

(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 I
<b>C O 7 K</b> 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195 Z N A
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 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)	(73) 特許権者	514079985
(86) (22) 出願日	平成26年4月10日(2014.4.10)		フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-517848 (P2016-517848A)		4 D PHARMA RESEARCH LIMITED
(43) 公表日	平成28年6月20日(2016.6.20)		イギリス国 エイビー25 2セットエス
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/051123		アバディーン コーンヒルロード ライ
(87) 国際公開番号	W02014/167338		フサイエンシーズ イノベーションビルディング
(87) 国際公開日	平成26年10月16日(2014.10.16)	(74) 代理人	100107984
審査請求日	平成29年4月7日(2017.4.7)		弁理士 廣田 雅紀
(31) 優先権主張番号	1306536.2	(74) 代理人	100102255
(32) 優先日	平成25年4月10日(2013.4.10)		弁理士 小澤 誠次
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(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ェリンを発現する、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 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ェリンが、  
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エーション、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  
バリエーション、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エーション、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；

10

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、壊死性腸炎、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与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与する細胞表面マーカーが、CD40、I - A / I - E、CD317 / B220、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与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 I 型 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、Flt3L 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 1 3】

ロゼブリア属フラジェリン、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 1 1 又は 1 2 に記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

## 【請求項 1 4】

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 1 1 ～ 1 3 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 1 5】

対象の食欲を刺激するのに使用するための、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の医薬組成物及び／又は栄養補助剤。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 1 ～ 1 5 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、T L R 5 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ェリンを発現し、前記ロゼブリア属フラジェリン、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。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

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に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

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、5 0 0 ～ 1 0 0 0 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

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., 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、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 I g A の産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、とりわけ孢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Schaefferフローラ (ASF, Altered Schaeffer 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

20

30

40

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., 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)。さらに、B. フラギリリスの Treg 増強効果が、P S A、及び T L R 2 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 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)。

#### 【 0 0 0 4 】

微生物叢組成の劇的な変化が、炎症性腸疾患 (I B D , 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 XIV a 細菌のレベルが、I B D 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, "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, 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, 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, Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis 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)。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。

#### 【 0 0 0 5 】

ロゼブリア属は、フィルミクテス門の系統発生的クラスター XIV a 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 (*Roseburia inulinivorans*) の 5 つの種が同定され、特徴付けられている (Stanton and Savage 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., 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)。ヒトの腸に定着しているこれらの細菌の正確な数

10

20

30

40

50

は、正確に推定されていないが、ロゼブリア属種が、健康なヒトの腸内で優性であり、I B D患者において過小提示される (Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis 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)。

#### 【 0 0 0 6 】

マウスの腸への定着及び適応に関与する細菌遺伝子、特にフラジェリン、並びにロゼブリア属細菌による定着に应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ロゼブリア属菌の特定のフラジェリン構造が、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T r e g 応答を指向することにおける、T L R 5 - R . ホミニスなどのT L R 5 - ロ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、G e n B a n kにおいて受託番号C P 0 0 3 0 4 0 (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(16 S rRNA遺伝子株L 1 - 8 2に対するG e n B a n k受託番号: A J 3 1 2 3 8 5)に対して、参照ゲノム配列が、G e n B a n kにおいて受託番号A B Y J 0 2 0 0 0 0 0 0 (バージョン2)で示されており、配列A B Y J 0 2 0 0 0 0 0 1 ~ A B Y J 0 2 0 0 0 4 0 9からなる。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 7 】

【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., Arijis 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

50

【非特許文献 2 0】Stanton and Savage 1983

【非特許文献 2 1】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ェリンタンパク質が、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。

【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・インテスチナリスから誘導され、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。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。

（２）ロゼブリア属フラジェリンが、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ーション、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ェ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ーション、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ーション、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。

（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。

（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細菌を含む宿主細胞であって；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細菌を含む宿主細胞。

10

( 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細菌を含む宿主細胞。

( 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細菌を含む宿主細胞。

20

( 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。

30

( 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。

40

( 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 ( I B S )、大腸炎、炎症性腸障害 ( I B D )、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、壊死性腸炎、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

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。

(16) 対象の1又は2以上の細胞におけるIL-10及び／又はTGF $\beta$ 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

(17) IL-10の産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。

(18) IL-10及び／又はTGF $\beta$ の産生を上方調節する、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。

20

(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Siglec-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に關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。

(20) 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關与する細胞表面マーカーの産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。

30

(21) CD40及び／又はI-A/I-Eの産生を上方調節する、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。

(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。

40

(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。

(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。

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。

(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

(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。

(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。

20

(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。

(31) 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。

30

(32) 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。

40

(34) 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含む飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

50

( 3 6 ) カプセル化されている、上記 ( 3 5 ) に記載の飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物。

( 3 7 ) 上記 ( 3 1 ) 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ェリン、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

( 3 8 ) 上記 ( 3 3 ) 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ェリン、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

( 3 9 ) 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。

( 4 0 ) 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、

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。

( 4 1 ) 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、

前記対象の免疫系が調節される、前記方法。

( 4 2 ) 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、

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。

( 4 3 ) 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

( 4 4 ) 対象の 1 又は 2 以上の細胞における I L - 1 0 及び / 又は T G F 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 I L - 1 0 及び / 又は T G F の産生が調節される、前記方法。

( 4 5 ) 対象の 1 又は 2 以上の細胞における C D 4 0 、 I - A / I - E 、 C D 3 1 7 / B S T - 2 、 C D 1 0 3 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 C D 8 3 及び / 又は S i g l e c - H 及び / 又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に關与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 C D 4 0 、 I - A / I - E 、 C D 3 1 7 / B S T - 2 、 C D 1 0 3 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 C D 8 3 及び / 又は S i g l e c - H 及び / 又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に關与する細胞表面マーカーの産生が調節される、前記方法。

( 4 6 ) 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、

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 I F N 遺伝子の発現が調節される、前記方法。

( 4 7 ) 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 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。

( 4 8 ) 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、

前記対象における腸内微生物叢が改善される、前記方法。

( 4 9 ) 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、

前記対象における食欲が調節される、前記方法。

( 5 0 ) 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（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、

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。

（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。

（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。

（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

10

20

30

40

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。

( 6 0 ) 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。

( 6 1 ) 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。

( 6 2 ) 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。

( 6 3 ) 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。

( 6 4 ) 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。

( 6 5 ) 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。

( 6 6 ) 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、前記対象における免疫寛容が修復される、前記方法。

( 6 7 ) 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。

( 6 8 ) 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ェリン、及び／若しく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／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ェリン、及び／若しく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／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

10

20

30

40

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。

【 0 0 1 1 】

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

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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

【 0 0 1 4 】

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

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

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

【 0 0 1 7 】

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Siglec-H及び／又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に關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・インテスチナリスなどの）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、Irf3及びIrf4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・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

10

【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・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌に関する。

20

【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）ロゼブリア属菌に関する。

30

【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）ロゼブリア属菌に関する。

40

【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）ロゼブリア属菌に関する。

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。

## 【 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）ロゼブリア属菌を含む飼料、食品、栄養補助食品、又は食品添加物に関する。

## 【 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、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ェリン、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もよい、方法に関する。

30

40

## 【 0 0 2 8 】

さらなる態様において、本発明は、本発明による栄養補助剤を製造する方法であって、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、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、前記ロゼブリア属フラジェリン、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

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もよい、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、対象の免疫系が調節される、方法に関する。

【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、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(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/又はTGF $\beta$ 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Siglec-H及び/又は同等種などの免疫応答及び抗原認識に關与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關与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、Irf3及びIrf4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、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、Irf3及びIrf4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、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。

【 0 0 3 9 】

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

【 0 0 4 0 】

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（C c k , cholecystokinin）をコードする遺伝子の発現及び／又はグルカゴン（G c g , 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（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が調節される、方法に関する。

20

【 0 0 4 1 】

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

【 0 0 4 2 】

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。

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

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・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌の使用に関する。

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

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。

【 0 0 4 7 】

20

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。

【 0 0 4 8 】

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。

30

【 0 0 4 9 】

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、ＯＡＳ１、ＯＡＳ２、ＯＡＳ３、ＯＡＳＬ、Ｉｒｆ３及びＩｒｆ４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

【 0 0 5 0 】

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、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。

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、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。

**【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、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。

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、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。

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、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

**【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、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。

**【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、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

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。

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】

20

【図1】R・ホミニスゲノムの配列及び注釈。R・ホミニスA2-183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3,592,125bp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Fla1抗体、Fla2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ブロット（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FlaA1及びFlaA2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・ホミニスとの単一連関後、マウス腸内に示差的に発現した転写物の同定。（

50

A) GF (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、GF 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 GF 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。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$ 。

【図 4】ロゼブリア・ホミニスによる、FoxP3 + Treg 細胞の誘導。R・ホミニスで 14 日間処置した従来の C3H/HeN の固有層 (対照と R・ホミニス処置との間  $P = 0.0425$ ) 及び腸間膜リンパ節 ( $P = 0.0683$ ) 中の FoxP3 + Treg 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・ホミニス単一定着によって有意に誘導される。(A) 無菌及び R・ホミニス単一定着 C3H/HeN (N = 8) 及び C57BL/6 (N = 3) マウスにおける、抗 CD3 及び抗 FoxP3 での上行結腸固有層細胞の免疫蛍光解析。(B) GF 及び R・ホミニス処置 C3H/HeN マウスの上行結腸における、(i) 抗 Ly6G、(ii) 抗 CD11b、(iii) 抗 CD3 及び (iv) 抗 CD3 と抗 FoxP3 で標識した、固有層細胞の免疫蛍光解析。GF マウス (N = 7 ~ 8) 及び R・ホミニス処置マウス (N = 8 ~ 10) における、視野あたりの陽性細胞数として表すデータ。\*  $P < 0.05$ 。本来の倍率  $\times 630$ 。

【図 6】R・ホミニスフラジェリン RH1 は、腸上皮細胞及びマウス骨髄誘導樹状細胞において特定の効果を有する。(A) 異なる細菌フラジェリン、サルモネラ・エンテリティディス (Salmonella enteritidis) (SE)、大腸菌 K12 (EC)、RH1 及び RH2 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 C3H/HeN、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、組換えフラジェリン (SE、K12、RH1、RH2、緑色) との 24 時間インキュベーション後の、CD11c + B220 + CD317 + Flt3L - 誘導樹状細胞による、(i) CD40、(ii) I-A/I-E 及び (iii) CD103 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 CD11c + B220 + CD317 + 細胞及び CD11c + CD11b + B220 - 細胞上でゲーティングした従来の C3H/HeN からの、組換えフラジェリン (SE、K12、RH1、RH2) 処置 Flt3L - 及び GM-CSF - 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  $\pm$  SEM として表したデータ。(D) サイトカイン IL-10 及び IL-12 のタンパク質発現を、C3H/HeN 及び C57BL/6 から誘導した、対照 (未刺激 DC; N = 3) 及び RH1 処置 DC (N = 3) からの上清中の、CBA によって測定した。データは、平均値  $\pm$  SD で表す。\*\*\*  $P < 0.001$ 。(E) 無菌及び R・ホミニス単一定着 TLR5 KO マウス (N = 2) 中の、上行結腸固有層細胞の、抗 CD3 及び抗 FoxP3 での免疫蛍光標識の定量解析。

20

30

【図 7】R・ホミニスは、大腸炎の実験モデルにおける炎症を弱める。22 匹の雌 C57BL/6 マウスを使用して、DSS 誘導大腸炎の間の、R・ホミニスの治療効果を査定した。処置したマウスには、14 日間、 $10^9$  CFU の R・ホミニスを毎日投与した。8 日目から、マウスに、その飲み水中 DSS を 6 日間与えた。動物を 14 日目に安楽死させ、腸組織サンプリングを実施した。(A) 未処置 DSS マウス (N = 8) は、対照マウス (N = 4) と比較して、全ての遺伝子の強力な上昇を有し、一方で、示差的な遺伝子発現は、R・ホミニス処置動物 (N = 10) にてより低かった。リアルタイム PCR 結果を、倍数変化として示した。\*\*\*  $P < 0.001$ 。(B) 該グレードにて視野の平均百分率として示した、組織病理学的組織スコアリング。DSS 処置は、グレード 0、2、3 及び 4 にて、全ての視野を有意に変えた。R・ホミニスは、グレード 4 病理に対する % 視野を有意に減少させ ( $P = 0.02$ )、グレード 0 に対して % 視野を増加させた。データを、平均値  $\pm$  SD として表す。(C) 対照、DSS 処置及び DSS/R・ホミニス処置 IL-10 KO 動物の上行結腸 (ヘマトキシリン/エオシン染色)。示した画像は、各処置群から

40

50

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、単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によって検出した、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。赤色チャン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、全ての単一定着マウス中で検出され、およそ $1 \times 10^{10}$ 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。

10

【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。

20

【図S3】大腸菌との単一連関後、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・ホミニスとの単一連関後、TLR5 KO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TLR5 KO( $N = 3$ )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TLR5 KO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TLR5 KO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TLR5 KO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。

30

【図S5】上行結腸中、28日目以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。

40

【図1A】細胞溶解後不溶性の組換えフラジェ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ェ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-

50



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/lac (ファージT7 lac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遺伝子もコードする。

【図3A】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・レクタリ(Eubacterium rectale) 33656)；RI1 (ロゼブリア・インテスチナリスFla1)；RI2 (ロゼブリア・インテスチナリスFla2)；(B) RH1 (ロゼブリア・ホミニスFla1)；RH2 (ロゼブリア・ホミニスFla2)；RI3 (ロゼブリア・インテスチナリスFla3)；RI4 (ロゼブリア・インテスチナリスFla4)。

【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、単一组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、Flt3L誘導樹状細胞の頻度、未刺激Flt3L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、FlaC、FlaG、FlaE、FlaB、MoA及びFlaG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

本明細書で使用する用語「ポリペプチド F l a A 1」は、フラジェリンタンパク質 F l 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・インテスチナリス及びロゼブリア・イヌリニボランスの F l 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、又はそのバリエーション、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。

#### 【0064】

配列番号 2 は以下の配列を有する。

MVVQHNLTA MNANRQLGITTTGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKASDNAQDGVSLIQVAEGAL  
SETHSILQRMNELATQAANDTNTTSDRTAVQQEINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGS LCGQAITIDIS  
DMSATGLGVSGLVVSSFSAAGKAMSAQAQDAISYVSSMRSKLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIRDTDMAEEMVE  
YSKNNILAQAGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ

10

#### 【0065】

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。

#### 【0066】

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

#### 【0067】

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

20

#### 【0068】

一実施形態において、ポリペプチド F l a A 1 は、配列番号 2 に、又はそのバリエーション、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。

#### 【0069】

30

一実施形態において、ポリペプチド F l 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。

#### 【0070】

F l 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 l 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 l 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・インテスチ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。

#### 【0071】

ロゼブリア・ホミニス及びロゼブリア・インテスチナリスは、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 <sup>T</sup> ロゼブリア・ホミニス A 2 - 1 8 3 <sup>T</sup> ( D S M = 1 6 8 3 9 <sup>T</sup> ) 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)、NCIMB 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・インテスチナリスの例は、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 <sup>T</sup> ( D S M = 1 4 6 1 0 <sup>T</sup> ) 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。

#### 【 0 0 7 2 】

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、フラジェリントタンパク質 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・イヌリニバランスの遺伝子 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、又はそのバリエーション、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、又はそのバリエーション、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。

#### 【 0 0 7 3 】

配列番号 1 は以下の配列を有する。

```
ATGGTAGTACAGCACAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTTAGGTATCACAAACAGGCGCACAGGCTAAGTCTTC
TGAGAAGTTATCTTCTGGTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCAGCAGGTCTTACGATTTCCGAGAAGATGAGAA
GCCAGGTTAGAGGCTTAAATAAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTGTATCCCTTATTACAGGTAGCTGAGGGTGCATTA
AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATACAACCTCAGACAG
AACTGCAGTTTCAGCAGGAGATCAACCAGTTAGCATCTGAGATCACCAGAATCGCTTCTACAACCTCAGTTCAACACAATGA
ACCTGATCGATGGTAACCTTCAACAAGTAAGAAGCTTCAGGTAGGTTCCCTTTGCGGACAGGCTATCACAATCGATATCTCT
GATATGTCTGCTACAGGTCTTGGCGTTAGCGGATTAGTAGTATCTTCCTTCTCTGCAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC
TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTTCTATGCGTTCTAAGCTGGGTGCATTACAGAACAGACTTGAGCACACAATCTCCC
ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATGGTTGAG
TACAGCAAGAACAACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTATTATC
CTTATTACAGTAA
```

#### 【 0 0 7 4 】

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。

#### 【 0 0 7 5 】

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、又はそのバリエーション、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。

#### 【 0 0 7 6 】

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、若しくはそのバリエーション、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。

#### 【 0 0 7 7 】

一実施形態において、ポリペプチド F 1 a A 1 は、切断型 F 1 a A 1 ポリペプチドである。例えば、切断型ポリペプチドは、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。

#### 【 0 0 7 8 】

理論に束縛されることを望まずに、TLR5の認識及び活性化に關与するフラジェリンタンパク質の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。

【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。

【0083】

ロゼブリア属

ロゼブリア属細菌は、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、ロゼブリア属内で、ロゼブリア・セシコラ、ロゼブリア・ファエシス、ロゼブリア・ホミニス、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)。

【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、ロゼブリア・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、ロゼブリア・ファエシスを記述する。

【0086】

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

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。

【 0 0 8 7 】

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。

【 0 0 8 8 】

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

【 0 0 8 9 】

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。

【 0 0 9 0 】

ロゼブリア属フラジェリンは、f l a A 1、f l a A 2、f l a A 3、f l a A 4又はその組合せであってもよい。

20

【 0 0 9 1 】

用語「F l a A 1」、「F l a 1」、「f l a A 1」及び「f l a 1」は、本明細書で互換的に使用される。

【 0 0 9 2 】

用語「F l a A 2」、「F l a 2」、「f l a A 2」及び「f l a 2」は、本明細書で互換的に使用される。

【 0 0 9 3 】

用語F l aは、f l a A 1、f l a A 2、f l a A 3、f l a A 4又はf l i C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

【 0 0 9 4 】

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。

【 0 0 9 5 】

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。

【 0 0 9 6 】

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。

40

【 0 0 9 7 】

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、又はそのバリエーション、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 F 1 a 1 及び F 1 a 2 である。

## 【 0 1 0 0 】

ロゼブリア・ホミニス F 1 a 1 の例は、配列番号 2 として示す。ロゼブリア・ホミニス F 1 a 1 はまた、R h F 1 a A 1、R H F 1 a A 1、R h F 1 a 1、R H F 1 a 1、R H 1、又は R h 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。

MVVQHNLTAAMNANRQLGITTTGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKASDNAQDGVSLIQVAEGAL  
SETHSILQRMNELATQAANDTNTTSDRTAVQQEINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGS LCGQAITIDIS  
DMSATGLGVSGLVVSSFSAAAGKAMSAQAQDAISYVSSMRSLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIRDTDMAEEMVE  
YSKNNILAQAGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ

## 【 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 F 1 a 2 の例は、配列番号 4 として示す。ロゼブリア・ホミニス F 1 a 2 はまた、R h F 1 a A 2、R H F 1 a A 2、R h F 1 a 2、R H F 1 a 2、R h 2、又は R H 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。

MVVNHNMAAICESRQLRYNVKKMEKSSKKLATGYKLNTANDDAAGLQISETMRHHVKGLNKASRNSQDGI SMLQTADAAL  
QETQDVLDRMVELTTQAANDINTDSDRRAIQDELQDLNKEVDRIAYTTTFNQYMLAEGTPQAAPGYRIRQSGALNGQAI  
DIHFVNASKESLGTDKVVNVSSHAKASESITMVQDAIEQAALWRDEFGSQQERLEHAVRNTDNTSQNTQSAESGIRDTNMN  
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 F 1 a 1、F 1 a 2、F 1 a 3、及び F 1 a 4 が挙げられる。

30

## 【 0 1 0 6 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1 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、R i F 1 a A 1、R I F 1 a A 1、R i F 1 a 1、R I F 1 a 1、R i 1、又は R I 1 としても引用される。

## 【 0 1 0 7 】

配列番号 6 は以下の配列を有する。

MRINYNVSAAIANKHLLGIEDNLSASMERLSSGLKINHSDNPAGMAISNKMKAQIDGLNRSQNASDGISV IQIADGAL  
SETTSILQRMRELSVQAASDATMTPADKEAIQKEITSLKDEVDRISTDTEYNSKTL DGS LDTRVYTKNATRVDISDHVK  
AGQYQLSIDTAATQAGPVTANQNYNSTAPVGASGTMSINGSKVEIEAADTYAEAFEKIRNA AETGETTVKIEKNGALSFT  
AEQYGMSSILEIAFDDKQLANALGFTADGGNSVVEDPENKGSYVYQGQIQNGKVI VPSGTDAEVTLT KPSDGTGFGDTATV  
KTDGNKIVTDRAGFEMSFLADAGYTGKLD FVD TIDGTMALHIGANEDQETRVR IPEVSCKSLYIDDA DVTTVNGAGRG I  
TQFDDAISKVSEVRSLGAYQNRLESTVSSLDTFEENMTGAQSRLTDADMASEMTDYTHQNVLNQAAISVLTQANDLPQ

40

## 【 0 1 0 8 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 の例は、配列番号 8 に示す。ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 は本明細書でまた、R i F 1 a A 2 又は R I F 1 a A 2 又は R i 2 又は R I 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。

50

MVVNHNMALCESRQLRCNVKNMEKSSKKLATGYKLLGANDDAAGLQISETMRHQTRGLNKASRNSQDGI SMLQTADAAL  
QETQEVLD RMTDLTTQAANDINTDADRRAIQDEIDQLNQEVDR IAYTTNFNQYI LADGTPQARPGYYMIQTGSLAGQG I  
EIKFVNASKESLGVDKVDVSSHAKATESIAVVQNAIEKAASFRDRTFGAQERLEHALRGTDNTSESTQRAESSRRDTNMN  
MEMVQYSTNRILVQASQSI LAQYNDDAKYVLEMLKQVLQILQ

【0110】

ロゼブリア・インテスチナリス F1a3 の例は、配列番号 10 に示す。ロゼブリア・インテスチナリス F1a3 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。

【0111】

配列番号 10 は以下の配列を有する。

10

MVVQHNMAMNANRMLGVTTSAQAKSSEKLSSGYRINRAGDDAAGLTISEKMRSQIRGLNKASDNAQDGI SLIQVAEGAL  
SETHSILQRMNELATQAANDTNTTADRGAIQDEINQLTSEINRISSTTQFNTQNLIDGTFANKNLQVGSICGQRITVSI D  
SMSAGSLNVSANLVKVNFTSAAGEAMSNIQGAISAISTQRSYLGALQNRLEHTISNLDNISENTQSAESRIRDTDMAEEM  
VTYSKNNILAQAQGSMLAQANQSTQGVLSLLQ

【0112】

ロゼブリア・インテスチナリス F1a4 の例は、配列番号 12 に示す。ロゼブリア・インテスチナリス F1a4 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。

【0113】

配列番号 12 は以下の配列を有する。

20

MAMVVQHNMMSAMNANRNLGVTTGMQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLSISEKMRSQIRGLNKASDNAQDGI SLIQTAEG  
ALNESHSLQRMRELSVQAANGTETDDREAVQNEVSQLQEELTRISSETTEFNTMKLLDGSQSGSTSSTGSGPKFGVVDA  
TLDGALVTSNVKGIKVATAAATTTKAGQETAIWAADGKTLTLNLSKNKVYTQDEIDDLIANAKQEDSSATGAPAEVKVSL  
KNGIFNADADTTAGTVTAGGVKAVSDEGTVTGFGVADTISFTANKYGAEFNDTVFKFKFDKAAGKEEVETNTAIEIDGAN  
AVTAGEYTIHLAAGKEYTAEDLEDVLKTAGFDVFKLSGNTPEPNTLFATSGASTVTDITMGAGTAGAGLGSTDAMWQQ  
AGYDSVSSGAGITLQIGANEGQTMFSFISDDMSARALGVDGNKVDLSTQAGAQAQKATDTIDAAIKKVSAGRGRMGAIQNRLE  
HTISNLDTAENTQTAESRIRDTDMAEEMVEYSKNNILAQAQGSMLAQANQSTQGVLSLLQ

【0114】

用語「ポリペプチド F1aA1」、「F1aA1 ポリペプチド」、「ポリペプチド F1a1」及び「F1a1 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 F1a2」及び「F1a2 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 F1a3」及び「F1a3 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 F1a4」及び「F1a4 ポリペプチド」は本明細書で互換的に使用される。

30

【0115】

一態様において、ロゼブリア属フラジェリンは、F1a1、F1a2、F1a3 及び F1a4 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、F1a2、F1a1、F1a4 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 F1a2 である。

【0116】

40

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 F1a1、ロゼブリア・ホミニス F1a2、ロゼブリア・インテスチナリス F1a1、ロゼブリア・インテスチナリス F1a2、ロゼブリア・インテスチナリス F1a3、ロゼブリア・インテスチナリス F1a4 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 F1a2、ロゼブリア・インテスチナリス F1a2、ロゼブリア・インテスチナリス F1a1、ロゼブリア・インテスチナリス F1a4、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 F1a2、ロゼブリア・インテスチナリス F1a2 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 F1a2 である。

50

## 【 0 1 1 7 】

一実施形態において、本発明は、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ェ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。

## 【 0 1 1 8 】

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ェ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

10

## 【 0 1 1 9 】

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、F l a A 1、F l a A 2、f l a 3、f l a 4又はその組合せをコードしてもよい。

## 【 0 1 2 0 】

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ェリンをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

## 【 0 1 2 1 】

一実施形態において、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・ラジェリンの組合せをコードする。

20

## 【 0 1 2 2 】

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ェリンと、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の組合せの使用を包含する。

## 【 0 1 2 3 】

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、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ェリンをコードする。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ェリンをコードする。

30

## 【 0 1 2 4 】

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、又はそのバリエーション、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、又はそのバリエーション、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

## 【 0 1 2 5 】

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、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。

## 【 0 1 2 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、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



## 【 0 1 2 7 】

ロゼブリア・ホミニスのフラジェ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 F 1 a 1 及び F 1 a 2 をコードしているポリヌクレオチド配列である。

## 【 0 1 2 8 】

ロゼブリア・ホミニス F 1 a 1 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。

## 【 0 1 2 9 】

配列番号 1 は以下の配列を有する。

ATGGTAGTACAGCACAAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTTAGGTATCACAAACAGGCGCACAGGCTAAGTCTTC  
TGAGAAGTTATCTTCTGTTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCAGCAGGTCTTACGATTTCCGAGAAGATGAGAA  
GCCAGGTTAGAGGCTTAAATAAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTGTATCCCTTATTTCAGGTAGCTGAGGGTGCATTA  
AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATACAACCTCAGACAG  
AACTGCAGTTTCAGCAGGAGATCAACCAGTTAGCATCTGAGATCACCAGAATCGCTTCTACAACCTCAGTTCAACACAATGA  
ACCTGATCGATGGTAACCTTCAAGTAAGAAGCTTCAGGTAGGTTCCCTTTGCGGACAGGCTATCACAATCGATATCTCT  
GATATGTCTGCTACAGGTCTTGCGGTTAGCGGATTAGTAGTATCTTCTCTCTGCGAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC  
TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTTCTATGCGTTCTAAGCTGGGTGCATTACAGAACAGACTTGAGCACACAATCTCCC  
ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATGGTTGAG  
TACAGCAAGAACAACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTATTATC  
CTTATTACAGTAA

10

## 【 0 1 3 0 】

ロゼブリア・ホミニス 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 3 として示す。

## 【 0 1 3 1 】

配列番号 3 は以下の配列を有する。

ATGGTGGTTAATCATAATATGGCGGCAATCTGTGAGAGCAGGCAGCTGCGCTATAACGTGAAGAAGATGGAAAAATCTTC  
CAAAAAGCTTGCAGCAGGGTACAAGCTGAACACAGCAAATGATGATGCGGCAGGCTTGCAGATATCAGAGACGATGCGGC  
ATCATGTGAAAGGGCTGAACAAAGCCTCCCGGAATTCACAGGACGGCATCAGTATGCTGCAGACGGCGGATGCAGCGCTC  
CAAGAGACGCAGGATGTTCTCGATCGTATGGTGGAGCTGACGACGCAGGCAGCCAATGACATCAACACAGACTCGGATCG  
CAGGGCTATTTCAGGATGAGTTGGATCAGCTGAACAAGGAAGTGACCGCATCGCTATACGACGCACTTCAATCAGCAGT  
ATATGTTGGCGGAGGGAACGCCGAGGCGGCACCGGGATATTACCGCATACAGTCCGGGGCACTGAACGGACAGGCGATA  
GATATCCATTTTGTAAATGCGAGCAAGGAGAGCCTTGGCACAGACAAAGTGAATGTATCTTCGCATGCGAAGGCGTCGGA  
ATCCATCACGATGGTTTCAGGACGCGATTGAACAGGCGGCGCTCTGGAGAGACGAGTTCCGGCAGCCAGCAGGAGCGTCTGG  
AACATGCCGTGCGCAATACGGACAACACATCACAAAATACGCAGAGTGCGGAGTCAGGGATCAGAGACACCAACATGAAT  
ATGGAGATGGTATTATATTCGACCAACCGGATTCTGGTGCATGCATCCAGAGTATTCTGGCACAGTATAATGATGATGC  
AAAATCAGTGCTTGAGATTTTGAATAG

30

## 【 0 1 3 2 】

ロゼブリア・インテスチナリスのフラジェ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 F 1 a 1、F 1 a 2、F 1 a 3 及び F 1 a 4 をコードするポリヌクレオチド配列である。

## 【 0 1 3 3 】

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1 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。

## 【 0 1 3 4 】

配列番号 5 は以下の配列を有する。

ATGCGTGGCGGAGACAATAGAAGGAGAAACAGAATGAGAATTAATTACAATGTGTCAGCAGCGATTGCGAATAAACATTT  
ACTTGAATTTGAGGATAATTTAAGTGCATCGATGGAACGGCTTTCATCGGGACTTAAGATCAACCATTTCAAGGACAATC  
CGGCAGGAATGGCTATTTCCAACAAGATGAAAGCACAGATTGATGGTTTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATCGGATGGT  
ATTTCTGTTATTTCAGATCGCAGATGGTGCCTGAGTGAACGACCAAGTATTTTACAGCGTATGAGAGAATTTCCGTGCA  
GGCAGCGAGTGATGCAACAATGACACCGGCGGATAAAGAAGCAATCCAGAAAGAAATCACTTCATTAAGAGATGAAGTTG  
ACCGTATTTCTACAGATACAGAGTATAACAGCAAAACACTTTTAGATGGTTTCATTAGATACCAGGGTTTACACCAAAAAT

50

GCAACAAGAGTGGACATTTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTTCCATTGATACTGCAGCTACACAGGCCGG  
ACCGGTAACAGCAAATCAGAATTATAATTCCACAGCACCGGTCCGTGCGTCCGGAACAATGAGTATTAATGGTTCTAAAG  
TAGAGATAGAGGCAGCCGACACCTATGCGGAGGCTTTTGAGAAGATCAGAAATGCAGCAGAGACTGGTGAACAACCGTT  
AAGATTGAAAAAAGATGGAGCACTTTTCATTTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATCTTAGAGATCGCATNNNGAT  
GATAAGCAGCTTGCTAATGCACTTGATTTACAGCAGACGGAGGAAACAGTGTGTAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAG  
CTATGTATACGGACAGATTGAGAATGGCAAAGTGATCGTACCTTCCGGTACAGATGCCGAAGTAACGCTCACAAAACCGA  
GTGATGGAACCGGATTTGGTGATACAGCTACGGTAAAAACAGATGGAATAAGATTACGGTTACAGACAGAGCCGGATTT  
GAGATGTCATTTCTTGCTGATGCAGGTTATACGGGTAAGCTGGATTTTGATGTCACGGATATCGGAACGATGGCACTTCA  
TATTGGAGCAAATGAGGATCAGGAAACAAGAGTGCCTATTCGGGAGGTTTCTGCAAGAGCCTTTACATTGATGATGCAG  
ACGTGACGACTGTAAATGGAGCAGGCAGAGGTATCACACAGTTTGACGATGCCATTTCAAAGGTCAGTGAAGTGCCTTCA  
AGACTTGGTGATACAGAAATCGTCTTGAGAGTACGGTATCAAGCCTGGATACGTTTGAAGAAAATATGACAGGAGCCCA  
GTCACGACTGACAGATGCGGATATGGCATCGGAAATGACAGATTATACACATCAGAATGTATTAATCAGGCAGCAATCT  
CTGTTTTGACACAGGCAAACGATCTGCCACAGCAGGTATTGCAGATTCTGCAGTAA

【 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。

ATGGTAGTTAATCATAATATGGCATTGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTGAAGAACATGGAGAAGTCTTC  
AAAAAAGCTGGCAACAGGTTATAAATTGCTTGAGCAAATGATGATGCAGCAGGATTACAGATATCAGAAACCATGCGTC  
ATCAGACCAGAGGTCTTAACAAAGCATCCAGAAATTCGCAAGATGGAATTAGTATGCTGCAGACAGCAGATGCAGCATT  
CAGGAGACACAGGAAGTGTTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGCAGCTAATGATATCAATACGGATGCGGATCG  
TCGTGCAATTCAGGATGAAATCGATCAGTTAAATCAGGAAGTGATCGTATTGCATATACGACGAATTTTAATCAGCAGT  
ATATATTAGCGGATGGAACCTCCGACGGCAAGACCAGGATACTATATGATACAGACAGGAAGTCTTGCGGGACAGGGAATA  
GAGATTAAGTTTGTTAATGCGAGCAAAGAGAGCTTGGGTGTGGACAAGGTTGATGTATCATCGCATGAAAAGCGACAGA  
ATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAAGGCAGCTTCGTTTAGAGATACATTTGGGGCACAACAGGAGCGGTTAG  
AACACGCATTGCGTGGAACGGATAATACATCAGAAAGTACACAGAGGGCAGAAATCAAGTAGACGCGATACCAACATGAAT  
ATGGAGATGGTACAATATTCTACAAACCGTATTTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTTAGCACAGTACAATGATGATGC  
AAAATATGTGTTGGAATGTTAAATAG

【 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。

ATGGTAGTACAGCACAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGGCGTTACAACAAGCGCACAGGCCAAAATCTTC  
AGAGAAATTATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGCAGGTGATGACGCTGCTGTTTAAACAATTTCTGAGAAGATGAGAA  
GCCAGATCCGTGGATTAAACAAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTATTTCTTAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCATTA  
TCTGAGACACATTCTATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGATACCAATACAACCTGCTGATAG  
AGGAGCTATTCAGGATGAGATCAACCAGTTAACATCTGAGATTAACAGAATCTCTTCTACAACCTCAGTTCAATACTCAGA  
ACCTCATCGATGGTACATTCGCAAATAAAAAACCTTCAGGTTGGTTCTATCTGTGGACAGAGAATTACTGTTTCTATCGAC  
AGTATGTCTGCTGGTAGCTTAAATGTATCTGCTAACTTAGTAAAGGTTAACACTTTTCAGTGCAGCAGGTGAAGCAATGTC  
CAATATTCAGGGTGTCTATTTCTGCAATTTCTACACAGCGTTCTTACTTAGGAGCTTTCAGAATCGTCTGGAGCATACAA  
TCTCCAACCTTGACAACATTTCTGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATG  
GTTACTTACAGCAAGAACAATATTCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCTAACCACTACTCAGGGTGT  
ACTTTCTCTGTTACAGTAA

【 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。

ATGGCAATGGTAGTACAGCACAACATGTCCGCAATGAATGCGAACAGAAATTTAGGTGTTACAACAGGAATGCAGGCAAA  
 ATCATCAGAGAAGTTATCTTCCGGTTACAAGATCAACCGTGCAGCAGATGATGCAGCAGGACTTTCTATTTCTGAGAAGA  
 TGAGAAGCCAGATCCGCGGTTTAAATAAAGCATCTGACAATGCACAGGATGGTATCTCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA  
 GCATTAATGAGTCCCACTCTATTTTACAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGGCAGCCAACGGTACAGAGACAGATGA  
 CGACCGCGAGGCGAGTACAGAACGAGGTTTCCAGTTACAGGAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAACAGAGTTCAACA  
 CGATGAAGCTGCTGGATGGTTCTCAGAGTGGAAGTACATCTTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA  
 ACATTAGACGGTGCACCTTGTAACTCTAACGTGAAAGGTATTAAGTAGCAACAGCAGCTGCCACAACAACAAAGGCAGG  
 TCAGGAGACTGCTATCTGGGCTGCTGATGGAAGACATTAACCTTTAAATCTTTGAAAAATAAGGTATATACACAGGACG  
 AAATTGATGACTTGATCGCAAATGCAAAACAGGAAGACAGTTCTGCAACGGGTGCACCGGCTGAAGTGAAAGTATCTTTA  
 AAGAATGGTATTTTTAATGCAGATGCAGACACAACCTGCCGGAAGTGAACAGCCGGTGGTGTGAAGGCAGTATCTGATGA  
 AGGAACAGTAAGTGGATTTGTTGGTGCGATACAATTTTACGTCGCAAAATAAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATACTG  
 TATTTAAATTCAAATTTGATAAGGCAGCAGGCAAAGAAGTAGAGACAAATACAGCAATTGAAATTGATGGAGCAAAT  
 GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGCAGCAGGCAAAGAATATACGGCAGAAGATTTAGAAGATGTTCTTAA  
 AACGGCAGGATTCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGGAATACACCAGATGAGCCAAATACTTTATTTGCAACCAGTGGCG  
 CATCAACTGTGACTGATATTACAATGGGTGCTGGCACC GCCGAGCTGGTCTTGGAAGTACAGATGCTATGTGGGGGCAA  
 GCTGGTTATGACAGTTATCTTCTGGTCTGGCATTACCTTGACAGATTGGTGCAAATGAAGGTGACACCATGAGTTTCTCT  
 ATCGATGACATGAGTGCAAGAGCACTTGGCGTAGATGGCAACAAAGTTGATTTAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGC  
 AACTGATACCATGATGCAGCAATCAAGAAAGTATCTGCACAGCGTGGTAGAATGGGTGCGATCCAGAACCGTCTGGAGC  
 ACACCATCAGCAACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGACTGCAGAGTCCCGTATCCGTGATACAGATATGGCAGAA  
 GAGATGGTTGAGTACTCCAAGAACAACATTCTTGACAGGCAGGTCAGTCTATGCTTGACAGGCGAACCAAGTCTACACA  
 GGGTGTACTCTCCTTATTACAGTAA

10

20

#### 【 0 1 4 1 】

一態様において、ポリヌクレオチド配列は、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、ロゼブリア属フラジェリンをコードする。一実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、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ロゼブリア属フラジェリンをコードする。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ェリン F 1 a 2 をコードする。

#### 【 0 1 4 2 】

一態様において、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、ロゼブリア・ホミニス F 1 a 1 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 F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 3 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 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ェ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 F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 1 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 4 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ェ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 F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 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ェリンをコードするポリヌクレオチド配列は、ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a 2 をコードするポリヌクレオチド配列である。

30

40

#### 【 0 1 4 3 】

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

#### 【 0 1 4 4 】

一実施形態において、ロゼブリア属フラジェリンは、切断型ロゼブリア属フラジェリンである。例えば、切断型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

50

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。

【0145】

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。

【0146】

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 F1aA1、F1a2、F1a3 又は F1a4 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

【0147】

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 F1aA1 又は F1a3 をコードする。

【0148】

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。

【0149】

20

【表 1】

表A-本明細書で記述したロゼブリア属フラジェリン配列と、それらを誘導しうる細菌株の要約

細菌及び株	略語	ヌクレオチド配列番号	ヌクレオチド配列	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(flal)	RhFlaA1 又は RhFlaA1 又は RhFlaA1 又は Rh1 又は RH1	配列番号1	ATGGTAGTACAGCACAATCTTACA GCAATGAACGCTAACACACAGTTA GGTATCACACAGCGCGCAGGCT AAGCTTCTGAGAAGTTATCTCTG GTTACAAGATCAACCGCGCAGCAG ATGACGCGCAGGCTTACGATTT CCGAGAAGATGAGAACCCAGGTTA GAGGCTTAATAAAGCTTCTGACA ACGCACAGGATGGTGATCCCTTA TTCAGGTAGCTGAGGTGCATTAA GTGAGACACACTCCATCTTACAGC GTATGAATGAGTTAGCAACTCAGG CAGCAACGATACCAATACAACTT CAGACAGAACTGCAGTTCAGCAGG AGATCAACCCAGTTAGCATCTGAGA TCACCAGAAATCGCTTCTACAACTC AGTTCAACACAATGAACCTGATCG ATGGTAACCTTACACAAGTAAGAAC TTCAGGTAGGTTCCCTTTGCGGAC AGGCTATCACAAATCGATATCTCTG ATATGCTCTACAGGCTCTTGCGG TTAGCGGATTAGTAGTATCTTCCCTT CTCGACAGCTGGTAAGGCAATGTC TGCAGCTCAGGATGCTATCAGCTA CGTATCTTCTATGCGTTCTAAGCTG GGTGCAATTACAGAACAGACTTGAG CACACAATCTCCACCTGGACAAC ATTTCTGAGCACACATCTTCTGCA GAGTCTCGTATCCGTGATACAGAT ATGGCTGAAGAGATGGTTGAGTAC	配列番号2	MVVQHNLTAMNANRQLGIT TGAQAKSSEKLSGGYKINRA ADDAAGLTISEKMRSQVRGL NKAASDNAQDGVSLIQVAEG ALSETHSILQRMNELATQAA NDTNTTSDRTAVQQEINQLA SEITRIASSTTQFNTMNLIDGN FTSKKLQVGSCLCGQAITIDIS DMSATGLGVSGLVVSSFSA AGKAMSAQAQDAISYVSSMR SKLGALQNRLEHTISHLDNIS EHTSSAESRIRDTDMAEEM VEYSKNNILAQAGQSMMLAQ ANQSTQGVLSLLQ

10

20

30

40

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	配列番号3	AGCAAGAAACAACATCCTTGCTCAG GCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAG GCTAACCAAGTCTACTCAGGGTGTA TTATCCTTATTACAGTAA ATGGTGGTTAATCATATAATATGGCG GCAATCTGTGAGAGCAGGCAGCT GCGCTATAACGTGAAGAAGATGGA AAAATCTTCCAAAAAGCTTGGCAG AGGGTACAAGCTGAACACAGCAAA TGATGATGCGGAGGCTTGCGAGAT ATCAGAGACGATGCGGCATCATGT GAAAGGGCTGAACAAAGCCTCCC GGAATTCACAGGACGGCATCAGTA TGCTGCAGACGCGGATGCAGCG CTCCAAGAGACGCGGATGTTCTC GATCGTATGGTGAGCTGACGAC GCAGGCAGCCAATGACATCAACAC AGACTCGGATCGCAGGGCTATTCA GGATGAGTTGGATCAGCTGAACAA GGAAGTGGACCGCATCGCCTATAC GACGCACCTTCAATCAGCAGTATAT GTTGGCGGAGGGAACGCCGACAGG CGCACCGGATATTACCGCATAC AGTCCGGGGCACTGAACGGACAG GCGATAGATATCCATTTTGTAATG CGAGCAAGGAGAGCCTTGGCACA GACAAAGTGAATGTATCTTCGCAT GCGAAGGCGTCGGAATCCATCAC GATGTTTCAGGACGCGATTGAACA GGCGGCGCTCTGGAGAGACGAGT TCGGCAGCCAGCAGGAGCGTCTG GAACATGCCGTGCGCAATACGGAC AACACATCACAAAATACGCAGAGT GCGGAGTCAGGGATCAGAGACAC CAACATGAATATGGAGATGGTATT	配列番号4	MVVNHNMAAICESRQLRYN VKKMEKSSKKLATGYKLNTA NDDAAGLQISETMRHHVKG LNKASRNSQDGISMLQTAD AALQETQDVLDRMVELTTQ AANDINTSDRRRAIQDELQ LNKEVDRIAAYTTHFNQQYML AEGTPQAAPGYRIQSGAL NGQAIDIHFNASKESLGT KVNVS SHAKASESITMVQDA IEQAALWRDEFSGSQRERLE HAVRNTDNTSQNTQSAESG IRDTNMNMVLYSTNRILV HASQSILAQYNDDAKSVLEIL K
----------------------------	---	-------	--	-------	--

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Ri1	配列番号5		<p>ATATTCGACCAACCGGATTCTGGT GCATGCATCCAGAGTATTCTGGC ACAGTATAATGATGATGCAAAATCA GTGCTTGAGATTTTGAATAG</p> <p>ATGCGTGCGGAGACAATAGAAG GAGAAACAGAAATGAGAAATTAATTA CAATGTGTCAGCAGCGATTGCGAA TAAACATTTACTTTGGAATTGAGGAT AATTTAAGTGCATCGATGGAACGG CTTTCATCGGGACTTAAGATCAAC CATTCCAAGGACAATCCGGCAGGA ATGGCTATTTCCAACAAGATGAAA GCACAGATTGATGGTTAAACCGG GCTTCCCAGAAATGCATCGGATGGT ATTTCTGTTATTTCAGATCGCAGATG GTGCGCTGAGTGAAAACGACCAGTA TTTTACAGCGTATGAGAGAACTTTC CGTGACGCGAGCGAGTGATGCAA CAATGCACCGCGCGGATAAAGAAG CAATCCAGAAAGAAATCACTTCATT AAAAGATGAAGTTGACCGTATTTCT ACAGATACAGAGTATAACAGCAA ACACTTTTAGATGGTTCTTAGATA CCAGGGTTTACACCAAAAATGCAA CAAGAGTGGACATTTCTGATCATG TGAAGCAGGACAGTATCAGCTTT CCATTGATACTGCAGCTACACAGG CCGGACCGGTAAACAGCAAAATCAGA ATTATAATTCCACAGCACCGGTCG GTGCGTCCGGAACAATGAGTATTA ATGGTTCTAAAGTAGAGATAGAGG CAGCCGACACCTATGCGGAGGCTT TTGAGAAGATCAGAAATGCAGCAG AGACTGGTGAACAACCGTTAAGA TTGAAAAGAAATGGAGCACITTCATT</p>	配列番号6		<p>MRINYVSAIAIANKHLLGIED NLSASMERLSSGLKINHSD NPAGMAISNMKAQIDGLNR ASQNASDGISVIQIADGALSE TTSILQRMRELSVQAASDAT MTPADKEAIQKEITSLKDEV DRISTDTEYNSKTLLDGS LD TRVYTKNATRVDISDHVKAG QYQLSIDTAATQAGPVTANQ NYNSTAPV GASGTMSINGS KVEIEAADTYAEAFEKIRNAA ETGETTVKIEKNGALSFTAE QYGMSSILEIAFDDKQLANA LGFTADGGNSVVEDPENKG SYVYQIQNGKVIVPSGTDA EVLTKPSDGTGFGDTATVK TDGNKITVTD RAGFEMSFLA DAGYTGKLD FVDTDIGTMAL HIGANEDQETRVRIPEVSCK SLYIDDADVTTVNGAGRGIT QFDDAISKVSEVRSRLGAYQ NRLESTVSSLDTFEENMTGA QSRLTDADMASEMTDYTHQ NVLNQAAISVLTQANDLPQ</p>
-----------------------------------	--	-------	--	--	-------	--	---

10

20

30

40

ロゼブリア・イン テスチナリスL1-	RiFla2 又は RiFla2 又は	配列番号7	<p>TACCGCAGAACAGTACGGAATGTC AAGCATCTTAGAGATCGCATTNNT GATGATAAGCAGCTTGCTAATGCA CTTGGATTTACAGCAGACGGAGGA AACAGTGTGTAGAAAGATCCAGAG AATAAAGGCAGCTATGTATACGGA CAGATTCAGAATGGCAAAGTGATC GTACCTTCGGTACAGATGCCGAA GTAAACGCTCACAAACCGAGTGAT GGAACCGGATTTGGTGATACAGCT ACGGTAAACACAGATGGAATAAG ATTACGGTTACAGACAGAGCCGGA TTTGAGATGTCATTTCTTGCTGATG CAGGTTATACGGTAAAGCTGGATT TTGATGTCACGGGATATCGGAACGA TGGCACTTCATATTGGAGCAAATG AGGATCAGGAAACAAGAGTGCGTA TTCCGGAGGTTTCTGCAAGAGCC TTTACATTGATGATGCAGACGTGA CGACTGTAATGGAGCAGGCAGA GGTATCACACAGTTTGACGATGCC ATTTCAAAGTCAAGTGAAGTGCGT TCAAGACTTGGTGATACCAAGAT CGTCTTGAGAGTACGGTATCAAGC CTGGATACGTTTGAAGAAAATATG ACAGGAGCCCAAGTACGACTGACA GATGCGGATATGGCATCGGAAATG ACAGATTATACACATCAGAATGTAT TAAATCAGGCAGCAATCTCTGTTTT GACACAGGCAACGATCTGCCACA GCAGGTATTGCAGATTCTGCAGTA A</p>	配列番号8	<p>MVVNHNMALICESRQLRCN VKNMEKSSKKLATGYKLLGA NDDAAGLQISETMRHQTRG</p>
-----------------------	------------------------	-------	--	-------	---

10

20

30

40



82(fla2)	Ri2又はRi2	AGTCTTCAAAAAAGCTGGCAACAG GTTATAAATTGCTTGGAGCAAAATGA TGATGCAGCAGGATTACAGATATC AGAAACCATGCGTCATCAGACCAG AGGCTTAAACAAAGCATCCAGAAA TTCGCAAGATGGAATTAGTAGTCT GCAGACAGCAGATGCAGCATTACA GGAGACACAGGAAGTGTGGATC GAATGACGGATCTGACAACACAGG CAGCTAATGATATCAATACGGATG CGGATCGTCGTGCAATTCAGGATG AAATCGATCAGTTAAATCAGGAAG TGGATCGTATTGCATATACGACGA ATTTAATCAGCAGTATATATTAGC GGATGGAACCTCGCAGGCAAGAC CAGGATACTATATGATACAGACAG GAAGTCTTGCAGGACAGGGAATA GAGATTAAGTTTGTAAATGCGAGC AAAGAGAGCTTGGGTGTGGACAAAG GTTGATGATCATCGCATGCAAAA GCGACAGAACTCTATAGCAGTGGTA CAGAAATGCAATTGAAAAGGCAGCT TCGTTTAGAGATACATTTGGGGCA CAACAGGAGCGGTTAGAACACGCA TTGCGTGGAAACGGATAATACATCA GAAAGTACACAGAGGGCAGAAATCA AGTAGACGCGATACCAACATGAAT ATGGAGATGGTACAAATATTCTACAA ACCGTATTTAGTACAGGCATCTCA GAGTATTTTAGCACAGTACAATGAT GATGCAAAATATGTGTTGGAATG TTAAATAG	LNKASRNSQDGISMLQTAD AALQETQEVLDRTMTDLTTQ AANDINTDADRRAIQDEIDQL NQEVDRIAYTTNFNQYILA DGTPQARPGYYMIQTGSLA GGGIEIKFVNASKESLGVDK VDVSSHAKATESIAVVQNAI EKAASFRDTFGAQQERLEH ALRGTDNTSESTQRAESSR RDTNMNMEMVQYSTNRILV QASQSILAQYNDDAKYVLEM LKQVLQILQ
ロゼブリア・イン テスチナリスL1-	RiFla3又は RiFla3又は	ATGGTAGTACAGCACAAATATGACC GCAATGAATGCGAACAGAAATGTTA GGCGTTACAACAAGCGCACAGGC	MVVQHNMTAMNANRMLGV TTSAQAKSSEKLSGGYRINR AGDDAAGLTISEKMRSQIRG
		配列番号9	配列番号10

10

20

30

40

82(fla3)	Ri3又はRi3		AAAATCTTCAGAGAAATTATCTTCT GGTTACAGAAATCAACCGTGCAGGT GATGACGCTGCTGGTTTAACAATT TCTGAGAAAGATGAGAAAGCCAGATC CGTGGATTAAACAAGCTTCTGAC AACGCACAGGATGGTATTTCCCTTA ATCCAGGTTGCTGAGGGTGCAATTA TCTGAGACACATTCTATCTTACAGC GTATGAATGAGTTAGCTACTCAGG CTGCTAACGATACCAATACAACCTG CTGATAGAGGAGCTATTACAGGATG AGATCAACCAGTTAACATCTGAGA TTAACAGAACTCTTCTACAACTCA GTTCAATACTCAGAACCTCATCGAT GGTACATTGCAATAAATAAACCTTC AGGTTGGTTCTATCTGTGGACAGA GAATTACTGTTTCTATCGACAGTAT GTCTGCTGGTAGCTTAATGTATCT GCTAACTTAGTAAGGTTAACACTT TCAGTGCAGCAGGTGAAGCAATGT CCAATATTCAGGGTGCTATTTCTG CAATTTCTACACAGCGTTCTTACTT AGGAGCTCTTCAGAAATCGTCTGGA GCATACAATCTCCAACCTTGGACAA CATTCTGAGAAATACICAGTCTGCT GAATCTCGTATCCGTGATACAGAT ATGGCTGAAGAGATGGTTACTTAC AGCAAGAACAAATATTTCTTGCTCAG GCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAG GCTAACCCAGTCTACTCAGGGTGTA CTTTCTCTGTTACAGTAA		LNKASDNAQDGLISLIQVAEG ALSETHSILQRMNELATQAA NDTNTTADRGAIQDEINQLT SEINRISSTTQFNTQNLIDGT FANKNLQVGSICGQRITVSID SMSAGSLNVSANLVKVNTF SAAGEAMSNIIQGAISAISTQ RSYLGALQNRLEHTISNLDNI SENTQSAESRIRDTDMAEE MVTYSKNNILAQAGQSMILA QANQSTQGVLSLLQ
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	配列番号11	ATGGCAATGGTAGTACAGCACAAAC ATGTCCGCAATGAATGCGAACAGA AATTTAGGTGTTACAAACAGGAATG CAGGCAAAATCATCAGAGAAAGTTA	配列番号12	MAMVVQHNM SAMNANRNL GVTTGMQAKSSEKLSGGYKI NRAADDAAGLSISEKMRSQI RGLNKASDNAQDGLISLIQTA

10

20

30

40

			<p>             TCTTCCGGTTACAAGATCAACCGT              GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTT              TCTATTTCTGAGAAAGATGAGAAAGC              CAGATCCGCGGTTTAAATAAAGCA              TCTGACAAATGCACAGGATGATATC              TCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA              GCATTAAATGAGTCCCACTCTATTT              TACAGAGAATGAGAGAGTTATCCG              TACAGGCAGCCAAACGGTACAGAGA              CAGATGACGACCGCGAGGCAGTA              CAGAACGAGGTTTCCCACTTACAG              GAAGAGCTGACAAGAAATTTCTGAG              ACAACAGAGTTCACACGATGAAG              CTGCTGATGTTCTCAGAGTGGA              AGTACATCTTCAACCGGTCAGGT              CCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA              ACATTAGACGGTGACCTTGTAAACA              TCTAACGTGAAAGGTATTAAAGTA              GCAACAGCAGCTGCCACAAACA              AAGGCAGGTCAGGAGACTGCTATC              TGGGCTGCTGATGGAAGACATTA              ACTTTAAATCTTTCGAAAAATAAGG              TATATACACAGGACGAAATTTGATG              ACTTGATCGCAAAATGCAAAACAGG              AAGACAGTTCTGCAACGGGTGCAC              CGGCTGAAGTGAAAGTATCTTTAA              AGAATGGTATTTTAAATGCAGATGC              AGACACAACTGCCGGAACGTGAAC              AGCCGGTGGTGTGAAGGCAGTAT              CTGATGAAGGAACAGTAACTGGAT              TTGTTGGTGCAGATACAAATTTTATT              TACGGCAATAAGTATGGAGCAGA              GTTCAATGATACTGTATTTAAATTC              AAATTTGATAAGGCAGCAGGCAAA              GAAGAAGTAGAGACAAATACAGCA           </p>		<p>             EGALNESHILQRMRELSVQ              AANGTETDDREAVQNEVS              QLQEELTRISSETTEFNTMKLL              DGSQSGSTSSSTSGSPKFGV              VDATLDGALVTSNVKGIKVA              TAAATTTKAGQETAIWAADG              KTLTLNLSKNKYVTQDEIDDL              IANAKQEDSSATGAPAEVKV              SLKNGIFNADADTTAGTVTA              GGKAVSDEGTVTGFVGAD              TISFTANKYGAEFNDTVFKF              KFDKAAGKEEVEETNTAIEID              GANAVTAGETIHLAAGKEY              TAEDLEDVLKTAGDFDFVKL              SGNTPDEPNTLFTSGASTV              TDITMGAGTAGAGLGSTDA              MWGQAGYDSVSSGAGITLQ              IGANEGQTMFSIDDMASARA              LGVDGNKVLDLSTQAGAQA              TDTIDAIAKKVSAQRGRMGA              IQNRLEHTISNLDTAENTQT              AESRIRDTDMAEEMVEYSK              NNILAQAGQSMLAQANQST              QGVLSLLQ           </p>
--	--	--	--	--	---

10

20

30

40

		ATTGAAATTGATGAGCAAATGCG GTAACAGCAGGTGAATATACAATT CATCTTGACAGCAGGCAAAGAATAT ACGGCAGAAGATTTAGAAGATGTT CTTAAACGGCAGGATTCGACTTT GATGTTAAATTAAGTGGAATACAC CAGATGAGCCAAATACTTTATTGCG AACCAGTGGCGCATCAACTGTGAC TGATATTACAATGGGTGCTGGCAC CGCCGGAGCTGGTCTTGAAAGTA CAGATGCTATGTGGGGGCAAGCT GGTTATGACAGTTATCTTCTGGTG CTGGCATTACCTTGCAGATTGGTG CAAATGAAGGTCAGACCATGAGTT TCTCTATCGATGACATGAGTGCAA GAGCAC TTGGCGTAGATGGCAACA AAGTTGATTTAAGCACACAGGCTG GCGCACAGAAAGCAACTGATACCA TTGATGCAGCAATCAAGAAAGTAT CTGCACAGCGTGGTAGAATGGGT GCGATCCAGAACCGTCTGGAGCA CACCATCAGCAACCTTGATACAGC AGCAGAGAAATACCCAGACTGCAGA GTCCCGTATCCGTGATACAGATAT GGCAGAAAGAGATGGTTGAGTACTC CAAGAACACATTCTTGCACAGGC AGGTCAGTCTATGCTTGCACAGGC GAACCAGTCTACACAGGGTGTACT CTCCCTATTACAGTAA
--	--	--

50

【 0 1 5 0 】

【 表 2 】

表B-本明細書に記載のロゼブリア属フラジェ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	タンパク質受託番号 (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	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	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	WP_006855378
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	WP_006855745
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	WP_006857364
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	WP_006858703

10

20

30

40

50

## 【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・インテスチナリスなどの）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・インテスチナリスなどの）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/SA1008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- $\kappa$ 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

30

40

## 【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

50



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。

#### 【0159】

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）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、組織又は器官の上皮細胞による炎症を軽減する。

10

#### 【0160】

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。

#### 【0161】

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）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、対象におけるT細胞の産生を増加させる。

20

#### 【0162】

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。

#### 【0163】

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Teffs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（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・インテスチナリスなどの）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。

30

40

#### 【0164】

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（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する。

【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・インテスチナリスなどの)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。

【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・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌に関する。

30

【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・インテスチナリスなどの）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、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・インテスチナリスなどの）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、結腸制御性T細胞のマーカーの例である。

10

【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ェリン、及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla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、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ェリン、及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla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。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、セリアック病、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ェリン、及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla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、セリアック病、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

40

【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ェリン、及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は(FlaA1又はFlaA2などの)ポリペプチドFla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%、30%

50

、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

IL8、IL12、IL13、IL17、IL21、IL22、IL23、IL27、IFN、CCL2、CCL3、CCL5、CCL20、CXCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びTNF- 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・インテスチナリスなどの)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、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・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌は、IL-10及び/又はTGF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 I L - 1 0 のレベルは、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l 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、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 高い、又は 1 0 0 % を超えて高いように、増加する。

#### 【 0 2 0 2 】

一部の態様において、I L - 1 0 は、特定の C D 1 0 3 + 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産生される。

#### 【 0 2 0 3 】

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 l a A 1 又は F l a A 2 などの ) F l 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 l a A 1 又は F l a A 2 などの ) F l 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關与する細胞表面マーカーの産生を上方調節する。

#### 【 0 2 0 4 】

免疫応答及び抗原認識に關与する細胞表面マーカーの例としては、C D 4 0、I - A / I - E、C D 3 1 7 / B S T - 2、C D 1 0 3、C D 8 0、C D 8 6、C D 8 3 及び／又は S i g l e c - H 及び／又は種同等物が挙げられる。

#### 【 0 2 0 5 】

細胞表面マーカー ( 例えば、C D 3 1 7 / B S T - 2 ) が、異なる種において異なる名前と呼ばれてもよく、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。本明細書で使用する用語「種同等物」は、これらの細胞表面マーカーを包含する。

#### 【 0 2 0 6 】

本明細書で使用する用語「C D 4 0 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 ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l 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 C D 4 0 のレベルと比較した、対象における C D 4 0 のレベルの増加を意味する。例えば、細胞マーカー C D 4 0 を有している細胞数が増加し、及び／又は細胞上の C D 4 0 マー

#### 【 0 2 0 7 】

一実施形態において、対象の細胞 ( 複数可 ) 上の C D 4 0 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 ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l 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 1 0 %、2 0 %

10

20

30

40

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、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ェリン、及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla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。

10

#### 【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ェリン、及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla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。

20

#### 【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ェリン、及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla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ェリン、及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla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。

30

40

#### 【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ェリン、及び/又はポリペプチドFla、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Fla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、

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Fla、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Fla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（FlaA1又はFlaA2などの）前記Fla、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla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Fla、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Fla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Fla、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Fla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（Fla

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 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 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、又は 1 0 0 % を超えて多く、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 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 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ェリン、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ェリン及び/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 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 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 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。

30

40

【 0 2 1 6 】

本明細書で使用される用語「C D 8 6 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 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



## 【 0 2 1 7 】

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ェリン、及び／又はポリペプチドＦ１α、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Ｆ１α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ェリン、及び／又はポリペプチドＦ１α、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Ｆ１α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

## 【 0 2 1 8 】

本明細書で使用される用語「ＣＤ８３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Ｆ１α、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Ｆ１α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

## 【 0 2 1 9 】

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ェリン、及び／又はポリペプチドＦ１α、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Ｆ１α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ェリン、及び／又はポリペプチドＦ１α、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Ｆ１α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「S i g l e c - H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F l a、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F l 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、対象内のS i g l e c - Hのレベルと比較した、対象内S i g l e c - Hのレベルの増加を意味する。例えば、1又は2以上S i g l e c - 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S i g l e c - 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S i g l e c - H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F l a、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F l 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、対象の細胞（複数可）上のS i g l e c - 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S i g l e c - H細胞マーカーが、又は100%を超えて多く、細胞（複数可）上のS i g l e c - 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、S i g l e c - 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ェリン、及び／又はポリペプチドF l a、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F l 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S i g l e c - 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、S i g l e c - H細胞マーカーを有する細胞が、又は100%を超えて多く、S i g l e c - 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

30

## 【0222】

一部の態様において、C D 4 0、I - A / I - E、C D 3 1 7 / B S T - 2、C D 8 0、C D 8 6、C D 8 3及び／又はS i g l e c - Hの産生は、（F L T 3 Lにより拡大した寛容性C D 1 0 3 + 樹状細胞などの）樹状細胞によってである。

## 【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I F N遺伝子の発現が下方調節される。

## 【0224】

一実施形態において、1又は2以上のI型I F N遺伝子の発現レベルは、ロゼブリア属フラジェリン、及び／又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l a、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）前記ポリペプチドF l 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。

40

## 【0225】

50

I 型 I F N 遺伝子の例としては、I F N - 1、I F N - 3、I f i 2 0 2 b、I f i 2 0 3、I F I 4 4、I F T I、M X I、O A S I、O A S 2、O A S 3、O A S L、I r f 3 及び I r f 4 が挙げられるが、これらに制限はされない。

【 0 2 2 6 】

－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。

【 0 2 2 7 】

－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ェリン、及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) 前記ポリペプチド F l 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、対象におけるレベルと比較した場合、レベルが少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 少ないように減少する。

【 0 2 2 8 】

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。

【 0 2 2 9 】

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 XIV a 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ェリン、及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) 前記ポリペプチド F l 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と、炎症性腸疾患 ( I B D ) の対象において起こりうる。

【 0 2 3 0 】

－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ェリン、及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) 前記ポリペプチド F l 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、対象におけるレベルと比較した場合、微生物の数が、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 % 又は 5 0 % 多い、又は 1 0 0 % 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ェリン、及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) ポリペプチド F l a、及び / 又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び / 又は ( F l a A 1 又は F l a A 2 などの ) 前記ポリペプチド F l 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、対象における型と比較

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）するための能力を意味する。

【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・インテスチナリスなどの）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発揮する。Ag t、Car t p t、C c k、C x c l 1 2及びG c g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】

C c k及びG c g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（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、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。

## 【 0 2 3 6 】

－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。

## 【 0 2 3 7 】

－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。

## 【 0 2 3 8 】

－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。

## 【 0 2 3 9 】

－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（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、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・インテスチナリスなどの）ロゼブリア属菌は、Tlr5、Tlr1、Vnn1、Defb37、Pla2g、Muc16、Itln、Sprr1a、Clbn4、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。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、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、Clbn4、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

## 【 0 2 4 5 】

一実施形態において、TLR関連遺伝子（例えば、Tl r 5、Tl r 1及びV n n 1）、抗細菌ペプチドをコードする遺伝子（例えば、D e f b 3 7、P l a 2 g、M u c 1 6及びI t l n）、腸バリア機能遺伝子（例えば、S p r r 1 a、C l d n 4、P m p 2 2、C r b 3及びM a g i 3）、自然免疫遺伝子（例えばD e f c r 2 0、P c g f 2、L t b p 4、I g s f 8及びT c f e 2 a）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ェリン、及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）前記ポリペプチドF l 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。

10

## 【 0 2 4 6 】

一実施形態において、Tl r 5、Tl r 1、V n n 1、D e f b 3 7、P l a 2 g、M u c 1 6、I t l n、S p r r 1 a、C l d n 4、P m p 2 2、C r b 3、M a g i 3、M a r v e l d 3、M p p 7、D e f c r 2 0、P c g f 2、L t b p 4、I g s f 8及びT c f e 2 a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。

20

## 【 0 2 4 7 】

一実施形態において、Tl r 5、Tl r 1、V n n 1、D e f b 3 7、P l a 2 g、M u c 1 6、I t l n、S p r r 1 a、C l d n 4、P m p 2 2、C r b 3、M a g i 3、M a r v e l d 3、M p p 7、D e f c r 2 0、P c g f 2、L t b p 4、I g s f 8及びT c f e 2 a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ェリン、及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l 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。

30

## 【 0 2 4 8 】

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 - 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 ]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。

40

## 【 0 2 4 9 】

一実施形態において、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 ]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レベルが、ロゼブリア属フラジェリン、及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l a、及び/又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び/又は（F l a A 1又はF l a A 2などの）ポリペプチドF l 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

50

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。

【0250】

さらなる態様において、本発明は、FlaA1又はFlaA2などのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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(ファームキューティス、例えばR.ホミニス又はR.インテスチ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、FlaA1又はFlaA2などのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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、FlaA1又はFlaA2などのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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FlaA1又はFlaA2などのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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

【0251】

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うる。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

【0252】

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

【0253】

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。

【0254】

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。

【0255】

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

【0256】

対象

一実施形態において、対象は単胃動物である。

【0257】

単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。

【0258】

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】

－実施形態において、対象はヒトである。

【0261】

典型的に、TLR5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（FlaA1又はFlaA2などの）ポリペプチドFla、及び／又は前記ロゼブリア属フラジェリン及び／又は（FlaA1又はFlaA2などの）前記ポリペプチドFla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】

－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】

－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】

－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、セリアック病、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、機能的消化不良、アトピー性疾患、壊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】

－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】

－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】

－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】

－態様において、障害は自己免疫性障害である。

【0271】

－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、（セリアック病を含む）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・インテスチナリスなどの）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・インテスチナリスなどの）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・インテスチナリスなどの）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・インテスチナリスなどの）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

(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、標的部位上で効果を持つことができるように、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に、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)ロゼブリア属菌を保護するための手段を意味する。

【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、その周辺からの単離である時にさえ、保護コーテ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。

【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、腸内での効果を産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)ロゼブリア属菌が接種されることを確かにする。

【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。

【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

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・インテスチナリスなどの)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、コンデンスミルク、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。

#### 【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）。

40

#### 【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(インピボにて、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 $1 \times 10^3$  ~ 約 $1 \times 10^{11}$ コロニー形成単位(CFU, colony-forming unit)、例えば、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  CFU、別の例では、約 $1 \times 10^6$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  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、 $1 \times 10^6$  ~ 約 $1 \times 10^{11}$  CFU/g、例えば約 $1 \times 10^8$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  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せられていてもよい。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、ペクチン、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チ、ポリデキストロース、D-タガトース、アカシア繊維、イナゴマメ、オート麦及びシトラス繊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、

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、腔内、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、バツ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、腔内、非経口、経鼻、バツ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。

【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(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。

【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(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、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(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、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。

【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

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 A 2 - 183 及びロゼブリア・インテスチナリス L 1 - 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（例えばバリエーション、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ましい。

【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】

40

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。

【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



ー又は等価の、ドメイン（複数可）等をコードする配列を含むであろう。ホモログはまた、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】

ホモログアミノ酸配列及び／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で実施可能である。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. 403-410) 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、アライン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、マルチプルアライン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ン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、例えば対アライン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

#### 【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	

#### 【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】

－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】

－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、全配列にわたって決定されてもよい。

10

## 【0345】

## 組換え体

－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

－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もよい。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

－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】

－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。－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WO 91/17243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-TOPO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タグ化組換え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<sub>q</sub>遺伝子と、アンピシリン選択のためのAmp<sup>R</sup>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-TOPO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、二重タグ化フラジェリンの産生をもたらす、金属アフィニティータグ (MAT, Metal Affinity Tag) 配列と、FLAGペプチド (Asp - Tyr - Lys - Asp - Asp - Asp - Asp - Lys) 配列に隣接する。本発現ベクターはまた、MAT - ORF - FLAG組換えフラジェリンのIPTG誘導可能、高レベル発現のためのpT7/lac (ファージT7 lac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lacI遺伝子と、アンピシリン選択のためのAmpR遺伝子とも含む。

#### 【0366】

##### 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。

#### 【0367】

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。

#### 【0368】

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。

#### 【0369】

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

#### 【0370】

本記述のフラジェ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。

#### 【0371】

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。

#### 【0372】

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。

#### 【0373】

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。

#### 【0374】

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、Pribnow Box又はTATAボックスなどの保存領域でありうる。

#### 【0375】

##### 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。

#### 【0376】

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、Sh1 - イントロン又はADHイントロンなどの、イントロン配列などの好適なスパ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。

【0377】

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。

【0378】

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。

【0379】

宿主細胞

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。

【0380】

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。

【0381】

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、本記述のフラジェ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。

【0382】

本記述のフラジェ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、フラジェ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、フラジェ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、フラジェ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。

【0383】

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)本記述のフラジェ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。

【0384】

一実施形態において、宿主細胞を、F l a 1、F l a 2、F l a 3 及び F l a 4 からなる群から選択される、少なくとも1つのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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 l a 2、F l a 1 及び F l a 4 からなる群から選択される、少なくとも1つのフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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、フラジェリン(例えば、ロゼブリア属フラジェリン) F l 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。

【0385】

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ェリンをコードする、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ェリンと、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．ホミニスフラジェリン（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ェリン（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。

【0388】

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、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ェ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ェ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．ホミニスフラジェリン（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ェリン（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。

【0390】

フラジェ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、フラジェ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、フラジェ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、フラジェ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。

【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。

【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、スポ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（*Weissella*）種が挙げられるが、これらに制限はされない。

【0395】

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 para casei*)、*L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*)、*L. フェルメントム* (*L. fermentum*)、*L. プレビス* (*L. brevis*)、*L. ガセリ* (*L. gasseri*)、*L. プランタラム* (*L. plantarum*)、*L. ブルガリカス* (*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. ジェンセニ* (*L. jensenii*)、*L. ラムノサス* (*L. rhamnosus*)、*L. クリスパタス* (*L. crispatus*)、*L. ジョンソニ* (*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. アシディピスシス* (*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. amylophilus*)、*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. avarius*)、*L. ビフェルメンタンス* (*L. bifementans*)、*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. ceti*)、*L. コレオホミニス* (*L. coleohominis*)、*L. コリノイデス* (*L. collinoides*)、*L. コンボスチ* (*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. dextrinicus*)、*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. farraginis*)、*L. ファルシミニス* (*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. インテスチナリス* (*L. intestinalis*)、*L. カリキセンシス* (*L. kalixensis*)、*L. ケフィラノファシエンシス* (*L. kefiranofermentans*)、*L. ケフィリ* (*L. kefir*)、*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. paraplanatarum*)、*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. サンフランシスコセンシス* (*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. スフィチェリ* (*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・シクロヘキサニカム (Propionibacterium cyclohexanicum)、プロピオニバクテリウム・フレウデンレクリ亜種フレウデンレクリ (Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii)、プロピオニバクテリウム・グラニューロサム (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。

【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・カテナラタム (Bifidobacterium catenulatum)、ビフィドバクテリウム・シュードカテナラタム (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。

【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・インテスチ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。

【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、

10

20

30

40

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、「alp」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 *Aspergillus oryzae* (Jal 125) 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うる。

【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、好適に改変される必要があってもよい。

【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 0 2 3 8 0 2 3 号明細書で記述されている。

【 0 4 1 3 】

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 - 0 4 4 9 3 7 5 号明細書にて見られる。

【 0 4 1 4 】

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

【 0 4 1 5 】

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。

【 0 4 1 6 】

一実施形態において、宿主生物は、糸状菌であってもよい。

【 0 4 1 7 】

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 - 5 7 4 1 6 6 5 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

【 0 4 1 8 】

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 - 5 6 7 4 7 0 7 号明細書で概説される。

【 0 4 1 9 】

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

【 0 4 2 0 】

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産生を包含する。

【 0 4 2 1 】

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。

【 0 4 2 2 】

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

【 0 4 2 3 】

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。

【 0 4 2 4 】

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。

【 0 4 2 5 】

これに関して、種サッカロミセス・セレビスシ (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・セレピ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。

【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ように、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うる。

【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. Ingrams 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、シリコンウイスカ炭化物技術 (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を参照のこと) 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を参照のこと) が含まれる。

【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。

【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】

10

20

30

40

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 T i 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 R i 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 D N A 配列の存在及び／又は挿入が必要であってもよい。もし例えば、形質転換のために、植物細胞の T i - 又は R i - 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 T i - 又は R i - プラスミド T - D N A 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 - D N A を使用することは、集中的に研究されてきており、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 Kanter 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。

10

#### 【 0 4 3 6 】

##### 培養及び産生

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産生に伝導性であり、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

#### 【 0 4 3 7 】

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。

#### 【 0 4 3 8 】

組換え細胞によって産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。

#### 【 0 4 3 9 】

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。

#### 【 0 4 4 0 】

##### 分泌

30

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。

#### 【 0 4 4 1 】

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 ( A G ) 遺伝子 ( g l a A - 例えばアスペルギルスからの 1 8 と 2 4 のアミノ酸バージョン )、 a - 因子遺伝子 ( 酵母、例えばサッカロミセス、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。

#### 【 0 4 4 2 】

40

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。

#### 【 0 4 4 3 】

##### 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 ( E L I S A )、放射免疫アッセイ法 ( R I A ) 及び蛍光活性化細胞ソーティング ( F A C S ) が挙げられる。

#### 【 0 4 4 4 】

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 , 8 1 7 , 8 3 7 号明細書、同第 A - 3 , 8 5 0 , 7 5 2 号明細書、同第 A - 3 , 9 3 9 , 3 5 0 号明細書、同第 A - 3 , 9 9 6 , 3 4 5 号明細書、同第 4 , 2 7 7 , 4 3 7 号明細書、同第 A - 4 , 2 7 5 , 1 4 9 号明細書及び同第 A - 4 , 3 6 6 , 2 4 1 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 , 8 1 6 , 5 6 7 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、ペプチドライブ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пит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。

#### 【 0 4 5 4 】

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。

#### 【 0 4 5 5 】

図 B 1 A 及び B 1 B は、組換えフラジェリンの SDS 解析を示す。

#### 【 0 4 5 6 】

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 F 1 a A 1 (これはまた本明細書において、R h F 1 a A 1 又は R h 1 とも呼ばれる)

ロゼブリア / ホミニス F 1 a A 2 (これはまた本明細書において、R h F 1 a A 2 又は R h 2 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 F 1 a A 1 (これはまた本明細書において、R i F 1 a A 1 又は R i 1 又は R I 1 とも呼ばれる)

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a A 2 (これはまた本明細書において、R i F 1 a A 2 又は R i 2 又は R I 2 とも呼ばれる)

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a A 3 (これはまた本明細書において、R i F 1 a A 3 又は R i 3 又は R I 3 とも呼ばれる)

ロゼブリア・インテスチナリス F 1 a A 4 (これはまた本明細書において、R i F 1 a A 4 又は R i 4 又は R I 4 とも呼ばれる)

#### 【 0 4 5 7 】

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., CLAESSE, 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.

#### 【 0 4 5 8 】

細菌増殖条件

R . ホミニス A 2 - 1 8 3 <sup>T</sup> (= D S M 1 6 8 3 9 <sup>T</sup> = N C I M B 1 4 0 2 9 <sup>T</sup>) を、Y C F A 培地中 3 7 °C にて嫌氣的に増殖させた。培養液をスピンドウンし、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。

10

20

30

40

50

## 【0459】

R. インテスチナリス L1 - 82<sup>T</sup> (= DSM 14610<sup>T</sup> = NCIMB 13810<sup>T</sup>) を、YCF A 培地中 37 にて嫌氣的に増殖させた。培養液をスピンドウンし、ペレットを 1 mL の、2 % シス테인 (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 YCF A 培地中に再懸濁させた。

## 【0460】

## マウス

C3H / HeN 及び C57BL / 6 を、Harlan Laboratories 社より購入した。GF C3H / HeN は、Jouy-en-Josas (ANAXEM プラットフォーム、Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France) の INRA ノトバイオト歯菌類ブリーディング施設中で提供され、維持した。GF TLR5KO 及び野生型 C57BL / 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 ノトバイオト歯菌類ブリーディング施設中で維持された。従来の TLR5KO 及び野生型 BOY / 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 ノトバイオト歯菌類ブリーディング施設にて実施した。GF C3H / HeN 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、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 YCF A 培地を与えた。回腸、上行結腸及び盲腸試料を 14 日及び 28 日で回収した。6 匹の GF C3H / HeN 雄マウスを、以上で記述したように、大腸菌 MG1655 (K12) で処置し、3 匹の動物を 10 日及び 22 日で犠牲死させ、N = 3 を得た。3 匹の GF TLR5KO マウスと 3 匹の C57BL / 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な重要性を評価した。28 日後、3 匹の動物を、それらの GF カウンターパートと一緒に犠牲死させた。22 匹の雌 C57BL / 6 マウスに、毎日 50 µL の 10<sup>9</sup> CFU 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 日から、マウスに、それらの飲み水中 DSS (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。

## 【0462】

## 組織培養実験

Caco-2 (ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 上皮結腸直腸がん細胞) 及び HT29 (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、嫌気ワークステーション内で増殖させた。R. ホミニス A2 - 183 培養液又は R. インテスチナリス L1 - 82<sup>T</sup> を、指数増殖期に回収し、100 µL の細菌懸濁液 (10<sup>8</sup> CFU / ml) 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 (Caco-2 及び HT-29) を、2 時間及び 4 時間インキュベーション後に回収し、RNA later 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 × 10<sup>4</sup> Caco-2 細胞を、5 % CO<sub>2</sub> の 75 % 加湿大気中、37 にて 24 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 % CO<sub>2</sub> の 75 % 加湿大気中、37 にて 2 時間、最終濃度 100 ng / µl にて、組換えフラジェリンとともにインキュベートした。

## 【0463】

## FISH 解析



F I S H解析を、一般的細菌プローブE u b 3 3 8と、新規に設計したR . ホミニスA 2 - 1 8 3特異的プローブと、R . インテスチナリスL 1 - 8 2<sup>T</sup>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。

#### 【 0 4 6 4 】

##### 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パイロシーケンシングのための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。

#### 【 0 4 6 5 】

##### 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、6 0 0 0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。

#### 【 0 4 6 6 】

##### 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。

#### 【 0 4 6 7 】

##### 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。

#### 【 0 4 6 8 】

##### ウエスタンブロット

ロゼブリア・ホミニスFlaA1及びFlaA2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。ウエスタンブロットのために、R . ホミニスを、種々の量 ( 0.01 g ~ 1 g 食餌 / 10 mL 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、8 M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。FlaA1及びFlaA2抗体を、1 : 1

10

20

30

40

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.ホミニスフラジェリンの免疫局在化を、FlaA1及びFlaA2フラジェ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FlaA1及び抗FlaA2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、Alexaロバ抗ウサギ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8µm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】

##### 組換えフラジェリンのクローニング及び精製

20

フラジェリン遺伝子を、PCR増幅と精製によって、R.ホミニス、R.インテスチリス、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%CO<sub>2</sub>の75%加湿大気中、37にて2時間、最終濃度100µg/µLにて、組換えフラジェ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., Jaensson, E., Agace, W.W. & Mowat, A.M. 2008, "IL-10-dependent partial refractiveness 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マウス的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、 $1 \times 10^6$  / mLにて再懸濁させ、100mm<sup>2</sup> 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、 $1 \times 10^6$  / mLで再プレティングした。5日目に細胞を100ng/mLフラジェリンで刺激して、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、 $2 \times 10^6$  / 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フラジェリンで刺激し、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Siglec-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、FACSArria(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。

10

#### 【0475】

サイトメトリックビーズアレイ(CBA)

骨髓細胞を、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フラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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つの別の機会で行った。

20

#### 【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 FACSAria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、4μm組織切片を、標準のヘモトキシリン/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。

30

#### 【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】

40

補足情報(SI)材料及び方法

細菌増殖条件

R.ホミニスA2-183<sup>T</sup>(=DSM 16839<sup>T</sup>=NCIMB 14029<sup>T</sup>)を、YCF A培地中37℃にて嫌氣的に増殖させた。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嫌気ワークステーション(Don Whitley Scientific社)中、80%N<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>及び10%H<sub>2</sub>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】

50

無菌 ( G F ) マウスへの定着のために、 R . ホミニスを、 3 7 にて終夜 Y C F A 培地中で増殖させた。培養液を、培養液をスピンドウンし、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。

#### 【 0 4 8 1 】

##### マウス

C 3 H / H e N 及び C 5 7 B l / 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 l / 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

#### 【 0 4 8 2 】

##### マウス実験

1 8 匹の G F C 3 H / H e N 雄マウスを、対照 ( N = 8 ) と処置 ( N = 1 0 ) 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、 1 0 0  $\mu$  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  $\mu$  L Y C F A 培地を与えた。 1 4 日目及び 2 8 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、RNA later ( 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 RNA later に移した。

20

#### 【 0 4 8 3 】

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 1 0 日及び 2 2 日に犠牲死させ、 N = 3 を得た。

#### 【 0 4 8 4 】

3 匹の G F T L R 5 K O マウスと、 3 匹の C 5 7 B l / 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 . ホミニスフラジェリンの機能的重要性を評価した。 2 8 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

#### 【 0 4 8 5 】

2 2 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 . ホミニスの治療的効果を評価するために使用した。 7 ~ 1 0 日の順応期間の後、マウスに、毎日 5 0  $\mu$  L の 1 0 <sup>9</sup> 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 日目から、マウスに、それらの飲み水中 D S S ( M W 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

#### 【 0 4 8 6 】

##### 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 ) 、ペニシリン、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 . 5 m L D M E M ( 高グルコース、 H E P E S ) 培地中、 2  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 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 . 0 m L 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、 3 7 にて、 5 % C O <sub>2</sub> 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DMEEM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DMEEM細胞培地で満たし、一方で下コンパートメントを、酸素化DMEEMで満たした。

#### 【0487】

R.ホミニスA2-183培養液を、3,500×gにて5分間の遠心分離によって、指数増殖期で回収した。ペレットを洗浄し、0.8mL嫌気性DMEEM中に再懸濁させた。100マイクロリットルの細菌懸濁液(10<sup>8</sup>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、YCF 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L1-82<sup>T</sup>(=DSM 14610<sup>T</sup>=NCIMB 13810<sup>T</sup>)培養液を、3,500×gにて5分間の遠心分離によって、指数増殖期で回収した。ペレットを洗浄し、0.8mL嫌気性DMEEM中に再懸濁させた。100マイクロリットルの細菌懸濁液(10<sup>8</sup>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、YCF 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】

組換えフラジェリンでの組織培養実験のために、5×10<sup>4</sup> Caco-2細胞を、5%CO<sub>2</sub>の75%加湿大気中、37℃にて、熱不活性化ウシ胎児血清(Gibco社)、ペニシリン、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DMEEM(高グルコース、HEPES)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DMEEM中で24時間保持した。

30

#### 【0490】

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及びパイロシーケンシングのための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。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。1.5~3.5kb断片を、CloneSmart(登録商標)LCamp Kit(Lucigen社)を使用してクローニングし、4~8kbライブラリーを、pJAZZ(登録商標)OC Vector(Lucigen社)を使用して構築した。ホスミドライブラリーを、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、70µLの、10%グリセロール及び相当する抗生物質

50

を補充した  $2 \times 12$  B 培地を含む 384 ウェルマイクロタイタープレートに保管した。細胞を 37 °C にて終夜、振とうしながら増殖させ、-80 °C にて保存した。

#### 【0492】

##### シーケンシング、アセンブリ及び注釈

小サイズライブラリーのシーケンシングの鋳型を、1 µl のクローンバイオマスと、pSMART-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 W G S ライブラリーの末端リードを、CEQ8000 (Beckman Coulter 社) 及び ABI3770 (Applied Biosystems 社) DNA シーケ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](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. RAST 注釈パイプライン (<http://rast.nmpdr.org>; Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz 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 A 2 - 183 の注釈されたゲノム配列を受託番号 CP003040 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を取り除いた。1 標本 t 検定を、ログ - 比值上で使用して、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 RNeasy Later 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) を使用してピオチン標識cRNA内に、又は3'IVT Express Kit (Affymetrix社) を使用してピオチン標識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) へのハイブリダイゼーションを、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数の可能性を提示し、実験における遺伝指数と、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】

##### RT-PCR解析

R. ホミニス特異的プライマー5'-CCCACTGACAGAGTATGTAATGTAC-3' 及び5'-GCACCACCTGTCCACAC-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。Gy r A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2 µg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、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。PCRサイクル条件は、以下のものであった。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。

#### 【0500】

##### ウエスタンブロット

ロゼブリア・ホミニスFla1及びFla2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産生した。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バント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Fla1のために、ペプチドNH<sub>2</sub>-CRSQVRGLNKASDNA-CONH<sub>2</sub>とペプチドNH<sub>2</sub>-IDGNFTSKKLQVGSGLC-COOHとを使用し、一方でR・ホミニスFla2のためにペプチドC-AQYNDDAKSVLEILK-COOHとペプチドC-GLNKASRNSQDGLS-CONH<sub>2</sub>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。

#### 【0501】

ウエスタンブロットのために、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。Fla1及びFla2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。

#### 【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。

#### 【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(GCTGCCTCCGTTAGGAGT; 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に試験した、新規に設計したR・ホミニスA2-183特異的プローブ(GTACATTACATACTCTGTCACTG; 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(



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 (× 630) を、Apochromaticsシステム (Leica社) を使用してレトリブした。

#### 【 0 5 0 4 】

##### 免疫蛍光

R . ホミニスフラジェリンの免疫局在化を、F l a 1 及び F l a 2 フラジェ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 P B S 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 - 2 0 ℃ にて固定し、抗 F l a 1 又は抗 F l a 2 ウサギ抗血清 ( 1 : 1 2 5 、CovaLabs社) と 4 ℃ にて終夜インキュベートし、A l e x a ロバ抗ウサギ 4 8 8 ( 1 : 1 0 0 0 、Molecular Probes社) を使用して可視化した。

#### 【 0 5 0 5 】

切片を、先に冷却したメタノール中、- 2 0 ℃ にて 3 0 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 μ m ) 上で試験した。切片を、先に冷却したメタノール中、- 2 0 ℃ にて 3 0 分間 ( L y 6 G F I T C 、C D 3 F I T C 、C D 1 1 b F I T C 、すべて 1 : 5 0 ( BD Biosciences社) ) 、又は 1 % パラホルムアルデヒド ( P F A ) 中、R T にて 2 分間固定した、C D 3 F I T C ( 1 : 1 0 0 、BD Biosciences社) で二重標識したFoxP3 ( 1 : 5 0 0 、Abcam社) のために続いて P B S 中 0 . 0 1 % T r i t o n X 中 3 分間、いずれかで固定した。すべての切片を、P B S ( p H 7 . 4 ) 中 1 0 % 関連前免疫血清を含む、1 0 % B S A ( 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、R T にて 1 時間インキュベートした。P F A 固定切片を、抗体と共に、4 ℃ にて終夜インキュベートした。F o x P 3 を、A l e x a ヤギ抗ウサギ 5 9 4 ( 1 : 1 0 0 0 、Molecular Probes社) を使用して可視化した。切片を、D A P I にて対比標識し、Vectashield ( Vector Laboratories社) でマウントした。陽性細胞の定量的ために、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。

#### 【 0 5 0 6 】

##### 組織学

上行結腸組織試料を、一定に撈拌しながら、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 P B S 中ですすいで、次いで 7 0 % エタノールに移し、横断セクション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、× 2 0 0 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に見え、ゴブレット細胞がムチンのわずかに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

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で見ると頻度が高い。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＝腺窩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

フラジェリン遺伝子を、PCR増幅と精製によって、R．ホミニス、R．インテスチナリス、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・レクタリ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β-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-κB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。

#### 【0509】

Caco-2細胞を、最終濃度100 ng/μLにて、組換えフラジェリンとともに、5% CO<sub>2</sub>の75%加湿大気中、37℃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

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, Jaensson 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、100 U/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。

#### 【0511】

骨髄誘導樹状細胞及び培養液の作製

骨髄を、以前に報告された通り (Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikahara 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

10

20

30

40

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、骨髓細胞を、10% FCS及び20 ng/mL r mGM-CSFを補充したRPMI中、 $1 \times 10^6$  / mLにて再懸濁させ、100 mm<sup>2</sup>組織培養プレート中、10 mL / 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、 $1 \times 10^6$  / mLで再プレーティングした。5日目に細胞を100 ng/mLフラジェリンで刺激して、6日目に回収した。Flt3L誘導樹状細胞のために、骨髓細胞を、10% FCS及び200 ng/mL r mFlt3を補充したRPMI中、 $2 \times 10^6$  / mLで再懸濁し、2 mL / 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100 ng/mLフラジェリンで刺激し、10日目に回収した。細胞を、穏やかにピペ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Sieglec - 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、FACSria 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)

骨髓細胞を、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、100 ng/mLフラジェリン(例えばロゼブリア属フラジェリン)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

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 <sup>T</sup> ( N C I M B = 1 3 8 1 0 ; D S M = 1 4 6 1 0 <sup>T</sup> ) 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 T r i s - 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。DNA 消化を、各カラムに、7 0 μ L の R D D 緩衝液と混合した 3 0 ユニットの 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。R I N H 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 DNA ( 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。

## フラジェリン遺伝子のPCR増幅

【 0 5 2 1 】

10

リバープライマー (5' - 3') : CTTAGATCTTTTCAAATCTCAAGCAC

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

リバープライマー (5' - 3') : CTTAGATCTTTTAACTTTCCAACAC

20

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

30

【 0 5 2 3 】

## 【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( $\mu$ L)
PCR産物	2
塩溶液	1
H <sub>2</sub> O	2
ベクター-酵素混合物	1
合計	6

## 【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ェ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  $\mu$ g / 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、120 V 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し、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  $\mu$ L 溶液 / 10 mg アガロースゲルスライスの比で加えた。混合液をついで、頻繁にボルテックスしながら、65 °C 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  $\mu$ L 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。カラムをついで、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  $\mu$ L 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

し、-20℃で保存した。

#### 【0525】

フラジェ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、フラジェリンを切除した。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で、陽性クローンから作製した。ロゼブリア属フラジェ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BL21 Rosetta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ェリンの発現と精製

フラジェリン遺伝子(RH1又はFlaA1)をコードする形質転換大腸菌(例えばBL21 Rosetta)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、フラジェ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、Soniprep 150(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、4 M尿素画分に混合し、可溶化フラジェリンを含む6 M尿素溶液を作製した。1 ミリリットルのT a l o n樹脂 (Clontech社、Takara、UK) を、2 mLの緩衝液1 (50 mM T r i s (pH 7.4)、150 mM N a C l) で2回洗浄し、1.000 × g、2分間、R Tにて遠心分離した。上清を捨て、フラジェリンを含む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、R Tにて樹脂を、2 M尿素、50 mM T r i s (pH 7.4)、150 mM N a C l、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 T r i s - H C l、680 mMイミダゾール、360 mM N a C l、0.35 N H C l、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、R T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F L A G M 2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、T a l o n樹脂の溶出液に加え、F L A G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F L A G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。T a l o n - 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 T r i s (pH 7.4)、150 mM N a C lで5回洗浄した。溶出は、ビーズに、0.9 M尿素、50 mM T r i s (pH 7.4)、150 mM N a C lを含む、250 μLの200 μg/mL F L A Gペプチド溶液を加えることと、よく混合することと、R T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P B S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、クーマシーブルー溶液で染色したS D S - P A G Eによって査定した (図3 A)。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、P B Sに対して1時間透析し、タンパク質濃度を、B r a n d f o r d方法を使用して測定した。内毒素測定確認値は、< 0.25 E U/mLであった。

#### 【0528】

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

ATGGTAGTACAGCACAATCTTACAGCAATGAACGCTAACAGACAGTTAGGTATCACAACAGGCGCACAGGCTAAGTCTTC  
 TGAGAAGTTATCTTCTGTTACAAGATCAACCGCGCAGCAGATGACGCAGCAGGTCTTACGATTTCCGAGAAGATGAGAA  
 GCCAGGTTAGAGGCTTAAATAAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTGTATCCCTTATTCAGGTAGCTGAGGGTGCATTA  
 AGTGAGACACACTCCATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCAACTCAGGCAGCAAACGATACCAATACAACCTCAGACAG  
 AACTGCAGTTTCAGCAGGAGATCAACCGATTAGCATCTGAGATCACCAGAATCGCTTCTACAACCTCAGTTCAACACAATGA  
 ACCTGATCGATGGTAACCTTACAAGTAAGAAGCTTCAGGTAGGTTCCCTTTGCGGACAGGCTATCACAATCGATATCTCT  
 GATATGTCTGCTACAGGTCTTGGCGTTAGCGGATTAGTAGTATCTTCTCTCTGAGCTGGTAAGGCAATGTCTGCAGC  
 TCAGGATGCTATCAGCTACGTATCTTCTATGCGTTCTAAGCTGGGTGCATTACAGAACAGACTTGAGCACACAATCTCCC  
 ACCTGGACAACATTTCTGAGCACACATCTTCTGCAGAGTCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATGGTTGAG  
 TACAGCAAGAACAACATCCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCTAACCACTACTCAGGGTGTATTATC  
 CTTATTACAGTAA (配列番号1)。

MVVQHNLTAAMNANRQLGITTTGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNKAASDNAQDGVSLIQVAEGAL  
 SETHSILQRMNELATQAANDTNTTSDRTAVQQEINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGLSLCGQAITIDIS  
 DMSATGLGVSGLVVSSFSAAGKAMSAAQDAISYVSSMRSLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIRDTDMAEEMVE  
 YSKNNILAQAGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ (配列番号2)。

#### 【0529】

4つのドメインD 0、D 1、D 2及びD 3からなるフラジェリン構造。図4 Aを参照のこと。

D 0 : N末端 - ヘリックスはG l n 2から始まり、S e r 3 2 (N D 0) まで上方に伸



びる。C末端 - ヘリックスは、A l 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 l a 4 4 であり、他が G l u 4 5 4 ~ A l a 4 5 9 である、スプーク領域。

D 1 : A l a 4 4 ~ G l n 1 7 6 で伸びるN末端区画と、A s n 4 0 6 ~ G l 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 l a 4 4 ~ A l 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 l 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バックされる。

D 2 ドメインは、2つの区画：L y s 1 7 7 ~ G l y 1 8 9 のN末端区画と、A l a 2 8 4 ~ G l 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關与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79 ~ 117位でのアミノ酸 ( N - D 1 ドメイン ) と、配列番号2の408 ~ 439位でのアミノ酸 ( C - D 1 ドメイン ) 、並びに配列番号2の411位でのアミノ酸アラニン ( A ) 、配列番号2の412位でのアミノ酸グルタミン ( Q ) 、及び配列番号2の420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単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。i n s i t u ハイブリダイゼーション ( F I S H , i n s i t u 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  $1 \times 10^{10}$  細菌 / g 糞の数で、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、66種のRNA及び3,273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、炭水化物代謝に關与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 ) 及び休眠及び孢子形成 ( 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關してもっとも近い相関が、エウバクテリウム・レクター ( Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H.

10

20

30

40

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、これらの生物に関係なく、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* spp. or *Eubacterium rectale*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 9, pp. 6371-6376)。1, 095 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包含した。例えば、IV型線毛集合タンパク質PilB及びPilC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FlgC、鞭毛フック基底本体複合体タンパク質FlhE、鞭毛タンパク質FlaB及び鞭毛モータースイッチタンパク質FlhGは、R.ホミニスに固有であった(表S1)。2つの細菌ゲノムは、42の炭水化物遺伝子まで異なり、それらの異なる栄養学的要求を表している。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FlhCに相同の鞭毛とは反対に、両FLA型である2つの鞭毛遺伝子を発現するという点で固有である。

#### 【0533】

表S1 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関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。

#### 【0534】

【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
<b>アミノ酸及び誘導体</b>	
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
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・プトレッシンABCトランスポートパーミアーゼ成分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
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	硫酸パーミアーゼ
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トランスポートATP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	メチオニンABCトランスポート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トランスポート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
<b>炭水化物</b>	
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

10

20

30

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ゼ	
中央炭水化物代謝	ピルビン酸フェロドキシシンオキシドレクターゼ、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シンオキシドレクターゼ、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シンオキシドレクターゼ、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シンオキシドレクターゼ、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bglオペロン抗転写終結、BglG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MglC	
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ヒドラターゼ	
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ゼ	
単糖	ベータ-グルクロニダーゼ	
単糖	D-マンノネートオキシドレダクターゼ	
単糖	マンノネートデヒドラターゼ	
単糖	ラムノガラクトツ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
<b>細胞壁及び莢膜</b>	
莢膜及び細胞外多糖	D,D-ヘプトース7-ホスフェートキナーゼ
莢膜及び細胞外多糖	GDP-L-フコースシンセターゼ
莢膜及び細胞外多糖	dTDP-4-デヒドロラムノース3,5-エピメラーゼ
莢膜及び細胞外多糖	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
莢膜及び細胞外多糖	多糖デアセチラーゼ
莢膜及び細胞外多糖	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
莢膜及び細胞外多糖	テイコ酸転座透過酵素タンパク質TagG
莢膜及び細胞外多糖	dTDP-4-デヒドロラムノースリダクターゼ
莢膜及び細胞外多糖	dTDP-グルコース4,6-デヒドラターゼ
莢膜及び細胞外多糖	TRAP-型輸送系、小透過酵素成分、予測N-アセチルノイラミネートトランスポーター
莢膜及び細胞外多糖	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
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
<b>クラスター化に基づくサブシステム</b>	
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(SpoIIQ)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
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
<b>補因子、ビタミン、補欠分子族、色素</b>	
補酵素A	2-デヒドロパント酸2-リダクターゼ
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
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
<b>DNA代謝</b>	
CRISPs	CRISPR関連タンパク質Cas2

10

20

30

40



DNA修復	ウラシル-DNAグリコシラーゼ、ファミリー1
DNA修復	未知機能のエキシヌクレアーゼ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
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
休眠及び孢子形成	
孢子DNA保護	小酸溶解性孢子タンパク質、ベータ型SASP
サブカテゴリーなし	孢子成熟タンパク質A
サブカテゴリーなし	孢子成熟タンパク質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	
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
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
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

10

20

30

40

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FliE
原核生物における鞭毛運動性	フラジェリンタンパク質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FliG
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ゼ(嫌気)、大サブユニット
リン代謝	
サブカテゴリーなし	エキソポリホスファターゼ

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過酵素タンパク質 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過酵素タンパク質 PstC
サブカテゴリーなし	ナトリウム依存リン酸トランスポーター
カリウム代謝	
サブカテゴリーなし	カリウム電位依存性チャネルサブファミリー-KQT
タンパク質代謝	
タンパク質生合成	EngCに関連する可能性あるGTPase
タンパク質生合成	アスパルチル-tRNA(Asn)シンセターゼ
タンパク質生合成	tRNA-Ala-CGC
タンパク質生合成	tRNA-Gly-CCC
タンパク質生合成	tRNA-Pro-GGG
タンパク質生合成	tRNA-Ser-CGA
タンパク質生合成	tRNA-Ser-GGA
タンパク質生合成	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
タンパク質プロセッシング及び修飾	[NiFe]ヒドロゲナーゼニッケル取込タンパク質HypA
タンパク質プロセッシング及び修飾	[NiFe]ヒドロゲナーゼニッケル取込関連タンパク質 HypB
RNA代謝	
RNAプロセッシング及び修飾	ペプチジル-プロイリルcis-transイソメラーゼ
RNAプロセッシング及び修飾	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AtI
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	
抗生物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
抗生物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

10

20

30

40



抗生物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
抗生物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
抗生物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

【 0 5 3 5 】

10

【表 7】

表S1B E.レクタリに存在するが、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、ポリアミントランスポーター近位
リシン、スレオニン、メチオニン及びシステイン	硫酸アデニルトランス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
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	メチオニントランスポーター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/メチルガラクトシド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
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
単糖	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トランスフェラーゼ
多糖	グリコーゲン生合成タンパク質GlgD、グルコース-1-リン酸アデニルとランスフェラーゼファミリー
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

20

30

40

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-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
<b>補因子、ビタミン、補欠分子族、色素</b>	
ビオチン	3-ケトアシル-CoAチオラーゼ
ビオチン	ビオチンシンターゼ
ピリドキシン	4-ヒドロキシシレオニン-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ン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ン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
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
<b>DNA代謝</b>	
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
<b>脂肪酸、脂質及びイソプレノイド</b>	
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
<b>イオン捕獲及び代謝</b>	
サブカテゴリーなし	ソルターゼA、LPXTG特異的
<b>膜輸送</b>	
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
<b>運動性及び走化性</b>	
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
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
<b>ヌクレオシド及びヌクレオチド</b>	

10

20

30

40

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	
タンパク質合成	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)-リシジンシンターゼ
呼吸	
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	
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	
抗生物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
抗生物質及び毒性化合物に対する耐性	細胞質銅ホメオスターシスタンパク質cutC

10

20

30

40

## 【0536】

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ケ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)単一関連マウスの盲腸からのインピボ、(ii)培養培地中で増殖した細菌からのインピトロ

50

、(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 S2 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		Rh28d-インビトロ +食餌		インビトロ+食餌 -インビトロ	
	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アセチルトランスフ ェラーゼ	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
鞭毛モーター回転タンパク質MotA	-0.94	0.71937	2.37	0.00023	1.69	0.02442	4.25	0.00001	-0.56	1.00000
鞭毛モーター回転タンパク質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

10

20

30

40



レスレオニン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覚トランスデュサー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覚トランスデュサー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
ホスホエノールピ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MobA/MobL	183.02	0.00023	9.49	0.01454	8.09	0.08695	-2.39	0.44355	22.63	0.02615

ピルビン酸-フラボドキシノンオキシ 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

【 0 5 3 9 】

【 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 <sup>+</sup> 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	鞭毛モーター回転タンパク質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ス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

## 【0540】

50の示差的に発現した遺伝子を単離した（インビボ対インビトロ）。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与する遺伝子、mobA及びmobL様遺伝子のインビボでの高い上方調節であった（図2A）。転写研究におけるそ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ったため、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与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。

30

## 【0541】

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2B）。R.ホミニスは、複数のフラジェリン遺伝子、flaA1、flaA2、flaA3及びflaBを有する。マウス腸環境において、フラジェリン発現を、組換えフラジェリンタンパク質FlaA1及びFlaA2に対して作製された特異的抗体（RH1及びRH2）で、インビボ定着マウス、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、ウエスタンブロットと免疫細胞化学によって検証した（図2C）。インビボでのフラジェ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ボ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2D）。関連した遺伝子には、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]が含まれる。

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 ( C a c o - 2 及び H T - 2 9 ) 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 )。インビボデータと一致して、フラジェリン遺伝子 M o t A は、C a c o - 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 C a c o - 2 細胞で見られ、上方調節が H T - 2 9 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 2 8 日でもっとも見られ、1 5 9 個の遺伝子が上方調節され、1 4 3 個の遺伝子が下方調節される。1 4 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、7 9 個の遺伝子が上方調節され、1 1 9 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、2 8 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。アフメトリックスデータの陽性のリアルタイム P C R 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 動物間のアフメトリックスデータ

20

アフ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 R N A 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 ) 1 4 日に上行結腸にて示差的に発現した転写物。( B ) 2 8 日に上行結腸にて示差的に発現した転写物。( C ) 1 4 日に回腸にて示差的に発現した転写物。( D ) 2 8 日に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結合カセット、サブファミリーG(WHITE)、メンバー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 ポーター)、メンバー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ノトロピック、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結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー12	3.69	0.000333	6.62
1428682_at	Zc3h6	ジンクフィンガー-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、メンバーB7	2.87	0.018503	1.70
1424451_at	Acaa1b	アセチル-補酵素Aアクリルトランスフェラーゼ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、メンバーQ	2.32	0.013564	2.22
1428902_at	Chst11	炭水化物ウルホトランスフェラーゼ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、メンバー3	2.21	0.007554	3.07
1419651_at	2610200G18Rik	RIKENcDNA2610200G18遺伝子	2.21	0.000406	6.29

10

20

30

40

1422188_s_at	NA	NA	2.20	0.000397	6.39
1435468_at	D230025D16Rik	RIKENcDNAD230025D16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	2.12	0.026066	1.24
1451557_at	Tat	チロシンアミノトランスフェラーゼ	2.11	0.046376	0.38
1428989_at	0710001D07Rik	RIKENcDNA0710001D07遺伝子	2.03	0.04028	0.54
1456680_at	B3gnt6	UDP-GlcNAc: ベータGalベータ-1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ6(コア3シクターゼ)	2.01	0.024447	1.35
1443235_at	Elf2ak4	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結合カセット、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバー1A	1.97	0.009639	2.79
1456389_at	Zeb2	ジンクフィンガー-E-ボックス結合ホメオボックス2	1.96	0.013795	2.16
1440840_at	D630004K10Rik	RIKENcDNAD630004K10遺伝子	1.96	0.017697	1.80
1457619_at	Ces6	カルボキシシルエステラーゼ6	1.94	0.04028	0.55
1449049_at	Tlr1	Toll様受容体1	1.92	0.018503	1.72
NuGO_empt049113_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	Eltld1	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Al875142	1.77	0.03504	0.78
1428332_at	1500004A08Rik	RIKENcDNA1500004A08遺伝子	1.77	0.038684	0.61
1434015_at	Slc2a6	溶質キャリアヤーファミリー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	痙性対まひ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精神遅滞遺伝子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_empt066282_at	Defb37	デフェンシンペータ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	0.02652	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及びブレクストリンドメインタンパク質2	1.34	0.037045	0.70
1454706_at	Uvrug	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結合カセット、サブファミリーG(WHITE)、メンバー1	1.30	0.04028	0.55
1418817_at	Chmp1b	クロマチン変換タンパク質1B	1.25	0.010981	2.61
1441059_at	1700049G17Rik	RIKENcDNA1700049G17遺伝子	1.25	0.028805	1.05
NuGO_empt061346_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(ニューロトランスミッタートランスポーター)、メンバー14	1.22	0.012499	2.32
NuGO_empt073103_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	-1.20	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

10

20

30

40

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_empt090017_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	セクレトグラニンIII	-1.77	0.016351	1.93
1443877_a_at	Rapgef6	Rapグ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	-1.89	0.024018	1.38
1422452_at	Bag3	Bcl2関連アサノジーン3	-1.89	0.026066	1.24
1438041_at	Pde7a	ホスホジェステラーゼ7A	-1.91	0.025597	1.29
1433927_at	Usp11	ユビキチン特異的ペプチダーゼ様1	-1.92	0.024018	1.38

10

20

30

40

1422860_at	Nits	ニューロテンシン	-1.94	1.84E-07	14.19
1451194_at	Aldob	アルドラーゼ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_empt066852_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)、クラスAメンバー1	-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	システイン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	Bmper	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	Airdc3	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、メンバー1	-2.78	0.000251	6.92
1419349_a_at	Cyp2d9	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 <sup>9</sup>	-2.78	0.000134	7.68
NuGO_emt044299_at	Sstr1	ソマトスタチン受容体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	RIKENcDNAD630013G24遺伝子	-2.99	0.004044	3.83
1419185_a_at	Mlxip1	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	カルシトニン関連ポリペプチド、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

10

20

30

40

50



【 0 5 4 6 】  
【 表 1 1 】

表S4B. R.ホ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、サブファミリーG(WHITE)、メンバー5	42.06	1.60E-09	18.55
1449375_at	Ces6	カルボキシエステラーゼ6	26.10	1.75E-16	31.66
1422749_at	Ly6g6c	リンパ球抗原6複合体、座G6C	25.49	2.06E-10	20.64
1448964_at	S100g	S100カルシウム結合タンパク質G	17.88	4.82E-07	13.11
1455540_at	Cps1	カルバモイル-リン酸シンセターゼ1	11.50	0.010507	1.76
1449133_at	Sprr1a	小プロリンリッチタンパク質1A	11.27	0.009303	1.97
NuGO_empt070648_at	Abca12	ATP結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー12	7.97	4.05E-08	15.43
1448485_at	Ggt1	ガンマ-グルタミルタンパク質1	7.45	0.020934	0.94
1417828_at	Aqp8	アクアポリン8	6.67	0.001582	4.30
1437060_at	Olfm4	オルファクトメジン4	5.80	0.023469	0.77
1420437_at	Indo	インドールアミン-ピロール2,3ジオキシゲナーゼ	5.18	0.000637	5.44
1425452_s_at	AW125753	発現した配列AW125753	4.97	0.001639	4.20
1439934_at	Slc30a10	溶質キャリアファミリー30、メンバー10	4.68	0.000119	7.49
1430641_at	9030605I04Rik	RIKENcDNA9030605I04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、メンバー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	C1ca6	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	キャ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_empt092118_s_at	NA	NA	3.51	0.040399	-0.04
1451239_a_at	Slc26a1	溶質キャリアファミリー26(硫酸トランスポーター)、メン	3.36	0.004508	2.94

10

20

30

40

50

1418283_at	Cldn4	バー1		2.97	0.002809	3.51
1418165_at	Itlna	クラウジン4		2.88	0.0005	5.82
1440192_at	1810054D07Rik	インテレクチンa		2.86	0.000108	7.65
1426980_s_at	E130012A19Rik	RIKENcDNA1810054D07遺伝子		2.83	0.002052	3.91
1431042_at	Paqr8	RIKENcDNAE130012A19遺伝子		2.67	0.000637	5.46
1424688_at	Creb3l3	プロゲスチン及びアジポQ受容体ファミリメンバーVIII		2.67	0.035165	0.19
NuGO_empt049113_at	Ptprh	cAMP応答性ヨウ素結合タンパク質3様3		2.54	6.75E-06	10.55
1432358_at	Muc16	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、H		2.47	0.044391	-0.20
1419759_at	Abcb1a	ムチン16		2.46	0.00017	7.13
NuGO_empt033610_at	Nox1	ATP結合カセット、サブファミリ-B(MDR/TAP)、メンバー1A		2.43	0.035165	0.20
1418661_at	Abhd2	NADPHオキシダーゼ1		2.41	0.043727	-0.17
1420499_at	Gch1	アビドロラーゼドメイン含有2		2.38	0.040391	-0.03
1416607_at	4931406C07Rik	GTPシクロヒドロラーゼ1		2.31	3.39E-11	22.26
1417991_at	Dio1	RIKENcDNA4931406C07遺伝子		2.29	0.006845	2.39
1455455_at	Glt2d2	脱ヨウ素酵素、ヨードチロニン、型I		2.16	0.015457	1.33
1417164_at	Dusp10	グリコシルトランスフェラーゼ28ドメイン含有2		2.13	0.031006	0.40
1428937_at	Atp2b1	二重特異性ホスファターゼ10		2.13	1.13E-05	9.98
1429833_at	Ly6g6e	ATPase、Ca++輸送、細胞膜1		2.10	0.042694	-0.12
1419582_at	Cyp2c55	リンパ球抗原6複合体、座G6E		2.06	0.022426	0.83
1448562_at	Upp1	シトクロームP450、ファミリ-2、サブファミリ-c、ポリペプチド55		2.06	0.007369	2.29
1444254_at	NA	ウリジンホスホリラーゼ1		2.05	0.009642	1.90
1428936_at	Atp2b1	ATPase、Ca++輸送、細胞膜1		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フェラーゼ		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-アクリルトランスフェラーゼ4(リンホスファチジル酸アクリルトランスフェラーゼ、デルタ)		2.02	0.047797	-0.32

10

20

30

40

1456231_at	Pla2g3	ホスホリパーゼA2、グループリン	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	末梢ミエリタンパク質	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	Al843639	発現した配列Al843639	1.94	0.006795	2.41
1452070_at	Dedd2	死エフェクタードメイン含有DNA結合タンパク質2	1.92	0.046848	-0.28
1417404_at	Elovl6	ELOVLファミリーメンバー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、ポリペプチド16	1.87	0.000119	7.50
1422983_at	Itgb6	インテグリンペーパータ6	1.87	0.03266	0.33
1454746_at	Plekhm1	プレクストリンホモログ、γドメイン含有、ファミリーM(RUNドメインを有する)メンバー1	1.86	0.001042	4.88
1425079_at	Tm6sf2	膜貫通6スーパ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-アクリルトランスフェラーゼ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	Srebf2	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	Centa1	センタウリン、アルファ1	1.75	0.009141	2.01
NuGO_empt084792_x_at	NA	NA	1.74	0.020944	0.92
1417823_at	Gcat	グリシンC-アセチルトランスフェラーゼ(2-アミノ-3-ケトブチレート-補酵素アリガーゼ)	1.74	0.049235	-0.38
NuGO_empt066282_at	Defb37	デフェンシンペーパータ37	1.74	6.42E-05	8.25
1429550_at	Entpd8	エクトヌクレオシドトリホスフェ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、メンバー2a1	1.73	0.001791	4.09
NuGO_empt043440_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	Lhfp12	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、メンバー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	Mtmr11	ミオチューブラリン関連タンパク質11	1.62	0.010762	1.73
NuGO_empt070892_at	NA	NA	1.62	0.020773	0.95
1436710_at	Zswim4	ジンクフィンガー、SWIMドメイン含有4	1.62	0.009718	1.88
1420663_at	Zbtb7b	ジンクフィンガー及びBTBドメイン含有7B	1.61	0.042694	-0.13
1418991_at	Bak1	BCL2-アプタゴニスト/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_empt021769_s_at	Slc17a4	溶質キャリアヤーファミリー17(リン酸ナトリウム)、メンバー4	1.57	0.015878	1.30
1418671_at	Capn5	カルパイン5	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	溶質キャリアヤーファミリー35、メンバーF2	1.56	0.004185	3.02
1450982_at	Slc9a3r1	溶質キャリアヤーファミリー9(ナトリウム/水素イオン共輸送)、イソフォーム3調節因子1	1.56	0.008755	2.06
1434015_at	Slc2a6	溶質キャリアヤーファミリー2(促進グルコーストランスポーター)、メンバー6	1.55	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

10

20

30

40

1424809_at	Crb3	Crumbsホモログ、3(ドロソフィラ)	1.53	0.014107	1.43
1428953_at	Otud7b	OTUドメイン含有7B	1.53	0.035702	0.17
1424090_at	Sdcbp2	シニデカン結合タンパク質(シンテニン)2	1.53	0.023574	0.76
1418215_at	Mep1b	メプリン1ペーテ	1.53	0.027636	0.55
1434456_at	Gm440	遺伝子モデル440、(NCBI)	1.53	0.032752	0.32
1423521_at	Lmnbl	ラミンB1	1.53	0.007369	2.31
1425298_a_at	Naip1	NLRファミリー、アポトーシス阻害タンパク質1	1.51	0.002438	3.70
1456619_at	Liph	リパーゼ、メンバーH	1.50	0.044796	-0.22
1418976_s_at	Cideb	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	1.49	0.020944	0.93
1423376_a_at	Dok4	ドッキングタンパク質4	1.49	0.005089	2.73
1415793_at	Pnpo	ピリドキシン5'-リン酸オキシダーゼ	1.48	0.00252	3.63
1435461_at	Magi3	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	0.001623	4.23
1444951_at	BC042698	cDNA配列BC042698	1.45	0.042694	-0.14
1452214_at	Skil	SKI様	1.45	0.020383	0.99
1426284_at	Krt20	ケラチン20	1.43	0.021519	0.88
1460406_at	Al427122	発現した配列Al427122	1.42	0.016225	1.27
1419331_at	Cdh17	カドヘリン17	1.41	0.009399	1.94
1428509_at	Myo1e	ミオシンE	1.41	0.043727	-0.17
1429117_at	Tradd	死ドメインを介してTNFRSF1A関連	1.41	0.020944	0.91
1460681_at	Ceacam2	CEA関連細胞接着分子2	1.41	0.036022	0.14
1455678_at	NA	NA	1.41	0.048555	-0.36
1440218_at	BC040758	cDNA配列BC040758	1.41	0.026321	0.62
1416009_at	Tspan3	テトラスパニン3	1.40	0.002052	3.91
1456200_at	lpmk	イノシトールリン酸マルチキナーゼ	1.40	0.033108	0.28
1424126_at	Alas1	アミノレブリン酸シンターゼ1	1.39	0.040391	-0.03
1434482_at	D4Erd22e	DNAセグメント、Chr4、ERATODi22、発現	1.39	0.038213	0.05
1416690_at	Gtpbp2	GTP結合タンパク質2	1.38	0.035702	0.16
1417895_a_at	Tmem54	膜貫通タンパク質54	1.38	0.001332	4.53
1424245_at	Ces2	カルボキシルエステラーゼ2	1.37	0.020383	0.99

10

20

30

40

1434559_at	Stx3	シンタキシン3	1.37	0.032755	0.31
1426733_at	Itpk1	イノシトール1,3,4-三リン酸5/6キナーゼ	1.35	0.010099	1.81
1451139_at	Slc39a4	溶質キヤリヤーファミリー39(亜鉛トランスポーター、メンバー4	1.34	0.04853	-0.34
1417398_at	Rras2	関連RASウイルス(r-ras)がん遺伝子ホモログ、2	1.34	0.040085	-0.02
1427203_at	Myo15b	ミオシンXVB	1.33	0.020944	0.92
1428331_at	2210016F16Rik	RIKENcDNA2210016F16遺伝子	1.32	0.047659	-0.30
1427128_at	Ptpn23	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型23	1.31	0.042694	-0.13
1420426_at	Myo7b	ミオシンVIIb	1.30	0.036022	0.13
1452304_a_at	Arhgef5	RhoGアニンヌクレオチド交換因子(GEF)5	1.30	0.047797	-0.31
1434303_at	Raph1	Ras関連(RaGDS/AF-6)及びプレクストリンホモログ、ドメイン1	1.29	0.024887	0.69
1433885_at	AI788777	発現した配列AI788777	1.28	0.018321	1.10
1415765_at	Hnrp12	異種核リボヌクレオタンパク質U様2	1.28	0.009181	2.00
1448110_at	Sema4a	Semaドメイン、免疫グロブリンドメイン(Ig)、膜貫通ドメイン(TM)及び短細胞質ドメイン、(セマホリン)4A	1.27	0.00151	4.40
1423960_at	Mboat5	膜結合O-アケリルトランスフェラーゼドメイン含有5	1.27	0.043727	-0.18
1415676_a_at	Psbmb5	プロテオソーム(プロソーム、マクロパイン)サブユニット、ベータ型5	1.27	0.040399	-0.04
1434345_at	Clrn3	クラリン3	1.27	0.027133	0.59
1426014_a_at	Mucdhl	ムチン及びカドヘリン様	1.27	0.036152	0.11
1420503_at	Slc6a14	溶質キヤリヤーファミリー6(ニューロトランスミッタートランスポーター)、メンバー14	1.26	0.001582	4.31
1418817_at	Chmp1b	クロマチン改変タンパク質1B	1.25	0.004961	2.78
1423686_a_at	Prr13	プロリンリッチ13	1.25	0.026919	0.60
1420826_at	Letm1	ロイシンジッパー-EF-ハンド含有膜貫通タンパク質1	1.24	0.036022	0.13
1448618_at	Mvp	主要ポータルタンパク質	1.24	0.031006	0.39
1417178_at	Gipc2	GIPCPDZドメイン含有ファミリー、メンバー2	1.24	0.014863	1.38
1416627_at	Spint1	セリンプロテアーゼ阻害剤、Kunitz型1	1.23	0.048555	-0.36
1428163_at	Sar1b	SAR1遺伝子ホモログ、B(S.セルビシエ)	1.22	0.036022	0.13

10

20

30

40



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	マトリックスメタロプロチナーゼ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	2610018103Rik	RIKENcDNA2610018103遺伝子	-1.22	0.04853	-0.35
1417999_at	Itm2b	統合膜タンパク質2B	-1.22	0.020944	0.91
1454994_at	Klhl20	Kelch様20(ドロソフィラ)	-1.24	0.040433	-0.05
1435563_at	Mrps5	ミトコンドリアリボソームタンパク質S5	-1.25	0.022222	0.84
1445561_at	NA	NA	-1.27	0.04853	-0.34
1436854_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2	-1.27	0.002008	3.97
1416452_at	Oat	オルニチンアミノトランスフェラーゼ	-1.27	0.009757	1.86
1415961_at	Itm2c	統合膜タンパク質2C	-1.28	0.007369	2.28
1448933_at	Pcdhb17	プロトカドヘリンベータ17	-1.28	0.048555	-0.35
1440391_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
1450788_at	Saa1	血清アミロイドA1	-1.31	0.001623	4.23
1444451_at	Pappa2	パパラインシン2	-1.31	0.038548	0.03
1457029_at	C030010B13Rik	RIKENcDNA C030010B13遺伝子	-1.31	0.023793	0.74
1417088_at	Zfp346	ジンクフィンガータンパク質346	-1.33	0.039077	0.01
1436220_at	Zfp287	ジンクフィンガータンパク質287	-1.33	0.022441	0.82
1445824_at	Zfp458	ジンクフィンガータンパク質458	-1.37	0.044011	-0.18
1420191_s_at	D16Bwg1494e	DNAセグメント、Chr16、Brigham&Women's遺伝子1494発現	-1.37	0.035165	0.19
1415871_at	Tgfb1	形質転換増殖因子、ベータ誘導	-1.38	0.039653	0.00
1442731_at	9030416H16Rik	RIKENcDNA9030416H16遺伝子	-1.41	0.012107	1.59
1424889_at	Nupl2	ヌクレオポリン様2	-1.42	0.001582	4.31
1416178_a_at	Plekha1	プレクストリンホモログ、ドメイン含有、ファミリーB(エベクチン)メンバー1	-1.44	0.047797	-0.32
1447946_at	Adam23	Aディスインテグリン及びメタロプロチナーゼドメイン23	-1.44	0.017961	1.13

10

20

30

40

NuGO_empt080869_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	亜鉛及びリンゲフィンガー3	-1.45	9.00E-06	10.24
1416865_at	Fgd1	FYVE、RhoGEF及びPHドメイン含有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スA、メンバー3	-1.47	0.029906	0.45
1434961_at	Asb1	アンキリンリピート及びSOCSC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(ドロソフィラ)	-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、ポリペプチド1	-1.50	0.028455	0.51
1429086_at	Grhl2	Grainyhead様2(ドロソフィラ)	-1.51	0.04298	-0.15
1439078_at	Klhl4	Kelch様4(ドロソフィラ)	-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ー調節キナーゼ1	-1.60	0.004814	2.85
1417234_at	Mmp11	マトリックスメタロプロチナーゼ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、ポリペプチド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

10

20

30

40



1428260_at	Spg3a	癌性対まひ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	ホスホリン酸性クラスターソータータンパク質1	-1.72	7.34E-05	8.05
1451342_at	Spon1	スポンジン1、(f-スポンジン)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	コンタクチン1	-1.77	0.029208	0.48
1435829_at	B930008K04Rik	RIKENcDNAB930008K04遺伝子	-1.78	0.004961	2.78
NuGO_empt010210_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	Elp4	延長タンパク質4ホモログ、(S.セルビスエ)	-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	ホスホリン酸性クラスターソータータンパク質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_empt029633_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

10

20

30

40

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、グループE、メンバー-3	-1.91	0.040798	-0.06
1434740_at	Scarf2	スカベンジャー受容体クラスF、メンバー-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	-1.92	0.003616	3.21
1457072_at	Bcl11a	B-細胞CLL/リンパ腫11A(ジンクフィンガンタータンパク質)	-1.93	0.04853	-0.35
1428347_at	Cyfp2	細胞質FMR1相互作用タンパク質2	-1.93	0.000484	5.87
1448823_at	Cxcl12	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド12	-1.95	0.007369	2.28
1436051_at	Myo5a	ミオシンVa	-1.95	0.000596	5.61
1425065_at	Oas2	2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ2	-1.96	0.032484	0.34
1454876_at	Rab23	RAB23、メンバー-RASがん遺伝子ファミリー	-1.97	0.029208	0.48
NuGO_emt022150_at	Cartpt	CARTプレプロペプチド	-1.98	0.008035	2.16
1423396_at	Agt	アンジオテンシノーゲン(セルピンペプチダーゼ阻害剤、クラ ッドA、メンバー-8)	-1.98	0.017774	1.15
1418213_at	Krt23	ケラチン23	-1.99	0.031284	0.38
1444670_at	Smyd3	SET及びMYNDドメイン含有3	-2.02	0.022766	0.80
1453251_at	Dhx30	DEAH(Asp-Glu-Ala-His)ボックスポリペプチド30	-2.03	0.027622	0.56
1440925_at	Rhoq	Rasホモログ、遺伝子ファミリー、メンバー-Q	-2.05	0.031006	0.40
1422640_at	Pcdhb9	プロトカドヘリンベータ9	-2.07	0.015304	1.34
1450708_at	Scg2	セクレトグラニンII	-2.09	0.010099	1.81
1435673_at	Hoxd3	ホメオボックスD3	-2.09	0.029426	0.47
1416710_at	Tmem35	膜貫通タンパク質35	-2.10	0.007507	2.24
1423150_at	Scg5	セクレトグラニンV	-2.11	0.002438	3.69
1418392_a_at	Gbp3	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
1436566_at	Rab40b	Rab40b、メンバー-RASがんgeneファミリー	-2.12	0.003512	3.25
1441231_at	EG665123	予測遺伝子、EG665123	-2.14	0.035789	0.15
1419349_a_at	Cyp2d9	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9	-2.14	0.003512	3.25
1445481_at	Al317158	発現した配列Al317158	-2.18	0.033108	0.26
1443698_at	Fbxo39	F-ボックスタンパク質39	-2.19	0.009359	1.95
1424900_at	Slc29a4	溶質キャリアヤーファミリー-29(ヌクレオシドトランスポータ	-2.22	0.001105	4.77

10

20

30

40

1419185_a_at	Mlxipl	一)、メンバー4				
1435504_at	Clip4	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 バー4	-2.23	0.000867	5.09	
1438868_at	Phf11	PHDフィンガータンパク質11	-2.24	0.006244	2.51	
1422860_at	Nts	ニューロテンシン	-2.24	0.000857	5.12	
1451860_a_at	Trim30	三角モチーフタンパク質30	-2.28	1.04E-09	19.02	
1434788_at	D930050A07Rik	RIKENcDNAD930050A07遺伝子	-2.28	0.038792	0.03	
1450684_at	Etv1	Etsバリアント遺伝子1	-2.33	0.009359	1.95	
1433536_at	Lrp11	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質11	-2.38	0.000606	5.57	
NuGO_empt060551_at	9030421J09Rik	RIKENcDNA9030421J09遺伝子	-2.39	0.000793	5.21	
1428758_at	Tmem86a	膜貫通タンパク質86A	-2.44	0.044497	-0.20	
1445881_at	NA	NA	-2.45	0.004961	2.76	
1451426_at	D11Lgp2e	DNAセグメント、Chr11、LotharHennighausen2、発現	-2.54	0.031006	0.39	
1416639_at	Slc2a5	溶質キャリアヤーファミリー2(促進グルコーストランスポータ ー)、メンバー5	-2.55	0.0093	1.98	
1429313_at	Ror1	受容体チロシンキナーゼ様オーフアン受容体1	-2.67	0.006738	2.43	
1433184_at	6720477C19Rik	RIKENcDNA6720477C19遺伝子	-2.70	0.001269	4.59	
1419136_at	Akr1c18	アルド-ケトリリダクターゼファミリー1、メンバーC18	-2.72	0.017774	1.16	
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	-2.77	0.0113	1.66	
1417988_at	Resp18	調節内分沁特異的タンパク質18	-2.79	0.000483	5.90	
1453196_a_at	Oasl2	2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ様2	-2.83	0.003512	3.26	
1423555_a_at	Ifi44	インターフェロン誘導タンパク質44	-2.84	0.011794	1.62	
1449939_s_at	Dlk1	デルタ様1ホモログ、(ドロソフィラ)	-2.86	0.042694	-0.13	
NuGO_empt091063_at	NA	NA	-2.99	5.20E-10	19.73	
1436998_at	Ankrd43	アンキリンリピートドメイン、43	-3.08	0.000637	5.49	
1418293_at	Ifit2	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	-3.13	0.001056	4.85	
NuGO_empt044299_at	Sstr1	ソマトスタチン受容体1	-3.14	0.000637	5.44	
			-3.16	2.31E-08	16.00	

10

20

30

40

1421492_at	Ptgds2	プロスタグランジンD2シンターゼ2、造血性	-3.18	7.03E-05	8.13
1449025_at	Ifit3	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	-3.34	0.007674	2.21
1455528_at	NA	NA	-3.47	0.002046	3.94
1429273_at	Bmper	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



【 0 5 4 7 】

【 表 1 2 】

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2	4.21	0.008352	3.02
1420673_a_at	Acox2	アシル-補酵素Aオキシダーゼ2、分岐鎖	3.37	0.023445	1.29
1418174_at	Dbp	D部位アルブミンプロモーター結合タンパク質	3.26	0.04708	0.16
1434116_at	Cbx2	クロモボックスホモログ、2(ドロッソフィラPcクラス)	3.15	0.01298	2.21
1456284_at	Tmem171	膜貫通タンパク質171	2.94	0.011378	2.45
1460713_at	BC048355	cDNA配列BC048355	2.61	0.035037	0.67
1438689_at	4632433K11Rik	RIKENcDNA4632433K11遺伝子	2.41	0.04048	0.41
1460187_at	Sfrp1	分泌関連配列タンパク質1	2.37	0.021033	1.51
1420645_at	Pcgf2	Polycombグループリングフィンガー2	2.31	0.003987	4.19
1455547_at	Zc3h7b	ジンクフィンガー-CCCH型含有7B	2.16	0.008352	2.98
1416258_at	Tk1	チミジンキナーゼ1	2.12	0.017451	1.78
1449845_a_at	Ephb4	Eph受容体B4	2.12	0.033002	0.77
1455120_at	Hpd1	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ様	2.07	0.023445	1.30
1417399_at	Gas6	増殖停止特異的6	2.06	0.000167	8.81
1452862_at	Rreb1	Ras応答性要素結合タンパク質1	2.05	0.03901	0.47
1455246_at	NA	NA	2.02	0.032868	0.78
1434322_at	Mical12	MICAL様2	1.99	0.009875	2.69
1428207_at	Bcl7a	B細胞CLL/リンパ腫7A	1.99	0.04708	0.11
1420845_at	Mrps2	ミトコンドリアリボソームタンパク質S2	1.97	0.042267	0.36
1444254_at	NA	NA	1.96	0.025132	1.19
1448656_at	Cacnb3	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	0.032019	0.86
1434908_at	Al480556	発現した配列Al480556	1.95	0.029591	0.99
1424376_at	Cdc42ep1	CDC42エフェクタータンパク質(RhoGTPase結合)1	1.89	0.01298	2.20
1430274_a_at	Stard3nl	STARD3 N末端様	1.88	0.008596	2.92
1416513_at	Lamb2	ラミニン、ベータ2	1.87	0.016398	1.89

10

20

30

40

50

1416536_at	Mum1	メラノーマ関連抗原(変異)1	1.86	0.025132	1.17
NuGO_empt084041_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	0.02461	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	0.003248	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	Aytl2	アクリルトランスフェラーゼ様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	Fgfr1	繊維芽細胞増殖因子受容体様1	1.73	0.02321	1.33
1429582_at	Btbd14a	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スポーターファミリー、メンバー2b1	1.70	0.01298	2.22
1424101_at	Hnrpl	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ポニンホモログ、(GH)ドメイン含有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、メンバー8	1.62	0.04708	0.13
1418671_at	Capn5	カルパイン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キナーゼアノカンタンパク質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

10

20

30

40

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	Gtbp1	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	CCAAT/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、メンバー2	1.47	0.044113	0.28
1434134_at	Wdr42a	WDリピートドメイン、42A	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	カルポニン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	トランスグルタミナーゼ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	Hnrp1	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	シナプトジヤニン2結合タンパク質	-1.19	0.04708	0.15

10

20

30

40

1416281_at	Wdr45l	Wdr45様	-1.22	0.016971	1.84
1418843_at	Slc30a4	溶質キヤリヤーファミリ-30(亜鉛トランスポーター、メンバ-4	-1.30	0.037239	0.54
1459557_at	Zbtb16	ジ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	インターフェロンアルファ応答性遺伝子	-1.32	0.038411	0.50
1448762_at	Rad17	RAD17ホモログ、(S.ポンペ)	-1.32	0.044087	0.30
1435461_at	Magi3	膜関連グアニレートキナーゼ、WW及びPDZドメイン含有3	-1.33	0.044113	0.26
1434835_at	Wpal	ウイングスアパ-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_empt073151_at	Nlrp9b	NLRファミリ-、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_empt081039_at	Eif4e1b	真核翻訳開始因子4Eファミリ-メンバー1B	-1.38	0.037239	0.54
1422217_a_at	Cyp1a1	シトクロームP450、ファミリ-1,サブファミリ-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-システインリリガーゼ、触媒サブユニット	-1.41	0.023137	1.36
1440722_at	D19Ert386e	DNAセグメント、Chr19、ERATODi386、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

10

20

30

40



1453269_at	Unc5b	Unc-5ホモログ、B(C.エレガンス)	-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	Jmjd1c	ジユ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ー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	Elf4h	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	トランスフォーマー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	プロスタグランジン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	ホモシステイン誘導性、小胞体ストレス誘導性、ユビキチン様ドメイン、メンバー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	5830417C01Rik	RIKENcDNA5830417C01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	Marveld3	MARVEL(膜関連)ドメイン含有3	-1.86	4.82E-05	10.38
1454343_at	Ppapdc1	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	RIKENcDNA530065I17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コイルドメイン、s1	-1.91	0.028192	1.04
1442111_at	D430033H22Rik	RIKENcDNA430033H22遺伝子	-1.91	0.007072	3.40

1424451_at	Acaa1b	アセチル補酵素Aクリトランスフェラーゼ1B	-1.92	0.035037	0.67
1459879_at	4921513D23Rik	RIKENcDNA4921513D23遺伝子	-1.92	0.008352	2.99
1428776_at	Slc10a6	溶質キヤリヤーファミリー10(ナトリウム/胆汁酸コトランスポーターファミリー)、メンバー6	-1.92	0.011378	2.45
1458079_at	Usp40	ユビキチン特異的プロテアソーム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-β-ヒドロキシ)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、ポリペプチド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ファミリーメンバー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	Txnrd1	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	Prkcd	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及びCNCホモログ、y2	-2.32	0.027369	1.07
NuGO_empt067737_at	9130230L23Rik	RIKENcDNA9130230L23遺伝子	-2.34	0.04708	0.15

10

20

30

40

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ー7)	-2.40	0.011571	2.40
1459253_at	Artdc3	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ンリッチリピータンパク質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	Rsad2	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	0.003248	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	溶質キャリアヤーファミリー22(有機陽イオントランスポーター、メンバー5)	-2.90	0.021033	1.49
1438660_at	Gcnt2	グルコサミニル(N-アセチル)トランスフェラーゼ2、I-分岐酵素	-2.95	0.018436	1.70
1437759_at	Pfkfb	ホスホフルクトキナーゼ、血小板	-2.97	0.008352	3.11
NuGO_empt050020_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	RapGアニン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

10

20

30

40

1440749_at	NA	NA	-3.38	0.001388	5.76
1440892_at	BC017647	cDNA配列BC017647	-3.52	0.004881	3.85
1441115_at	Rnf125	リングフィンガータンパク質125	-3.90	0.000237	8.14
1421365_at	Fst	ホリスタチン	-4.33	0.04708	0.12
1446972_at	D15Wsu126e	DNAセグメント、Chr15、WayneStateUniversity126、発現	-7.09	0.003054	4.72

10

20

30

40

50

【 0 5 4 8 】

【表 1 3】

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

【 0 5 4 9 】

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ェリント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、Pla2g3、Muc16及びItln、及び腸バリア機能遺伝子Sprr1a、Clcn4、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- $\kappa$ 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.L., 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

【 0 5 5 0 】

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。この時間間隔にわたり、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。

30

【 0 5 5 1 】

R.ホミニスは、主に結腸中でT細胞経路に影響を与える

40

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CTLA-4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 $CH/HeN$ 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】

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- $\kappa$ BのTCR及びCD28共刺激活性化	0.03611	10	40
免疫応答_CTLA-4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

【0554】

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されてきた(Mallia, M., Campbell, R.D. & Aguado, B. 2006, "Characterization of the five novel  $Ly6$  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】

$R$ ・ホミニスフラジェリンは、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

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、フラジェリンは、Th 1、Th 2、Th 17 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】

細菌フラジェリン Fl a A 1 (RH 1) 及び Fl a A 2 (RH 2) の機能性を、固有の R . ホミニスフラジェリン配列に対して作製された、新規可溶性組換えフラジェリンタンパク質を使用して調査した。RH 1 と RH 2 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ェリンと比較し、対比させて、FLT 3 L 又は GM - C S F 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ェ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 6 A)。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 K 1 2 (EC) 又は RH 1 フラジェリンよりも強力であった。RH 1 フラジェリンはまた、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 TLR 5 を発現している上皮細胞を使用して、TLR 5 依存であることが示された。反対に RH 2 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ェ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、インビボにおいて発現したけれども、RH 1 フラジェリンタンパク質は、インビトロにおいて、RH 2 よりも生物学的に活性であり、RH 1 はまた、インビボにて、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 RH 1 フラジェリンが、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、FLT 3 L 及び GM - C S F 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 6 B ~ C)。特に、RH 1 は、C 3 H / He N 及び C 5 7 B 1 / 6 マウス両方からの骨髄誘導 DC s による、I - A / I - E 及び CD 4 0 の上方調節と、IL - 10 の産生を伴った、その FLT 3 L 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、C 5 7 B 1 / 6 DC にて有意に上昇し (図 6 D)、これは、CD 103 + 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、フラジェリンが CD 103 + 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ェリンの機能的重要性を評価するために、無菌 TLR 5 KO と WT マウスを単一定着した。R . ホミニス that 定着した TLR 5 KO 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、TLR 5 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、TLR5 KO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、TLR5 KOマウスの固有層中の二重陽性CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞の数は、単一関連C3H/HeN及びC57Bl6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.ホミニスが単一定着したTLR5 KO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_FcεpsilonRI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FcγR-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】

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、TLR5 KOでは与えなかったという本明細書の観察は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>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<sup>+</sup> T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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

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、フラジェリン - 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., 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)、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TLR5 KOのインパクトが、RH1 (シグナリングフラジェリン) 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ェリン) 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Irf4を含む) TLR5 KO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。

#### 【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、10<sup>9</sup> 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)。

#### 【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。

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。これらの工程に関与する遺伝子は、Agtr、Cartpt、Cck及びCxc112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。

#### 【0564】

これらの遺伝子変化が、食物取込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獲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、しかしまた、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。

#### 【0565】

議論

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、 $10^8$  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., Kirund i, 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 I g A 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 o f 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., E berl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf-Bensussan, N. 2009, "The key role of segmen ted filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell resp onses", 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 filam entous 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., T a k e d a, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induc tion 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XIV a 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 . ホミニスの安定単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されてきた。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、単一関連に続いて、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。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。インビボ実験によって、フラジェ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., 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)。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、IBD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., 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)。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、IBD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., Theil, 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IBD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、Ly6g6c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与する、T細胞調節及び分化に関与する経路、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、IL-10、ICOS及びCTLA-4に関連したものが含まれ、これらは全て、Treg分化を支持することに関与する。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CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞における有意な増加が実証されてきた。これらの発見は、Treg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うる。

#### 【 0 5 7 0 】

フラジェリンシグナルは、宿主 TLR5 受容体によって把握され、多くの病原性フラジェリン構造が、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 を通じたシグナリングが、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りうる (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. ホミニスフラジェリン FlaA1 (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、大腸菌フラジェリン変異体が、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、フラジェリンの発現、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. ホミニスフラジェリンタンパク質は、インビボにて発現したままであり、維持された定着、顕在的炎症と、調節表現型の T 細胞の増殖がないことと相関する。SFB におけるフラジェ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 細胞応答と相関した (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ェ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、他のフラジェリンに比べて、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

10

20

30

40

50

って誘導された T r e g 応答における、フラジェリン - T L R 5 シグナリングの有意差を、T L R 5 K O 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ェリン構造が、C D 1 0 3 + D C 又は T r e g サブセットいずれか上で発現した T L R 5 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., Allan, 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 cells", 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、D S S 処置マウスにて確認された。このデータは、I B D における R . ホミニスの可能性ある治療利益を提案する。

#### 【 0 5 7 1 】

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る遺伝子の調節であった。特に、満腹ホルモン C c k 及び G c g が有意に減少した。食物取込における C c k 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、腸機能と摂収挙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。C c k は、食欲と摂収を刺激する分子の発現を減少させるため、及び摂収を阻害し、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 ( N p y 2 r 及び C a r t p t 、両方が、本研究にて、2 倍下方調節された)。C c k 、G c g 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、C c k と G c g 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 炭素未満の脂肪酸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 C c k 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)。C c k と G c g 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 S C F A 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



-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。フラジェリン産物 RH1 は、好ましく Tregs 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。Treg 分化と増殖を指向することにおける TLR5 の重要性が実証されてきた。合わせると、本データは、片利共生性フラジェリンのさらなる機能性、TLR5 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。

#### 【0573】

機能アッセイ

インビトロモデル

異なる組換えフラジェリンに対する、腸上皮細胞 (IEC, intestinal epithelial cell) の応答の解析

異なる組換えフラジェリン (図 D. 2) 病原性フラジェリン (SE、ST、LF 及び HM) 誘導に対する IEC の刺激後の、CCL20 遺伝子発現 (炎症誘発性遺伝子) の分子解析は、CCL20 mRNA の同様だが同一ではないレベルを誘導し、片利共生性フラジェリンが、非常により可変の誘導レベルを表示した。ER (エウバクテリウム・レクタ 33656)、K12 (大腸菌 K12)、RH1 及び RI3 フラジェリンは、病原体フラジェリンと同様のレベルにて、CCL20 を誘導し、RI1 と RI4 は、中間の刺激性を有し、RH2 は、HT-29 にて CCL20 の低誘導剤として明らかになり、Caco-2 細胞にてアゴニスト潜在力を欠き、RI2 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、TLR5 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。

#### 【0574】

#### 【表16】

表 D2

	Unstim	ST	SE	K12	ER	RI1	RI2	RI3	RI4	RH1	RH2
Unstim		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ST	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SE	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
K12	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI1	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS
RI2	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS
RI3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS
RI4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	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	

#### 【0575】

表 D 2 は、HT-29 (上右) 及び Caco-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 (unstim) 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

。NS (有意差なし) ; \* (  $p < 0.05$  ) ; \* \* (  $p < 0.01$  ) ; \* \* \* (  $p < 0.001$  )。

#### 【0576】

IECにおける組換えフラジェ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、組換えフラジェリンで24時間刺激した (図D3)。

#### 【0577】

フラジェリン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	*	*
RI1	NS	NS	NS	*	*		NS	NS	NS	NS	NS
RI2	NS	NS	**	NS	*	*		*	NS	**	NS
RI3	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		*
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
ST	*		**	NS	*	***	***	NS	***	NS	*
SE	*	NS		NS	NS	***	***	NS	**	NS	**
K12	*	NS	NS		NS	*	*	NS	*	NS	**
ER	*	NS	NS	NS		**	**	**	**	*	NS
RI1	NS	*	*	*	*		NS	*	**	NS	NS
RI2	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
ER						NS	NS	NS	NS	NS	NS
RI1							NS	NS	NS	NS	NS
RI2								NS	NS	NS	NS
RI3									NS	NS	NS
RI4										NS	NS
RH1											NS
RH2											

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	**
ER						*	*	NS	*	*	*
RI1							NS	NS	NS	*	NS
RI2								NS	NS	*	NS
RI3									NS	NS	*
RI4										NS	NS
RH1											NS
RH2											

#### 【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、フラジェリンの片利共生性又は病原性起源から独立して、フラジェ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、フラジェ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、骨髓細胞を、10% FCS及び20 ng/mL rmGM-CSFを補充したRPMI中、 $1 \times 10^6$  / mLにて再懸濁させ、100 mm<sup>2</sup> 組織培養プレート中、10 mL / 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

20

30

40

50

GM-CSF 補充培地で、12 ウェル組織培養プレート中、 $1 \times 10^6$  / mL で再プレatingした。5 日目に細胞を  $100 \text{ ng/mL}$  フラジェリンで刺激して、6 日目に回収した。Flt3L 誘導樹状細胞のために、骨髓細胞を、10% FCS 及び  $200 \text{ ng/mL}$  rmFlt3 を補充した RPMI 中、 $2 \times 10^6$  / mL で再懸濁し、2 mL / 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  $100 \text{ ng/mL}$  フラジェリンで刺激し、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】

組換えフラジェリンで刺激した GM-CSF / IL-4 誘導樹状細胞 (図 D5) 及び Flt3L 誘導樹状細胞 (図 D6) のフローサイトメトリー解析を実施した。フラジェリン Rh1 は、片利共生性フラジェリン K12 及び Er と、病原性フラジェリン SE 及び ST に対して同様の応答を持つ、Ri4 及び Ri3 を有する GM-CSF / IL-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。Rh2 と反対に、Ri2 は、GM-CSF / IL-4 誘導樹状細胞との細胞応答を誘導せず、しかし、Flt3L 誘導樹状細胞に対する細胞応答を有意に増加した。これらのフラジェリン、とりわけ Ri1 は、Flt3L 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ェリンの特異性を示す。これらの Flt3L 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

BOY / J WT 及び TLR5 KO マウスを使用して、R. ホミニス 及び その フラジェリンの機能的な重要性を評価した。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 (Treg) 細胞のフローサイトメトリー解析を実施した (図 6A 及び B)。CD4 + T 細胞集団中の FoxP3 + CD25 + 細胞の百分率は、TLR5 KO マウスと比較して、BOY / 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ェリンが、CD4 + FoxP3 + CD25 + 制御性 T 細胞を促進することによって、Tregs に影響を与えることを示唆する。したがって、フラジェリンが、TLR5 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、及び/又はポリペプチド FlaA1、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。

#### 【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、及び/又はポリペプチド FlaA1、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。

【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、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。

【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、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。

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、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。

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、セリアック病、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、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。

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、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。

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、機能的消化不良、(抗生物質関連下痢、旅行者下痢及び小児下痢を含む)機能的下痢、機能的腹痛、機能的腫脹、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、壊死性腸炎、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、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。

【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・インテスチナリスなどの）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。

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・インテスチナリスなどの）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。

【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・インテスチナリスなどの）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。

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・インテスチナリスなどの）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。

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・インテスチナリスなどの）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

【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、MobA及びMobL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・インテスチナリスなどの）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。

50

## 【0600】

15. Fla A 1、Fla 2、Fla A 3 及び Fla B 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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【0601】

16. 以下の、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、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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【0602】

17. Agt、Cartpt、Cck、Cxc112 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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【0604】

19. T細胞調節に関係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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【0605】

20. 上行結腸における Ly 6 g 6 c 及び Ly 6 g 6 e 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、及び/又はポリペプチド Fla 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。

## 【0606】

21. Tlr5、Tlr1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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。

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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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の使用。

## 【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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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の使用。

30

## 【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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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。

【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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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。

【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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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。

【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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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。

【0617】

32. 医薬における使用のための、(細菌種ロゼブリア・ホミニス、又は細菌種ロゼブリア・インテスチナリスなどの)ロゼブリア属菌、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、及び/又はポリペプチドFlaA1、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、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・インテスチナリスなどの)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・インテスチナリスなどの)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・インテスチナリスなどの)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。

【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・インテスチナリスなどの)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・インテスチナリスなどの)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

## 【 0 6 2 6 】

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。

## 【 0 6 2 7 】

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。

## 【 0 6 2 8 】

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。

## 【 0 6 2 9 】

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 F l 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。

## 【 0 6 3 0 】

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 F l 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。

## 【 0 6 3 1 】

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 F l 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。

## 【 0 6 3 2 】

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。

## 【 0 6 3 3 】

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。

## 【 0 6 3 4 】

1 0 . 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 F l 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。

## 【 0 6 3 5 】

1 1 . 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 1 0 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

## 【 0 6 3 6 】

1 2 . 前記障害が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、1 型糖尿病、セリアック病、アトピー性皮膚炎、鼻炎、過敏性腸症候群 ( I B S ) 、大腸炎、炎症性腸障害 ( I B D ) 、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、壊死性腸炎、及びそれらの組合せからなる群から選択される、段落 1 0 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

## 【 0 6 3 7 】

1 3 . 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 F l 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。

## 【 0 6 3 8 】

1 4 . 樹状細胞及び / 又は上皮細胞を活性化する、段落 1 3 に記載のポリペプチド又はポリヌクレオチド。

## 【 0 6 3 9 】

1 5 . 対象の 1 又は 2 以上の細胞における I L - 1 0 及び / 又は T G F の産生を調節するのに使用するための、ポリペプチド F l 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。

## 【 0 6 4 0 】

10

20

30

40

50

16. IL-10の産生が、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. IL-10及び/又はTGFの産生を上方調節する、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CD40及び/又はI-A/I-Eの産生を調節するのに使用するための、ポリペプチドFlaA1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. CD40及び/又はI-A/I-Eの産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. CD40及び/又はI-A/I-Eの産生を上方調節する、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IFN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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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(Cck)及び/又はグルカゴン(Gcg)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(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、ポリペプチドFlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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FlaA1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。

【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FlaA1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。

40

【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 $\beta$ 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FlaA1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 $\beta$ 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FlaA1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FlaA1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】

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FlaA1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FlaA1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】

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FlaA1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FlaA1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】

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FlaA1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FlaA1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FlaA1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。

【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FlaA1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FlaA1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FlaA1又は前記ポリペプチドをコードするポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列の使用。

【 0 6 8 0 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 1 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 2 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 3 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 4 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 5 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 6 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 7 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 8 】

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の、ポリペプチドFlaA1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。

【 0 6 8 9 】

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FlaA1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。

【 0 6 9 0 】

(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 gen-  
etic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut", *PLoS geneti-  
cs*, 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., Curt-  
iss, R., 3rd, McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2010, "Reversible microbial coloniza-  
tion of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses", *Science (N-  
ew York, N.Y.)*, vol. 328, no. 5986, pp. 1705-1709.

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 respons-  
e 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. 200  
1, "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestin-  
e", *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 transp-  
lantation recipients while enhancing antiviral immunity", *Journal of immunology*  
(Baltimore, Md.: 1950), vol. 187, no. 10, pp. 5130-5140.

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 intesti-  
nal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 48  
5-498.

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 reveal-  
ed by a custom phylogenetic microarray", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 16, n  
o. 12, pp. 2034-2042.

Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., P-  
ettersson, S. & Conway, S. 2004, "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inf-  
lamination by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA", *N-  
ature 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 flagelli-  
n enhances mucosal innate immune defense", *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 276-287

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 infla-  
mmatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a fla-  
gellated pathogen", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 186, no.  
9, pp. 5406-5412.

Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis I., Ballet V., Claes K.  
, Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeire S. 2013, "Predominant dys-  
biosis in patients with ulcerative colitis is different from Crohn's disease pat-  
ients", *Inflammatory Bowel Diseases*. 8th Congress of ECCO, Feb 14-16, 2013.

Macpherson, A.J. 2006, "IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in

10

20

30

40

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.

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.

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.

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., Jaensson, 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.

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.

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.

10

20

30

40

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008 Feb 8;9

: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.

(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, Jaensson 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.

(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.

(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されてきたが、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。



【図 2 - 2】

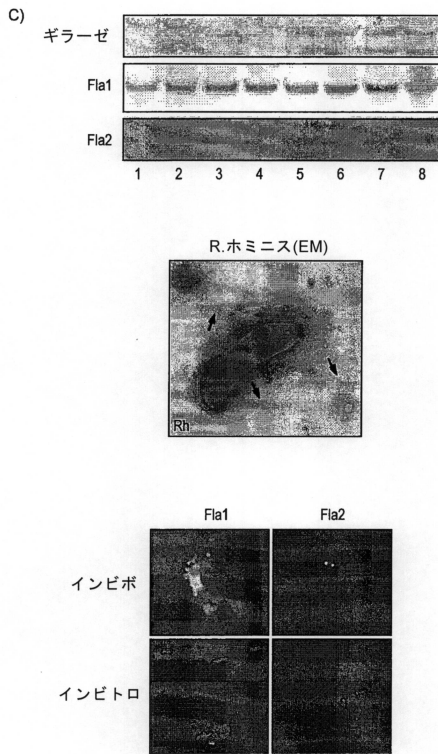


FIG. 2

【図 2 A】

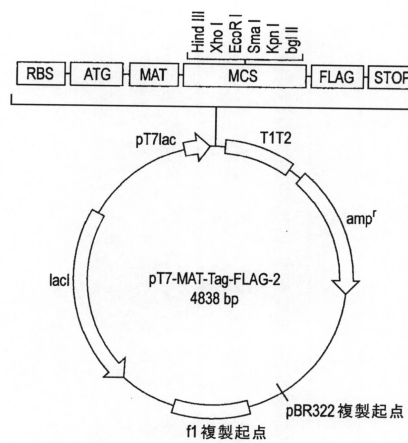


FIG. 2A

【図 2 - 3】

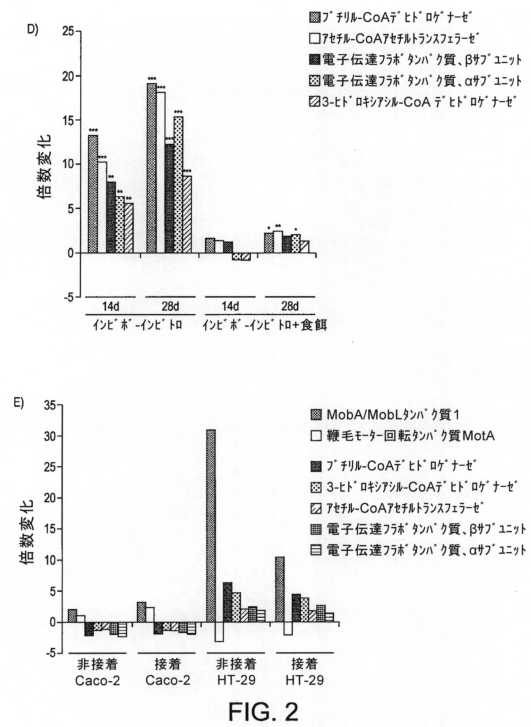


FIG. 2

【図 3 - 1】

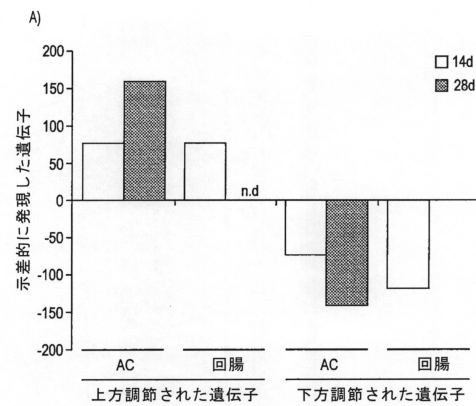
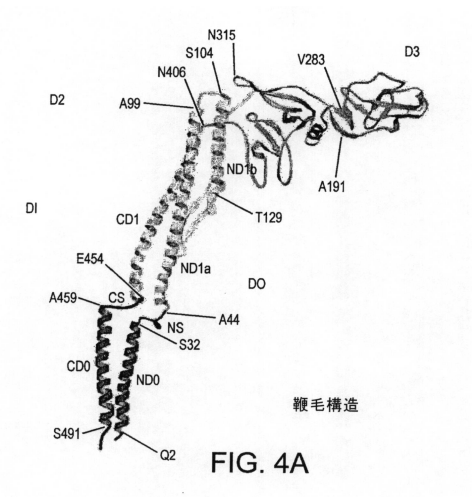


FIG. 3

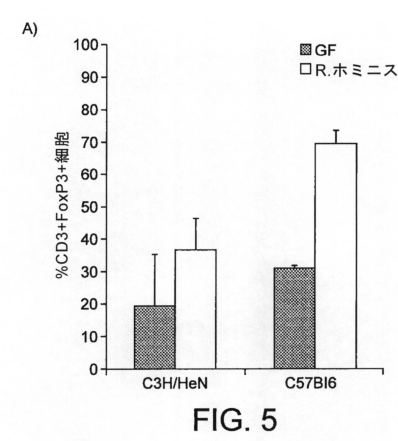




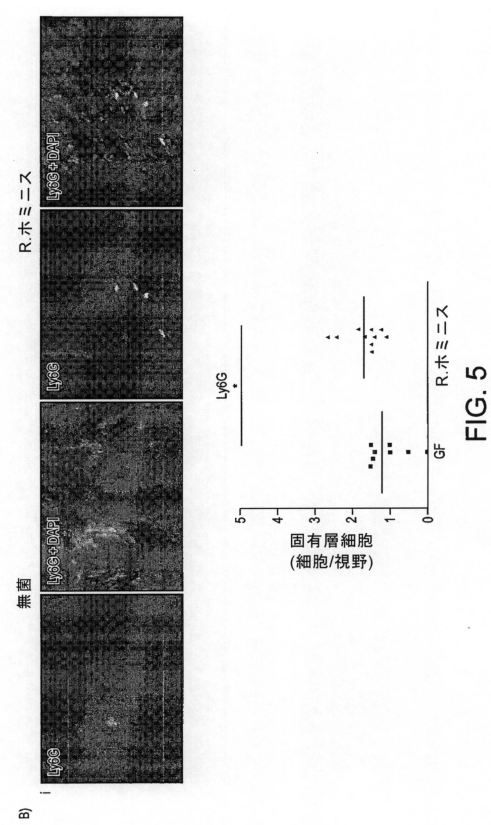
【図 4 A】



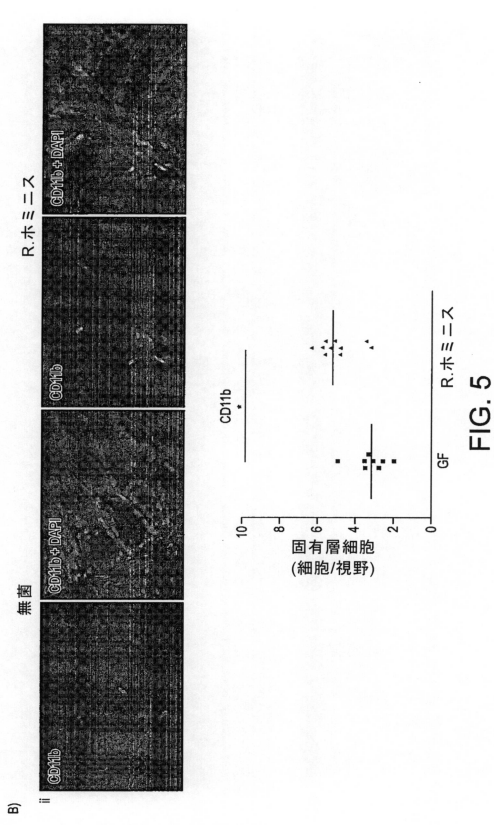
【図 5 - 1】



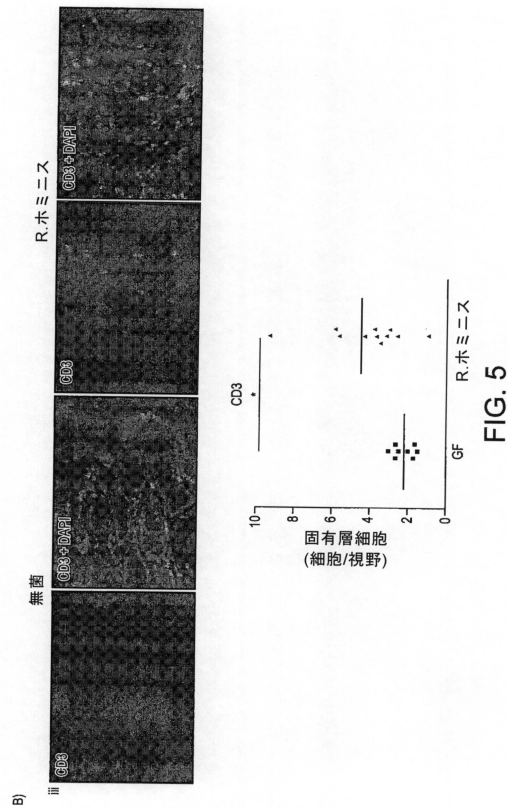
【図 5 - 2】



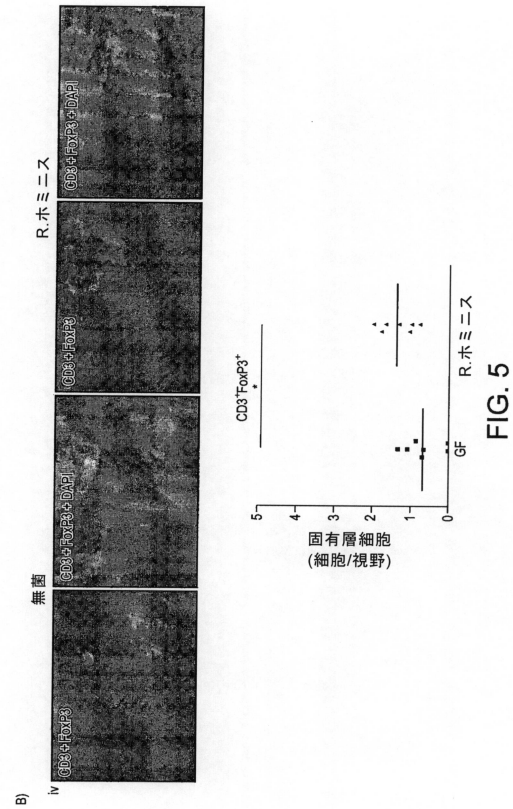
【図 5 - 3】



【図 5 - 4】



【図 5 - 5】



【図 6 - 1】

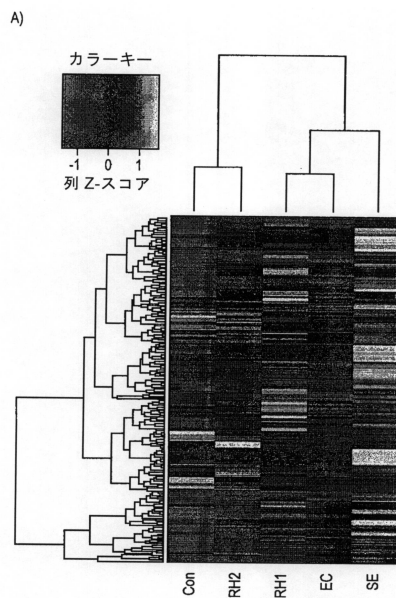
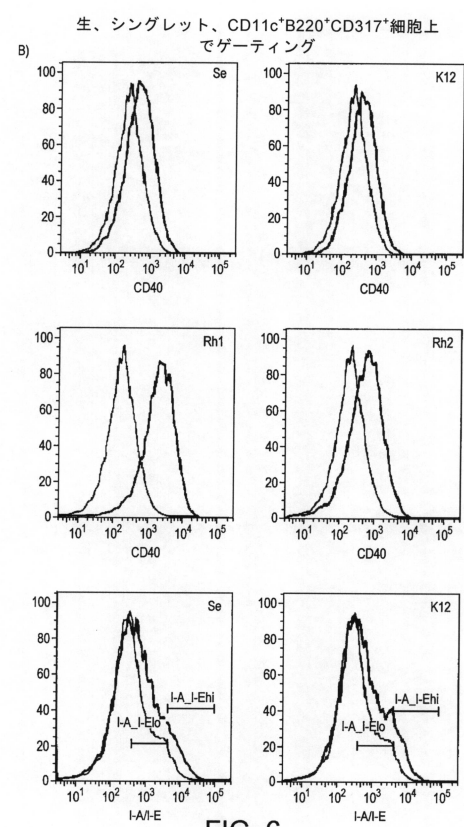
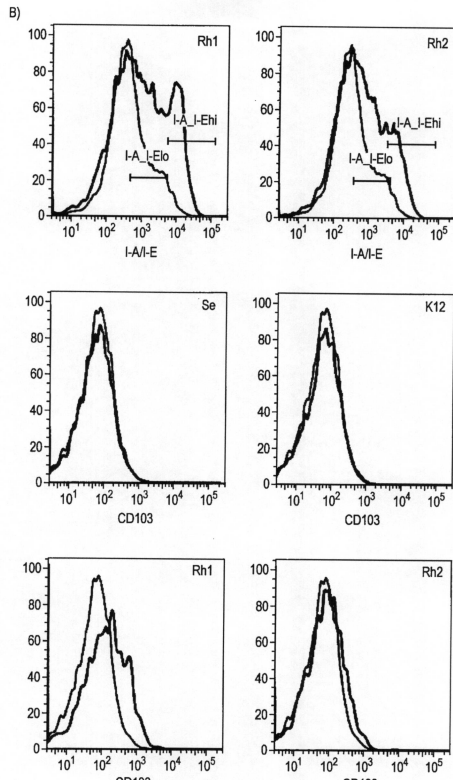


FIG. 6

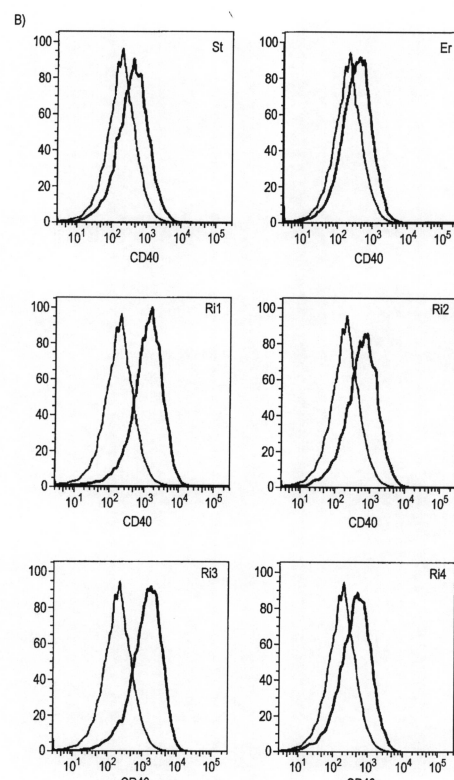
【図 6 - 2】



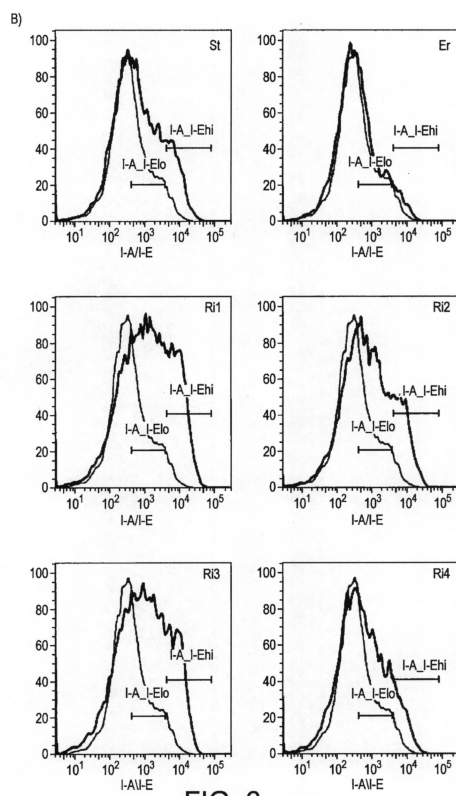
## 【 図 6 - 3 】



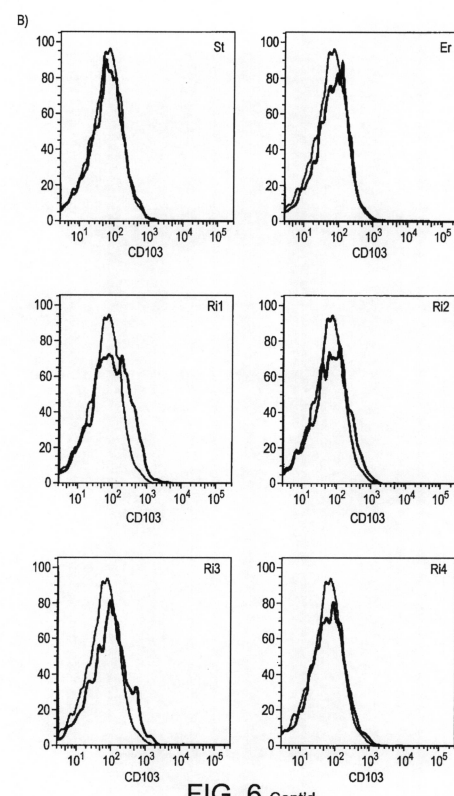
## 【 図 6 - 4 】



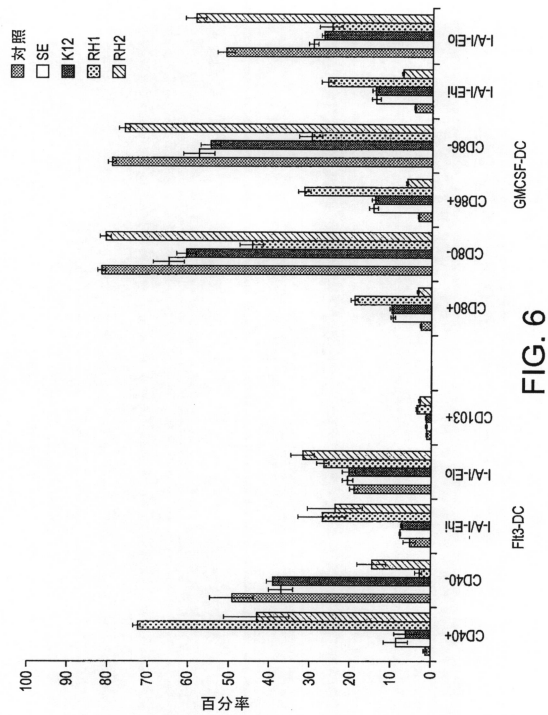
## 【 図 6 - 5 】



## 【 図 6 - 6 】

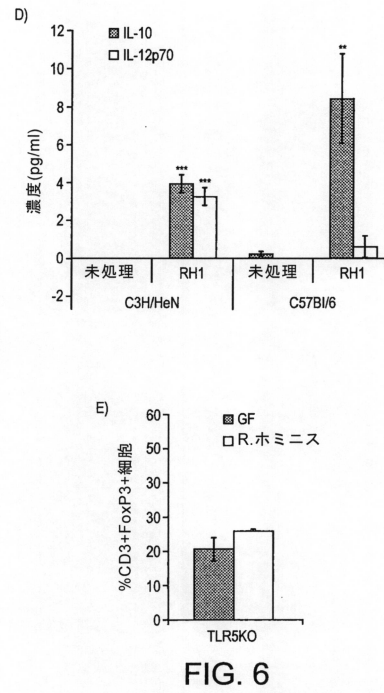


【図 6 - 7】

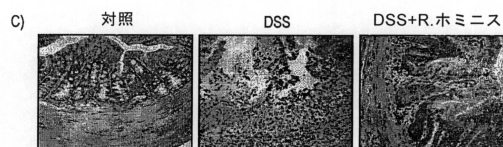
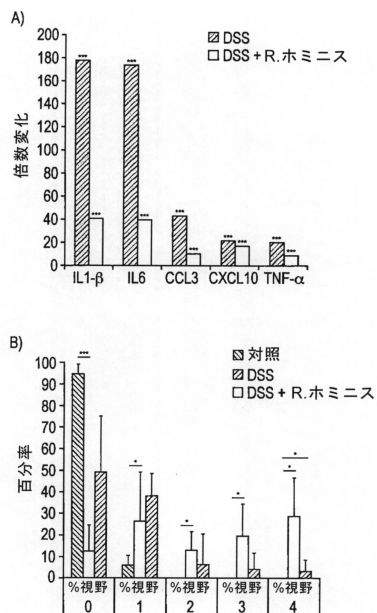


G

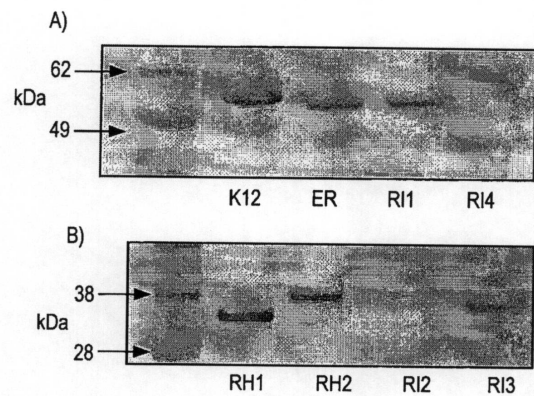
【図 6 - 8】



【図 7】



【図 B 1】





## 【図 C 1 - 1】

鞭毛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

RIFa1 RIEEV02820	ATGCGTGGCGGAGACATAGAAAGGAGAAACAGAATGAGAATTAATACAATGTGTGACGA 60 ATGCGTGGCGGAGACATAGAAAGGAGAAACAGAATGAGAATTAATACAATGTGTGACGA 60
RIFa1 RIEEV02820	GCGATTGCGAATAAACATTTACTTGAATTTAGGATAATTTAAGTGCATCGATGGAACGG 120 GCGATTGCGAATAAACATTTACTTGAATTTAGGATAATTTAAGTGCATCGATGGAACGG 120
RIFa1 RIEEV02820	CTTTCATCGGACTTAAGATCAACATTTCAAGGACAATCCGCGAGGAATGGCTATTTC 180 CTTTCATCGGACTTAAGATCAACATTTCAAGGACAATCCGCGAGGAATGGCTATTTC 180
RIFa1 RIEEV02820	AACAAGATGAAAGCAGAGTTGATGGTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATCGATGGT 240 AACAAGATGAAAGCAGAGTTGATGGTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATCGATGGT 240
RIFa1 RIEEV02820	ATTTCTGTATTTCAGATCGCAGATGGTGGCTGAGTGAACGACCAAGTATTTTACAGCGT 300 ATTTCTGTATTTCAGATCGCAGATGGTGGCTGAGTGAACGACCAAGTATTTTACAGCGT 300
RIFa1 RIEEV02820	ATGAGAGAACTTCCGTGCAGGCGAGGTGATGCAACAATGACACCGCGGATAAAGAA 360 ATGAGAGAACTTCCGTGCAGGCGAGGTGATGCAACAATGACACCGCGGATAAAGAA 360
RIFa1 RIEEV02820	GCAATCCAGAAAGAACTCACTTATTAAGATGAAGTTGACCGTATTTTACAGATACA 420 GCAATCCAGAAAGAACTCACTTATTAAGATGAAGTTGACCGTATTTTACAGATACA 420
RIFa1 RIEEV02820	GAGTATAACAGCAAAACACTTTAGATGGTTCATTAGATACCGAGGTTTACACCAAAAT 480 GAGTATAACAGCAAAACACTTTAGATGGTTCATTAGATACCGAGGTTTACACCAAAAT 480
RIFa1 RIEEV02820	GCAACAAGAGTGGACATTTCTGATCATGTGAAGCAGGACAGATACAGCTTTCATTGAT 540 GCAACAAGAGTGGACATTTCTGATCATGTGAAGCAGGACAGATACAGCTTTCATTGAT 540
RIFa1 RIEEV02820	ACTGCAGCTACACAGGCCGACCGGTAACAGCAAAATCAGAATTATAATTCACAGCACC 600 ACTGCAGCTACACAGGCCGACCGGTAACAGCAAAATCAGAATTATAATTCACAGCACC 600

FIG. C1

## 【図 C 1 - 2】

RIFa1 RIEEV02820	GTGCGTGGCTCCGGAACATGAGTATTAATGGTCTAAAGTAGAGATAGAGGACGCCAG 660 GTGCGTGGCTCCGGAACATGAGTATTAATGGTCTAAAGTAGAGATAGAGGACGCCAG 660
RIFa1 RIEEV02820	ACCTATGCGGAGGCTTTTGAAGAGTACAGAAATGCAGCAGAGACTGGTGAACACCGTT 720 ACCTATGCGGAGGCTTTTGAAGAGTACAGAAATGCAGCAGAGACTGGTGAACACCGTT 720
RIFa1 RIEEV02820	AAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTTCATTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATC 780 AAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTTCATTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATC 780
RIFa1 RIEEV02820	TTAGAGATCGCATTTGATGATAAGCAGCTTGCTAATGCACCTTGGATTACAGCAGACGA 840 TTAGAGATCGCATTTGATGATAAGCAGCTTGCTAATGCACCTTGGATTACAGCAGACGA 840
RIFa1 RIEEV02820	GGAACAGTGTGTGAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAGCTATGTATACGACAGATTGAG 900 GGAACAGTGTGTGAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAGCTATGTATACGACAGATTGAG 900
RIFa1 RIEEV02820	AATGGCAAAGTGATGCTACCTTCCGGTACAGATGCCGAAGTAAACGCTCAAAAACCGAGT 960 AATGGCAAAGTGATGCTACCTTCCGGTACAGATGCCGAAGTAAACGCTCAAAAACCGAGT 960
RIFa1 RIEEV02820	GATGGAACCGGATTTGGTGATACAGCTACCGTAAAAACAGATGAAATTAAGATTACGGTT 1020 GATGGAACCGGATTTGGTGATACAGCTACCGTAAAAACAGATGAAATTAAGATTACGGTT 1020
RIFa1 RIEEV02820	ACAGACAGAGCCGGATTGAGATGTCATTTCTGCTGATGACGAGTTATACGGTAAGCTG 1080 ACAGACAGAGCCGGATTGAGATGTCATTTCTGCTGATGACGAGTTATACGGTAAGCTG 1080
RIFa1 RIEEV02820	GATTTTGATGTCACGGATACGGAACGATGGCACTTCAATTTGAGCAAAATGAGGATCAG 1140 GATTTTGATGTCACGGATACGGAACGATGGCACTTCAATTTGAGCAAAATGAGGATCAG 1140
RIFa1 RIEEV02820	GAAACAAGAGTGCATTTCCGGAGGTTTCCCTGCAAGAGCTTTACATTGATGATGACAG 1200 GAAACAAGAGTGCATTTCCGGAGGTTTCCCTGCAAGAGCTTTACATTGATGATGACAG 1200
RIFa1 RIEEV02820	GTGACGACTGTAATGGAGCAGCAGAGGTATCACACAGTTTGACGATGCCATTTCAAAG 1260 GTGACGACTGTAATGGAGCAGCAGAGGTATCACACAGTTTGACGATGCCATTTCAAAG 1260
RIFa1 RIEEV02820	GTCAAGTGAAGTGCCTTCAAGACTTGGTGATACCAAGATCGTCTTGAGAGTACGGTATCA 1320 GTCAAGTGAAGTGCCTTCAAGACTTGGTGATACCAAGATCGTCTTGAGAGTACGGTATCA 1320
RIFa1 RIEEV02820	AGCCTGGATACGTTTGAAGAAAAATGACAGGAGCCAGTCACGACTGACAGATGCGGAT 1380 AGCCTGGATACGTTTGAAGAAAAATGACAGGAGCCAGTCACGACTGACAGATGCGGAT 1380
RIFa1 RIEEV02820	ATGGCATCGGAAATGACAGATTATACACATCAGAAATGTAATTAATCGAGCAGCAATCTCT 1440 ATGGCATCGGAAATGACAGATTATACACATCAGAAATGTAATTAATCGAGCAGCAATCTCT 1440
RIFa1 RIEEV02820	GTTTTGACACAGGCAACGATCTGCCACAGCAGGATTTGACAGATTCTGCAGTAA 1494 GTTTTGACACAGGCAACGATCTGCCACAGCAGGATTTGACAGATTCTGCAGTAA 1494

FIG. C1 Cont'd

## 【図 C 2】

CLUSTAL2.1多重配列アライメント

RIFa2 RIEEV02466	ATGGTAGTTAATCAATAATATGGCATGTCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60 ATGGTAGTTAATCAATAATATGGCATGTCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60
RIFa2 RIEEV02466	AAGAACATGGAGAAGTCTTCAAAAAGCTGGCAACAGGTTATAAATGCTTGGAGCAAA 120 AAGAACATGGAGAAGTCTTCAAAAAGCTGGCAACAGGTTATAAATGCTTGGAGCAAA 120
RIFa2 RIEEV02466	GATGATGACGAGGATTACAGATATCAGAAACATGCTCATCAGACAGAGGTTCTTAAC 180 GATGATGACGAGGATTACAGATATCAGAAACATGCTCATCAGACAGAGGTTCTTAAC 180
RIFa2 RIEEV02466	AAAGCATCAGAAATTCGCAAGATGGAATAGTATGCTGACAGACAGAGTGCAGCATT 240 AAAGCATCAGAAATTCGCAAGATGGAATAGTATGCTGACAGACAGAGTGCAGCATT 240
RIFa2 RIEEV02466	CAGGAGACACAGGAAGTGTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGACGATGAT 300 CAGGAGACACAGGAAGTGTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGACGATGAT 300
RIFa2 RIEEV02466	ATCAATACGGATGCGGATCGTGTGCAATTCAGGATGAAATCGATCAGTTAAATCAGGAA 360 ATCAATACGGATGCGGATCGTGTGCAATTCAGGATGAAATCGATCAGTTAAATCAGGAA 360
RIFa2 RIEEV02466	GTGGATCGTATTGCATATACGACGAATTTTAAATCAGCAGTATATATTAGCGGATGGA 420 GTGGATCGTATTGCATATACGACGAATTTTAAATCAGCAGTATATATTAGCGGATGGA 420
RIFa2 RIEEV02466	CCGACGGCAAGACAGGATACATATATGATACAGACAGGAAGTCTTGGGACAGGGAATA 480 CCGACGGCAAGACAGGATACATATATGATACAGACAGGAAGTCTTGGGACAGGGAATA 480
RIFa2 RIEEV02466	GAGATTAAGTTTGTAAATGCGAGCAAGAGAGCTTGGGTGTGACAAAGGTTGATGATCA 540 GAGATTAAGTTTGTAAATGCGAGCAAGAGAGCTTGGGTGTGACAAAGGTTGATGATCA 540
RIFa2 RIEEV02466	TCGCATGCAAAAGCGACAGAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATGAAAGGCGAGCT 600 TCGCATGCAAAAGCGACAGAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATGAAAGGCGAGCT 600
RIFa2 RIEEV02466	TCGTTTAGAGATACATTTGGGGCACAACAGGAGCGGTTAGAACACGCATTGCGTGGAA 660 TCGTTTAGAGATACATTTGGGGCACAACAGGAGCGGTTAGAACACGCATTGCGTGGAA 660
RIFa2 RIEEV02466	GATAATACATCAAGAAATACAGAGGGCGAGAATCAAGTAGACGCGATACCAACATGAAT 720 GATAATACATCAAGAAATACAGAGGGCGAGAATCAAGTAGACGCGATACCAACATGAAT 720
RIFa2 RIEEV02466	ATGAGATGGTACAATTTCTCAAAACCGTATTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTTA 780 ATGAGATGGTACAATTTCTCAAAACCGTATTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTTA 780
RIFa2 RIEEV02466	GCACAGTACAATGATGATGCAAAATATGTGTTGGAAATGTTAAATAG 828 GCACAGTACAATGATGATGCAAAATATGTGTTGGAAATGTTAAATAG 828

FIG. C2

## 【図 C 3】

CLUSTAL2.1多重配列アライメント

RIFa3 RIEEV00779	ATGGTAGTACAGCACAAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTAGGCGTTACAACA 60 ATGGTAGTACAGCACAAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTAGGCGTTACAACA 60
RIFa3 RIEEV00779	AGCGCACAGGCAAAATCTTACAGAGAAATATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGACGGT 120 AGCGCACAGGCAAAATCTTACAGAGAAATATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGACGGT 120
RIFa3 RIEEV00779	GATGACGCTGCTGGTTTAAACAAATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGTTGGATTAAC 180 GATGACGCTGCTGGTTTAAACAAATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGTTGGATTAAC 180
RIFa3 RIEEV00779	AAAGCTTCTGACAACGACAGGATGGTATTTCTTAAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCAATTA 240 AAAGCTTCTGACAACGACAGGATGGTATTTCTTAAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCAATTA 240
RIFa3 RIEEV00779	TCTGAGACACATTTCTATCTTACAGCTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGAT 300 TCTGAGACACATTTCTATCTTACAGCTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGAT 300
RIFa3 RIEEV00779	ACCAATACAACCTGCTGATAGAGGAGCTATTCAGGATGAGATCAACCAAGTTAAATCTGAG 360 ACCAATACAACCTGCTGATAGAGGAGCTATTCAGGATGAGATCAACCAAGTTAAATCTGAG 360
RIFa3 RIEEV00779	ATTAACAGAATCTCTTCAACACTCAGTTCAATCTCAGAACCTCATCGATGGTACATTT 420 ATTAACAGAATCTCTTCAACACTCAGTTCAATCTCAGAACCTCATCGATGGTACATTT 420
RIFa3 RIEEV00779	GCAAAATAAAACCTTCAGGTTGGTTCTATCTGTTGACAGAGAATTAAGTTTCTATCGAC 480 GCAAAATAAAACCTTCAGGTTGGTTCTATCTGTTGACAGAGAATTAAGTTTCTATCGAC 480
RIFa3 RIEEV00779	AGTATGCTGCTGGTAGCTTAAATGATCTGCTAATCTAGTAAAGGTTAAACATTTTCAGT 540 AGTATGCTGCTGGTAGCTTAAATGATCTGCTAATCTAGTAAAGGTTAAACATTTTCAGT 540
RIFa3 RIEEV00779	GCAGCAGGTGAAGCAATGCTCAATATTCAGGTTGCTATTTCTGCAATTTCTACACAGCGT 600 GCAGCAGGTGAAGCAATGCTCAATATTCAGGTTGCTATTTCTGCAATTTCTACACAGCGT 600
RIFa3 RIEEV00779	TCTTACTTAGGAGCTCTTCAAGATGCTGTCGAGCATACAATCTCCAATTTGGACAACT 660 TCTTACTTAGGAGCTCTTCAAGATGCTGTCGAGCATACAATCTCCAATTTGGACAACT 660
RIFa3 RIEEV00779	TCGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTTGATACAGATATGGCTGAAGAGATG 720 TCGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTTGATACAGATATGGCTGAAGAGATG 720
RIFa3 RIEEV00779	GTTACTTACAGCAAGAACTATTTCTGCTCAGGACGAGCTATGCTGCTCAGGCT 780 GTTACTTACAGCAAGAACTATTTCTGCTCAGGACGAGCTATGCTGCTCAGGCT 780
RIFa3 RIEEV00779	AACCACTTACTCAGGTTGATCTTCTGCTTACAGTAA 819 AACCACTTACTCAGGTTGATCTTCTGCTTACAGTAA 819

FIG. C3

## 【図 C 4 - 1】

CLUSTAL2.1 多重配列アライメント

```

RIFla4      ATGGCAATGGTAGTACAGCACAAATGTCGCGAATGAATGCGAACAGAAATTAGGTGTT 60
RIEU99488   ATGGCAATGGTAGTACAGCACAAATGTCGCGAATGAATGCGAACAGAAATTAGGTGTT 60

RIFla4      ACAACAGGAATGCAGGCAAAATCATCAGAGAAGTTATCTCCGGTTACAAGATCAACCGT 120
RIEU99488   ACAACAGGAATGCAGGCAAAATCATCAGAGAAGTTATCTCCGGTTACAAGATCAACCGT 120

RIFla4      GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTTCTATTCTGAGAAGATGAGAAGCAGATCCGCGT 180
RIEU99488   GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTTCTATTCTGAGAAGATGAGAAGCAGATCCGCGT 180

RIFla4      TTAATAAAGCATCTGCAATGCACAGGATGTTATCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA 240
RIEU99488   TTAATAAAGCATCTGCAATGCACAGGATGTTATCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA 240

RIFla4      GCATTAATGAGTCCCACTCTATTTACAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGCAGCC 300
RIEU99488   GCATTAATGAGTCCCACTCTATTTACAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGCAGCC 300

RIFla4      AACGGTACAGAGCAGATGACGACCGCGAGGCGAGTACAGAACGAGGTTCCCACTACAG 360
RIEU99488   AACGGTACAGAGCAGATGACGACCGCGAGGCGAGTACAGAACGAGGTTCCCACTACAG 360

RIFla4      GAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAACAGAGTTCAACACGATGAAGCTGCTGGATGGT 420
RIEU99488   GAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAACAGAGTTCAACACGATGAAGCTGCTGGATGGT 420

RIFla4      TCTCAGAGTGAAGTACATCTTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA 480
RIEU99488   TCTCAGAGTGAAGTACATCTTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA 480

RIFla4      ACATTAGACGGTGCACCTGTAACATCTAACGTGAAAGGATTAAGTAGCAACAGCAGCT 540
RIEU99488   ACATTAGACGGTGCACCTGTAACATCTAACGTGAAAGGATTAAGTAGCAACAGCAGCT 540

RIFla4      GCCACAACAACAAAGGCGAGTCAAGGAGCTGCTATCTGGGCTGCTGATGGAAGACATTA 600
RIEU99488   GCCACAACAACAAAGGCGAGTCAAGGAGCTGCTATCTGGGCTGCTGATGGAAGACATTA 600

RIFla4      ACTTTAAATCTTTGAAAAATAAGGTATATACACAGGACGAAATGATGACTTGTATGCA 660
RIEU99488   ACTTTAAATCTTTGAAAAATAAGGTATATACACAGGACGAAATGATGACTTGTATGCA 660

RIFla4      AATGCAAAACAGGAAGCAGTCTGCAACGGGTGCACCGGCTGAAGTGAAGATCTTTA 720
RIEU99488   AATGCAAAACAGGAAGCAGTCTGCAACGGGTGCACCGGCTGAAGTGAAGATCTTTA 720

RIFla4      AAGAATGGTATTTTAAATGAGATGACAGACAACTGCCGGAATGTAAACAGCCGGTGGT 780
RIEU99488   AAGAATGGTATTTTAAATGAGATGACAGACAACTGCCGGAATGTAAACAGCCGGTGGT 780

```

FIG. C4

## 【図 C 4 - 2】

```

RIFla4      GTGAAGGCAGTATCTGATGAAGGAACAGTAACCTGGATTGTTGGTGAGATCAATTC 840
RIEU99488   GTGAAGGCAGTATCTGATGAAGGAACAGTAACCTGGATTGTTGGTGAGATCAATTC 840

RIFla4      TTACGGCAAAATAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATATCTATTAAATCAAAATTTGAT 900
RIEU99488   TTACGGCAAAATAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATATCTATTAAATCAAAATTTGAT 900

RIFla4      AAGGCAGCAGGCAAGAAGAAGTACAGACAATACAGCAATGAAATTTGATGGAGCAAT 960
RIEU99488   AAGGCAGCAGGCAAGAAGAAGTACAGACAATACAGCAATGAAATTTGATGGAGCAAT 960

RIFla4      GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGAGCAGGCAAGAATATACGGCAGAA 1020
RIEU99488   GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGAGCAGGCAAGAATATACGGCAGAA 1020

RIFla4      GATTAGAAGATGTTCTTAAACGGCAGGATTCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGAAAT 1080
RIEU99488   GATTAGAAGATGTTCTTAAACGGCAGGATTCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGAAAT 1080

RIFla4      ACACCATGAGCCAATCTTTTGTGCAACGAGTGGCGCATCACTGTGACTGATATT 1140
RIEU99488   ACACCATGAGCCAATCTTTTGTGCAACGAGTGGCGCATCACTGTGACTGATATT 1140

RIFla4      ACAATGGGTGCTGGCACCGCGGAGCTGGTCTTGAAGTACAGATGCTATGTGGGGCA 1200
RIEU99488   ACAATGGGTGCTGGCACCGCGGAGCTGGTCTTGAAGTACAGATGCTATGTGGGGCA 1200

RIFla4      GCTGGTTATGACAGT-TATCTTCTGGTCTGGCATCTACCTTCAGATTTGGTCAATGAA 1259
RIEU99488   GCTGGTTATGACAGTGTATCTTCTGGTCTGGCATCTACCTTCAGATTTGGTCAATGAA 1260

RIFla4      GGTCAACCATGAGTTCTCTATCATGACATGAGTGAAGAGCACTTGGCTAGATGGC 1319
RIEU99488   GGTCAACCATGAGTTCTCTATCATGACATGAGTGAAGAGCACTTGGCTAGATGGC 1320

RIFla4      AACAAAGTTGATTAAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGCAACTGATACCATGATGCA 1379
RIEU99488   AACAAAGTTGATTAAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGCAACTGATACCATGATGCA 1380

RIFla4      GCAATCAAGAAAGTATCTGACACGCGTGTAGATGGGTGCGATCCAGAACCCCTGAG 1439
RIEU99488   GCAATCAAGAAAGTATCTGACACGCGTGTAGATGGGTGCGATCCAGAACCCCTGAG 1440

RIFla4      CACACCATCAGCAACTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCGAGCTCAGAGTCCCGTATC 1499
RIEU99488   CACACCATCAGCAACTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCGAGCTCAGAGTCCCGTATC 1500

RIFla4      CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGGTTGAGTACTTCAAGAACAACATCTTGACAG 1559
RIEU99488   CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGGTTGAGTACTTCAAGAACAACATCTTGACAG 1560

RIFla4      GCAGGTCACTATGCTTGACAGGCGAACCAGTCTACACAGGGTGACTCTCTTATTA 1619
RIEU99488   GCAGGTCACTATGCTTGACAGGCGAACCAGTCTACACAGGGTGACTCTCTTATTA 1620

RIFla4      CAGTAA 1625
RIEU99488   CAGTAA 1626

```

FIG. C4 Cont't

## 【図 D 2】

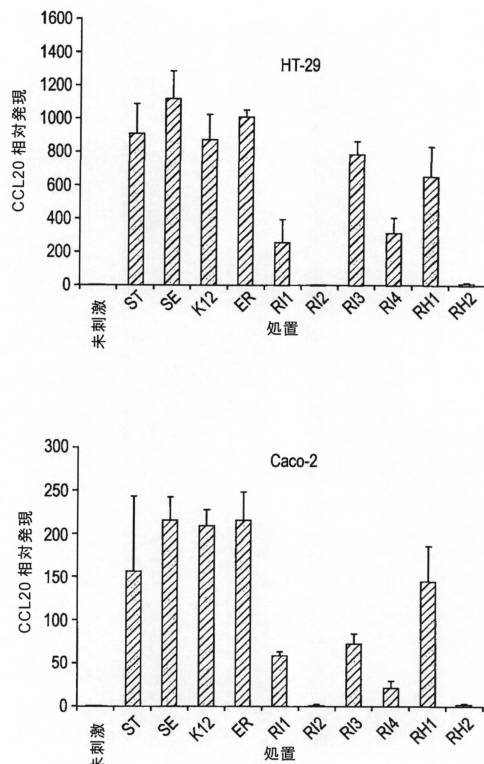


FIG. D2

## 【図 D 3 - 1】

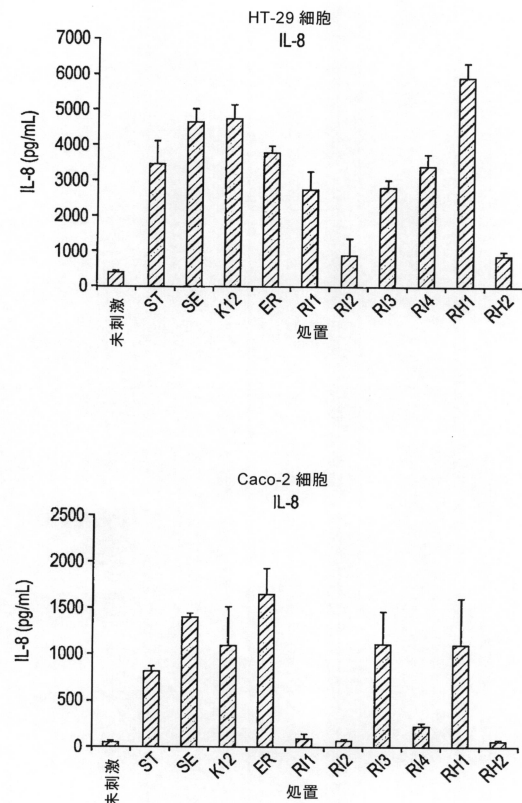


FIG. D3



【図 D 3 - 2】

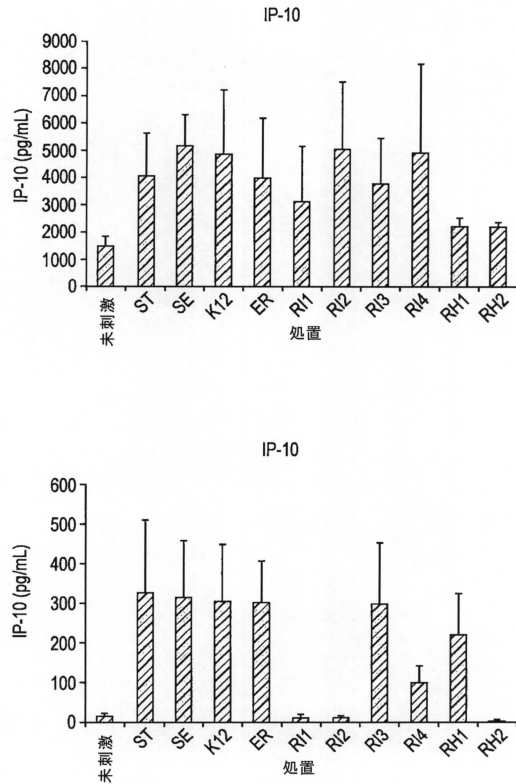


FIG. D3 Cont'd

【図 D 3 - 3】

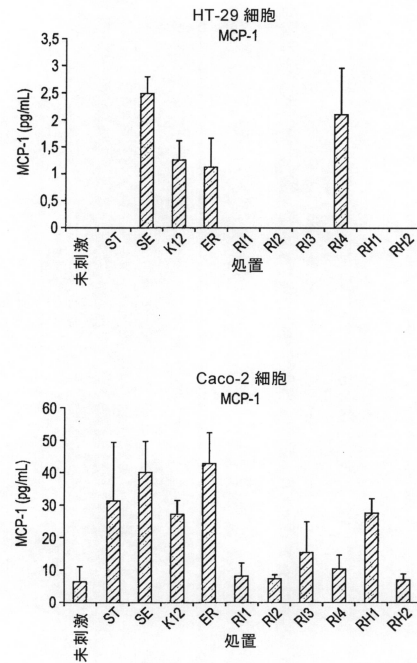


FIG. D3 Cont'd

【図 D 4】

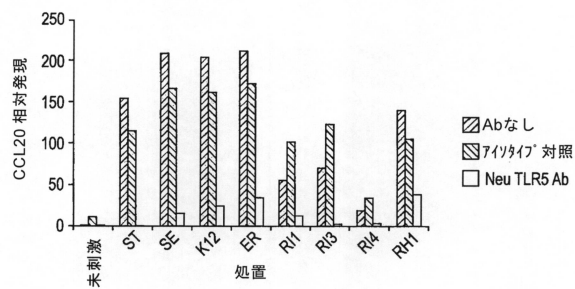


FIG. D4

【図 D 5】

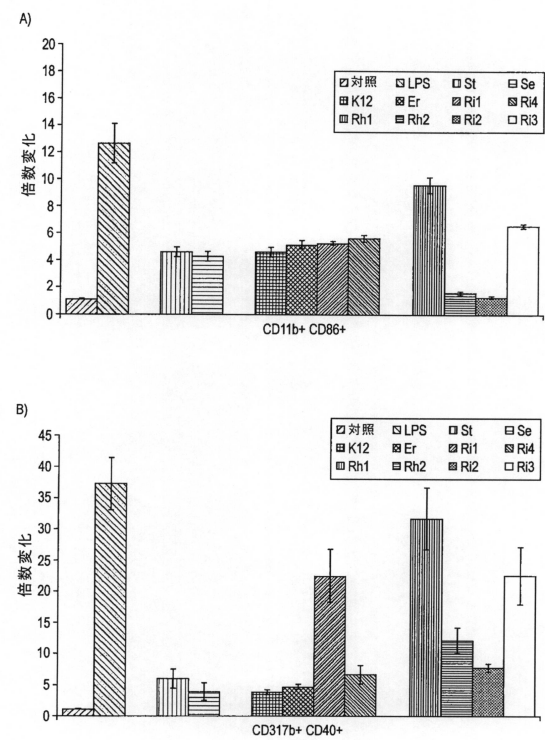


FIG. D5

## 【図 D 6 - 1】

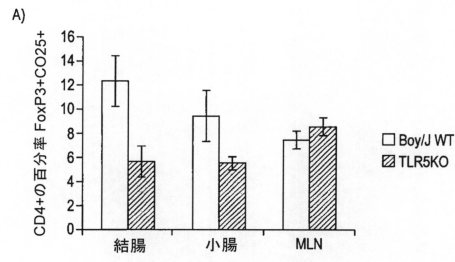


FIG. D6

## 【図 D 6 - 2】

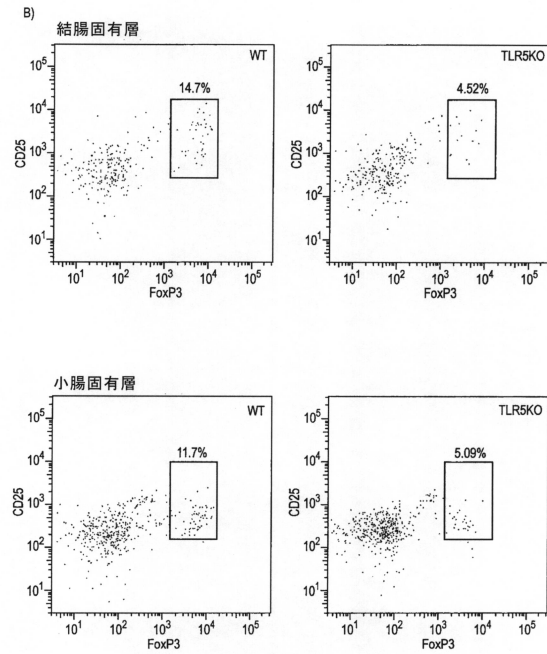


FIG. D6

## 【図 D 6 - 3】

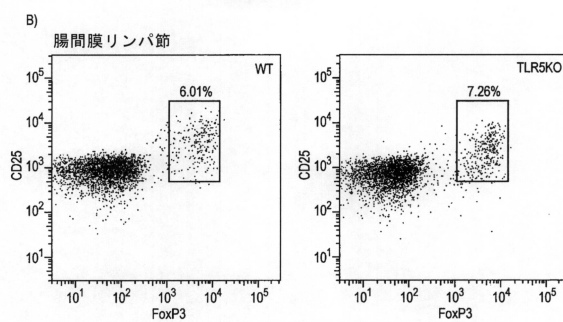


FIG. D6 Cont'd

## 【図 S 1】

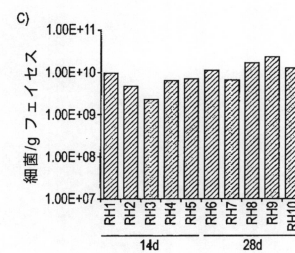
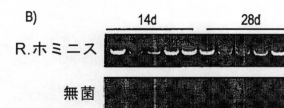
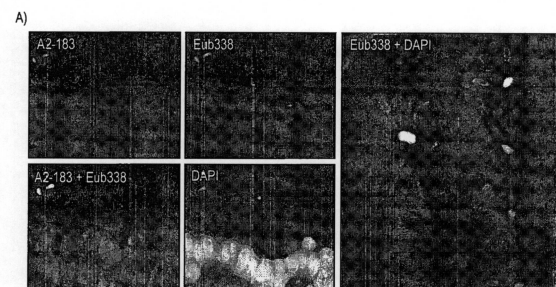
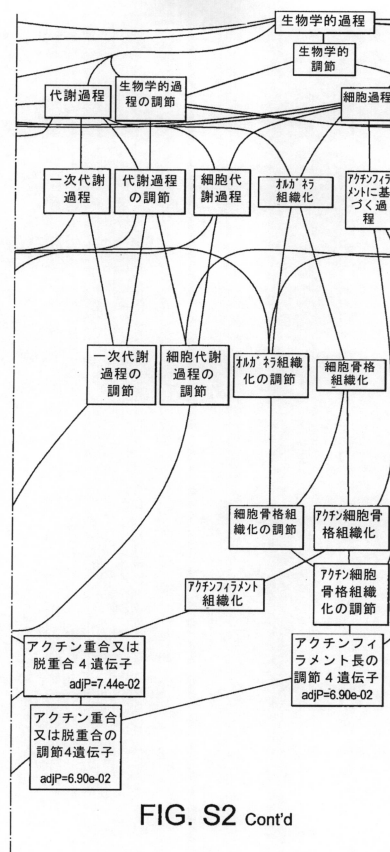


FIG. S1

【 ㊦ S 2 - 2 】



【 図 S 3 - 1 】

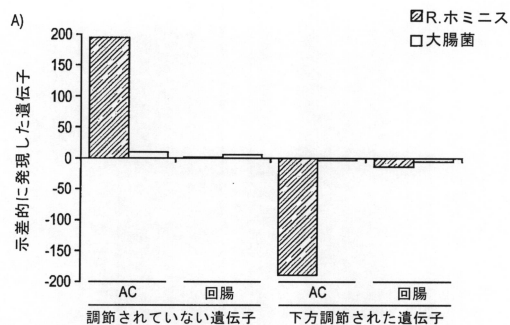
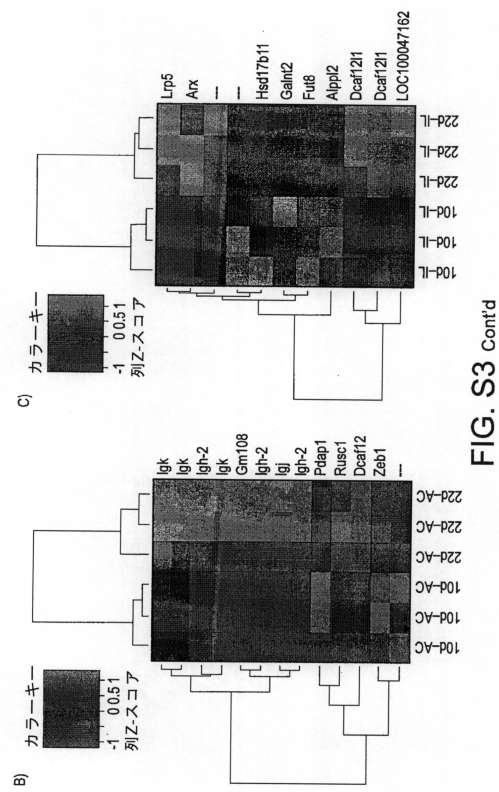
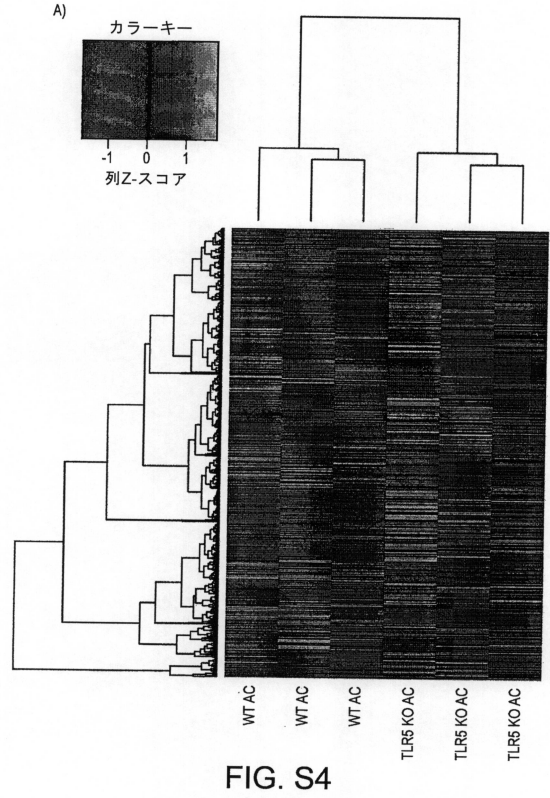


FIG. S3

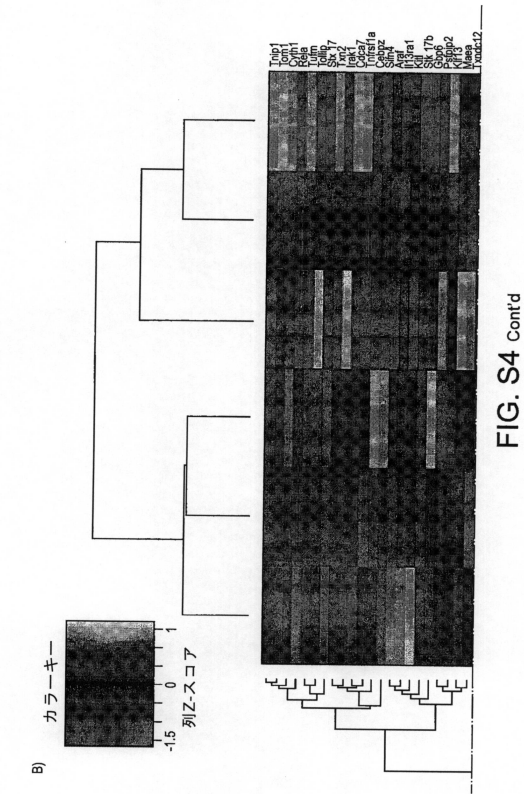
【図 S 3 - 2】



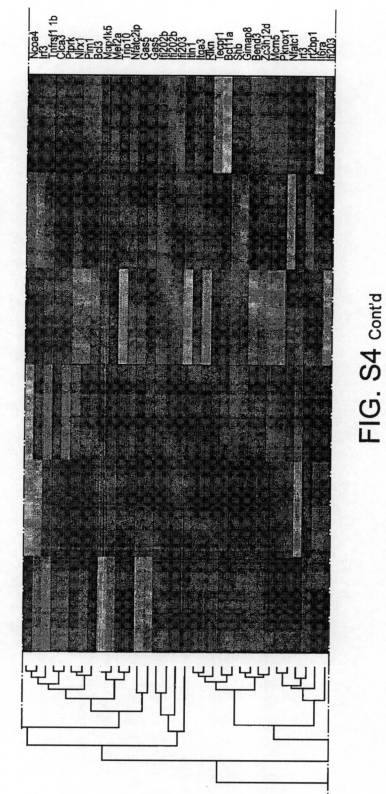
【図 S 4 - 1】



【図 S 4 - 2】



【図 S 4 - 3】



【 図 S 4 - 5 】

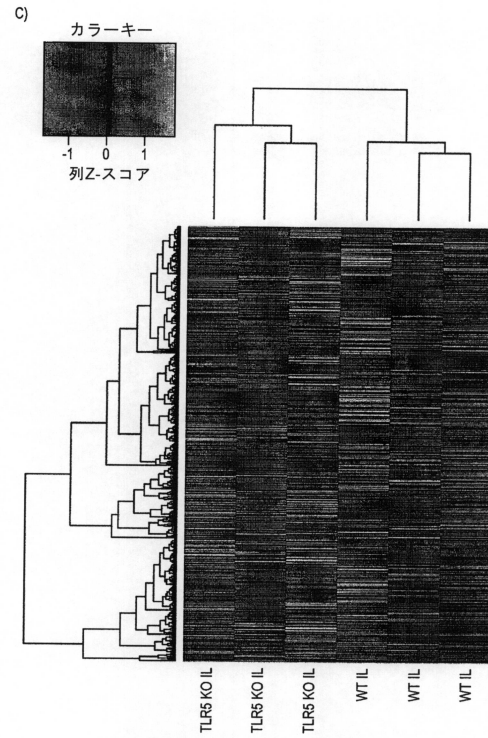


FIG. S4 Cont'd

【 図 S 5 - 1 】

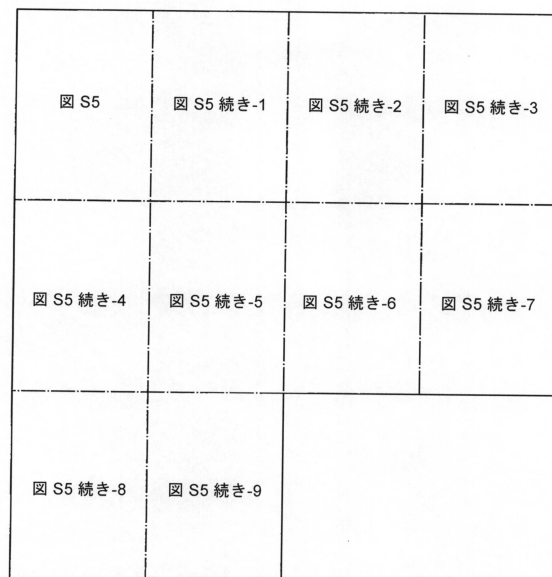


FIG. S5

FIG. S4 Cont'd



【図 S 5 - 2】

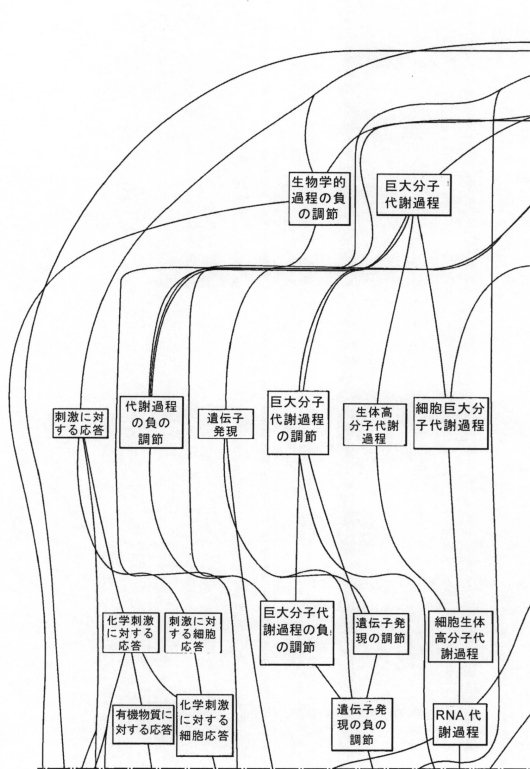


FIG. S5

【図 S 5 - 3】

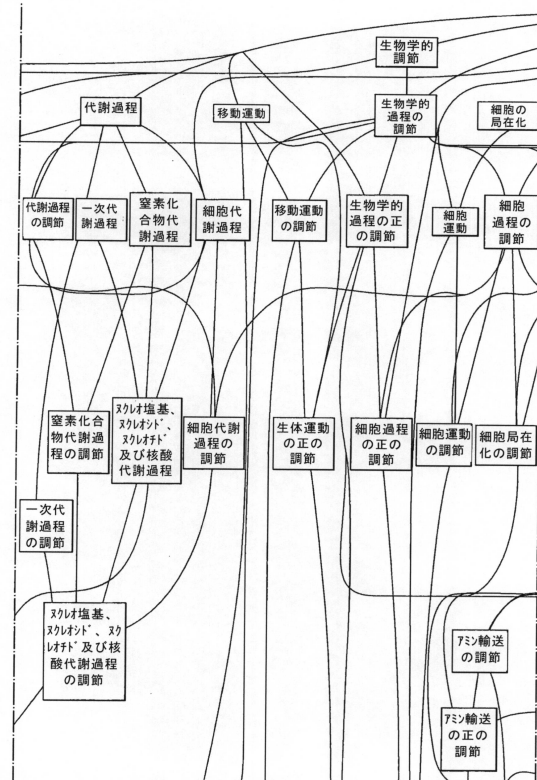


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 4】

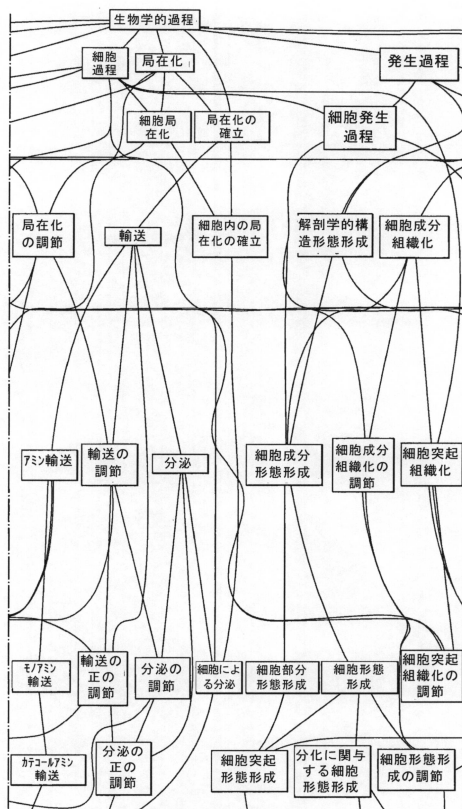


FIG. S5 Cont'd

【図 S 5 - 5】

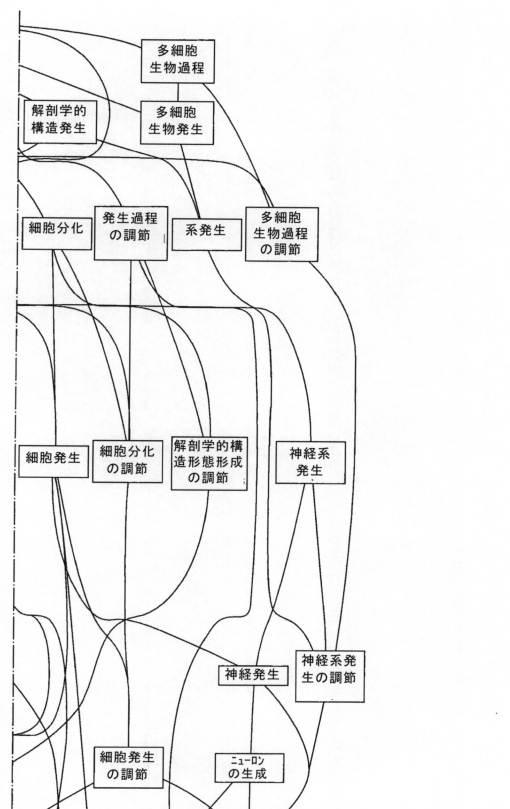
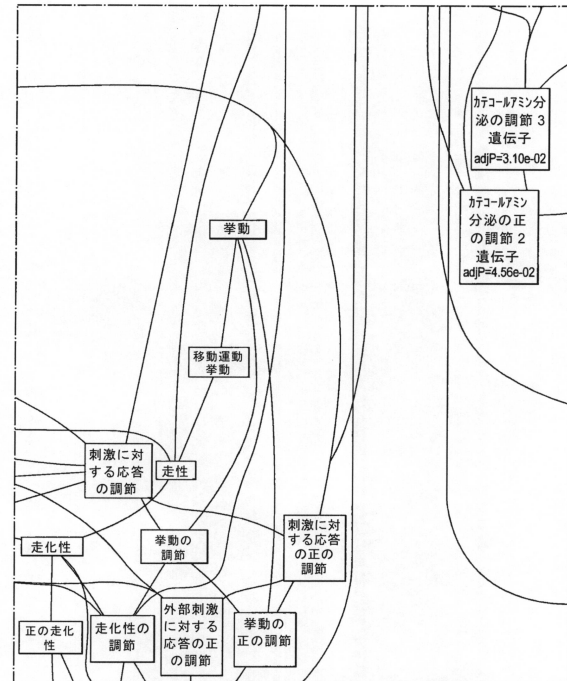


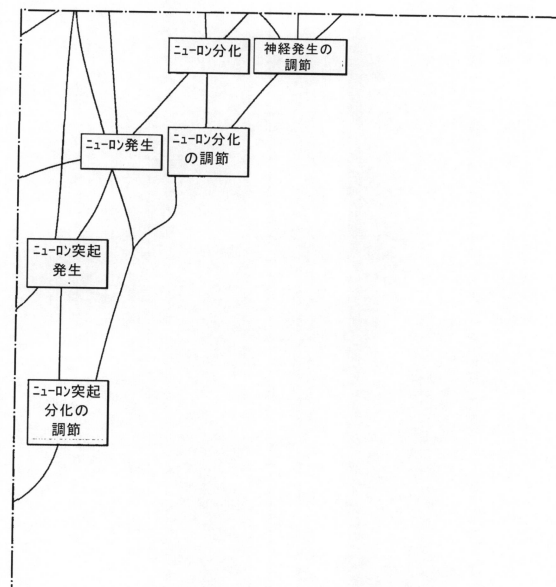
FIG. S5 Cont'd

【 図 S 5 - 7 】



**FIG. S5** Cont'd

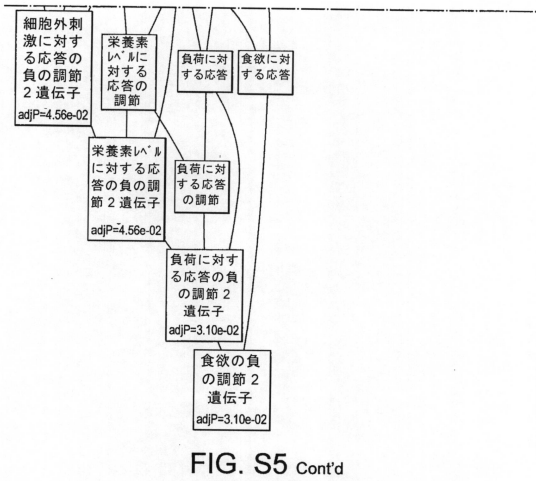
【 図 S 5 - 9 】



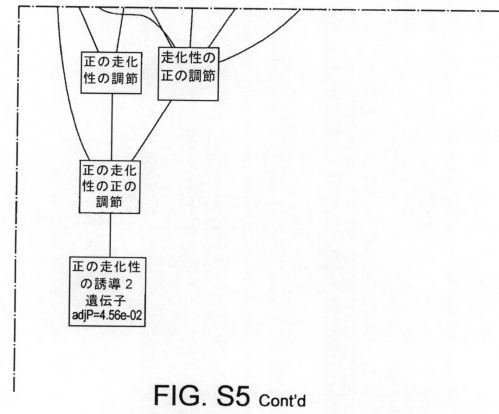
**FIG. S5** Cont'd



【図 S 5 - 1 0】



【図 S 5 - 1 1】



【図 S 6】

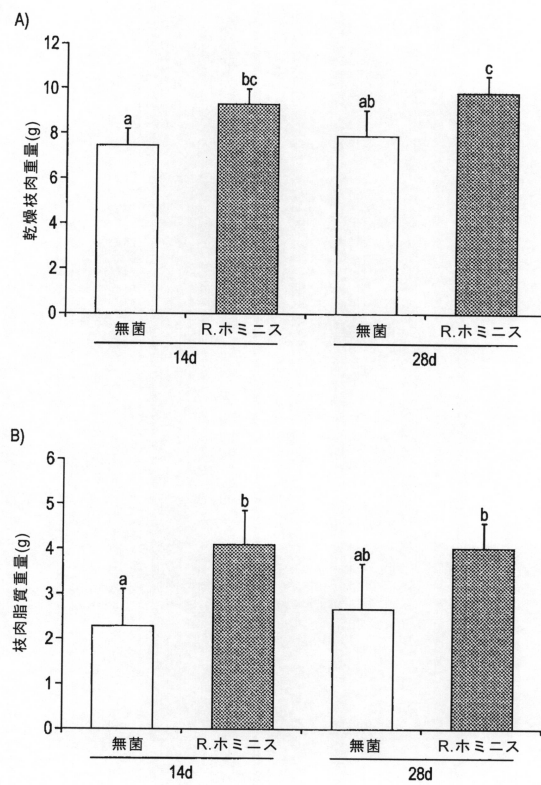


FIG. S6

【配列表】

0006641262000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 2 3 L 33/195 (2016.01)  
 A 2 3 L 33/13 (2016.01)  
 C 1 2 N 15/31 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/11 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/0783 (2010.01)  
 C 1 2 N 5/0784 (2010.01)  
 C 1 2 N 5/071 (2010.01)  
 A 6 1 K 35/74 (2015.01)  
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 9/48 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 11/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/14 (2006.01)  
 A 2 3 K 20/147 (2016.01)  
 A 2 3 K 20/153 (2016.01)

F I

A 2 3 L 33/195  
 A 2 3 L 33/13  
 C 1 2 N 15/31  
 C 1 2 N 15/11 Z  
 C 1 2 N 5/0783  
 C 1 2 N 5/0784  
 C 1 2 N 5/071  
 A 6 1 K 35/74 B  
 A 6 1 K 38/16  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 35/76  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 9/48  
 A 6 1 P 3/02  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 37/00  
 A 6 1 P 37/02  
 A 6 1 P 43/00 1 1 1  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 3/04  
 A 6 1 P 29/00 1 0 1  
 A 6 1 P 19/02  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 P 3/10  
 A 6 1 P 17/02  
 A 6 1 P 37/08  
 A 6 1 P 11/02  
 A 6 1 P 1/14  
 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 2 5 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 サイエンス 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

- ルティーディー気付
- (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 サイエンスズ 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  
ルティーディー気付
- (72)発明者 モナイス エドゥアルド  
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 サイエンスズ 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  
ルティーディー気付
- (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 サイエンスズ 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  
ルティーディー気付

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 特表２０１４－５３４９５７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

C 0 7 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )