

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : コレラ及び腸管毒素原性大腸菌感染症に対する新規予防・治療法の開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 濱端 崇・岡村匡史・西川喜代孝  
キーワード : 細菌性下痢症、ペプチド性中和剤、付着因子 CS6、細胞侵入、細菌感染マウスモデル  
研究成果 :

## 1. 目的

世界的に猛威を振るうコレラと腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 感染症の制圧に向け、ETEC の主要な付着因子である CS6 の付着・細胞侵入メカニズムの解明、下痢の主要因である毒素の中和剤の開発を行うとともに、マウス感染モデルを開発し、コレラ・ETEC 感染症の予防・治療法の評価を行う。

## 2. 研究成果

(濱端) CS6 の転写調節因子を特定するため、ETEC 総タンパクとのゲルシフトアッセイでシフトが観察された CS6 遺伝子上流断片をプローブとして、プルダウンによる結合タンパクの抽出およびファージディスプレイライブラリーからの結合クローンの単離を試みたが、いずれも失敗に終わった。そこで CS6 遺伝子がコードされているプラスミドの全塩基配列を決定し、調節因子の検索を試みた。カナマイシン (Km) 耐性遺伝子カセットを相同組み換え法により ETEC4266 株の *cssB* に挿入し、全プラスミドを抽出して大腸菌 TOP10 株に形質転換し、Km 耐性を指標に選択して当該プラスミドを分離した。その全塩基配列を次世代シーケンサーによる解析および Gap filling PCR によって決定した。このプラスミド (pCss165) は 165 kb と他の付着因子プラスミドよりもかなり大きく、また 24.4% が挿入配列であった。アノテーションの結果、このプラスミドの選択に有利に働く可能性のある種々の遺伝子が同定された。調節因子として報告のある *csvR* および *araC* が見いだされたが、ETEC4266 株でこれらの遺伝子を欠損したところ、細胞に対する付着も CS6 の発現も影響を受けなかったことから、CS6 の調節因子はこのプラスミド以外にコードされていると推測された。

(西川) これまでに開発した GGR-tet は、コレラ毒素 (CT) の CHO 細胞形態変化誘導能を効率よく阻害するが、Caco2 細胞での cAMP 産生増加能に対しては阻害効果を示さなかった。今回、GGR-tet をベースとした多価型ペプチドシート合成技術により、CT の CHO 細胞形態変化誘導能ならびに Caco2 細胞の cAMP 産生増加能を共に効率よく阻害する新規化合物 (YGR-tet, GNR-tet) を開発した。易熱性毒素 (LT) については、野生型 LTB および GM1 の末端 Gal 結合部位変異体 LTB-E51A を用いた多価型ペプチドライブラリースクリーニングにより、新規化合物 (AAR-tet) を同定した。AAR-tet は、LT による CHO 細胞形態変化誘導能ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を効率よく阻害した。また GGR-tet をベースとして多価型ペプチドシート合成により新規化合物 (NNR-tet, ENR-tet) を同定した。興味深いことに CT 阻害薬として同定した GGR-tet は、CT による Caco2 細胞の cAMP 産生増加能をほとんど抑制しないが、LT による cAMP 産生増加能を強力に阻害した。以上の結果は、CT と LT は相同性が高いにも関わらず各々最適阻害モチーフが異なり、各々個別の阻害薬開発が必要であること、またそれが可能であることを示唆している。耐熱性毒素 (STh) のペプチドライブラリーアレイを用いて STh に高親和性を示すペプチド性化合物を同定するため、精製 STh (5-18) をビオチン化し、Caco2 細胞での cGMP 産生能増加能力を保持したまま、STh をプローブ化することに成功した。

(岡村) CS6 の糖鎖結合性を糖鎖および糖脂質糖鎖固定化アレイで解析したところ、heparin に強く結合すること、また heparin の脱硫酸化を反映して結合が若干弱まるが、脱硫酸化の位置によってその強度が異なることがわかった。さらに CS6 の構成サブユニットである *CssA* および *CssB* を別々に糖鎖固定化アレイで解析したところ、*CssB* は heparin のみに結合したのに対し、*CssA* は CS6 と同様の強度で heparin と heparin 脱硫酸化物に結合し、さらに Lacto-N-neotetraose (LnNT) にも弱く結合した。しかし付着実験では、heparin は ETEC 4266 株の INT407 細胞への付着を量依存的に阻害したが、LnNT は阻害しなかった。昨年度報告したように CS6 の結合を担うのは *CssB* の 118 番目の Lysine であることから、CS6 による付着は Lysine の正電荷と heparin 硫酸基の負電荷の結合である可能性が考えられる。近交系マウスを用いたコレラ菌・ETEC の易感染系統選抜の追試の結果、コレラ菌はマウス系統によらず速やかに排菌されること、また ETEC は DBA/2 が比較的保菌が長い傾向が認められ、易感染系のバックグラウンドの候補になると考えられた。

Subject No. : 24-110

Title : Development of Novel Preventive/Therapeutic Method against Cholera and Enterotoxigenic *E. coli* Infections.

Researchers : Takashi Hamabata, Tadashi Okamura, Kiyotaka Nishikawa

Key word : Bacterial diarrheagenic infection, CS6, Peptide neutralizer, Cholera toxin (CT), Heat-labile toxin (LT), Heat-stable toxin (STh), Mouse infection model

Abstract :

(Hamabata) In order to find the transcriptional regulator protein of CS6 gene, CS6 plasmid was isolated from previously constructed ETEC4266 *cssB*:Km (kanamycin-resistant cassette) isogenic strain. The entire nucleotide sequence of the plasmid was determined using a next-generation sequencer with the subsequent help of gap-filling PCR. The CS6 plasmid of 4222 was 165 kb in length and designated as pCss165. This plasmid contains Insertion Sequences up to 24.4% and several genes that might function to be advantageous to itself. Although two known transcriptional regulators, *csvR* and *araC*, were found on pCss165, knockout of these genes constructed from 4266 affected neither CS6 expression nor adhesion to INT407 cells. The regulator of CS6 was suggested to be located elsewhere in the genome of 4266.

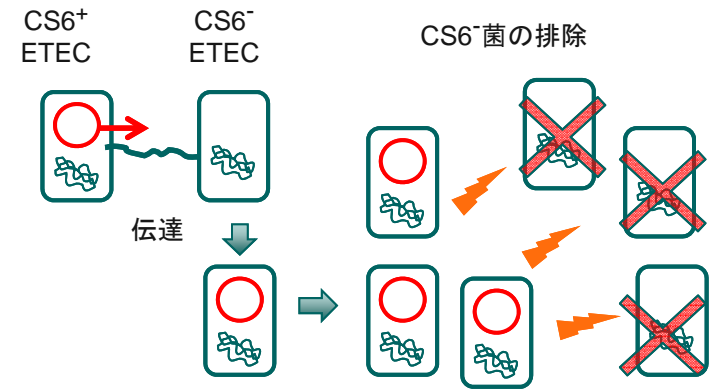
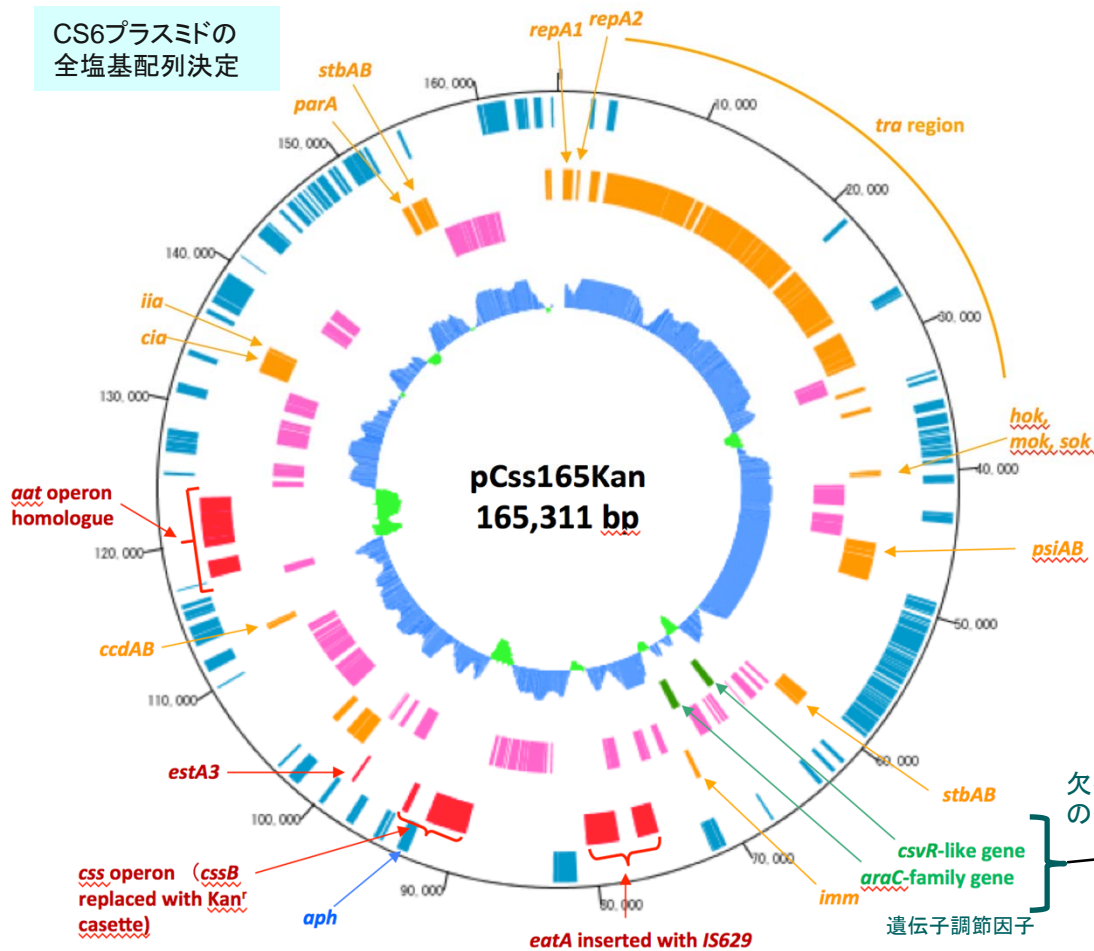
(Nishikawa) The previously developed tetravalent peptide compound GGR-tet inhibited CHO cell elongation induced by CT but cAMP overproduction of Caco-2 cells. We this time developed novel peptide compounds YGR-tet and GNR-tet, by means of multivalent peptide on-sheet synthesis, which inhibit both CHO elongation and Caco-2 cAMP overproduction. The novel compounds AAR-tet, developed through multivalent peptide library approach for LT-inhibitor, showed efficient inhibition on both CHO elongation and Caco-2 cAMP overproduction induced by LT. Interestingly, the CT-neutralizer GGR-tet mentioned above strongly inhibited Caco-2 cAMP overproduction by LT, suggesting the effective motifs on CT and LT are different in spite of their homology. For developing STh-neutralizer, the STh(5-18) peptide was successfully biotinylated remaining the cGMP overproduction ability in Caco-2 cells.

(Okamura) The binding preference of CS6 was examined using glycan array slides. It was found that CS6 preferentially bound to heparin, and the binding seemed depending on the number as well as the position of desulfurization in heparin molecule. C<sub>ss</sub>B, the CS6-constitutive subunit together with C<sub>ss</sub>A, showed the same result as CS6, whereas C<sub>ss</sub>A showed weak binding to Lacto N-neotetraose (LNnT) as well as heparin. However, LNnT did not inhibit the adherence of ETEC4266 to INT407 cells, whereas heparin did in a dose-dependent manner. Taking into account the data we previously reported that 118<sup>th</sup> lysine (K118) in C<sub>ss</sub>B is responsible to the adherence by CS6, the positive charge of C<sub>ss</sub>B K118 and the negative charge of sulfate in heparin might be the mechanism of adherence by CS6. Evaluation of the most appropriate mouse inbred strain for infection of *Vibrio cholerae* and ETEC was continued. We concluded that, no specific strain was suitable for *V. cholera* infection host because of the rapid excretion in all strains, where DBA/2 might be a candidate of ETEC infection model since this strain retained the orally-inoculated ETEC in the gut rather longer than other mouse inbred strains did.

Researchers には、分担研究者を記載する。

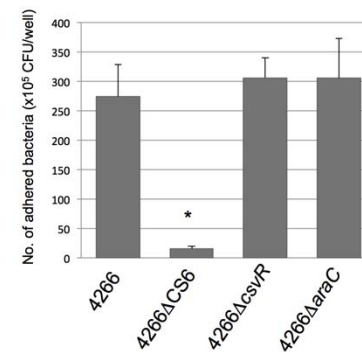
# (24指110) コレラ及び腸管毒素原性大腸菌感染症に対する新規予防・治療法の開発

## 1. 腸管毒素原性大腸菌の付着因子CS6の解析と予防・治療への応用(濱端)

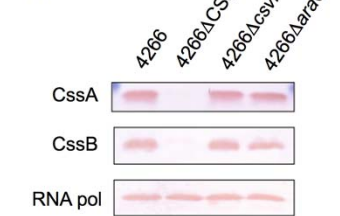


このプラスミドの保有はプラスミド自身に有利に働く可能性がある

A. 菌の付着



B. CS6発現

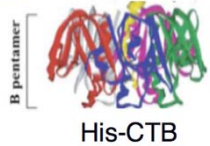


CsvRおよびAraC欠損はCS6発現にも付着にも影響しない

CS6遺伝子の調節因子は他のゲノム中に存在する

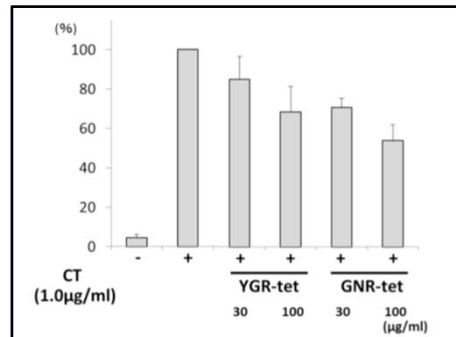
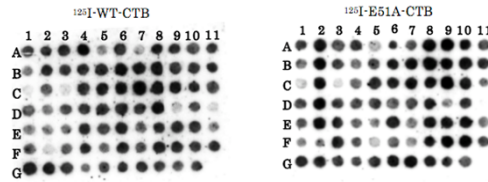
## 2. 合成オリゴマーペプチドを用いた毒素中和剤の開発(西川)

1) 多価型ペプチドシート合成技術を用いた新規CT阻害薬の同定



新規多価型ペプチド性化合物 (YGR-tet, GNR-tet) を開発した (特願 2014-050828)。

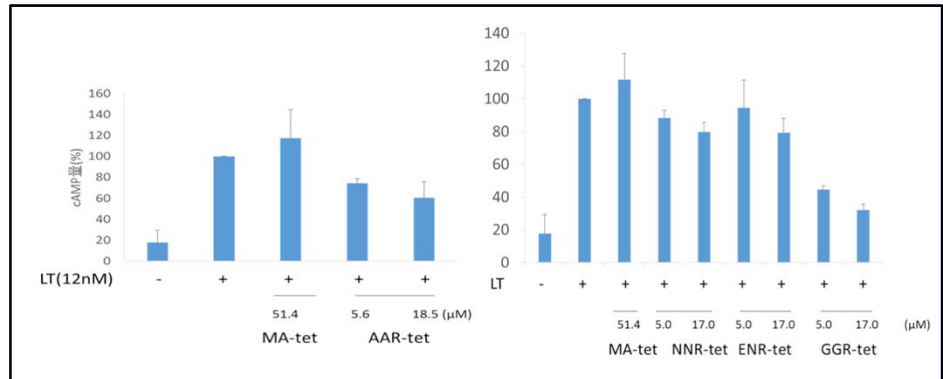
Caco-2細胞でのcAMP産生に対するYGR-tet, GNR-tetの阻害効果



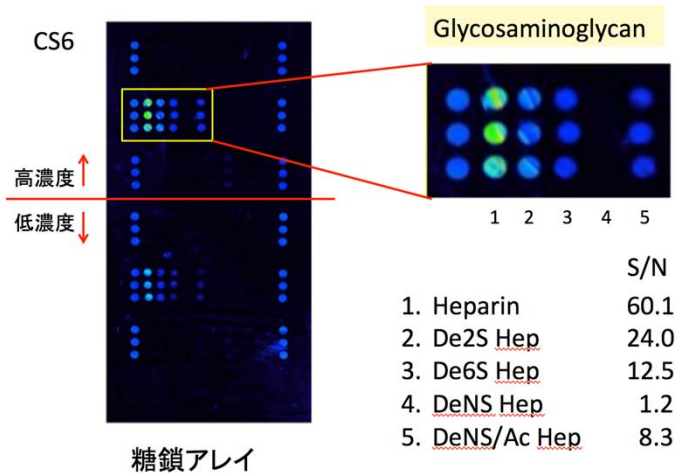
2) 多価型ペプチドライブラリー法ならびに多価型ペプチドシート合成技術を用いた新規LT阻害薬の同定



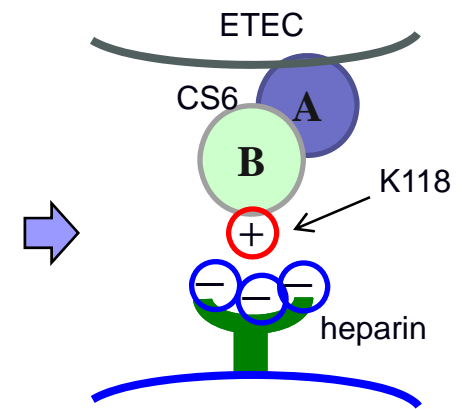
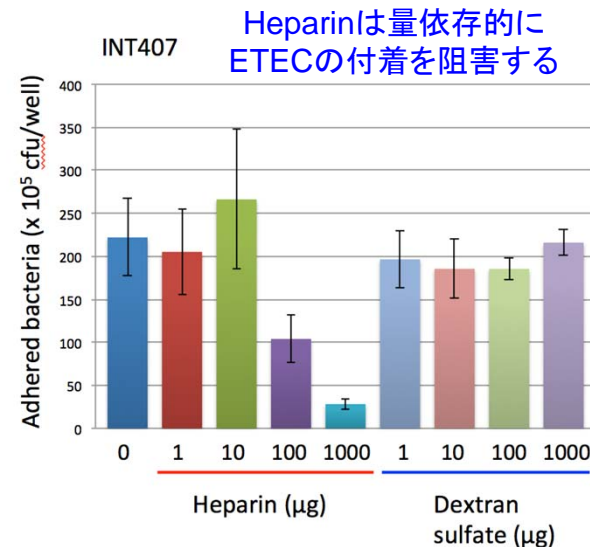
Caco2細胞でのcAMP産生に対するAAR-tet, NNR-tet, ENR-tet, GGR-tetの阻害効果



## 3. 細菌性下痢症の感染モデル動物の開発(岡村)



精製CS6はheparinに選択的に結合する



CS6 CssB K118とheparinが電荷的に結合する?

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : 腸管毒素原性大腸菌の付着因子CS6の解析と予防・治療への応用  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 濱端 崇

キーワード : 細菌性下痢症、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、付着因子 CS6、細胞侵入

研究成果 :

### 1. 目的

腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の主要な付着因子である CS6 の付着メカニズムの解明を目指し、CS6 遺伝子転写調節因子を特定する。

### 2. 方法

当研究室で作製した ETEC4266 株の *cssB* にカナマイシン (Km) 耐性遺伝子カセットを相同組み換え法により挿入した isogenic *CssB* ノックアウト株 (Wajima et al. Microb Pathog 51:243-249, 2011) より、全プラスミドを抽出した。これを大腸菌 TOP10 株にエレクトロポレーション法により形質転換し、Km 入り LB 寒天培地に塗抹し、一晚 37°C 保温後出現したコロニーを培養し、プラスミドを抽出精製した。次世代シーケンサー (Genome Sequencer FLX System, Roche Applied Science) および Gap filling PCR により、プラスミドの全塩基配列を決定した。コーディング領域 (CDS) の決定には GeneMark.hmn および NEB cutter (ver. 2.0) を用い、BLASTP software (ver. 2.2.3) で Genbank 登録データを参照し遺伝子を決定した。他の付着因子プラスミドとの比較は in silico Molecular Cloning (In Silico Biology) により行った。ETEC 4266 株の転写因子候補遺伝子欠損株は CS6 欠損株の作製と同様 G-DOC システムを用い、Km 耐性遺伝子を標的遺伝子に置換することにより作製した。欠損株の付着性アッセイは、24-well プレートに播種した Intestine-407 細胞を用いて行った。耐熱性毒素 (ST) の定量には E. COLIST-EIA キット (デンカ生研) を用いた。

### 3. 結果および考察

本年度は研究計画に照らし、CS6 の転写調節因子を特定することを目標に実験を進めた。まず CS6 遺伝子上流領域の連続的 DNA 断片と ETEC 総タンパクでゲルシフトアッセイを行ったところ、*cssA* の開始コドンから 31~60 bp 上流のプロープでのみ特異的なシフトが観察され、この部分が CS6 遺伝子のシス調節領域である可能性が示唆された。この DNA 断片を用いて、ETEC 4266 株の総タンパクからプルダウンによる結合タンパクの抽出、および ETEC4266 株のファージディスプレイライブラリーからの結合クロンの単離を試みたが、いずれも失敗に終わった。そこで方針を転換し、付着因子の調節因子は同一のプラスミドに存在するという報告が多いことから、CS6 遺伝子のコードされているプラスミドの全塩基配列を決定し、調節因子の検索を試みた。

CS6 遺伝子座 (*css*) の存在するこのプラスミド (p*Css165*) は約 165 kb の大きさを持ち、GC 含量が 49.5%、Insertion sequence 関連配列が 24.4% を占め、報告されている他の付着因子プラスミドとの相関性は見られなかった。アノテーションの結果、プラスミド伝達関連遺伝子群、post-segregation killing 遺伝子、colicin 関連遺伝子、およびプラスミド安定化関連遺伝子の存在が確認された。これらの遺伝子の存在は、このプラスミドが伝達性であり、かつ優位な選択圧を有するという可能性を示唆する。また ST 遺伝子も存在しており、このプラスミドの形質転換 TOP10 株の ST 産生が確認されたことから、この ST 遺伝子は機能していることがわかった。元株 4266 は易熱性毒素 (LT) も陽性であるが、LT 遺伝子はこのプラスミド上には存在していなかった。

遺伝子調節因子としては *csvR* および *araC* の 2 つの遺伝子の存在が確認できた。これらが CS6 の転写に関与するかを調べるため、ETEC4266 株を用いてこれらの遺伝子をそれぞれ欠損した isogenic 変異株を作製し、CS6 の発現ならびに INT-407 細胞への付着性を解析した。その結果これらの遺伝子の欠損は、CS6 の発現量にも、また細胞への付着の程度にも、影響を与えなかった。したがってこれらの転写因子は CS6 遺伝子の調節因子ではなく、CS6 の調節因子はこのプラスミド以外にコードされていると推測された。

今後は CS6 発現が温度感受性であることから転写制御因子 H-NS の関与の検討、またレポーターアッセイ系などを用いた調節因子の検索などを検討したいと考えている。

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : 細菌性下痢症の感染モデルマウスの開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 岡村匡史

キーワード : レセプター、トランスジェニックマウス、細菌感染マウスモデル、マウス感染評価系。  
研究成果 :

### 1. 目的

コレラ菌および毒素原性大腸菌 ETEC の易感染モデルマウス構築に向け、コレラ菌及び ETEC が定着しやすい近交系マウスを選抜する。また ETEC 易感染トランスジェニックマウスに導入する ETEC 付着因子 CS6 の宿主側レセプター候補の特定を試みる。

### 2. 方法

ETEC 4266 株を培養、遠心分離にて集菌し、60°C の 0.8% NaCl で 20 分処理し、菌体表層タンパクを抽出した。これを 40%-60%飽和で選択的に硫酸沈殿したのち、Q Sephalose Fast Flow (GE ヘルスケア) 陰イオン交換カラムを用いて 0-0.6 M NaCl のグラジエントで溶出した。溶出画分を SDS-PAGE およびウサギ C<sub>ss</sub>A 抗体/C<sub>ss</sub>B 抗体を用いたウェスタン解析で確認した。

*cssA* および *cssB* 遺伝子をそれぞれ His-tag 発現ベクターにクローニングし、IPTG 誘導で発現させ、Ni カラムで His-C<sub>ss</sub>A および C<sub>ss</sub>B を精製した。TEV protease で His Tag を切断し、Ni カラムで除去した。

精製 CS6 を糖鎖固定化アレイおよび糖脂質糖鎖固定化アレイ (住友ベークライト) にアプライし、4°C、一晚反応させた。洗浄後、ウサギ C<sub>ss</sub>A 抗体/C<sub>ss</sub>B 抗体を室温にて 1 時間反応させ、さらに洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG-Cy3 conjugate を室温にて 1 時間反応させた。洗浄後、乾燥させたアレイスライドを ScanArray Lite (Parkin Elmer) で解析した。C<sub>ss</sub>A および C<sub>ss</sub>B は糖鎖固定化アレイのみを用いて同様に解析した。

コレラ菌 N16961 株を 10<sup>6</sup> および 10<sup>8</sup> 個、DBA/2 と C3H/He 系統のマウス雌 4 週齢に、また ETEC4266 株 10<sup>10</sup> 個を Balb/c、AKR および DBA/2 系統にそれぞれ経口投与し、経時的に糞便を回収・懸濁して選択的寒天培地に塗抹し、37°C、一晚保温し、コロニーをカウントして菌数の推移を観察した。

### 3. 結果および考察

精製 CS6 の糖鎖結合性を糖鎖および糖脂質糖鎖固定化アレイで解析したところ、heparin に強く結合し、その他の一般的な糖鎖・糖脂質糖鎖には全く結合しなかった。また heparin の脱硫酸化を反映して結合が若干弱まるが、脱硫酸化の位置によってその強度が異なることがわかった。さらに CS6 の構成サブユニットである C<sub>ss</sub>A および C<sub>ss</sub>B を別々に糖鎖固定化アレイで解析したところ、C<sub>ss</sub>B は heparin のみに結合したのに対し、C<sub>ss</sub>A は CS6 と同様の強度で heparin と heparin 脱硫酸化物に結合し、さらに若干強度は劣るが Lacto-N-neotetraose にも弱く結合した。この結果の有意性を確かめるため ETEC 4266 株の付着阻害実験を行ったところ、heparin は ETEC 4266 株の INT407 細胞への付着を量依存的に阻害したが、一方 Lacto-N-neotetraose は阻害しなかった。昨年度の本研究で CS6 の結合を担うのは C<sub>ss</sub>B の 118 番目の Lysine であると示唆したが、Lysine は正の電荷を有するため、負の電荷を有する heparin の硫酸基と強く結合する可能性が考えられる。また heparin が CS6 の真のレセプターであるとすると、本研究の目的であったトランスジェニックによる ETEC 易感染性マウスモデルの構築は極めて難しい。今後は CS6 と heparin の結合の有意性を慎重に確認する。

前年度行った近交系マウスを用いたコレラ菌および ETEC の易感染系統選抜において、コレラ菌 10<sup>10</sup> 個の投与後 18 時間までに全匹死亡した DBA/2 と C3H/He 系統に対し、コレラ菌を 10<sup>6</sup> および 10<sup>8</sup> 個投与したところ、C3H/He に 10<sup>6</sup> 個投与した群の 1 匹のみが 13 日排菌が認められたが、しばしば軟便が認められ、キャリア化ではなく偶発的に感染が成立した可能性が考えられた。その他は 3 日目までに菌が消失した。また ETEC では前年度の実験で長期保菌が観察された Balb/c と AKR、DBA/2 を用いて 10<sup>10</sup> 個の投与を追試したところ、DBA/2 で 1 匹のみが 7 日目まで排菌したのが最長であった。比較的入手しやすい近交系マウスでは、コレラ菌は系統によらず速やかに排菌され、ETEC は DBA/2 が比較的保菌が長い傾向が認められた。



課題番号 : 24指110  
研究課題名 : 合成オリゴマーペプチドを用いた毒素中和剤の開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 西川 喜代孝

キーワード : コレラ毒素 (CT)、易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (ST)、ペプチドライブラリー、阻害薬

研究成果 :

(目標)

25年度は、1) CT、LTの受容体結合部位を標的とし、多価型ペプチドライブラリー法を用いて、高親和性結合能を有するペプチド性化合物を同定すること、さらに候補分子の阻害活性評価系を確立すること、2) SThの完全合成法を確立し、その活性評価系を確立すること、さらに既知配列から構成されるペプチドライブラリーアレイを用いてSThに高親和性を示すペプチド性化合物を同定すること、を目的としている。

(成果)

1) CTならびにLTは、B-サブユニット (CTB, LTB) を介して標的細胞表面に存在している糖脂質 GM1 ( $\text{Gal } \beta 1-3\text{GalNAc } \beta 1-4[\text{NeuAc } \alpha 2-3]\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc } \beta 1-1\text{Cer}$ ) を認識し結合する。これらの受容体認識部位を標的として、多価型ペプチドライブラリー法ならびに多価型ペプチドシート合成技術を用いて、高親和性モチーフを同定し、新規阻害薬を開発する。

CTについては、これまで野生型 CTB、GM1の末端 Gal 結合部位に変異を有する変異体 CTB-E51A を用いて、多価型ペプチドライブラリーを用いて、多価型ペプチド性化合物 (GGR-tet) を開発している (特願 2013-51032)。GGR-tet は、CTの CHO 細胞形態変化誘導能を効率よく阻害するものの、ヒト結腸がん由来細胞株 Caco2 細胞での cAMP 産生増加能に対してはほとんど阻害効果を示さない。今回、GGR-tet の配列をベースとして多価型ペプチドシート合成技術を用いたスクリーニングを行うことにより、新規多価型ペプチド性化合物 (YGR-tet, GNR-tet) を開発した (特願 2014-050828)。YGR-tet ならびに GNR-tet は、CTの CHO 細胞形態変化誘導能、ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能、を共に効率よく阻害することが示された。腸管上皮細胞での cAMP 産生増加は C1 チャネルを介した C1 の流出と、それに続く大量の水分の流出に直結することから、YGR-tet ならびに GNR-tet は、新規 CT 治療薬として期待される。

LTについては、野生型 LTB、GM1の末端 Gal 結合部位に変異を有する変異体 LTB-E51A を用いて、多価型ペプチドライブラリースクリーニングを行い、新規多価型ペプチド性化合物 (AAR-tet) を同定した (出願準備中)。AAR-tet は、LTによる CHO 細胞形態変化誘導能、ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能、を効率よく阻害した。これと並行して、LTB と CTB とのホモロジーが高いことに着目し、GGR-tet の配列をベースとして多価型ペプチドシート合成技術を用いたスクリーニングを行い、新規多価型ペプチド性化合物 (NNR-tet, ENR-tet) を同定した (出願準備中)。NNR-tet ならびに ENR-tet はともに、CHO 細胞形態変化誘導能、ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を効率よく阻害した。興味深いことに CT 阻害薬として同定した GGR-tet は、CTによる Caco2 細胞での cAMP 産生増加能をほとんど抑制しないにもかかわらず、LTによる cAMP 産生増加能を強力に (69%阻害能) 阻害することが示された。以上の結果は、CT と LT は高いホモロジーを有するものの、各々に対する最適阻害モチーフは異なっており、各々に対して個別に阻害薬開発をすることが必要であること、またそれが可能であることを明瞭に示している。

2) 本研究で開発を目指す、ペプチドライブラリーアレイを用いて STh に高親和性を示すペプチド性化合物を同定するためには、活性を保持したままプローブ化された STh を調製することが必要である。今回、STh の放射標識ならびにビオチン標識を試み、詳細な条件検討を行った。その結果、精製 STh (5-18) を用いビオチン化することにより、Caco2 細胞での cGMP 産生能増加能力を保持したまま、STh をプローブ化することに成功した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指110

研究課題名： コレラ及び腸管毒素原性大腸菌感染症に対する新規予防・治療法の開発

主任研究者名： 濱端 崇

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Entire sequence of the colonization factor coli surface antigen 6-encoding plasmid pCss165 from an enterotoxigenic Escherichia coli clinical isolate.	Wajima T, Sabui S, Kano S, Ramamurthy T, Chatterjee NS, Hamabata T.	Plasmid	70	2013

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ETEC 4266株のCS6プラスミドpCss165の全塩基配列の解析	輪島丈明、濱端 崇	第87回日本細菌学会総会	東京	2014年3月
受容体結合部位を標的とした易熱性エンテロトキシン阻害薬の開発	谷川哲也、高橋美帆、山本洋、濱端 崇、西川喜代孝、橋美帆、濱端 崇	第87回日本細菌学会総会	東京	2014年3月
志賀毒素耐性THP-1細胞クローンの単離と解析	服部隆行、高橋美帆、西川喜代孝、内藤幹彦	日本薬学会第134回年会	熊本	2014年3月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
CT阻害4価ペプチド及びコレラ治療薬	特願2014-050828 (特願2013-51032の国内優先権主張出願)	西川喜代孝、高橋美帆、山本洋、濱端崇	2014年3月13日	日本国
LT阻害 4 価ペプチドおよびETEC感染症治療薬	特願2014-128632	西川喜代孝、高橋美帆、谷川哲也	2014年6月23日	日本国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。  
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。