4	46
26	開発_PEDFシグナリング	0.02043	4	49
27	免疫応答_IL-2活性化及びシグナリング経路	0.02043	4	49
28	免疫応答_免疫応答におけるNFAT	0.02332	4	51
29	免疫応答_IL-3活性化及びシグナリング経路	0.02803	3	31
30	免疫応答_BCR経路	0.02809	4	54
31	免疫応答_TLRシグナリング経路	0.02809	4	54
32	免疫応答_免疫学的シナプス形成	0.03727	4	59
33	免疫応答_Th17細胞分化	0.03836	3	35
34	免疫応答_ヒトNKG2Dシグナリング	0.04722	3	38

【0561】

40

R. ホミニスが、従来の、そして無菌のマウスにおいてTregsに影響を与えたが、TLR5KOでは与えなかったという本明細書の観察は、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺制御性T細胞を促進しているフラジェリン-TLR5相互作用の報告(Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Allan, S.E., Steiner, T.S. & Levings, M.K. 2005, "Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells", Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 175, no. 12, pp. 8051-8059, Hossain, M.S., Jaye, D.L., Pollack, B.P., Farris, A.B., Tselanyane, M.L., David, E., Roback, J.D., Gewirtz, A.T. & Waller, E.K. 2011, "Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation rec

50

ipients while enhancing antiviral immunity", Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 187, no. 10, pp. 5130-5140) と一致する。同様に、IL-10 依存機構を介した、OVA-T 細胞受容体 CD4 (+) T 細胞による IL-4 産生を抑制する、フラジエリン - オボアルブミン融合タンパク質の能力が最近記述され (Schulke, S., Burgraff, M., Waibler, Z., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Kalinke, U., Vieths, S., Toda, M. & Scheurer, S. 2011, "A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy", The Journal of allergy and clinical immunology, vol. 128, no. 6, pp. 1340-1348.e12)、T 細胞サブセットの方向性のある分化に影響を与えることが可能であることを示唆している。加えて、R. ホミニスによって駆動された、T 細胞応答におけるTLR5KO のインパクトが、RH1 (シグナリングフラジエリン) が、Treg 応答を媒介することにおいて極めて重要であり、RH2 (非シグナリングフラジエリン) はそうではないことを暗示する。最後に、追加の観察が、(Ifi202b、Ifi203 及び Ifi4 を含む) TLR5KO におけるI型 IFN 遺伝子の増強であり、これは、TLR5 シグナリングが、I型インターフェロン応答を削ぐことを示唆している。
10

【0562】

R. ホミニスは、回腸及び結腸両方における自然免疫応答遺伝子をモジュレートし、DSS 処置マウスにおける大腸炎を弱める。

DSS マウスモデルを使用して、炎症経路の制御、並びに単一関連マウスにおけるTreg 誘導における陽性の効果による、R. ホミニスの治療効果を試験した。マウスに、14 日の期間、毎日投与し (約 50 μL、10⁹ CFU)、8 日以降、それらの飲み水中で DSS (MW 50 kDa、30 g / l) を与えた。炎症誘発性バイオマーカーのパネルの遺伝子発現は、未処置 DSS マウスが、4 ~ 49 倍の範囲の遺伝子誘導で、野生型マウスと比較して、全ての調査した遺伝子の強力な上昇を有したことを示した (図 7A)。炎症誘発性遺伝子誘導は、未処置マウスに比べて、R. ホミニス処置にて有意に低かった。組織学的解析は、未処置 DSS の上行結腸における重度の炎症の存在を示し、一方で、R. ホミニス処置動物の大腸粘膜は、低レベル炎症を有して、正常であり、炎症性遺伝子発現の減少と一致する (図 7B 及び C)。
20

【0563】

R. ホミニス定着化は、体組成と満腹遺伝子の発現に影響を与える。
30

単一関連マウスにおける、R. ホミニスの代謝活性がまた明白であった。GO - プロセス「食物に対する応答の負の調節」 (GO: 0032096)、「食欲の負の調節」 (GO: 0032099) 及び「カテコールアミン分泌の調節」 (GO: 0050433) が、R. ホミニスによる定着の後、下行結腸において、全て下方調節された (図 S5)。このデータは、R. ホミニスが、宿主食欲における刺激効果を発揮することを暗示する。これらの工程に関する遺伝子は、Akt、Cartpt、Cck 及び Cxcl12 であり、2 ~ 12 倍の範囲の倍数変化を有した。Cck はとりわけ、飢え抑制剤として、消化及び満腹において主要な役割を果たす。Gcg もまた、この腸部位にて、下方調節を示した。
40

【0564】

これらの遺伝子変化が、食物取込み及び体組成に関して、生理学的関連性を有したかどうかを確立するために、乾燥枝肉重量と組成解析を実施した。R. ホミニス関連マウスの乾燥枝肉重量は、GF 動物と比較して、有意に重く、差は、14 日でもっとも認められた (図 S6A)。さらなる枝肉脂質解析が、総脂肪症がまた、R. ホミニス処置動物にて、14 日に有意に高かったことを示した (図 S6B)。これらの発見は、食物発酵を通したエネルギー収穫におけるフィルミクテス門の役割を明らかにしている最近のデータと一致するが、しかしながら、腸内細菌が、実際に、脳腸軸と、食欲調節ホルモンとをモジュレートできるという見解を支持する。
40

【0565】

宿主 - 微生物共生の長期間の共同進化が、その大部分が、他の生態系において高く提示されていない、腸内における機能的に重要な細菌種の選別を駆動した可能性がある。現在、微生物コミュニティの個々のメンバーの、とりわけ粘膜免疫系の発達に関して、腸機能への寄与に関する情報は限られている。

【 0 5 6 6 】

大腸菌 (H A 1 0 7) に基づく、可逆性定着モデルを使用する最近の研究は、 I g A における免疫誘導効果のために、生細菌が、 1 0 ⁸ C F U / 含有物グラムに近づく数字にて必要とされることを明らかにした (Hapfelmeier, S., Lawson, M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., Geuking, M.B., Curtiss, R., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2010 , "Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 328, no. 5986, pp. 1705-1709) 。 S F B 及びバクテロイデス・フラジリスの特定の機能が、 T 細胞生物学におけるそれらの寄与を定義するために、マウス腸内で調査されてきており、両方のこれらの細菌が、 T r e g s 及び T h 1 7 細胞の強力な誘導剤であると示されてきた (Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", *Cell*, vol. 122, no. 1, pp. 107-118, Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses", *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 677-689, Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 485-498) 。 A S F 中のそれらの存在、及びまた T 細胞分化に影響を与える、 4 6 のクロストリジアル株の混合培養の寄与が留意されてきたけれども (Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2011, "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses", *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 794-806, Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 331, no. 6015, pp. 337-341) 、クラスター-XIVa フィルミクテス門の個々のメンバーの効果は以前には報告されていない。

【 0 5 6 7 】

ここで報告されるのは、フィルミクテス門のメンバーである、嫌気細菌 R . ホミニスでの、無菌マウス腸の最初の成功した単一関連である。ロゼブリア属菌のような細菌の極端な酸素感受性が、厳格な嫌気性培養技術を要求し、機能的特性化を実施することを難しくしている。無菌マウス内の R . ホミニスの安定单一定着が確立されてきており、その代謝、組織、生理学及び共生特性を明らかにするための完全な注釈付きゲノム配列が生成してきた。定着に続く R . ホミニスの転写応答が、宿主腸環境と食餌両方に帰しうることが見出された。宿主駆動効果は、単一関連に統いて、 R . ホミニスの応答を支配する。これらには、遺伝子伝達、各輸送、走化性及び運動性サブシステムが含まれた。モビリゼーション伝達に関与した遺伝子の強力な上方調節が、腸環境が、腸内細菌の膜間の水平遺伝子交換に対して高く伝導性であるという見解を支持する。したがって、この環境は、腸生態系内での細菌生存、定着、及び機能に対して重要な遺伝子の散布を加速しうる。宿主定着における運動性及び鞭毛装置の役割は、病原性細菌に対してよく詳細に述べられているが、しかし、片利共生細菌における鞭毛タンパク質の役割についてはほとんど知られていない

い。インビオ実験によって、フラジエリン遺伝子の発現における、宿主腸環境の刺激効果が明らかになった。

【 0 5 6 8 】

マウス結腸における、腸バリア機能と、天然免疫を促進することにおける R . ホミニスの明確な役割が確立されてきた。密着結合、ギャップ結合及び接着結合が、細菌転座を、上皮下層に制限するように働く (Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., W uebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M ., Barasch, J., Rosenbauer, F., Luft, F.C. & Schmidt-Ott, K.M. 2010, "The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex", *Development* (Cambridge, England), vol. 137, no. 22, pp. 3835-3845)。クローン病と潰瘍性大腸炎両方が、バリア機能と密着結合完全性の欠損によって特徴づけられる。興味深いことに、I B Dにおける腸内微生物叢の腸内毒素症が、フィルミクテス門の減少と関連した (Spor, A., Koren, O. & Ley, R. 2011, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome", *Nature reviews.Microbiology*, vol. 9, no. 4, pp. 279-290、Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Le venez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., D ore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010, "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing", *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 59-65)。R . ホミニスが、バリア遺伝子の発現を活発に促進するという本明細書での観察は、I B D患者におけるそれらの欠損が、機能的に有意でありうることを示唆する。密着結合複合体の活性化が、R . ホミニスの特権というだけでなく、バクテロイデス・セタイオタオミクロン及びラクトバチルス・アシドフィルスのような他の片利共生生物もまた、粘膜バリア機能を増強し (Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G. & Gordon, J.I. 2001, "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine", *Science* (New York, N.Y.), vol. 291, no. 5505, pp. 881-884、Ukena, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F. & Westendorf, A.M. 2007, "Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity", *PLoS one*, vol. 2, no. 12, pp. e1308)、ヒトI B Dにおけるこれらの細菌での、プロバイオティクス機会をほのめかしている。

【 0 5 6 9 】

腸免疫系における R . ホミニスの効果は、好奇心をそそるものである。もっとも強力な効果が、上行性結腸にて留意され、L y 6 g 6 c のような遺伝子が、T 細胞活性化及びエフェクター機能に関する、T 細胞調節及び分化に関する経路、及び免疫シナプスでのアクチン重合と同様に、強く上方調節された。もっとも影響を受けた T 細胞経路には、I L - 1 0 、I C O S 及びC T L A - 4 に関連したものが含まれ、これらは全て、T r e g 分化を支持することに関する。重要なことに、フローサイトメトリー及び免疫細胞化学両方を使用する、R . ホミニスが定着した、無菌動物及び従来のマウスの結腸中のC D 3 + C D 4 + C D 2 5 + F o x P 3 + 細胞における有意な増加が実証してきた。これらの発見は、T r e g 分化を駆動する他のクロストリジウム属種における細菌のデータを補足する。明確に、R . ホミニスは、単一細菌種として、粘膜 T 細胞増殖を促進し、T 細胞分化に影響を与える。

【 0 5 7 0 】

10

20

30

40

50

フラジエリンシグナルは、宿主 TLR5 受容体によって把握され、多くの病原性フラジエリン構造が、強力な炎症促進性応答を誘導する (Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. & Aderem, A. 2001, "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1099-1103)。定住有鞭毛片利共生生物に対する応答における TLR5 を通したシグナリングが、TLR5 の欠損が、マウスにおける突発性大腸炎をもたらすので、ホメオスタシスのために重要である (Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R. & Gewirtz, A.T. 2007, "Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 117, no. 12, pp. 3909-3921)。インビボでの R. ホミニスフラジエリン F1aA1 (RH1) の増強された発現と、上皮細胞と BMDCs を活性化することにおけるその強度が、大きな興味である。他の研究が、大腸菌フラジエリン変異体が、おそらく、TLR5 シグナリングによる天然認識がないことにより、野生型有鞭毛株に対して、定着アドバンテージを有することを示した (De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F. & Cerf-Bensussan, N. 2011, "Trade-off between bile resistance and nutritional competence drives Escherichia coli diversification in the mouse gut", *PLoS genetics*, vol. 7, no. 6, pp. e1002107、Giraud, A., Arous, S., De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J.C., Rakotobe, S., Lindner, A.B., Taddei, F. & Cerf-Bensussan, N. 2008, "Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut", *PLoS genetics*, vol. 4, no. 1, pp. e2)。本明細書で、特定のフィルミクテス門に対して、フラジエリンの発現、又はおそらく上方調節が、腸内定着に対する天然の応答であることを示した。R. ホミニスフラジエリンタンパク質は、インビボにて発現したままであり、維持された定着、顯在的炎症と、調節表現型の T 細胞の増殖がないことと相關する。SF B におけるフラジエリン遺伝子の細菌の最近の確認 (Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T.D., Ohno, H., Umesaki, Y. & Hattori, M. 2011, "Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation", *Cell host & microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 273-284、Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., Gevers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R. & Ivanov, I.I. 2011, "The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment", *Cell host & microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 260-272) が、この細菌によって誘導された宿主 T 細胞応答と相關した (Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses", *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 677-689、Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 485-498)。興味深いことに、全ての試験した構造が、TLR5 に結合し活性化するフラジエリンに関連した保存された Arg90 を有する (Yoon, S.I., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L. & Wilson, I.A. 2012, "Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 335, no. 6070, pp. 859-864) けれども、他のフラジエリンに比べて、RH1 は、上皮及び DC 培養液両方における固有の効果を誘導し、これは他の配列 / 構造差違が RH1 によって媒介された固有のシグナリング応答の主要因でありうることを示唆している。R. ホミニスによ

って誘導された T reg 応答における、フラジエリン - TLR5 シグナリングの有意差を、TLR5KO を使用して確認した。理論に束縛されることを望まずに、特定の片利共生性フラジエリン構造が、CD103+ DC 又は Treg サブセットいずれか上で発現した TLR5 を通して、免疫寛容応答を指向することに寄与しうる (Flores-Langarica, A., Marshall, J.L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Henderson, I.R., Uematsu, S., Akira, S. & Cunningham, A.F. 2012, "Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T CELL and IgA responses in the mesenteric lymph node", Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 189, no. 12, pp. 5745-5754, Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T. M., Flavell, R.A., Littman, D.R. & Pamer, E.G. 2012, "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense", Immunity, vol. 36, no. 2, pp. 276-287, Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Alilan, S.E., Steiner, T.S. & Leving s, M.K. 2005, "Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cell s", Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 175, no. 12, pp. 8051-8059)。さらに、ブチル酸塩のような他のシグナリング部位がまた、免疫寛容に寄与しうるが、R. ホミニスの免疫ホメオスタシス効果が、DSS 処置マウスにて確認された。このデータは、IBD における R. ホミニスの可能性ある治療利益を提案する。

【0571】

R. ホミニス定着の興味深いさらなる生物学的効果は、食物に対する応答と、食欲の制御に影響を与えていた遺伝子の調節であった。特に、満腹ホルモン Cck 及び Gcg が有意に減少した。食物取込における Cck の効果が、迷走神経求心性を介して媒介される。これは、それによって接種した栄養に関する情報が、腸機能と摂取拳動両方に影響を与えるために、中枢神経系に到達する、主要な神経経路である。Cck は、食欲と摂取を刺激する分子の発現を減少させるため、及び摂取を阻害し、食欲を減らす分子の発現を増加させるために、迷走神経系上で働く (Npy2r 及び Cartpt、両方が、本研究にて、2 倍下方調節された)。Cck、Gcg と片利共生生物細菌間のリンクはここまで報告されてきていないが、脂肪酸とタンパク質の両方が、Cck と Gcg の強力な誘導剤である (Geraedts, M.C., Troost, F.J., Tinnemans, R., Soderholm, J.D., Brummer, R.J. & Saris, W.H. 2010, "Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa", Annals of Nutrition & Metabolism, vol. 56, no. 4, pp. 308-313)。R. ホミニスは、6 炭素未満の脂肪族テールを有するブチル酸塩のような、短鎖脂肪酸を産生し、この代謝活性は、より長い鎖脂肪酸にて観察された血漿 Cck における刺激効果を減少するように働いた (McLaughlin, J., Grazia Luca, M., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.J. & Thompson, D.G. 1999, "Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility", Gastroenterology, vol. 116, no. 1, pp. 46-53)。枝肉重量解析によって、体重と脂質含量の両方が、R. ホミニスで、実際に有意に増加し、無菌マウスの伝統化にて観察された重量増加と一致する (Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. 2008, "Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome", Cell host & microbe, vol. 3, no. 4, pp. 213-223)。Cck と Gcg の関与は以前に報告されてきていないので、これが、本研究にて見られるような満腹ホルモンにおける減少の直接効果であるかどうかは、観察すべきままである。しかしながら、部分的に SCFA の放出を通して、微生物叢定着と、食餌からのエネルギー収穫間のリンクが先に示されて来た (Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J. I. 2006, "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest", Nature, vol. 444, no. 7122, pp. 1027-1031, Tremaroli, V., Kovatcheva 50

-Datchary, P. & Backhed, F. 2010, "A role for the gut microbiota in energy harvesting?", Gut, vol. 59, no. 12, pp. 1589-1590、Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F. 2010, "A role for the gut microbiota in energy harvesting?", Gut, vol. 59, no. 12, pp. 1589-1590) という理解は重要である。R. ホミニスが主要なブチル酸塩生産物であることを考慮すると、この機構はまた、R. ホミニス処置の後に観察された代謝効率に寄与する可能性がある。

【0572】

まとめると、マウス腸の、R. ホミニスによる単一関連は、片利共生細菌適合と宿主寛容において頂点に達している、強力な二方向性遺伝子発現事象を誘導した。フラジエリン産物 R H 1 は、好ましく T reg s の増殖を駆動する、固有のシグナリング効果を発揮するように見える。T reg 分化と増殖を指向することにおける T L R 5 の重要性が実証されてきた。合わせると、本データは、片利共生性フラジエリンのさらなる機能性、T L R 5 シグナリング及び粘膜 T 細胞応答の正味方向を強調する。

10

【0573】

機能アッセイ

インビトロモデル

異なる組換えフラジエリンに対する、腸上皮細胞 (I E C , intestinal epithelial cell) の応答の解析

異なる組換えフラジエリン (図 D . 2) 病原性フラジエリン (S E 、 S T 、 L F 及び H M) 誘導に対する I E C の刺激後の、 C C L 2 0 遺伝子発現 (炎症誘発性遺伝子) の分子解析は、 C C L 2 0 mRNA の同様だが同一ではないレベルを誘導し、片利共生性フラジエリンが、非常に可変の誘導レベルを表示した。E R (エウバクテリウム・レクタル 3 3 6 5 6) 、 K 1 2 (大腸菌 K 1 2) 、 R H 1 及び R I 3 フラジエリンは、病原体フラジエリンと同様のレベルにて、 C C L 2 0 を誘導し、 R I 1 と R I 4 は、中間の刺激活性を有し、 R H 2 は、 H T - 2 9 にて C C L 2 0 の低誘導剤として明らかになり、 C a c o - 2 細胞にてアゴニスト潜在力を欠き、 R I 2 は、両方の細胞株にて観察可能な活性を有しなかった。結論として、本発明者らは、 T L R 5 アゴニストの 3 つのカテゴリーを区別した。 (i) 免疫刺激活性がないか、少ないもの、 (ii) 中間の免疫刺激活性を有するもの、及び (iii) 高い免疫刺激活性を有するもの。

20

【0574】

【表 16】

表 D2

	Unstim	ST	SE	K12	ER	R11	R12	R13	R14	RH1	RH2
Unstim	*	*	*	*	*	*	NS	**	*	*	*
Caco-2	ST	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	*	NS	*
	SE	**	NS	*	NS	*	**	NS	*	NS	**
	K12	**	NS	NS	NS	NS	*	NS	*	NS	*
	ER	**	NS	NS	NS	*	NS	**	NS	NS	***
	R11	***	NS	*	**	*	NS	**	NS	*	NS
	R12	NS	NS	**	**	**	NS	**	*	*	*
	R13	**	NS	*	**	**	NS	**	NS	NS	**
	R14	*	NS	**	**	**	*	NS	**	NS	*
	RH1	*	NS	NS	NS	**	NS	*	NS	*	*
	RH2	NS	NS	**	**	**	NS	**	NS	*	*

HT-29

40

【0575】

表 D 2 は、 H T - 2 9 (上右) 及び C a c o - 2 (下左) における対となる t 検定で計算した、各処置間の有意差を示唆している。使用した T 検定は、処置を未刺激細胞 (u n s t i m) と比較するために片側であり、 1 つの処置を他と比較するために両側であった

50

。NS(有意差なし) ; * (p < 0.05) ; ** (p < 0.01) ; *** (p < 0.001)。

【0576】

I ECにおける組換えフラジエリンの効果の細胞及び免疫学的解析を、分泌されたサイトカイン、CXCL8、CXCL10及びCCL2(MCP-1)の測定によって決定した。IECSを、組換えフラジエリンで24時間刺激した(図D3)。

【0577】

フラジエリンST、SE、K12、ER、RI3及びRH1が、可変の、しかし同様のレベルの、IL-8、IP-10及びMCP-1ケモカインの分泌を誘導し、一方で、とりわけCaco-2において、RI1、RI2、RI4及びRH2が、TLR5の低アゴニストとして挙動し、これは、有意に低い量の分泌したケモカインを誘導する。

【0578】

【表17】

表 D3a

Unstim	ST	SE	K12	ER	RI1	RI2	RI3	RI4	RH1	RH2
Unstim	*	*	*	*	NS	*	*	*	*	*
ST	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SE	*	NS	NS	NS	NS	**	*	NS	*	*
K12	NS	NS	NS	*	NS	**	*	NS	**	*
ER	NS	NS	NS	*	NS	**	NS	*	NS	*
RI1	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI2	NS	NS	**	NS	*	NS	*	NS	*	NS
RI3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RI4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RH1	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RH2	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

表 D3b

Unstim	ST	SE	K12	ER	RI1	RI2	RI3	RI4	RH1	RH2
Unstim	***	***	*	**	NS	NS	**	**	NS	NS
ST	*	*	#	NS	*	**	**	**	NS	NS
SE	*	NS	NS	NS	NS	**	**	**	NS	NS
K12	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	*	NS
ER	*	NS	NS	NS	NS	**	**	**	*	NS
RI1	NS	*	*	*	*	NS	*	NS	**	NS
RI2	NS	*	*	*	*	NS	*	NS	NS	NS
RI3	*	NS	NS	NS	NS	*	*	*	NS	*
RI4	*	NS	*	*	*	*	*	*	NS	NS
RH1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RH2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

T
表 D3c

Unstim	ST	SE	K12	ER	RI1	RI2	RI3	RI4	RH1	RH2
Unstim	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ST	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SE	*	NS	*	*	*	*	*	*	*	*
K12	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI1	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI2	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI3	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI4	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RH1	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RH2	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

表 D3d

Unstim	ST	SE	K12	ER	RI1	RI2	RI3	RI4	RH1	RH2
Unstim	*	*	*	**	NS	NS	NS	NS	*	NS
ST	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SE	*	NS	NS	*	*	NS	*	NS	*	*
K12	*	NS	NS	**	**	**	*	NS	**	NS
ER	*	NS	NS	*	*	NS	*	*	*	*
RI1	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RI2	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RI3	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RI4	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RH1	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*
RH2	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	*

【0579】

表D3a、D3b、D3c及びD3dは、対となるt検定で計算した、各処置間の有意差を示唆している。表D3aとD3bの上右側が、IL-8に対するt値を与え、下左側が、IP-10に対して与え、図D3c及びD3dが、MCP-1に対するt値を与えた。NS(有意ではない)； * (p < 0.05)； ** (p < 0.01)； *** (p < 0.001)。

【0580】

図D4で示したように、抗TLR5特異的抗体でのTLR5の中和は、フラジエリンの片利共生性又は病原性起源から独立して、フラジエリン媒介炎症応答を無効にした。したがって、Caco-2細胞にて観察された、フラジエリンの炎症誘発性効果は、TLR5活性化に依存する。

【0581】

骨髓誘導樹状細胞及び培養の発生

骨髓を、C3H/HeN及びC57BL/6マウスの大脳骨及び脛骨から回収した。GM-CSF誘導樹状細胞のために、骨髓細胞を、10% FCS及び20ng/ml r-mGM-CSFを補充したRPMI中、 1×10^6 /mlにて再懸濁させ、100mm²組織培養プレート中、10mL/プレートにて播いた。3日培養後、緩く接着性の細胞を集め、

10

30

40

50

G M - C S F 補充培地で、12ウェル組織培養プレート中、 1×10^6 / mLで再プレーティングした。5日目に細胞を100ng / mLフラジエリンで刺激して、6日目に回収した。F 1 t 3 L誘導樹状細胞のために、骨髄細胞を、10% F C S 及び200ng / mL r m F 1 t 3 を補充したR P M I 中、 2×10^6 / mLで再懸濁し、2mL / ウェルにて、12ウェル組織培養プレート中に播いた。細胞を10日間、4日目に各ウェルに加えた、F 1 t 3 補充培地で培養した。9日目に、細胞を100ng / mLフラジエリンで刺激し、10日目に回収して、フローサイトメトリーによって解析した。

【0582】

組換えフラジエリンで刺激したG M - C S F / I L - 4 誘導樹状細胞（図D 5）及びF 1 t 3 L誘導樹状細胞（図D 6）のフローサイトメトリー解析を実施した。フラジエリン R h 1 は、片利共生性フラジエリンK 1 2 及びE r と、病原性フラジエリンS E 及びS T に対して同様の応答を持つ、R i 4 及びR i 3 を有するG M - C S F / I L - 4 誘導樹状細胞における細胞応答を有することにおいて、最も強力であった。R h 2 と反対に、R i 2 は、G M - C S F / I L - 4 誘導樹状細胞との細胞応答を誘導せず、しかし、F 1 t 3 L誘導樹状細胞に対する細胞応答を有意に増加した。これらのフラジエリン、とりわけR i 1 は、F 1 t 3 L誘導樹状細胞の活性化に応答して、差を導き出すそれらの能力において典型的である。この応答は、樹状細胞の特異的サブセットに対するフラジエリンの特異性を示す。これらのF 1 t 3 L誘導樹状細胞は、免疫学的寛容において重要な役割を果たす、形質細胞様樹状細胞としてカテゴリー化される。

【0583】

インビボモデル

B O Y / J WT 及びT L R 5 K O マウスを使用して、R . ホミニス及びそのフラジエリンの機能的重要性を評価した。マウスにR . ホミニスを定着させた。動物を安楽死させ、腸組織サンプリングを実施した。小腸を、フローサイトメトリーによる免疫学的解析のために回収した。

【0584】

小腸固有層中のT細胞集団、とりわけ制御性T（T r e g ）細胞のフローサイトメトリー解析を実施した（図6 A 及びB）。C D 4 + T細胞集団中のF o x P 3 + C D 2 5 + 細胞の百分率は、T L R 5 K O マウスと比較して、B O Y / J WT マウスにて有意に高かった。これは、R . ホミニス、よりとりわけフラジエリンが、C D 4 + F o x P 3 + C D 2 5 + 制御性T細胞を促進することによって、T r e g s に影響を与えることを示唆する。したがって、フラジエリンが、T L R 5 相互作用を通して、宿主免疫応答を指向することにおいて、重要であることを結論づけることが可能である。

【0585】

要約条項

本発明は、特許請求の範囲及び付随する明細書中で定義される。便宜上、本発明の他の態様を、番号付けした条項の方法によって、本明細書で提示する。

【0586】

1. 対象の免疫系を調節するのに使用するための、（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの）口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF 1 a A 1 、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0587】

2. 対象の適応免疫系を調節するのに使用するための、条項1に記載の、（細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの）口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF 1 a A 1 、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを

10

20

30

40

50

含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0588】

3. 対象の自然免疫系を調節するのに使用するための、条項1に記載の、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0589】

4. 対象における免疫ホメオスタシスを維持するのに使用するための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

10

【0590】

5. 対象における免疫障害を処置するのに使用するための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

20

【0591】

6. 免疫障害が、潰瘍性大腸炎、回腸囊炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症を含む他の自己免疫状態、セリック病、アトピー性皮膚炎及び鼻炎を含むアレルギーから選択される、条項5に記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

30

【0592】

7. 対象における炎症性障害、免疫障害及び腸障害から選択される障害を処置するのに使用するための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又は口ゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

40

【0593】

8. 障害が、過敏性腸症候群(IBS)、大腸炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸障害(IBD)、回腸囊炎、機能性消化不良、(抗生素質関連下痢、旅行者下痢及び小児下痢を含む)機能性下痢、機能性腹痛、機能性腫脹、上腹部痛症候群、食後苦痛症候群、胃食道逆流症(GERD)、糖尿病、関節炎、多発性硬化症及び乾癬アレルギーのような自己免疫性障害、アトピー疾患、例えば、アトピー性皮膚炎、壞死性腸炎、他の感染及びこれらの組合せから選択される、条項7に記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオ

50

チド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0594】

9. 対象における腸内微生物叢を改善するのに使用するための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

10

【0595】

10. 対象における食欲を調節するのに使用するための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0596】

11. 対象における腸の健康を促進するのに使用するための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

20

【0597】

12. 対象の免疫系におけるTregs細胞及び寛容機構を促進するのに使用するための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

30

【0598】

13. 少なくとも1つのモビリゼーション又は走化性遺伝子の誘導及び／又は発現を調節する、条項1～12のいずれかに記載の使用のための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

40

【0599】

14. 少なくとも1つのモビリゼーション又は走化性遺伝子の発現を上方調節し、前記遺伝子が、M_{ob}A及びM_{ob}Lから選択される、条項13に記載の使用のための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジエリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

50

【0600】

15. F1aA1、F1a2、F1aA3及びF1aBから選択される少なくとも1つの遺伝子を調節する、条項1～14のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0601】

16. 以下の、アセチル-C₀Aアセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C₀Aデヒドロゲナーゼ、ブチリル-C₀Aデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラボタンパク質ベータサブユニット、電子伝達フラボタンパク質アルファサブユニットの少なくとも1つの発現を調節する、条項1～15のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。10

【0602】

17. Agt、Cartpt、Cck、Cxcl12及びGcgから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を下方調節する、条項1～16のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。20

【0603】

18. 結腸又は回腸における、少なくとも1つの免疫応答遺伝子を活性化する、条項1～17のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。30

【0604】

19. T細胞調節に関する遺伝子の誘導及び/又は発現を調節することによって、適応免疫応答を活性化する、条項1～18のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。40

【0605】

20. 上行結腸におけるLy6g6c及びLy6g6eから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を上方調節する、条項1～19のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスチナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。50

【0606】

21. T1r5、T1r1、Vnn1, Defb37、Pla2g、Muc16、Itln、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3、Magi3、Marveld3、Mpp7、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igsf8及びTcfe2aから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を調節する、条項1～20のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

10

【0607】

22. 対象の免疫系を調節するための医薬の調製における、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞の使用。

20

【0608】

23. 対象の自然免疫系を調節するための医薬の調製における、条項22に記載の(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞の使用。

30

【0609】

24. 対象の適応免疫系を調節するための医薬の調製における、条項22に記載の(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞の使用。

【0610】

25. 対象における免疫ホメオスタシスを維持するための医薬の調製における、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞の使用。

40

【0611】

26. 対象の免疫障害を処置するための医薬の調製における、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)口ゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は口ゼブリア属フラジエリン、及び/又は前記口ゼブリア属フラジエリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞の使用。

【0612】

50

27. 対象の免疫系を調節する方法であって、前記方法は、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を含む組成物を対象に投与することを含む方法。

【0613】

28. 対象の自然免疫系を活性化する方法であって、前記方法は、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を含む組成物を対象に投与することを含む方法。

10

【0614】

29. 対象の適応免疫系を活性化する方法であって、前記方法は、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を含む組成物を対象に投与することを含む方法。

20

【0615】

30. 対象における免疫障害を処置する方法であって、前記方法は、薬学的に有効な量の(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を対象に投与することを含む方法。

30

【0616】

31. 対象が哺乳動物である、条項1~21のいずれかに記載の使用、又は条項27~30のいずれかに記載の方法、又は条項22~26のいずれかに記載の使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

40

【0617】

32. 医薬における使用のための、(細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び/又はベクター、及び/又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【0618】

33. (細菌種口ゼブリア・ホミニス、又は細菌種口ゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドF1aA1、及び/又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び/又はロゼブリア属フラジェリン、及び/又は前記

50

記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物。

【0619】

34. (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞と、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む栄養補助剤。 10

【0620】

35. (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を含むプロバイオティクス組成物。 20

【0621】

36. (細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含むベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を含む、飼料、食品、栄養補助食品、栄養補助剤、又は食品添加物。 20

【0622】

37. 条項32に記載の医薬組成物を製造するためのプロセスであって、前記プロセスは、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含むプロセス。 30

【0623】

38. 条項33に記載の栄養補助剤を製造するためのプロセスであって、前記プロセスは、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスキナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び／又はポリペプチドF1aA1、及び／又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、及び／又はロゼブリア属フラジェリン、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリンをコードするポリヌクレオチド、及び／又はベクター、及び／又は前記ベクターを含む宿主細胞、及び／又は前記ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含むプロセス。 40

【0624】

要約段落

便宜上、本発明の他の態様を、番号付けした段落の方法によって、本明細書で提示する。

【0625】

1. 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートするのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。 50

【0626】

2. 組織又は器官の炎症を減少させる、段落1に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0627】

3. 組織又は器官の上皮細胞による炎症を減少させる、段落2に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0628】

4. 前記上皮細胞が、消化管の上皮細胞である、段落3に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0629】

5. 対象におけるT細胞の産生をモジュレートするのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であって、好ましくはポリペプチド又はポリヌクレオチドは、対象における制御性T細胞の産生を増加させる。

【0630】

6. 免疫寛容を修復するのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0631】

7. 対象の免疫系を調節し、免疫寛容を修復するのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0632】

8. 対象の適応免疫系を調節するのに使用するための、段落7に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0633】

9. 対象の自然免疫系を調節するのに使用するための、段落7に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0634】

10. 対象における障害を処置するのに使用するための、前記障害が炎症性障害及び/又は自己免疫性障害である、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0635】

11. 前記障害が、前記対象の消化管又はその切片に影響を与える、段落10に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0636】

12. 前記障害が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、1型糖尿病、セリック病、アトピー性皮膚炎、鼻炎、過敏性腸症候群(IBS)、大腸炎、炎症性腸障害(IBD)、潰瘍性大腸炎、囊炎、クローン病、機能性消化不良、アトピー性疾患、壞死性腸炎、及びそれらの組合せからなる群から選択される、段落10に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0637】

13. 対象の組織又は器官における樹状細胞及び/又は上皮細胞をモジュレートするのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0638】

14. 樹状細胞及び/又は上皮細胞を活性化する、段落13に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0639】

15. 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/又はTGF- β の産生を調節するのに使用するための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0640】

10

20

30

40

50

16. I L - 10 の產生が、樹状細胞によってである、段落 15 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0641】

17. I L - 10 及び / 又は T G F の產生を上方調節する、段落 15 又は 16 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0642】

18. 対象の 1 又は 2 以上の細胞における C D 4 0 及び / 又は I - A / I - E の產生を調節するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0643】

19. C D 4 0 及び / 又は I - A / I - E の產生が樹状細胞による、段落 18 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0644】

20. C D 4 0 及び / 又は I - A / I - E の產生を上方調節する、段落 18 又は 19 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0645】

21. 対象の 1 又は 2 以上の細胞における 1 又は 2 以上の I 型 I F N 遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0646】

22. 対象の 1 又は 2 以上の細胞における 1 又は 2 以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0647】

23. 対象における腸内微生物叢を改善するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0648】

24. 対象における食欲を調節するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0649】

25. 対象の食欲を刺激する、段落 24 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0650】

26. 対象の血液におけるコレシストキニン (C c k) 及び / 又はグルカゴン (G c g) のレベルが減少する、段落 24 又は 25 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0651】

27. 対象の 1 又は 2 以上の細胞におけるコレシストキニン (C c k) をコードする遺伝子の発現及び / 又はグルカゴン (G c g) をコードする遺伝子の発現を調節するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0652】

28. 対象における消化管の健康状態を改善するのに使用するための、ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0653】

29. カプセル化されている、段落 1 ~ 28 のいずれかに記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

【0654】

30. ポリペプチド F 1 a A 1 又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む医薬組成物。

【0655】

31. 前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドがカプセル化されている、段落 30 に記載

10

20

30

40

50

の医薬組成物。

【0656】

32. ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤とを含む栄養補助剤。

【0657】

33. 前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドがカプセル化されている、段落32に記載の栄養補助剤。

【0658】

34. ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

10

【0659】

35. カプセル化されている、段落34に記載の飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

【0660】

36. 段落30に記載の医薬組成物を製造する方法であって、前記方法が、前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドを、薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含み、任意選択で前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドがカプセル化されている、方法。

【0661】

37. 段落32に記載の栄養補助剤を製造する方法であって、前記方法が、前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドを、栄養学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と混合することを含み、任意選択で前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドがカプセル化されている、方法。

20

【0662】

38. 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートする方法であって、前記方法が、対象にポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における組織又は器官の炎症がモジュレートされる、方法。

【0663】

39. 対象におけるT細胞の産生をモジュレートする方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象におけるT細胞、特に制御性T細胞の産生がモジュレートされる、方法。

30

【0664】

40. 対象の免疫系を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の免疫系が調節される、方法。

【0665】

41. 対象における障害を治療する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、前記障害が炎症性障害及び／又は自己免疫性障害である、方法。

40

【0666】

42. 対象における樹状細胞及び／又は上皮細胞をモジュレートする方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における樹状細胞及び／又は上皮細胞がモジュレートされる、方法。

【0667】

43. 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF- β の産生を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF- β の産生が調節される、方法。

【0668】

50

44. 対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-Eの産生を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞におけるCD40、I-A/I-Eの産生が調節される、方法。

【0669】

45. 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現が調節される、方法。

【0670】

10

46. 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現が調節される、方法。

【0671】

47. 対象における腸内微生物叢を改善する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における腸内微生物叢が改善される、方法。

【0672】

20

48. 対象における食欲を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における食欲が調節される、方法。

【0673】

49. 対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び/又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を調節する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び/又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現が調節される、方法。

【0674】

30

50. 対象における消化管の健康状態を改善する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における消化管の健康状態が改善される、方法。

【0675】

51. 対象における組織又は器官の炎症をモジュレートするための医薬の製造のための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0676】

52. 対象におけるT細胞の産生をモジュレートするための医薬の製造のための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

40

【0677】

53. 対象の免疫系を調節するための医薬の製造のための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0678】

54. 対象における障害の治療のための医薬の製造のための、前記障害が炎症性障害及び/又は自己免疫性障害である、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0679】

55. 対象の組織又は器官における樹状細胞及び/又は上皮細胞をモジュレートするための医薬の製造のための、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリ

50

スクレオチド配列の使用。

【0680】

56. 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び/又はTGFの産生を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0681】

57. 対象の1又は2以上の細胞におけるCD40及び/又はI-A/I-Eの産生を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0682】

58. 対象の1又は2以上の細胞における対象の1又は2以上のI型IFN遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0683】

59. 対象の1又は2以上の細胞における1又は2以上の炎症誘発性遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0684】

60. 対象における腸内微生物叢を改善するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0685】

61. 対象における食欲を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0686】

62. 対象の1又は2以上の細胞におけるコレシストキニン(Cck)をコードする遺伝子の発現及び/又はグルカゴン(Gcg)をコードする遺伝子の発現を調節するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0687】

63. 対象における消化管の健康状態を改善するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0688】

64. 対象における免疫寛容を修復するための医薬の製造のため、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の使用。

【0689】

65. 対象における免疫寛容を修復する方法であって、前記方法が、ポリペプチドF1aA1又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を投与することを含み、対象における免疫寛容が修復される、方法。

【0690】

(参考文献)

Aminov, R.I., Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Welling, G.W. & Flint, H.J. 2006, "Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent *in situ* hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to Roseburia spp. or Eubacterium rectale", Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no. 9, pp. 6371-6376.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species", Science (New York, N.Y.), vol. 331, no. 6015, pp. 337-341.

10

20

30

40

50

- Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W. & Rennick, D. 1996, "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses", *The Journal of clinical investigation*, vol. 98, no. 4, pp. 1010-1020.
- Chung, H. & Kasper, D.L. 2010, "Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis", *Current opinion in immunology*, vol. 22, no. 4, pp. 455-460.
- Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Allan, S.E., Steiner, T.S. & Levings, M.K. 2005, "Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 175, no. 12, pp. 8051-8059.
- De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F. & Cerf-Bensussan, N. 2011, "Trade-off between bile resistance and nutritional competence drives *Escherichia coli* diversification in the mouse gut", *PLoS genetics*, vol. 7, no. 6, pp. e1002107.
- Duck, L.W., Walter, M.R., Novak, J., Kelly, D., Tomasi, M., Cong, Y. & Elson, C.O. 2007, "Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 13, no. 10, pp. 1191-1201.
- Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. Pt 10, pp. 2437-2441.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. 2005, "Diversity of the human intestinal microbial flora", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 308, no. 5728, pp. 1635-1638.
- Flores-Langarica, A., Marshall, J.L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Henderson, I.R., Uematsu, S., Akira, S. & Cunningham, A.F. 2012, "Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T CELL and IgA responses in the mesenteric lymph node", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 189, no. 12, pp. 5745-5754.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. 2007, "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 34, pp. 13780-13785.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses", *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 677-689.
- Geraedts, M.C., Troost, F.J., Tinnemans, R., Soderholm, J.D., Brummer, R.J. & Saris, W.H. 2010, "Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa", *Annals of Nutrition & Metabolism*, vol. 56, no. 4, pp. 308-313.
- Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2011, "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses", *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 794-806.

- Giraud, A., Arous, S., De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J.C., Rakoto be, S., Lindner, A.B., Taddei, F. & Cerf-Bensussan, N. 2008, "Dissecting the genetic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut", *PLoS genetics*, vol. 4, no. 1, pp. e2.
- Hapfelmeier, S., Lawson, M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., Geuking, M.B., Curtiss, R., 3rd, McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2010, "Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 328, no. 5986, pp. 1705-1709. 10
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. & Aderem, A. 2001, "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1099-1103.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G. & Gordon, J.I. 2001, "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 291, no. 5505, pp. 881-884.
- Hossain, M.S., Jaye, D.L., Pollack, B.P., Farris, A.B., Tselanyane, M.L., David, E., Roback, J.D., Gewirtz, A.T. & Waller, E.K. 2011, "Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 187, no. 10, pp. 5130-5140. 20
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umetsaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 485-498.
- Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., Dore, J., Leclerc, M. & McSweeney, C.S. 2010, "Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 16, no. 12, pp. 2034-2042. 30
- Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S. & Conway, S. 2004, "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA", *Nature immunology*, vol. 5, no. 1, pp. 104-112.
- Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R. & Pamer, E.G. 2012, "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense", *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 276-287. 40
- Letran, S.E., Lee, S.J., Atif, S.M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F. & McSorley, S.J. 2011, "TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 186, no. 9, pp. 5406-5412.
- Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijs I., Ballet V., Claes K., Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeire S. 2013, "Predominant dysbiosis in patients with ulcerative colitis is different from Crohn's disease patients", *Inflammatory Bowel Diseases. 8th Congress of ECCO, Feb 14-16, 2013*.
- Macpherson, A.J. 2006, "IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in 50

the intestine", Current topics in microbiology and immunology, vol. 308, pp. 117-136.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. 2001, "IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms", Microbes and infection / Institut Pasteur, vol. 3, no. 12, pp. 1021-1035.

Macpherson, A.J., Martinic, M.M. & Harris, N. 2002, "The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine", Cellular and molecular life sciences : CMLS, vol. 59, no. 12, pp. 2088-2096.

Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H., Turnbaugh, P.J., Fulton, R.S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K., Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Crock, L.W., Russell, A., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L. & Gordon, J.I. 2009, "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, no. 14, pp. 5859-5864. 10

Mallya, M., Campbell, R.D. & Aguado, B. 2006, "Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands", Protein science : a publication of the Protein Society, vol. 15, no. 10, pp. 2244-2256.

Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", Cell, vol. 122, no. 1, pp. 107-118. 20

McLaughlin, J., Grazia Luca, M., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.J. & Thompson, D.G. 1999, "Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility", Gastroenterology, vol. 116, no. 1, pp. 46-53.

Monteleone, I., Platt, A.M., Jaansson, E., Agace, W.W. & Mowat, A.M. 2008, "IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function", European journal of immunology, vol. 38, no. 6, pp. 1533-1547.

Nutsch, K.M. & Hsieh, C.S. 2012, "T cell tolerance and immunity to commensal bacteria", Current opinion in immunology, vol. 24, no. 4, pp. 385-391. 30

Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T.D., Ohno, H., Umesaki, Y. & Hattori, M. 2011, "Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation", Cell host & microbe, vol. 10, no. 3, pp. 273-284.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010, "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing", Nature, vol. 464, no. 7285, pp. 59-65. 40

Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. & Mazmanian, S.K. 2011, "The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota", Science (New York, N.Y.), vol. 332, no. 6032, pp. 974-977. 50

- Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J.R. 2006, "Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease", *Journal of clinical microbiology*, vol. 44, no. 11, pp. 3980-3988.
- Schulke, S., Burggraf, M., Waibler, Z., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Kalinke, U., Vieths, S., Toda, M. & Scheurer, S. 2011, "A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy", *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 128, no. 6, pp. 1340-1348.e12.
- Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., Gevers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R. & Ivanov, I.I. 2011, "The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment", *Cell host & microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 260-272. 10
- Spor, A., Koren, O. & Ley, R. 2011, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome", *Nature reviews.Microbiology*, vol. 9, no. 4, pp. 279-290.
- Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F. 2010, "A role for the gut microbiota in energy harvesting?", *Gut*, vol. 59, no. 12, pp. 1589-1590.
- Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. 2008, "Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome", *Cell host & microbe*, vol. 3, no. 4, pp. 213-223. 20
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. 2006, "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest", *Nature*, vol. 444, no. 7122, pp. 1027-1031.
- Ukema, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzler, F. & Westendorf, A.M. 2007, "Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity", *PLoS one*, vol. 2, no. 12, pp. e1308.
- Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R. & Gewirtz, A.T. 2007, "Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 117, no. 12, pp. 3909-3921. 30
- Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M., Barasch, J., Rosenbauer, F., Luft, F.C. & Schmidt-Ott, K.M. 2010, "The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex", *Development (Cambridge, England)*, vol. 137, no. 22, pp. 3835-3845.
- Wilson, R.H., Maruoka, S., Whitehead, G.S., Foley, J.F., Flake, G.P., Sever, M.L., Zeldin, D.C., Kraft, M., Garantziotis, S., Nakano, H. & Cook, D.N. 2012, "The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens", *Nature medicine*, vol. 18, no. 11, pp. 1705-1710. 40
- Yoon, S.I., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L. & Wilson, I.A. 2012, "Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 335, no. 6070, pp. 859-864.
- (補足情報の参考文献リスト)
- (1) Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB); 1999.
 - (2) Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Diss T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008 Feb 8;9 50

:75-2164-9-75.

(3) Dennis G,Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4(5):P3.

(4) Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer 3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 2007 Jul;35(Web Server issue):W71-4.

(5) Duck LW, Walter MR, Novak J, Kelly D, Tomasi M, Cong Y, et al. Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Oct;13(10):1191-1201.

10

(6) Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J.Clin.Invest.*, 1996, 98, 4, 1010-1020.

(7) Monteleone I, Platt AM, Jaansson E, Agace WW, Mowat AM. IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function. *Eur J Immunol*. 2008 38(6):1533-47

(8) Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992 Dec 1;176(6):1693-1702.

20

(9) Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 2000 Nov 1;96(9):3029-3039.

(10) Weigel BJ, Nath N, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Chen W, Krieg AM, et al. Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. *Blood* 2002 Dec 1;100(12):4169-4176.

(10) Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 2007 Dec 1;179(11):7577-7584.

30

(12) Olivera L, Canul RR, Pereira-Pacheco F, Cockburn J, Soldani F, McKenzie NH, et al. Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins), or starch. *J Agric Food Chem* 2003 Jan 1;51(1):319-325.

【 0 6 9 1 】

以上の明細書にて言及された全ての刊行物は、参照によって本明細書に組み込まれている。記述した方法、及び本発明のシステムの種々の改変及び変化が、本発明の範囲と意図を逸脱せずに、当業者に対して明らかであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に連結して記述してきたが、特許請求したような本発明は、そのような特定の実施形態に過度に制限されるべきではないことが理解されるべきである。実際に、生化学及び分子生物学、又は関連する分野の当業者に明白である、本発明を実施するための記述したモードの種々の改変が、以下の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

40

【 図 1 - 1 】

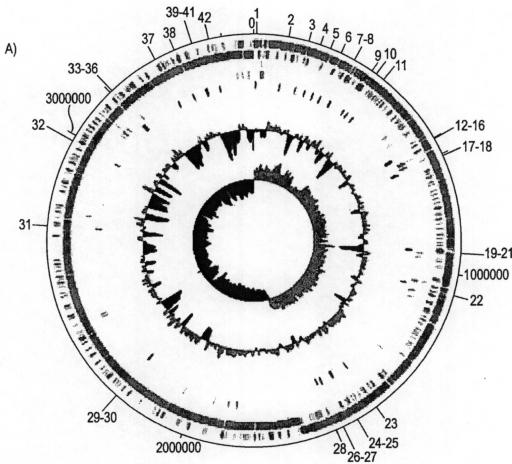


FIG. 1

【図1-2】

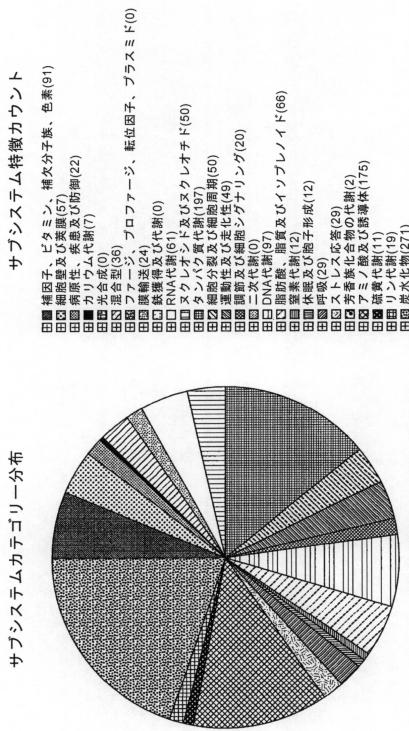


FIG. 1

【図 1 A】

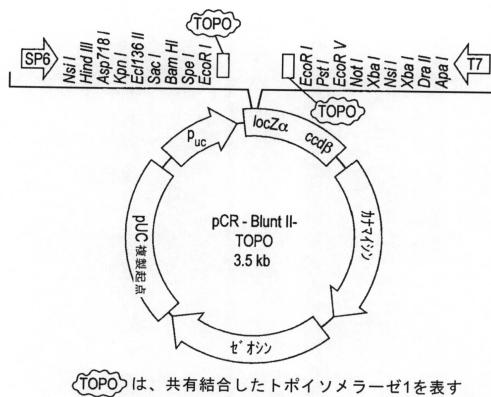


FIG. 1A

(义 2 - 1)

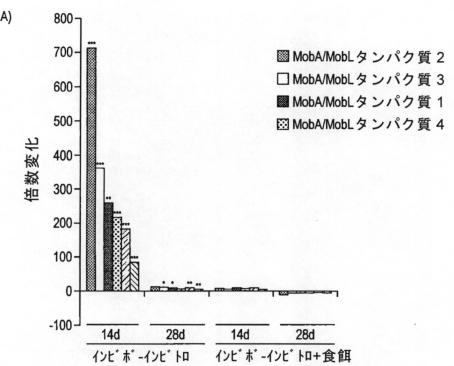


FIG. 2

【図 2 - 2】

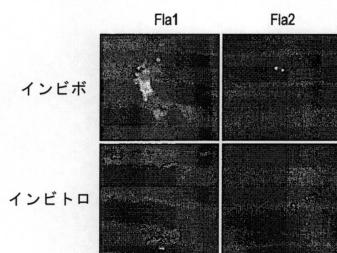
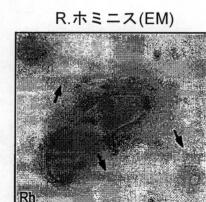
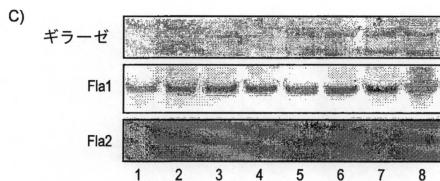


FIG. 2

【図 2 - 3】

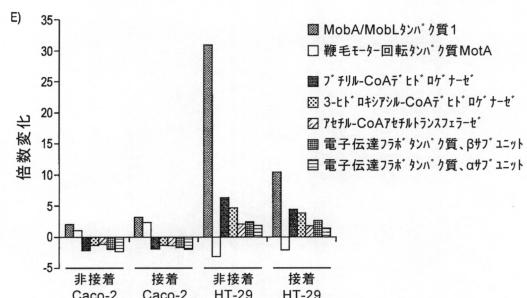
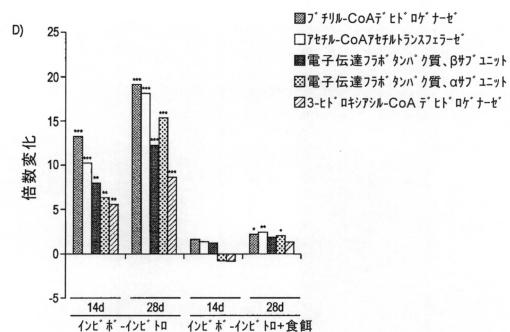


FIG. 2

【図 2 A】

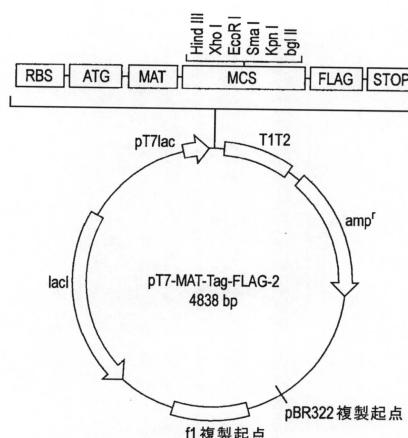


FIG. 2A

【図 3 - 1】

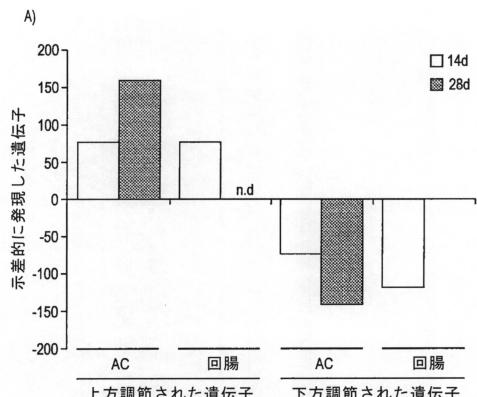


FIG. 3

【図 3 - 2】



FIG. 3

【図 3 - 3】

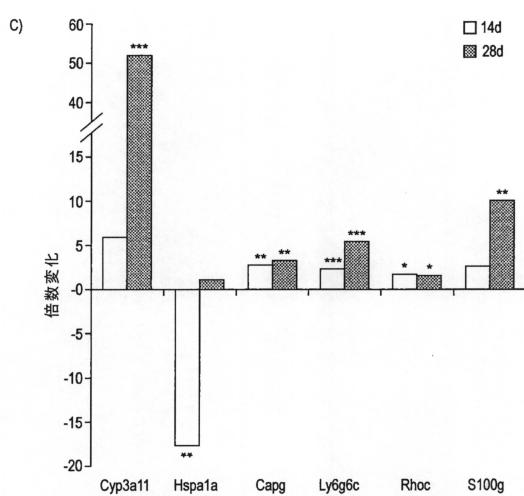


FIG. 3

【図 3 A】

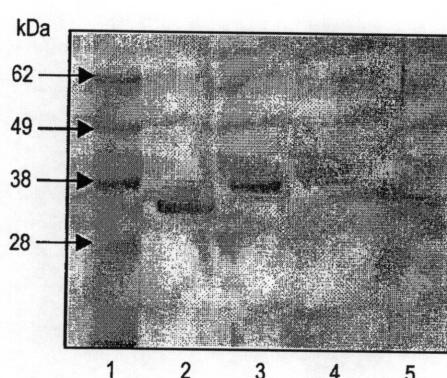


FIG. 3A

【図 4】

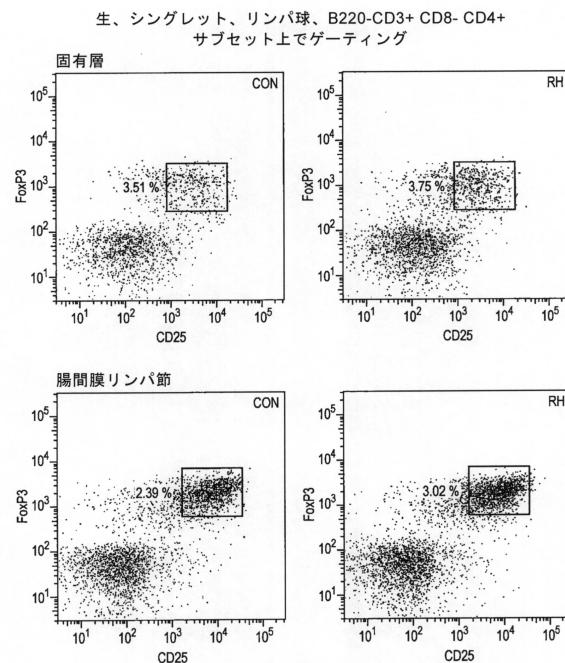


FIG. 4

【図 4 A】

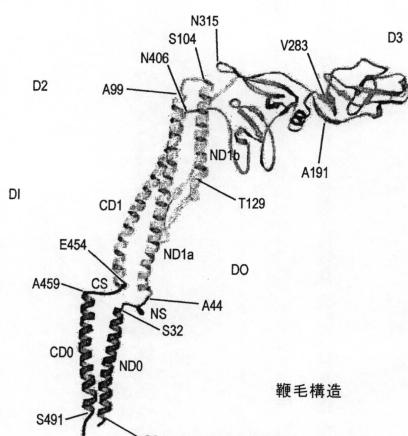


FIG. 4A

【図 5 - 1】

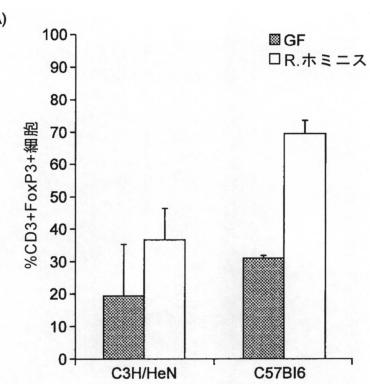


FIG. 5

【図 5 - 2】

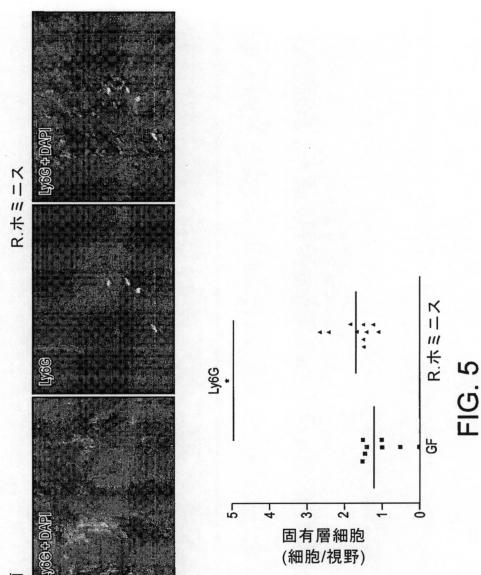


FIG. 5

【図 5 - 3】

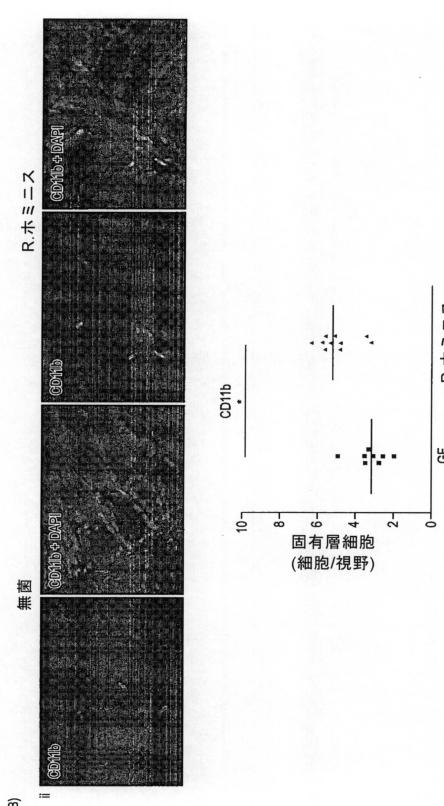


FIG. 5

【図 5 - 4】

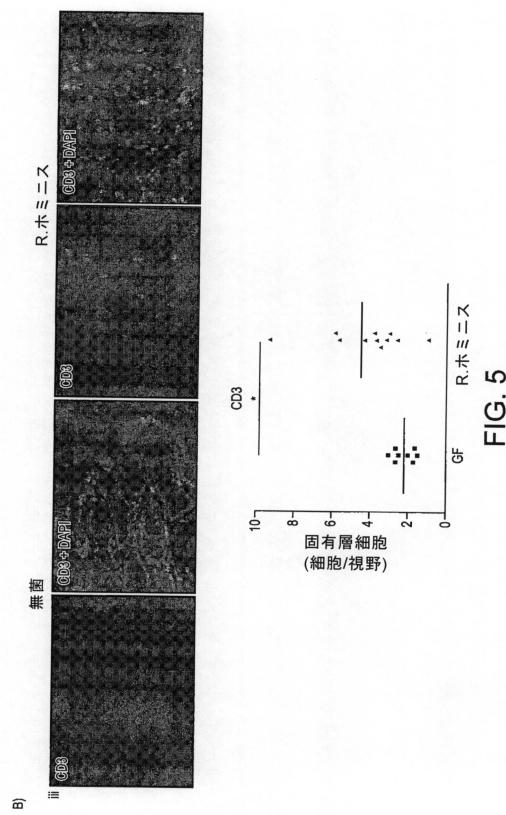


FIG. 5

【図 5 - 5】

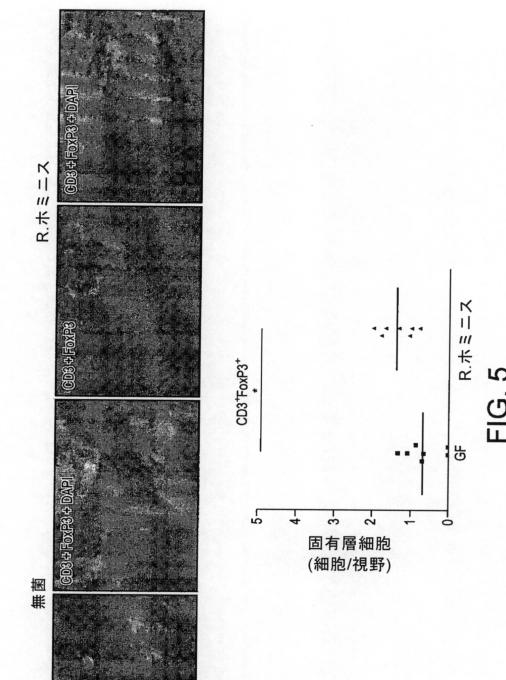


FIG. 5

【図 6 - 1】

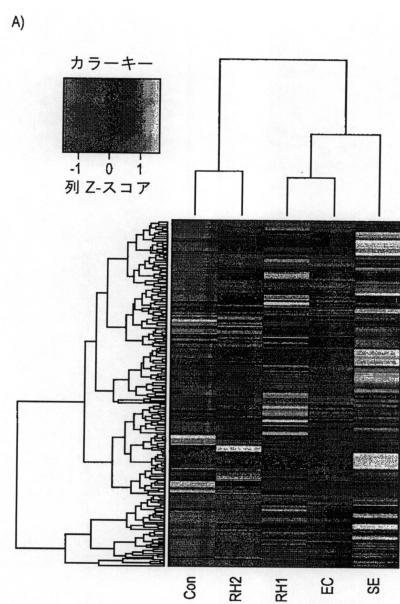


FIG. 6

【図 6 - 2】

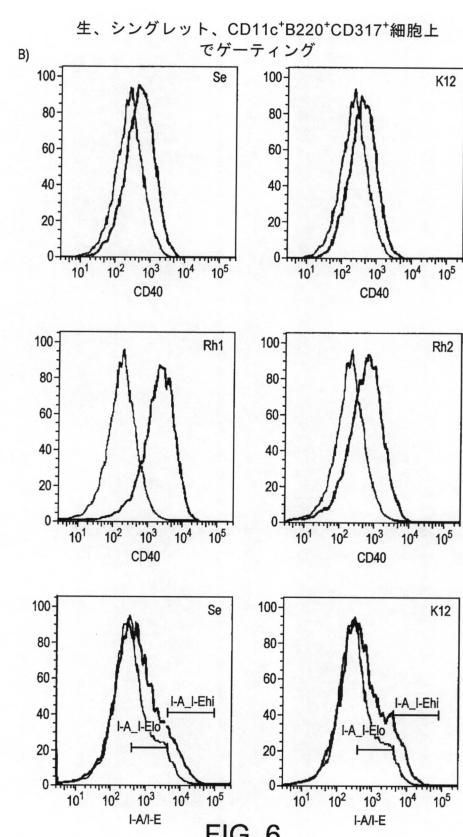


FIG. 6

【図 6 - 3】

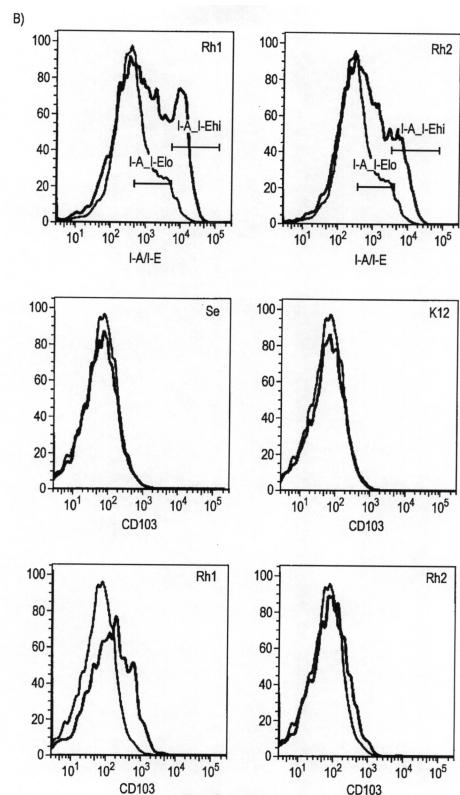


FIG. 6 Cont'd

【図 6 - 4】

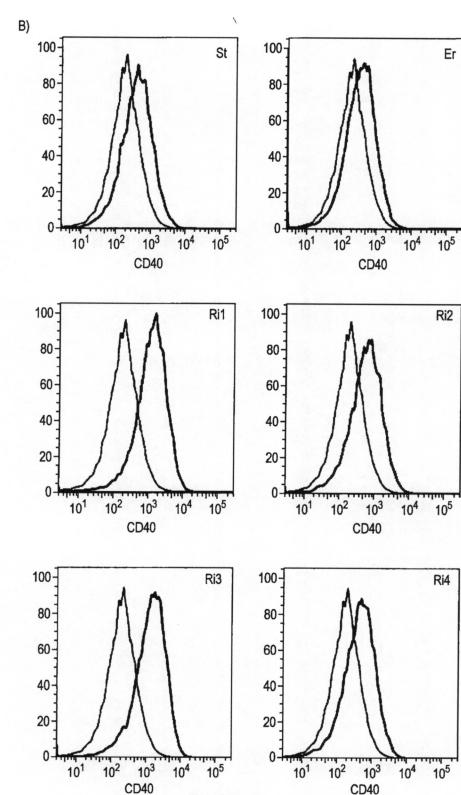


FIG. 6 Cont'd

【図 6 - 5】

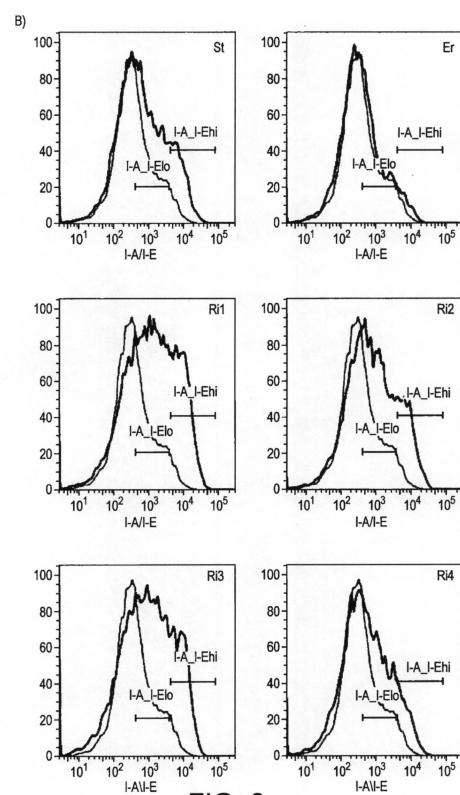


FIG. 6 Cont'd

【図 6 - 6】

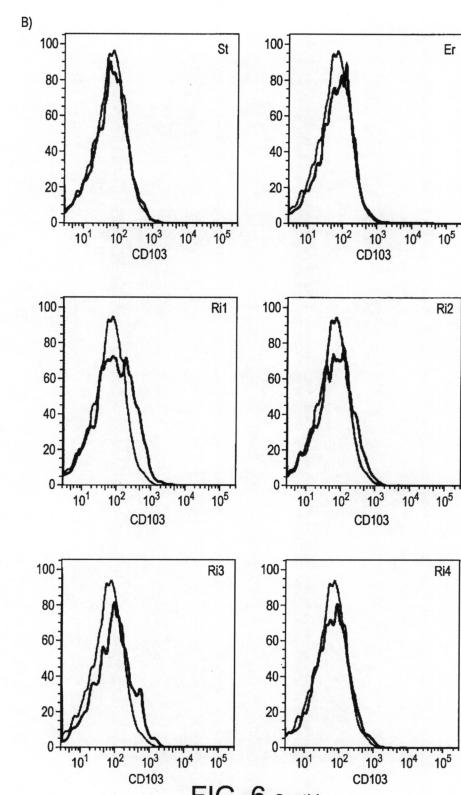


FIG. 6 Cont'd

【図 6 - 7】

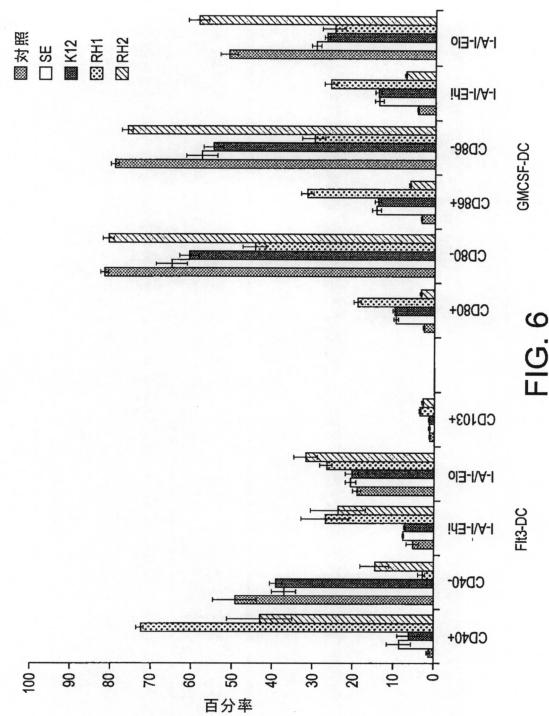


FIG. 6

C)

【図 7】

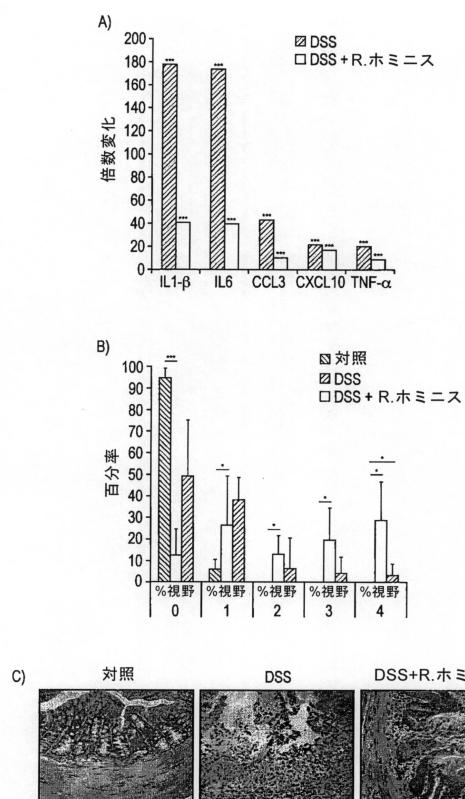


FIG. 7

【図 6 - 8】

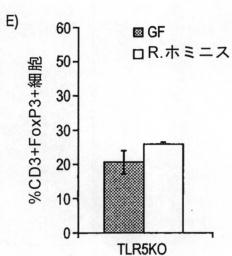
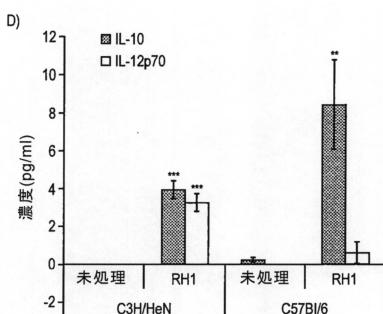


FIG. 6

【図 B 1】

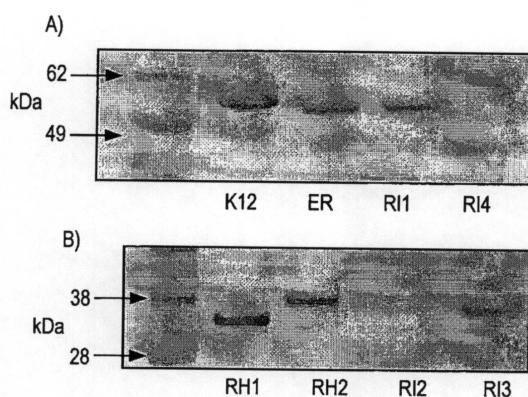


FIG. B1

【図C1-1】

概要 ヌクレオチド配列を確認するCLUSTAL2.1多重配列アライメント
と受託番号

RIFla1	ATGCGTGGCGGAGACAATAGAAAGGAAAACAGATGAGAATTAAATCATGTGTAGCA 60
RIEEV02820	ATGCGTGGCGGAGACAATAGAAAGGAAAACAGATGAGAATTAAATCATGTGTAGCA 60
RIFla1	GCGATTCGGAATAAACATTACTGGAAATTGAGGATAATTAAATGTCATGGAAACGG 120
RIEEV02820	GCGATTCGGAATAAACATTACTGGAAATTGAGGATAATTAAATGTCATGGAAACGG 120
RIFla1	CTTTCATGGGACTTAAGATAACCATTCAGGACATCCGGCAGGAATGGCTATTCCC 180
RIEEV02820	CTTTCATGGGACTTAAGATAACCATTCAGGACATCCGGCAGGAATGGCTATTCCC 180
RIFla1	AACAAAGATGAAAGCACAGTTGATGGTTAACCGGGCTTCCAGAATGTCATGGATGGT 240
RIEEV02820	AACAAAGATGAAAGCACAGTTGATGGTTAACCGGGCTTCCAGAATGTCATGGATGGT 240
RIFla1	ATTCCTGTTATTCAAGTCAGATGGCTGAGTAAACGACAGTATTTCAGCGT 300
RIEEV02820	ATTCCTGTTATTCAAGTCAGATGGCTGAGTAAACGACAGTATTTCAGCGT 300
RIFla1	ATGAGAGAACTTCCGTGAGGAGTGATGCAACATGACCCGGGATAAAGGG 360
RIEEV02820	ATGAGAGAACTTCCGTGAGGAGTGATGCAACATGACCCGGGATAAAGGG 360
RIFla1	GCAATCCAGAAAGAAAATCAGTATTAAAGATGAAATTGACAGTATTACAGATACA 420
RIEEV02820	GCAATCCAGAAAGAAAATCAGTATTAAAGATGAAATTGACAGTATTACAGATACA 420
RIFla1	GAGTATAACAGAAACACTTTAGATGGTTCATTAGATACCAAGGGTTACACCAAAAT 480
RIEEV02820	GAGTATAACAGAAACACTTTAGATGGTTCATTAGATACCAAGGGTTACACCAAAAT 480
RIFla1	GCAACAAGGTGACATTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTTCATTGAT 540
RIEEV02820	GCAACAAGGTGACATTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTTCATTGAT 540
RIFla1	ACTGCAGCTACACAGGCCGACCGGTAACAGCAAATCAGAATTAAATCCACAGCACCG 600
RIEEV02820	ACTGCAGCTACACAGGCCGACCGGTAACAGCAAATCAGAATTAAATCCACAGCACCG 600

FIG. C1

【図C1-2】

RIFla1	GTCGGTGCCTCCGGAACAATGAGTAAATGGGTTAAAGTAGAGATGAGGAGCCGAC 660
RIEEV02820	GTCGGTGCCTCCGGAACAATGAGTAAATGGGTTAAAGTAGAGATGAGGAGCCGAC 660
RIFla1	ACCTATCGGGAGGGTTTGGAGAAGATCAGAAATGGAGCAGAGACTGGTAAACACCGTT 720
RIEEV02820	ACCTATCGGGAGGGTTTGGAGAAGATCAGAAATGGAGCAGAGACTGGTAAACACCGTT 720
RIFla1	AAGATTGAAAAGATGGAGCATTCTATTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAGCATC 780
RIEEV02820	AAGATTGAAAAGATGGAGCATTCTATTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAGCATC 780
RIFla1	TTAGAGATCGCATTTGATGATAAGCAGCTTGTCAATGCACTTGGATTACAGCAGACGG 840
RIEEV02820	TTAGAGATCGCATTTGATGATAAGCAGCTTGTCAATGCACTTGGATTACAGCAGACGG 840
RIFla1	GGAACACAGTTGAGAAGATCCGAGAATAAAGGCAGCTATGATACGGACAGATTAGC 900
RIEEV02820	GGAACACAGTTGAGAAGATCCGAGAATAAAGGCAGCTATGATACGGACAGATTAGC 900
RIFla1	AATGGCAAGTGTGATGTCATCTCCGGTACAGATGCCAGAACGCTCACAACCGAGT 960
RIEEV02820	AATGGCAAGTGTGATGTCATCTCCGGTACAGATGCCAGAACGCTCACAACCGAGT 960
RIFla1	GATGGAACCCGATTGGTATGAGCTACAGCTACGGTAAACAGATGGAAATAAGATTACGGTT 1020
RIEEV02820	GATGGAACCCGATTGGTATGAGCTACAGCTACGGTAAACAGCTCACAACCGAGT 1020
RIFla1	ACAGACAGCCGGATTGGTATGAGCTACAGCTACGGTAAACAGATGGAAATAAGATTACGGTT 1080
RIEEV02820	ACAGACAGCCGGATTGGTATGAGCTACAGCTACGGTAAACAGCTCACAACCGAGT 1080
RIFla1	GATTITGATGTCACGGATATCGGAACGATGCCACCTCATATTGGAGCAAATGGAGGATCAG 1140
RIEEV02820	GATTITGATGTCACGGATATCGGAACGATGCCACCTCATATTGGAGCAAATGGAGGATCAG 1140
RIFla1	GAAACAAGAGTGTATTCCGGAGGTTCTGCAAGGCTTACATTGATGATGAGAC 1200
RIEEV02820	GAAACAAGAGTGTATTCCGGAGGTTCTGCAAGGCTTACATTGATGATGAGAC 1200
RIFla1	GTGACGACTGTAATGGAGCAGGAGTATCACAGCTTGTACGACGATGCCATTCTCAAAG 1260
RIEEV02820	GTGACGACTGTAATGGAGCAGGAGTATCACAGCTTGTACGACGATGCCATTCTCAAAG 1260
RIFla1	GTCACTGGTCAAGACTGTTGTCATACCAGAATCGCTTGTGAGAGTACGGTATCA 1320
RIEEV02820	GTCACTGGTCAAGACTGTTGTCATACCAGAATCGCTTGTGAGAGTACGGTATCA 1320
RIFla1	AGCCTGGATACGTTGAGAAAATATGACAGGAGGCCAGTCACGACTGACAGATGCCGAT 1380
RIEEV02820	AGCCTGGATACGTTGAGAAAATATGACAGGAGGCCAGTCACGACTGACAGATGCCGAT 1380
RIFla1	ATGGCATGGAAATCTGAGATGTCATCTGGTAAACAGTGTGTTACAGGCTAACATCT 1440
RIEEV02820	ATGGCATGGAAATCTGAGATGTCATCTGGTAAACAGTGTGTTACAGGCTAACATCT 1440
RIFla1	GTTTGACACAGGAAACGATCTGCCACAGCAGGATTGAGCAGATTCTGCAAGTAA 1494
RIEEV02820	GTTTGACACAGGAAACGATCTGCCACAGCAGGATTGAGCAGATTCTGCAAGTAA 1494

FIG. C1 Cont'd

【図C2】

CLUSTAL2.1多重配列アライメント

RIFla2	ATGGTAGTTAACATAATGGCATGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60
RIEEV02466	ATGGTAGTTAACATAATGGCATGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60
RIFla2	AAGAACATGGAGAAATCTCAAAAAGCTGCAAGGATTTAGTAAATGGCTGGAGCAA 120
RIEEV02466	AAGAACATGGAGAAATCTCAAAAAGCTGCAAGGATTTAGTAAATGGCTGGAGCAA 120
RIFla2	GATGATCAGCAGGATTACAGATTCAGAACATCGCTCATGACAGGAGGCTTAAAC 180
RIEEV02466	GATGATCAGCAGGATTACAGATTCAGAACATCGCTCATGACAGGAGGCTTAAAC 180
RIFla2	AAAGCATCAGAAATTCCGAAGATGGTAAATGGCTGAGCAGCAGATGCGATTAAAC 240
RIEEV02466	AAAGCATCAGAAATTCCGAAGATGGTAAATGGCTGAGCAGCAGATGCGATTAAAC 240
RIFla2	CAGGAGACACAGGAAGTGTGGATGCAATGACGGATCTGCAACACAGGAGCTAATGAT 300
RIEEV02466	CAGGAGACACAGGAAGTGTGGATGCAATGACGGATCTGCAACACAGGAGCTAATGAT 300
RIFla2	ATCAATACGATCGGATCTGTCGAATTAGGATAAAATGCACTGTTAAACAGGAA 360
RIEEV02466	ATCAATACGATCGGATCTGTCGAATTAGGATAAAATGCACTGTTAAACAGGAA 360
RIFla2	GTGGATCGTATTGATACAGCAATTATCAGCAGTTATATAGCGGATGGAACT 420
RIEEV02466	GTGGATCGTATTGATACAGCAATTATAGCGGATGGAACT 420
RIFla2	CCGCAGGAAGCAGGATCTATGATACAGGAAGGAGCTTGGGGCAAGGGGAATA 480
RIEEV02466	CCGCAGGAAGCAGGATCTATGATACAGGAAGGAGCTTGGGGCAAGGGGAATA 480
RIFla2	GAGATTAAGTTGTTAACGGCAAGAGGAGCTTGGGGCAAGGGTTAGTATCA 540
RIEEV02466	GAGATTAAGTTGTTAACGGCAAGAGGAGCTTGGGGCAAGGGTTAGTATCA 540
RIFla2	TCGCATGCAAACAGCAGAAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAAGCAGCT 600
RIEEV02466	TCGCATGCAAACAGCAGAAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAAGCAGCT 600
RIFla2	TGCTTAAAGGAGGACATGGGACAAACAGGGGTTAGAAGACAGCTTGGCTGAACGG 660
RIEEV02466	TGCTTAAAGGAGGACATGGGACAAACAGGGGTTAGAAGACAGCTTGGCTGAACGG 660
RIFla2	GATAATACATCGAAAGTACACAGGGCAGAACTAGTACGGGATACCAACATGA 720
RIEEV02466	GATAATACATCGAAAGTACACAGGGCAGAACTAGTACGGGATACCAACATGA 720
RIFla2	ATGGAGATGTTAACATATCTACAAACCGTATTAGTACAGGCTCTCAGAGTATT 780
RIEEV02466	ATGGAGATGTTAACATATCTACAAACCGTATTAGTACAGGCTCTCAGAGTATT 780
RIFla2	GCACAGTACAATGATGTCAGGAAATATGTTGGAAATGTTAAAG 828
RIEEV02466	GCACAGTACAATGATGTCAGGAAATATGTTGGAAATGTTAAAG 828

FIG. C2

【図C3】

CLUSTAL2.1多重配列アライメント

RIFla3	ATGGTAGTACAGCACAATATGACGGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGCGTTACAACA 60
RIEEV00779	ATGGTAGTACAGCACAATATGACGGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGCGTTACAACA 60
RIFla3	AGCGCACAGCAAATCTTCAGAGAAAATATCTCTGGTACAGAACATCCGGTCAAGGTT 120
RIEEV00779	AGCGCACAGCAAATCTTCAGAGAAAATATCTCTGGTACAGAACATCCGGTCAAGGTT 120
RIFla3	GATGACGCTGTTGTTAACAAATTCTGAGAGATGAGAAGCCGATCTGGTAAAC 180
RIEEV00779	GATGACGCTGTTGTTAACAAATTCTGAGAGATGAGAAGCCGATCTGGTAAAC 180
RIFla3	AAAGCTCTGACAAGCAGCAGGATGTTCTCCATTAACTCCAGGTTCTGAGGGTCTTAAAC 240
RIEEV00779	AAAGCTCTGACAAGCAGCAGGATGTTCTCCATTAACTCCAGGTTCTGAGGGTCTTAAAC 240
RIFla3	ATGGCATGGACACAGTATCACACAGTATGAGATGAGCTTGTGAGGCTAACATCT 1440
RIEEV00779	ATGGCATGGACACAGTATCACACAGTATGAGATGAGCTTGTGAGGCTAACATCT 1440
RIFla3	GTTTGACACAGGAAACGATCTGCCACAGCAGGATTGAGCAGATTCTGCAAGTAA 1494
RIEEV00779	GTTTGACACAGGAAACGATCTGCCACAGCAGGATTGAGCAGATTCTGCAAGTAA 1494

FIG. C3

【図 C 4 - 1】

CLUSTAL2.1 多重配列アライメント

```

RIFla4 ATGGCAATGTTAGTACAGCACACATGTCCGAATGAATGCGAACAGAAAATTAGGTGTT 60
RIEU99488 ATGGCAATGTTAGTACAGCACACATGTCCGAATGAATGCGAACAGAAAATTAGGTGTT 60

RIFla4 ACAACAGGAATGCAGGCAAATCATCAGAGAAGTTCTTCGGTTACAAGATCACCGT 120
RIEU99488 ACAACAGGAATGCAGGCAAATCATCAGAGAAGTTCTTCGGTTACAAGATCACCGT 120

RIFla4 GCAGCAGATGAGCAGGACTTCTATTCTGAGAAAGATGAGAACGAGATCCGGGT 180
RIEU99488 GCAGCAGATGAGCAGGACTTCTATTCTGAGAAAGATGAGAACGAGATCCGGGT 180

RIFla4 TTAAAAAAAGCATCTGACAAATGACAGGATGGTATCTTAAATCCAGACCGCTGAGGGA 240
RIEU99488 TTAAAAAAAGCATCTGACAAATGACAGGATGGTATCTTAAATCCAGACCGCTGAGGGA 240

RIFla4 GCATTAAATGAGTCCCACCTCTTTCAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGGCAGGCC 300
RIEU99488 GCATTAAATGAGTCCCACCTCTTTCAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGGCAGGCC 300

RIFla4 AACGGTACAGAGACAGTACGGCAGGGAGGAGTACAGAACAGGAGTTACAG 360
RIEU99488 AACGGTACAGAGACAGTACGGCAGGGAGGAGTACAGAACAGGAGTTACAG 360

RIFla4 GAAGAGCTGACAAGAATTCTGAGAACACAGAGTICAACAGGTGAAGCTGCTGGT 420
RIEU99488 GAAGAGCTGACAAGAATTCTGAGAACACAGAGTICAACAGGTGAAGCTGCTGGT 420

RIFla4 TCTCAGAGTGGAAAGTACATCTCAACCGGGTCAGGTGCGAAGTTGGTTAGATGCA 480
RIEU99488 TCTCAGAGTGGAAAGTACATCTCAACCGGGTCAGGTGCGAAGTTGGTTAGATGCA 480

RIFla4 ACATTAGACGGTGACTTGAACATCTAACGTGAAAGGTTAAAGTAGAACACAGCAGCT 540
RIEU99488 ACATTAGACGGTGACTTGAACATCTAACGTGAAAGGTTAAAGTAGAACACAGCAGCT 540

RIFla4 GCCACAAACAAAAGCAGGTGAGGAGACTGCTATCGGCTGCTGATGAAAGACATTA 600
RIEU99488 GCCACAAACAAAAGCAGGTGAGGAGACTGCTATCGGCTGCTGATGAAAGACATTA 600

RIFla4 ACTTTAAATCTTCAAAAGGTTATAACAGGAGTATACACAGGAGCAGAAATTGATGACTTGTGCA 660
RIEU99488 ACTTTAAATCTTCAAAAGGTTATAACAGGAGTATACACAGGAGCAGAAATTGATGACTTGTGCA 660

RIFla4 AATGCAAAACAGGAAGACAGTCTGAAACCGGGTGACCGGGCTGAAGTGAAGTCTTAA 720
RIEU99488 AATGCAAAACAGGAAGACAGTCTGAAACCGGGTGACCGGGCTGAAGTGAAGTCTTAA 720

RIFla4 AAGAATGGTATTTAAATGCAAGATGCAGACACAACGCGGAACCTGAACTGTAACAGCGGGTGGT 780
RIEU99488 AAGAATGGTATTTAAATGCAAGATGCAGACACAACGCGGAACCTGAACTGTAACAGCGGGTGGT 780

```

FIG. C4

【図 C 4 - 2】

```

RIFla4 GTGAGGAGCAGTATCTGATGAGAACAGTAACCTGGATTGTTGGTCAGATACAATTTC 840
RIEU99488 GTGAGGAGCAGTATCTGATGAGAACAGTAACCTGGATTGTTGGTCAGATACAATTTC 840

RIFla4 TTACGGCAAAATAAGTATGAGCAGAGTCAATGATACTGTTAAATTCAAATTGAT 900
RIEU99488 TTACGGCAAAATAAGTATGAGCAGAGTCAATGATACTGTTAAATTCAAATTGAT 900

RIFla4 AAAGCAGCAGGCAAAGAAGAATGAGAACAAATACAGCAATTGAAATTGAGGCAAAT 960
RIEU99488 AAAGCAGCAGGCAAAGAAGAATGAGAACAAATACAGCAATTGAAATTGAGGCAAAT 960

RIFla4 GCGGTAACAGCAGGGTAATATAACATTCTTCAGCAGGGCAAAGAATACGGCAGAA 1020
RIEU99488 GCGGTAACAGCAGGGTAATATAACATTCTTCAGCAGGGCAAAGAATACGGCAGAA 1020

RIFla4 GATTAGAAGATGTTAAACGGCAGGATTGACTTGTGATGTTAAATTAAAGTGGAAAT 1080
RIEU99488 GATTAGAAGATGTTAAACGGCAGGATTGACTTGTGATGTTAAATTAAAGTGGAAAT 1080

RIFla4 ACACAGATGAGCCAATACATTCTTCAGCAGGGCAAAGAATACGGCAGAA 1140
RIEU99488 ACACAGATGAGCCAATACATTCTTCAGCAGGGCAAAGAATACGGCAGAA 1140

RIFla4 ACAATGGGTGCTGGCACCGCCGGAGCTGCTGGGAAGTACAGTGTGATGATT 1200
RIEU99488 ACAATGGGTGCTGGCACCGCCGGAGCTGCTGGGAAGTACAGTGTGATGATT 1200

RIFla4 GCTGGTTATGACAGT-TATCTCTGGCTGCTGCAATTACCTTCAGATTTGTCAAATGAA 1259
RIEU99488 GCTGGTTATGACAGT-TATCTCTGGCTGCTGCAATTACCTTCAGATTTGTCAAATGAA 1259

RIFla4 GGTCAGACCATGAGGTTCTTCTATCGATGACATGAGTCAGAGCAGTGGCTAGATGCC 1319
RIEU99488 GGTCAGACCATGAGGTTCTTCTATCGATGACATGAGTCAGAGCAGTGGCTAGATGCC 1319

RIFla4 ACAAAAGTGTGATTAAACACAGGCTGCGACAGAAAGCAACTGATACCTTGTGCA 1379
RIEU99488 ACAAAAGTGTGATTAAACACAGGCTGCGACAGAAAGCAACTGATACCTTGTGCA 1379

RIFla4 GCAATCAAGAAAGTATCTGACAGCGTTGAGAATGGTGGCGATCCAGAACCGTCTGG 1439
RIEU99488 GCAATCAAGAAAGTATCTGACAGCGTTGAGAATGGTGGCGATCCAGAACCGTCTGG 1439

RIFla4 CACACCATCAGCACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGATGCGAGGTCCCCTAC 1499
RIEU99488 CACACCATCAGCACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGATGCGAGGTCCCCTAC 1500

RIFla4 CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGTTGAGTACTCCAAGAACACATTCTGACAG 1559
RIEU99488 CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGTTGAGTACTCCAAGAACACATTCTGACAG 1559

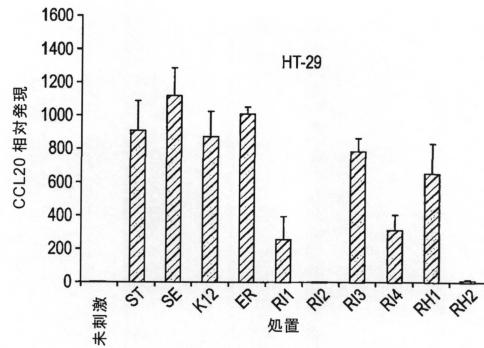
RIFla4 GCAGGTCACTGTTGCAACGGCGAACCGTCTACAGGGTTGACTCTCCTTATTAA 1619
RIEU99488 GCAGGTCACTGTTGCAACGGCGAACCGTCTACAGGGTTGACTCTCCTTATTAA 1620

RIFla4 CAGTAA 1625
RIEU99488 CAGTAA 1626

```

FIG. C4 Cont'd

【図 D 2】



Caco-2

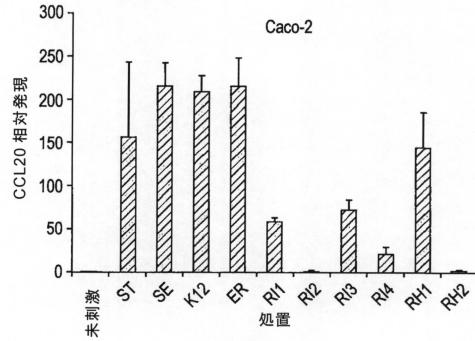
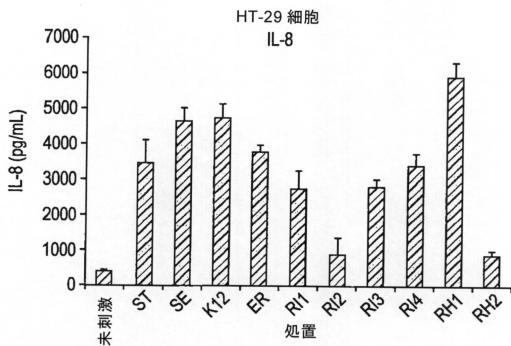


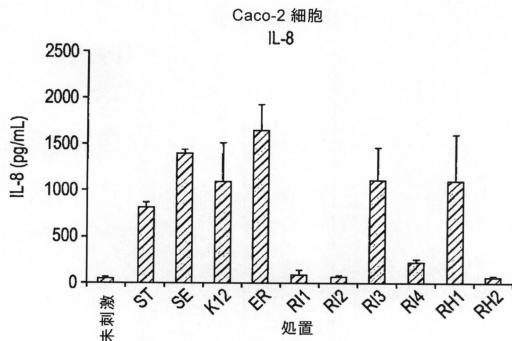
FIG. D2

【図 D 3 - 1】



HT-29 細胞

IL-8

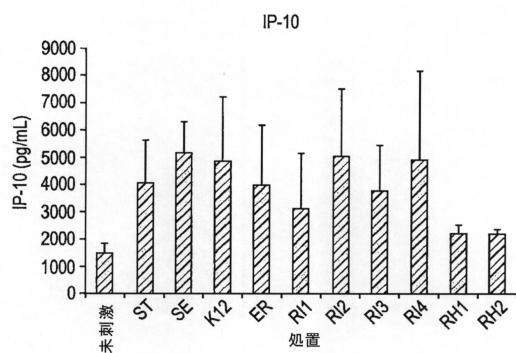


Caco-2 細胞

IL-8

FIG. D3

【図 D 3 - 2】



【図 D 3 - 3】

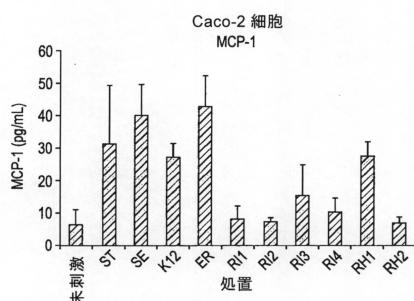
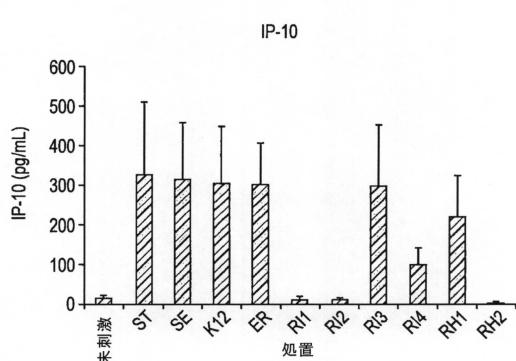
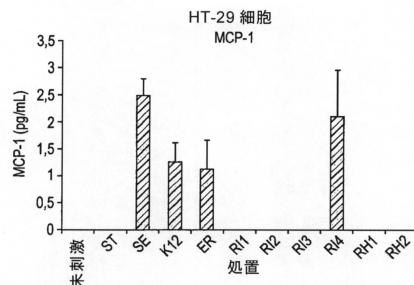


FIG. D3 Cont'd

【図 D 4】

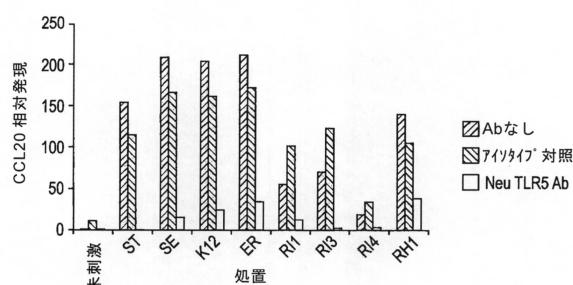


FIG. D4

【図 D 5】

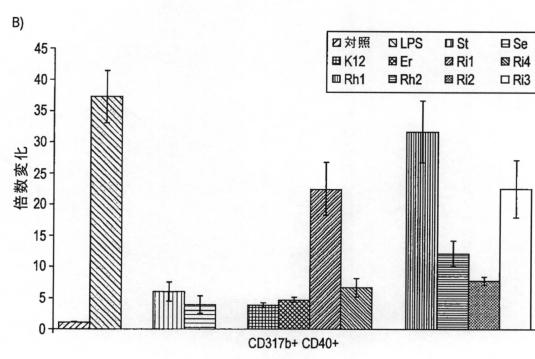
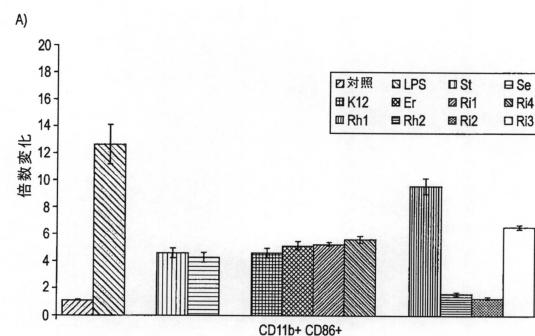


FIG. D5

【図 D 6 - 1】

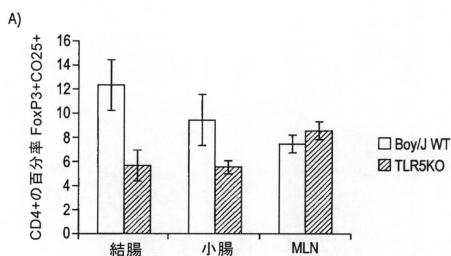


FIG. D6

【図 D 6 - 2】

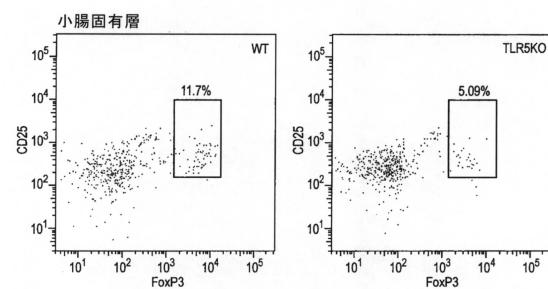
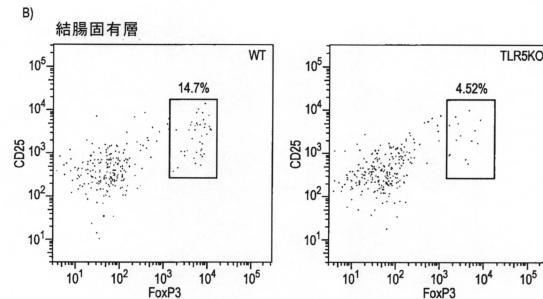


FIG. D6

【図 D 6 - 3】

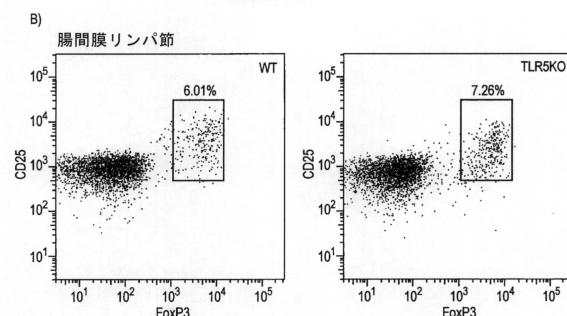


FIG. D6 Cont'd

【図 S 1】

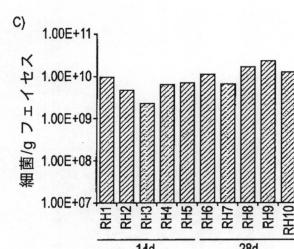
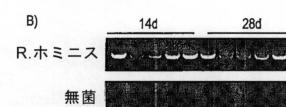
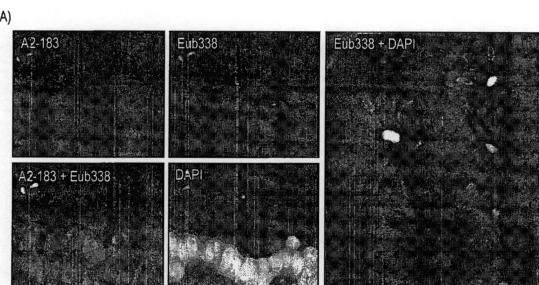


FIG. S1

【図 S 2 - 1】

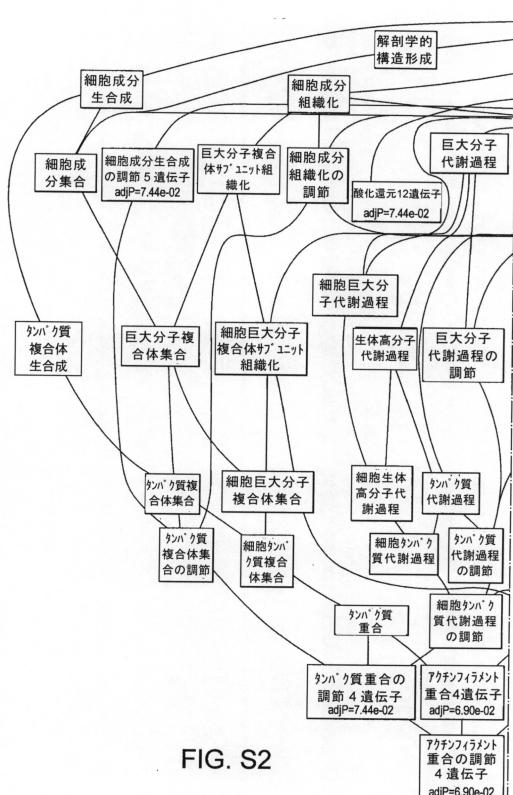


FIG. S2

【図 S 2 - 2】

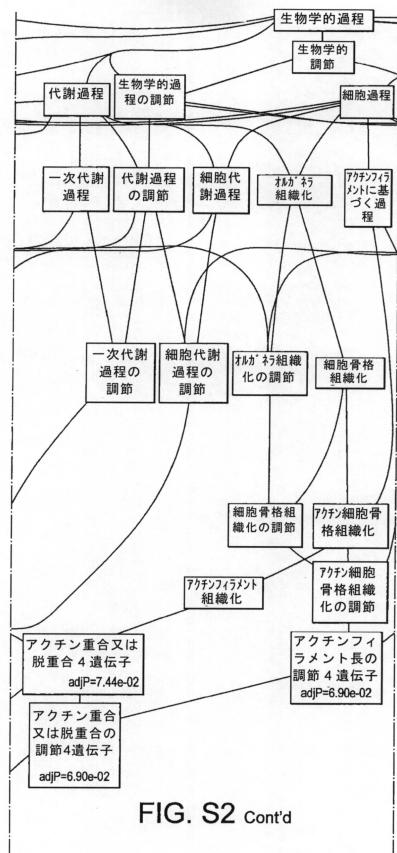


FIG. S2 Cont'd

【図 S 2 - 3】

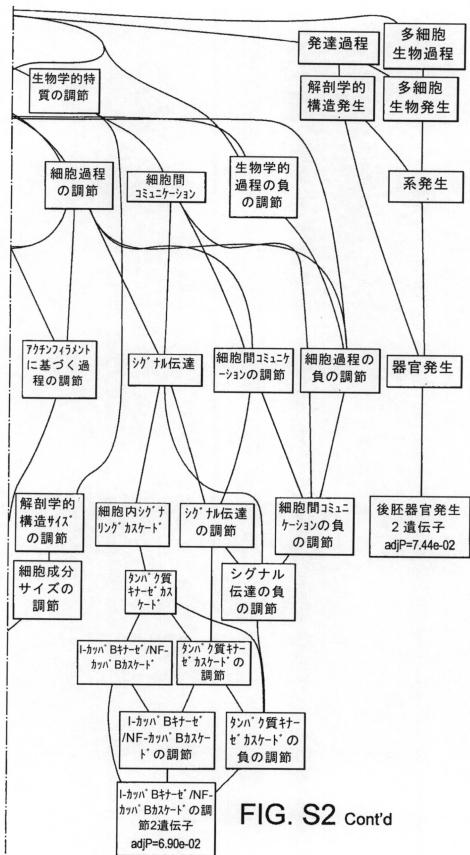


FIG. S2 Cont'd

【図 S 3 - 1】

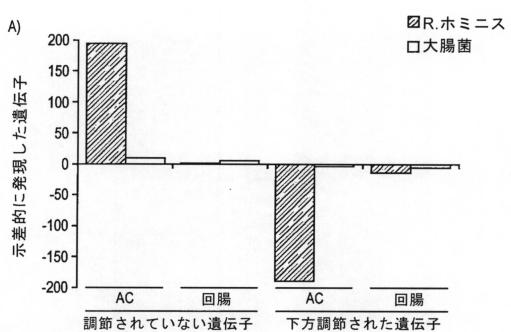


FIG. S3

【图 S 3 - 2】

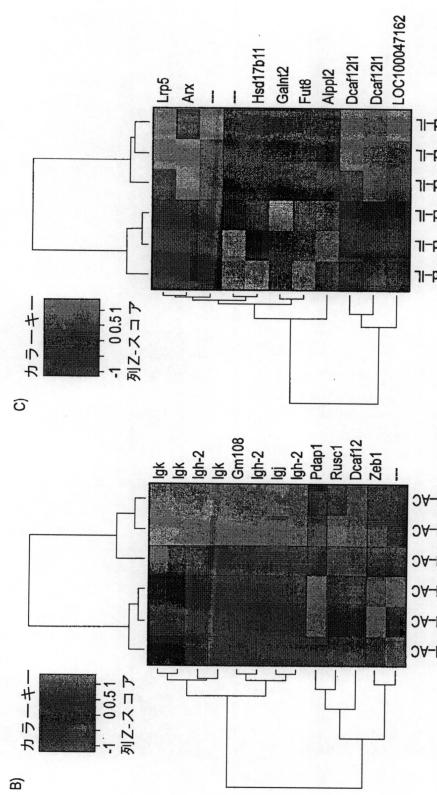


FIG. S3 Cont'd

【図S4-2】

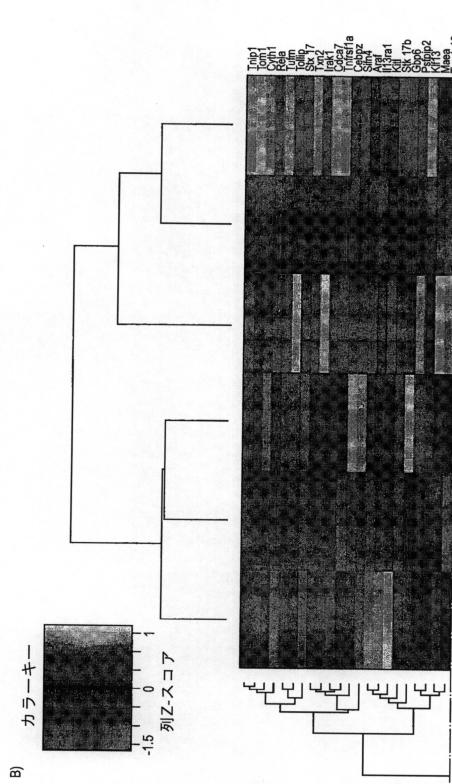


FIG. S4 Cont'd

【図S4-1】

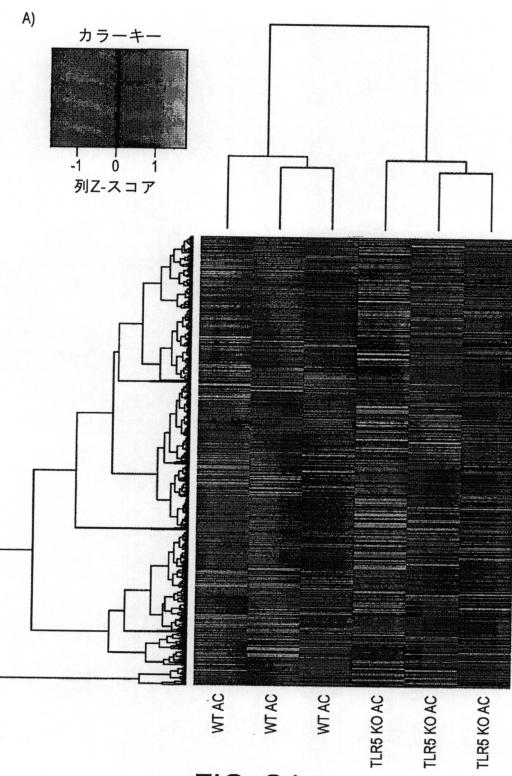


FIG. S4

【図S4-3】

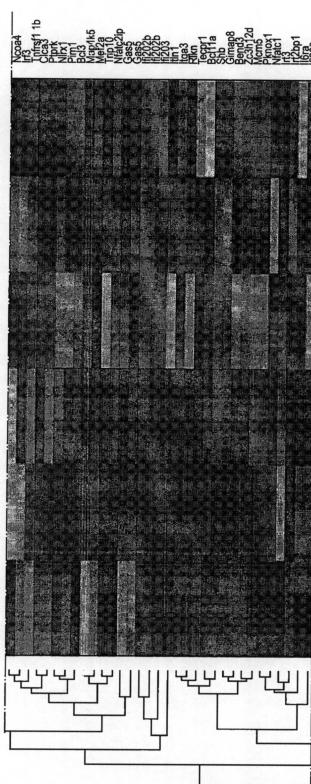
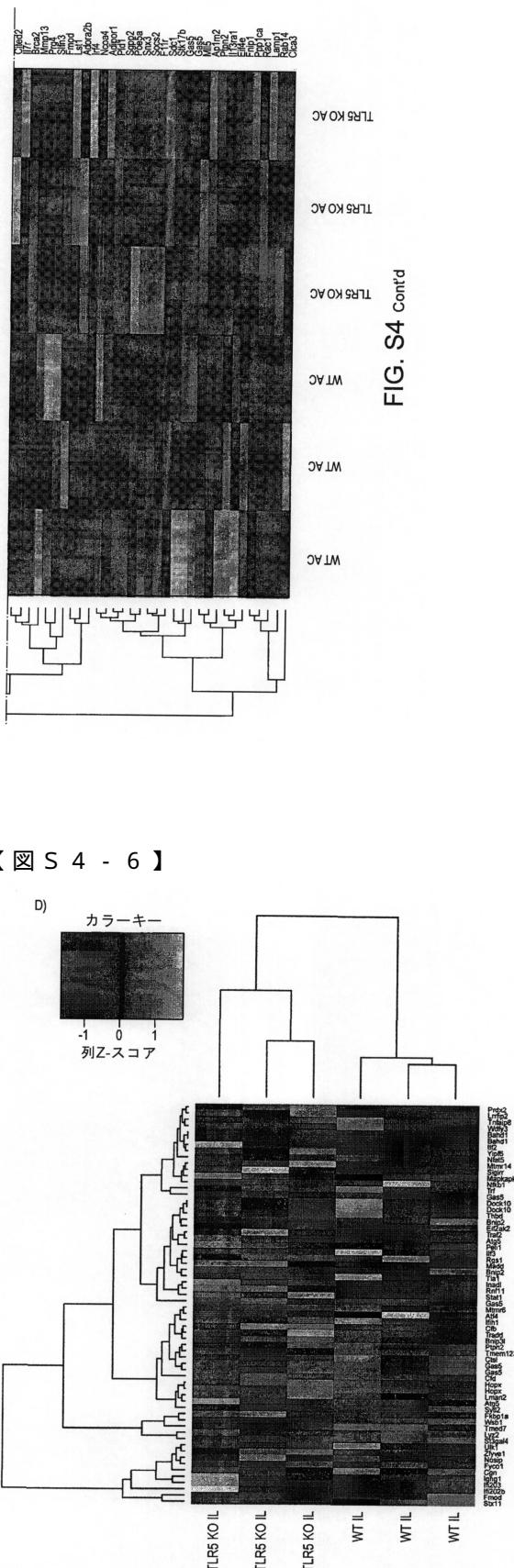


FIG. S4 Cont'd

【図S4-4】



【図S4-5】

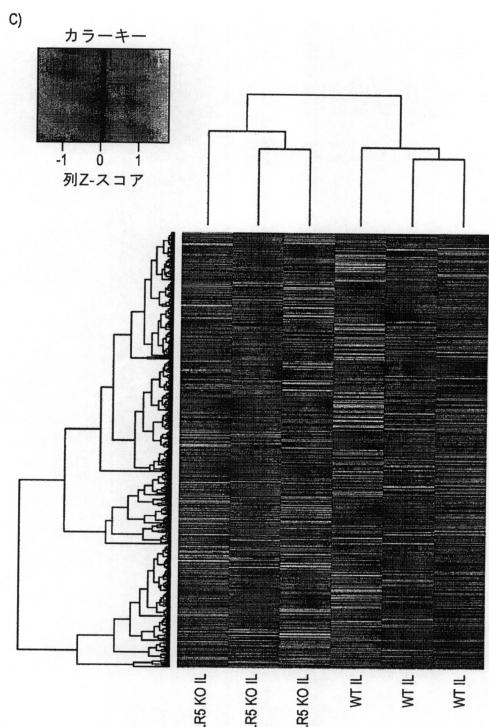
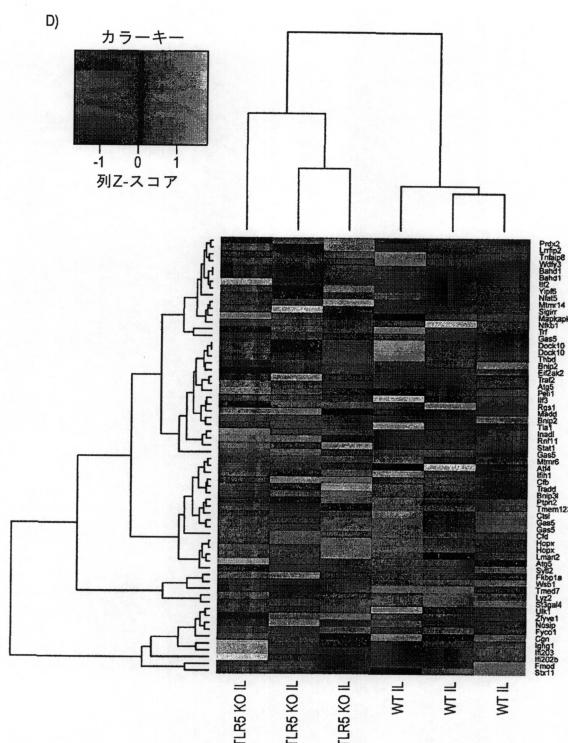


FIG. S4 Cont'd

【図S4-6】



【图 S 5 - 1】

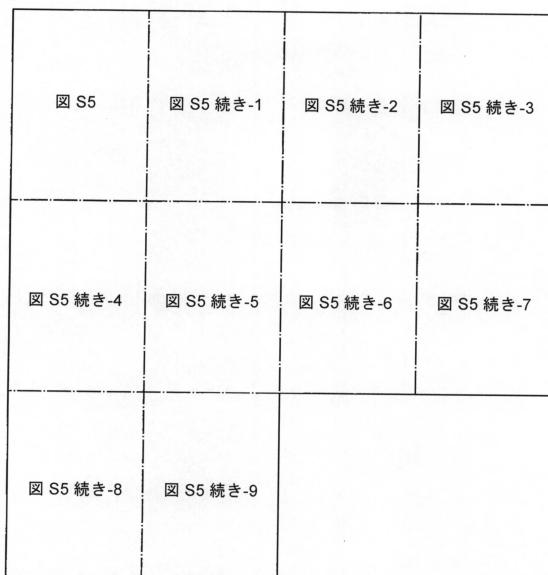


FIG. S5

【図S5-2】

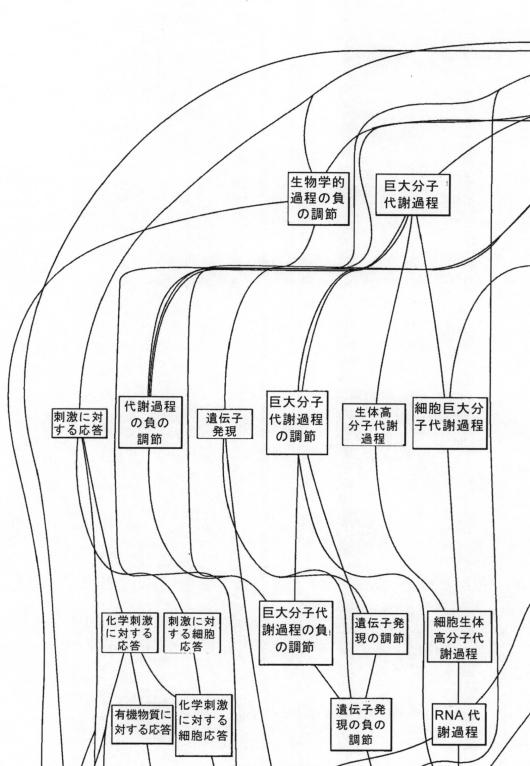


FIG. S5

【図S5-3】

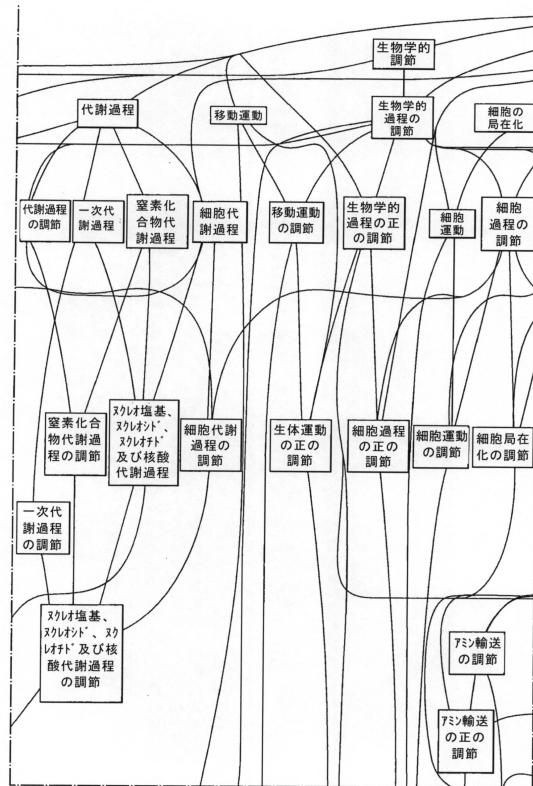


FIG. S5 Cont'd

【図S5-4】

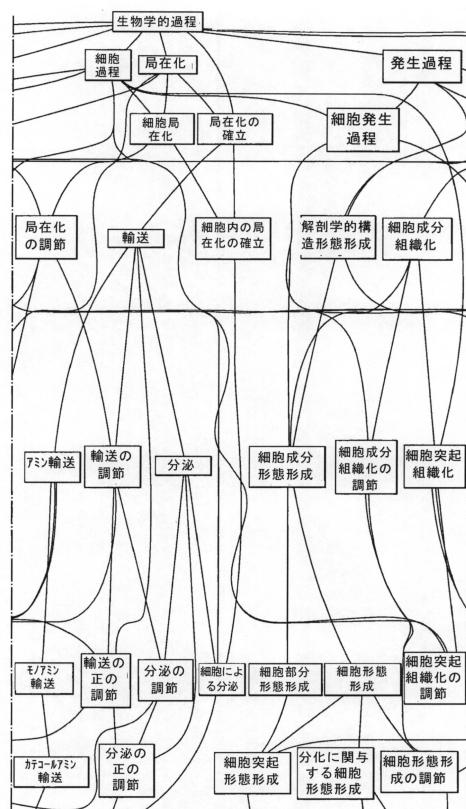


FIG. S5 Cont'd

【図S5-5】

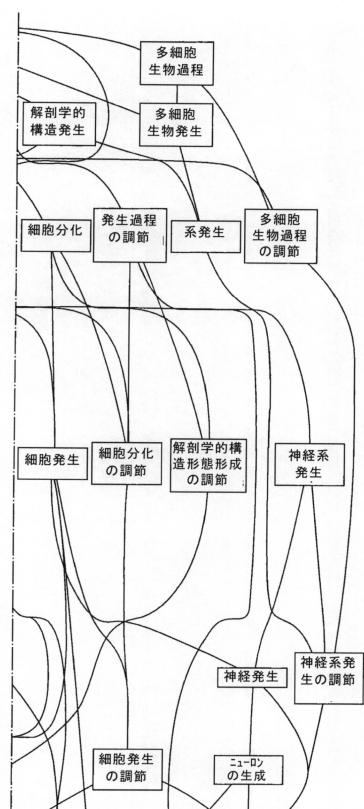


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 6】

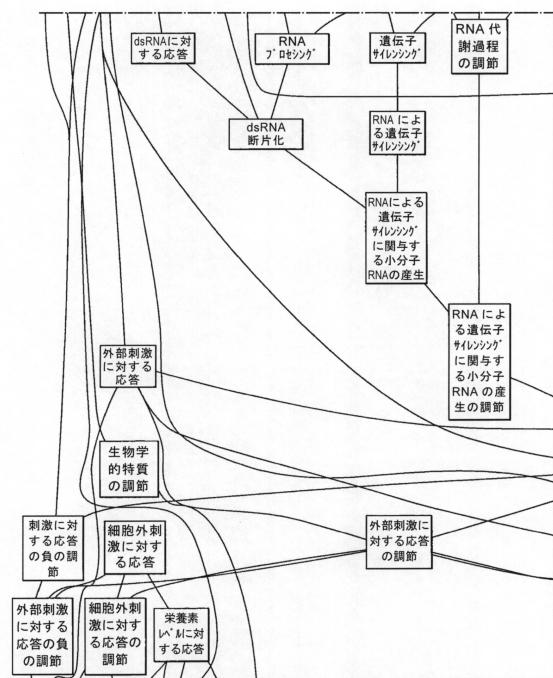


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 7】

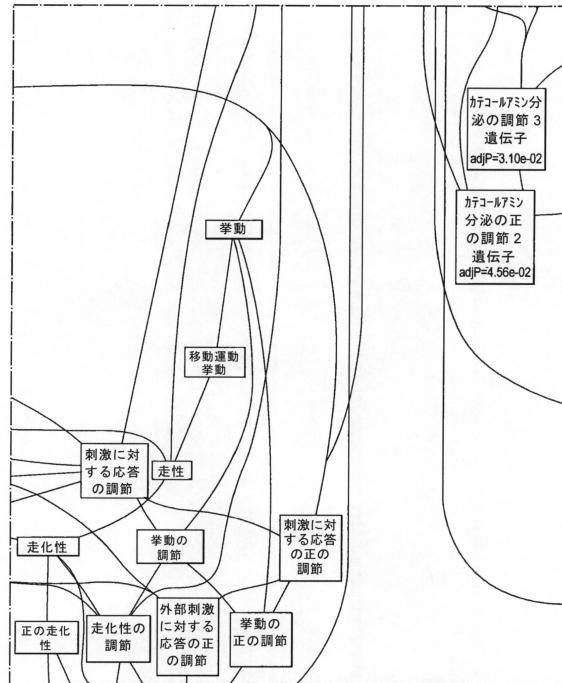


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 8】

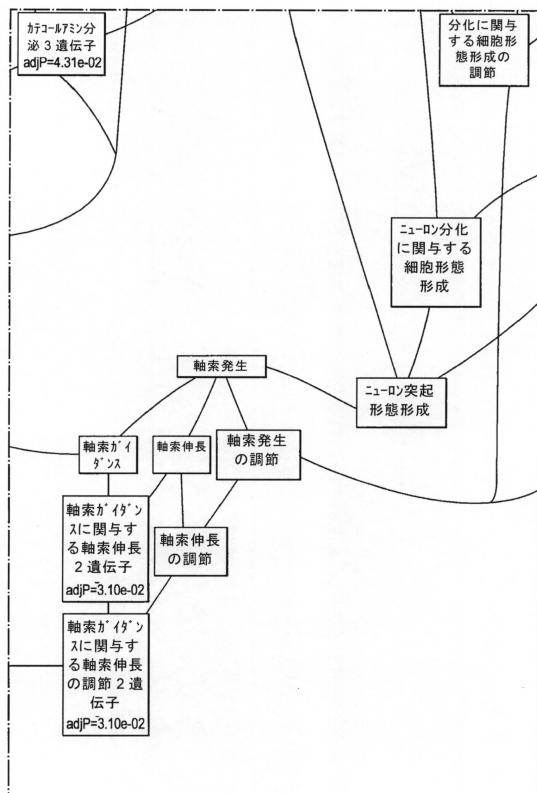


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 9】

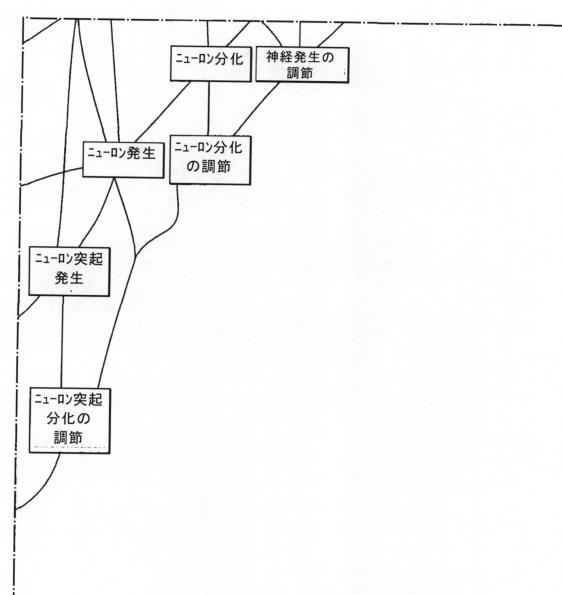


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 10】

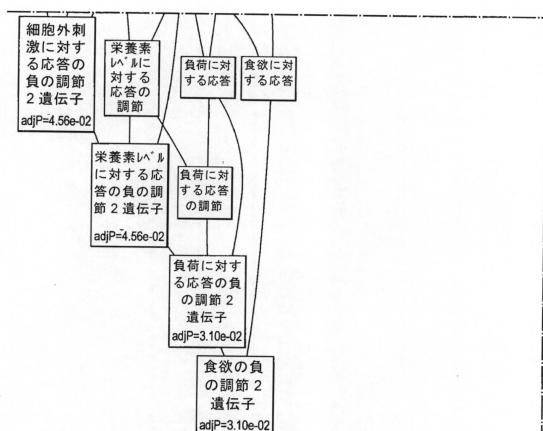


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 11】

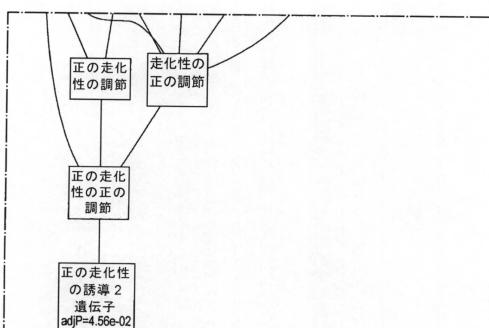


FIG. S5 Cont'd

【図 S 6】

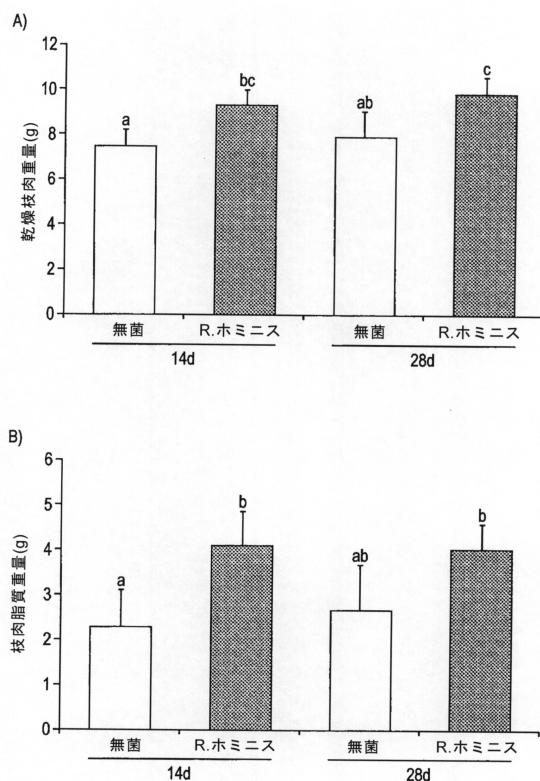


FIG. S6

【配列表】

0006641262000001.app

フロントページの続き

			F	I	
A 2 3 L	33/195	(2016.01)	A 2 3 L	33/195	
A 2 3 L	33/13	(2016.01)	A 2 3 L	33/13	
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/0784	(2010.01)	C 1 2 N	5/0784	
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	35/74	B
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48	
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 2 3 K	20/147	(2016.01)	A 6 1 P	1/14	
A 2 3 K	20/153	(2016.01)	A 2 3 K	20/147	
			A 2 3 K	20/153	

(74)代理人 100188352

弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100172797

弁理士 有馬 昌広

(72)発明者 ケリー デニス

イギリス国 エイビー 25 2ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒル ロード ライフ サイエンシズ イノベーション ビルディング ジーティー バイオロジクス エ

ルティー＝ディー＝氣付

(72)発明者 パターソン アンジェラ

イギリス国 エイビー 25 2ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒル ロード ライフ サイエンシズ イノベーション ビルディング ジーティー バイオロジクス エルティー＝ディー＝氣付

(72)発明者 モナイス エドワルド

イギリス国 エイビー 25 2ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒル ロード ライフ サイエンシズ イノベーション ビルディング ジーティー バイオロジクス エルティー＝ディー＝氣付

(72)発明者 ムルダー イムケ

イギリス国 エイビー 25 2ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒル ロード ライフ サイエンシズ イノベーション ビルディング ジーティー バイオロジクス エルティー＝ディー＝氣付

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 特表2014-534957(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)