(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6014652号
(P6014652)

(45)発行日　平成28年10月25日(2016.10.25)　(24)登録日　平成28年9月30日(2016.9.30)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A
A23L 31/00	(2016.01)	C12N	1/20	E
A61K 35/74	(2015.01)	A23L	31/00	
A61P 31/16	(2006.01)	A61K	35/74	A
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/16	

請求項の数 9　(全 21 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-501629 (P2014-501629)
(86)(22)出願日　平成24年3月29日 (2012.3.29)
(65)公表番号　特表2014-516248 (P2014-516248A)
(43)公表日　平成26年7月10日 (2014.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/055673
(87)国際公開番号　WO2012/130966
(87)国際公開日　平成24年10月4日 (2012.10.4)
審査請求日　平成27年2月3日 (2015.2.3)
(31)優先権主張番号　11160140.7
(32)優先日　平成23年3月29日 (2011.3.29)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

微生物の受託番号　CNCM　CNCM I-4437

(73)特許権者　599132904
ネステク　ソシエテ　アノニム
スイス国，ブベイ，アブニュー　ネスレ　５５
(74)代理人　100088155
弁理士　長谷川　芳樹
(74)代理人　100114270
弁理士　黒川　朋也
(74)代理人　100128381
弁理士　清水　義憲
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100140453
弁理士　戸津　洋介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｄ－乳酸産生が欠損し、保存期間が改善した、ラクトバチルスジョンソニー（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓｊｏｈｎｓｏｎｉｉ）ＣＮＣＭＩ－１２２５株の天然変異体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌｅ　ｄｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ　ｄｅ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　Ｐａｓｔｅｕｒ）に寄託された、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株。
【請求項２】
Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌｅ　ｄｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ　ｄｅ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　Ｐａｓｔｅｕｒ）に寄託された、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株を含む組成物。
【請求項３】
食品組成物、ペットフード組成物、飲料、乳製品、栄養調合物、食品添加物、栄養補助食品、医薬組成物、食品成分、及び化粧組成物からなる群から選択される、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
酸乳製品及びミルクベースの粉末からなる群から選択される、請求項２に記載の組成物。
【請求項５】
１日の用量当たり10^{6}～10^{12}ＣＦＵの量の、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株を含む、請求項２～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】

脆弱化した免疫系と連関する障害の治療又は予防のための組成物であって、Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｎａｔｉｏｎａｌｅ ｄｅ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｄｅ Ｍｉｃｒｏｏｒｇｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ Ｐａｓｔｅｕｒ）に寄託された、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－４４３７株を含む組成物。

【請求項７】

脆弱化した免疫系と連関する障害が、インフルエンザ、鼻炎、風邪、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項６に記載の組成物。

【請求項８】

腸毒性細菌又は腸毒性ウイルスによる細胞接着及び細胞浸潤と連関する障害の治療又は予防のための組成物であって、Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｎａｔｉｏｎａｌｅ ｄｅ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｄｅ Ｍｉｃｒｏｏｒｇｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ Ｐａｓｔｅｕｒ）に寄託された、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－４４３７株を含む組成物。

【請求項９】

腸毒性細菌又は腸毒性ウイルスが、サルモネラ属；カンピロバクター属；リステリア属；ＥＴＥＣ株、ＥＨＥＣ株、ＥＰＥＣ株、及びＥＩＥＣ株；エルシニア属；赤痢菌属；黄色ブドウ球菌、ボツリヌス菌、及びセレウス菌；ビブリオバルニフィカス／腸炎ビブリオ；ロタウイルス；ノロウイルス；ベロ毒素産生性大腸菌；エンテロバクターサカザキ；毒素産生性ウェルシュ菌（Ａ型及びＢ型）；トキソプラズマ属、及びジアルジア属；クロストリジウムディフィシル；並びに、これらの組合せからなる群から選択される、請求項８に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は一般に、プロバイオティクス細菌の分野に関する。特に、本発明は、特性を改善したラクトバチルスジョンソニー（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｊｏｈｎｓｏｎｉｉ）ＣＮＣＭ Ｉ－１２２５株の天然変異体（ｎａｔｕｒａｌ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ）に関する。例えば、本発明は、Ｄ－乳酸産生が欠損しており、酸素への曝露下で生存率の改善を示す、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－１２２５株の天然変異体に関する。

【背景技術】

【０００２】

ラクトバチルスジョンソニーＮＣＣ５３３、又は好酸性乳酸桿菌（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｓ）Ｌａ１、又はラクトバチルスジョンソニーＬｊ１としても知られ、ヒト分離株であるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－１２２５（Ｂｅｒｎｅｔ－Ｃａｍａｒｄ，Ｍ．Ｆ．ら（１９９７）、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６３、２７４７～２７５３）は、現在Ｌｃ１という商標名で市販され、大きな成功を収めているプロバイオティクスである。

【０００３】

生存可能なプロバイオティクス細菌を含有する製品に典型的なことであるが、これらの微生物は酸素への曝露に対して感受性なので、保存期間の間、細菌が生き残るのを確実にすることが、このような製品の生産における課題である。よって、酸素への抵抗性の改善を示す、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－１２２５の変異体を利用可能とすることが望ましい。

【０００４】

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ Ｉ－１２２５は、複数の健康上の利益をもたらすことが詳しく記載されており、それらの利益には、例えば、免疫調節活性（Ｈａｌｌｅｒ，Ｄ．ら、２０００、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６８：７５２～７５９；Ｈａｌｌｅｒ，Ｄ．ら、２０００、Ｇｕｔ、４７：７９～８７；又はＩｂｎｏｕ－Ｚｅｋｒｉ，Ｎ．ら、２００３、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７１：４２８～４３６）、又は病原体の阻害

（Ｂｅｒｎｅｔ，Ｍ．Ｆ．ら、１９９４、Ｇｕｔ、３５：４８３～４８９）、及び長い安全使用歴がある。

【０００５】

一部の製品類型、例えば、乳幼児を意図する製品においてラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の適用を制限してきた１つの側面は、糖の発酵からの、主にＤ－乳酸異性体の産生である。ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５は、例えば、ＭＲＳ培地で増殖させると、ラクトースを、Ｄ－乳酸及びＬ－乳酸へと、６０：４０％の比で発酵させる。

【０００６】

ＣＯＤＥＸ　Ｉｎｆａｎｔ　Ｆｏｒｍｕｌａ　Ｄｉｒｅｃｔｉｖｅは、３歳未満の乳児ではＤ－乳酸の排出が制限され、Ｄ－乳酸アシドーシスを結果としてもたらしうるために、３歳未満の乳児によるＤ－乳酸及びＤ－乳酸産生細菌の摂取の禁忌を推奨している。

【０００７】

この結論を支持する証拠は限定されたものであり、主に食品中のＤ－乳酸の存在に基づくものであり、消化管の天然の常在菌であるＤ－乳酸産生細菌の投与に基づくものではない。

【０００８】

結果として、複数の刊行物がこの見解に異議を申し立てている（Ｃｏｎｎｏｌｌｙ、Ｅ．ら、ＮＴＲＡｆｏｏｄｓ　３（３）、３７～４９．２００４；Ｈａｓｃｈｋｅ－Ｂｅｃｈｅｒ、Ｅ．ら、２００８、Ａｎｎ．Ｎｕｔｒ．Ｍｅｔａｂ．５３：２４０～２４４；Ｍａｃｋ、Ｄ．Ｒ．、２００４、Ｃａｎ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１８：６７１～６７５）が、ＣＯＤＥＸ　Ｉｎｆａｎｔ　Ｆｏｒｍｕｌａ　Ｄｉｒｅｃｔｉｖｅの推奨には依然として変化がない。

【０００９】

ＣＯＤＥＸは、Ｄ－乳酸産生プロバイオティクスを、特殊調製粉乳中の栄養補助食品から原則的に除外し、Ｌ－乳酸だけを産生する株の遺伝子操作を促した。かかる開発の例は、遺伝子改変生物（ＧＭＯ）、特に、遺伝子改変ラクトバチルスジョンソニー株の生成であり、そこでは、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ（Ｄ－ＬＤＨ）遺伝子（ｌｄｈＤ）が単離され、遺伝子置換を介してゲノムのコピーを不活化するのに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて切断された（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ－ｔｒｕｎｃａｔｅｄ）ｌｄｈＤ遺伝子の複製物が用いられた（Ｌａｐｉｅｒｒｅ，Ｌ．ら、１９９９、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６５：４００２～４００７）。

【００１０】

この遺伝子操作された株は、その遺伝子素材が組換えＤＮＡ法を用いて変化させたものであり、結果として、ＧＭＯと考えられるので、実験だけを目的として産生され、食品には用いられていない。

【００１１】

にもかかわらず、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の多数の健康上の利益を、Ｄ－乳酸又はＤ－乳酸産生細菌の摂取が現在推奨されていない個体も享受できる可能性をもたらすことは望ましいことであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

よって、当技術分野では、Ｄ－乳酸産生が欠損しており、にもかかわらず生存可能であり、製品中の生存の改善を示す、天然のプロバイオティクス株、特に、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体が強く必要とされている。

【００１３】

本発明者らは、これらの必要に取り組んできた。

結果として、本発明の目的は、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の変異体であって、ＣＯＤＥＸ　Ｉｎｆａｎｔ　Ｆｏｒｍｕｌａ　Ｄｉｒｅｃｔｉｖｅに

よる現行の規約を尊重しながら、乳幼児を意図する製品にもまた適用可能であり、改善された保存安定性を示し、天然であってＧＭＯとは考えられない変異体を当技術分野にもたらすことであった。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明者らは、驚くべきことに、独立請求項の対象を介して、本発明の目的を達成しうることを見いだした。従属請求項は、本発明の理念をさらに展開する。

【００１５】

本発明者らは、Ｌ－乳酸だけを産生し、保存安定性が改善された、ラクトバチルスジョンソニーＬａ１の、天然（非ＧＭＯ）で、生存可能で、遺伝子的に安定な変種を単離する可能性について調べた。

【００１６】

例えば損傷したＤＮＡの誤修復又はＤＮＡの複製におけるエラーに起因する、ゲノム配列の変化は比較的低頻度で自然に生じる。

【００１７】

このようなラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体について探索するため、本発明者らは、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の約２１，０００個のコロニーをスクリーニングし、本発明の目的を達成する、Ｄ－乳酸が欠損した、１つの天然の変種を同定した。

【００１８】

本発明者らは、ＭＲＳ培養上清中のＤ－乳酸濃度及びＬ－乳酸濃度をさらに決定し、培養上清中の全乳酸の濃度と比較したＤ－乳酸の相対濃度が、１．５％未満、すなわち、約１．１％であることを示した。

【００１９】

ＤＮＡ配列の解析により、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子において、酵素のアミノ酸配列を変化させ、よって、その触媒特性を変化させる点突然変異が主に同定された。

【００２０】

天然の変異体は、生存可能であり、Ｄ－乳酸の産生へと可逆化する例はなく、安定であることが示された。

【００２１】

本発明者らはまた、８℃及び１５℃における保存安定性も評価し、同定された変異体を、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株と比較した。同定された変異体は、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株と比較して保存期間の著明な改善を示した。本発明者らはまた、この株の保存安定性を、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の他の変異体とも比較し、この天然変異体が、最良の保存期間を示すことを見出した。

【００２２】

結果として、本発明の一実施形態は、Ｄ－乳酸産生が欠損しており、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株と比較して保存期間の延長を示す、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体である。

【００２３】

本発明者らが知る限りでは、Ｄ－乳酸産生が欠損しており、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株と比較して保存期間の延長を示すラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体が提供されるのは、これが初めてである。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】メタンスルホン酸エチルで処理されたラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の「生存曲線」を示す図である。

【図２】Ｇ塩基の酸化からＤＮＡ鎖の分離までの天然突然変異の分子過程であって、親ＤＮＡ種と変異ＤＮＡ種との混合、及び親コロニーと変異コロニーとの混合を結果としても

たらす分子過程を示す図である。
【図３】ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５のＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の遺伝子配列（配列番号１）、及びラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７の対応する遺伝子において同定される変化（丸印を付す）を示す図である。翻訳されたＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素（配列番号２）もまた、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７の対応する変化と共に示す。
【図４Ａ】ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７のＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の遺伝子配列（配列番号６）を示す図であり、２３０位における塩基に枠囲いを付すが、これは、親株のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５（Ｇ）と比較して変化している。
【図４Ｂ】ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７のＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素のタンパク質配列（配列番号７）を示す図であり、７７位におけるアミノ酸に枠囲いを付すが、これは、親株のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５（Ｒ）と比較して変化している。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
本発明の目的において、「Ｄ－乳酸産生が欠損した」とは、株が、全乳酸産生と比較して５％未満、好ましくは２％未満、なおより好ましくは１．５％未満のＤ－乳酸を産生し、理想的には約１．１％のＤ－乳酸を産生することを意味する。Ｄ－乳酸濃度及びＬ－乳酸濃度は、無細胞の培養上清中で測定することができる。
【００２６】
ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体により産生される乳酸の総量はまず細胞増殖と関連する。細胞は、静止期（ｓｔａｔｉｏｎａｒｙ　ｐｈａｓｅ）に入り、分裂を停止すると、糖の代謝を継続し、乳酸産生を増大させる。しかし、産生されるＤ－乳酸とＬ－乳酸との比は、一定であることが見出された。
【００２７】
ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の「天然」変異体とは、ＧＭＯとは考えられない株を意味する。このような天然変異体は、例えば、損傷したＤＮＡの誤修復又はＤＮＡの複製におけるエラーに起因して天然で生じる、ゲノム配列の変化を受けるコロニーを、例えば、スクリーニングすることで得ることができる。エラーの自然発生は、例えば、メタンスルホン酸エチル（ＥＭＳ）の適用を介して、コロニーをストレス状態に置くことにより増強することができる。
【００２８】
本出願の目的では、「ＧＭＯ」という用語を、環境への遺伝子改変生物の慎重な放出についての、２００１年３月１２日の欧州議会及び欧州理事会によるＤＩＲＥＣＴＩＶＥ　２００１／１８／ＥＣに従い定義し、議会によるＤｉｒｅｃｔｉｖｅ　９０／２２０／ＥＣは無効化するものとする。したがって、「遺伝子改変生物（ＧＭＯ）」とは、ヒトを例外とし、交配及び／又は天然の組換えを介して、天然では生じない形で遺伝物質を変化させた生物を意味する。
【００２９】
この定義の用語の範囲内では、遺伝子改変は、少なくとも以下の使用を介して生じる：
（１）生物外の何らかの手段を介して生成される核酸分子の、任意のウイルス、細菌プラスミド、若しくは他のベクター系への挿入、及びそれら核酸分子の、それらが天然では生じないが持続的な増殖が可能な宿主生物への組込みによる、遺伝物質の新たな組合せの形成を伴う組換え核酸法；
（２）マイクロインジェクション、マクロインジェクション、及びマイクロカプセル化を含めた、生物外で調製される遺伝物質の、生物への直接的な導入を伴う技法；又は
（３）遺伝性の遺伝物質を新たに組み合わせた生細胞が、２つ以上の細胞の融合を介して、天然では生じない方法により形成される細胞融合（プロトプラスト融合を含めた）法、若しくはハイブリダイゼーション法。

【００３０】
株は、少なくとも９９．９５％の核酸同一性、例えば、少なくとも９９．９９％の核酸同一性、好ましくは、少なくとも９９．９９５％の核酸同一性を有する場合に、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の「変異体」であると考えられる。例えば、株は、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の核酸配列と比較して５００以下の、例えば、１００以下の、好ましくは、５０以下の核酸変化を有する場合に、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の変異体であると考えられる。
【００３１】
細菌株は、８℃及び／又は１５℃での保存の４５日間後にＬｃ１飲料製品における生存の延長を示す場合に、「ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株と比較して保存期間の延長を示す」と考えられる。本発明のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体を製品中で用いると、結果として、保存期間の終末時において、生存可能な細菌の数の増大がもたらされる。
【００３２】
本発明者らは、本発明のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体が、Ｄ－乳酸が欠損した表現型の一因となる、ｄ－ｌｄｈ遺伝子における突然変異を示すことを見出した。
【００３３】
結果として、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体は、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素の配列を変化させている可能性がある。例えば、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体は、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素の配列の７７位のアミノ酸におけるアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変化を含みうる。
【００３４】
この変化は、Ｄ－乳酸がほとんど又はまったく産生されないように、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素の機能を著明に変化させるようである。
【００３５】
Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素のタンパク質配列におけるこの変化は、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の核酸配列における変化に基づく。
【００３６】
結果として得られる酵素を不活化する、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の核酸配列における任意の天然の変化は、本発明の主題を達成しうる。また、野生型配列又はＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の一部若しくは全部のうちの、１又は複数の連続したヌクレオチドの少なくとも１つの欠失も、本発明の主題を達成しうる。
【００３７】
本発明者らは、本発明のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の天然変異体におけるＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の核酸配列について解析した。
【００３８】
よって、本発明はまた、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の核酸配列が、２７０位の核酸におけるＧからＡへの転移を含む、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体にも関する。
【００３９】
Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼの不活化を結果としてもたらすこのような変化は天然で自発的に低頻度で生じるが、変化はランダムであり、同じ頻度で親配列（野生型）へと修復されうる。
【００４０】
不活化された遺伝子が増殖上の不利益を変種（ｖａｒｉａｎｔ）に付与する場合は、この修復の頻度がさらに上昇する可能性がある。培養物コレクションから最終的な生成物までの世代数の大きさを踏まえると、このような変化は、とりわけ、その遺伝子的な安定性が欠失よりも低い単一塩基対の変化であるので、安定であることが重要である。

有利な事に、変化は安定であるということも判明した。

【００４１】

本発明の目的を達成するラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体の一例を、単離し、精製し、詳細に特徴づけた。

【００４２】

よって、本発明は、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体に関し、前記ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体はラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７でありうる。

【００４３】

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７は、２０１１年2月8日、ブダペスト条約に基づき、Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌｅ　ｄｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ　ｄｅ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇｎｉｓｍｅｓ（ＣＮＣＭ）、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　Ｐａｓｔｅｕｒ、２５　Ｒｕｅ　ｄｕ　Ｄｏｃｔｅｕｒ　Ｒｏｕｘ、Ｆ－７５７２４　Ｐａｒｉｓ　Ｃｅｄｅｘ　１５、Ｆｒａｎｃｅに寄託された。

【００４４】

株は、完全に配列決定された。

【００４５】

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５は、１９９２年6月３０日、ブダペスト条約に基づき、ＣＮＣＭに寄託された。

【００４６】

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７は、この株によるＤ－乳酸産生の欠損の一因となる、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子において予測される変化を含めた合計２３の変化を含有する。機能が増殖に重要であることが予測される２つの遺伝子、すなわち、ＬＪ０８７４（トリオースリン酸イソメラーゼ）遺伝子及びＬＪ０５１５（ホスホメチルピリミジンキナーゼ）遺伝子において変化が認められる。ＭＲＳ培地中では、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７が、Ｌａ１と比較して同様の速度で増殖し、よって、上記の変化は、有害作用を示さない。２成分制御系のヒスチジンキナーゼ酵素である、ＬＪ１６５８における副次的な変化が注意される。この株についての予備的な発現プロファイリングは、おそらくマンノースに特異的なＰＴＳオペロンを構成するＬＪ１６５２～ＬＪ１６５６の５つの遺伝子の、著明な下方制御を明らかにする。これは、Ｌａ１と比較して糖の発酵パターンに変化をもたらさないが、これは、Ｌａ１において予測される複数のマンノースＰＴＳ系の存在に起因しうる。

【００４７】

本発明はまた、生物学的に純粋な培養物として存在する、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体へも拡張される。

【００４８】

本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体は、任意の適切な方法に従い培養することができ、例えば、凍結乾燥又は噴霧乾燥を介して本発明の組成物に添加するために調製することができる。

【００４９】

プロバイオティクスであるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株は、十分に記載されている多数の健康上の利益を提供するが、それらの一部については上記で詳述している。

【００５０】

「プロバイオティクス」とは、宿主の健康又は福利に対して有益な効果を伴う微生物細胞調製物又は微生物細胞の構成要素を意味する（Ｓａｌｍｉｎｅｎ　Ｓら、「Ｐｒｏｂｉｏｔｉｃｓ：ｈｏｗ　ｓｈｏｕｌｄ　ｔｈｅｙ　ｂｅ　ｄｉｆｉｎｅｄ」、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｆｏｏｄ　Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１９９９：１０、１０７～１０）。

【００５１】

本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体は、

提供される健康上の利益の点で、本質的に生物学的同等物とみなすことができる。

【００５２】

学術的研究はまた、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の生物学的に純粋な培養物から単離される無細胞の培養上清が、複数の健康上の利益をもたらすことも示している（例えば、Ｂｅｒｎｅｔ－Ｃａｍａｒｄ，Ｍ．－Ｆ．ら、１９９７、ＡＰＰＬＩＥＤ　ＡＮＤ　ＥＮＶＩＲＯＮＭＥＮＴＡＬ　ＭＩＣＲＯＢＩＯＬＯＧＹ、２７４７～２７５３ページ参照）。

【００５３】

よって、本発明は、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体の生物学的に純粋な培養物から単離される無細胞の培養上清へとさらに拡張される。

【００５４】

本発明のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び無細胞の培養上清は、多数の健康上の利益をもたらすので、これらを用いて、ヒト又は動物の身体における障害を治療又は予防することができる。

【００５５】

結果として、本発明は、ヒト又は動物の身体を治療法により治療する方法で用いられる組成物の調製において用いられる、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清を含む組成物に関する。

【００５６】

本発明はまた、医薬組成物又は医薬の調製における、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清を含む組成物の使用にも関する。

【００５７】

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５は、免疫調節（Ｈａｌｌｅｒ，Ｄ．ら、２０００、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６８、７５２～７５９；Ｈａｌｌｅｒ，Ｄ．ら、２０００、Ｇｕｔ　４７、７９～８７；Ｉｂｎｏｕ－Ｚｅｋｒｉ，Ｎ．ら、２００３、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７１、４２８～４３６）、病原体の阻害（Ｂｅｒｎｅｔ，Ｍ．Ｆ．ら、１９９４、Ｇｕｔ　３５、４８３～４８９）、及び上皮細胞接着（Ｎｅｅｓｅｒ，Ｊ．Ｒ．ら、２０００、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１０、１１９３～１１９９；Ｇｒａｎａｔｏ，Ｄ．ら、１９９９、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６５、１０７１～１０７７）を含めたそのプロバイオティクス関連活性について広範に研究されている。

【００５８】

生物学的同等性のために、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又はその無細胞の培養上清は、同じ健康上の利益を提供する。

【００５９】

結果として、本発明は、脆弱化した免疫系と連関する障害の治療又は予防において用いられる、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清を含む組成物に関する。

【００６０】

本発明はまた、脆弱化した免疫系と連関する障害を治療又は予防するための組成物を調製するための、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清の使用にも関する。

【００６１】

当技術分野では、脆弱化した免疫系と連関する障害がよく知られており、当業者は、脆弱化した免疫系が、どの障害と連関するのかについて理解するであろう。

【００６２】

脆弱化した免疫系と連関する障害の典型的な例は、インフルエンザ、鼻炎、風邪、及び

これらの組合せからなる群から選択することができる。

【００６３】

本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清を含む組成物はまた、腸毒性細菌又は腸毒性ウイルスによる細胞接着及び細胞浸潤と連関する障害の治療又は予防においても用いることができる。

【００６４】

本発明はまた、腸毒性細菌又は腸毒性ウイルスによる細胞接着及び細胞浸潤と連関する障害を治療又は予防するための組成物を調製するための、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清の使用へも拡張される。

【００６５】

当技術分野では、腸毒性細菌及び腸毒性ウイルスがよく知られている。Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｆｏｏｄ　Ｓａｆｅｔｙ　Ａｕｔｈｏｒｉｔｙ（ＥＦＳＡ）は、２０１０年１１月にこのような病原体の一覧を公表した。

【００６６】

腸毒性細菌種又は腸毒性ウイルス種は、例えば、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）属；カンピロバクター（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）属；リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）属；例えば、ＥＴＥＣ株、ＥＨＥＣ株、ＥＰＥＣ株、又はＥＩＥＣ株などの大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）株；エルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）属；赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）属；黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、又はセレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｅｒｅｕｓ）などの毒素産生細菌；ビブリオバルニフィカス（Ｖｉｂｒｉｏ　ｖｕｌｎｉｆｕｃｕｓ）／腸炎ビブリオ（Ｖｉｂｒｉｏ　ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）；ロタウイルス；ノロウイルス；ベロ毒素産生性大腸菌（ｖｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ　Ｅ．ｃｏｌｉ）；エンテロバクターサカザキ（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓａｋａｚａｋｉｉ）；毒素産生性ウェルシュ菌（Ｃ．ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）（A型及びB型）；エキノコックス（Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、トキソプラズマ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ）属、又はジアルジア（Ｇｉａｒｄｉａ）属などの食品媒介寄生虫；ピロリ菌（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）；クロストリジウムディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）；破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｅｔａｎｉ）；又はこれらの組合せからなる群から選択することができる。

【００６７】

当業者には、どの障害がどの腸毒性細菌種又は腸毒性ウイルス種と連関するのかが明らかである。

例えば、腸毒性細菌種又は腸毒性ウイルス種による細胞接着及び細胞浸潤と連関する障害は、下気道感染症、消化管感染症、中耳炎、及びこれらの組合せからなる群から選択することができる。

【００６８】

本発明の組成物は、ヒト又は動物への投与に適する限りにおいて、任意の種類の組成物でありうる。

【００６９】

本発明の組成物は、特に、経口投与、腸内投与、非経口投与、又は局所投与することもできる。組成物は、選択される投与方式に通常利用可能な任意の剤形で提供することができる。

【００７０】

本発明の組成物は、任意の年齢群に投与することができる。

【００７１】

本発明の組成物は、風邪の季節、例えば、秋～春にかけて投与することが好ましい。

【００７２】

本発明の組成物はまた、いつでも服用することもできる。本発明の組成物は、午前中に

、例えば、１日にわたり免疫系を強化するのに　　、服用するのが好ましい場合がある。
【００７３】
組成物は、例えば、食品組成物、ペットフード組成物、飲料、乳製品、栄養調合物、乳児用ミルク、食品添加物、栄養補助食品、医薬組成物、食品成分、及び／又は化粧組成物からなる群から選択することができる。
【００７４】
例えば、組成物は、ヨーグルト若しくはヨーグルト飲料などの酸乳製品；又はミルクベースの粉末からなる群から選択することができる。
【００７５】
特に、粉末化製品の場合、組成物が保存安定性粉末の形態で提供されれば好ましい場合がある。保存安定性を得、プロバイオティクスの生存率を確保するためには、組成物を、０．２より小さい水分活性で、例えば、０．１９～０．０５の範囲の水分活性で、好ましくは０．１５より小さい水分活性で提供することができる。水分活性又はa_wとは、系における水のエネルギー状態の尺度である。水分活性は、同じ温度の純水の蒸気圧で除した粉末／製品に由来する水の蒸気圧と定義され、したがって、純粋な蒸留水の水分活性はちょうど１である。
【００７６】
本発明の組成物は、クレンジングクリーム、保護クリーム、トリートメントクリーム、若しくはケアクリーム、クレンジングローション若しくは殺菌ローションなどのスキンケアローション、スキンケアゲル、若しくはスキンケアフォーム、浴用組成物、又は脱臭組成物でありうる。
【００７７】
外用局所投与のための組成物についてより具体的に述べると、それらは、水性溶液、水性アルコール溶液、又は油性溶液の場合もあり、ローション様又は血清様の溶液又は分散液の場合もあり、水性相中に脂肪性相を分散させるか（Ｏ／Ｗ）又は逆の分散（Ｗ／Ｏ）により得られる、液体又は半液体で均質なミルク様のエマルジョンの場合もあり、軟質で、半固体又は固体で均質で、クリーム様の懸濁液又はエマルジョンの場合もあり、水性ゲル又は無水ゲルの場合もあり、マイクロエマルジョン、マイクロカプセル、マイクロ粒子、又はイオン性及び／又は非イオン性の小胞分散液の場合もある。
【００７８】
本発明による局所用組成物は、ヘアケアに適する任意の剤形、とりわけ、ヘアローション、シャンプー、とりわけ、ふけ予防用シャンプー、ヘアコンディショナー、デタングラー、ヘアクリーム又はヘアゲル、ヘアスタイリングスプレー、ヘアセットローション、トリートメントローション、場合によって、毛染めシャンプーの形態における染料組成物（とりわけ、酸化染色用）、ヘアリストラクチャリング用ローション、パーマネントウェービング用組成物、脱毛予防用ローション又はゲル、駆虫用シャンプー又は医薬用シャンプー、とりわけ、抗脂漏症用シャンプー、頭皮ケア製品、とりわけ、抗刺激性ケア、抗老化ケア、若しくはリストラクチャリングケア用である頭皮ケア製品、又は血液の循環を活性化する頭皮ケア製品の形態で有利に調合しうる。
【００７９】
本発明の組成物がエマルジョンである場合、脂肪性相の比率は、組成物の総重量に対して、重量で５％～８０％の範囲であることが可能であり、好ましくは重量で１０％～５０％の範囲でありうる。エマルジョン形態の組成物において用いられる油、乳化剤、及び共乳化剤は、従来より化粧分野及び／又は皮膚科分野で用いられている油、乳化剤、及び共乳化剤から選択される。乳化剤及び共乳化剤は、組成物の総重量に対して、重量で０．３％～３０％の範囲の比率で組成物中に存在することが可能であり、好ましくは重量で０．５％～２０％の範囲の比率で組成物中に存在しうる。
【００８０】
本発明の組成物が油性ゲル又は油性溶液である場合、脂肪性相は、組成物の総重量の９０％超を占めることが可能である。

【００８１】
局所投与用の剤形はまた、親水性ゲル化剤又は脂溶性ゲル化剤、親水性活性剤又は脂溶性活性剤、防腐剤、抗酸化剤、溶媒、芳香剤、充填剤、日焼け止め、脱臭剤、及び染料など、化粧分野、医薬分野、及び／又は皮膚科分野において一般的な補助剤も含有しうる。これらの多様な補助剤の量は、考慮する分野において、従来より用いられる量であり、例えば、組成物の総重量の０．０１％～２０％である。それらの性質に応じて、これらの補助剤は、脂肪性相及び／又は水性相へと導入することができる。
【００８２】
本発明において用いうる脂肪性物質としては、例えば、水素化ポリイソブテン及び液体石油ゼリーなどの鉱物油；例えば、シアバターの液体画分、ヒマワリ油、及びキョウニン油などの植物油；例えば、ペルヒドロスクアレンなどの動物油；合成油、特に、パーセリン（Ｐｕｒｃｅｌｌｉｎ）油、ミリスチン酸イソプロピル、及びパルミチン酸エチルヘキシル；不飽和脂肪酸；及び例えば、ペルフルオロポリエーテルなどのフルオロ油に言及することができる。また、脂肪アルコール、例えば、ステアリン酸などであり、例えば、蝋、特に、パラフィン蝋、カルナウバ蝋、及び蜜蝋などである脂肪酸も用いることができる。また、シリコーン油、並びに、例えば、シクロメチコン及びジメチコン、並びにシリコーン蝋、シリコーン樹脂、及びシリコーンガムなどのシリコーン化合物も用いることができる。
【００８３】
本発明において用いうる乳化剤としては、例えば、ステアリン酸グリセリル、ポリソルベート６０、Ｈｅｎｋｅｌ社によりシノワックス（Ｓｉｎｎｏｗａｘ　ＡＯ）（登録商標）の商標名で販売されている、３３モルのエチレンオキシドを含むセチルステアリルアルコール／オキシエチル化セチルステアリルアルコールの混合物、Ｇａｔｔｅｆｏｓｓｅ社によりテフォース（Ｔｅｆｏｓｅ）（登録商標）６３の商標名で販売されている、ＰＥＧ－６／ＰＥＧ－３２／ステアリン酸グリコールの混合物、ＰＰＧ－３ミリスチルエーテル、セチルジメチコンコポリオール及びソルビタンモノステアリン酸又はトリステアリン酸などのシリコーン乳化剤、ＰＥＧ－４０ステアリン酸、又はオキシエチレン化モノステアリン酸ソルビタン（２０　ＥＯ）に言及することができる。
【００８４】
本発明において用いうる溶媒としては、低級アルコール、とりわけ、エタノール及びイソプロパノール、並びにプロピレングリコールに言及することができる。
【００８５】
本発明の組成物はまた、特に、ヴィシー盆地に由来する水であるヴィッテル（Ｖｉｔｔｅｌ）水及びラロッシュポゼ（ｌａ　Ｒｏｃｈｅ　Ｐｏｓａｙ）水から選択される湧水及び／又は鉱（泉）水も有利に含有しうる。
【００８６】
親水性ゲル化剤としては、カルボマーなどのカルボン酸ポリマー；アクリル酸／アクリル酸アルキルコポリマー、ポリアクリルアミドなどのアクリルコポリマーであり、特に、ＳＥＰＰＩＣ社によりセピゲル（Ｓｅｐｉｇｅｌ）３０５（登録商標）の商標名で販売されている、ポリアクリルアミド、Ｃ１３～１４のイソパラフィン、及びＬａｕｒｅｔｈ－７の混合物；多糖、例えば、ヒドロキシアルキルセルロースなどであり、特に、ヒドロキシプロピルセルロース及びヒドロキシエチルセルロースなどの誘導体；グアーガム、ローカストビーンガム、イナゴマメガム、及びキサンタンガムなどの天然ガム；並びに粘土に言及することができる。
【００８７】
脂溶性ゲル化剤としては、ベントンなどの改質粘土、ステアリン酸アルミニウムなど、脂肪酸の金属塩、疎水性シリカ、その他、エチルセルロース及びポリエチレンに言及することができる。
【００８８】
本発明による組成物はまた、クレンジングソープ又はクレンジングバーを構成する固体

調製物でもありうる。

【００８９】

それらはまた、溶液、クリーム、ゲル、エマルジョン、又はムースの形態で頭皮に用いることもでき、代替的に、高圧ガスもまた含有するエアゾール組成物の形態で頭皮に用いることもできる。

【００９０】

経口投与のための本発明による経口使用の場合、摂取可能な支持物質又は担体の使用が好ましい。摂取可能な支持物質又は担体は、考慮する組成物の種類に応じて多様な性質でありうる。

【００９１】

ミルク、ヨーグルト、チーズ、発酵乳、ミルクベースの発酵製品、アイスクリーム、シリアルベースの製品又は発酵シリアルベースの製品、朝食用シリアル、シリアルバー又はグラノーラバー、ミルクベースの粉末、特殊調製粉乳及び粉ミルク、チョコレート様又はシリアル様の菓子食品、動物用飼料、特に、家畜動物用飼料、錠剤、ゲル状カプセル又はトローチ、液体細菌懸濁液、乾燥形態の経口栄養補助食品及び液体形態の経口栄養補助食品は、とりわけ、摂取可能な支持物質又は担体としての使用に適する。

【００９２】

経口投与される、本発明による組成物は、例えば、コーティングされた錠剤、ゲル状カプセル、ゲル、エマルジョン、錠剤、カプセル、ハイドロゲル、食品バー、コンパクトパウダー又はルースパウダー、懸濁液又は溶液、菓子製品、発酵乳、発酵させたチーズ、チューインガム、歯磨き粉、又はスプレー溶液、又は食品担体の形態で調合することができる。

【００９３】

錠剤又はトローチ、乾燥形態の経口栄養補助食品、及び液体形態の経口栄養補助食品は、食餌用支持物質若しくは医薬用支持物質又は食品担体としての使用に適する。

【００９４】

組成物は、例えば、特に、糖でコーティングされた錠剤、ゲル状カプセル、ゲル、エマルジョン、錠剤、カプセル、及び制御放出を可能とするハイドロゲルを生成させるための通常の工程を介して調合しうる栄養補助食品でありうる。

【００９５】

特に、本発明による微生物は、あらゆる形態の栄養補助食品又は栄養強化食品、例えば、食品バー又はコンパクトパウダー若しくは非コンパクトパウダーへと組み込むことができる。パウダーは、水、ソーダ、ミルク製品、又はダイズ派生物中で希釈することもでき、食品バーへと組み込むこともできる。

【００９６】

本発明の微生物、その画分、及び／又はその代謝産物を、さらに、このような経口組成物又は栄養補助食品のための通常の賦形剤及び成分、すなわち、特に、脂肪性成分及び／又は水性成分、保湿剤、増粘剤、防腐剤、テクスチャリング剤、芳香増強剤、及び／又はコーティング剤、抗酸化剤、防腐剤、並びに食品部門で一般的な染料と調合することもできる。

【００９７】

当分野では、薬剤及び賦形剤を経口組成物用に、特に、栄養補助食品用に調合することが知られており、本明細書における詳細な記載の対象とはしない。

【００９８】

治療適用では、疾患及びその合併症の症状を少なくとも部分的に治癒させるか又は停止させるのに十分な量で組成物を投与する。これを達成するのに十分な量を、「治療有効用量」と定義する。この目的で有効な量は、疾患の重症度並びに患者の体重及び全身状態など、当業者に知られる多数の因子に依存する。

【００９９】

予防適用では、本発明による組成物を、特定の疾患に対して感受性であるか、そうでな

ければこの疾患のリスクがある患者に、疾患を発症するリスクを少なくとも部分的に軽減するのに十分な量で投与する。このような量を、「予防有効用量」と定義する。ここでもまた、正確な量は、患者の健康状態及び体重など、多数の患者特異的な因子に依存する。

【０１００】

本発明の組成物は、治療有効用量又は予防有効用量の少なくとも１つの本発明のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体及び／又は無細胞の培養上清を含む。

【０１０１】

当業者は、用量を適宜調整するであろう。

例えば、組成物は、１日の用量当たり10^6～10^{12}ＣＦＵ、例えば、10^8～10^{10}ＣＦＵの量の、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体を含みうる。

【０１０２】

先行研究はまた、非複製型Ｌ．ジョンソニー（Ｌ．ｊｏｈｎｓｏｎｉｉ）ＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５を、感染症を含めた、免疫系と関連する障害の治療又は予防において用いうることも示している（参照により全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１０／１３３４７５参照）。Ｌ．ジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５は、構成的なｈＢＤ１発現を強く誘導し、熱処理されたＬ．ジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５は、その生存対応物より強力にｈＢＤ１を上方制御することが見出された。

【０１０３】

結果として、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体はまた、非複製形態でも存在させることができる。

【０１０４】

「非複製型」のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体は、熱処理された変異体を包含する。これは、不活化された天然変異体、死滅した天然変異体、生存不可能な天然変異体、並びに／又はＤＮＡ、代謝産物、細胞質化合物、及び／若しくは細胞壁物質などの断片として存在する天然変異体である、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体を包含する。

【０１０５】

「非複製型」とは、古典的プレート播種法において、生存可能な細胞及び／又はコロニー形成単位を検出しえないことを意味する。このような古典的プレート播種法は、微生物学書：Ｊａｍｅｓ　Ｍｏｎｒｏｅ　Ｊａｙ、Ｍａｒｔｉｎ　Ｊ．Ｌｏｅｓｓｎｅｒ、Ｄａｖｉｄ　Ａ．Ｇｏｌｄｅｎ．２００５、「Ｍｏｄｅｒｎ　ｆｏｏｄ　ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ」、７版、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．７９０ページにまとめられている。典型的には、生存可能な細胞の非存在は、以下の通りに示すことができる：異なる濃度の細菌調製物（「非複製型」試料）の接種及び適切な条件下（少なくとも２４時間にわたる、好気性雰囲気下及び／又は嫌気性雰囲気下）でのインキュベーション後において、寒天プレート上に目視可能なコロニーが見られないか、又は液体の増殖培地中で濁度の増大が見られないこと。

【０１０６】

明らかに、非複製型の微生物はコロニーを形成せず、結果として、このことは、１ｇ当たりに10^6～10^{12}ＣＦＵの複製型細菌から得られた非複製型微生物の量として理解されるべきである。

【０１０７】

組成物はまた、１日の用量当たり０．００５ｍｇ～５０００ｍｇ、例えば、０．５ｍｇ～５０ｍｇの量の、本発明によるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５株の天然変異体も含みうる。

【０１０８】

当業者は、開示される本発明の範囲から逸脱しない限りにおいて、本明細書で記載される本発明の全ての特色を自由に組み合わせうることを理解するであろう。特に、本発明の

使用について記載される特色は、本発明の食品材料に適用することができ、この逆もまた成り立つ。

【０１０９】

本発明のさらなる利点及び特色は、以下の実施例及び図から明らかである。

【実施例】

【０１１０】

実施例１：ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５培養物のメタンスルホン酸エチル処理

ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５の１６時間培養物を約10^8コロニー形成単位含有する１００μｌの試料を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で３回洗浄した。細胞を１ｍｌのＰＢＳ中に最終的に懸濁させ、０又は１０μｌのメタンスルホン酸エチルを添加し、振とうせずに３７℃でンキュベートした。処理された細胞をＰＢＳ中で２回洗浄し、処理された培養物及び処理されていない培養物のＣＦＵを決定し、生存細胞としてプロットして、図１に示される「生存曲線」を得た。まず、１％の生存細胞を生じる条件を標的とし、前後の時点と共に一括し、細胞を希釈し、計数のためにＭＲＳプレート上に単一のコロニーとして播種した。次いで、残りの処理された細胞を用いて、１０ｍｌのＭＲＳ培養液に接種し、３７℃で１６時間にわたる増殖のためにインキュベートした。次いで、培養物を希釈し、ＭＲＳプレート上に塗布し、スクリーニングするための個別のコロニーを生じさせた。

【０１１１】

突然変異は主に二本鎖ＤＮＡにおけるグアノシン（Ｇ）残基の酸化を介して細菌中で天然に生じ、図２に示す通り、ＤＮＡ複製により分離すると、典型的に単一塩基対の変化を生じさせる。これは、どのＤＮＡ鎖が配列決定されるかに応じて、Ｇからアデノシン（Ａ）への変化及びシチジン（Ｃ）からチミジン（Ｔ）への変化という、天然の突然変異プロファイルを結果としてもたらす。メタンスルホン酸エチルは、Ｇ塩基の化学的酸化を介して作用し、天然の突然変異と同じ突然変異プロファイル、すなわち、どのＤＮＡ鎖が配列決定されるかに応じてＧからＡ及びＣからＴ、を結果としてもたらす。これは、観察された変化のうちの大部分がＧからＡ及びＣからＴである、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼの遺伝子及びゲノム配列のＤＮＡ配列決定により、後に確認された。

【０１１２】

実施例２：Ｄ－乳酸産生が欠損した株についての個別のコロニーのスクリーニング

メタンスルホン酸エチル処理した個別のコロニーを、２００μｌのＭＲＳ培養液を含有する９６ウェルプレートへと採取し、３７℃で２４時間にわたりインキュベートして、ミニ培養物を形成した。培養物の増殖は、テカンサンライズ（Ｔｅｃａｎ　Ｓｕｎｒｉｓｅ）マイクロプレートリーダーを用いて、６２０ｎｍにおける吸光度により推定した。１０μｌの培養上清を、１００ｍＭのトリスＨＣｌ　ｐＨ９、２．５ｍＭのＥＤＴＡ　ｐＨ８．０、２０Ｕ／ｍｌのＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ（リゥコノストックメゼントロイデス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ　ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ）に由来する）、１ｍｇ／ｍｌのＮＡＤ（β－ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド）に加えて、３％の水酸化ヒドラジニウムを含有する反応混合物１９０μｌと混合し、室温で１時間インキュベートした。次いで、テカンサンライズマイクロプレートリーダーを用いて、３２０ｎｍにおける吸光度（β－ＮＡＤＨの形成）を測定し、データをエクセル（Ｅｘｃｅｌ）へとエクスポートし解析した。各プレートには、データを標準化するための基準として、ＭＲＳ単独、及び５％、２５％、５０％、又は１００％の濃度のラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５培養上清を含有する対照を含めた。

【０１１３】

これは、増殖後の培養培地におけるＤ－乳酸の存在又は非存在を決定するための単離コロニーの表現型解析である。個別のコロニーをＤ－乳酸の存在についてスクリーニングする場合には、５０％のＤ－乳酸産生細胞と５０％のＤ－乳酸非産生細胞とを含有する「混合された」培養物が、Ｄ－乳酸の存在について「陽性」である培養物を結果としてもたら

すことも明らかである。したがって、標的とするＤ－乳酸を欠損させた表現型は、Ｄ－乳酸産生の表現型に対して「劣性」であると考えられる。これは、図２に示す突然変異誘発の概略を、「親個体及び変化させた個体の両方の混合物であるがために、表現型的にはＤ－乳酸陽性である最終的なコロニーを、単一の酸化したＧ塩基がもたらす」、と考える場合に重要である。この場合には、メタンスルホン酸エチル処理後にＭＲＳ培養液中での増殖を含めることが、Ｄ－乳酸産生が欠損した株を単離するのに重要であった。メタンスルホン酸エチルで処理された約２１，０００の個別のコロニーをスクリーニングした後、Ｄ－乳酸産生が欠損した１５のコロニーを単離し、さらなる解析にかけた。

【０１１４】

実施例３：培養培地中のＤ－乳酸レベルの決定

培養物は、ＭＲＳ培養液中、３７℃で１６時間にわたり増殖させ、細菌を、遠心分離により取り除いた。Ｄ－乳酸の濃度を決定するため、無細胞の培養上清を水で希釈し、上記の通りに解析し、Ｄ－乳酸ナトリウムの希釈液により作成された検量線と比較した。Ｌ－乳酸の濃度も、酵素のＤ－乳酸デヒドロゲナーゼをウサギ筋肉のＬ－乳酸デヒドロゲナーゼと交換し、Ｌ－乳酸ナトリウムを基準物質として用いることにより同様に決定した。ＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７についてのこの解析の結果は、表１に示され、対照であるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５、ＧＭＯにより不活化されたＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を伴うラクトバチルスジョンソニーＮＣＣ９００６、並びにいずれもＬ－乳酸産生株であると考えられる、ラクトバチルスパラカゼイ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐａｒａｃａｓｅｉ）ＮＣＣ２４６１及びラクトバチルスラムノーサス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｈａｍｎｏｓｕｓ）ＮＣＣ４００７を包含する。

【０１１５】

ラクトバチルスパラカゼイＮＣＣ２４６１（受託番号：ＣＮＣＭ　Ｉ－２１１６）は、１９９９年1月１２日、ブダペスト条約に基づき、ＣＮＣＭに寄託された（所在地は既に記した）。ラクトバチルスラムノーサスＮＣＣ４００７（受託番号：ＣＧＭＣＣ　１．３７２４）は、２００４年１０月、ブダペスト条約に基づき、Ｃｈｉｎａ　Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　Ｃｅｎｔｅｒ（ＣＧＭＣＣ）、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｎｏ．１、Ｗｅｓｔ　Ｂｅｉｃｈｅｎ　Ｒｏａｄ、Ｃｈａｏｙａｎｇ　Ｄｉｓｔｒｉｃｔ、Ｂｅｉｊｉｎｇ　１００１０１、Ｃｈｉｎａに寄託された。ラクトバチルスジョンソニーＮＣＣ９００６は、「Ｄ－Ｌａｃｔａｔｅ　Ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ　Ｇｅｎｅ（ｌｄｈＤ）Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｒｅｓｕｌｔｉｎｇ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　Ｅｆｆｅｃｔｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｊｏｈｎｓｏｎｉｉ　Ｓｔｒａｉｎｓ　Ｌａ１　ａｎｄ　Ｎ３１２」（Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１９９９、６５（９）：４００２）と題するＬａｐｉｅｒｒｅらによる論文において記載される通り、ラクトバチルスジョンソニーＬａ１に由来する株である。

【０１１６】

表１：無細胞の培養物に由来するＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５、ＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７について決定されるＤ－乳酸値及びＬ－乳酸値。対照として、ＧＭＯによるＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の不活化を伴うラクトバチルスジョンソニー株であるＮＣＣ９００６株、いずれもＬ－乳酸産生株であると考えられるラクトバチルスパラカゼイＮＣＣ２４６１株及びラクトバチルスラムノーサスＮＣＣ４００７株を組み入れる。実験は３連で実施し、平均値と括弧内の標準偏差で示される。

【０１１７】

【表１】

株	全乳酸*	L-乳酸	D-乳酸	D-乳酸%
CNCM I-1225	14	4.8 (0.17)	9.2 (0.27)	65.7
CNCM I-4437	21.2	21.1 (0.53)	0.14 **	0.7
NCC9006	21.2	21.2 (3.25)	< 0.05 ***	< 0.3 ****
NCC2461	16.8	16.3 (0.97)	0.48 (0.02)	2.9
NCC4007	15.8	15.2 (0.49)	0.56 (0.03)	3.5

*g/l単位の乳酸値。
**試料のうちの1つだけが定量下限を上回る値を示した。
***定量下限を下回る。
****定量下限値を用いて計算した%。

【０１１８】
結果は、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５のＤ－乳酸産生値は全乳酸のうちの約６５％であるが、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７のＤ－乳酸産生値は大きく低下していることを示す。ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７のＤ－乳酸産生レベルは極めて低く、全乳酸のうちの１％未満である。この結果は、遺伝子工学の方法を用いて創出された不活化Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含有するラクトバチルスジョンソニーＮＣＣ９００６について得られた結果と同様である。また、いずれもＬ－乳酸産生細胞であると考えられ、これらの条件下で、それぞれ、３％及び３．５％のＤ－乳酸を産生する、対照株のラクトバチルスパラカゼイＮＣＣ２４６１及びラクトバチルスラムノーサスＮＣＣ４００７も注目される。これらのデータから、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株は、Ｌ－乳酸産生細胞であり、表現型的にはラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５と異なると考えることができる。

【０１１９】
実施例４：Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子における変化の同定
Ｄ－乳酸を欠損させた表現型の一因である、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子における変化を同定するために、ＤＮＡ配列解析のための領域をＰＣＲ増幅した。領域は、プライマーＰ１：ＴＣＡＧＣＡＣＡＴＡＡＣＣＡＧＣＡＧＣＴ（配列番号３）に加えて、Ｐ２：ＧＣＡＡＴＡＡＴＡＣＴＧＴＣＧＣＣＧＧＴ（配列番号４）を用いて、１μｌの細菌培養物から増幅した。単位複製配列は、プライマーＰ１、Ｐ３：ＧＴＧＴＡＴＡＡＴＡＡＡＡＧＡＣＧＧＴＣ（配列番号５）に加えて、Ｐ２により精製及び配列決定し、編集し、ＤＮＡＳＴＡＲシリーズのプログラムにより解析した。結果を図３に示す。図３に見られる通り、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株は、図３及び図４Ａの塩基対２７０におけるＧからＡへの変化を含有し、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素の配列の保存的なシグネチャードメインの外に位置する、７７位におけるアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変化（Ｒ７７Ｈ）を結果としてもたらす（図４Ｂ）。遺伝子配列決定のデータは、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７におけるＤ－乳酸産生が欠損した表現型が、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼの遺伝子配列及び酵素配列における対応する変化に付随して起こることを示している。

【０１２０】
実施例５：ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７の表現型安定性の決定
培養物のコレクションから最終的な生成物までの世代数の大きさを踏まえると、Ｄ－乳酸が欠損した表現型が安定であり、Ｄ－乳酸産生への可逆化が極めてまれであることが重要である。これについて調査するため、本発明者らは、ＭＲＳ培養液中でラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７を合計１００世代にわたり培養し、次いで、３００

の個別のコロニーを、Ｄ－乳酸産生について調べた。結果として、被験コロニーは、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７株について決定されたＤ－乳酸レベルを上回るＤ－乳酸レベルを示さなかった。この解析はまた、噴霧乾燥粉末及びＬｃ１飲料製品のパイロットスケールの生産の後でも実施し、同じ結果を得た。

【０１２１】

乳酸菌では、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ又はＬ－乳酸デヒドロゲナーゼの単一配列が、乳酸産生及びこの反応における共因子であるＮＡＤＨのＮＡＤへの再生に不可欠である。乳酸菌では、これが、嫌気性条件下でＮＡＤを再生させる唯一の経路であり、増殖に不可欠である。Ｄ－乳酸欠損株の場合、Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素が、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ酵素活性の欠如を補うのに十分なので、Ｄ－乳酸産生への可逆化のための選択圧は存在しない。

【０１２２】

実施例６：Ｌｃ１飲料製品におけるラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５及びラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７の生存

製品保存時におけるプロバイオティクス細菌の生存は、４５日間にわたる保存後に期待される10^7コロニー形成単位を確保するための重要な因子である。生存率が低下する理由は完全に理解されているわけではないが、酸素の関与についての何らかの証拠が存在すると考えられている。ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７が、シミュレートされた保存条件下で、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５と少なくとも同様に生存するかどうかについて検査するため、新鮮なＬｃ１飲料製品を採取し、１０分間にわたり８５℃まで加熱することにより生菌を消滅させた。次いで、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５又はラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７のいずれかを、無菌製品へと接種し、ボトルを密封し、８℃又は１５℃のいずれかで４５日間にわたる標準的な検査条件下で保存した。３回の独立した試験の結果を以下に示す。驚くべきことに、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－４４３７は、いずれの温度でも、３回の試験のいずれにおいても、ラクトバチルスジョンソニーＣＮＣＭ　Ｉ－１２２５より常に良好な生存を示し、改善はｌｏｇ０．４２～ｌｏｇ２超の範囲であった。

【０１２３】

【表２】

試験1.

保存温度	株	T = 0	T=45 日後	log 減損
8°C	CNCM I-1225	8.08	7.2	-0.88
	CNCM I-4437	8.04	7.62	-0.42
15°C	CNCM I-1225	8.08	6.36	-1.72
	CNCM I-4437	8.04	7.18	-0.87

【０１２４】

【表３】
試験2.

保存温度	株	T = 0	T=45 日後	log 減損
8°C	CNCM I-1225	7.93	6.46	-1.47
	CNCM I-4437	7.79	6.84	-0.95
15°C	CNCM I-1225	7.93	5.6	-2.33
	CNCM I-4437	7.79	6.7	-1.09

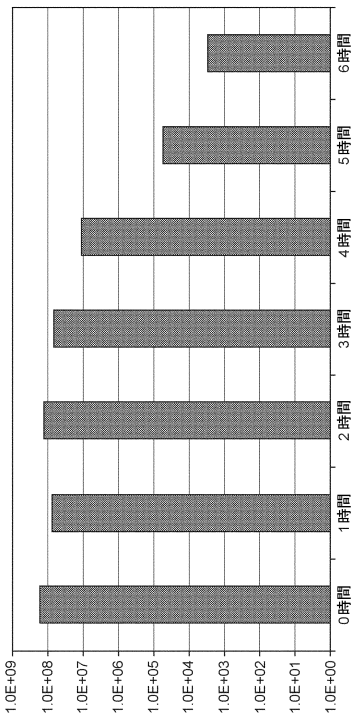
【０１２５】
【表４】
試験3.

保存温度	株	T = 0	T=45 日後	log 減損
8°C	CNCM I-1225	8.23	6.2	-2.03
	CNCM I-4437	7.91	7.41	-0.49
15°C	CNCM I-1225	8.23	5.85	-2.38
	CNCM I-4437	7.91	6.83	-1.08

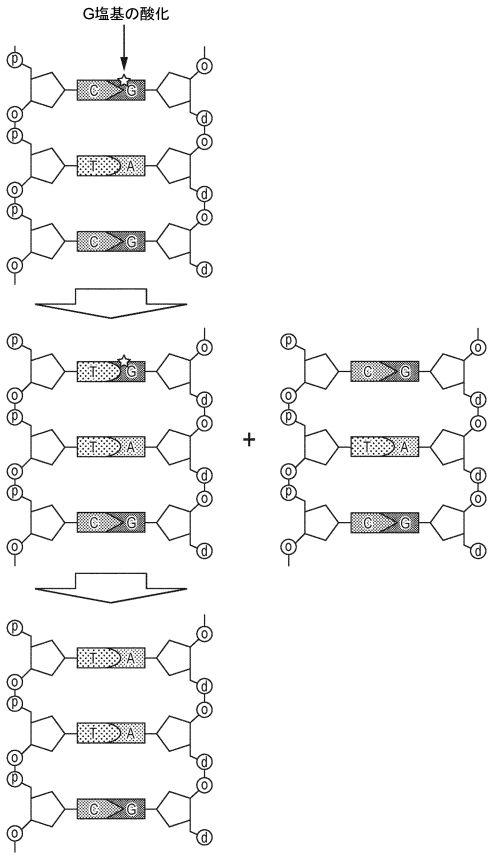
【０１２６】
【表５】
配列番号の一覧:

配列番号(DNA)	配列番号(タンパク質)	簡単な説明
1	2	ラクトバチルス・ジョンソニーCNCM I-1225のD-乳酸デヒドロゲナーゼ
3	該当なし	プライマーP1 (実施例4参照)
4	該当なし	プライマーP2 (実施例4参照)
5	該当なし	プライマーP3 (実施例4参照)
6	7	ラクトバチルス・ジョンソニーCNCM I-4437のD-乳酸デヒドロゲナーゼ(図4A及び4B)

【図１】



【図２】



【図３】

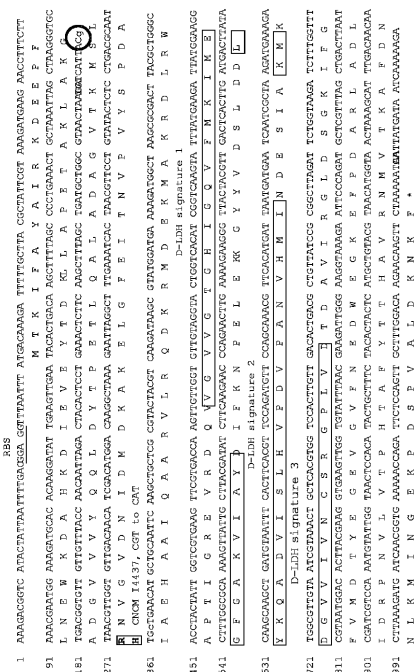


FIGURE 3

【図４Ａ】

FIGURE 4A

SEQ ID NO: 6

```
   1  ATGACAAAGA TTTTTGCTTA CGCTATTCGT AAAGATGAAG AACCTTTCTT
  51  AAACGAATGG AAAGATGCAC ACAAGGATAT TGAAGTTGAA TACACTGACA
 101  AGCTTTTAGC CCCTGAAACT GCTAAATTAG CTAAGGGTGC TGACGGTGTT
 151  GTTGTTTACC AACAATTAGA CTACACTCCT GAAACTCTTC AAGCTTTAGC
 201  TGATGCTGGC GTAACTAAGA TGTCATTACA TAACGTTGGT GTTGACAACA
 251  TCGACATGGA CAAGGCTAAA GAATTAGGCT TTGAAATCAC TAACGTTCCT
 301  GTATACTCTC CTGACGCAAT TGCTGAACAT GCTGCAATTC AAGCTGCTCG
 351  CGTACTACGT CAAGATAAGC GTATGGATGA AAAGATGGCT AAGCGCGACT
 401  TACGCTGGGC ACCTACTATT GGTCGTGAAG TTCGTGACCA AGTTGTTGGT
 451  GTTGTAGGTA CTGGTCACAT CGGTCAAGTA TTTATGAAGA TTATGGAAGG
 501  CTTTGGCGCA AAAGTTATTG CTTACGATAT CTTCAAGAAC CCAGAACTTG
 551  AAAAGAAGGG TTACTACGTT GACTCACTTG ATGACTTATA CAAGCAAGCT
 601  GATGTAATTT CACTTCACGT TCCAGATGTT CCAGCAAACG TTCACATGAT
 651  TAATGATGAA TCAATCGCTA AGATGAAAGA TGGCGTTGTA ATCGTAAACT
 701  GCTCACGTGG TCCACTTGTT GACACTGACG CTGTTATCCG CGGCTTAGAT
 751  TCTGGTAAGA TCTTTGGTTT CGTAATGGAC ACTTACGAAG GTGAAGTTGG
 801  TGTATTTAAC GAAGATTGGG AAGGTAAAGA ATTCCCAGAT GCTCGTTTAG
 851  CTGACTTAAT CGATCGTCCA AATGTATTGG TAACTCCACA TACTGCTTTC
 901  TACACTACTC ATGCTGTACG TAACATGGTA ACTAAAGCAT TTGACAACAA
 951  CTTAAACATG ATCAACGGTG AAAAACCAGA TTCTCCAGTT GCTTTGGACA
1001  AGAACAAGTT CTAA
```

【図４Ｂ】

FIGURE 4B

SEQ ID NO: 7

```
   1  MTKIFAYAIR KDEEPFLNEW KDAHKDIEVE YTDKLLAPET AKLAKGADGV
  51  VVYQQLDYTP ETLQALADAG VTKMSLHNVG VDNIIMDKAK ELGFEITNVP
 101  VYSPDAIAEH AAIQAARVLR QDKRMDEKMA KRDLRWAPTI GREVRDQVVG
 151  VVGTGHIGQV FMKIMEGFGA KVIAYDIFKN PELEKKGYYV DSLDDLYKQA
 201  DVISLHVPDV PANVHMINDE SIAKMKDGVV IVNCSRGPLV DTDAVIRGLD
 251  SGKIFGFVMD TYEGEVGVFN EDWEGKEFPD ARLADLIDRP NVLVTPHTAF
 301  YTTHAVRNMV TKAFDNNLKM INGEKPDSPV ALDKNKF
```

【配列表】
0006014652000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61P 11/02		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12	
A61P 31/04		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	11/02	
A23K 20/00		***(2016.01)***	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	20/00	
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ

(72)発明者 プリッドモア, レイモンドーデイヴィッド
スイス, シーエイチー１０２５ サンーシュルピス, リュ ドュ サントル ６１ビー
(72)発明者 フォータ, フランシス
スイス, シーエイチー１０１２ ローザンヌ, １０シー, シュマン ド ロヴェレアーズ
(72)発明者 デレイ, ミシェル
スイス, シーエイチー１６７５ ヴォドゥラン, ルート ド ブレサン ４
(72)発明者 ヤンコビッチ, イワナ
スイス, シーエイチー１０６６ エパランジュ, ル グラン シュマン １０６

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特開平１０－３１３８８４（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－１９４３７２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００４／０３９９６４（WO，Ａ１）
Appl. Environ. Microbiol., 1999, Vol.65, No.9, pp.4002-4007
J. Industrial Microbiol., 1992, Vol.11, pp,23-28

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １／００－７／０８
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ