

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7703168号
(P7703168)

(45)発行日 令和7年7月7日(2025.7.7)

(24)登録日 令和7年6月27日(2025.6.27)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	E Z N A
C 1 2 N	15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53	
C 1 2 Q	1/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/00	
C 1 2 P	33/20 (2006.01)	C 1 2 P	33/20	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
請求項の数 20 (全102頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-571281(P2021-571281)	(73)特許権者	598121341 慶應義塾 東京都港区三田二丁目15番45号	
(86)(22)出願日	令和3年1月18日(2021.1.18)	(73)特許権者	524412640 J S R株式会社 東京都港区東新橋一丁目9番2号	
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/001434	(74)代理人	110001047 弁理士法人セントクレスト国際特許事務 所	
(87)国際公開番号	WO2021/145458	(72)発明者	広瀬 信義 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾 大学 医学部内	
(87)国際公開日	令和3年7月22日(2021.7.22)	(72)発明者	本田 賢也 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾 大学 医学部内	
審査請求日	令和6年1月15日(2024.1.15)			
(31)優先権主張番号	62/961,797			
(32)優先日	令和2年1月16日(2020.1.16)			
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			
(31)優先権主張番号	63/007,708			
(32)優先日	令和2年4月9日(2020.4.9)			
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			
(31)優先権主張番号	63/028,077			
	最終頁に続く			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 胆汁酸を生成するための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3-オキソ-5 α -ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(5AR)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソアロLCAに変換するための組成物。

【請求項2】

3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β HSDH)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソアロLCAをイソアロLCAに変換するための組成物。

【請求項3】

5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【請求項4】

5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【請求項5】

3-オキソ-5 β -ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(5BR)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソLC

Aに変換するための組成物。

【請求項6】

5ARをコードするポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、イソLCA又は3-オキソLCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【請求項7】

グラム陽性菌に対する抗菌用組成物である、請求項1～6のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

イソアロLCA又はイソLCAを有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

【請求項9】

5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

【請求項10】

グラム陽性菌の感染症を治療又は予防するための組成物である、請求項7～9のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療又は予防するための組成物である、請求項7～9のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

敗血症及び敗血症を基礎疾患として有する急性呼吸窮迫症候群（ARDS／ALI）からなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための組成物である、請求項7～9のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

（1）被検者糞便中、3-オキソLCA、イソアロLCA、3-オキソアロLCA、アロLCA、3-オキソLCA及びイソLCAからなる群から選択される少なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

（2）工程（1）で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

（3）工程（2）における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法。

【請求項14】

百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

（1）被検者糞便中、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌を定量する工程、

（2）工程（1）で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

（3）工程（2）における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法。

【請求項15】

グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

（1）被検者糞便中、3-オキソLCA及びイソアロLCAからなる群から選択される少なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

10

20

30

40

50

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法。

【請求項16】

グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法。

【請求項17】

3-オキソアロICAの存在下、3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロICAを採取する工程を含む、イソアロICAの製造方法。

【請求項18】

3-オキソ-Δ⁴-ICAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロICAを採取する工程を含む、イソアロICAの製造方法。

【請求項19】

3-オキソ-Δ⁴-ICAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチドと3βHSDHをコードするポリヌクレオチドとを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロICAを採取する工程を含む、イソアロICAの製造方法。

【請求項20】

イソICA又は3-オキソICAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロICAを採取する工程を含む、イソアロICAの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胆汁酸を生成するための組成物に関する。より詳しくは、本発明は、百寿（寿命が百歳以上となること）等に関連する胆汁酸を産生する細菌を有効成分とする組成物に関する。また、本発明は、当該組成物の、グラム陽性菌に対する抗菌用途、前立腺がん等の治療又は予防用途に関する。

【背景技術】

【0002】

マイクロバイーム（細菌叢が持つ遺伝子や機能を統合する概念）は、病原菌感染に対する抵抗性、免疫、神経活動、骨密度、消化吸収機能といった、高齢者の健康状態を左右する重要な因子と考えられてきた（非特許文献1～5）。高齢者の細菌叢には、しばしば個人間格差や多様性の現象が見られ、これらが、免疫機能の老化、慢性全身炎症や老衰と関連していると考えられている（非特許文献6及び7）。老化に関わる健康全般や組織の

10

20

30

40

50

恒常性の修復や維持のために、細菌叢を構成する各細菌の機能の動的な調和を総合的に理解し、それらを論理的に操作する戦略の構築が不可欠となる。

【0003】

百歳以上の高齢者である百寿者は、高血圧、糖尿病、肥満やがんといった疾患にかかりにくいために長寿が達成されることが知られている（非特許文献8及び9）。さらに、百寿者の多くは、インフルエンザ、肺結核、赤痢、サルモレラ等の感染症や飢餓期を生き延びてきている（非特許文献10）。このことは、百寿者の有する細菌叢は、長寿の結果としてだけでなく、健康に年を重ねる事や回復力、恒常性の維持に積極的に寄与していることを示唆している（非特許文献6及び11～13）。

【0004】

しかしながら、病原菌感染や環境負荷への抵抗性に寄与している百寿者が保有する有益な共生細菌等はいまだ明らかとなっていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】 Nicoletti, C. Age-associated changes of the intestinal epithelial barrier: Local and systemic implications. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 1467~1469 (2015).

【文献】 Huang, Z. & Kraus, V. B. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 123~129 (2016).

【文献】 Morais, L. H., Schreiber, H. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* (2020).

【文献】 Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 576~590 (2018).

【文献】 Santoro, A. et al. Microbiomes other than the gut: inflammaging and age-related diseases. *Semin. Immunopathol.* (2020).

【文献】 Claesson, M. J. et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178~184 (2012).

【文献】 Claesson, M. J. et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4586~4591 (2011).

【文献】 Andersen, S. L., Sebastiani, P., Dworkis, D. A., Feldman, L. & Perls, T. T. Health span approximates life span among many supercentenarians: Compression of morbidity at the approximate limit of life span. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 67A, 395~405 (2012).

【文献】 Hirata, T. et al. Associations of cardiovascular biomarkers and plasma albumin wi

10

20

30

40

50

th exceptional survival to the highest ages. Nat. Commun. 11, 1~17 (2020).

【文献】Bloom, D. E. & Cadarette, D. Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. Front. Immunol. 10, 549 (2019).

【文献】Barcena, C. et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. Nat. Med. 25, 1234~1242 (2019).

【文献】Biagi, E. et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. Curr. Biol. 26, 1480~1485 (2016).

【文献】Wu, L. et al. A cross-sectional study of compositional and functional profiles of gut microbiota in Sardinian centenarians. mSystems 4, e00325-19 (2019).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明が解決しようとする課題は、百寿者特有の有益な共生細菌を同定し、当該細菌等を用いた病原菌感染の予防又は治療方法等を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

百寿者は、慢性炎症や老化に伴う疾患への罹患率が低く、その結果として長寿を達成している。腸内細菌叢は、長寿や健康に関わる重要因子と考えられている。

【0008】

そこで、本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、百寿者（平均107歳）が、高齢者（85~89歳）や若年者（21~55歳）と比較して、特異的に、isoallo lithocholic acid（リトコール酸、LCA）、isoLCA、3-oxoLCA、alloLCA、3-oxoalloLCA等の二次胆汁酸を産生する腸内細菌を保有していることを見出した。特に、isoalloLCAを誘導する生化学合成経路はこれまでに報告されていない。

【0009】

さらに、百寿者の便より単離された68種の細菌株において、Parabacteroides merdae及びOdoribacteraceaeに属する複数の株がisoalloLCAを効果的に誘導することが明らかになった。さらにまた、P. merdaeの遺伝子欠損株を用いた実験により、3-オキソー5 α -ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ（別称：5 α -reductase（5AR））と3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3 β -hydroxysteroid dehydrogenase（3 β HSDH））がisoalloLCAの生成を担っていることが判明した。

【0010】

そして、これら二次胆汁酸誘導体は、Clostridioides difficileやvancomycin-resistant Enterococcus faecium等のグラム陽性多剤耐性菌に対する抗菌作用が非常に高いということも見出した。

【0011】

また、前記5AR及び3 β HSDHが、isoalloLCAの生成のみならず、テストステロンの代謝に関与していることも、本発明者らは明らかにした。これら酵素、又はそれらを産生する菌が、腫瘍誘発性のテストステロン及び5 α -ジヒドロテストステロン（DHT）を枯渇させる一方で、転移抵抗性である3 β -アンドロスタンジオールを生成

10

20

30

40

50

することによって、前立腺がん等に対し、治療的效果が奏され得る。

【0012】

このように、本発明者らは、特定の二次胆汁酸代謝物、これらの生成に関与する酵素、及び当該酵素を産生する細菌が、病原菌の感染や前立腺がん等のリスクを低減させ、長寿に関与することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明は以下を提供するものである。

【0014】

<1> 3-オキソ-5 α -ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(5AR)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-oxo- Δ^4 -LCA(3-オキソ- Δ^4 -LCA)を3-oxoalloLCA(3-オキソアロLCA)に変換するための組成物。

10

【0015】

本発明はまた、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソアロLCAに変換するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0016】

<2> 3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β HSDH)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソアロLCAをイソアロLCA(isoalloLCA)に変換するための組成物。

20

【0017】

本発明はまた、3-オキソアロLCAをイソアロLCAに変換するための組成物を製造するための、3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β HSDH)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0018】

<3> 5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【0019】

本発明はまた、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

30

【0020】

<4> 5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【0021】

本発明はまた、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

40

【0022】

<5> 3-オキソ-5 β -ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(5BR)をコードするポリヌクレオチドを有する細菌。

【0023】

<6> 5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソLCA(3-oxoLCA)に変換するための組成物。

【0024】

本発明はまた、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソLCAに変換するための組成物を製造するための、5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0025】

50

<7> 5ARをコードするポリヌクレオチド、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、イソLCA (isoLCA) 又は3-オキソLCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【0026】

本発明はまた、イソLCA又は3-オキソLCAからイソアロLCAを生成するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチド、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0027】

<8> グラム陽性菌に対する抗菌用組成物である、<1>~<7>のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【0028】

<9> イソアロLCA又はイソLCAを有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

【0029】

<10> 5AR、3 β HSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

【0030】

<11> グラム陽性菌の感染症を治療又は予防するための組成物である、<8>~<10>のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【0031】

<12> クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療又は予防するための組成物である、<8>~<10>のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【0032】

<13> 敗血症及び敗血症を基礎疾患として有する急性呼吸窮迫症候群 (ARDS / ALI) からなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための組成物である、<8>~<10>のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【0033】

本発明はまた、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための組成物、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための組成物、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS / ALI からなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための組成物を製造するための、

5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、並びに5ARをコードするポリヌクレオチド、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌からなる群から選択される少なくとも1の細菌の使用に関する。

【0034】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS / ALI からなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、

5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、並びに、5ARをコードす

10

20

30

40

50

るポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌からなる群から選択される少なくとも1の細菌の使用に関する。

【0035】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖抑制、グラム陽性菌感染症の治療若しくは予防、クロストリジウム・ディフィシル感染症の治療若しくは予防、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患の、治療若しくは予防に用いるための、

5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、並びに、5ARをコードするポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌からなる群から選択される少なくとも1の細菌に関する。

【0036】

本発明はまた、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、並びに、5ARをコードするポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌からなる群から選択される少なくとも1の細菌の有効量を、対象に投与する、

グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、方法に関する。

【0037】

本発明はまた、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための組成物、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための組成物、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための組成物を製造するための、イソアロLCA又はイソLCAの使用に関する。

【0038】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、イソアロLCA又はイソLCAの使用に関する。

【0039】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖抑制、グラム陽性菌感染症の治療若しくは予防、クロストリジウム・ディフィシル感染症の治療若しくは予防、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患の、治療若しくは予防に用いるための、イソアロLCA又はイソLCAに関する。

【0040】

本発明はまた、イソアロLCA又はイソLCAの有効量を、対象に投与する、グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、方法に関する。

【0041】

本発明はまた、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための組成物、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための組成物、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための組成物を製造するための、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素の使用に関する。

【0042】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素の使用に関する。

10

【0043】

本発明はまた、グラム陽性菌の増殖抑制、グラム陽性菌感染症の治療若しくは予防、クロストリジウム・ディフィシル感染症の治療若しくは予防、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患の、治療若しくは予防に用いるための、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素に関する。

20

【0044】

本発明はまた、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素の有効量を、対象に投与する、グラム陽性菌の増殖を抑制するための、グラム陽性菌の感染症を治療若しくは予防するための、クロストリジウム・ディフィシルの感染症を治療若しくは予防するための、又は、敗血症及び敗血症を基礎疾患として有するARDS／ALIからなる群から選択される少なくとも1の疾患を、治療若しくは予防するための、方法に関する。

【0045】

<14> 3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、5α-ジヒドロテストステロン(DHT)を3β-アンドロスタンジオールに変換するための組成物。

30

【0046】

本発明はまた、DHTを3β-アンドロスタンジオールに変換するための組成物を製造するための、3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0047】

<15> 5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを有効成分とする、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

本発明はまた、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌との使用に関する。

40

【0048】

<16> 5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

【0049】

本発明はまた、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物を製造するための、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌の使用に関する。

【0050】

<17> 3βHSDHを有効成分とする、DHTから3β-アンドロスタンジオール

50

を生成するための組成物。

【0051】

本発明はまた、DHTから3 β -アンドロスタンジオールを生成するための組成物を製造するための、3 β HSDHの使用に関する。

【0052】

<18> 5AR及び3 β HSDHを有効成分とする、テストステロンから3 β -アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

【0053】

本発明はまた、テストステロンから3 β -アンドロスタンジオールを生成するための組成物を製造するための、5AR及び3 β HSDHの使用に関する。

【0054】

<19> 下記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための組成物である、<14>～<18>のうちのいずれか一項に記載の組成物

疾患群：

前立腺がん、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症、卵巣内皮がん、神経炎症、及びGABAA受容体を介したてんかん。

【0055】

本発明はまた、前記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための組成物を製造するための、

3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDH、並びに、5AR及び3 β HSDHからなる群から選択される少なくとも1の物質の使用に関する。

【0056】

本発明はまた、前記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための、

3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDH、並びに、5AR及び3 β HSDHからなる群から選択される少なくとも1の物質の使用に関する。

【0057】

本発明はまた、前記疾患群から選択される少なくとも1の疾患の、治療又は予防に用いるための、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDH、並びに、5AR及び3 β HSDHからなる群から選択される少なくとも1の物質に関する。

【0058】

本発明はまた、3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、5ARをコードするポリヌクレオチド及び3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、3 β HSDH、並びに、5AR及び3 β HSDHからなる群から選択される少なくとも1の物質の有効量を、対象に投与する、前記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための、方法に関する。

【0059】

<20> 下記疾患群から選択される少なくとも1の疾患の評価方法であって、疾患群：

前立腺がん、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症、卵巣

10

20

30

40

50

内皮がん、神経炎症、及びGABA受容体を介したてんかん、

(1) 被検者糞便中、3 β HSDHを産生する細菌を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は前記疾患に罹患する可能性は低いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は前記疾患に罹患する可能性が高い、又は罹患している可能性が高いと判定する工程を、含む方法。

【0060】

<21> 下記疾患群から選択される少なくとも1の疾患の予防方法又は治療方法であって、

疾患群：

前立腺がん、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症、卵巣内皮がん、神経炎症、及びGABA受容体を介したてんかん、

<20>に記載の方法にて、前記疾患に罹患する可能性が高い、又は罹患している可能性が高いと判定された前記被検者に、3 β HSDHを産生する細菌を投与する方法。

【0061】

<22> 百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、3-オキソLCA、イソアロLCA、3-オキソアロLCA、アロLCA(a l l o L C A)、3-オキソLCA及びイソLCAからなる群から選択される少なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法。

【0062】

<23> 百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、5AR、3 β HSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法。

【0063】

<24> 百歳以上生存する可能性を向上させる方法であって、

<22>又は<23>に記載の方法にて、百歳以上生存する可能性が低いと判定された前記被検者に、3-オキソLCA、イソアロLCA、3-オキソアロLCA、アロLCA、3-オキソLCA及びイソLCA、並びに、5AR、3 β HSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌からなる群から選択される少なくとも1を投与する方法。

【0064】

<25> グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、3-オキソLCA及びイソアロLCAからなる群から選択される少

10

20

30

40

50

なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法。

【0065】

<26> グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法。

【0066】

<27> グラム陽性菌の感染症を予防する方法であって、

<25>又は<26>に記載の方法にて、グラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定された前記被検者に、3-オキソLCA、イソアロLCA、並びに、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌からなる群から選択される少なくとも1を投与する方法。

【0067】

<28> 3-オキソアロLCAの存在下、3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【0068】

<29> 3-オキソ-Δ⁴-LCAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【0069】

<30> 3-オキソ-Δ⁴-LCAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチドと3βHSDHをコードするポリヌクレオチドとを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【0070】

<31> イソLCA又は3-オキソLCAの存在下、5ARをコードするポリヌクレオチド、3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【0071】

<32> 3βHSDHの存在下、3-オキソアロLCAからイソアロLCAを生成し、当該イソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【0072】

<33> 5AR及び3βHSDHの存在下、3-オキソ-Δ⁴-LCAからイソアロLCAを生成し、当該イソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

10

20

30

40

50

【0073】

<34> 5AR、3βHSDH及び5BRの存在下、イソLCA又は3-オキソLCAからイソアロLCAを生成し、当該イソアロLCAを採取する工程を含む、イソアロLCAの製造方法。

【発明の効果】

【0074】

本発明によれば、百寿に関連する胆汁酸の製造が可能となる。また当該胆汁酸、それらの生成に関与する酵素、及び当該酵素を産生する細菌等によって、グラム陽性菌の感染症、又は前立腺がん等の治療又は予防が可能となる。さらに、本発明によれば、糞便中におけるこれら細菌等の量を指標とすることによって、グラム陽性菌の感染症への抵抗性、前立腺がん等の罹患の可能性、百歳以上生存する可能性を評価することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1A】Bray-Curtisの非類似度を示す、β多様性のPCoAプロットである。より若い被験者（高齢者及び若年者）の腸内細菌叢から百寿者の腸内細菌叢へ徐々に分離していくことが示される。図中、「Centenarian（又はCE）」、「Elderly」、及び「Young」は各々、百寿者、高齢者及び若年者を示す（以下の図面においても同様）。図1A～1Gに、全メタゲノムショットガンシーケンシングとdenovoアセンブリ解析を基にした、被験者（日本人の百歳以上の長寿者（百寿者）、高齢者、若年者）の腸内細菌の特徴を示す。

【図1B】Shannon多様性指数を示すドットプロット図である若年者と比較して百寿者と高齢者の被験者で有意に増加した（ $P < 0.05$ 、線形モデル）。

【図1C】存在量の多い5つの細菌門の相対存在量（Relative abundance）を示すグラフである。

【図1D】差のある存在量について高齢の特徴に従ってグループ化された、百寿者、高齢者、若年者コントロール間の腸内細菌種（MSPs）の相対存在量（RelAb）の変化を示すグラフである。

【図1E】差のある存在量について若年の特徴に従ってグループ化された、百寿者、高齢者、若年者コントロール間の腸内細菌種の相対存在量の変化を示すグラフである。

【図1F】差のある存在量について百寿の特徴に従ってグループ化された、百寿者、高齢者、若年者コントロール間の腸内細菌種の相対存在量の変化を示すグラフである。図1D～1Fにおいて、それぞれの特徴は、百寿者、高齢者、若年者のグループの中の既定の軌跡に属する種に対する、異なる相対存在量の状況を表すモデルを示している。カラースケールは線形モデルからの係数を表し、それぞれの比較において、種の増加（カラー表示下「赤」）と減少（カラー表示下「青」）を示す。高齢者と比較した百寿者、若年者と比較した百寿者、若年者と比較した高齢者；それぞれのケースで後者のグループは、参照モデルとして使用した。FDR $P < 0.05$ で有意に存在量が異なる菌種を、アスタリスクで示す。

【図1G】百寿者、高齢者、若年者グループのC. scindensのbaiオペロン（baiA2とbaiNを除く）の遺伝子のホモログの存在量を示すドットプロット図である。アスタリスクは、Wilcoxonの順位和検定を基にしたFDR $P < 0.05$ において、有意に異なる存在量であることを示す。被験数：百寿者[n=176（153人）]、高齢者（n=110）、若年者（n=44）。それぞれの点は個々の被験者を示す。

【図2A】百寿者（n=127）、高齢者（n=108）、若年者（n=47）及び百寿者の直系親族（図中「CE-L」と表記（以下、同様）、n=18）について、個々の被験者の糞便における胆汁酸を、LC-MS/MSにより分析、定量した結果を示す、グラフである。カラー表示下、3-oxoalloLCAの比率を青色で、isoalloLCAの比率を赤色で、alloLCAの比率を緑色で、3-oxoLCAの比率を水色で、isoLCAの比率を黄色で示す。結果を、それぞれのグループ内で年齢順に示す。本発明者らが注目した百寿者91（CE91）を、点線枠で示す。図2A～2Gにおいて、

百寿者の糞便において、*isoLCA*、*3-oxoLCA*、*alloLCA*、*isoalloLCA*及び*3-oxoalloLCA*の含有量が有意に高いことを示す。

【図2B】糞便中の胆汁酸化合物の総量について、4種の年齢群の個々人に対して定量した結果を示す、ドットプロット図である。

【図2C】個人の胆汁酸分析結果間の差異を示す、Spearmanの相関を用いた多次元尺度構成法プロット(MDS)である。それぞれの点は、年齢群によって色分けされた各ドナー個人を示している(百寿者vs.高齢者; $P=4.27E-9$ 、百寿者vs.若年者; $P=2.72E-12$ 、百寿者vs.百寿者の直系親族; $P=4.18E-6$ 、高齢者vs.若年者; $P=0.00123$ 、Wilcoxon検定)。

【図2D】腸内細菌によって代謝される、トータル一次胆汁酸(Primary BA)とトータル二次胆汁酸(Secondary BA)の平均比率を示す、グラフである。

【図2E】CAを基にした胆汁酸(7α -と 12α -OH基を有する)とCDCAを基にした胆汁酸(7α -OH基を有する)の平均比率を示す、グラフである。

【図2F】糞便中の各胆汁酸化合物の定量結果を示すグラフである。図2B及び2D~2Fにおいて、データは平均±標準偏差にて示す。*** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$; Tukeyの検定を伴う一元配置分散分析。nsは有意差なしであることを示す。各点は個々人を示す。糞便中の総胆汁酸量は、糞便の湿重量に対する $\mu\text{mol/g}$ をもって示す。

【図3A】CE91の糞便細菌組成を示す図である。CE91の糞便から単離された68細菌株を、それらの相対存在量と共に示す。図3A~3Eにおいて、同定された、*isoLCA*、*3-oxoLCA*及び*isoalloLCA*の生成に関わる細菌株と遺伝子を示す。

【図3B】CE91由来68株による、 $50\mu\text{M}$ のLCAを基質とする胆汁酸代謝の結果を示す、グラフである。

【図3C】CE91由来68株による、 $50\mu\text{M}$ の $3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-LCA}$ を基質とする胆汁酸代謝の結果を示す、グラフである。図3B及び3Cにおいて、単離菌は、嫌気条件下、pH9に調整された培地中で48時間、 37°C で培養した。これらの図面において、予測される胆汁酸代謝酵素遺伝子ホモログの有無を、ワッフルチャートにて右側に示す。ホモログは $<1e-12$ E値; $>30\%$ 配列一致度; $>60\%$ クエリカバレッジとして定義した。また、これらの図面において、カラー表示下、赤で薄く色づけられたグラフ領域は、トランス型の化学構造を有する化合物を示し、青はシス型の化学構造を有する化合物を示す。

【図3D】*P. merdae* St3と*Odoribacteraceae* St21とにおいて、予測される胆汁酸代謝酵素遺伝子の概略図である。矢印はコーディング配列を示す。また、カラー表示下、同定された機能に基づき色分けしてある。

【図3E】*P. merdae* St3の、5AR、 $3\beta\text{HSDH}$ 又は5BR遺伝子の欠失株における胆汁酸代謝アッセイの結果を示す、グラフである。 $50\mu\text{M}$ の*3-oxoalloLCA*、 $3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-LCA}$ 又は 3-oxoLCA を基質としてpH9に調整した培地に加え、48時間 37°C で培養した。カラー表示下、検出された基質濃度は薄い黄色で示す。ndは未検出であることを示す。図3B、3C及び3Eにおいて、LC-MS/MSにて決定した胆汁酸濃度を示す。データは $N=2$ のサンプルの平均±標準偏差にて示す。

【図4A】グラム陽性病原体及びグラム陰性病原体に対する、WCA培地又はBHI培地における二次胆汁酸の最小発育阻止濃度(MIC90)を示す図である。

【図4B】各二次胆汁酸の濃度を変化させたWCA培地中での、病原体の増殖曲線を示すグラフである。カラー表示下、LCA、*isoLCA*及び*isoalloLCA*を各々、青色、黄色及び緑色にて示す。データは平均と標準偏差にて示す。エラーバーは、塗り潰し領域にて表す。

【図4C】 $8\mu\text{M}$ *isoalloLCA*含有又は含有しないWCA培地中で、*C. difficile* 630とVREを5時間培養した際の代表的な走査型電子顕微鏡画像(

10

20

30

40

50

SEM、左パネル)と透過型電子顕微鏡画像(TEM、右パネル)である。スケールバーは、 $1.0\mu\text{m}$ (SEM)、 200nm (*C. difficile* 630のTEM)、 500nm (VREのTEM)を示す。矢印は、*isoalloLCA*処理後の形状変化を示す。

【図4D】 $12.5\mu\text{M}$ 3-oxo- Δ^4 -LCA含有WCA培地中での、CE91由来の*Odoribacteraceae* St21、*C. innocuum* St51又は*P. distasonis* St4と共培養した際の、*C. difficile* 630又はVREの*In vitro*増殖抑制の結果を示す、グラフである。一晚培養した際のCFUを示す($n=6$)。

【図4E】WCA培地又はBHI培地中での、共生株に対する*isoalloLCA*のMIC90を示す図である。

【図4F】二次胆汁酸処理後の糞便培養液の多様性についてのShannon指数を示す、ドットプロット図である。健康な若年ドナーのヒト糞便サンプルを、3-oxoLCA又はLCA、*isoalloLCA*を添加($50\mu\text{M}$)した改良WCA培地中で、48時間インキュベートした結果を示す。図4Dと4Fにおいて、データは平均±標準偏差にて示す。***は $P<0.001$ であることを示す。図4Dは、Welchの補正を伴うMann-Whitney検定の結果を示す。図4Fは、Dunnの検定を伴うKruskal-Wallis検定の結果を示す。nsは有意差なしであることを示す。それぞれの点は、図4Dにおいては一つのマイクロタイタープレートの結果を示し、図4Fにおいては、ドナーの糞便培養の結果を示す。

【図4G】腸内細菌叢の属レベルの組成変化を示す、グラフである。健康な若年ドナーのヒト糞便サンプルを、3-oxoLCA、LCA、又は*isoalloLCA*(各 $50\mu\text{M}$)を添加した改良WCA培地中で、48時間インキュベートした結果を示す。

【図5A】百寿者群(図中「上」、ADL、 $n=94$)と高齢者群(図中「下」、ADL、 $n=112$)のバーセルインデックスによって見積もられた日常生活動作スコア(ADL)を示すグラフである。

【図5B】百寿者群(図中「上」、MMSE、 $n=68$)と高齢者群(図中「下」、MMSE、 $n=111$)のバーセルインデックスによって見積もられたミニメンタルステート検査(MMSE)スコアを示すグラフである。

【図5C】百寿者($n=149-153$)、高齢者($n=111-112$)、若年者($n=15-39$)の血液検査の結果を示すグラフである。赤血球数(RBC)；アルブミン；C反応性たんぱく質(CRP)；白血球数(WBC)；総タンパク；血中尿素窒素(BUN)；空腹時血糖；尿酸；クレアチニン。

【図5D】ELISAによって定量された、百寿者($n=122$)、高齢者($n=67$)、若年者($n=19$)個々の糞便中のリポカリンレベルを示すグラフである。

【図5E】百寿者($n=89$)、高齢者($n=112$)、若年者($n=43$)個々のBMI値を示すグラフである。図5C~5Eにおいて、データは平均±標準偏差にて示す。*** $P<0.001$ ；** $P<0.01$ ；* $P<0.05$ ；Dunnの検定を伴うKruskal-Wallis検定。nsは有意差なしであることを示す。灰色の領域は、正常値の範囲を示す。

【図5F】糖尿病、高血圧症、がんの病歴をもつ個人の割合を示すグラフである。黒色は、これらの疾患記録をもつ人の割合を示す。135人の百寿者と112人の高齢者と43人の若年者の病歴を調査した。

【図6】百寿者、高齢者、若年者コントロールのアセンブルされた腸内メタゲノム中の全ての門に関する相対存在量を示すドットプロット図である。線形モデルにおけるFDR $P<0.05$ で有意に差のある群を、アスタリスクで示す。点は個々人を示す。

【図7A】百寿者、高齢者、若年者、百寿者の直系親族、及びIBD患者群の個人間unweighted UniFrac距離行列を基にしたPCoAプロットである。カラー表示下、百寿者、高齢者、若年者、百寿者の直系親族、及びIBD患者を、各々、オレンジ色、青色、灰色、黄色、及び赤色にて示す。

10

20

30

40

50

【図7B】百寿者、高齢者、若年者、百寿者の直系親族、及びIBD患者における、百寿者で有意に増加した種についての相対存在量を示す、グラフである。

【図7C】百寿者、高齢者、若年者、百寿者の直系親族、及びIBD患者における、百寿者で有意に減少した種についての相対存在量を示す、グラフである。

【図7D】百寿者、高齢者、若年者、百寿者の直系親族、及びIBD患者における、百寿者と彼らの直系親族に特徴的な種についての相対存在量を示す、グラフである。図7A～7Dにおいて、データは平均±標準偏差にて示す。*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; Bonferroni補正を伴うWilcoxonの符号順位検定の事後検定。nsは有意差なしであることを示す。点は個々人を示す。図7A～7Dにおいて、百寿者 ($n=160$)、高齢者 ($n=112$)、若年者 ($n=40$)、百寿者の直系親族 ($n=22$ 、48–95歳、avg. 74.5 ± 11.6 歳)、及び炎症性腸疾患 (IBD) 患者 ($n=103$ 、15–78歳、avg. 49 ± 1.51 歳) の糞便について、16SrRNA遺伝子のシーケンシングした結果を示す。

【図8A】GC/MSによって、百寿者 ($n=47$) と高齢者 ($n=31$)、若年者 ($n=23$) の糞便中の短鎖脂肪酸を定量した結果を示すドットプロット図である。糞便中の短鎖脂肪酸量は、糞便の湿重量に対する $\mu\text{mol/g}$ で示す。

【図8B】百寿者、高齢者、若年者における、個々人の糞便中のアンモニア濃度を示すドットプロット図である。

【図8C】百寿者、高齢者、若年者における、個々人の糞便中のpHレベルを示すドットプロット図である。図8A～8Cにおいて、データは平均±標準偏差にて示す。*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; Tukeyの検定を伴う一元配置分散分析。nsは有意差なしであることを示す。

【図8D】糞便中のpHレベルと各二次胆汁酸との相関を回帰直線にて示す散布図である。各ドットは個々人の結果を示す。Spearmanの係数 (r) とその優位性 (P) を、百寿者 (カラー表示下、オレンジ)、高齢者 (カラー表示下、青)、若年者 (カラー表示下、灰色) のサンプル、それぞれの群に対して別々に計算した。百寿者に関し、pHと、糞便中のalloLCAレベル ($P=0.0156$)、3-oxoalloLCAレベル ($P=0.00237$) 又はisoalloLCAレベル ($P=0.0034$) とにおいて、有意に正の相関が認められた。

【図9】サルデーニャの百歳以上の長寿コホートにおけるC.scindensのbaioペロン遺伝子の存在量を示す、ドットプロット図である。百寿者、高齢者コントロール、若年者コントロールの中のC.scindensのbaioペロン (baia2とbaiaNを除く) の遺伝子に対するホモログの存在量を示す。各存在量において、ペアワイズのWilcoxon検定を基にしたFDR $P < 0.05$ 条件下で有意に差のある存在量を、アスタリスクで示す。

【図10A】百寿者 ($n=127$)、高齢者 ($n=108$)、若年者 ($n=47$)、百寿者の直系親族 ($n=18$) 個々人における糞便胆汁酸をLC-MS/MSにより定量した結果を示す、ドットプロット図である。

【図10B】百寿者 ($n=127$)、高齢者 ($n=108$)、若年者 ($n=47$)、百寿者の直系親族 ($n=18$) 個々人における糞便胆汁酸をLC-MS/MSにより定量した結果を示す、ドットプロット図である。図10A及び10Bにおいて、データは平均値±標準偏差にて示す。*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; Tukeyの検定を伴う一元配置分散分析。nsは有意差なしであることを示す。糞便の総胆汁酸量は糞便の湿重量に対して $\mu\text{mol/g}$ で示す。ndは未検出であることを示す。

【図11A】CE91由来の68株による、In vitro、pH7でのCDCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図11B】CE91由来の68株による、In vitro、pH9でのCDCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図11C】CE91由来の68株による、In vitro、pH7でのLCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図11D】CE91由来の68株による、In vitro、pH9でのLCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図11E】CE91由来の68株による、In vitro、pH7での3-oxo- Δ^4 -LCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図11F】CE91由来の68株による、In vitro、pH9での3-oxo- Δ^4 -LCAを基質とする胆汁酸代謝を解析した結果を示すグラフである。図11A～11Fにおいて、基質の濃度は50 μ Mとし、各解析結果は、48時間培養した培養液上清をLC-MS/MS解析することにより取得した。データはN=2の平均+標準偏差として示す。また、各図における「Strain number (株の番号)」及びカラー表示下における色分け等は、図3Aに対応する。

【図12】Bacteroidetes株の胆汁酸代謝酵素をコードする遺伝子クラスターの概要を示す図である。百寿者(CE91)から単離されたBacteroidetes株の遺伝子クラスターを解析した結果を示す。5AR(カラー表示下、マゼンタ色)、5BR(カラー表示下、青色)、3 β HSDHグループ1(カラー表示下、緑色)、3 β HSDHグループ2(カラー表示下、紫色)のホモログを含む遺伝子クラスターは、TCAサイクルに関連する機能(カラー表示下、ベージュ色)及び/又はトランスポーター/エフラックスシステムの膜融合タンパク質(カラー表示下、黄色)としてアノテーションされる遺伝子に、かなり近接している。遺伝子ホモログは、 $<1e^{-12}$ E値、 $>30\%$ 配列同一性、 $>60\%$ クエリカバレッジの類似性をもつものとして定義した。矢印はコーディング配列を示し、アノテーションされた機能に応じて色分けした。

【図13A】3-oxoalloLCA(終濃度50 μ M)を基質として添加し、pH9に調整したWCA培地中で、Bacteroidetes株を培養し、LCA関連化合物の代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図13B】3-oxoLCA(終濃度50 μ M)を基質として添加し、pH9に調整したWCA培地中で、Bacteroidetes株を培養し、LCA関連化合物の代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図13C】isoLCA(終濃度50 μ M)を基質として添加し、pH9に調整したWCA培地中で、Bacteroidetes株を培養し、LCA関連化合物の代謝を解析した結果を示すグラフである。図13A～13Cにおいて、LC-MS/MSによる定量のため、培養上清を37℃、48時間の嫌気培養後に採取した。データは、N=2の平均±標準偏差として示す。

【図13D】P. merdae St3又はOdoribacteraceae St21と、P. distasonis St4(図中、上側)又はE. lenta St34(図中、下側)との、50 μ M LCAを添加したpH9に調整したWCA培地にて共培養をし、胆汁酸の代謝を解析した結果を示す、グラフである。図13A～13Dにおいて、対応する株中の5AR(カラー表示下、赤)、5BR(カラー表示下、青)、3 β HSDH I1(カラー表示下、緑)、3 β HSDH2(カラー表示下、紫)及び3 α HSDH(カラー表示下、オレンジ)に対するホモログの有無を、各図右側のワッフルチャート中に示す。

【図14A】Parabacteroides merdae St3の5AR(PM3806)、5BR(PM3805)、3 β HSDH(PM3804)遺伝子周辺の遺伝子編成の概略を示す図である。それぞれのタンパク質配列を、Pfam-A HMM domain libraryに対するHMMER v. 3.1b2のhmmscanによりアノテーションした。

【図14B】5AR、5BR又は3 β HSDHについての欠失体作製の概要を示す図である。欠失体作製のためのプラスミドは、目的遺伝子のすぐ上流と下流の相同配列をpLGB30プラスミドに挿入することにより作製した。欠失体が作製できたことは、相同配列部位の中(#3-#4)と外(#1-#2)のプライマーを用いたPCRにより確認した。

【図15A】二次胆汁酸濃度を変化させて培養した際の、病原体の増殖曲線を示すグラフである。WCA培地を用いて37℃、嫌気条件下で培養した培地の吸光度(OD600)

10

20

30

40

50

を測定することにより、その増殖を検出した。カラー表示した、赤で薄く塗られた曲線は、*isoalloLCA*を含む培養における結果である。

【図15B】グラム陽性病原体に対する*isoalloLCA*の効果を示すグラフである。

【図15C】グラム陰性病原体に対する*isoalloLCA*の効果を示すグラフである。図15B及び15Cにおいて、赤で薄く塗られた領域は、増殖が阻害される*isoalloLCA*濃度を示し、MIC90をその領域内に示す。データは、N=2の平均±標準偏差である。

【図16A】WCA培地中で培養された腸内共生菌に対する*isoalloLCA*の増殖阻害効果を示すグラフである。37℃、嫌気条件下で培養した培地の吸光度(OD600)を測定することにより、グラム陽性共生菌とグラム陰性共生菌両方の増殖を検出した。データは、N=2の平均と標準偏差とで示す。赤で薄く塗られた領域は、増殖阻害効果のある*isoalloLCA*濃度を示す。

【図16B】コントロール、又は2.5μMの*isoalloLCA*を含むWCA培地中で5時間培養した際の、*C. difficile* 630、*C. sporogenes*、*C. indoli*、*C. HGF2 (innocuum)*を、走査型電子顕微鏡にて観察して得られた、代表的な結果を示す写真である。各右側のパネルは、対応する高解像度画像を示す。スケールバーは5.0μmと1.0μmを示す。矢頭は*isoalloLCA*処理後の形状変化を示す。

【図17】異なる濃度の*isoalloLCA*を含むWCA培地とBrain Heart Infusion (BHI)培地中で、*C. difficile* 630、VRE、SDSE、*C. symbiosum*、*C. scindens*、又は*C. HGF2 (innocuum)*を培養して得られる増殖曲線を示すグラフである。データはN=2の平均と標準偏差で示す。赤で薄く塗られた領域は、増殖阻害効果のある*isoalloLCA*濃度を示す。また、下部に、WCAとBHI培地の栄養組成を併せて示す。

【図18】3-oxoLCA量、isoLCA量、*isoalloLCA*量と、5AR、5BR、3βHSDHsを有する細菌種の相対量との相関を示す図である。図中、右側のワッフルチャートは、百寿者のアセンブルされた腸内メタゲノムから得られた腸内細菌種の、5AR(カラー表示下、赤)と5BR(カラー表示下、青)、3βHSDH1(カラー表示下、緑)、3βHSDH2(カラー表示下、紫)に対するホモログの有無を示す。中央のドット図は、百寿者の糞便中の二次胆汁酸量と、対応する種の相対存在量との相関を示すドット図である。黒いドットは、FDR P<0.05における有意なSpearmanの相関を示す。

【図19A】野生型(WT) *P. merdae* St3(図中「PmWT」)又は5AR欠損型(Δ5AR) *P. merdae* St3(図中「PmΔ5AR」)による*in vitro*でのテストステロンの代謝を解析した結果を示すグラフである。菌株は、pH7に調整したWCA培地で、37℃で48時間嫌気的に培養した。

【図19B】*P. merdae* St3と*Odoribacteraceae* St21-24による、テストステロンの代謝を解析した結果を示すグラフである。

【図19C】*P. merdae* St3と*Odoribacteraceae* St21-24による、5α-ジヒドロテストステロン(DHT)の代謝を解析した結果を示すグラフである。図19B及び19Cにおいて、培養上清は、3時間、6時間、9時間、12時間後に回収した。各ステロイドホルモンの濃度はLC-MS/MSにより決定した。データは、N=2の平均±標準偏差にて示す。

【発明を実施するための形態】

【0076】

以下、本発明をその好適な実施形態に即して詳細に説明する。先ず、百寿等に関与する胆汁酸生成反応を触媒する活性を有する、本発明に係る各種酵素について説明する。

【0077】

<3-オキソ-5α-ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(5AR)>

本発明に係る3-オキソ-5α-ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ(3-oxo-5

10

20

30

40

50

- α -steroid-4-dehydrogenase、5AR) は、5 α -レダクターゼ (5 α -reductase) とも称され、EC 1.3.99.5 によって特定される酵素である。

【0078】

本発明に係る5ARは、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソアロLCAに変換する反応 (若しくは3-オキソアロLCAを3-オキソ- Δ^4 -LCAに変換する反応) 及び/又はテストステロンを5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) に変換する反応 (若しくはDHTをテストステロンに変換する反応) を触媒する活性を有する酵素である。

【0079】

また、本発明に係る5ARは、配列番号：69～89のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に対し、高い相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であることが好ましい。

10

【0080】

また、本発明に係る5ARは、配列番号：69～89のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然 (人工的) に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明に係る5ARには、5ARのアミノ酸配列 (配列番号：69に記載のアミノ酸配列等) において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含むタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、好ましくは2～150個、より好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～70個、より好ましくは2～50個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個 (例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個) である。

20

【0081】

また、本発明に係る5ARは、配列番号：69～89のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。

【0082】

<3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3 β HSDH) >

本発明に係る3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase、3 β HSDH) は、EC 1.1.1.145 によって特定される酵素であり、2種のアイソタイプ (3 β HSDH1及び3 β HSDH2) であり得るが、好ましくは3 β HSDH2である。

30

【0083】

本発明に係る3 β HSDHは、3-オキソアロLCAをイソアロLCAに変換する反応 (若しくはイソアロLCAを3-オキソアロLCAに変換する反応)、3-オキソLCAをイソLCAに変換する反応 (若しくはイソLCAを3-オキソLCAに変換する反応) 及びDHTを3 β -アンドロスタンジオールに変換する反応 (若しくは3 β -アンドロスタンジオールをDHTに変換する反応) のうちの少なくとも1の反応を触媒する活性を有する酵素である。

【0084】

本発明に係る3 β HSDH1は、配列番号：113～129のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に対し、高い相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であることが好ましい。

40

【0085】

また、本発明に係る3 β HSDH2は、配列番号：130～141のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に対し、高い相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であることが好ましい。

【0086】

本発明に係る3 β HSDH1は、配列番号：113～129のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然 (人工的) に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明に係る3 β HSDH1には、3 β HSDH1のアミノ酸配列 (配列番

50

号：113に記載のアミノ酸配列等）において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含むタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、好ましくは2～200個、より好ましくは2～180個、さらに好ましくは2～150個、より好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～70個、より好ましくは2～50個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個（例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個）である。

【0087】

本発明に係る3βHSDH2は、配列番号：130～141のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然（人工的）に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明に係る3βHSDH2には、3βHSDH2のアミノ酸配列（配列番号：130に記載のアミノ酸配列等）において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含むタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、好ましくは2～150個、より好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～70個、より好ましくは2～50個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個（例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個）である。

【0088】

本発明に係る3βHSDH1は、配列番号：113～129のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を含むタンパク質であってよい。

【0089】

また、本発明に係る3βHSDH2は、配列番号：130～141のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を含むタンパク質であってよい。

【0090】

<3-オキソ-5β-ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ（5BR）>

本発明に係る3-オキソ-5β-ステロイド-4-デヒドロゲナーゼ（3-oxo-5β-steroid 4-dehydrogenase、5BR）は、EC1.3.99.6によって特定される酵素である。

【0091】

本発明に係る5BRは、3-オキソ-Δ⁴-LCAを3-オキソLCAに変換する反応（若しくは3-オキソLCAを3-オキソ-Δ⁴-LCAに変換する反応）を触媒する活性を有する酵素である。

【0092】

また、本発明に係る5BRは、配列番号：90～112のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に対し、高い相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であることが好ましい。

【0093】

また、本発明に係る5BRは、配列番号：90～112のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然（人工的）に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明に係る5BRには、5BRのアミノ酸配列（配列番号：90に記載のアミノ酸配列等）において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含むタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、好ましくは2～250個、より好ましくは2～200個、さらに好ましくは2～150個、より好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～70個、より好ましくは2～50個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個（例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個）である。

【0094】

また、本発明に係る5BRは、配列番号：90～112のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。

【0095】

なお、本発明において、「高い相同性」とは、20%以上（例えば、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上）であり、60%以上（例えば、65%以上、70%以上、75%以上、85%以上）が好ましく、80%以上（例えば、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上）がより好ましく、90%以上（例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）がさらに好ましく、100%であることが特に好ましい。

10

【0096】

「相同性」とは、類似性（similarity）又は同一性（identity）を意味し得る。また、「相同性」とは、特に、同一性（identity）を意味してもよい。アミノ酸配列の相同性は、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information（米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール））等のアラインメントプログラムを利用して決定できる。例えば、アミノ酸配列の相同性とは、blastpを用いて算出されるアミノ酸配列間の相同性が挙げられ、より具体的には、blastpをデフォルトのパラメータを用いて（すなわち初期設定のパラメータを用いて）算出されるアミノ酸配列間の相同性が挙げられる。

20

【0097】

また、本発明において、アミノ酸の置換等は、好ましくは、保存的な置換である。「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸・グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リジン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

30

【0098】

また、本発明において、「ストリンジェントな条件」としては、例えば、「1XSSC、0.1% SDS、37℃」程度のハイブリダイゼーションの条件であり、より厳しい条件としては「0.5XSSC、0.1% SDS、42℃」程度のハイブリダイゼーションの条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2XSSC、0.1% SDS、65℃」程度のハイブリダイゼーションの条件が挙げられる。

【0099】

また、本発明に係る各種配列を特定する配列番号を、以下の表1～4に示す。さらに、表1～4において、百寿者特有の細菌株（68種）の各種酵素の保有の有無を併せて示す。16SrDNA～3βHSDH2の項目における数字は、16SrDNAを特定するDNA配列の配列番号、及び各種酵素を特定するアミノ酸配列の配列番号を各々示す。また、16SrDNA～3αHSDHの項目において、黒丸は、配列情報は開示していないが、その細菌株がその酵素を保有していることを示す。ハイフンは、その細菌株がその酵素を保有していないことを示す。

40

【0100】

50

【表 1】

Strain number	Strain name	16SrDNA	5AR	5BR	3βHSDH1	3βHSDH2	3αHSDH
1	Parabacteroides goldsteinii St1	1	69	90	113	—	—
2	Parabacteroides goldsteinii St2	2	70	91	114	—	—
3	Parabacteroides merdae St3	3	71	92	115	—	—
4	Parabacteroides distasonis St4	4	—	93	—	130	●
5	Parabacteroides distasonis St5	5	—	94	—	131	●
6	Bacteroides dorei St6	6	72	95	116	—	—
7	Bacteroides dorei St7	7	73	96	117	—	—
8	Bacteroides thetaiotaomicron St8	8	74	97	118	—	—
9	Bacteroides thetaiotaomicron St9	9	75	98	119	—	—
10	Bacteroides uniformis St10	10	76	99	120	—	—
11	Bacteroides uniformis St11	11	77	100	121	—	—
12	Bacteroides uniformis St12	12	78	101	122	—	—
13	Bacteroides uniformis St13	13	79	102	123	—	—
14	Porphyromonas somerae St14	14	—	—	—	—	—
15	Alistipes finegoldii St15	15	80	103	—	132	—
16	Alistipes finegoldii St16	16	81	104	—	133	—
17	Alistipes onderdonkii St17	17	82	105	—	134	—

【 0 1 0 1 】

【表 2】

Strain number	Strain name	16SrDNA	5AR	5BR	3βHSDH1	3βHSDH2	3αHSDH
18	Alistipes onderdonkii St18	18	83	106	—	135	—
19	Odoribacter laneus St19	19	84	107	124	136	—
20	Odoribacter laneus St20	20	85	108	125	137	—
21	Odoribacteraceae St21	21	86	109	126	138	—
22	Odoribacteraceae St22	22	87	110	127	139	—
23	Odoribacteraceae St23	23	88	111	128	140	—
24	Odoribacteraceae St24	24	89	112	129	141	—
25	Campylobacter ureolyticus St25	25	—	—	—	—	—
26	Akkermansia muciniphila St26	26	—	—	—	—	—
27	Akkermansia muciniphila St27	27	—	—	—	—	—
28	Pyramidobacter pisolens St28	28	—	—	—	—	—
29	Corynebacterium striatum St29	29	—	—	—	●	—
30	Raoultibacter timonensis St30	30	—	●	—	—	●
31	Raoultibacter timonensis St31	31	—	●	—	—	●
32	Gordonibacter pamelaee St32	32	—	—	—	●	●
33	Eggerthella lenta St33	33	—	—	—	●	●
34	Eggerthella lenta St34	34	—	—	—	●	●

【 0 1 0 2 】

【表 3】

Strain number	Strain name	16SrDNA	5AR	5BR	3βHSDH1	3βHSDH2	3αHSDH
35	Eggerthella lenta St35	35	—	—	—	●	●
36	Christensenellaceae St36	36	—	●	—	—	—
37	Christensenellaceae St37	37	—	●	—	—	—
38	Desulfovibrionaceae St38	38	—	—	—	—	—
39	Desulfovibrionaceae St39	39	—	—	—	—	—
40	Ruminococcaceae St40	40	—	●	—	—	●
41	Ruminococcaceae St41	41	—	●	—	—	●
42	Ruminococcaceae St42	42	—	—	—	●	—
43	Ruminococcaceae St43	43	—	—	—	●	—
44	Ruminococcaceae St44	44	—	—	—	—	—
45	Ruminococcaceae St45	45	—	●	—	●	—
46	Clostridiales St46	46	—	—	—	—	●
47	Clostridiales St47	47	—	—	—	—	●
48	Emergencia timonensis St48	48	—	●	—	●	●
49	Emergencia timonensis St49	49	—	●	—	●	●
50	Clostridioides difficile St50	50	—	—	—	—	—
51	Clostridium innocuum St51	51	—	—	—	—	—

【 0 1 0 3 】

【表 4】

Strain number	Strain name	16SrDNA	5AR	5BR	3 β HSDH1	3 β HSDH2	3 α HSDH
52	Phascolarctobacterium faecium St52	52	—	—	—	—	—
53	Phascolarctobacterium faecium St53	53	—	—	—	—	—
54	Hungatella hathewayi St54	54	—	—	—	—	●
55	Hungatella hathewayi St55	55	—	—	—	—	●
56	Lachnospiraceae St56	56	—	—	—	●	●
57	Lachnospiraceae St57	57	—	—	—	●	●
58	Lachnospiraceae St58	58	—	●	—	●	—
59	Clostridium scindens St59	59	—	—	—	—	—
60	Clostridium scindens St60	60	—	—	—	—	—
61	Lachnospiraceae St61	61	—	●	—	—	—
62	Lachnospiraceae St62	62	—	●	—	—	—
63	Clostridium hylemonae St63	63	—	—	—	—	—
64	Faecalicatena contorta St64	64	—	—	—	—	●
65	Clostridium symbiosum St65	65	—	—	—	—	●
66	Clostridium symbiosum St66	66	—	—	—	—	●
67	Methanobrevibacter smithii St67	67	—	—	—	—	—
68	Methanobrevibacter smithii St68	68	—	—	—	—	—

【0104】

本発明に係る「5AR」、「3 β HSDH」及び「5BR」（以下、「本発明に係る酵素」とも総称する）は、他の化合物が直接又は間接的に付加されていてもよい。かかる付加としては特に制限はなく、遺伝子レベルでの付加であってもよく、化学的な付加であってもよい。また付加される部位についても特に制限はなく、本発明に係る酵素のアミノ末端及びカルボキシル末端のいずれかであってもよく、その両方であってもよい。遺伝子レベルでの付加は、本発明に係る酵素をコードするDNAに、他のタンパク質をコードするDNAの読み枠を合わせて付加させたものを用いることにより達成される。このようにして付加される「他のタンパク質」としては特に制限はなく、本発明に係る酵素の精製を容易にする目的の場合には、ポリヒスチジン（His-）タグ（tag）タンパク質、FLAG-タグタンパク質（登録商標、Sigma-Aldrich社）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）等の精製用タグタンパク質が好適に用いられ、また本発明に係る酵素の検出を容易にする目的の場合には、GFP等の蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化学発光タンパク質等の検出用タグタンパク質が好適に用いられる。化学的な付加は、共有結合であってもよく、非共有結合であってもよい。「共有結合」としては特に制限はなく、例えば、アミノ基とカルボキシル基とのアミド結合、アミノ基とアルキルハライド基とのアルキルアミン結合、チオールどうし間のジスルフィド結合、チオール基とマレイミド基又はアルキルハライド基とのチオエーテル結合が挙げられる。「非共有結合」としては、例えば、ビオチン-アビジン間結合が挙げられる。また、このようにして化学的に付加される「他の化合物」としては、本発明に係る酵素の検出を容易にする目的の場合には、例えば、Cy3、ローダミン等の蛍光色素が好適に用いられる。

【0105】

本発明に係る酵素は、これら各酵素を産生する細菌等を培養することによって得ること

ができる。例えば、培養した当該細菌等を濾過、遠心分離等により培地から回収し、回収した細菌等を、細胞溶解、磨砕処理又は加圧破碎等によって処理し、さらに、限外濾過処理、塩析、硫酸沈殿等の溶媒沈殿、クロマトグラフィー（例えば、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）等によって、細菌等において発現したタンパク質を精製、濃縮する方法が挙げられる。また、本発明に係る酵素に、前述の精製タグタンパク質が付加されている場合には、該タグタンパク質が吸着する基質を用いて精製し、採取することもできる。さらに、これらの精製、濃縮方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。

【0106】

また、本発明に係る酵素は、上記生物学的合成に限定されることなく、後述の本発明に係るDNA等及び無細胞タンパク質合成系を用いても製造することができる。かかる無細胞タンパク質合成系としては特に制限はないが、例えば、コムギ胚芽由来、大腸菌由来、ウサギ網状赤血球由来、昆虫細胞由来の合成系が挙げられる。さらに、当業者であれば、市販のペプチド合成機等を用い、本発明に係る酵素を化学的に合成することもできる。

【0107】

また、本発明に係る酵素は、他の成分と混合して用いてもよい。他の成分としては特に制限はなく、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、プロテアーゼ阻害剤、保存剤が挙げられる。

【0108】

<ポリヌクレオチド>

次に、本発明に係る酵素をコードするポリヌクレオチドについて説明する。本発明に係るポリヌクレオチドは、上述の本発明に係る酵素をコードする限り、天然のDNA又はRNAであってもよく、天然のDNA又はRNAに人為的に変異が導入されたDNA又はRNAであってもよく、人工的に設計されたヌクレオチド配列からなるDNA又はRNAであってもよい。さらに、その形態について特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、化学合成DNA、化学合成RNAが含まれる。これらポリヌクレオチドの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、各種細菌からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる）を作製し、これを展開して、本発明にかかる酵素をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明に係る酵素をコードする遺伝子に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行うことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、各種細菌から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

【0109】

そして、このように調製したDNAに、必要に応じ、上述のアミノ酸置換をコードする変異を導入することは、当業者であれば、公知の部異特異的変異導入法を利用することで行うことができる。部異特異的変異導入法としては、例えば、Kunkel法（Kunkel, T. A., Proc Natl Acad Sci USA, 1985年、82巻、2号、488～492ページ）、SOE（splicing-by-overlap-extension）-PCR法（Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R., Gene, 1989年、77巻、51～59ページ）が挙げられる。

【0110】

また、当業者であれば、上述のアミノ酸置換が導入されたタンパク質をコードするヌクレオチド配列を人工的に設計し、該配列情報に基づき、自動核酸合成機を用いて、本発明

10

20

30

40

50

にかかるポリヌクレオチドを化学的に合成することもできる。

【0111】

さらに、本発明に係るポリヌクレオチドは、コードする本発明に係る酵素の発現効率を宿主細胞においてより向上させるという観点から、当該宿主細胞の種類に合わせて、コドン最適化した本発明に係る酵素をコードするDNAの態様もとり得る。

【0112】

また、本発明においては、前述のポリヌクレオチドを宿主細胞内において複製することができるよう、当該DNAが挿入されているベクターの態様もとり得る。

【0113】

本発明において「ベクター」は、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、その宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。

【0114】

このようなベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージDNAが挙げられる。また、プラスミドとしては、大腸菌由来のプラスミド（pET22、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、酵母由来のプラスミド（YEp13、YEp24、YCp50等）、枯草菌由来のプラスミド（pUB110、pTP5等）が挙げられる。ファージDNAとしてはλファージ（Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。さらに、宿主細胞が昆虫由来であれば、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターを、植物由来であればT-DNA等、動物由来であればレトロウイルス、アデノウイルスベクター等の動物ウイルスベクターも、本発明に係るベクターとして用いることもできる。また、本発明に係るベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。例えば、本発明に係るDNAをベクターに挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法等が採用される。

【0115】

また、本発明に係るベクターは、前記DNAがコードする本発明にかかる酵素を宿主細胞内にて発現可能な状態で含んでなる発現ベクターの形態であってもよい。本発明にかかる「発現ベクター」は、これを宿主細胞に導入して本発明にかかる酵素を発現させるために、前記DNAの他に、その発現を制御するDNA配列や形質転換された宿主細胞を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列（SD配列）及びターミネーター等がこれに含まれる。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主細胞と同種若しくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、前記発現を制御するDNA配列以外に発現を誘導するDNA配列を含んでいても良い。かかる発現を誘導するDNA配列としては、宿主細胞が細菌である場合には、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）の添加により、下流に配置された遺伝子の発現を誘導することのできるラクトースオペロンが挙げられる。本発明における遺伝子マーカーは、形質転換された宿主細胞の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

【0116】

ベクターには、本発明に係る酵素をコードするDNAが1種ずつ挿入されていてもよく、また複数種のDNAを1のベクターに挿入してもよい。ベクターに複数種のDNAを挿入する場合において、一つのベクターに複数種のDNAが挿入される場合、これらのDNAはオペロンを形成することが好ましい。ここで「オペロン」とは、同一のプロモーター

の制御下に転写される1又は複数の遺伝子から構成される核酸配列単位である。

【0117】

<細菌>

次に、上述の本発明に係るポリヌクレオチドを有する細菌について説明する。

【0118】

本発明に係る「5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌」は、上述の本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌である限り、特に制限はなく、例えば、当該ポリヌクレオチドを有する、*Parabacteroides goldsteini*、*Parabacteroides merdae*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Alistipes finegoldii*、*Alistipes onderdonkii*、*Odoribacter laneus*、又は、*Odoribacteraceae*が挙げられる。

10

【0119】

より具体的には、

配列番号：1又は2に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Parabacteroides goldsteini*、
配列番号：3に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Parabacteroides merdae*、
配列番号：6又は7に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Bacteroides dorei*、
配列番号：8又は9に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Bacteroides thetaiotaomicron*、
配列番号：10～13のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Bacteroides uniformis*、
配列番号：15又は16に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Alistipes finegoldii*、
配列番号：17又は18に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Alistipes onderdonkii*、
配列番号：19又は20に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Odoribacter laneus*、又は
配列番号：21～24のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Odoribacteraceae*が挙げられる。

20

30

【0120】

本発明に係る「3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌」は、上述の本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌である限り、特に制限はなく、例えば、当該ポリヌクレオチドを有する、*Parabacteroides goldsteini*、*Parabacteroides merdae*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Odoribacter laneus*、*Odoribacteraceae*、*Parabacteroides distasonis*、*Alistipes finegoldii*、*Alistipes onderdonkii*、*Corynebacterium striatum*、*Gordonibacter pamelaee*、*Eggerthella lenta*、*Ruminococcaceae*、*Emergencia timonensis*、又は*Lachnospiraceae*が挙げられる。

40

【0121】

より具体的には、

配列番号：1又は2に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する*Parabacteroides goldsteini*、

50

配列番号：3に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides merdae*、
配列番号：6又は7に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides dorei*、
配列番号：8又は9に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides thetaiotaomicron*、
配列番号：10～13のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides uniformis*、
配列番号：19又は20に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacter laneus*、
配列番号：21～24のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacteraceae*、
配列番号：4又は5に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides distasonis*、
配列番号：15又は16に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes finegoldii*、
配列番号：17又は18に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes onderdonkii*、
配列番号：29に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Corynebacterium striatum*、
配列番号：32に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Gordonibacter pamelaeae*、
配列番号：33～35のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Eggerthella lenta*、
配列番号：42、43及び45のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Ruminococcaceae*、
配列番号：48又は49に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Emergencia timonensis*、又は
配列番号：56～58のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Lachnospiraceae*
が挙げられる。

【0122】

本発明に係る「5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌」は、上述の本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド及び3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌である限り、特に制限はなく、例えば、これらのポリヌクレオチドを有する、*Parabacteroides goldsteinii*、*Parabacteroides merdae*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Alistipes finegoldii*、*Alistipes onderdonkii*、*Odoribacter laneus*、又は*Odoribacteraceae*が挙げられる。

【0123】

より具体的には、

配列番号：1又は2に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides goldsteinii*、
配列番号：3に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides merdae*、
配列番号：6又は7に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides dorei*、
配列番号：8又は9に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌ

クレオチドを有する *Bacteroides thetaiotaomicron*、
配列番号：10～13のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides uniformis*、
配列番号：15又は16に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes finegoldii*、
配列番号：17又は18に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes onderdonkii*、
配列番号：19又は20に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacter laneus*、又は
配列番号：21～24のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacteraceae*
が挙げられる。

10

【0124】

本発明に係る「5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌」は、上述の本発明に係る5BRをコードするポリヌクレオチドを有する限り、特に制限はなく、例えば、当該ポリヌクレオチドを有する、*Parabacteroides goldsteini*、*Parabacteroides merdae*、*Parabacteroides distasonis*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Alistipes finegoldii*、*Alistipes onderdonkii*、*Odoribacter laneus*、*Odoribacteraceae*、*Raoultibacter timonensis*、*Christensenellaceae*、*Ruminococcaceae* *Emergencia timonensis*、又は *Lachnospiraceae* が挙げられる。

20

【0125】

より具体的には、

配列番号：1又は2に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides goldsteini*、
配列番号：3に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides merdae*、
配列番号：4又は5に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides distasonis*、
配列番号：6又は7に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides dorei*、
配列番号：8又は9に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides thetaiotaomicron*、
配列番号：10～13のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides uniformis*、
配列番号：15又は16に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes finegoldii*、
配列番号：17又は18に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes onderdonkii*、
配列番号：19又は20に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacter laneus*、
配列番号：21～24のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacteraceae*、
配列番号：30又は31に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Raoultibacter timonensis*、
配列番号：36又は37に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Christensenellaceae*、

30

40

50

配列番号：４０、４１及び４５のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Ruminococcaceae*、
配列番号：４８又は４９に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Emergencia timonensis*、又は
配列番号：５８、６１及び６２のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Lachnospiraceae*
が挙げられる。

【０１２６】

本発明に係る「５ＡＲをコードするポリヌクレオチド、３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチド、及び５ＢＲをコードするポリヌクレオチドを有する細菌」は、上述の本発明に係る５ＡＲをコードするポリヌクレオチド、３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチド、及び５ＢＲをコードするポリヌクレオチドを有する限り、特に制限はなく、例えば、これらのポリヌクレオチドを有する、*Parabacteroides goldsteini*、*Parabacteroides merdae*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Alistipes finegoldii*、*Alistipes onderdonkii*、*Odoribacter laneus*、又は *Odoribacteraceae* が挙げられる。

【０１２７】

より具体的には、
配列番号：１又は２に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides goldsteini*、
配列番号：３に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Parabacteroides merdae*、
配列番号：６又は７に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides dorei*、
配列番号：８又は９に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides thetaiotaomicron*、
配列番号：１０～１３のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Bacteroides uniformis*、
配列番号：１５又は１６に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes finegoldii*、
配列番号：１７又は１８に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Alistipes onderdonkii*、
配列番号：１９又は２０に記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacter laneus*、又は
配列番号：２１～２４のうちのいずれかに記載のヌクレオチド配列に対して極めて高い同一性を有するポリヌクレオチドを有する *Odoribacteraceae* が挙げられる。

【０１２８】

なお、本発明において「極めて高い同一性」とは、好ましくは９５％以上（９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上）、特に好ましくは１００％である。ヌクレオチド配列の「同一性」も、ＢＬＡＳＴ等のアラインメントプログラムを利用して決定できる。例えば、ヌクレオチド配列の同一性とは、*blastn*を用いて算出されるヌクレオチド配列間の同一性が挙げられ、より具体的には、*blastn*をデフォルトのパラメータを用いて（すなわち初期設定のパラメータを用いて）算出されるヌクレオチド配列間の同一性が挙げられる。

【０１２９】

また、本発明に係る細菌は、上述の各酵素に加え、各酵素の基質及び／又は各酵素が触媒する反応によって生成される胆汁酸のトランスポーターをコードするポリヌクレオチドを有していることが好ましい（図１２ 参照）。

10

20

30

40

50

【0130】

さらに、本発明に係る細菌は、本発明に係る酵素をコードするポリヌクレオチドを有する限り特に制限はなく、生来的に有している細菌であってもよく、上述の本発明に係るDNA又はベクターを外来的に導入することによって保有する細菌等の宿主細胞（形質転換体）であってもよい。

【0131】

本発明に係るDNA又はベクターが導入される細菌は特に限定されず、例えば、上述の腸内細菌、他の微生物（大腸菌、出芽酵母、分裂酵母、枯草菌、放線菌、糸状菌等）が挙げられる。また、本発明においては、前記細菌の代わりに、細胞に、上述の本発明に係るDNA又はベクターを外来的に導入することによって得られる形質転換体も用いることができる。かかる細胞としては、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等が挙げられる。

10

【0132】

本発明に係るDNA又はベクターの導入も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。例えば、大腸菌等の細菌への導入方法としては、ヒートショック法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、接合法が挙げられ、植物細胞への導入方法としては、アグロバクテリウムを用いる方法やパーティクルガン法が挙げられ、昆虫細胞への導入方法としては、バキュロウィルスを用いる方法やエレクトロポレーション法が挙げられ、動物細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法が挙げられる。

20

【0133】

このようにして細菌又は細胞内に導入されたDNA等は、当該細菌内等において、一過的に保有されるものであってもよく、また恒常的に保有されるものであってもよく（例えば、そのゲノムDNAにランダムに挿入されることによって保持されてもよく、相同組み換えによって保持されてもよく）、またベクターであれば、そのゲノムDNA外の独立体として複製され保持し得る。

【0134】

<組成物>

次に、本発明の組成物について説明する。後述の実施例において示すとおり、百寿等に関与する胆汁酸の生成経路に、上述の本発明に係る細菌が関与することが、本発明者らによって明らかとなった。したがって、本発明は、以下の態様の組成物を提供する。

30

（１）本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソアロLCAに変換するための組成物。

（２）本発明に係る3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソアロLCAをイソアロLCAに変換するための組成物。

（３）本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と本発明に係る3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

（４）本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド及び本発明に係る3 β HSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

40

（５）本発明に係る5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、3-オキソ- Δ^4 -LCAを3-オキソLCAに変換するための組成物。

（６）本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド、本発明に係る3 β HSDHをコードするポリヌクレオチド、及び本発明に係る5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、イソLCA又は3-オキソLCAからイソアロLCAを生成するための組成物。

【0135】

また、後述の実施例において示すとおり、胆汁酸（イソアロLCA又はイソLCA）、それら胆汁酸の生成に関与する酵素（5AR、3 β HSDH、5BR）、及びそれら酵素

50

を産生する細菌は、グラム陽性菌に対して抗菌効果を発揮することが明らかになった。したがって、本発明は、以下の態様の組成物も提供する。

(7) グラム陽性菌に対する抗菌用組成物である、前記(1)～(4)及び(6)のうちのいずれか一項に記載の組成物。

(8) イソアロICA又はイソICAを有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

(9) 本発明に係る5AR、本発明に係る3βHSDH、及び本発明に係る5BRから選択される少なくとも1の酵素を有効成分とする、グラム陽性菌に対する抗菌用組成物。

【0136】

また、後述の実施例において示すとおり、本発明に係る酵素(5AR、3βHSDH)及びそれら酵素を産生する細菌は、テストステロン等の代謝に関与することが明らかになった。したがって、本発明は、以下の態様の組成物も提供する。

(10) 本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、5α-ジヒドロテストステロン(DHT)を3β-アンドロスタンジオールに変換するための組成物。

(11) 本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを有効成分とする、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

(12) 本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド及び本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を有効成分とする、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

(13) 本発明に係る3βHSDHを有効成分とする、DHTから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

(14) 本発明に係る5AR及び本発明に係る3βHSDHを有効成分とする、テストステロンから3β-アンドロスタンジオールを生成するための組成物。

(15) 下記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防するための組成物である、前記(10)～(14)のうちのいずれか一項に記載の組成物

疾患群：

前立腺がん、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症、卵巣内皮がん、神経炎症、及びGABAA受容体を介したてんかん。

【0137】

本発明に係る「細菌」としては、上述のとおりであるが、本発明の組成物において有効成分として含有される「細菌」としては、生菌であっても死菌体であってもよく、生菌及び死菌体の両方であってもよい。「死菌体」としては、例えば、加熱処理体、焼成処理体、蒸煮処理体、放射線(γ線等)照射処理体、酵素処理体、薬物(抗生物質等)処理体、化学物質(ホルマリン等)処理体、超音波処理体が挙げられる。また、本発明に係る細菌の形態は特に限定されず、液体又は固体の何れでもよいが、当該形態は乾燥形態(例えば、粉体状、菌末状等)が、製造時や保管時の取扱いが容易である観点から好適である。乾燥物は、菌体を溶媒(水等)に分散させた懸濁液を乾燥させることによって調製することができる。乾燥方法は、特に制限はなく、例えば、噴霧乾燥(スプレードライ)法、凍結乾燥法が挙げられる。滅菌方法は、特に制限はなく、レトルト殺菌法、UHT殺菌法、空気殺菌法、加圧殺菌法、高圧蒸気滅菌法、乾熱滅菌法、流通蒸気消毒法、電磁波殺菌法、電子線滅菌法、高周波滅菌法、放射線滅菌法、紫外線殺菌法、酸化エチレンガス滅菌法、過酸化水素プラズマ滅菌法、化学的殺菌法(アルコール殺菌法、ホルマリン固定法、電解水処理法)等が挙げられる。また、場合によっては、加熱等による殺菌処理の前後、あるいは、乾燥処理の前後に、界面活性剤処理、磨砕・粉碎処理、酵素処理、分画処理等を行うこともでき、これらの処理により得られるものも、本発明の組成物に含有し得る。

【0138】

本発明の組成物において有効成分として含有される細菌は、前述の菌体のみならず、当該細菌による生成物(例えば、当該細菌の分泌産物、当該細菌による代謝産物)、構成物

質（細菌自体の成分。所謂、菌体成分。例えば、当該細菌を構成する、アミノ酸、ペプチド、核酸、糖、脂質、ビタミン、ホルモン、及びそれらの複合体、さらには、それらとリン・硫黄金属元素との複合体等）であってもよい。

【0139】

また、本発明の組成物が含有する有効成分は、本発明に係る細菌の培養物であってもよい。培養物は、当該細菌を含むもの（増殖した当該細菌を含む培養液、固形培地等）であってもよく、当該培養物の形態は、特に限定されず、液体又は固体の何れでもよいが、当該形態は乾燥形態（例えば培養乾燥物等）が、製造時や保管時の取扱いが容易な観点から、好適である。なお、かかる培養乾燥物等も、当業者であれば、上述の乾燥方法を用い、適宜調製し得る。

【0140】

本発明の組成物において有効成分として含有される「酵素」としては、上述のとおりである。また、本発明の組成物において有効成分として含有される「胆汁酸」としては、後述の実施例のとおりであるが、その活性を有する限り、薬理学上許容される塩、水和物又は溶媒和物も含まれる。このような薬理学上許容される塩としては、特に制限はなく、各化合物の構造等に応じて適宜選択することができ、例えば、酸付加塩（例えば、塩酸塩、臭化水素塩、硫酸塩、硫酸水素塩、硝酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩等の無機酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩）、塩基付加塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、亜鉛塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩）、有機アミン付加塩（例えば、モルホリン、ピペリジン等の付加塩）、アミノ酸付加塩（例えば、リジン、グリシン、フェニルアラニン等の付加塩）が挙げられる。また、水和物又は溶媒和物としては、特に制限はなく、例えば、胆汁酸又はその塩1分子に対し、0.1～10分子の水又は溶媒が付加したものが挙げられる。

【0141】

さらに、本発明に係る「胆汁酸」には、その抑制活性を有する限り、互変異性体、幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体等の総ての異性体及び異性体混合物が含まれる。さらにまた、前記物質が生体内で酸化、還元、加水分解、アミノ化、脱アミノ化、水酸化、リン酸化、脱水酸化、アルキル化、脱アルキル化、抱合等の代謝を受けてなおその阻害活性を示す化合物をも包含し、また本発明は生体内で酸化、還元、加水分解等の代謝を受けて前記物質を生成する化合物をも包含する。

【0142】

本発明の組成物は、医薬組成物（医薬品、医薬部外品等）、食品組成物（飲食品、動物用飼料等）、あるいはモデル動物実験等に用いられる試薬の形態であり得る。

【0143】

本発明における組成物は、有効成分である物質（胆汁酸、酵素、細菌等）の形態に応じて、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、咀嚼剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤、坐剤等として、経口的又は非経口的（例えば、腸管内、筋肉内、静脈内、気管内、鼻内、経皮、皮内、皮下、眼内、膺、腹腔内、直腸若しくは吸入）、又はこれらの複数の組み合わせからなる経路による投与用に使用することができる。

【0144】

これら製剤化においては、薬理学上若しくは飲食品として許容される担体、具体的には、生理食塩水、滅菌水、培地、植物油、溶剤、賦形剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。

【0145】

また、これら製剤化においては、本発明に係る細菌が腸内細菌であるという点を鑑み、特に経口投与を目的とする製剤においては、本発明の組成物を腸管内に効率良く送達することを可能にする組成物と組み合わせてもよい。このような腸管内への送達を可能とする組成物については特に制限されることなく、公知の組成物を適宜採用することができ、例えば、pH感受性組成物、腸管までの放出を抑制する組成物（セルロース系ポリマー、アクリル酸重合体及び共重合体、ビニル酸重合体及び共重合体等）、腸管粘膜特異的に接着する生体接着性組成物（例えば、米国特許第6,368,586号明細書に記載のポリマー）、プロテアーゼ阻害剤含有組成物、腸管内酵素によって特異的に分解される組成物が挙げられる。

10

【0146】

本発明の組成物を食品組成物として用いる場合、例えば、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、栄養補助食品、病者用食品、あるいは動物用飼料であり得る。なお、機能性食品は、通常、その作用メカニズムに基づき、プロバイオティクス、バイオジェニクス、プレバイオティクス、シンバイオティクスの4つに分類され、本発明においては、プロバイオティクス、バイオジェニクス、シンバイオティクス、プレバイオティクスの態様をとり得る。

【0147】

本発明の飲食品は、上記のような組成物として摂取することができる他、種々の飲食品として摂取することもできる。飲食品の具体例としては、機能性飲料、ドリンク剤、ゼリー状飲料、清涼飲料水、乳飲料、茶飲料、アルコール飲料、スープ類等の液状食品；ヨーグルト、ドリンクヨーグルト等の発酵食品、発酵飲料；食用油、ドレッシング、マヨネーズ、マーガリン等の油分を含む製品；飯類、麺類、パン類等の炭水化物含有食品；ハム、ソーセージ等の畜産加工食品；かまぼこ、干物、塩辛等の水産加工食品；漬物等の野菜加工食品；ゼリー等の半固形状食品；みそ等の発酵食品；洋菓子類、和菓子類、キャンディー類、ガム類、グミ、冷菓、氷菓等の各種菓子類；カレー、あんかけ、中華スープ等のレトルト製品；インスタントスープ、インスタントみそ汁等のインスタント食品や電子レンジ対応食品等が挙げられる。さらには、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、液状、ペースト状又はゼリー状に調製された健康飲食品も挙げられる。なお、本発明における飲食品の製造は、当該技術分野に公知の製造技術により実施することができる。

20

【0148】

また本発明で提起される飲食品組成物において、保健用途が表示された飲食品として提供・販売されることも可能である。「表示」行為には、需要者に対して前記用途を知らしめたる全ての行為が含まれ、前記用途を直接的に認識できる表現、あるいは前記用途を想起・類推させるような表現を、組成物自体に付したものであってもよいし、組成物が含有する容器、包装材又は添付文書に付したものであってもよい。また「表示」は、本発明組成物の関連する情報として、チラシ、パンフレット、ポップ、カタログ、ポスター、書籍、DVD等の記憶媒体、電子掲示板やインターネット等の広告等で、本発明の組成物が効果的であることを表示・広告するものであってもよい。

30

【0149】

本発明の組成物（7）～（9）に関し、それらの対象となる「グラム陽性菌」としては、グラム染色により紺青色あるいは紫色に染色される細菌であれば良く、特に制限はないが、例えば、図4A及び4Eに示されるグラム陽性菌が挙げられる。本発明において「抗菌」とは、グラム陽性菌の増殖を抑制すること及び／又は殺菌を意味する。また、本発明の組成物（7）～（9）は、グラム陽性菌の感染症を治療又は予防するための組成物としても用いられ得る。かかる「感染症」としては、特に制限はないが、例えば、クロストリジウム・ディフィシルの感染症、敗血症、敗血症を基礎疾患として有する急性呼吸窮迫症候群（ARDS／ALI）が挙げられる。

40

【0150】

また、本発明の組成物（15）に関し、対象とする疾患については上述のとおりである

50

が、こと「前立腺がん」の治療又は予防には、後述の実施例に示すとおり、前立腺がんの進行及び／又は転移の抑制も含まれる。

【0151】

＜治療又は予防方法＞

本発明はまた、本発明に係る5AR、本発明に係る3βHSDH、及び本発明に係る5BRから選択される少なくとも1の酵素の有効量を、対象に投与する、グラム陽性菌の感染症を治療又は予防する方法に関する。

【0152】

さらに本発明は、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド及び本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、並びに、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド、本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチド、及び本発明に係る5BRをコードするポリヌクレオチドを有する細菌からなる群から選択される少なくとも1の細菌の有効量を、対象に投与する、グラム陽性菌の感染症を治療又は予防する方法に関する。

【0153】

さらにまた、本発明は、イソアロICA又はイソICAの有効量を、対象に投与する、グラム陽性菌の感染症を治療又は予防する方法に関する。

【0154】

また、本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る5ARをコードするポリヌクレオチド及び本発明に係る3βHSDHをコードするポリヌクレオチドを有する細菌、本発明に係る3βHSDH、並びに、本発明に係る5AR及び本発明に係る3βHSDHからなる群から選択される少なくとも1の物質の有効量を、対象に投与する、上記疾患群から選択される少なくとも1の疾患を、治療又は予防する方法に関する。

【0155】

本発明において、「予防」には、感染の抑制及び遅延、がん等の発症の抑制、遅延及びその再発を抑制することが含まれる。「治療」には、感染症及びがん等からの完全な回復のみならず、それらの症状を緩和又は改善し、その進行を抑制し、またその再発を抑制することが含まれる。

【0156】

本発明の治療等における「対象」は、ヒトを含む動物である。ヒト以外の動物としては特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物等を対象とすることができる。具体的には、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サル等が挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明にかかる対象は、上述の感染症及びがん等の罹患者であってもよいが、これら疾患と診断されている必要はなく、例えば、これら疾患に罹患したおそれがある者、これら疾患に罹患したと感じている者が挙げられる。また、健常者であっても、これら疾患の予防等を目的として日常的に摂取することができる。

【0157】

また本技術は、治療的目的であっても、非治療目的使用であってもよい。「非治療目的使用」とは、医療行為、すなわち治療による人体への処置行為を含まない概念である。例えば、健康増進等が挙げられる。

【0158】

本発明に係る細菌、酵素及び胆汁酸の投与又は摂取方法としては、特に制限はなく、経口投与であってもよく、また非経口投与（例えば、腸管内への投与）であってもよいが、経口投与である場合には、本発明に係る細菌等の効果をより向上させるという観点から、

対象は、プロトンポンプ阻害剤（P P I）等の摂取により胃酸の産生を減少させておくことが好ましい。また、これら物質の投与又は摂取において、上述の組成物の態様が好適に用いられ得る。

【0159】

本発明に係る細菌、酵素及び胆汁酸等を投与又は摂取する場合、その投与量又は摂取量は、対象の年齢、体重、上記疾患の症状、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品等）、有効成分の種類及びその形態等に応じて、適宜選択される。また、1日当り1回又は複数回（例えば、2回、3回）に分けて投与又は摂取させてもよい。さらに、投与又は摂取の期間は、改善の程度に応じて中止することもできるが、予防の観点から、中止することなく継続して投与又は摂取させても良い。なお、「継続」については、毎日継続でもよく、

10

【0160】

＜診断方法等＞

本発明は、下記疾患群から選択される少なくとも1の疾患の評価方法であって、

疾患群：

前立腺がん、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症、卵巣内皮がん、神経炎症、及びG A B A A受容体を介したてんかん、

（1）被検者糞便中、3 β H S D Hを産生する細菌を定量する工程、

（2）工程（1）で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

20

（3）工程（2）における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は前記疾患に罹患する可能性は低いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は前記疾患に罹患する可能性が高い、又は罹患している可能性が高いと判定する工程を、含む方法を、提供する。

【0161】

さらに、本発明は、前記疾患群から選択される少なくとも1の疾患の予防方法又は治療方法であって、

30

前記方法にて、前記疾患に罹患する可能性が高い、又は罹患している可能性が高いと判定された前記被検者に、3 β H S D Hを産生する細菌を投与する方法をも、提供する。

【0162】

本発明はまた、百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

（1）被検者糞便中、3-オキシL C A、イソアロL C A、3-オキシアロL C A、アロL C A、3-オキシL C A及びイソL C Aからなる群から選択される少なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

（2）工程（1）で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

40

（3）工程（2）における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法を、提供する。

【0163】

また、本発明は、百歳以上生存する可能性を評価する方法であって、

（1）被検者糞便中、5 A R、3 β H S D H、及び5 B Rから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌（好ましくは、3 β H S D H 2を少なくとも産生する細菌）を定量する工程、

（2）工程（1）で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値

50

と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者は百歳以上生存する可能性が低いと判定する工程を、含む方法をも、提供する。

【0164】

さらに、本発明は、百歳以上生存する可能性を向上させる方法であって、

前記の方法にて、百歳以上生存する可能性が低いと判定された前記被検者に、3-オキソソルチン酸、イソアロルチン酸、並びに、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌（好ましくは、3βHSDH2を少なくとも産生する細菌）からなる群から選択される少なくとも1の物質を投与する方法をも、提供する。

【0165】

本発明はまた、グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、3-オキソソルチン酸及びイソアロルチン酸からなる群から選択される少なくとも1の胆汁酸を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記胆汁酸を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法。

【0166】

また、本発明は、グラム陽性菌に対する抵抗性を評価する方法であって、

(1) 被検者糞便中、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌（好ましくは、3βHSDH2を少なくとも産生する細菌）を定量する工程、

(2) 工程(1)で定量して得られた値を、百寿者の前記細菌を定量して得られる対応値と比較する工程、及び

(3) 工程(2)における比較の結果、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値と同等又はそれより高い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が高いと判定し、

被検者糞便中の前記定量値が、前記対応値より低い場合に、前記被検者はグラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定する工程を、含む方法を、提供する。

【0167】

さらに、本発明は、グラム陽性菌の感染症を予防する方法であって、

前記方法にて、グラム陽性菌に対する抵抗性が低いと判定された前記被検者に、3-オキソソルチン酸、イソアロルチン酸、並びに、5AR、3βHSDH、及び5BRから選択される少なくとも1の酵素を産生する細菌（好ましくは、3βHSDH2を少なくとも産生する細菌）からなる群から選択される少なくとも1の物質を投与する方法をも、提供する。

【0168】

本発明の各評価方法における「被検者」については特に制限はなく、上述の治療方法等における「対象」と同様であるが、ヒトに限られる。

【0169】

本発明の各評価方法において、定量対象となる細菌は少なくとも1種類であればよいが、好ましくは2種類以上（例えば、3種類以上、4種類以上）、より好ましくは5種類以上（例えば、6種類以上、7種類以上、8種類以上、9種類以上）、さらに好ましくは10種類以上（例えば、15種類以上、20種類以上、25種類以上、30種類以上）である。

10

20

30

40

50

【0170】

「糞便中の細菌の定量」は、当該細菌の量（数）そのものではなくともよく、例えば、当該細菌の量（数）を反映する当該細菌特有の物質の量を測定することによって行なうことができる。かかる物質としては、前記細菌特異的なオリゴヌクレオチド（例えば、16S rRNA遺伝子、及びその転写物）、前記細菌特有の構成物質（当該細菌を構成する、ペプチド、核酸、糖、脂質、及びそれらの複合体等）、当該細菌による生成物（例えば、当該細菌の分泌産物、当該細菌による代謝産物）が挙げられる。

【0171】

物質がオリゴヌクレオチドである場合には、例えば、PCR（RT-PCR、リアルタイムPCR、定量PCR）、DNAマイクロアレイ解析法、ノーザンブロッティング、次世代シーケンシング法（合成シーケンシング法（sequencing-by-synthesis、例えば、イルミナ社製Solexaゲノムアナライザー又はHiSeq（登録商標）2000によるシーケンシング）、パイロシーケンシング法（例えば、ロッシュ・ダイアグノステックス（454）社製のシーケンサーGS LX又はFLXによるシーケンシング（所謂454シーケンシング））、リガーゼ反応シーケンシング法（例えば、ライフテクノロジー社製のSolid（登録商標）又は5500xlによるシーケンシング）、T-RFLP法、ビーズアレイ法、in situ ハイブリダイゼーション、ドットプロット、RNaseプロテクションアッセイ法、質量分析法、ゲノムPCR法、サザンブロッティングを用いて、定量することができる。

【0172】

その他の物質については、例えば、酵素結合免疫吸着法（ELISA法）、CLEIA（化学発光酵素免疫測定法）、ラテックス凝集法、抗体アレイ、イムノブロッティング、イムノクロマトグラフィー、イメージングサイトメトリー、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、免疫組織化学的染色法等の抗体を用いて検出する方法（免疫学的方法）や、質量分析法が挙げられる。

【0173】

「免疫学的方法」では、各物質に結合する抗体が使用され、当該抗体を各々の抗体が結合する各物質に接触させ、当該抗体の各物質への結合性を指標として、各物質量が検出される。

【0174】

「質量分析（MS）法」とは、試料を、イオン源を用いてイオン化し、分析部において、真空中で運動させ電磁気力を用いて、あるいは飛行時間差によりイオン化した試料を質量電荷比に応じて分離し、検出できる質量分析計を用いた測定方法のことをいい、イオン源を用いてイオン化する方法としては、EI法、CI法、FD法、FAB法、MALDI法、ESI法等の方法を適宜選択することができる。また、分析部において、イオン化した試料を分離する方法としては、磁場偏向型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間（TOF）型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型等分離方法を適宜選択することができる。また、2以上の質量分析法を組み合わせたタンデム型質量分析（MS/MS）やトリプル四重極型質量分析を利用することができる。特に、トリプル四重極型質量分析計による選択反応モニタリング（SRM：Selected reaction monitoring、SRM）又は多重反応モニタリング（MRM：Multiple reaction monitoring）によって、1回の測定で多種の物質を同時に測定することができる。また、質量分析計は単独で用いられてもよいし、液体クロマトグラフィー（LC）や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を組み合わせることにより、対象物質を分離・精製して試料とすることができる。

【0175】

また、かかる「免疫学的方法」及び「質量分析法」は、「糞便中の酵素の定量」及び「糞便中の胆汁酸の定量」にも用いられ得る。また、「糞便中の胆汁酸の定量」においては、各種クロマトグラフィー（ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、LC/MS、LC-MS/MS、薄層クロマトグラフィー等）が好適に用いられ得る。

【0176】

そして、このように定量して得られる値は、絶対量のみならず、相対値であってもよい。相対値としては、例えば、検出に用いる測定方法又は測定装置に基づく量比（所謂、任意単位（AU）で表される数値）が挙げられる。

【0177】

また、細菌量における相対値としては、例えば、後述の実施例に示すとおり、腸内細菌叢全体におけるその細菌の割合を示す値（相対存在量、占有率）であってもよい。また、参照腸内細菌の量を基準として算出した値を用いてもよい。本発明にかかる「参照腸内細菌」は、糞便試料において安定して存在しており、また異なる生体試料間において、その量の差が小さい細菌であればよい。

【0178】

本発明の各評価方法においては、このようにして定量して得られた値と、同物質の対応値とを比較する。なお、「対応値」としては、百歳以上のヒト個体における定量値であり、本発明の各方法においてカットオフ値又は基準値として機能する値であればよく、例えば、百歳以上のヒト個体群において検出された各物質量の中央値又は平均値が挙げられる。また、「対応値」は、あらかじめ設定した定量値（固定値）であってもよく、該評価方法に関するキットの説明書等にかかる固定値が記載されていることが好ましい。さらに、比較対象となる百歳以上のヒト個体は、前記被検者と、性別、人種、及び国籍のうちの少なくとも一の特徴が同様である者が好ましい。また、かかる「比較」は、当業者であれば、上記検出方法に合った統計学的解析方法を適宜選択して行うことができる。統計学的解析方法としては、例えば、マン・ホイットニーのU検定、t検定、分散分析（ANOVA）、クラスカル・ウォリス検定、ウィルコクソン検定、オッズ比、ハザード比、フィッシャーの正確検定、受信者動作特性解析（ROC解析）、分類木と決定木解析（CART解析）が挙げられる。また、比較の際には、正規化された又は標準化かつ正規化されたデータを用いることもできる。

【0179】

「対応値より高い」又は「対応値より低い」とは、当業者であれば上記統計学的解析方法に基づき適宜判断することができる。例えば、検出された物質量が対応値より高く又は低く、その差が統計的に有意と認められること（例えば、 $P < 0.05$ ）が挙げられる。また、例えば、検出された物質量が対応値の2倍以上（好ましくは、5倍以上、10倍以上）又は0.5倍以下（好ましくは、0.2倍以下、0.1倍以下）であることも挙げられる。一方、「対応値と同等」とは、例えば、検出された物質量と対応値との差が統計的に有意と認められないこと（例えば、 $P > 0.05$ ）が挙げられる。また例えば、検出された物質量が対応値の0.5倍超、2倍未満であることが挙げられる。

【0180】

「可能性が高い」及び「可能性が低い」とは各々、例えば、80%以上及び20%未満であることが挙げられ、好ましくは90%以上及び10%未満であり、さらに好ましくは95%以上及び5%未満である。また同様に、「グラム陽性菌に対する抵抗性が高い」及び「グラム陽性菌に対する抵抗性が低い」とは各々、例えば、グラム陽性菌に感染する確率が80%以上及び20%未満であることが挙げられ、好ましくは、前記確率が90%以上及び10%未満であり、さらに好ましくは、前記確率が95%以上及び5%未満である。

【0181】

本発明の各評価方法における上記判定は、通常、医師（医師の指示を受けた者も含む）によって行われるが、上述の定量値等に関するデータは、医師による治療のタイミング等の判断も含めた診断に役立つものである。よって、本発明の方法は、医師による診断のために上述の定量値に関するデータを収集する方法、当該データを医師に提示する方法、上述の定量値と前記対応値とを比較し分析する方法、患者の臨床症状及び／又は他の検査結果を考慮した上で医師による診断を補助するための方法とも表現し得る。

【0182】

また、上記判定に基づく、投与については特に制限はなく、上述の治療方法等と同様で

ある。

【0183】

＜イソアロＬＣＡの製造方法＞

後述の実施例において示すとおり、本発明者らによって、イソアロＬＣＡを誘導する生化学合成経路が見出された。したがって、本発明は、以下のイソアロＬＣＡの製造方法を提供する。

【0184】

３－オキソアロＬＣＡの存在下、本発明に係る３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

10

【0185】

３－オキソ－Δ⁴－ＬＣＡの存在下、本発明に係る５ＡＲをコードするポリヌクレオチドを有する細菌と本発明に係る３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチドを有する細菌とを培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

【0186】

３－オキソ－Δ⁴－ＬＣＡの存在下、本発明に係る５ＡＲをコードするポリヌクレオチドと本発明に係る３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチドとを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

20

【0187】

イソＬＣＡ又は３－オキソＬＣＡの存在下、本発明に係る５ＡＲをコードするポリヌクレオチド、本発明に係る３βＨＳＤＨをコードするポリヌクレオチド、及び本発明に係る５ＢＲをコードするポリヌクレオチドを有する細菌を培養し、該細菌及び／又はその培養物において生成されたイソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

【0188】

本発明に係る３βＨＳＤＨの存在下、３－オキソアロＬＣＡからイソアロＬＣＡを生成し、当該イソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

【0189】

本発明に係る５ＡＲ及び本発明に係る３βＨＳＤＨの存在下、３－オキソ－Δ⁴－ＬＣＡからイソアロＬＣＡを生成し、当該イソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

30

【0190】

本発明に係る５ＡＲ、本発明に係る３βＨＳＤＨ及び本発明に係る５ＢＲの存在下、イソＬＣＡ又は３－オキソＬＣＡからイソアロＬＣＡを生成し、当該イソアロＬＣＡを採取する工程を含む、イソアロＬＣＡの製造方法。

【0191】

本発明において、培養する「細菌」としては上述のとおりであるが、本発明の製造方法においても、当該細菌の代わりに、本発明に係るＤＮＡ又はベクターが外来的に導入された宿主細胞も用いることができる。

40

【0192】

「細菌（宿主細胞）を培養する」条件は、当該細菌等がイソアロＬＣＡを製造できる条件であればよく、当業者であれば、細菌等の種類、用いる培地等に合わせて、温度、空気の添加の有無、酸素の濃度、二酸化炭素の濃度、培地のｐＨ（例えば、ｐＨ７～９）、培養温度（通常２０～４０℃であり、好ましくは２５～３７℃）、培養時間、湿度等を適宜調整し、設定することができる。また培地としては、細菌等が資化し得るものが含有されていればよく、炭素源、窒素源、硫黄源、無機塩類、金属、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン加水分解物、血清等が含有物として挙げられる。また、かかる培地には、例えば、本発明に係る酵素をコードするポリヌクレオチドの発現を誘導するためのＩＰＴＧや、本発明に係るベクターがコードし得る薬剤耐性遺伝子に対応する抗生物質（例えば

50

、アンピシリン)や、本発明に係るベクターがコードし得る栄養要求性を相補する遺伝子に対応する栄養物(例えば、アルギニン、ヒスチジン)を添加してもよい。

【0193】

本発明において、「培養物」とは、細菌等を培地で培養することによって得られる、増殖した細菌等、該細菌等の分泌産物及び該細菌等の代謝産物等を含む培地のことであり、それらの希釈物、濃縮物を含む。

【0194】

本発明において用いる「酵素」としては上述のとおりであるが、本発明に係る酵素の存在下、イソアロICAを生成させる条件については、当該生成反応が促進される条件であればよく、当業者であれば、反応液の組成(例えば、緩衝液)、反応液のpH(例えば、pH7~9)、反応温度(通常20~40℃であり、好ましくは25~37℃)、反応時間等を適宜調整し、設定することができる。

【0195】

このような細菌、その培養物又は反応液等からのイソアロICAの採取についても、特に制限はなく、公知の回収、精製方法により行うことができる。かかる採取方法としては、例えば、溶媒による抽出、各種クロマトグラフィー(ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、LC-MS、LC-MS/MS、薄層クロマトグラフィー等)が挙げられる。さらに、これらの方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。また、採取の時期としては、用いる細菌、酵素等の種類に合わせて適宜調整され、イソアロICAが生成し得る時間であればよいが、通常1時間~14日であり、好ましくは12時間~7日である。

【実施例】

【0196】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。また、本実施例は、以下に示す方法を用いて行なった。なお、本【実施例】の記載において、[]内の数字は、最後に列挙してある引用文献の番号に対応する。

【0197】

(ヒト検体の収集)

若年者、高齢者、百歳以上の長寿者、その直系親族、炎症性腸疾患(IBD)患者からの糞便サンプルの収集は、慶應義塾大学医学部倫理委員会に承認された下記プロトコルに従って実施した。

若年健常者ドナー及びIBD患者については、承認番号:20150075に基づく。

高齢者コホートについては、承認番号:20160297(川崎市における高齢者の暮らし方と健康に関する学術調査の一部として)に基づく。

百歳以上の長寿者とその直系親族については、承認番号20022020(全国超百寿者研究[15]の一部として)に基づく。

【0198】

なお、参加前に、それぞれのドナーからインフォームドコンセントを得ている。また、全ての実験は、これらの審査委員会によって要求された規則に従い実施した。全ての研究手順は、関連する倫理規制を遵守して実施した。全国超百寿者研究[15]と川崎市における高齢者の暮らし方と健康に関する学術調査は、大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システムに観察研究として登録されている。(ID:UMIN000040447及びUMIN000026053)。

【0199】

(ヒト糞便検体についてのメタゲノムシーケンシング、及び16SrRNA遺伝子についてのパイロシーケンシング)

糞便サンプルを20%グリセロールと10mM EDTAを含むPBSに懸濁し、使用するまで-80℃に保管した。融解後、100μLの懸濁液を、RNase A(終濃度100μg/mL, Invitrogen)とリゾチーム(終濃度15mg/mL, S

igma)を含む800 µLのTE10 (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA) バッファーに穏やかに混合し、37℃で1時間インキュベーションした。精製アクロモペプチダーゼ (終濃度 2,000 U/mL, Wako) を加え、更に37℃で1時間インキュベーションした。SDS (終濃度 1%) とプロテイナーゼ K (終濃度 1mg/mL, Roche) を、前記混合液にさらに加え、55℃で1時間インキュベーションした。次いで、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1 at pH 7.9) により、高分子量DNAを抽出し、イソプロパノール (水相と等量) を用いて沈殿させ、1mLの70%エタノールで洗浄し、30 µLのTEバッファーで穏やかに懸濁させた。

【0200】

16S rRNAシーケンシングは、Illuminaのプロトコルに従い、MiSeqを用いて行った。PCRは、27Fmodプライマー 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3' (配列番号: 166) と338Rプライマー 5'-TGCTGCC TCCCGTAGGAGT-3' (配列番号: 167) を用い、16S rRNA遺伝子のV1-V2領域に対して実施した。それぞれのサンプルから得られたアンプリコン (~330 bp) は、AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) を用いて精製した。

【0201】

DNAは、Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Invitrogen) とInfinite M Plex plate reader (Tecan) を用いて定量した。精製したDNAは、-20℃で保管した。

【0202】

2つのペアエンドリードは、重なり合うシーケンスを基にfastq-join programを用いて結合した。平均クオリティバリューが25未満となる、両方のユニバーサルプライマーに対して不一致なリードを、除去した。両方のプライマーシーケンスを除去し、クオリティフィルターをパスした3000リードをクオリティバリューに従って降順に並べ、ペアワイズの配列一致度についてカットオフ97%で、UCLUST program (Edgar 2010) version 5.2.32を用いてクラスタリングし、operational taxonomic unit (OTU) とした。

【0203】

Ribosomal Database Project (RDP) とNational Center for Biotechnology Information (NCBI) genome databaseに対する相同性をGLSEARCHプログラムにより検索することで、それぞれのOTUの分類学上の割当を行った。

【0204】

メタゲノムシーケンシングライブラリーは、Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina) を用い、製造元推奨のプロトコルに従って、2 ngのインプットDNAから調製したライブラリーを等量でプールし、それぞれのプールされたライブラリーのインサートサイズと濃度は、Agilent Bioanalyzer DNA 1000 kit (Agilent Technologies) を用いて決定した。シーケンシングは、Illumina NovaSeq 6000で151 bpのペアエンドリードを用い、1サンプル当たりおよそ1000万のペアエンドリードが得られるよう実施した。データは、Broad Picard Pipelineを用いて、分離や集約等を解析した (<https://broadinstitute.github.io/picard>)。メタゲノムデータのためのクオリティコントロールは、シーケンシングアダプター (最小5 bpの重なり) を検出して除去するためにTrimGalore!を、ヒトDNAのコンタミネーションの除去と低クオリティのシーケンス (HEADCROP: 15, SLIDINGWINDOW: 1:20) を除去するために、kneadData v0.7.2を用いて実施した。そして、50 bp未満の長さの配列を除いた。メタゲノムリードは、MEGAHIT [46] を用いてそ

10

20

30

40

50

それぞれのサンプルで個々にアセンブルしてコンティグとし、オープンリーディングフレームの予測は、Prodigal [47] を用いて、予測される遺伝子がスタートコドンとストップコドン両方を保持するように行った。予測した遺伝子を、より短いシーケンスの95%配列同一性、90%カバレッジの配列相同性を基準に、CD-HIT [48、49] を用いてクラスタリングすることで、非冗長遺伝子カタログを作成した。リードは、リードの長さに対して少なくとも95%の配列同一性のある、ユニークで強力なマッピングを条件とするBWA [50] を用い、遺伝子カタログに対してマッピングし、組織内のスクリプトを用いてカウントし (count matrix)、transcript-per-million (TPM matrix) に規格化した。Count matrixは、MSPminerをデフォルト設定で用いて遺伝子をビンニングし、メタゲノムの種パンゲノム (コア遺伝子とアクセサリー遺伝子) にするためのインプットとして使用した [51]。そして、一つのサンプル内の全てのメタゲノム種の存在量を、MSPminerにより出力されたトップ30の代表的なコア遺伝子のTPM中央値として表した。アセンブルされた遺伝子を、これまでの報告の通り、種、属、門レベルでNCBI RefSeq (version May 2018) を用いてアノテーションした [52]。NCBI RefSeqのどの種にもマッチしないメタゲノムの種を、系統発生的にアノテーションするために、PhyloPhlanをデフォルト設定で使用した [53]。種レベルでの相対的な存在量を基に、 α 多様性はShannon指数を用い、 β 多様性はBray-Curtis非類似度を用いて算出した (Rのveganパッケージ)。クエリ配列に対して少なくとも40%の配列一致度と80%のカバレッジをもつホモログタンパクの同定とアノテーションを行うために、C. scindensisのbaiオペロン中のタンパク質 [26]、又は、5AR、5BR、3 β HSDHI、若しくは3 β HSDHIIとしてここに報告されている単離菌の中のタンパク質を用い、非冗長遺伝子カタログに対し、US EARCH ublastでクエリを実行した。同一の処理パイプラインは、サルデーニャの百歳以上の長寿者の腸内細菌のデータセットに適用されている [8]。

【0205】

続く解析では、クオリティコントロールステップの後で少なくとも400万リードあるサンプルのみを使用した。加えて、被験者が抗生剤治療を受けている間に採取されたサンプルは使用しなかった。種又は門において差異のある存在量やShannon多様性指数の違いを検証するために、Rのlmer () 関数やlm () 関数の中で実行されるように、線形変量効果モデリング (百歳以上の長寿者と、若年者若しくは高齢者のコントロール)、又は、固定効果モデリング (高齢者と若年者コントロール) を使用した。さらに、種の異なる存在量を解析するために、少なくとも10%のサンプル中に存在しているメタゲノム種に解析を限定し、ゼロの値はそれぞれ最も小さいゼロでない測定の半量値に置き換え、正規性のためにlog10の変換を相対存在量に適用した。線形モデリングは、固定効果の共変量、すなわち、性別 (男性又は女性) やコホート情報 (百歳以上の長寿者、高齢者又は若年者) を含む。変量効果は、少数の百歳以上の長寿者間で一つ以上のサンプルの被験者情報を含む。全体として腸内細菌組成とコホートや性別情報との相関を同定するため、(Rのveganパッケージでadonis () 関数で実行されるように) PERMANOVAを、Bray-Curtis非類似度に適用した。高齢者や若年者コントロールと比較した百歳以上の長寿者の中のbaiオペロンホモログの相対存在量の違いを評価するために、ペアワイズのWilcoxonの順位検定を使用した。5AR、5BR、3 β HSDHI又は3 β HSDHII遺伝子をコードするBacteroidetesの種の相対存在量と糞便中の二次胆汁酸の存在量の間の相関関係の傾向を評価するために、Spearmanの順位相関を使用した。全ての名目上のp値は、多重検定のためにBenjamini-Hochberg法を用いて調整し、(特に断りがない限り) FDR < 0.05の関連性で有意差ありとみなした。

【0206】

(LC-MS/MSを用いた糞便中胆汁酸の定量)

正確に10mg秤量した凍結乾燥糞便サンプルを、200 μ Lの水に懸濁した。次いで

10

20

30

40

50

、250 μ Lの糞便懸濁液を、3 μ Lの重水素ラベル化された内部標準及び747 μ Lの0.27N NaOHを含むスクリーキャップのガラスバイアル中にて、1時間超音波をかけることにより、ホモジナイズした（重水素ラベル化された内部標準： d_4 -CA, d_4 -GCDCA, d_4 -TCDCa, d_5 -CDCA-3S, d_4 -LCAを各々50 μ M）。1時間室温でインキュベーションした後、8N HClを用いてpHが8.0になるよう調整し、110 μ Lの0.5M EDTA/0.5M Trisを混合した。そして、当該溶液を15000 rpmの遠心処理に供し、その上清を固相抽出カートリッジ（Agilent Bond Elut C18, 100mg/3mL, あらかじめ1mLのメタノールと3mLの水で3回処理）に移した。カートリッジを1mLの水で洗浄し、捕捉された胆汁酸を300 μ Lの90%エタノールで溶出した。5 μ LをLC/ESI-MS/MS（Triple Quad 6500+ tandem mass spectrometer, equipped with an ESI probe and Exion LC AD ultra-high pressure liquid chromatography system; SCIEX）にインジェクションした。分離カラム InertSustain C18（150mm $\times$ 2.1mm ID, 3 μ m particle size; GL Sciences Inc.）は40℃で使用した。10mMの酢酸アンモニウムとアセトニトリルとの混合溶液を、溶離液として使用し、分離は直線グラジエントにより0.2mL/minの流速で実施した。

移動相組成は、次のように徐々に変化させた。

酢酸アンモニウム：アセトニトリル（86：14, v/v）0.5分、（78：22, v/v）0.5-5分、（72：28, v/v）5-28分、（46：54, v/v）28-55分、（2：98, v/v）55-66分、（2：98, v/v）66分-70分。トータルの稼働時間を70分間とした。

LC/ESI-MS/MSを稼働するために、陽イオンMRMモードとして以下のMSパラメータを使用した。

ion spray voltage; 5,500 V, interface temperature; 500℃, curtain gas; 30psi, collision gas (nitrogen); 9psi, nebulizing gas; 80psi, and heater gas; 80psi。

陰イオンMRMモードとして、以下のMSパラメータを使用した。

ion spray voltage; -4,500V, interface temperature; 500℃, curtain gas; 30psi, collision gas (nitrogen); 9psi, nebulizing gas; 80psi, and heater gas; 80psi。

サンプルは、Analyst ソフトウェア ver1.71を用いて取得し、SCIEX OS-MQ ソフトウェア ver1.7.0.36606を用いて解析した。

【0207】

（糞便の短鎖脂肪酸、pH及びアンモニアの測定）

糞便中の短鎖脂肪酸の濃度は、PAL RTC autosampler（CTC Analytics）を備えたGC-MS（Shimadzu QP2020 system with a flame ionization detector）により決定した。ヘリウムをキャリアガスとして使用し、0.25 μ mの膜厚でコートされた溶融シリカキャピラリーカラム30m $\times$ 0.25mmを使用した。注入口温度を250℃とした。初期オープン温度を60℃、2分とし、それから330℃まで15℃/分で上昇させた。

MSパラメータは次のように設定した。

ion source temperatureは200℃、interface temperatureは280℃、loop timeは0.3秒。

GC-MS測定のために、0.5 μ g/ μ Lと20 μ g/ μ Lとの濃度になるようエタノールにて調製した50 μ Lの糞便サンプルを、10 μ Lの酢酸- d_4 （80 μ M）と混合した。

PAL RTC autosamplerを用い、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリニウム(DMT-MM)とn-オクチルアミン(80 µMの濃度のそれぞれの試薬10 µL)を、それぞれの糞便サンプルに加え、GC-MSヘインジェクションする前に9時間反応させた。サンプルは、Lab Solutions Insight GC-MS software (Shimadzu)を用いて解析し、定量した。

【0208】

糞便のpHは、蒸留水に懸濁した0.1 mg/µLの糞便分散液の上清を、pHメーター(Horiba Ltd.)に供し、測定した。また、同じ糞便懸濁液から、enzymatic ammonia ELISA assay kit (Abcam)を用い、同製造元のプロトコルに従い、糞便アンモニアレベルを定量した。

10

【0209】

(百十歳以上の長寿者からの細菌株の単離)

百十歳以上の長寿者からの糞便サンプル(centenarian 91 (CE91)、日本人、女性、年齢>110)を等量(w/v)の20%グリセロールを含むPBSに分散し、液体窒素中で瞬時に冷凍し、使用まで-80°Cで保存した。200 µLの融解した糞便懸濁液をPBSで段階希釈し、100 µLを非選択アガロースプレート(Brucella agar plate with haemin, Vitamin K1, lysed rabbit blood and defibrinated sheep blood (BHK-RS), Kyokuto)と、選択アガロースプレート(グラム陰性細菌に対して: Paramomycin and vancomycin supplemented BHK, Kyokuyo、クロストリジウム細菌に対して: Oxoid Reinforced Clostridial (RC) Agar, Thermofisher)に播種し、嫌気チャンバー(Coy Laboratory Products)内で、嫌気条件下(80% N₂, 10% H₂、及び10% CO₂)、37°Cで培養した。72時間から10日までインキュベーションした際に出現した個々のコロニーを、ピックアップした。単離した株は、サンガーシーケンシングのために、ユニバーサルプライマー(27 Fmod: 5'-AGRGT TTTGATYMTGGCTCAG-3' (配列番号: 166)、1492 R: 5'-GGYTACCTTGT TACGACTT-3' (配列番号: 168))を用いたPCRにて、16S rRNA遺伝子領域を増幅し、NCBI genome databaseを用いて同定した。カルチャーコレクション中の個々の単離菌は、16S rRNAシーケンスの相同性>98.0%で種を、相同性>94.5%で科を、相同性>86.5%で目を命名した。単離菌は、20%のグリセロールを含む最適な培地中、-80°Cで冷凍保存した。

20

30

【0210】

(細菌における胆汁酸代謝についてのIn vitroスクリーニング)

胆汁酸代謝をスクリーニングするために、単離した細菌株を、50 µMのCDCA、3-oxo-Δ⁴-LCA又はLCAと共に、ガス透過性膜(Breathe-easier (商標), Diversified Biotech)でカバーした96-deep well plate (Treff Lab)中、嫌気性条件で培養した。対数期から静止期の細菌懸濁液20 µLを、pH7に調整(MOPSバッファー使用、Dojindo)された、又はpH9に調整(TAPSバッファー使用、Dojindo)されたWilkins-Chalgren Anaerobe (WCA, Thermofisher)培地1 mLに植菌した。いくつかの細菌株は、追加の栄養素を添加したRC又はWCA培地中で増殖させた。Ruminococcaceae St42-43及び45、Clostridiales St47、並びにLachnospiraceae St56は、RC培地中で培養した。一方、Phascolarctobacterium faecium St52-53は、コハク酸ナトリウムを添加したRC培地中(20 mmol/L)で培養した。Akkermansia muciniphila St26-27の培養においては、塩化アンモニウム(1.0 g/L)、L-システイン(1.0 g/L)、ビタミン

40

50

K (0.5 mg/L)、ヘミン (5 mg/L) 及び 0.29% 揮発性脂肪酸溶液を添加した WCA 培地 (DSMZ 1611 YCFA modified medium をベース) を使用した。Alistipes finegoldii St16、Campylobacter ureolyticus St25、Christensenellaceae St36-37、及び Ruminococcaceae St44 は、4% 塩溶液 (0.2 g/L 塩化カルシウム、0.2 g/L 硫酸マグネシウム、1 g/L リン酸水素ナトリウム、1 g/L リン酸二水素ナトリウム、10 g/L 炭酸水素ナトリウム、2 g/L 塩化ナトリウム)、塩化アンモニウム (1.0 g/L)、L-システイン (1.0 g/L)、ビタミン K (0.5 mg/L)、ヘミン (5 mg/L)、酢酸ナトリウム (1.0 g/L)、ギ酸ナトリウム (0.15 g/L)、フマル酸ナトリウム (0.15 g/L)、チオグリコール酸ナトリウム (0.3 g/L)、1% ATCC vitamin solution、並びに 1% ATCC Trace element solution を添加した WCA 培地中で培養した。Methanobrevibacter smithii St67-68 の培養においては、上記の改良された WCA 培地に、更に重炭酸ナトリウム (0.25 g/L) と硫化ナトリウム (0.05 g/L)、ギ酸ナトリウム (1.36 g/L) を添加して用いた [54]。嫌気性条件下で 37℃、48 時間 インキュベーションした後、培養上清を回収し、解析のためのサンプル調製まで -20℃ で保管した。

【0211】

サンプル調製のために、100 µL の培養上清を 10 µL の重水素ラベル化した内部標準 (d4-CA と d4-CDCA、d4-LCA、それぞれ 1 nmol/mL) を含むスクリーキャップガラスバイアルに移した。400 µL の水を加え、10 分間超音波をかけ、それから固相抽出カートリッジ (Agilent Bond Elut C18、100 mg/1 mL、あらかじめ 1 mL のメタノールと 3 mL の水で処理) に供した。カートリッジを 1 mL の水で洗浄し、捕捉した胆汁酸を 1 mL の 90% エタノールで溶出した。溶媒を蒸発させた後、残留物を 100 µL の 50% エタノールに溶解し、5 µL を LC/ESI-MS/MS (LC-MS8040 tandem mass spectrometer, equipped with an ESI probe and Nexera X2 ultra-high-pressure liquid chromatography system; Shimadzu) にインジェクションした。分離カラム InertSustain C18 (150 mm × 2.1 mm ID, 2 µm particle size; GL Sciences Inc.) は 40℃ で使用した。混合液 A (10 mM 酢酸アンモニウム、0.01% ギ酸、20% アセトニトリル) と混合液 B (30% アセトニトリル、70% メタノール) を溶離液として使用し、分離は直線グラジエントにより 0.2 mL/min の流速で行った。

移動相組成を次のように徐々に変化した。

混合液 A : B (80 : 20, v/v) 0.1 分、(48 : 52, v/v) 0.1 - 1 分、(30 : 70, v/v) 1 - 27 分、(0 : 100, v/v) 27 - 27.1 分、(0 : 100, v/v) 27.1 - 33 分、(80 : 20, v/v) 33 - 33.1 分、(80 : 20, v/v) 33.1 - 83 分。トータル稼働時間は 83 分間とした。

LC/ESI-MS/MS を稼働するために、次の MS パラメータを使用した。

spray voltage; 3000 V、heating block temperature; 400℃、nebulizing gas flow; 3 L/min、drying gas flow; 15 L/min、interface temperature 300℃、collision gas (argon) pressure; 230 kPa、collision energy; negative (11 to -35 eV); and positive (-16 to -19 eV) ion modes。

サンプルは、LabSolutions Insight LC-MS software (Shimadzu) を用いて解析し、定量した。

【0212】

(細菌の全ゲノムシーケンシング)

68単離株の抽出ゲノムを断片化した。ゲノム配列は、PacBio SequelとIllumina MiSeqシーケンサーを用い、全ゲノムショットガンシーケンシング法により決定した。Illumina MiSeq 2x300bpペアエンドシーケンシングのライブラリーを、TruSeq DNA PCR-Free kit (target length=550bp)を用いて調製し、全てのMiSeqのリードは、FASTX-toolkit (v. 0.0.13, hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)を用い、クオリティバリュー>20にてトリミングとフィルタリングを行った。PacBio Sequelのシーケンシングライブラリーを、SMRTbell template prep kit 2.0 (target length=10-15kbp)を用い、DNAの断片化をせずに調製した。Sequelによる内部コントロールの除去とアダプタトリミングの後、追加オプション (corOutCoverage=10000, corMinCoverage=0, corMhapSensitivity=high)を設定したCanu (v1.8)を用いて、トリミングされたリードのエラー修正を実行した。フィルターパスしたMiSeqのリードと修正されたSequelのリードのde novoハイブリッドアセンブリを、Unicycler (v. 0.4.8)により実施した。なお、これには、環状コンティグを生成する重なりと環化のチェックが含まれる。生成したコンティグの遺伝子の予測とゲノムのアノテーションは、Rapid Annotations based on Subsystem Technology (RAST) Prokaryotic Genome Annotation Server [55]とProkka:rapid prokaryotic genome annotation software tool [56]を用いて実施した。なお、特に断りがない限り、デフォルトパラメータを使用した。

【0213】

(変異体作製)

P. merdae St3の欠失変異体 ($\Delta 5AR$ 、 $\Delta 5BR$ 、 $\Delta 3\beta HSDH$)は、*Bacteroides* 変異体の作製方法 [29] を改良して、作製した。簡潔に説明すると、コーディング領域の両側のおよそ2kbの配列をPCRにより増幅した。なお、この増幅に用いたPCRプライマーの配列等は下記表5を参照のほど。そして、製造元のプロトコルに従い、HiFi DNA Assembly (NEB)を用いて、自殺ベクターpLGB30のPstIとSalIの位置に組み込んだ。1 μ Lの反応液を*E. coli* MFDpirのエレクトロコンピテントセルに形質転換した。形質転換細胞を、以下のようにして、*P. merdae* St3と接合させた。

【0214】

供与体 (*E. coli* MFDpir)と受容体 (*P. merdae* St3)を、それぞれLB培地とBHI培地でOD600が0.5となるまで増殖させ、1:1の割合で混合した。混合液をBHIアガロースプレート上に滴下し、嫌気条件下で37℃、16時間インキュベーションした。テトラサイクリン (6 μ g/mL)を含むBHIアガロースプレート上で接合完了体のコロニーを形成させた。

【0215】

続いて、二回目の相同組み換えによりゲノムからプラスミドを失った株を選定するために、接合完了体を0.25% (wt/vol) グルコースと50mg/L L-システイン、5mg/Lヘミン、2.5 μ g/LビタミンK1、2mg/L FeSO₄·7H₂O、5 μ g/LビタミンB12、10mMラムノースを添加したM9アガロースプレートに播種した。遺伝子欠失の成否を、PCRとサンガーシーケンシングにより確認した。

【0216】

10

20

30

40

50

【表 5】

プライマー名	配列 (5' - 3')	配列 番号
5AR-upstream-Fw	GTGGATCCCCGGGCTGCACCGTATCGTCCCAAAGTTGT	142
5AR-upstream-Rv	TCTAATTGTTATGATTAACATCATAATAGAT	143
5AR-downstream-Fw	AGTTAATCATAACAATTAGAAATAAGGTGA	144
5AR-downstream-Rv	CTGGAAGATAGGCAATTAGGTAAGCTGGCGCTTGAAATC	145
5AR-check#1-Fw	TTGGCGTTCATCAGTTCAAG	146
5AR-check#2-Rv	ACCCTGACTCCGATGTTGAG	147
5AR-check#3-Fw	GCTCAGACGGGATCATGAAC	148
5AR-check#4-Rv	ATCCTGGCAATGGTCGATGA	149
5BR-upstream-Fw	GTGGATCCCCGGGCTGCAAGTTCGCGACGGTCTTTCTT	150
5BR-upstream-Rv	CATAATAGATTGGAAGGATTAGCCATC	151
5BR-downstream-Fw	CCTTTTCCAACTATTATGAGTTAATCAT	152
5BR-downstream-Rv	CTGGAAGATAGGCAATTAGGCCGGAATCAACTGAAGGA	153
5BR-check#1-Fw	CGTCTTCCGGATCCTCGAAG	154
5BR-check#2-Rv	GCTATGGCTTTGCGTAACCG	155
5BR-check#3-Fw	AATACGGCATCCTGGTTGCA	156
5BR-check#4-Rv	CGCTTGGTGGACATTTGCAA	157
3bHSDH-upstream-Fw	GTGGATCCCCGGGCTGCAGGATGAAAGCGATTGCCGAC	158
3bHSDH-upstream-Rv	AATATAAGTAACCGGCATGCACTTTTAGTT	159
3bHSDH-downstream-Fw	GCATGCCGGTACTTATATTCTAATTTCTC	160
3bHSDH-downstream-Rv	CTGGAAGATAGGCAATTAGACGCCCTGCAGATCATATGG	161
3bHSDH-check#1-Fw	CTGGTGTCTCCTTGTCTGTC	162
3bHSDH-check#2-Rv	TTTGCTTACGTTGCTGTGCC	163
3bHSDH-check#3-Fw	TTTCCCATCACACGTACGGG	164
3bHSDH-check#4-Rv	CAAAAGCGTTCCGACAAGCA	165
27Fmod	AGRGTTTGATYMTGGCTCAG	166
338R	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	167
1492R	GGYTACCTTGTACGACTT	168

【0217】

(細菌増殖抑制評価)

Clostridioides difficile strain 630 (ATCC BAA-1382)、*Clostridioides difficile* VPI 10463 (ATCC 43255)、vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (ATCC 700221)、*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (ATCC 12394)、carbapenemase-resistant *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1705)、及び *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ATCC 14028) は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。

【0218】

Clostridium perfringens (JCM 1290T)、*Bacillus cereus* (JCM 2152T)、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (JCM 16555)、*Streptococcus pyogenes* (JCM 5674T)、*Streptococcus sanguinis* (JCM 5708T)、*Proteus mirabilis* (JCM 1669T)、及び *Proteus vulgaris* (JCM 20013) は、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM) より購入した。

【0219】

腸管接着性侵入性 *Escherichia coli* は、Nicolas Banich 教授から提供された。

【0220】

腸内共生菌に関し、*Clostridium scindens* (ATCC 35704 T) と *Clostridium sporogenes* (ATCC 15579)、*Dorea formicigenerans* (ATCC 27755T)、*Ruminococcus lactaris* (ATCC 29176 T)、*Bacteroides fragilis* (ATCC 25285T)、*Clostridium indolis* (JCM 1380T)、*Clostridium hiranonis* (JCM 10541 T)、*Clostridium hylemonae* (JCM 10539T)、*Clostridium nexile* (JCM 31500T)、*Clostridium butyricum* (JCM 1391T)、*Dorea longicatena* (JCM 11232T)、*Eubacterium hallii* (JCM 31263)、*Streptococcus thermophilus* (JCM 17834T)、*Ruminococcus gnavus* (JCM 6515T)、*Anaerotruncus coli hominis* (JCM 15631T)、*Blautia producta* (JCM 1471T)、*Blautia obeum* (JCM 31340)、*Bifidobacterium bifidum* (JCM 1254)、*Bifidobacterium breve* (JCM 1192T)、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (JCM 1217T)、*Lactobacillus casei* (JCM 1134T)、*Lactobacillus paragasseri* (JCM 1130)、*Lactobacillus reuteri* (JCM 1112T)、*Collinsella aerofaciens* (JCM 10188T)、*Roseburia intestinalis* (JCM 17583T)、*Eggerthella lenta* (JCM 9979T)、*Bacteroides caccae* (JCM 9498T)、*Bacteroides finegoldii* (JCM 13345T)、*Bacteroides intestinalis* (JCM 13265T)、*Bacteroides ovatus* (JCM 5824T)、*Bacteroides stercoris* (JCM 9496T)、*Parabacteroides johnsonii* (JCM 13406T)、及び *Prevotella copri* (JCM 13464T) は、ATCC と JCM から入手した。

【0221】

本発明者らが所属する研究室が以前報告した下記 *Treg* 誘導株もまた、共生菌パネルの中に含めた。*Clostridium symbiosum* (VE202-16)、*Clostridium ramosum* (VE202-18)、*Clostridium boltea* (VE202-7) 及び *Flavinofractor plautii* (VE202-3)。加えて、本発明者らが所属する研究室でヒト糞便から単離した *Hungatella hathewayi* と *Eubacterium rectale*、*Alistipes putredinis* も使用した。

【0222】

下記 *Clostridium HGF2 (innocuum)* HM287 は、Human Microbiome Project の一部として、BEI Resources, NIAID, NIH を通して入手した：*Clostridium sp.*, Strain HGF2, HM-287。

【0223】

BHK blood agar plates (Kyokuto) 上に新規に形成したコロニーから、WCA 培地中で OD600 が 0.63 となるように調整した一次懸濁液を調製した。続いて、100 µL の一次懸濁液を最終 2.4 mL となるように培地中に希釈することで二次懸濁液を調製した。10 µL の二次懸濁液を、最終 200 µL となるように

10

20

30

40

50

様々な濃度（3.175, 6.25, 12.5, 25, 及び50 μM ）の、次に示す胆汁酸を含む培地に植菌した；DCA、LCA、3-oxoLCA、3-oxoalloLCA、isoLCA、alloLCA、isoalloLCA。菌の増殖は、37℃に設定したマイクロプレートリーダー（Sunrise Thermo, Tecan）で、測定ポイントの前に60秒間振とうさせ、OD600を測定することにより0.5から1時間毎にモニタリングした。最小発育阻止濃度を決定するために、10 μL の二次懸濁液を最終200 μL となるように0.25から50 μM のisoalloLCAを含む培地に植菌した。

【0224】

（電子顕微鏡法（EM））

電子顕微鏡法に供するサンプル調製のため、IsoalloLCA添加又は無添加下に5時間培養した後、細菌の培養液を採取した。走査型電子顕微鏡法に供するため、10–30 μL の培養液をNano percolator membrane（JEOL）にスポットし、新しく調製した2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定した。4℃一晩固定した後、サンプルは0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4, Muto Pure Chemicals）で洗浄し、1.0%四酸化オスミウム（TAAB Laboratories）で4℃2時間固定し、エタノール濃度を増やしていく一連の溶液を用いて処理した。サンプルは、臨界点乾燥機（CPD300, Leica Biosystems）を用いて乾燥し、導電性のオスミウムコーター（Neoc-ST, Meiwa fosis）を使って、およそ2 nm厚にオスミウムをコートした。SEM画像はSU6600（Hitachi High Tech）を用い、5 keVの電子ボルトで撮像した。

【0225】

透過電子顕微鏡法に供するため、25 mLの細菌培養液を遠心することにより（13,000 rpm, 2分間）、細菌のペレットを作製した。ペレットは2.5%グルタルアルデヒド溶液で4℃一晩固定した。0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後、サンプルは1.0%の四酸化オスミウムで4℃2時間固定し、蒸留水で洗浄、低ゲル化温度Type VII-Aアガロース（Sigma-Aldrich）に包埋した。サンプルは、無水エタノールまでエタノール濃度を上げていく一連の溶液を用いて脱水し、アセトン（Sigma-Aldrich）、*n*-ブチルグリシジルエーテル（Okenshoji Co., Ltd.）、段階的な濃度のエポキシ樹脂に浸漬し、100%エポキシ樹脂（100 g Epon（商品名）は27.0 g MNA, 51.3 g EPOK-812, 21.9 g DDSA 及び1.1 mL DMP-30を含む。Okenshoji Co., Ltd.）にも4℃で48時間浸漬した。純エポキシ樹脂の重合を、60℃、72時間で完了した。超マイクローム（Leica UC7, Leica Biosystems）を用いて、超薄膜片（70 nm）を銅のグリッド（Veco Specimen Grids, Nisshin-EM）上に作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛でそれぞれ10分間染色した。TEM画像は、JEM-1400 plus（JEOL）を用い、80–100 keVの電子ボルトで撮像した。

【0226】

（胆汁酸を添加したヒト糞便の培養）

ヒト糞便の培養は、96-deep well plates（Treff Lab）中で、若年者と健常者ドナーから得られた糞便サンプルを用いて実施した。ヒト糞便バッチ培養に以前使用した培地[59, 60]をベースにした、4%塩溶液（0.2 g/L塩化カルシウム、0.2 g/L硫酸マグネシウム、1 g/Lリン酸水素二カリウム、1 g/Lリン酸二水素カリウム、10 g/L炭酸水素ナトリウム、2 g/L塩化ナトリウム）、塩化アンモニウム（1.0 g/L）、L-システイン（1.0 g/L）、ビタミンK（0.5 mg/L）、ヘミン（5 mg/L）、酢酸ナトリウム（1.0 g/L）、ギ酸ナトリウム（0.15 g/L）、フマル酸ナトリウム（0.15 g/L）、チオグリコール酸ナトリウム（0.3 g/L）、1% ATCC vitamin solution及び1% ATCC Trace element solutionを添加した、WCA培地1 mL

に5mgの糞便を加えて、培養に用いた。糞便培養は、終濃度50 μ Mの胆汁酸(LCA、3-oxoLCA、isoalloLCA)の存在下、嫌気性条件、37 $^{\circ}$ Cにて48時間行った。16Sメタゲノムシーケンシングのために、糞便培養液から上述のようにDNAを抽出した。

【0227】

(LC-MS/MS LC-MS/MSを用いたステロイドホルモンの定量)

CE91より単離したParabacteroides merdae St3及びOdoribacteraceae St21-24株を、50 μ Mのテストステロン又は5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)と共に、ガス透過性膜(Breath-easyierTM, Diversified Biotech)で被覆した96穴プレート(Treff Lab)中で嫌氣的に培養した。対数増殖期から定常期までの20 μ Lの細菌培養液を、pHを7に調整した(MOPS緩衝液を使用、Dojindo)Wilkins-Chalgren Anaerobe(WCA、サーモフィッシャー社)培地1mLに接種した。3時間、6時間、9時間及び12時間培養後に、LC-MS/MS定量のために、各培養上清を採取した。

【0228】

試料調製のために、40 μ Lの培養上清を、160 μ Lの重水素標識内部標準物質(testosterone-d3, 12.5nMのメタノール溶液)及び800 μ Lの80%メタノールと混合した。試料を室温で10分間超音波処理した後、孔径0.45 μ m(Pure Clean for Solvent 0.45 μ m, KURABO)のフィルターに通した。2 μ Lの溶液をLC/ESI-MS/MS(ESIプローブとExion LC AD ultra-high pressure liquid chromatography system; SCIEXを備えたTriple Quad 6500+tandem mass spectrometer)に注入した。分離カラムInertSustain C18(内径150mm $\times$ 2.1mm、粒径2 μ m; GL Sciences Inc.)は40 $^{\circ}$ Cで使用した。混合物A(蒸留水中の5mMギ酸アンモニウム)と混合物B(メタノール中の5mMギ酸アンモニウム)とをグラジエントとして使用し、0.2mL/分の流速で線形勾配溶出によって分離を行った。移動相組成を以下のように徐々に変化させた。

混合物A:B(60:40、v/v)を0分時点、(100:0、v/v)を20~25分時点、(60:40、v/v)を25.1~30分時点。全運転時間は30分間とした。LC-ESI-MS/MSを操作するために、以下のMSパラメータを使用した。ion spray voltage; 5,500 V, interface temperature; 500 $^{\circ}$ C, curtain gas; 30psi, collision gas(nitrogen); 9psi, nebulizing gas; 80psi, and heater gas; 80psi。サンプルはAnalystソフトウェア ver1.71を用いて採取し、SCIEX OS-MQソフトウェア ver1.7.0.36606を用いて分析した。

【0229】

(統計解析)

全ての統計解析は、GraphPad Prism software(GraphPad Software, Inc.)を用いて実施した。Tukey検定を伴う一元配置分散分析(パラメトリック)とDunn検定を伴うKruskal-Wallis検定(ノンパラメトリック)を、多重比較のために使用した。二群間の全ての比較のために、Welch's補正を伴うMann-Whitney検定(ノンパラメトリック)を使用した。Bonferroni補正を伴うWilcoxon signed-rank testの事後検定(ノンパラメトリック)を、群の平均を比較するために使用した。2変数間の相関を調べるために、Spearmanの順位相関を使用した。

【0230】

(実施例1) 百寿者の腸内細菌叢シグネチャ

3つの年齢層（百寿者（ $n = 160$ ）、高齢者（ $n = 112$ ）、及び若年者（ $n = 44$ ））を解析対象とした。百寿者は、全て、日本百寿者研究の一環として募集され〔15〕、そのほとんどは介護施設に入居（85%）しており、その他は自宅に居住（9.4%）、医療施設に入院（5.6%）している。百寿者は、日常生活動作（ADL）やミニメンタルステート検査値（MMSE）、赤血球数や血清アルブミン値が低い事が報告されている。

【0231】

百寿者の一部は、血清C反応性タンパク質と糞便リポカリンのレベルの上昇によって証明されるように軽度の炎症の兆候を示し〔9, 12, 13〕、これは、老化が、バリアの完全性の低下と免疫老化に起因する慢性炎症を伴うという既定概念と一致している（図5C及び5D）。それにもかかわらず、百寿者の大多数において、肥満、糖尿病、高血圧、がん等の慢性疾患は認められず、これらの疾患の有病率は、高齢者グループと比較して有意に増加していない（図5E及び5F、並びに表6）。

【0232】

10

20

30

40

50

【表 6】

	百寿者の直系親族、 兄弟姉妹			
	百寿者 Centenarian (n = 160)	高齢者 Elderly (n = 112)	若年者 Young (n = 39)	Lineal descendants and siblings of centenarians (n = 22)
Age (years)	106.95±2.56	86.42±1.31	31.05±9.37	74.68±11.62
Female, No. (%)	146 (91.25)	54 (48.21)	8 (20)	11 (50)
Residence, No. (%)				
Home	15 (9.38)	112 (100)	39 (97.5)	
Nursing home	136 (85.00)	0 (0)	0 (0)	
Hospital	9 (5.62)	0 (0)	0 (0)	
Height (meter)	1.44±0.08	1.54±0.09	1.69±0.08	
Weight (kilogram)	39.6±7.43	54.95±9.74	62±10.74	
Body mass index, BMI score	19.35±3.47	23.07±3.06	21.64±2.67	
Systolic blood pressure (mmHg)	133.10±22.63	142±16.74		
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.44±15.23	74.42±11.02		
Pulse (beats/min)	74.23±12.29	73.95±11.52		
Activities of daily living, ADL score	27.5±26.02	98.79±3.3	100±0	
Mini-mental state examination, MMSE score	12.76±8.13	26.14±2.85		
Blood tests				
Total protein (g/dL)	6.65±0.63	7.26±0.4	7.39±0.58	
Albumin (g/dL)	3.33±0.43	4.2±0.31	4.65±0.16	
Total cholesterol (mg/dL)	172.10±32.74	196.29±32.24		
Triglycerides (mg/dL)	106.16±47.88	132.9±79.39		
High density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	47.79±11.88	61.16±16.75		
Low density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	96.86±26.84	108.22±24.44		
Fasting blood sugar (mg/dL)	108.24±30.81	110.71±43.09	84.88±10.41	
Haemoglobin A1c (%)	5.60±0.54	5.95±0.58		
C-reactive protein (mg/dL)	0.47±0.82	0.21±0.67	0.05±0.06	
Aspartate aminotransferase (U/L)	22.01±6.70	25.57±9.49	20.1±5.22	
Alanine aminotransferase (U/L)	11.50±5.42	18.57±11.41	15.41±5.04	
Lactate dehydrogenase (U/L)	200.65±44.24	198.94±38.07		
Gamma-glutamyl transpeptidase (U/L)	16.70±10.99	26.19±21.42	15.75±4.74	
Cholinesterase (U/L)	198.87±58.79	299.91±60.54		
Creatinine (mg/dL)	0.88±0.37	0.87±0.31	0.61±0.09	
Uric acid (mg/dL)	5.53±1.54	5.41±1.32	4.03±0.93	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	23.45±11.28	19.07±5.73	11.73±2.42	
White blood cell count (x10 ³ cells/ μ L)	5.36±1.50	5.15±1.35	5.48±1.35	
Red blood cell count (x10 ⁴ cells/ μ L)	372.89±52.99	422.71±42.26	508.6±37.97	
Platelet count (x10 ⁴ cells/ μ L)	21.27±7.68	21.24±4.15	24.91±5.64	
Haemoglobin (g/dL)	11.44±1.68	13.05±1.41	15.29±1.2	
Haematocrit (%)	34.78±4.70	39.58±4.02	45.96±2.85	
Mean corpuscular volume (fL)	93.59±6.10	93.73±4.36	90.53±4.55	
Medical history, No. (%)				
Cerebrovascular disease	30 (18.87)	10 (9.01)	0 (0)	
Myocardial infarction	2 (1.27)	0 (0)	0 (0)	
Angina	17 (10.69)	10 (9.01)	0 (0)	
Haematological disorder/disease	2 (1.27)		0 (0)	
Parkinson's disease	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Collagen disease	5 (3.16)	3 (2.68)	0 (0)	
Asthma	4 (2.55)	7 (6.36)	1 (2.56)	
Pneumonia	29 (18.47)	5 (4.55)	0 (0)	
Respiratory disease	15 (9.55)	18 (16.36)	0 (0)	
Bone fractures	111 (69.81)	31 (27.68)	0 (0)	
High blood pressure	65 (41.40)	80 (71.43)	2 (5.13)	
Diabetes mellitus	8 (5.06)	10 (9.01)	0 (0)	
Renal disease	11 (7.01)	12 (10.71)	0 (0)	
Cancer	19 (12.03)	18 (16.07)	0 (0)	
Gastrointestinal disease	58 (36.48)	78 (69.64)	0 (0)	
Positive faecal occult blood test, No. (%)	3 (6.67)	9 (8.04)	1 (4.35)	

Data are presented as mean±SD or No. (%)

【0233】

3つのグループから糞便サンプルを収集し、16S rRNAアンプリコンと全メタゲノムショットガンシーケンシングの両方を用い、細菌叢を解析した。その結果、ブレイ・カーチス距離に基づく主座標分析 (PCoA) により、百寿者と両方の対照群の間で細菌叢の組成に有意差があることが明らかになった (PERMANOVA FDR<0.05、図1A)。門レベルでは、対照群と比較して、百寿者で *Proteobacteria* と *Synergistetes* の有意な増加、*Verrucomicrobia* の中程度の増加、及び *Actinobacteria* (放線菌) の減少が観察された (図1C及び図6)。

【0234】

このような *Proteobacteria* の増殖は、炎症性腸疾患（IBD）の患者によく見られるが、IBD患者で一般的に観察される腸内細菌の多様性の減少とは対照的に、百寿者の腸内菌叢においては、若年者と比較してても、平均して高いシャノン指数であり、多様性が認められた（図1B）。さらに、百寿者の細菌叢の構成は、IBD患者のそれとは異なり、主要因分析で異なる集合として分類された（図7A）。

【0235】

また、いくつかの分類群は、百寿者グループと対照グループで相対的な存在量の差が認められた（図1D～1F、及び図7B～7D）。これらは、加齢軌跡に基づいて3つの特徴群にグループ化された。

【0236】

最初の特徴群は、年齢とともに存在量が増加又は減少した分類群である（図1D）。例えば、未知の *Firmicutes* 種（msp__161）又は *Eubacterium siraeum* は、百寿者に最も多く、次に高齢者、その次に若年者であった。一方、*Blautia wexlerae* は反対の傾向を示し、若年者に最も多く、次に百寿者、その次に高齢者であった。また、*Alistipes shahii* は、若年者と比較して、高齢者と百寿者のグループの両方で比較的多かった。これらの調査結果は、これらの分類群の相対的な存在量が加齢への適応を反映しており、身体活動、環境、及び食事に関連している可能性があることを示唆する以前の研究と一致していた〔4～6，8〕。

【0237】

2番目の特徴群は、百寿者と若年者でその存在量が類似しているが、高齢者とは異なる分類群である（図1E）。これらの種は、若さの維持に貢献したり、抗老化作用を持っている可能性がある。特に、未知の *Firmicutes*（msp__197）、*Ruminococcus gnavus*、及び *Eggerthella lenta* は、百寿者と若年者の両方で比較的多かった。興味深いことに、後者の2つの種は胆汁酸代謝に関与しており、宿主の腸内でのイソ胆汁酸の生合成に関与している可能性がある〔18〕。

【0238】

3番目の特徴群は、百寿者に特異的な分類群で、百寿者と対照群（高齢者と若年者）間ではその存在量が有意に異なっており、2つの対照群の中間に位置付けられるわけではない（図1F）。この群では、*Alistipes*、*Parabacteroides*、*Clostridium* 種、及び人間の腸内の主要な古細菌である *Methanobrevibacter* が、対照群と比較して百寿者に特に富んでいた。百寿者に最も豊富な種の1つは *Clostridium scindens* で、一次胆汁酸を二次胆汁酸に変換するのに必要な、比較的まれな 7α -dehydroxylation の能力を持っていることが知られている〔19，20〕。対照的に、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Eubacterium rectale* 等の主要な酪酸生産菌は、百寿者で選択的に枯渇していた（図1F）。

【0239】

また、百寿者の直系の子孫と兄弟姉妹から便を収集し、16SrRNAシーケンスによって分析した（ $n=22$ from 14 centenarians, 48–95 yo、図7A～7D及び表6）。*Phascolarctobacterium faecium* や *Alistipes putredinis* 等の一部の細菌種は、対照群と比較して、百寿者とその家族に豊富に含まれていた（図7D）。百寿者とその直系の子孫におけるこれらの分類群の増加は、遺伝、生活習慣、及び食事による可能性がある。例えば、アブラナ科の野菜の消費は、前述の分類群の拡大に有利に働くことが報告されている〔21〕。

【0240】

（実施例2） 百寿者特有の胆汁酸プロファイル

次に、高齢者及び若年者の対照と比較して、百寿者糞便中の代謝物分析結果を評価した。まず、糞便中の短鎖脂肪酸（SCFA）を分析し、百寿者のプロピオン酸と酪酸の両方のレベルが低下していることが明らかになった（図8A）。その一方で、イソ酪酸やイソ

10

20

30

40

50

吉草酸等の分岐短鎖脂肪酸、及びアンモニアは、百寿者で上昇していた（図 8 A 及び 8 B）。

【0241】

これらの代謝変化は、*R. intestinalis* や *F. prausnitzii* 等の SCFA 生産菌の同時減少（[22]、図 1 F）、及び *Alistipes putredinis* 等のタンパク質発酵生物の増加に起因している可能性がある（[23]、図 1 F）。アミノ酸を利用する細菌のこの増加は、百寿者に一般的に観察される上部消化管のタンパク質分解能力の低下の結果である可能性がある。

【0242】

さらに、糞便 pH は、百寿者の方が対照よりも有意に高く（図 8 C）、これは、SCFA 濃度が低く、加齢に特徴的な胃液産生が減少したことが一因である可能性がある。

【0243】

百寿者において胆汁酸を代謝する可能性のある種が増加することを考慮して、次に糞便中の胆汁酸の分布に焦点を合わせ、解析した。

【0244】

一次胆汁酸は肝臓のコレステロールから合成され、グリシン又はタウリンのいずれかに結合し、胆管に分泌される [24, 25]。これらの一次胆汁酸は、次に、腸内細菌叢によって脱共役され、様々な二次胆汁酸に変換される [19, 25]。主だった生化学変換は、一次胆汁酸（*cholic acid* (CA) と *chenodeoxycholic acid* (CDCA)）の 7 α -脱ヒドロキシ化であり、それによって、それらは二次胆汁酸（*deoxycholic acid* (DCA) と *lithocholic acid* (LCA)）に変換される。

【0245】

細菌叢を介した胆汁酸代謝は、下記に示すとおり、胆汁酸誘導性（*bai*）オペロン遺伝子（*BaiB*、*BaiCD*、*BaiA2*、*BaiE*、*BaiF*、及び *BaiH*）によってコードされる酵素によって触媒される複数の酸化還元反応で構成される [19, 26]。7 α -脱ヒドロキシ化に加えて、胆汁酸は、酸化及びエピマー化を受けて、オキソ（ケト）、イソ（3 β -ヒドロキシ）及びアロ（5 α -H）及び並びにシス及びトランス異性体に変換される [25]。

【0246】

10

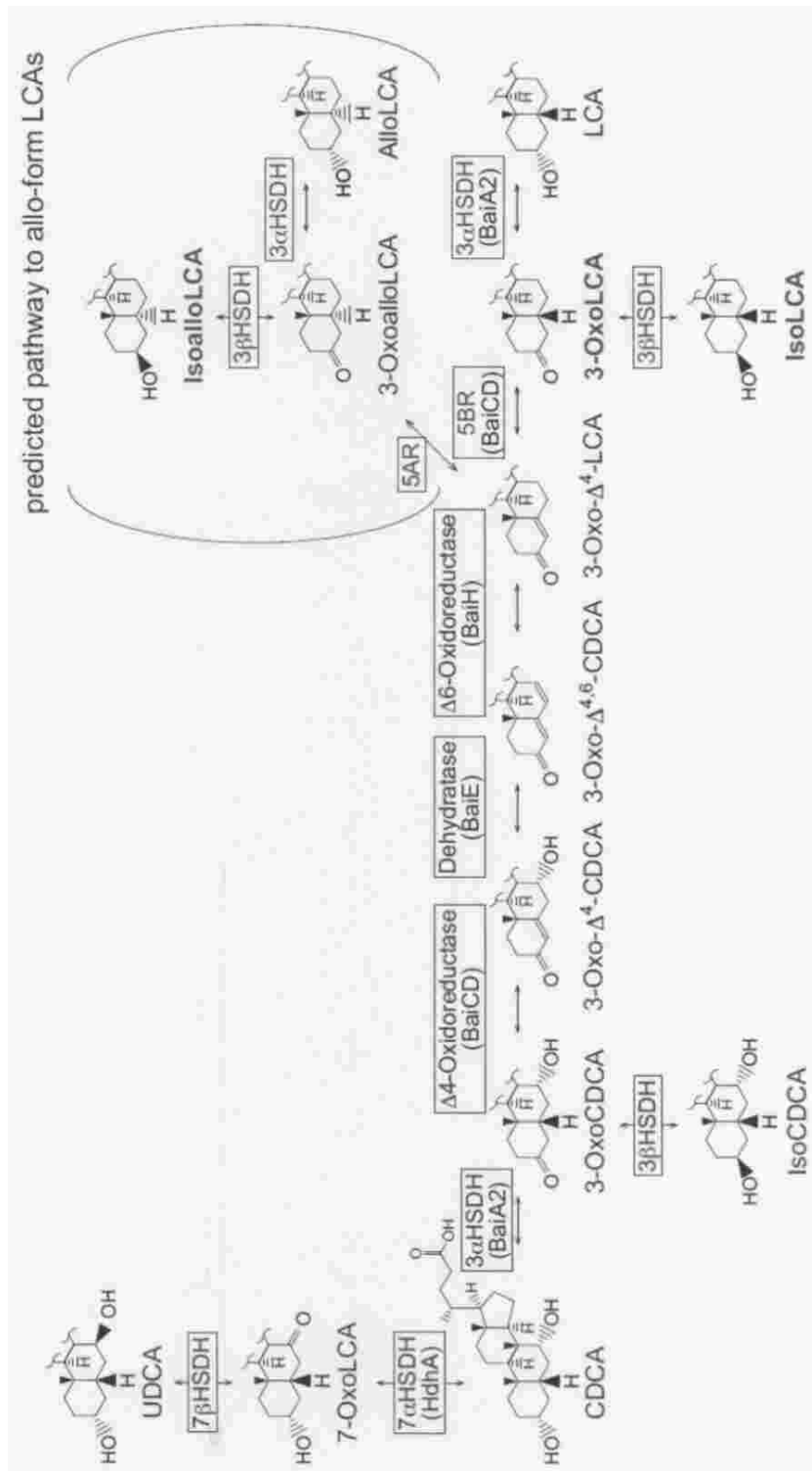
20

30

40

50

【化 1】



【 0 2 4 7 】

メタゲノム分析では、百寿者の *bai* オペロンに相同な遺伝子の相対的な存在量の増加が確認された (図 1 G)。しかしながら、サルデーニャの百寿者のメタゲノムでは同様の結果を導き出さなかった (図 9)。

【 0 2 4 8 】

百寿者の胆汁酸分布を調べるために、高感度のターゲット液体クロマトグラフィーータンデム質量分析 (LC-MS/MS) を行った。予備検討において、標的となる 132 の胆汁酸のうち 95 が、百寿者糞便中の微量成分 ($< 0.5 \mu\text{mol/g}$) である事が明らかになった。したがって、定量分析のために残りの 37 種の胆汁酸化合物を選択した (表

7)。

【0249】

【表7】

略称	化合物名	化学式	CAS
CDCA	Chenodeoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	474-25-9
CDCA3S	Chenodeoxycholic acid 3-sulfate	$C_{24}H_{40}O_7S$	na
TCDCa	Tauro-chenodeoxycholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{44}NNaO_6S$	6009-98-9
GCDCA	Glyco-chenodeoxycholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{42}NNaO_5$	16564-43-5
3-Oxo- Δ^4 -CDCA	3-Oxo-4-cholenoic acid	$C_{24}H_{36}O_3$	1452-29-5
3-Oxo- $\Delta^{4,5}$ -CDCA	3-Oxo-4,6-choladienoic acid	$C_{24}H_{34}O_3$	88179-71-9
LCA	Lithocholic acid	$C_{24}H_{40}O_3$	434-13-9
LCA3S	Lithocholic acid 3-sulfate (disodium salt)	$C_{24}H_{38}Na_2O_6S$	64936-81-8
TLCA	Trauro-lithocholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{44}NNaO_5S$	6042-32-6
TLCA3S	Taurolithocholic acid 3-sulfate (disodium salt)	$C_{26}H_{43}NNa_2O_6S_2$	64936-83-0
IsoLCA	Iso-lithocholic acid	$C_{24}H_{40}O_3$	1534-35-6
IsoalloLCA	Iso-allo-lithocholic acid	$C_{24}H_{40}O_3$	2276-93-9
3-OxoLCA	3-Oxo-lithocholic acid	$C_{24}H_{38}O_3$	1553-56-6
7-OxoLCA	7-Oxo-lithocholic acid	$C_{24}H_{38}O_4$	4651-67-6
UDCA	Ursodeoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	128-13-2
UDCA3S	Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	$C_{24}H_{40}O_7S$	na
TUDCA	Tauro-ursodeoxycholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{44}NNaO_6S$	35807-85-3
IsoCDCA	Iso-chenodeoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	566-24-5
IsoDCA	Iso-deoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	570-63-8
3-OxoCDCA	3-Oxo-chenodeoxycholic acid	$C_{24}H_{38}O_4$	4185-00-6
3-OxoDCA	3-Oxo-deoxycholic acid	$C_{24}H_{38}O_4$	4185-01-7
CA	Cholic acid	$C_{24}H_{40}O_5$	81-25-4
CA3S	Cholic acid 3-sulfate	$C_{24}H_{40}O_8S$	na
TCA	Tauro-cholic acid	$C_{26}H_{45}NO_7S$	81-24-3
GCA	Glyco-cholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{42}NNaO_6$	863-57-0
IsoCA	Iso-cholic acid	$C_{24}H_{40}O_5$	3338-16-7
3-OxoCA	3-Oxo-cholic acid	$C_{24}H_{38}O_5$	2304-89-4
7-OxoDCA	7-Oxo-deoxycholic acid	$C_{24}H_{38}O_5$	911-40-0
DCA	Deoxycholic acid (sodium salt)	$C_{24}H_{39}NaO_4$	302-95-4
DCA3S	Deoxycholic acid 3-sulfate	$C_{23}H_{38}O_7S$	na
TDCA	Tauro-deoxycholic acid (sodium salt)	$C_{26}H_{44}NNaO_6S$	1180-95-6
GDCA	Glyco-deoxycholic acid	$C_{26}H_{43}NO_5$	360-65-6
UCA	Ursocholic acid	$C_{24}H_{40}O_5$	2955-27-3
Δ^5 -3 β -OH	3 β -Hydroxy-5-cholenoic acid	$C_{24}H_{38}O_3$	5255-17-4
HCA	Hyochoic acid	$C_{24}H_{40}O_5$	547-75-1
HDCA	Hyodeoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	83-49-8
MDCA	Murideoxycholic acid	$C_{24}H_{40}O_4$	668-49-5

【0250】

その結果、濾過後、重み正規化された便懸濁液中の総胆汁酸量は、百寿者と対照群間で有意差はなかった。しかしながら、百寿者の糞便中胆汁酸において、独特の分布が認められた（図2A～2F、並びに図10A及び10B）。例えば、百寿者は、一次胆汁酸のレベルが低く、それに伴い、CDCA代謝物レベルが高くなった（図2D～2F）。特に、iso-LCA、3-oxo-LCA、isoallo-LCA、allo-LCA及び3-oxoallo-LCAのレベルは、百寿者で有意に上昇していたが、高齢者と若年者の間でこの上昇は見られず、単に老化の副産物ではないことが示唆される（図2A及び2F）。さらに、allo-LCA、3-oxoallo-LCA及びisoallo-LCAの濃度は、糞便pHと正の相関があり（図8D）、百寿者におけるこれらの胆汁酸量の増加は、食事と消化機能の変化、及びその結果としての腸管メタボローム変化を反映している可能性があることが示唆される。このような腸内環境は、特定の細菌種の増殖及び／又はiso-LCA、3-oxo-LCA、及びisoallo-LCAの生成に関与する酵素の発現を促進する可能性がある。あるいは、iso-LCA産生細菌、3-oxo-LCA産生細菌、及びisoallo-LCA産生細菌の腸への定着は、腸内細菌叢の他のメンバー及び

それらの代謝プロセスに因果的に影響を与える可能性がある。

【0251】

(実施例3) *isoLCA*産生細菌株、*3-oxoLCA*産生細菌株、及び*isoalloLCA*産生細菌株の同定

次に、百寿者の細菌叢における*isoLCA*、*3-oxoLCA*、及び*isoalloLCA*の生合成に関与する細菌株と酵素の特定を試みた。

【0252】

以前の報告では、*3-oxo- Δ^4 -DCA* (*3-oxo-4,5-dehydro-DCA*とも称される) から、*C4-C5*二重結合の*C5*のベータ位を水素化 (*hydrogenation*) することで*3-oxoDCA*を生成できることが示されている。この反応は、*C. scindens*及び*C. hylemonae*を含む少数のクロストリジウム種が保有している*BaiCD*遺伝子によってコードされる*3-oxo-5 β -steroid 4-dehydrogenase* (*5 β reductase*、*5BR*とも称される) によって触媒されると報告されている [26, 27]。

【0253】

さらに、*E. lenta*と*R. gnavas*は、それぞれ*3 α -hydroxysteroid dehydrogenase* (*3 α HSDH*)と*3 β HSDH*の作用により、*DCA*から*3-oxoDCA*を生成し、*3-oxoDCA*から*isoDCA*を生成できることが報告されている [18]。

【0254】

そこで、*3-oxoLCA*及び*isoLCA*の生成は、*3-oxoDCA*及び*isoDCA*同様に、*5BR*、*3 α HSDH*及び*3 β HSDH*が関与すると、下記に示すように仮定した。

【0255】

10

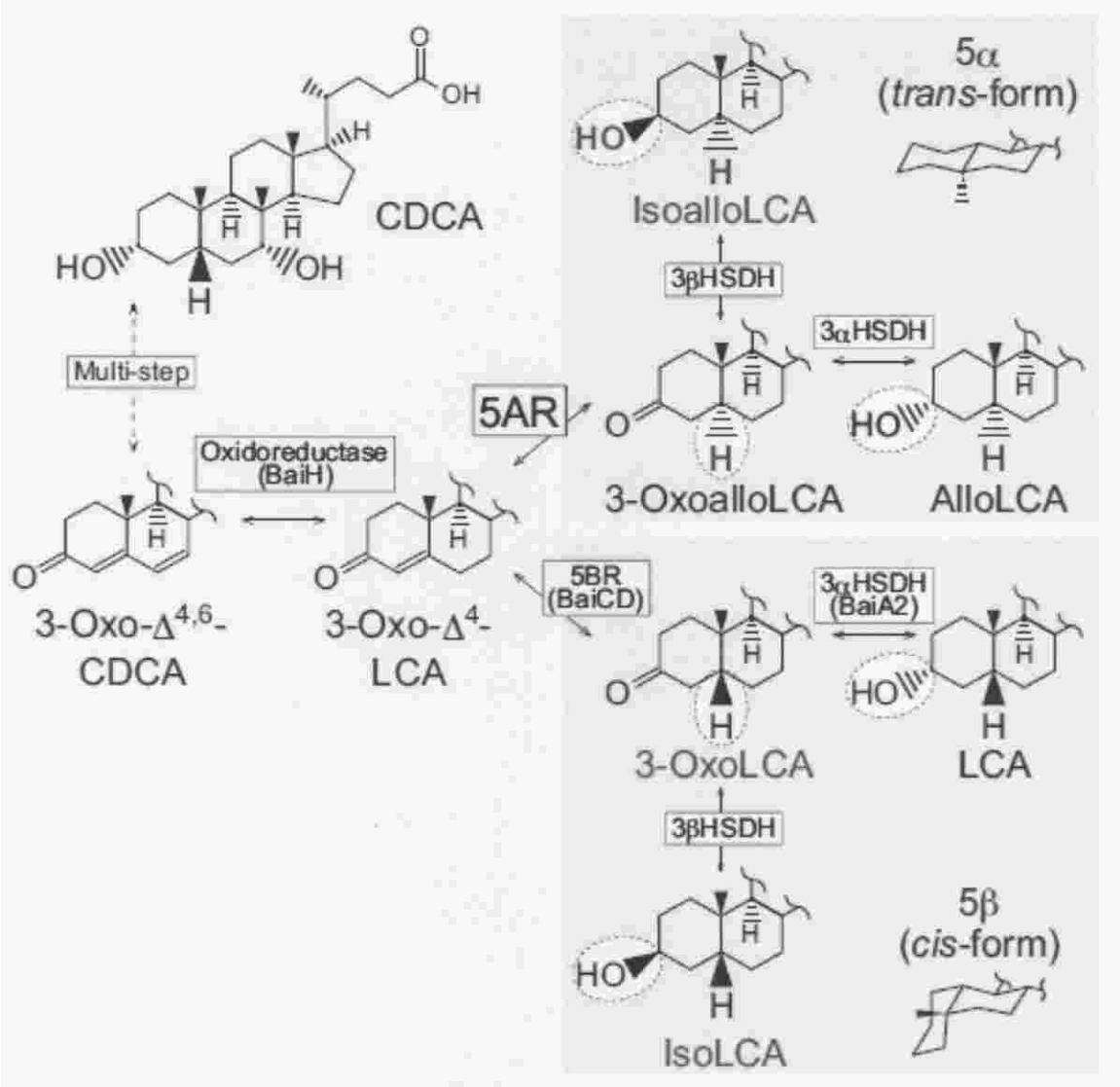
20

30

40

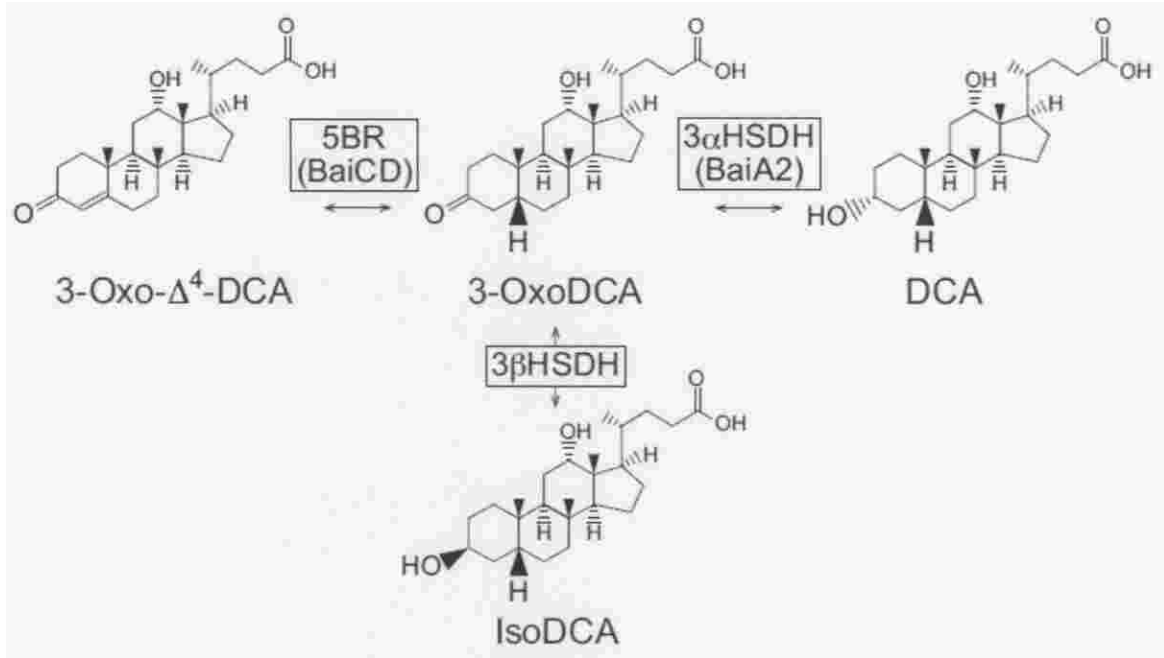
50

【化 2】



【 0 2 5 6 】

【化 3】



10

【 0 2 5 7 】

20

一方、イソアロ胆汁酸の生成につながる生合成経路はこれまで報告されていない。本発明者らは、*isoalloLCA*が3-oxo-*alloLCA*中間体を介した5 α -reductase (5AR) 類似体と3 β HSDHの連続作用によって3-oxo- Δ^4 -LCAから生成される可能性があると予測した。5ARは、C4-C5二重結合を水素化することにより、テストステロンから5 α -dihydrotestosteroneへの変換を仲介し、それによってA及びBステロイド環を平面(トランス)立体配座に歪めることが知られている(〔28〕、下記 参照)。3-oxo-*alloLCA*(トランス胆汁酸)は、類似の経路を介して3-oxo- Δ^4 -LCAから生じる可能性があると考えた。

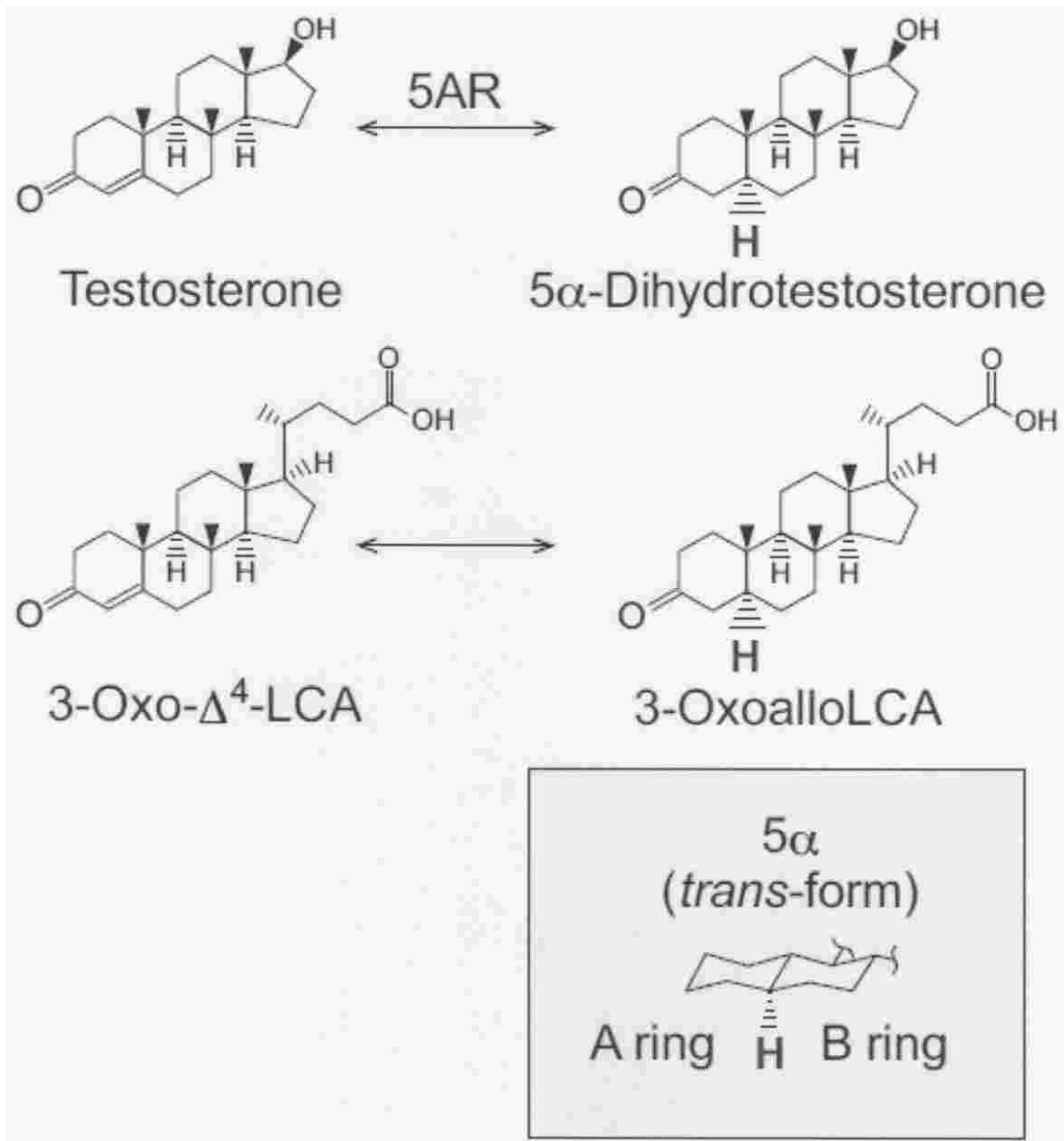
【 0 2 5 8 】

30

40

50

【化 4】



【0259】

また、3-oxoalloLCAからisoalloLCAへのその後の変換には、既に調べられている3-oxoDCAからisoDCAへの変換を担う3βHSDHが関与する可能性があることも予測した[18]。

【0260】

isoLCA、3-oxoLCA、及びisoalloLCAの生合成経路を検証し、加えて、それらの二次胆汁酸を産生する細菌株を特定するために、血液検査で大きな異常を示さず、便中のisoLCA、3-oxoLCA、及びisoalloLCAが高濃度を示した百寿者(CE91、110歳以上)に絞り詳細な調査を行なった(図2A)。

【0261】

具体的にはまず、CE91の便検体を様々な培地で培養し、16SrRNA遺伝子シーケンシングによって細菌コロニーを分析し、CE91の細菌叢構造を大まかに再現した68の特徴的な菌株の集合体を調製した(図3A、及び表8～11)。

【0262】

10

20

30

40

50

【表 8】

Strain number	Strain name	16S rRNA gene sequence similarity			Assignments using 40 universal single copy marker genes		
		accession no.	closest species	Similarity (%)	accession no.	closest species	Similarity (%)
1	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> St1	NR_113076.1	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> DSM 19448	98.305	GCA_003463685.1	<i>Parabacteroides</i> sp. AM58-2XD	99.95
2	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> St2	NR_113076.1	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> DSM 19448	98.305	GCA_003463685.1	<i>Parabacteroides</i> sp. AM58-2XD	99.95
3	<i>Parabacteroides merdae</i> St3	NR_041343.1	<i>Parabacteroides merdae</i> JCM 9497	100	GCA_000154105.1	<i>Parabacteroides merdae</i> ATCC 43184	100
4	<i>Parabacteroides distasonis</i> St4	NR_074376.1	<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	99.327	GCA_000307455.1	<i>Parabacteroides distasonis</i> Cl.03T12C09	100
5	<i>Parabacteroides distasonis</i> St5	NR_074376.1	<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	99.327	GCA_000307455.1	<i>Parabacteroides distasonis</i> Cl.03T12C09	100
6	<i>Bacteroides dorei</i> St6	NR_041351.1	<i>Bacteroides dorei</i> strain 175	99.896	GCA_004347805.1	<i>Bacteroides dorei</i>	100
7	<i>Bacteroides dorei</i> St7	NR_041351.1	<i>Bacteroides dorei</i> strain 175	99.896	GCA_004347805.1	<i>Bacteroides dorei</i>	100
8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> St8	NR_074277.1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> strain VPI-5482	99.729	GCA_900109385.1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	99.97
9	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> St9	NR_074277.1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> strain VPI-5482	99.729	GCA_900109385.1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	99.97
10	<i>Bacteroides uniformis</i> St10	NR_112945.1	<i>Bacteroides uniformis</i> JCM 5828	100	GCA_003603955.1	<i>Bacteroides</i> sp. AF36-11BH	100
11	<i>Bacteroides uniformis</i> St11	NR_112945.1	<i>Bacteroides uniformis</i> JCM 5828	100	GCA_003603955.1	<i>Bacteroides</i> sp. AF36-11BH	100
12	<i>Bacteroides uniformis</i> St12	NR_112945.1	<i>Bacteroides uniformis</i> JCM 5828	99.661	GCA_002161435.1	<i>Bacteroides uniformis</i>	99.98
13	<i>Bacteroides uniformis</i> St13	NR_112945.1	<i>Bacteroides uniformis</i> JCM 5828	99.661	GCA_002161435.1	<i>Bacteroides uniformis</i>	99.98
14	<i>Porphyromonas somerae</i> St14	NR_113090.1	<i>Porphyromonas somerae</i> DSM 23386	99.865	GCA_000372405.1	<i>Porphyromonas somerae</i> DSM 23386	98.8
15	<i>Alistipes finegoldii</i> St15	NR_102944.1	<i>Alistipes finegoldii</i> DSM 17242	99.735	GCA_000265365.1	<i>Alistipes finegoldii</i> DSM 17242	99.59
16	<i>Alistipes finegoldii</i> St16	NR_102944.1	<i>Alistipes finegoldii</i> DSM 17242	99.735	GCA_000265365.1	<i>Alistipes finegoldii</i> DSM 17242	99.59
17	<i>Alistipes onderdonkii</i> St17	NR_113151.1	<i>Alistipes onderdonkii</i> JCM 16771	100	GCA_000374505.1	<i>Alistipes onderdonkii</i> WAL 8169 = DSM 19147	99.92

【 0 2 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 9】

Strain number	Strain name	16S rRNA gene sequence similarity		Assignments using 40 universal single copy marker genes		
		accession no.	closest species	Similarity (%)	accession no.	closest species
18	<i>Alistipes onderdonkii</i> St18	NR_113151.1	<i>Alistipes onderdonkii</i> JCM 16771	100	GCA_000374505.1	<i>Alistipes onderdonkii</i> WAL 8169 = DSM 19147
19	<i>Odoribacter laneus</i> St19	NR_113074.1	<i>Odoribacter laneus</i> YIT 12061	99.73	GCA_000243215.1	<i>Odoribacter laneus</i> YIT 12061
20	<i>Odoribacter laneus</i> St20	NR_113074.1	<i>Odoribacter laneus</i> YIT 12061	99.73	GCA_000243215.1	<i>Odoribacter laneus</i> YIT 12061
21	<i>Odoribacteraceae</i> St21	NR_126194.1	<i>Butyricimonas faechomnis</i> strain 180-3	97.842	GCA_900538505.1	uncultured <i>Butyricimonas</i> sp.
22	<i>Odoribacteraceae</i> St22	NR_126194.1	<i>Butyricimonas faechomnis</i> strain 180-3	97.842	GCA_900538505.1	uncultured <i>Butyricimonas</i> sp.
23	<i>Odoribacteraceae</i> St23	NR_126194.1	<i>Butyricimonas faechomnis</i> strain 180-3	97.842	GCA_900538505.1	uncultured <i>Butyricimonas</i> sp.
24	<i>Odoribacteraceae</i> St24	NR_126194.1	<i>Butyricimonas faechomnis</i> strain 180-3	97.842	GCA_900538505.1	uncultured <i>Butyricimonas</i> sp.
25	<i>Campylobacter ureolyticus</i> St25	NR_118654.1	<i>Campylobacter ureolyticus</i> ATCC 33387	99.036	GCA_002847805.1	<i>Campylobacter ureolyticus</i>
26	<i>Akkermansia muciniphila</i> St26	NR_074436.1	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	99.203	GCA_002885055.1	<i>Akkermansia muciniphila</i>
27	<i>Akkermansia muciniphila</i> St27	NR_074436.1	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	99.203	GCA_002885055.1	<i>Akkermansia muciniphila</i>
28	<i>Pyramidobacter piscicola</i> St28	NR_113185.1	<i>Pyramidobacter piscicola</i> W5455	99.797	GCA_000177335.1	<i>Pyramidobacter piscicola</i> W5455
29	<i>Corynebacterium striatum</i> St29	NR_037041.1	<i>Corynebacterium striatum</i> strain Minnet	99.323	GCA_900447675.1	<i>Corynebacterium striatum</i>
30	<i>Raoultibacter timonensis</i> St30	NR_148574.1	<i>Raoultibacter timonensis</i> strain Marseille-P3277	99.932	GCA_900240215.1	<i>Raoultibacter timonensis</i>
31	<i>Raoultibacter timonensis</i> St31	NR_148574.1	<i>Raoultibacter timonensis</i> strain Marseille-P3277	99.932	GCA_900240215.1	<i>Raoultibacter timonensis</i>
32	<i>Gordonibacter pamelaeae</i> St32	NR_102934.1	<i>Gordonibacter pamelaeae</i> 7-10-1-b	98.999	GCA_000210055.1	<i>Gordonibacter pamelaeae</i> 7-10-1-b
33	<i>Eggerthella lenta</i> St33	NR_074377.1	<i>Eggerthella lenta</i> strain DSM 2243	98.932	GCA_003340405.1	<i>Eggerthella lenta</i>
34	<i>Eggerthella lenta</i> St34	NR_074377.1	<i>Eggerthella lenta</i> strain DSM 2243	100	GCA_003340405.1	<i>Eggerthella lenta</i>

【 0 2 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 10】

Strain number	Strain name	16S rRNA gene sequence similarity		Assignments using 40 universal single copy marker genes	
		accession no.	closest species	accession no.	closest species
35	Eggerthella lenta S155	NR_074377.1	Eggerthella lenta strain DSM 2243	GCA_0033440005.1	Eggerthella lenta
36	Christensenellaceae S136	NR_144743.1	Christensenella timonensis strain Marselle-P2437	GCA_900087015.1	Christensenella timonensis
37	Christensenellaceae S137	NR_144743.1	Christensenella timonensis strain Marselle-P2437	GCA_900087015.1	Christensenella timonensis
38	Desulfovibrionaceae S138	NR_104990.1	Desulfovibrio desulfuricans strain Essex 6	GCA_001553605.1	Desulfovibrio fairfieldensis
39	Desulfovibrionaceae S139	NR_104990.1	Desulfovibrio desulfuricans strain Essex 6	GCA_001553605.1	Desulfovibrio fairfieldensis
40	Ruminococcaceae S140	NR_029356.1	Flavonifractor plautii strain 265	GCA_900549565.1	uncultured Clostridiales bacterium
41	Ruminococcaceae S141	NR_029356.1	Flavonifractor plautii strain 265	GCA_900549565.1	uncultured Clostridiales bacterium
42	Ruminococcaceae S142	NR_147370.1	Pseudoflavonifractor phocaenensis strain Marselle-P3064	GCA_900066895.1	uncultured Flavonifractor sp.
43	Ruminococcaceae S143	NR_029356.1	Flavonifractor plautii strain 265	GCA_900543935.1	uncultured Clostridiales bacterium
44	Ruminococcaceae S144	NR_151900.1	Ruthenibacterium lactatiformans strain 585-1	GCA_900543285.1	uncultured Ruminococcaceae bacterium
45	Ruminococcaceae S145	NR_147398.1	Anaerotruncus rubrantis strain MT15	GCA_900548065.1	uncultured Anaerotruncus sp.
46	Clostridiales S146	NR_044425.1	Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans strain SW512	GCA_900113995.1	Ruminococcaceae bacterium D5
47	Clostridiales S147	NR_044425.1	Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans strain SW512	GCA_900113995.1	Ruminococcaceae bacterium D5
48	Emergencia timonensis S148	NR_144737.1	Emergencia timonensis strain SN18	GCA_003472745.1	Emergencia timonensis
49	Emergencia timonensis S149	NR_113132.1	Clostridioides difficile ATCC 9689	GCA_003472745.1	Emergencia timonensis
50	Clostridioides difficile S150	NR_029164.1	[Clostridium] innocuum strain B_3	GCA_000210395.1	Clostridioides difficile M68
51	Clostridium innocuum S151	NR_026111.1	Phascolarctobacterium faecium ACM 3679	GCA_002221705.2	[Clostridium] innocuum

【 0 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

Strain number	Strain name	16S rRNA gene sequence similarity			Assignments using 40 universal single copy marker genes		
		accession no.	closest species	Similarity (%)	accession no.	closest species	Similarity (%)
52	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> St62	NR_026111.1	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> ACM 3679	98.416	GCA_000980215.1	<i>Carnobacterium</i> sp. N15 MGS-207	99.52
53	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> St63	NR_026111.1	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> ACM 3679	98.35	GCA_000980215.1	<i>Carnobacterium</i> sp. N15 MGS-207	99.52
54	<i>Hungateella hathewayi</i> St64	NR_036928.1	<i>Hungateella hathewayi</i> strain 1313	99.162	GCA_003463705.1	<i>Hungateella hathewayi</i>	99.99
55	<i>Hungateella hathewayi</i> St65	NR_036928.1	<i>Hungateella hathewayi</i> strain 1313	99.162	GCA_003463705.1	<i>Hungateella hathewayi</i>	99.99
56	<i>Lachnospiraceae</i> St66	NR_144731.1	<i>Eisenbergiella massiliensis</i> strain AT11	97.862	GCA_003478085.1	<i>Eisenbergiella</i> sp. OF01-20	99.59
57	<i>Lachnospiraceae</i> St67	NR_144731.1	<i>Eisenbergiella massiliensis</i> strain AT11	97.862	GCA_003478085.1	<i>Eisenbergiella</i> sp. OF01-20	99.58
58	<i>Lachnospiraceae</i> St68	NR_144731.1	<i>Eisenbergiella massiliensis</i> strain AT11	97.592	GCA_001722585.1	<i>Eisenbergiella</i> sp. OF01-20	99.54
59	<i>Clostridium scindens</i> St69	NR_028785.1	<i>Clostridium</i> sp. scindens ATCC 35704	99.935	GCA_000154505.1	<i>Clostridium</i> sp. scindens ATCC 35704	99.99
60	<i>Clostridium scindens</i> St60	NR_028785.1	<i>Clostridium</i> sp. scindens ATCC 35704	99.935	GCA_000154505.1	<i>Clostridium</i> sp. scindens ATCC 35704	99.99
61	<i>Lachnospiraceae</i> St61	NR_144610.1	<i>Exibacter muris</i> strain 40cc-B-5824-ARE	98.108	GCA_003464355.1	<i>Clostridium</i> sp. AF15-17LB	96.92
62	<i>Lachnospiraceae</i> St62	NR_144610.1	<i>Exibacter muris</i> strain 40cc-B-5824-ARE	98.108	GCA_003464355.1	<i>Clostridium</i> sp. AF15-17LB	96.92
63	<i>Clostridium hylemonae</i> St63	NR_024719.1	<i>Clostridium</i> sp. hylemonae strain TN-272	99.448	GCA_000159515.1	<i>Clostridium</i> sp. hylemonae DSM 15053	99.54
64	<i>Faecalicatena contorta</i> St64	NR_104803.1	<i>Faecalicatena contorta</i> DSM 3982	99.539	GCA_003434075.1	<i>Faecalicatena contorta</i>	100
65	<i>Clostridium symbiosum</i> St65	NR_118730.1	<i>Clostridium</i> sp. symbiosum ATCC 14940	98.366	GCA_001406475.1	<i>Clostridium</i> sp. symbiosum	99.97
66	<i>Clostridium symbiosum</i> St66	NR_118730.1	<i>Clostridium</i> sp. symbiosum ATCC 14940	98.366	GCA_001406475.1	<i>Clostridium</i> sp. symbiosum	99.97
67	<i>Methanobrevibacter smithii</i> St67	NR_074235.1	<i>Methanobrevibacter smithii</i> ATCC 35061	99.932	GCA_000824705.1	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	99.82
68	<i>Methanobrevibacter smithii</i> St68	NR_074235.1	<i>Methanobrevibacter smithii</i> ATCC 35061	99.932	GCA_000824705.1	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	99.81

【0 2 6 6】

次に、CDCA、LCA、及び3-oxo- Δ^4 -LCAのいずれかを出発基質として、個々の分離株をpH7又はpH9で培養し、48時間後に培養上清を回収し、LC-MS/MSで胆汁酸を定量した（図3B及び3C、並びに図11A～11F）。

【0 2 6 7】

その結果、CDCAを基質とする培養では、どの培養上清においてもiso-、3-oxo-、又はisoallo-LCAは検出されなかったが、低レベルではあるが、既報[27]にある*C. scindens*株59-60（St59-60）及び*C. hylemonae* St63がLCAを産生することが確認出来た（図11A及び11B）。

【0268】

LCAを基質として培養した場合、*Gordonibacter pamela* St32及び*E. lenta* St33-35は、3-oxoLCA及びisoLCAを生成したことから（図3B、並びに図11C及び11D）、以前の研究[18]で予測されたように、これら菌株は、3 α HSDH及び3 β HSDHを保有すると考えられた。

【0269】

さらに、*Raoulibacter timonensis* St30-31及び*Lachnospiraceae* spp. St57は、LCAを3-oxoLCAに変換することもでき、これらの種が*E. lenta*と同様に3 α HSDHを持っていることが示唆された。

10

【0270】

3-oxo- Δ^4 -LCAを基質として使用した場合、3-oxoLCAは、*Hungatella hathewayi* St54-55及び*Lachnospiraceae* spp. St62の培養上清で高レベルに蓄積したことから、これらの菌株が5BRを持っていることが示唆された（図3C、並びに図11E及び11F）。

【0271】

同様に、isoLCAは、*Clostridium innocuum* St51及び*Lachnospiraceae* spp. St58の培養上清で3-oxo- Δ^4 -LCAから高レベルで生成されたことから（図3C、並びに図11E及び11F）、これらの株が5BR及び3 β HSDHを保有していることが示唆された。

20

【0272】

Parabacteroides distasonis St4-5が、LCAを、3-oxoLCAを経由して3-oxo- Δ^4 -LCAに変換し（図3B、並びに図11C及び11D）、さらに、3-oxo- Δ^4 -LCAからisoLCA及びLCAに変換したこと（図3C、並びに図11E及び11F）は注目に値し、これらの株が3 α HSDH、3 β HSDH及び5BRを保有していることが示唆された。

【0273】

以上のとおり、前記68株において、少なくとも12株が強力な3-oxoLCA生成能を有していることが明らかになった。また、8株は、LCA又は3-oxo- Δ^4 -LCAからisoLCAへの生成能を有していることが明らかになった。

30

【0274】

驚くべきことに、3-oxo- Δ^4 -LCAを基質とした培養で、*Parabacteroides merdae* St3、*Odoribacter laneus* St19、*Odoribacteraceae* spp. St21-24で、isoalloLCAの顕著な蓄積が認められ、加えて、*Bacteroides dorei* St6-7においても低いレベルではあるがisoalloLCAの蓄積が観察され（図3C、並びに図11E及び11F）、これらの菌株が5AR及び3 β HSDH活性の両方を保有していることが示唆される。

【0275】

さらに、*Parabacteroides goldsteinii* St1-2、*Bacteroides thetaiotaomicron* St9、*B. Uniformis* St10-13、*Alistipes finegoldii* St15-16、*A. onderdonkii* St17-18、及び*O. laneus* St20の培養物は全て、推定される中間体である3-oxoalloLCAの十分な蓄積を示したが、その一方で、isoalloLCAの蓄積レベルは非常に低かった（図3C、並びに図11E及び11F）、これらの菌株は、おそらく5ARを保有している一方で、この培養条件では3 β HSDHの活性を有していないか、又は不活性であると考えられる。

40

【0276】

したがって、合計20のバクテロイデス株（St4、5、8、及び14株を除くSt1-24株）は、3-oxo- Δ^4 -LCAを3-oxoalloLCAに変換できること

50

が明らかとなり、そのうちの8株は、*isoalloLCA*を確実に生成できるということが判明した。

【0277】

注目すべきことに、pH7での培養と比較して、百寿者の腸環境を表すpH9での培養は、3-oxo*alloLCA*、*isoalloLCA*、*isoLCA*、及び3-oxo*LCA*の蓄積を増強したことから（図11A～11F）、アルカリ性の環境が、これらの胆汁酸の生成に関与する酵素の活性又は発現を促進する可能性がある。

【0278】

（実施例4） 5AR及び3βHSDHが関与する、3-oxo-Δ⁴-*LCA*から*isoalloLCA*への変換

予測される生合成経路、特に5BRと3α-／3β-HSDHとが、3-oxo-Δ⁴-*LCA*から3-oxo*LCA*と*isoLCA*への変換に関与し、5ARと3βHSDHとが、*isoalloLCA*の生成に関与するという仮説を検証するため、Miseq及びPacBioを統合的に用い、68株全ての遺伝子をシーケンスした。

【0279】

これらのゲノム配列を照会すると、既報[18]通り、*Eggerthella*株が、3αHSDH遺伝子を保有することが明らかになった（図3B及び3C）。*P. distasonis* St4、5株は、3αHSDHと予測される遺伝子を保有していることが明らかになった。この結果は、胆汁酸代謝の*in vitro*の評価結果と整合している。

【0280】

さらに、ヒト5AR（steroid 5 alpha-reductase 1, SRD5A1）と30%以上のアミノ酸配列類似性を有する、オルソロガスな配列が、21種の*Bacteroidetes*株で同定された（図3B～3D（カラー表示下、赤色で示す）、及び図12）。

【0281】

次に、予測された5AR遺伝子座に直接隣接する遺伝子を解析した。その結果、21株全てで、5BRであると予測されるNADH:flavin oxidoreductase配列を含む、胆汁酸代謝機能に関連する遺伝子のクラスターが見つかった（図3B～3D（カラー表示下、青色で示す）、及び図12）。

【0282】

また、3βHSDHであると予測されるshort-chain dehydrogenase（SDR）の配列も特定した。これらのSDR配列は2つのグループで構成されていた。グループIは*P. merdae* St3の3βHSDHと高い配列類似性（>40%）を示した。一方、グループIIは相互に関連していたが、*P. merdae* St3の3βHSDHとは関連していなかった（図3B～3D（カラー表示下、グループIは緑色で示し、グループ2は紫色で示す）、及び図12）。

【0283】

さらに、遺伝子クラスターの近くに胆汁酸トランスポーターをコードしていると思われる配列を見出した（図12）。

【0284】

以上のことから、St8株を除いて、5AR及び3βHSDHと予想される遺伝子の保有は、3-oxo-Δ⁴-*LCA*からの3-oxo*alloLCA*及び／又は*isoalloLCA*産生に明らかに関連していることが判明した（図3C）。

【0285】

関連する生合成経路をさらに解明するために、3-oxo*alloLCA*、3-oxo*LCA*又は*isoLCA*を基質として24種の*Bacteroidales*分離株を培養し、それぞれの胆汁酸変換能力を*in vitro*で調べた（図13A～13D）。

【0286】

その結果、胆汁酸の転換効率は、基質特異性と菌株間とで差がみられたが、胆汁酸転化のパターンは、基本的に予測された経路と一致していた。例えば、*P. merdae* S

10

20

30

40

50

t 3、*P. distasonis* St 4-5、*B. dorei* St 7及び*Odoribacteraceae* St 21は、強力な3 β HSDH活性を示し、3-oxoalloLCAからのisoalloLCA産生と3-oxoLCAからのisoLCA生成を示す一方で（図13B）、*B. dorei* St 6や*B. uniformis* St 10-13等の他のいくつかの株の活性は、推定3 β HSDH遺伝子の有無に関わらず、低かった（図13A及び13B）。

【0287】

5BR活性の強さも菌株間で異なった。*P. distasonis* St 4-5及び*B. dorei* St 7は、3-oxoLCAを3-oxo- Δ^4 -LCAに効率的に変換したが、他の菌株は中程度から弱い活性を示した（図13B）。

【0288】

Porphyromonas somerae St 14は、推定5AR及び3 β HSDH遺伝子を欠いている一方で、3-oxoalloLCAからisoalloLCAを生成することができるため（図13A）、3 β HSDH活性を有する株特異的遺伝子を保有していることが示唆される。

【0289】

異なる遺伝子を持つ分離株が、胆汁酸を協調的に代謝できるかどうかを調べるために、LCAの存在下、*E. lenta* St 34（3 α HSDH、3 β HSDHを持つ）又は*P. distasonis* St 4（3 α HSDH、3 β HSDH、5BRを持つ）と、*P. merdae* St 3又は*Odoribacteraceae* St 21（5BR、5AR、3 β HSDHを持つ）との共培養を行なった。

【0290】

その結果、全ての組み合わせにおいて、isoalloLCAが協調的に生産され、*E. lenta* St 34と*P. merdae* St 3との共培養で最高の収量が認められた（図13D）。

【0291】

以上のことから、酵素活性、基質特異性、及び遺伝子座において、株間に差が認められたものの、上記で特定されたバクテロイデスの遺伝子群は、胆汁酸の協調的産生に寄与する可能性があり、少なくとも、百寿者にみられる独特の糞便中胆汁酸の組成分布に関与している可能性がある。

【0292】

細菌叢を介した胆汁酸代謝における5AR及び3 β HSDHの役割をさらに確認するために、*P. merdae*と*Odoribacteraceae*の変異株を作製した。

【0293】

P. merdae St 3株に関して、接合を介したプラスミド導入とrhamnose-inducible ssBfe1 cassetteを用いたdouble-crossover resolvantsの選択により推定5AR（PM3806）、3 β HSDH（PM3804）、又は5BR（PM3805）をコードする遺伝子を欠く3つの変異体の作製に成功した（[29]、図14A及び14B）。

【0294】

その結果、予想通り、3-oxo- Δ^4 -LCAを基質として培養した場合、*P. merdae* Δ 5ARは、3-oxoalloLCA、isoalloLCAのいずれも生成することができなかった。*P. merdae* Δ 3 β HSDHは、3-oxoalloLCAを生成する一方でisoalloLCAは生成できなかった（図3F）。

【0295】

3-oxoalloLCAを基質とした場合、*P. merdae* Δ 5ARは、その親株（野生株）同様にisoalloLCAを生成したが、*P. merdae* Δ 3 β HSDHはisoalloLCAを生成しなかった（図3F）。

【0296】

さらに、*P. merdae* Δ 3 β HSDHは、3-oxoLCAをisoLCAに変換

10

20

30

40

50

できなかったことから、 3β HSDHがtrans-とcis-両方の胆汁酸を基質として利用できることが確認された。P. merdae $\Delta 5BR$ は、 $3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-LCA}$ 又は 3-oxoalloLCA からisoalloLCAを生成したが、 3-oxoLCA から $3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-LCA}$ に変換することができなかった（図3F）。

【0297】

以上のことから、ヒト腸内細菌叢によるisoalloLCA、 3-oxoLCA 、及びisoLCAの生成に、5AR、 3β HSDH、及び5BRが関与していることが裏付けられた。

【0298】

（実施例5） グラム陽性病原菌に対する、isoalloLCAの殺菌効果

二次胆汁酸は、宿主の代謝及び免疫応答の調節（制御性T細胞の誘導を含む、[25, 30~35]）や腸管における病原菌の増殖の防止[36~39]等、いくつかの生物学的に重要な役割を果たすことが知られている。特に、DCA、LCA、及びisoLCAは、最も緊急対策が必要な抗生物質耐性菌であるClostridioides difficileの増殖の阻害に関与することが知られている[36, 40, 41]。

【0299】

そこで次に、 3-oxoLCA とisoalloLCAが、C. difficileの増殖を阻害する能力を有するかどうかを調べた。具体的には、C. difficile 630を、様々な濃度のisoLCA、 3-oxoLCA 、isoalloLCA、 3-oxoalloLCA 、LCA、DCA、又は対照群存在下で培養し、光学密度測定を用いてin vitroでの増殖を経時的に追跡した。

【0300】

その結果、驚くべきことに、isoalloLCAは、C. difficile 630の増殖を強力に阻害した（図4A及び4B、並びに図13A及び13B）。WCA培地で90%以上の増殖を防ぐために必要な最小発育阻止濃度（MIC90）は $2.0\mu\text{M}$ であり、試験を行った他の胆汁酸の濃度をはるかに下回っていた（図4A及び4B、並びに図13A）。isoalloLCAによる強力な増殖阻害は、毒素産生性C. difficile VPI10463及びバンコマイシン耐性Enterococcus faecium（VRE）でも認められた（図4A及び4B、並びに図13A及び13B）。

【0301】

また、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いた観察によって、isoalloLCAは殺菌性を有し、C. difficile 630及びVREにおける、細胞壁の崩壊、腫れ、及び複数の壁貫通を含む、形態学的変化及び超微細構造の変化をもたらすことが明らかになった（図4C）。なお、これらの損傷のパターンは、 β -ラクタム系抗生物質でしばしば観察される[42]。

【0302】

$3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-LCA}$ を補給した状態での、Odoribacteraceae St21との共培養では、isoalloLCA処理同様に、有意なC. difficile 630及びVREの増殖阻害をもたらした（図4D）。

【0303】

対照的に、C. innocuum St51（isoLCA産生菌）又はP. distasonis St4（isoLCA及びLCA産生菌）と共培養を行った場合、制菌効果は観察されなかった。

【0304】

次に、メチシリン耐性Staphylococcus aureus（MRSA）、Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis（SDSE）、Clostridium perfringens、Streptococcus pyogenes、Streptococcus sanguinis、及びBacillus cereusを含むグラム陽性の病原菌、並びに、Klebsiella pneumoniae、Escherichia coli、Salmonel

10

20

30

40

50

la enterica、*Proteus vulgaris*、及び *Proteus mirabilis* を含むグラム陰性の病原菌に対する *isoalloLCA* の効果を調べた。なお、*S. aureus* は有名な皮膚病原菌であるが、腸にコロニーを形成することが多く、殆どの胆汁酸に耐性があることが知られてる [43]。

【0305】

IsoalloLCA は、*S. aureus* を含む、試験した全てのグラム陽性の病原菌の増殖を強く阻害し、MIC90 値は、WCA 培地で $0.5 \sim 3 \mu\text{M}$ 、BHI 培地で $3 \sim 6.25 \mu\text{M}$ の範囲となった (図 4A 及び 4B、並びに図 15A 及び 15B)。

【0306】

対照的に、グラム陰性病原菌パネルの全ての細菌は、試験した最高濃度 ($50 \mu\text{M}$) でも *isoalloLCA* に対する耐性が認められた (図 4A 及び 4B、並びに図 15A 及び 15C)。

【0307】

以上の結果から、*isoalloLCA* は、特にグラム陽性の病原菌に対して細菌の細胞壁に干渉することで、強力な殺菌／静菌効果を発揮することが示唆される。また、*isoalloLCA* は *S. aureus* を病原菌とするアトピー性皮膚炎等の皮膚疾患への予防、治療効果を発揮することも示唆される。

【0308】

(実施例 6) 片利共生的な腸内細菌叢への *isoalloLCA* の影響

腸内代謝物は、腸内の病原菌だけでなく、共生細菌にも遭遇するため、*isoalloLCA* がヒト腸内細菌叢の一般的な細菌にどのように影響するかを調べた。

【0309】

グラム陽性菌とグラム陰性菌の双方からなる合計 42 の一般的な腸内細菌叢を構成する細菌を培養コレクションから選択し、それぞれを WCA 及び BHI 培地で *isoalloLCA* の濃度を上げながら培養した。

【0310】

その結果、*IsoalloLCA* は、*Bacteroides* 等の殆どのグラム陰性共生菌の成長にそれほど影響を与えなかった (図 4E 及び図 16A)。

【0311】

対照的に、グラム陽性共生菌の成長を確実に妨害した (図 4E 及び図 16A)。ただし、共生菌株の MIC90 値は、一般に病原菌の値よりも高く *C. sporogenes*、*C. indolis*、及び *C. HGF2 (innocuum)* は $2.5 \mu\text{M}$ の *isoalloLCA* (*C. difficile* 1.25 倍の MIC90 値) で培養した場合でも、走査型電子顕微鏡観察において、共生菌の細胞壁構造は維持されていることがはっきりと認められた (図 16B)。特に、*Lactobacillus* 株は、*isoalloLCA* の阻害効果に対して非常に耐性を有していることが明らかになった (図 4E)。

【0312】

さらに、ペプトン及びアミノ酸が豊富な BHI 培地で共生菌株を培養すると、WCA 培地で培養した場合と比較して、*isoalloLCA* に対する耐性が増加したが、病原菌は、培地に関係なく感受性を概して維持していた (図 4A、4E、及び図 17)。

【0313】

以上の結果から、*isoalloLCA* が、グラム陽性菌に対して殺菌効果を発揮する濃度は環境条件に依存するものの、病原菌は、常に共生菌よりも感受性が高いことが示された。

【0314】

さらに、複雑な通常の腸内細菌叢に対する *isoalloLCA* の影響を評価するために、*isoalloLCA*、3-oxoLCA、LCA、又は対照系を使用して、若くて健康な試料提供者からのヒト糞便細菌叢を培養し、16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより菌叢の変化を分析した。

【0315】

10

20

30

40

50

その結果、 α 多様性は大きな影響を受けなかったが、*isoalloLCA*は、門レベルで細菌のコミュニティー構造に明らかな幅広い変化をもたらした（図4F及び4G）。

【0316】

他の胆汁酸化合物と比較して、*isoalloLCA*との培養後、*Clostridium*、*Faecalibacterium*、*Bifidobacterium*や*Streptococcus*等のグラム陽性菌のより顕著な減少と、それに対応する*Bacteroides*や*Alistipes*等のグラム陰性菌の増加が観察された。（図4G）。

これらの結果は、百寿者の腸内細菌叢に見られる*Bacteroides*と*Alistipes*の相対的な存在量の増加と一致しており、*isoalloLCA*が腸内細菌のコミュニティー構造に直接影響を与える可能性があることが示される。

10

【0317】

5AR、5BR、及び3 β HSDHが特徴的な二次胆汁酸誘導体の生産に重要な役割を果たすことが確認できたことから、日本の百寿者のメタゲノム配列データに戻り、これらの遺伝子を持つ他の種を調べた。その結果、5AR、5BR、及び3 β HSDH遺伝子群は、35種の細菌（全て*Bacteroidetes*）で検出された（図18）。そして、これらの細菌種の存在量を、*isoLCA*、3-oxoLCA、及び*isoalloLCA*の存在量に関連付けて評価した。

【0318】

その結果、*isoalloLCA*の場合、多数の*Alistipes* sp.、*Bacteroides cellulosilyticus*、*B. intestinalis*、及び*P. goldsteinii*との有意な正の相関が認められた。さらに、これらの種は、*isoLCA*及び3-oxoLCAのレベルとも正の相関が認められた（図18）。

20

【0319】

対照的に、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides ovatus*については、試験した3つの二次胆汁酸と有意に負の相関が認められた。*O. laneus*は、3-oxoLCA、*isoLCA*、及び*isoalloLCA*と有意又はトレンドレベルの正の相関を示したが、*P. merdae*とこれらの胆汁酸との有意な関連は認められなかった（図18）。

【0320】

これらの結果から、同定された遺伝子の発現と活性が、*in vivo*での種特異的及び腸内環境依存的（おそらく細菌間及び細菌-宿主相互作用を含む）な複雑な機序を介して調節されていることが示唆される。

30

【0321】

上述のとおり、本実施例において、百歳以上の腸内細菌叢のシグネチャを識別し、*isoLCA*、3-oxoLCA、及び*isoalloLCA*の生成を促進する細菌種と遺伝子／経路を同定することに成功した。

【0322】

*isoalloLCA*は、Treg細胞を誘導し、3-oxoLCA及び*isoLCA*はThelper17（TH17）細胞を抑制することが報告されており[30]、これらの胆汁酸の蓄積は、過剰な免疫反応や炎症から保護する可能性がある。

40

【0323】

今回及び以前の研究[1~3]に参加した百寿者は、免疫系の異常な活性化と免疫老化に関連すると考えられている代謝性疾患やがん等の慢性疾患を患っていないことは、前記可能性を裏付けるものである[12]。

【0324】

また、既報の抗炎症特性に加え、*isoalloLCA*はグラム陽性病原菌に対して非常に強力な抗菌効果も発揮することが、本実施例において明らかになった。胆汁酸が腸内病原性細菌感染に対する防御に寄与することが報告されている[36, 44, 45]。しかしながら、*isoalloLCA*は、多剤耐性病原菌を含むグラム陽性菌に対し、高い特異性を示す最も強力な抗菌剤として機能することが明らかになった。

50

【0325】

本実施例から、*isoalloLCA*がグラム陽性病原菌に対する定着阻害を促進することが、寿命に寄与する潜在的な要因となり得ることが示唆される。

【0326】

isoalloLCA、*isoLCA*、又は3-oxoLCAを生成する細菌の増加が長寿の結果、寿命に寄与するかに関係なく、これらの胆汁酸は健康状態を監視し、寿命を予測するバイオマーカーとして使用できる。

【0327】

さらに、本実施例で特定された細菌株のユニークな胆汁酸代謝能力を利用して、胆汁酸プールを論理的に操作し、究極的には、抗生物質耐性*C. difficile*、VRE、MRSA等のグラム陽性病原菌によって引き起こされる感染症を改善することが可能となる。

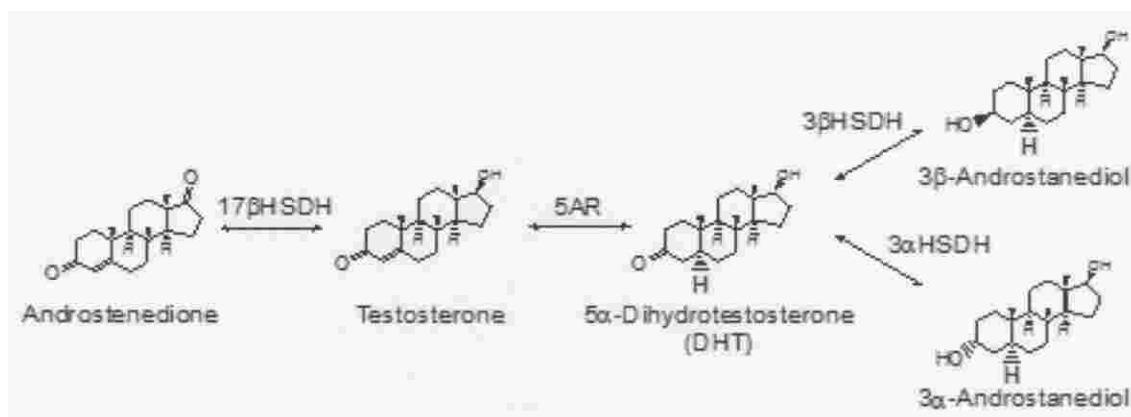
【0328】

(実施例7) 腸内細菌のテストステロン代謝への影響

本発明者らは、上述のとおり、3-oxo- Δ^4 -LCAから3-oxo*alloLCA*への還元に関与する、細菌及びそれらが産生する酵素(5AR)を見出した。また、(実施例3)にて示したとおり、ヒトの5ARは、テストステロン(testosterone)から5 α -dihydrotestosterone(DHT)への酵素的還元を触媒することが知られており、前記3-oxo*alloLCA*への還元に類似している。そこで、本発明者らは、この類似性に着目し、下記に示すとおり、上述の細菌由来の酵素は、テストステロンの代謝にも関与し得るのではないかと予測した。

【0329】

【化5】



【0330】

そこで、上述の細菌由来酵素の、ステロイドホルモン(テストステロン等)代謝能について、上述の*P. merdae* St3、*Odoribacteraceae* St21-24、及びそれらの酵素欠失変異体を用いて検証した。

【0331】

その結果、テストステロンの添加によって、野生型株においては、DHTと3β-androstane diol(*isoalloLCA*に相当)の産生がもたらされた。しかしながら、*P. merdae* Δ 5ARはそれらを産生することができなかった。その代わりに、*P. merdae* Δ 5ARにおいては、アンドロステンジオンの蓄積が検出された(図19A)。

【0332】

また、テストステロン存在下、*Odoribacteraceae* St21-24を*in vitro*で培養すると、テストステロンは直ちにDHTに変換され、その後インキュベーション3~12時間以内に3β-androstane diolに変換されることが明らかになった(図19B)。

【0333】

*P. merdae*と比較して、*Odoribacteraceae* St21-24の強い 3β HSDH酵素活性が、DHTの添加により検出された。*P. merdae*は代謝産物を産生しなかったが、*Odoribacteraceae* St21-2はインキュベーション3時間以内に多量の代謝産物の産生を示した(図19C)。

【0334】

また、試験した全ての株で、DHTから、 3α -androstanediolよりも 3β -androstanediolへの優先的な代謝反応が観察された(図19A~19C)。加えて、テストステロンは、 17β HSDHの機能を有する酵素の存在が推定される。*P. merdae*と*Odoribacteraceae* St21-24によって、アンドロステジオンに酸化された。

10

【0335】

前立腺がんは男性のがんによる死亡原因の第5位であり、2018年には全世界で推定120万例の新たな発症が報告されている[61]。前立腺がんにおける腫瘍の進行は、腺細胞におけるアンドロゲン受容体(AR)シグナル伝達を介する。現在、アンドロゲン遮断療法は、前立腺がん細胞を抑制するために精巣のアンドロゲン濃度を低下させる主要な治療法として用いられているが、患者の大部分は最終的にホルモン不応性腫瘍を発症する[62]。テストステロンとDHTはともにARのリガンドであるが、DHTはより強力なアンドロゲンであり、高い親和性でARに結合する[28]。 3β HSDHにより代謝される 3β -アンドロスタジオールはARに結合せずにエストロゲン受容体 β (ER β)を活性化し、E-カドヘリン発現を低下させることにより前立腺がん細胞移動を阻害することが報告されている[63, 64]。

20

【0336】

腸内細菌叢とステロイドホルモン代謝におけるその役割に関し、上記のとおり、本発明者らは、百歳以上の長寿者から分離した*Odoribacteraceae*株が、テストステロンとDHTを 3β -アンドロスタジオールに迅速に代謝する能力を有していることを証明した。

【0337】

このように、*Odoribacteraceae*株は、おそらく転移抵抗性である 3β -アンドロスタジオールを生成しながら、腫瘍誘発性テストステロン及びDHTを枯渇させることによって、前立腺がんにおける治療的役割を有する可能性がある。

30

【0338】

*Odoribacteraceae*株によるDHTの迅速な変換は、男性ホルモン性脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群、にきび、男性型多毛症等の抗アンドロゲン治療を必要とする様々な疾患の治療の可能性が存在する[65]。

【0339】

さらに、ER β の 3β -アンドロスタジオールの活性化は、卵巣内皮がんに対して増殖阻害作用と化学療法増強作用を有し[66]、乳がん細胞におけるER β の活性化については、一般的に疾患の進行に対して抗増殖作用を有すると考えられている[67]。

【0340】

*Odoribacteraceae*株のホルモン作用の他に、これらの株が産生する 3β -アンドロスタジオールは神経ステロイドとしての治療の可能性も有している[68, 69]。

40

【0341】

結論として、*Odoribacteraceae*株のような特定の腸内細菌叢により生成されるテストステロン由来代謝産物のホルモン及び神経化学的效果が期待でき、それがヒトの健康を改善するための形質転換療法(transformative therapy)につながる可能性がある。

【0342】

[引用文献]

50

1. Tindale, L. C., Salema, D. & Brooks-Wilson, A. R. 10-year follow-up of the Super-Seniors Study: Compression of morbidity and genetic factors. *BMC Geriatr.* 19, 58 (2019).
2. Arai, Y. et al. Inflammation, but not telomere length, predicts successful ageing at extreme old age: A longitudinal study of semi-supercentenarians. *EBioMedicine* 2, 1549~1558 (2015).
3. Andersen, S. L., Sebastiani, P., Dworkis, D. A., Feldman, L. & Perls, T. T. Health span approximates life span among many supercentenarians: Compression of morbidity at the approximate limit of life span. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 67 A, 395~405 (2012).
4. Barcena, C. et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat. Med.* 25, 1234~1242 (2019).
5. Biagi, E. et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr. Biol.* 26, 1480~1485 (2016).
6. Claesson, M. J. et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178~184 (2012).
7. Rampelli, S. et al. Shotgun metagenomics of gut microbiota in humans with up to extreme longevity and the increasing role of xenobiotic degradation. *mSystems* 5, e00124-20 (2020).
8. Wu, L. et al. A cross-sectional study of compositional and functional profiles of gut microbiota in Sardinian centenarians. *mSystems* 4, e00325-19 (2019).
9. Nicoletti, C. Age-associated changes of the intestinal epithelial barrier: Local and systemic implications. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 1467~1469 (2015).
10. Huang, Z. & Kraus, V. B. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 123~129 (2016).
11. Morais, L. H., Schreiber, H. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* (2020).
12. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune~metabolic viewpoint for ag

10

20

30

40

50

- e-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 576~590 (2018).
13. Santoro, A. et al. Microbiomes other than the gut: inflammaging and age-related diseases. *Semin. Immunopathol.* (2020).
14. Claesson, M. J. et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4586~4591 (2011).
15. Hirata, T. et al. Associations of cardiovascular biomarkers and plasma albumin with exceptional survival to the highest ages. *Nat. Commun.* 11, 1~17 (2020).
16. Bloom, D. E. & Cadarette, D. Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. *Front. Immunol.* 10, 549 (2019).
17. Lloyd-Price, J. et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* 569, 655~662 (2019).
18. Devlin, A. S. & Fischbach, M. A. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat. Chem. Biol.* 11, 685~690 (2015).
19. Ridlon, J. M., Kang, D.-J. J. & Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47, 241~259 (2006).
20. Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T. & Benno, Y. Assignment of *Eubacterium* sp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7 α -dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 971~978 (2000).
21. Li, F., Hullar, M. A. J., Schwarz, Y. & Lampe, J. W. Human gut bacterial communities are altered by addition of cruciferous vegetables to a controlled fruit- and vegetable-free diet. *J. Nutr.* 139, 1685~1691 (2009).
22. Duncan, S. H. et al. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1073~1078 (2007).
23. David, L. A. et al. Diet rapidly and re

10

20

30

40

50

producibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559~563 (2014).

24. De Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J. & Edwards, P. A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 17, 657~669 (2013).

25. Wahlstrom, A., Sayin, S. I., Marschall, H.-U. U. & Backhed, F. Intestinal cross talk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 24, 41~50 (2016).

26. Funabashi, M. et al. A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome. *Nature* 582, 566~570 (2020).

27. Ridlon, J. M., Kang, D. J. & Hylemon, P. B. Isolation and characterization of a bile acid inducible 7 α -dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271. *Anaerobe* (2010).

28. Nixon, M., Upreti, R. & Andrew, R. 5 α -Reduced glucocorticoids: A story of natural selection. *J. Endocrinol.* 212, 111~127 (2012).

29. Garcia-Bayona, L. & Comstock, L. E. Streamlined genetic manipulation of diverse bacteroides and parabacteroides isolates from the human gut microbiota. *MBio* 10, e01762-19 (2019).

30. Hang, S. et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature* 576, 143~148 (2019).

31. Campbell, C. et al. Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells. *Nature* 581, 475~479 (2020).

32. Song, X. et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ + regulatory T cell homeostasis. *Nature* 577, 410~415 (2020).

33. Brestoff, J. R. & Artis, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* 14, 676~684 (2013).

34. Skelly, A. N., Sato, Y., Kearney, S. & Honda, K. Mining the microbiota for microbial and metabolite-based immunotherapies. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 305~323 (2019).

35. Chen, M. L., Takeda, K. & Sundrud, M. S. Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. *Mucosal Immunol.* 12, 851~861 (2019).

10

20

30

40

50

36. Buffie, C. G. et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205~208 (2015).
37. Begley, M., Gahan, C. G. M. & Hill, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625~651 (2005).
38. Sung, J. Y., Shaffer, E. A. & Costerton, J. W. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens – Effects of hydrophobicity of the molecule and in the presence of phospholipids. *Dig. Dis. Sci.* 38, 2104~2112 (1993).
39. Urdaneta, V. & Casadesus, J. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Front. Med.* 4, 163 (2017).
40. Thanissery, R., Winston, J. A. & Theriot, C. M. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. *Anaerobe* 45, 86~100 (2017).
41. Abt, M. C., McKenney, P. T. & Pamer, E. G. *Clostridium difficile* colitis: Pathogenesis and host defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 609~620 (2016).
42. Cushnie, T. P. T., O'Driscoll, N. H. & Lamb, A. J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4471~4492 (2016).
43. Piewngam, P. et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature* 562, 532~537 (2018).
44. Theriot, C. M. et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat. Commun.* 5, 3114 (2014).
45. Alavi, S. et al. Interpersonal Gut Microbiome Variation Drives Susceptibility and Resistance to Cholera Infection. *Cell* 181, 1533–1546.e13 (2020).
46. Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T. W. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674~1676 (2015).
47. Hyatt, D. et al. Prodigal: Prokaryotic

10

20

30

40

50

gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119 (2010).

48. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, 3150~3152 (2012).

49. Qin, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59~65 (2010).

50. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754~1760 (2009).

51. Onate, F. P. et al. MSPminer: Abundance-based reconstitution of microbial pan-genomes from shotgun metagenomic data. *Bioinformatics* 35, 1544~1552 (2019).

52. Li, J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 32, 834~841 (2014).

53. Segata, N., Bornigen, D., Morgan, X. C. & Huttenhower, C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat. Commun.* 4, 2304 (2013).

54. Khelaifia, S., Raoult, D. & Drancourt, M. A versatile medium for cultivating methanogenic archaea. *PLoS One* 8, e61563 (2013).

55. Aziz, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75 (2008).

56. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068~2069 (2014).

57. Ferrieres, L. et al. Silent mischief: Bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *J. Bacteriol.* 192, 6418~6427 (2010).

58. Atarashi, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232~236 (2013).

59. Quinn, R. A. et al. Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations. *Nature* 579, 123~129 (2020).

60. McDonald, J. A. K. et al. Evaluation of

10

20

30

40

50

microbial community reproducibility, stability and composition in a human distal gut chemostat model. *J. Microbiol. Methods* 95, 167~174 (2013).

61. Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2018). doi:10.3322/caac.21492

62. Karantanos, T., Corn, P. G. & Thompson, T. C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* (2013).

63. Guerini, V. et al. The androgen derivative 5α -androstane- 3β , 17β -diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor β subtype. *Cancer Res.* (2005).

64. Dondi, D. et al. Estrogen receptor β and the progression of prostate cancer: Role of 5α -androstane- 3β , 17β -diol. *Endocr. Relat. Cancer* (2010).

65. Karrer-Voegeli, S. et al. Androgen dependence of hirsutism, acne, and alopecia in women retrospective analysis of 228 patients investigated for hyperandrogenism. *Medicine (Baltimore)*. (2009).

66. Pinton, G., Nilsson, S. & Moro, L. Targeting estrogen receptor beta ($ER\beta$) for treatment of ovarian cancer: Importance of KDM6B and SIRT1 for $ER\beta$ expression and functionality. *Oncogenesis* (2018).

67. Zhou, Y. & Liu, X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomarker Research* (2020).

68. Reddy, D. S. & Jian, K. The testosterone-derived neurosteroid androstanediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2010).

69. Huang, Q., Zhu, H., Fischer, D. F. & Zhou, J. N. An estrogenic effect of 5α -androstane- 3β , 17β -diol on the behavioral response to stress and on CRH regulation. *Neuropharmacology* (2008).

【産業上の利用可能性】

【0343】

以上説明したように、本発明によれば、グラム陽性細菌の感染や前立腺がん等のリスクを低減させることが可能となる。したがって、本発明は、これら疾患の医薬品の開発等において有用である。

10

20

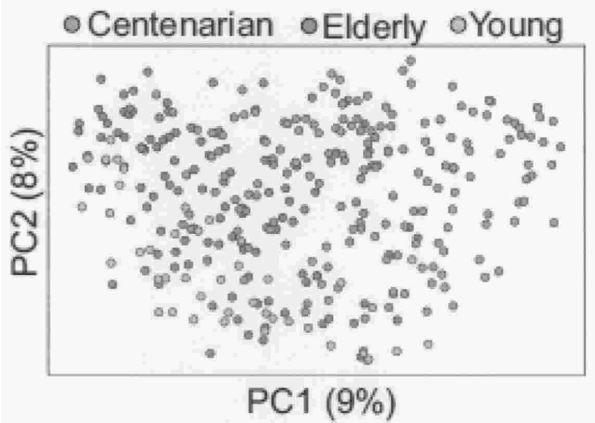
30

40

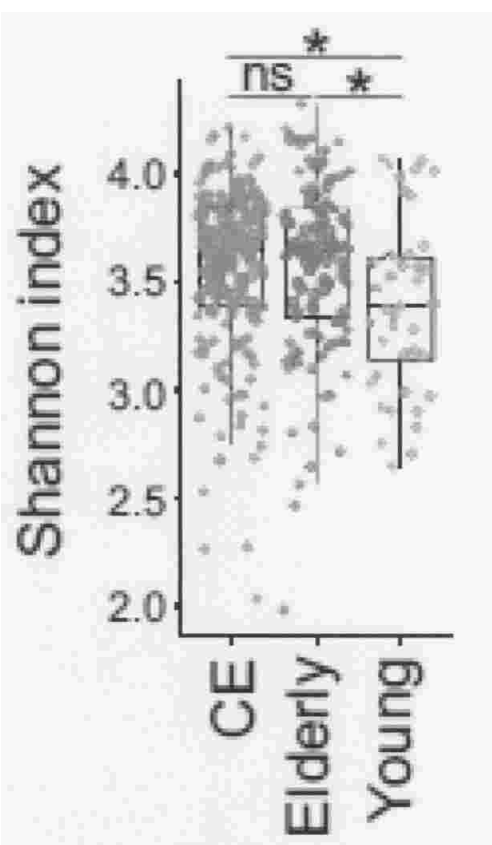
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

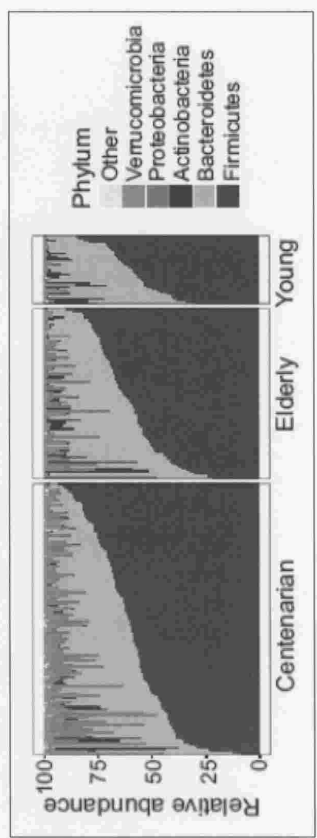
20

30

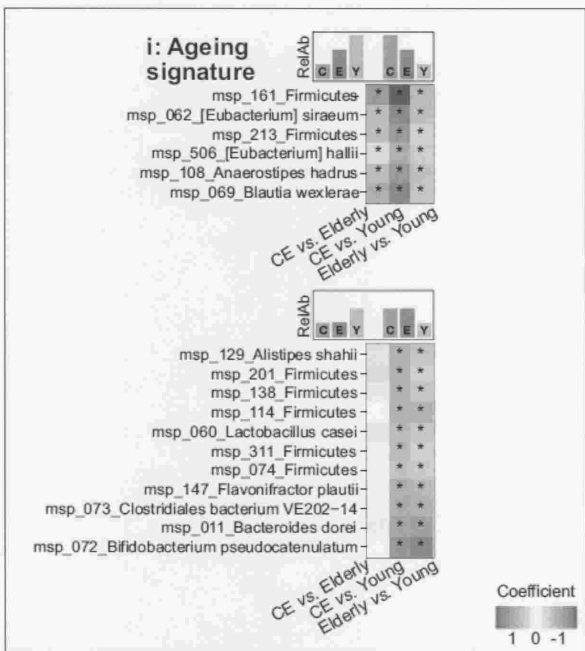
40

50

【図 1 C】



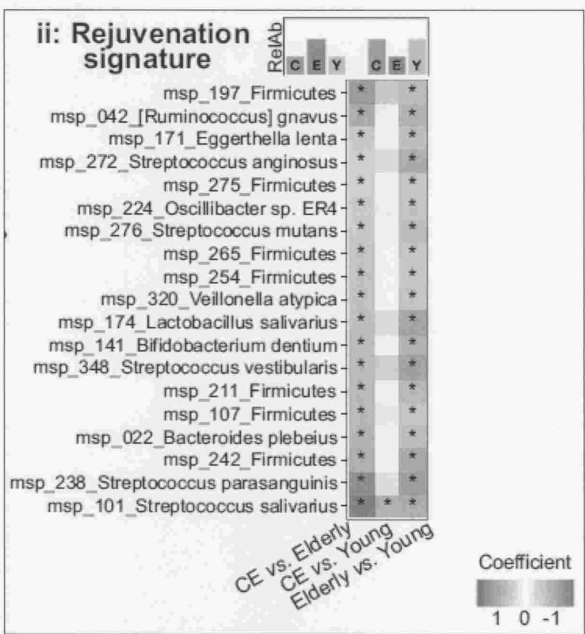
【図 1 D】



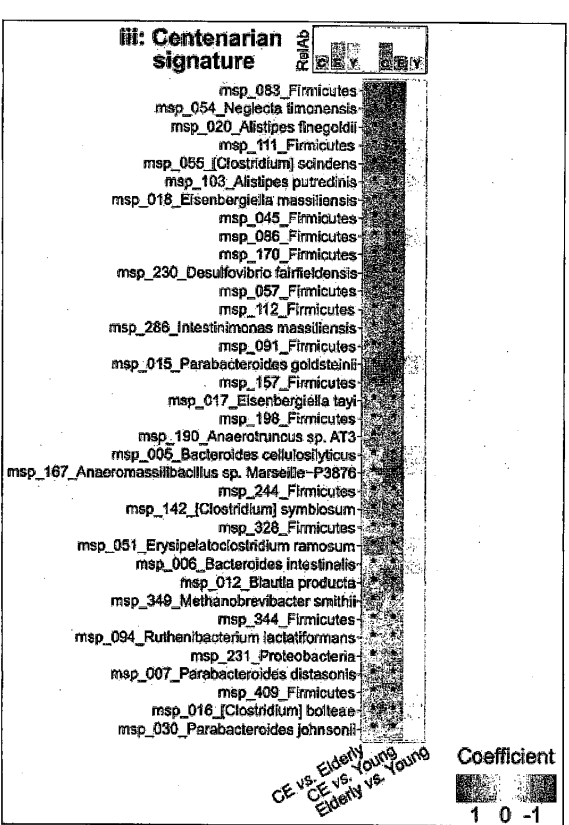
10

20

【図 1 E】



【図 1 F - 1】

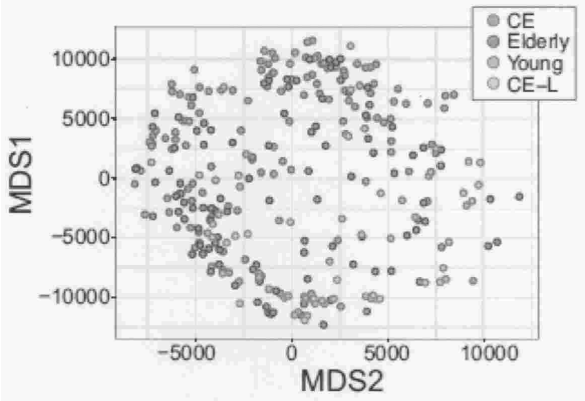


30

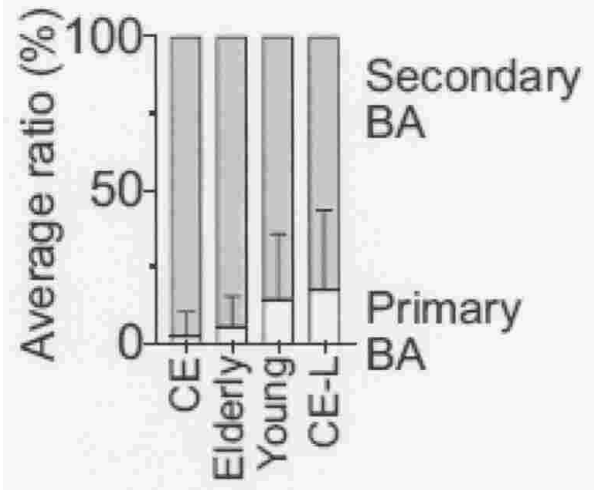
40

50

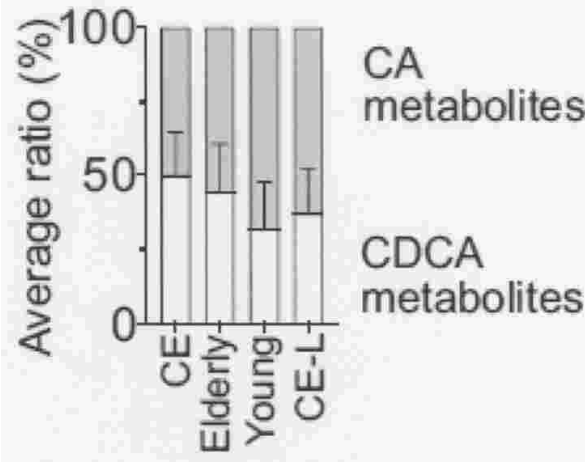
【図 2 C】



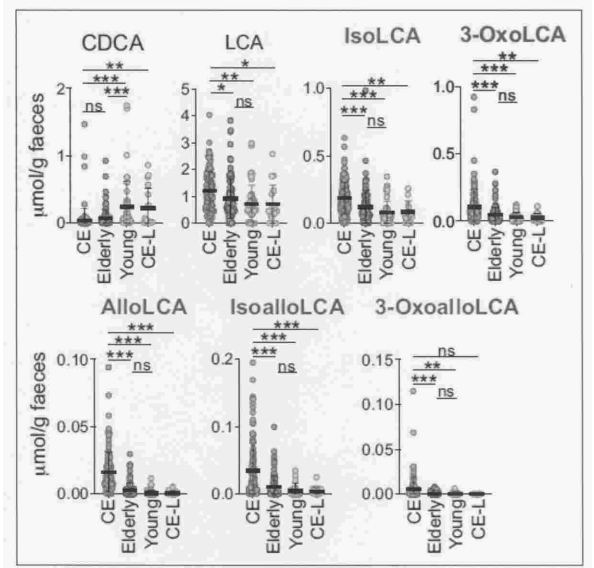
【図 2 D】



【図 2 E】



【図 2 F】



10

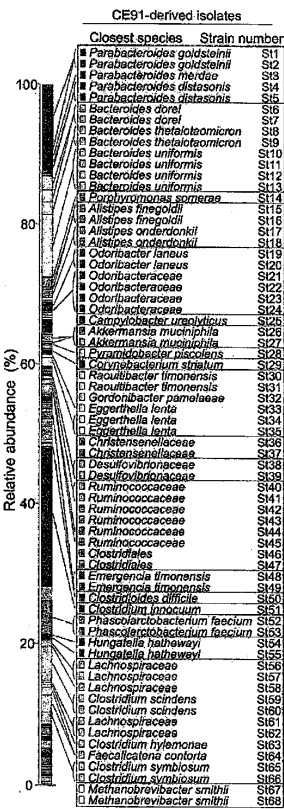
20

30

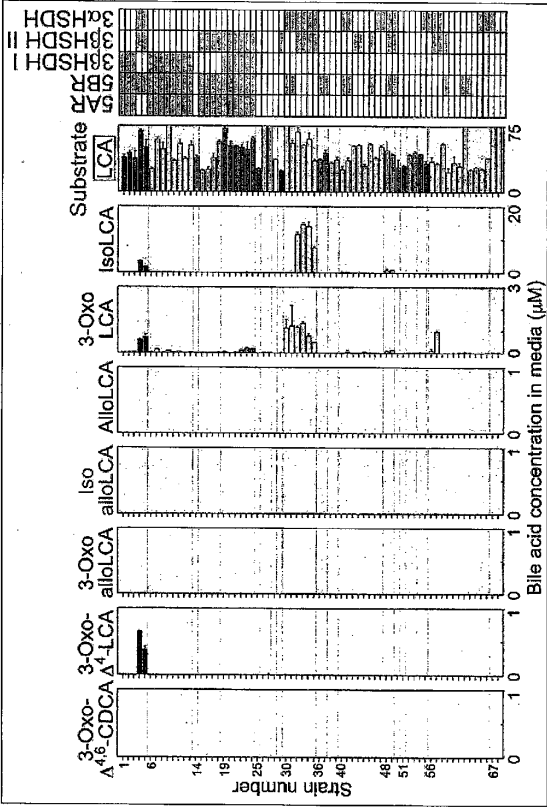
40

50

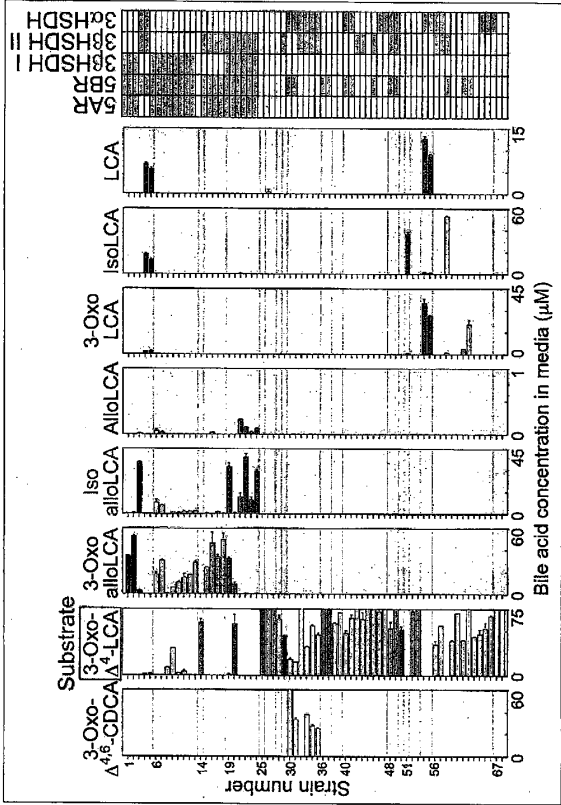
【図 3 A】



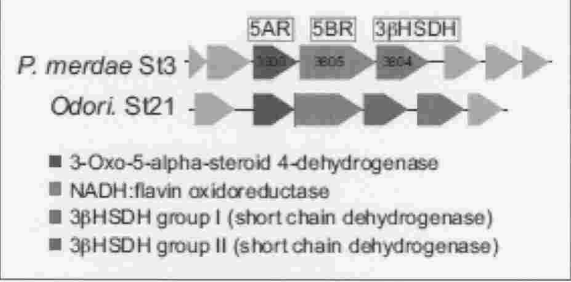
【図 3 B】



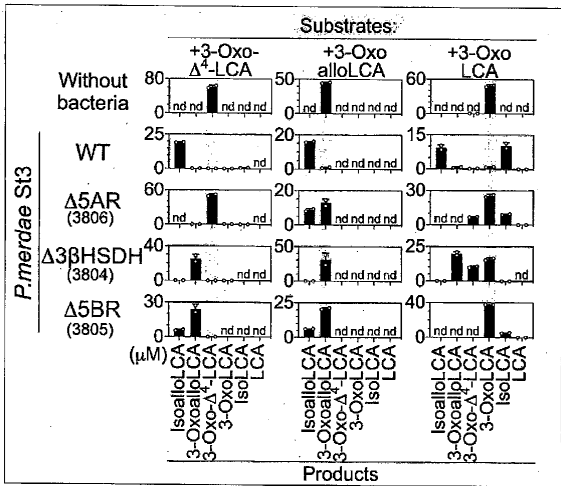
【図 3 C】



【図 3 D】



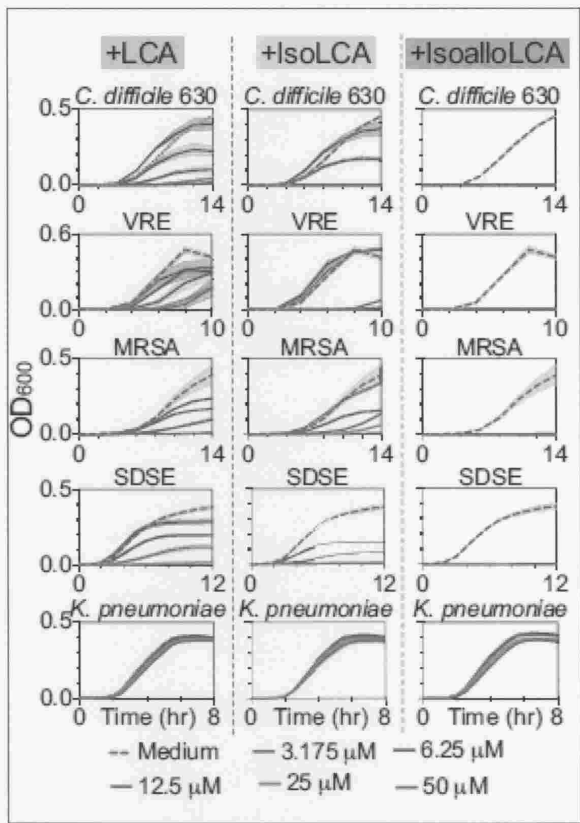
【図 3 E】



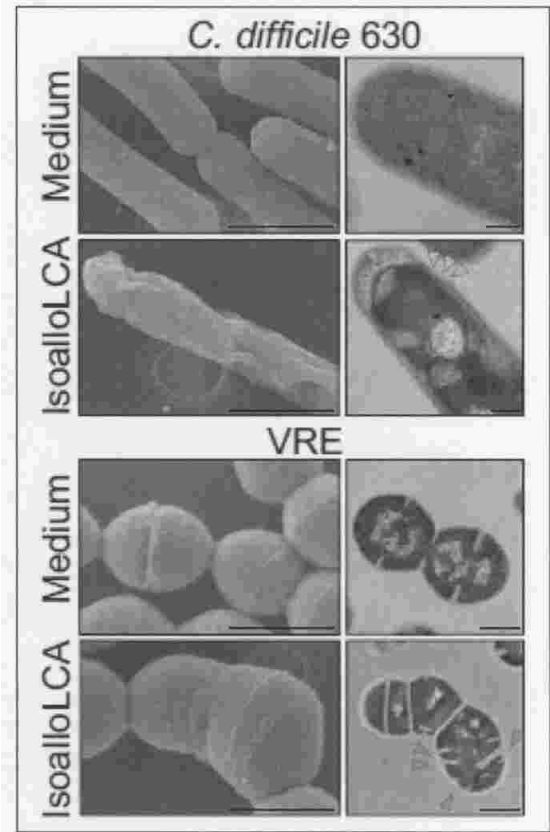
【図 4 A】

	Minimal inhibitory concentration, MIC90 (μM)							
	WCA medium							BHI
	DCA	Allo LCA	3-Oxo alloLCA	3-Oxo LCA	LCA	Iso LCA	Isoallo LCA	Isoallo LCA
<i>Clostridioides difficile</i> 630	>50	>50	>50	50	50	12.5	2.0	4.0
<i>Clostridioides difficile</i> VPI10463	>50	>50	>50	50	50	12.5	2.0	3.0
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	>50	50	>50	50	>50	12.5	3.0	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	>50	>50	>50	50	25	>50	3.0	4.0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (SDSE)	>50	>50	>50	50	25	12.5	2.0	4.0
<i>Clostridium perfringens</i>	>50	>50	25	50	50	6.25	2.0	3.0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25	>50	25	25	>50	12.5	0.5	5.0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	>50	>50	>50	50	25	12.5	2.0	3.0
<i>Bacillus cereus</i>	>50	>50	12.5	25	25	12.5	2.0	3.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Escherichia coli</i> LF82	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Proteus vulgaris</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Proteus mirabilis</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

【図 4 B】



【図 4 C】



10

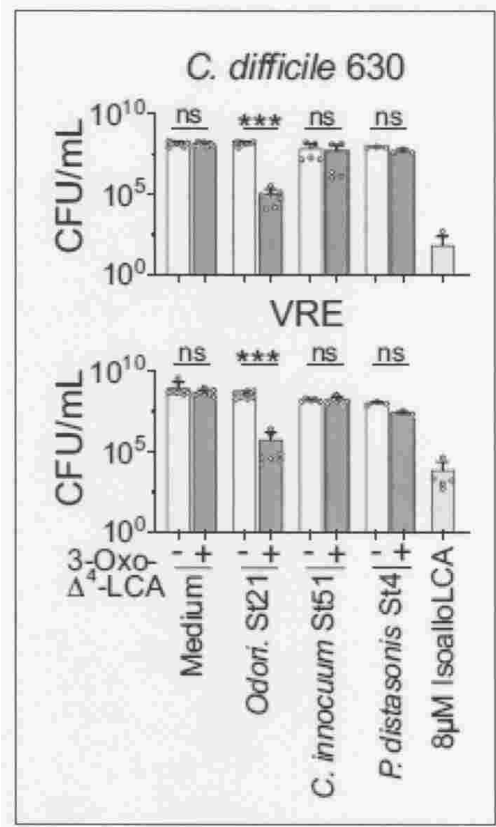
20

30

40

50

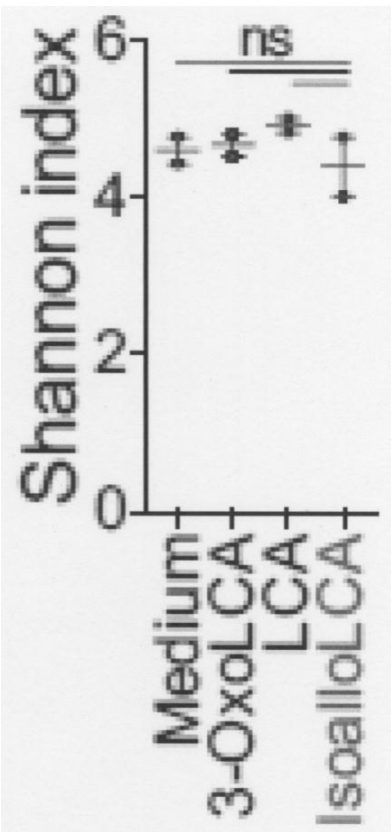
【図 4 D】



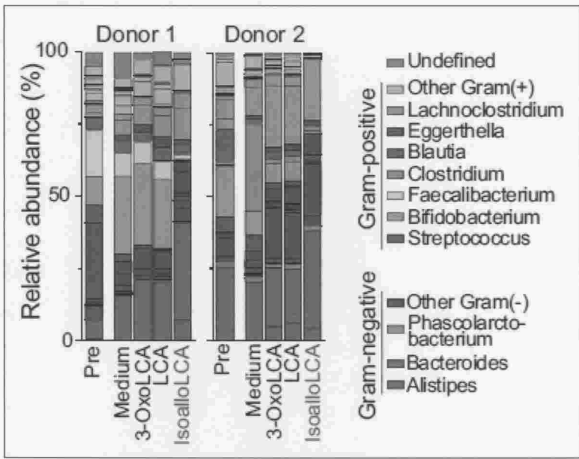
【図 4 E】

Minimal inhibitory concentration, MIC90 (μM)		
Strains tested		
	WCA	BHI
<i>Clostridium symbiosum</i> (VE202-16)	5.0	>50
<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704 ^T	5.0	>50
<i>Clostridium indolis</i> JCM 1380 ^T	4.0	>50
<i>Clostridium HGF2 (innocuum)</i> HM287	3.0	12.5
<i>Clostridium hylemonae</i> JCM 10539 ^T	3.0	6.25
<i>Clostridium ramosum</i> (VE202-18)	3.0	12.5
<i>Clostridium hiranonis</i> JCM 10541 ^T	3.0	5.0
<i>Clostridium nexile</i> JCM 31500 ^T	3.0	6.25
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 15579	3.0	6.25
<i>Clostridium bolteae</i> (VE202-7)	>50	>50
<i>Clostridium butyricum</i> JCM 1391 ^T	>50	>50
<i>Hungateella hathewayi</i> (CE91)	3.0	25
<i>Dorea longicatena</i> JCM 11232 ^T	6.25	12.5
<i>Dorea formicigenerans</i> ATCC 27755 ^T	4.0	25
<i>Eubacterium rectale</i> (Honda Lab)	4.0	>50
<i>Eubacterium halii</i> JCM 31263	3.0	3.0
<i>Streptococcus thermophilus</i> JCM 17834 ^T	3.0	6.25
<i>Flavinofactor plautii</i> (VE202-3)	3.0	12.5
<i>Ruminococcus gnavus</i> JCM 6515 ^T	2.0	6.25
<i>Ruminococcus lactaris</i> ATCC 29176 ^T	2.0	6.25
<i>Anaerotruncus colihominis</i> JCM 15631 ^T	3.0	12.5
<i>Blautia producta</i> JCM 1471 ^T	3.0	6.25
<i>Blautia obeum</i> JCM 31340	2.0	6.25
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1254	4.0	>50
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192 ^T	5.0	>50
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217 ^T	12.5	>50
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134 ^T	12.5	>50
<i>Lactobacillus paragasseri</i> JCM 1130	12.5	>50
<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112 ^T	12.5	>50
<i>Collinsella aerofaciens</i> JCM 10188 ^T	5.0	>50
<i>Roseburia intestinalis</i> JCM 17583 ^T	3.0	50
<i>Eggerthella lenta</i> JCM 9979 ^T	3.0	6.25
<i>Alistipes putredinis</i> (Honda Lab)	>50	>50
<i>Bacteroides caccae</i> JCM 9498 ^T	>50	>50
<i>Bacteroides finegoldii</i> JCM 13345 ^T	>50	>50
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 ^T	>50	>50
<i>Bacteroides intestinalis</i> JCM 13265 ^T	>50	>50
<i>Bacteroides ovatus</i> JCM 5824 ^T	>50	>50
<i>Bacteroides stercoris</i> JCM 9496 ^T	>50	>50
<i>Parabacteroides johnsonii</i> JCM 13406 ^T	>50	>50
<i>Prevotella copri</i> JCM 13464 ^T	>50	>50

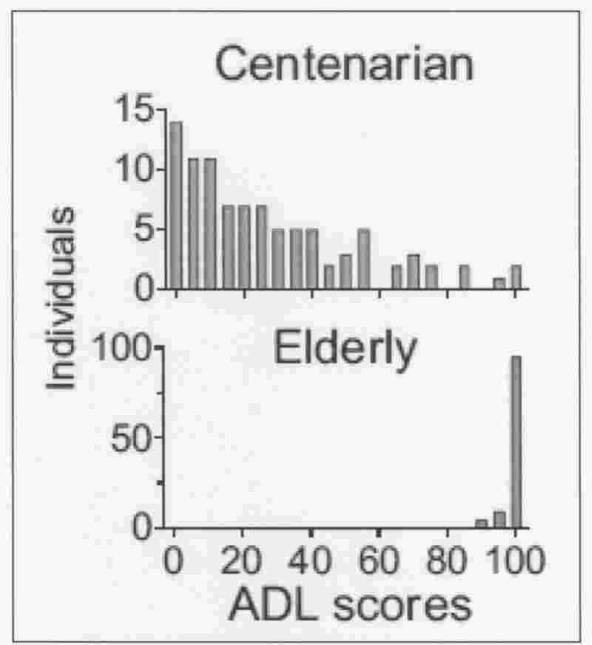
【図 4 F】



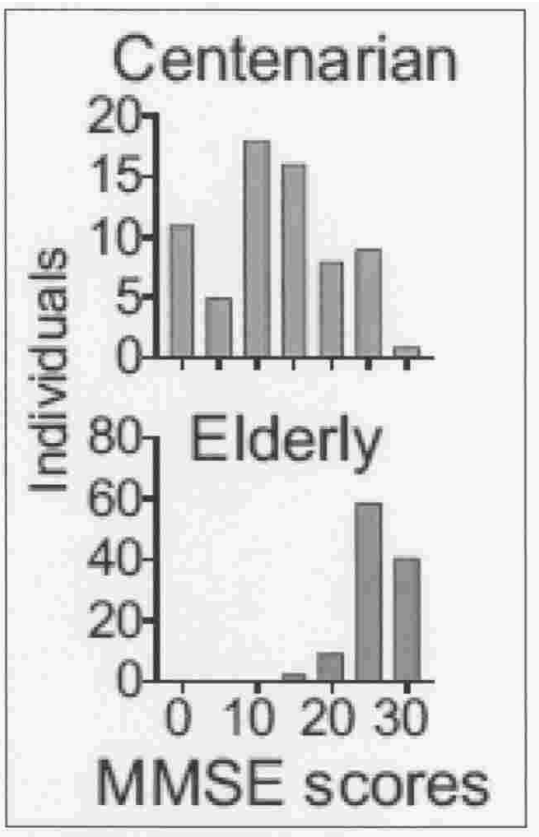
【図 4 G】



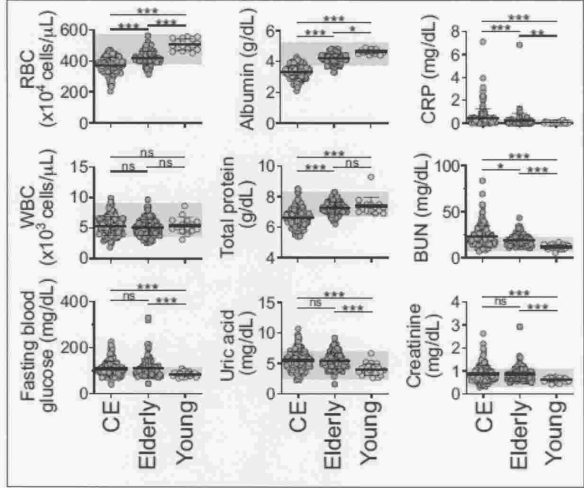
【図 5 A】



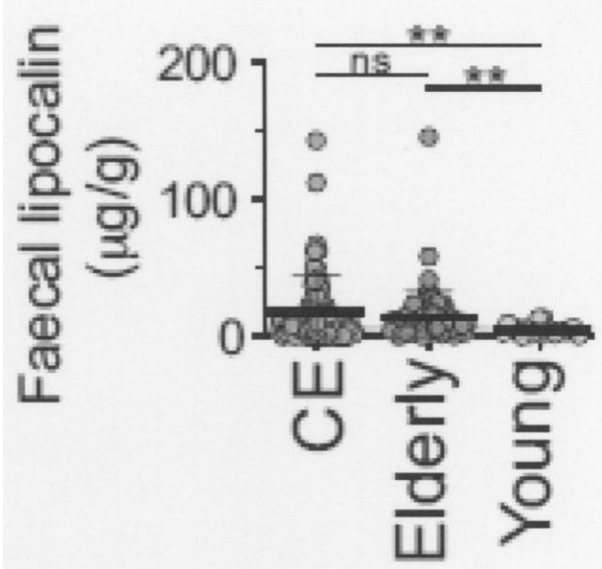
【図 5 B】



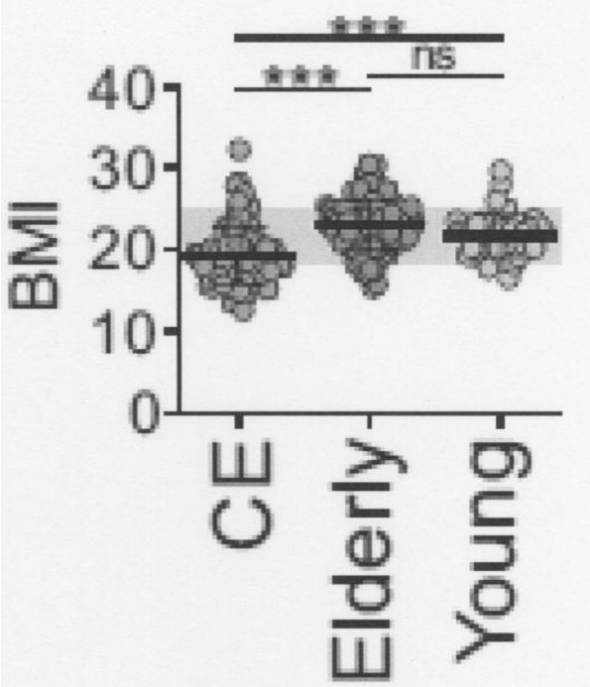
【図 5 C】



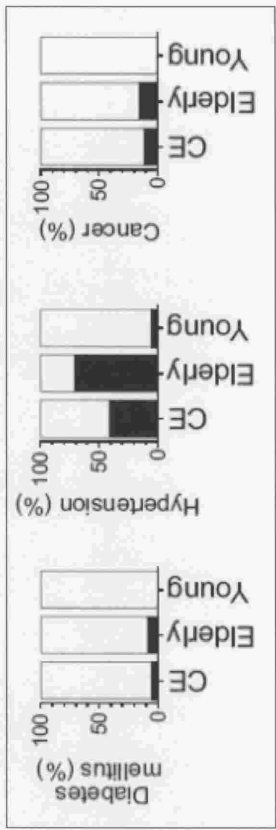
【図 5 D】



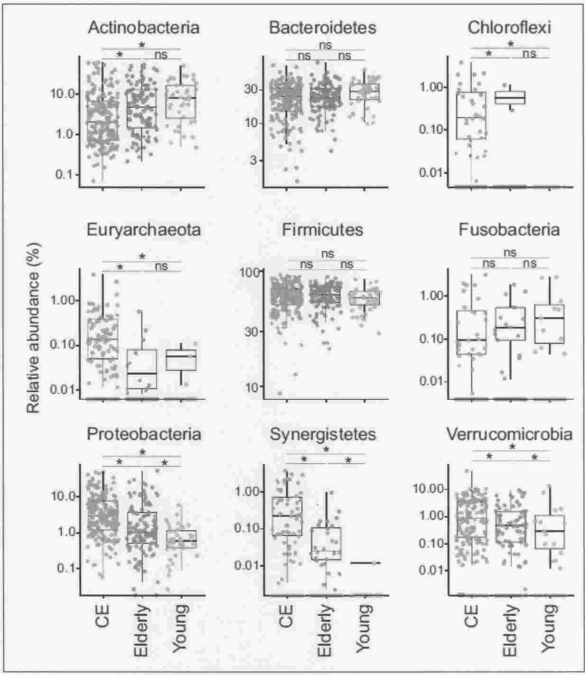
【図 5 E】



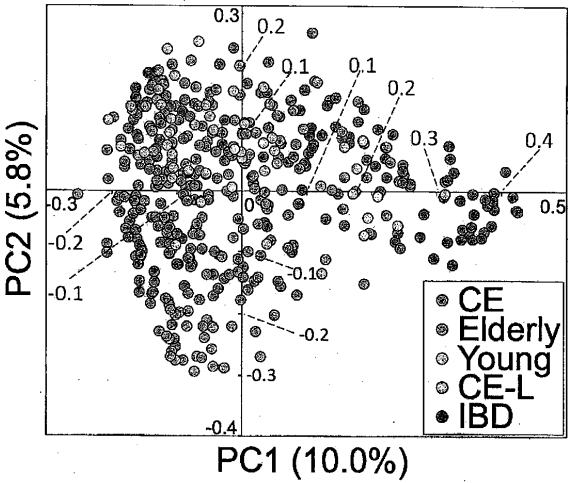
【図 5 F】



【図 6】



【図 7 A】



10

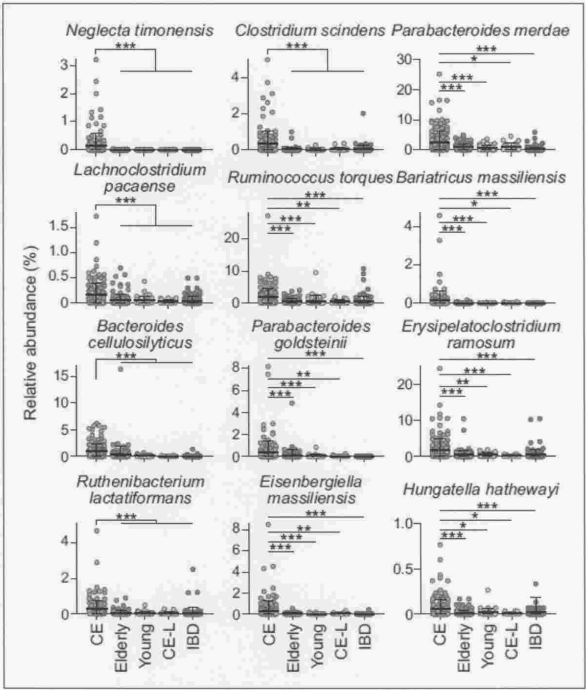
20

30

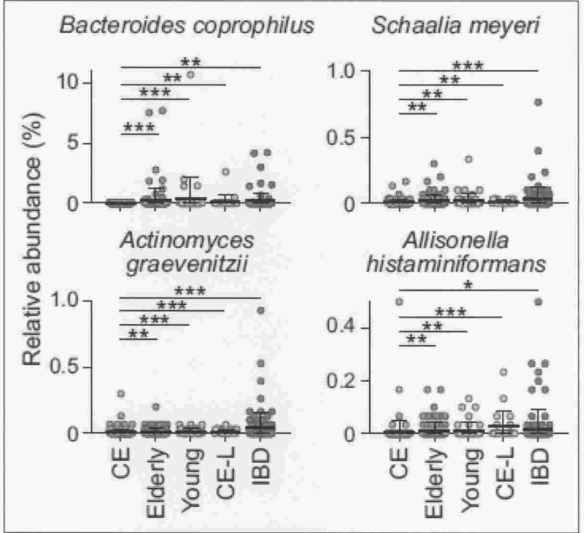
40

50

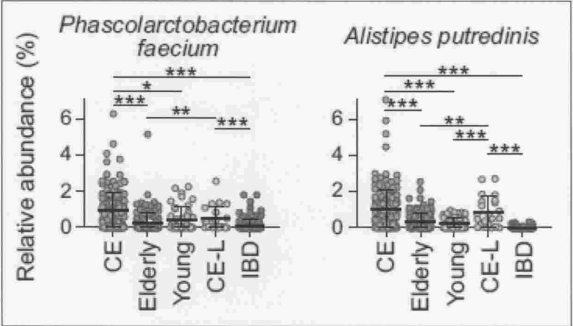
【図 7 B】



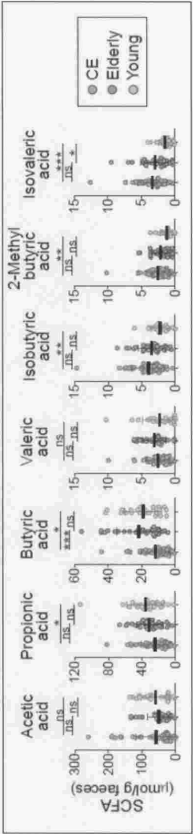
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 8 A】



10

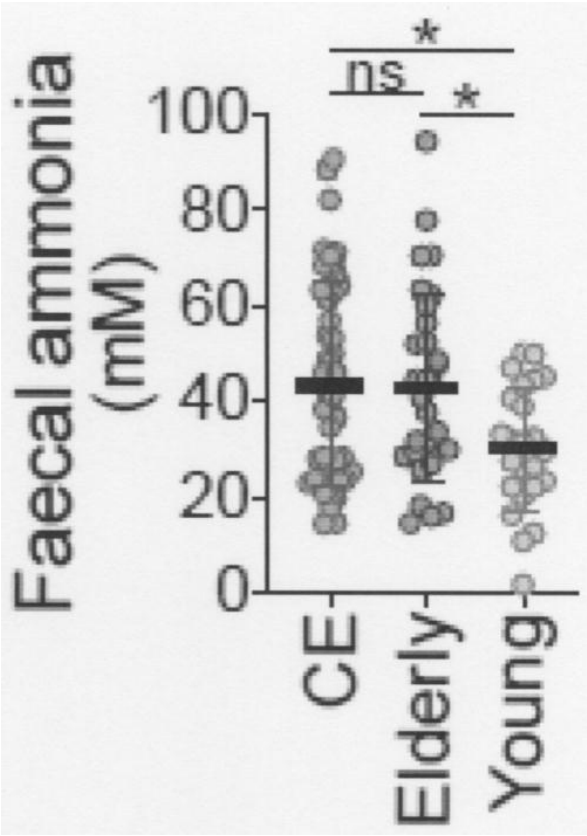
20

30

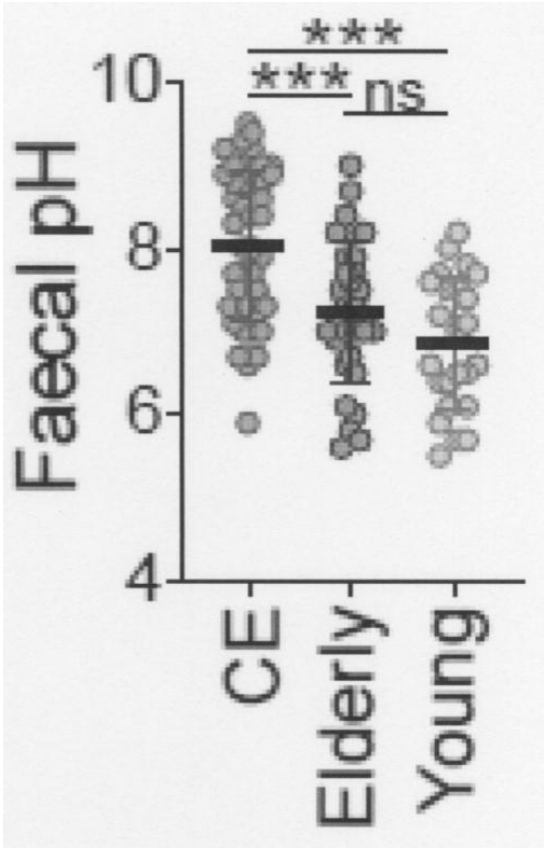
40

50

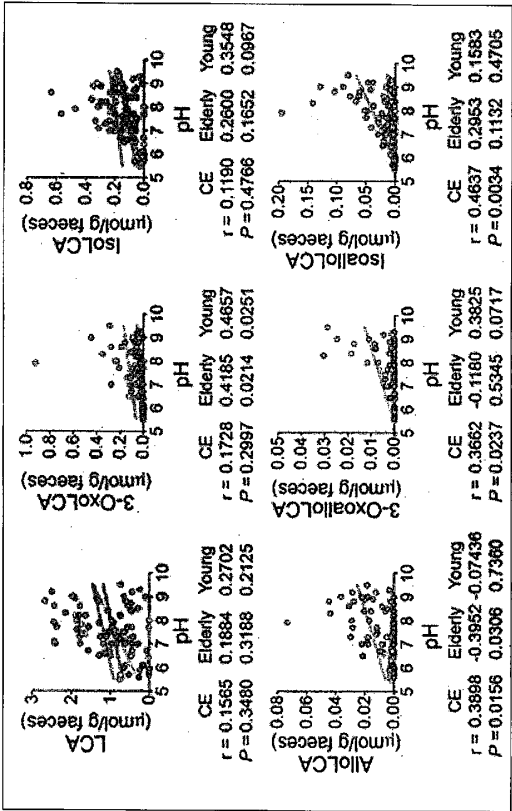
【図 8 B】



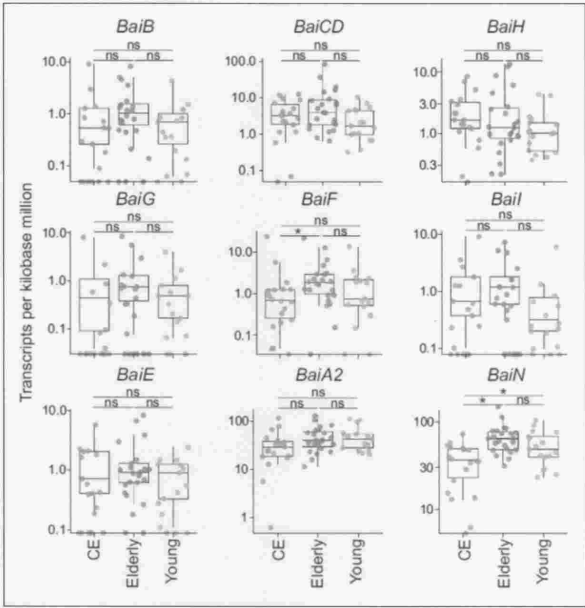
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9】



10

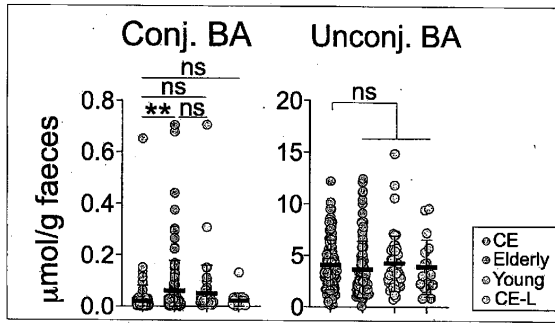
20

30

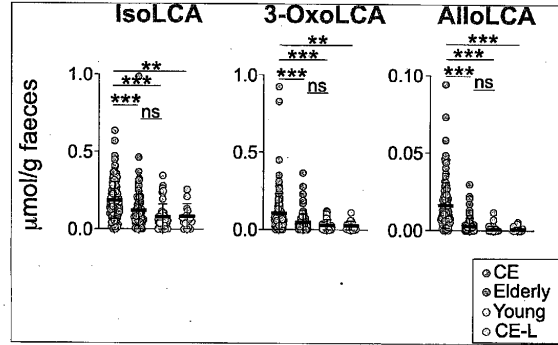
40

50

【図 10 A - 1】

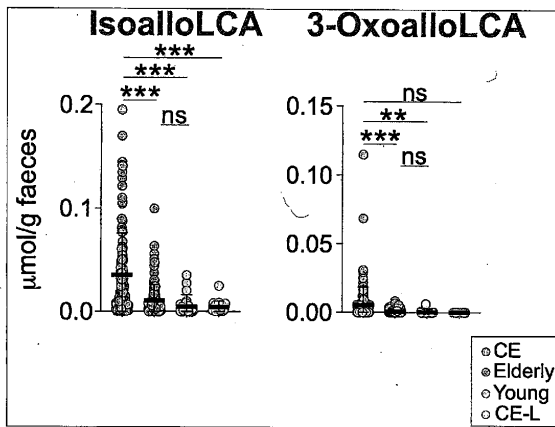


【図 10 A - 2】

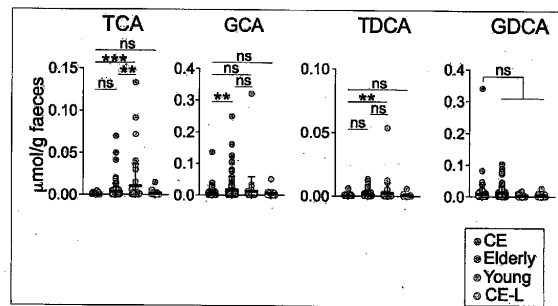


10

【図 10 A - 3】

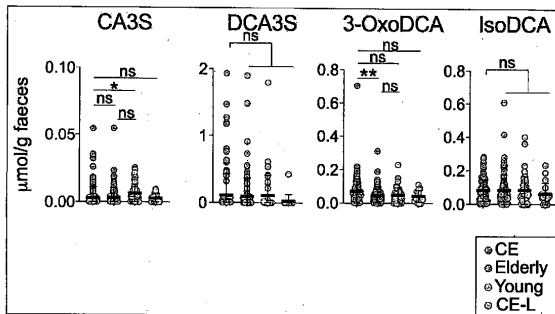


【図 10 A - 4】

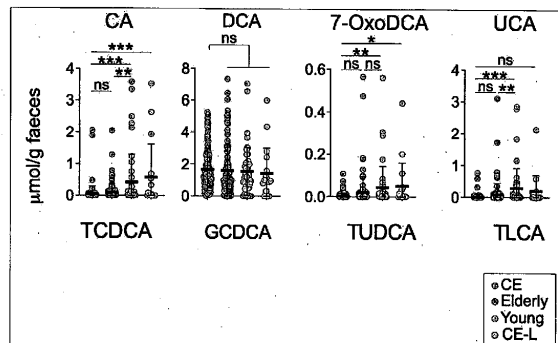


20

【図 10 A - 5】



【図 10 A - 6】

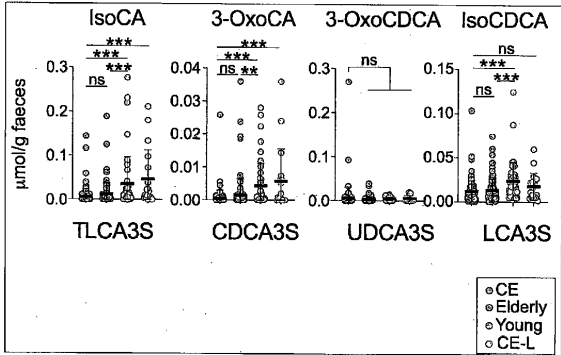


30

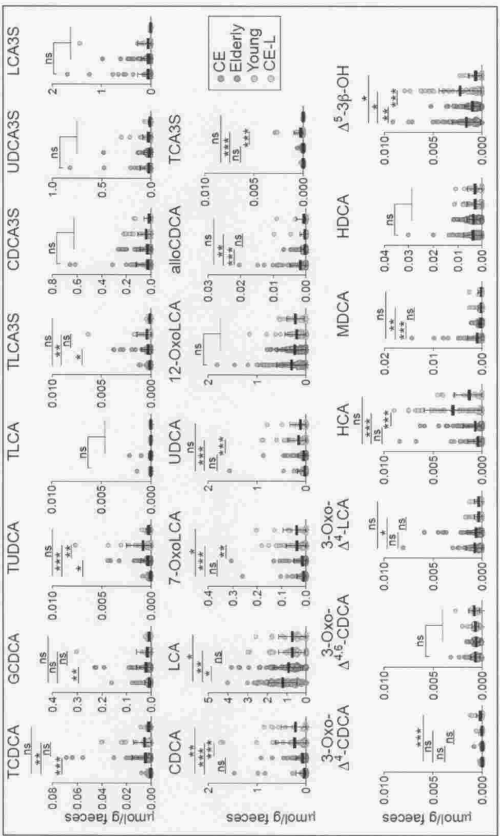
40

50

【図 10 A - 7】



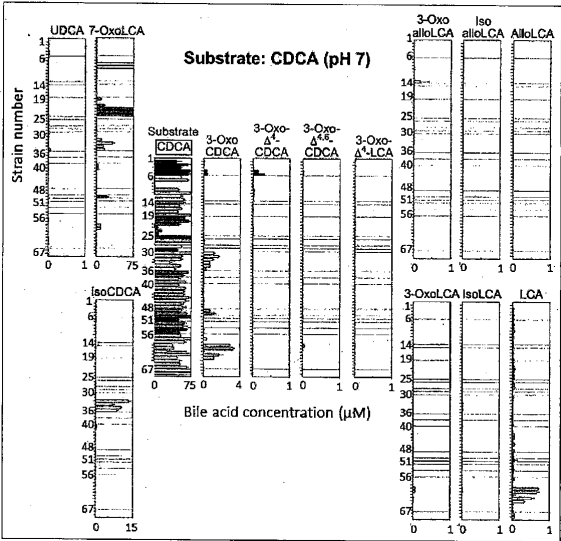
【図 10 B】



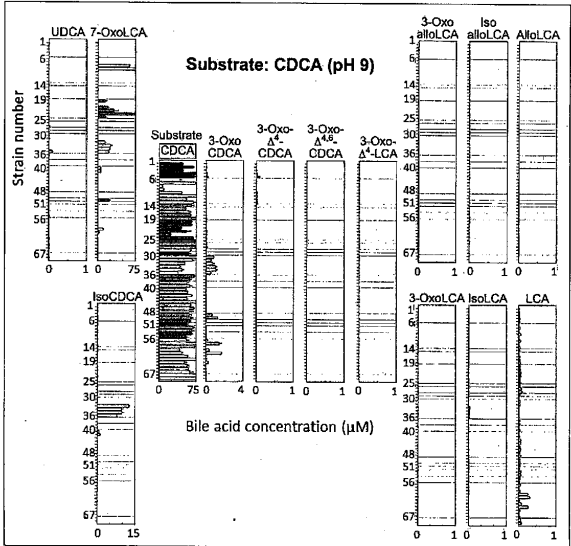
10

20

【図 11 A】



【図 11 B】

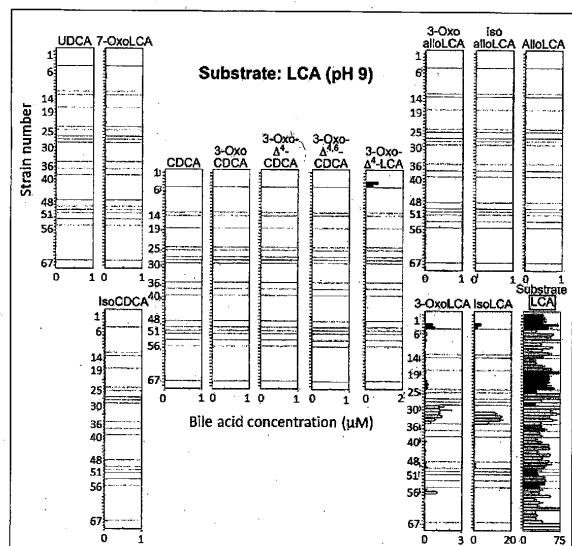


30

40

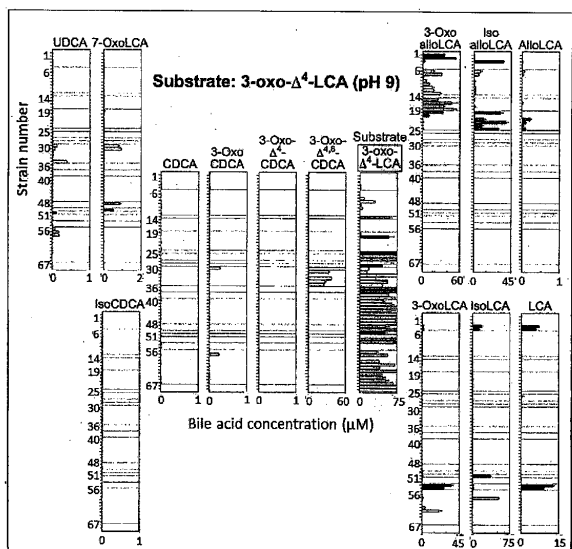
50

【図 1 1 D】



10

【図 1 1 F】



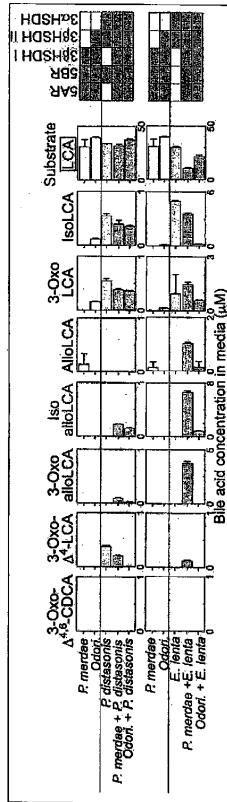
20

30

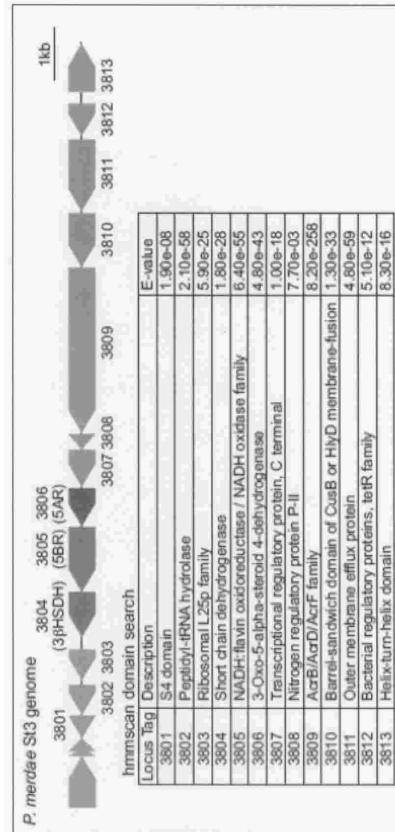
40

50

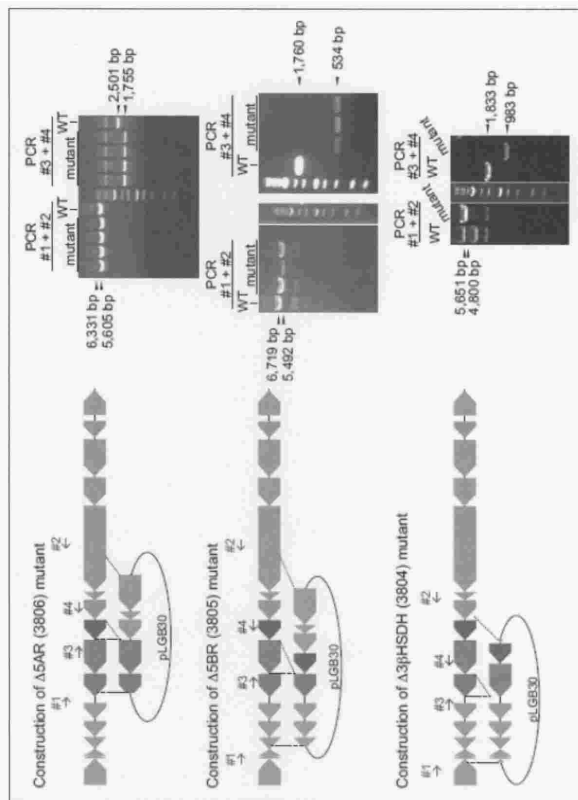
【図 13 D】



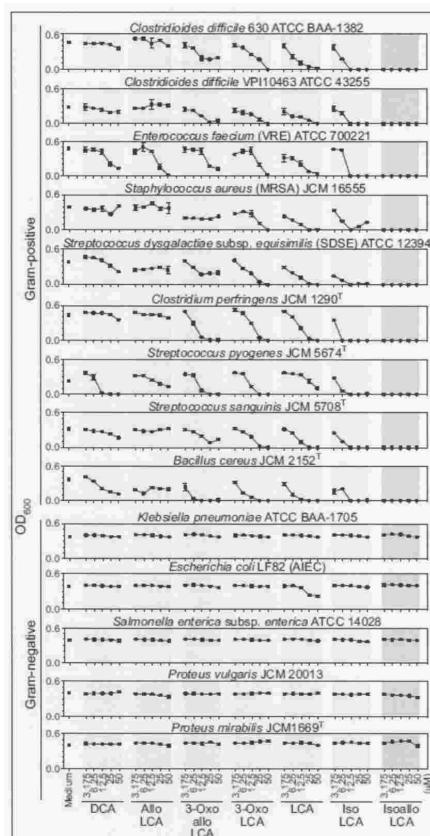
【図 14 A】



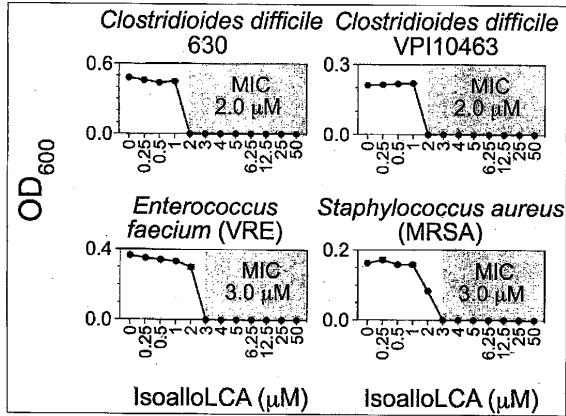
【図 14 B】



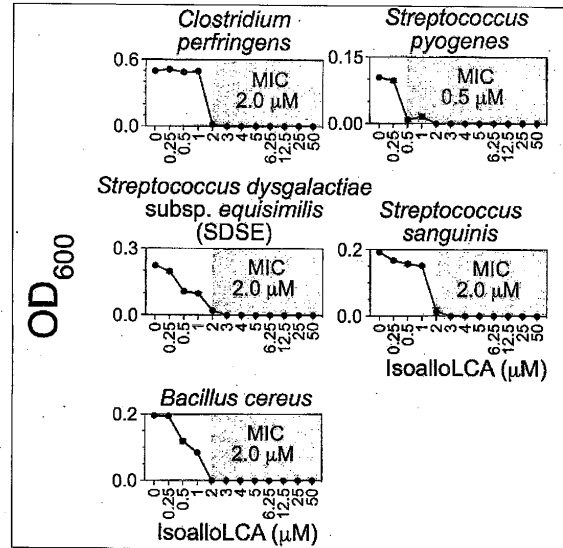
【図 15 A】



【図 15 B - 1】

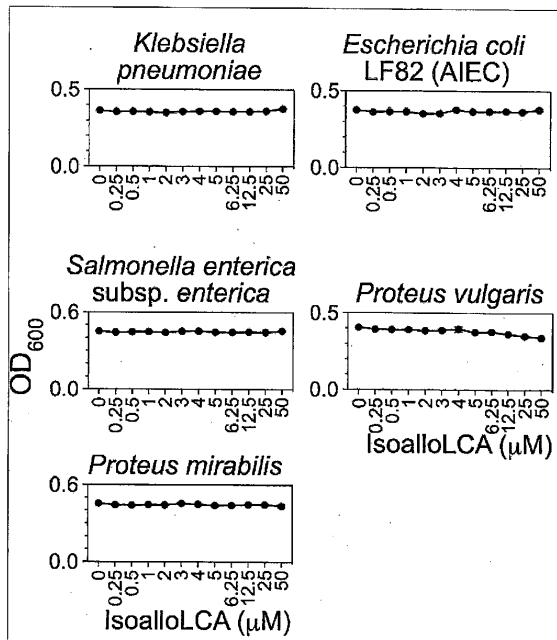


【図 15 B - 2】

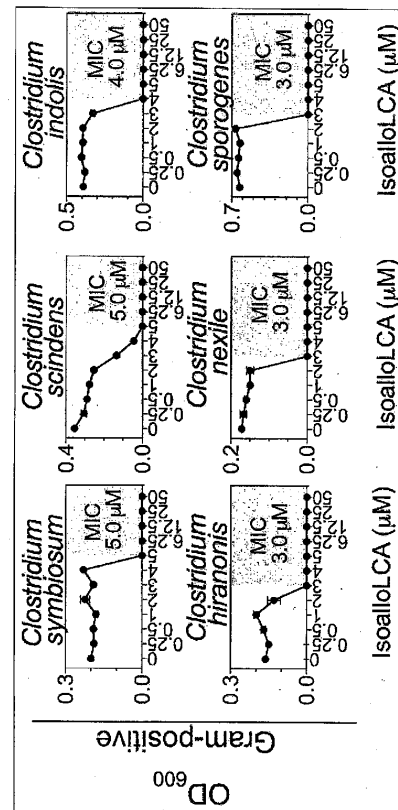


10

【図 15 C】



【図 16 A - 1】



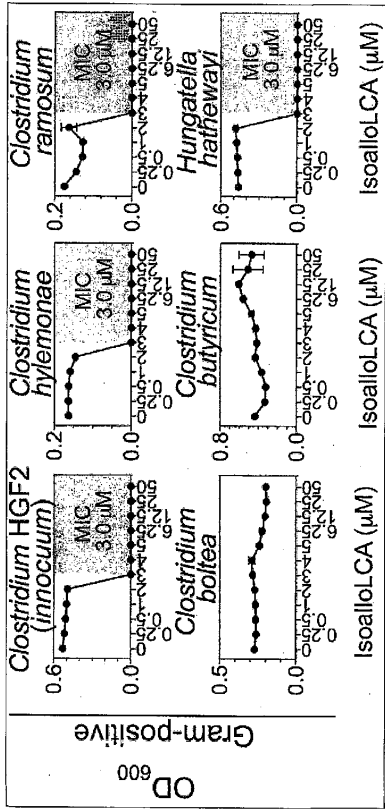
20

30

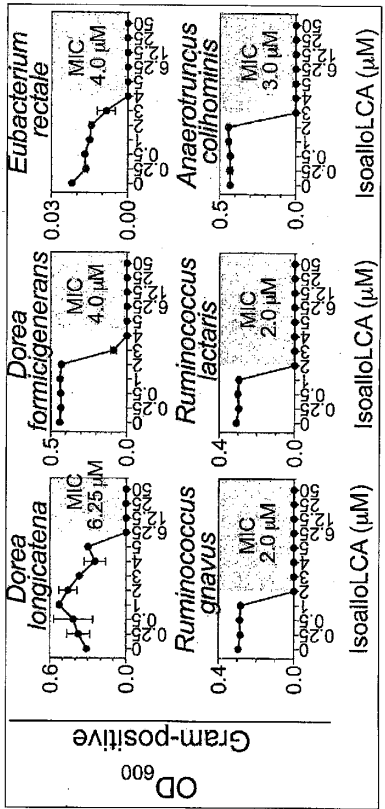
40

50

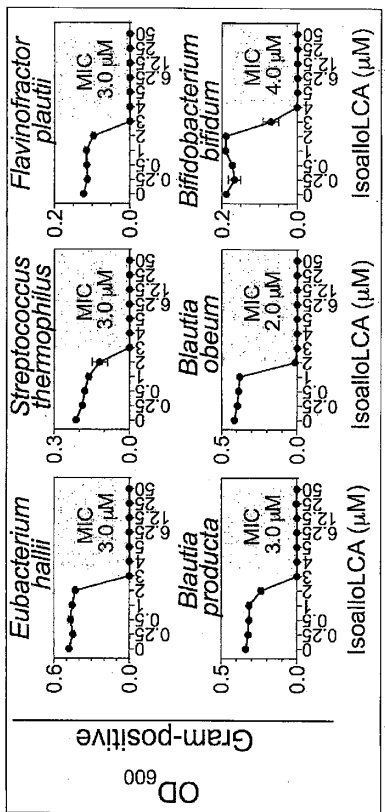
【図 16 A - 2】



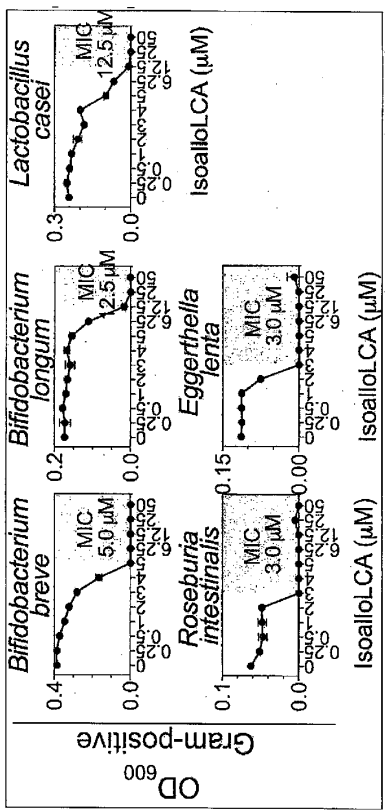
【図 16 A - 3】



【図 16 A - 4】



【図 16 A - 5】



10

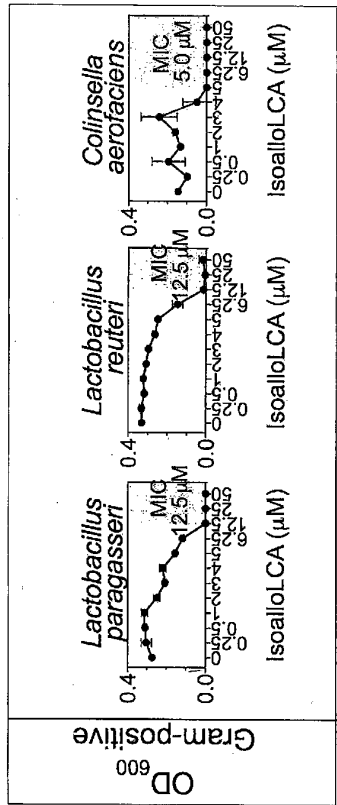
20

30

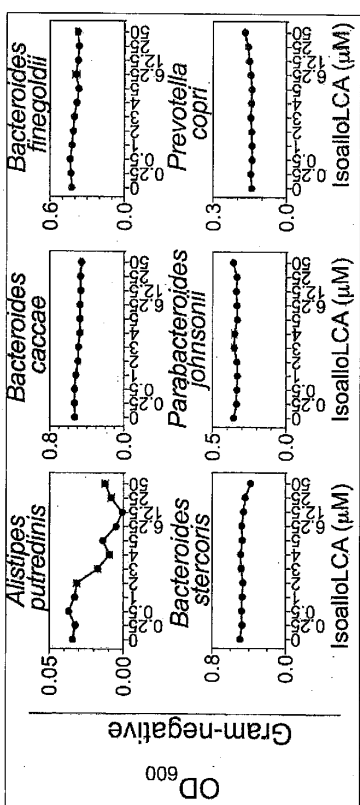
40

50

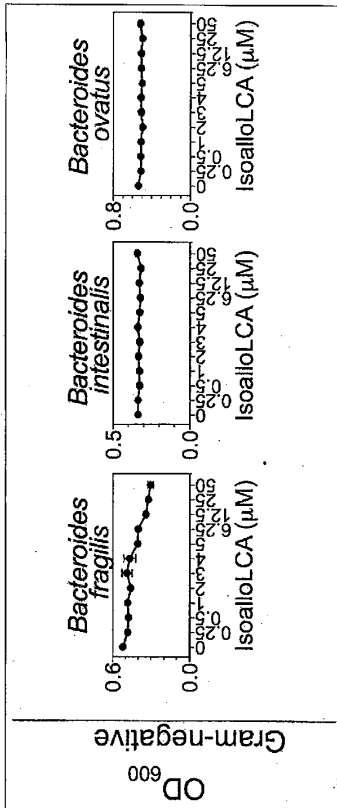
【図 16 A - 6】



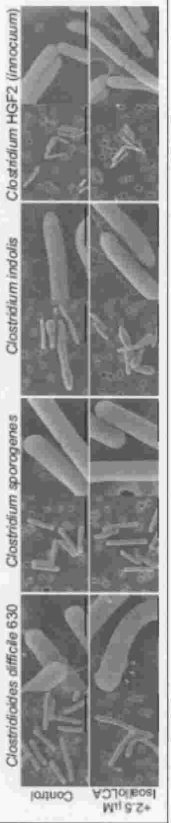
【図 16 A - 7】



【図 16 A - 8】



【図 16 B】



10

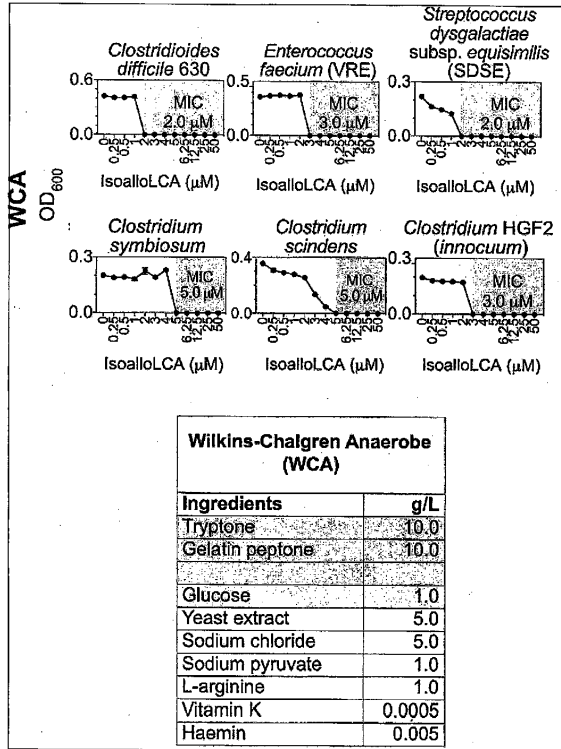
20

30

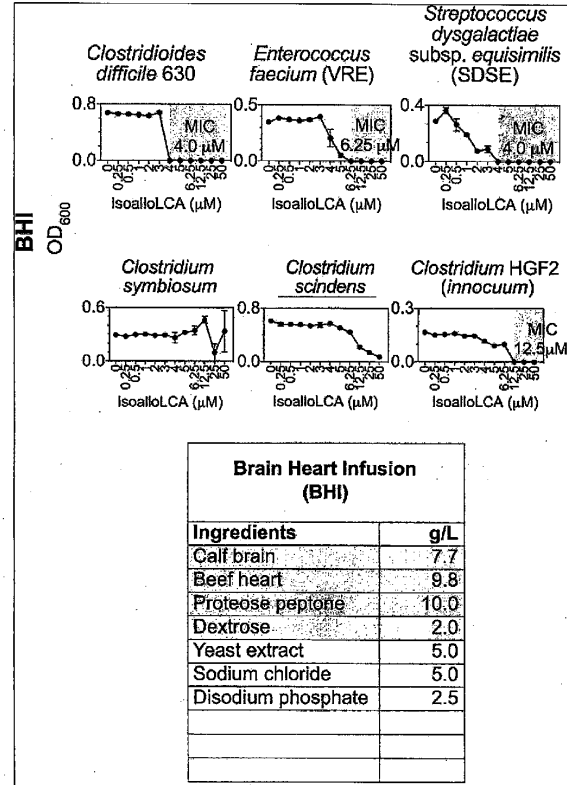
40

50

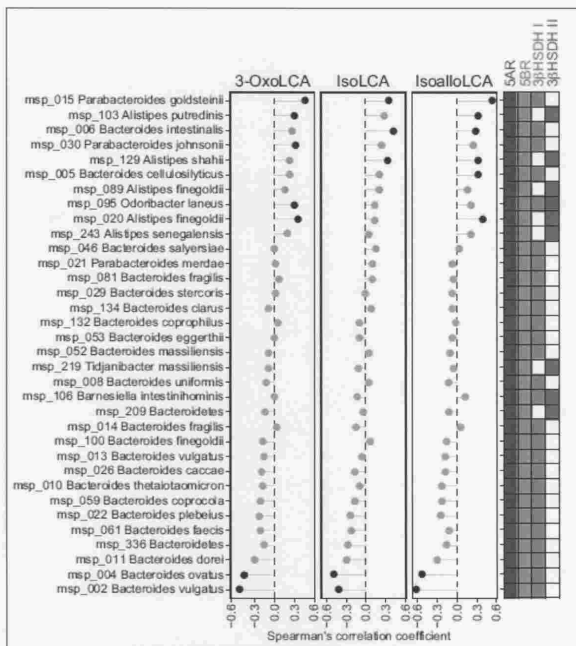
【図 17-1】



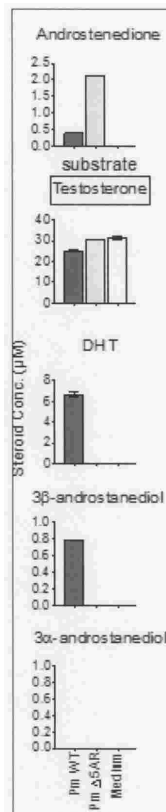
【図 17-2】



【図 18】



【図 19 A】



10

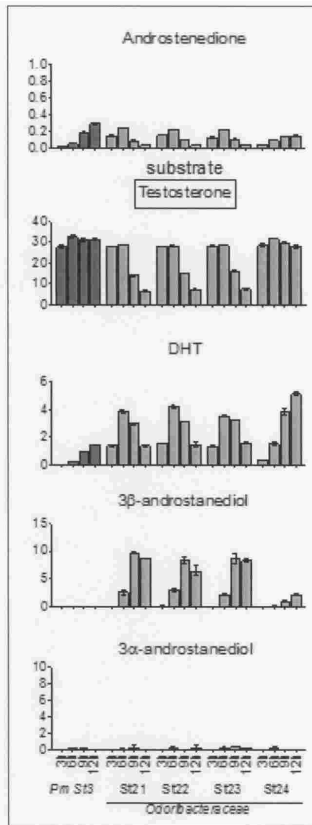
20

30

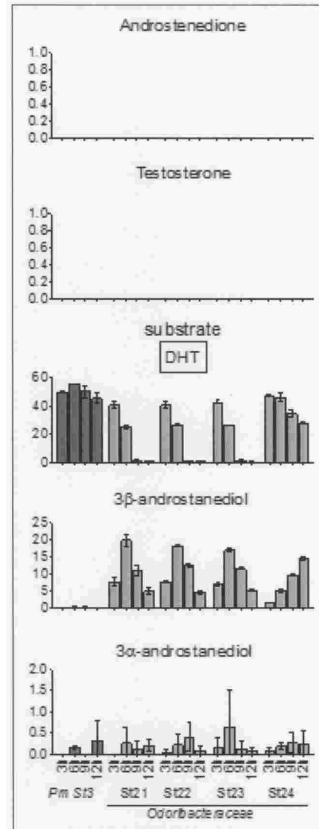
40

50

【図 19 B】



【図 19 C】



10

20

【配列表】

0007703168000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 K	35/74 (2015.01)	A 6 1 K	35/74	A
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	S
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	B
C 1 2 N	9/04 (2006.01)	C 1 2 N	9/04	Z

(32)優先日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/115,666

(32)優先日 令和2年11月19日(2020.11.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(出願人による申告) 令和元年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「革新的先端研究開発支援事業 インキュベートタイプ、腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出」「機能的に優れた腸内細菌株カクテルの同定分離」に係る委託事業、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 佐藤 優子
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 新 幸二
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 成島 聖子
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 新井 康通
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 竹下 梢
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 笹島 悟史
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特開昭62-262991(JP, A)
特開昭63-123400(JP, A)
米国特許出願公開第2018/0344781(US, A1)
特表2012-507521(JP, A)
国際公開第91/017251(WO, A1)
J. Lipid Res., 2006年, Vol.47, pp.241-259
Nat. Chem. Biol., 2015年, Vol.11, No.9, pp.685-690 (Author manuscript pp.1-21)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1/00
C 1 2 N 15/00
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 (S T N)