

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010年11月25日(25.11.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/134499 A2

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058305
- (22) 国際出願日: 2010年5月17日(17.05.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-120420 2009年5月18日(18.05.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 九州大学(Kyushu University, National University Corporation) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号 Fukuoka (JP). 明治乳業株式会社(Meiji Dairies Corporation)
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮本 敬久(MIYAMOTO Takahisa) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号 国立大学法人 九州大学内 Fukuoka (JP). 田中 孝(TANAKA Takashi) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田540 明治乳業株式会社研究本部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 志村 尚司(SHIMURA Hisashi); 〒5420081 大阪府大阪市中央区南船場2-3-4 日宝長堀ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

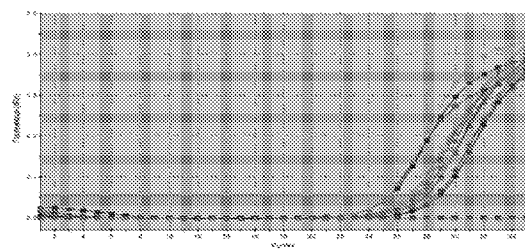
[続葉有]

(54) Title: PRIMER SET FOR DETECTING LISTERIA BACTERIA

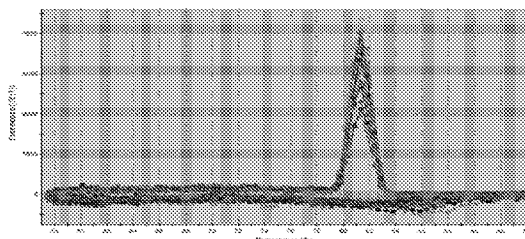
(54) 発明の名称: リステリア菌検出用のプライマーセット

[図12]

(a)



(b)



(c)



(57) Abstract: Disclosed is a method for quickly and specifically detecting and identifying the particularly virulent strain *Listeria monocytogenes*. Through classifying according to the single-nucleotide polymorphisms of hlyA gene, inlA gene, clpC gene and plcA gene, found in *Listeria monocytogenes*, and detecting a plurality of single-nucleotide polymorphisms, consisting of identified combinations classifiable according to the specific single-nucleotide permutations within the single-nucleotide polymorphism of each gene, the virulent strain belonging to the same group as the strain found in the clinical strain can be detected. In order to do this PCR is applied, using, for example, a primer set comprising a primer containing a base sequence represented by SEQ ID NO: 1 and a primer containing a base sequence represented by either SEQ ID NO: 12-16 or 18-20; or a primer set comprising a primer containing a base sequence represented by SEQ ID NO: 11 and a primer containing a base sequence represented by SEQ ID NO: 4.

(57) 要約:

[続葉有]



BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告なし ; 国際調査報告を受け取り次第公開される。(規則 48.2(g))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

特に高い病原性を有する *Listeria monocytogenes* の菌株を特異的かつ迅速に検出、同定する方法を提供する。*Listeria monocytogenes* が有する *hlyA* 遺伝子、*inlA* 遺伝子、*clpC* 遺伝子、*plcA* 遺伝子の一塩基多型によって分類し、各遺伝子内の一塩基多型に特異的な一塩基置換若しくは分類可能に特定された組み合わせからなる複数の一塩基多型を検出することにより、臨床株で見出された菌株と同じグループに属する病原性の高い菌株を検出する。このために、例えば、配列番号 1 に示す塩基配列を有するプライマーと配列番号 12 ~ 16 及び 18 ~ 20 に示す何れかの塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、若しくは配列番号 11 に示す塩基配列を有するプライマーと配列番号 4 の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットを用いて PCR 法を適用する。

明 細 書

発明の名称： リステリア菌検出用のプライマーセット

技術分野

[0001] 本発明は、リステリア モノサイトゲネス菌 (*Listeria monocytogenes*) の検出に用いられるプライマーセットに関する。

背景技術

[0002] リステリア菌は、動物や土壌などの環境中に広く常在しており、食肉や乳製品を中心とする様々な食品から高頻度に検出される。ところが、リステリア菌は低温増殖能や高食塩濃度耐性をもつため（五十君ら、2003）、食品の一次汚染はもちろん製造工程での二次汚染を防ぐことも困難である。食品が高濃度で本菌に汚染されていると、食品の低温保存中に増殖し、食中毒を引き起こす恐れがある。

[0003] 分類学的にリステリア属には6菌種が知られているが、リステリア症の原因菌とされているのはリステリア モノサイトゲネス菌 (*L. monocytogenes*) の1菌種だけである。本菌に感染した場合、成人は抵抗力が強いため、無症状感染や保菌状態となるが、新生児、高齢者及び免疫不全者などのハイリスク群では多くのリステリア症の発症がみられ、重症化した場合の致死率は30%と極めて高く、子宮内で胎児が感染すると死産や早産の原因となることが知られている（五十君ら、2003、2004）。

[0004] リステリア菌に感染した場合、発症までに長時間を要し、個人差があるため（五十君、2004）、頻発して起こるリステリア症が同一の食品を介して発生した集団食中毒であるかを判断することは困難である。また、菌株によっては血清型による分類ができない場合があり、血清型による分類のみでは病原性の有無の判定や追跡調査が十分にできない。このような観点からも詳細な分類が必要である。

[0005] リステリア菌の同定・分類方法として、例えばRFLPによる分類（非特許文献1参照）やPFGEによる分類（非特許文献2参照）が提案されてい

るが、実験操作に熟練を必要とし、操作が煩雑で長時間を要する。また、簡易迅速検出法として、hlyA遺伝子をPCRにより増幅するためのプライマーセットも報告されているが（非特許文献3）、対象となる内部塩基配列を有しない菌株には無効であり、100%のL. monocytogenesを検出できるわけでは無いとの報告がある（非特許文献4）。これらの方法以外にも、PCRによりL. monocytogenesを検出したり、血清型を判定したりする試みが数々行われているが（特許文献1、2、非特許文献5、6、7など）、病原性の高い菌株との関連性については把握されていない。

[0006] また、inlA遺伝子を増幅する方法として、タカラバイオ株式会社やABI（Applied Biosystems）社からそれぞれ異なる内部塩基配列を標的とした遺伝子増幅用のキットが販売されている。しかし、リステリア菌以外の類縁菌をも検出される可能性が高かった。

[0007] このような状況下において、本願発明者らはL. monocytogenesを迅速に検出するとともに、病原性の有無を含めて分類同定する方法を提案し、特願2006-144723号として特許出願を行っている（特許文献3、非特許文献8）。この方法は、hlyA遺伝子、cIpC遺伝子、inlA遺伝子、picA遺伝子においてそれぞれ見いだされる特徴的な一塩基置換（一塩基多型：SNP）を利用して分類する方法である（multi locus sequence typing(MLST)法）。

[0008] MLST法では、hlyA遺伝子、cIpC遺伝子、inlA遺伝子、picA遺伝子においてそれぞれ見いだされる特徴的な一塩基置換のタイプによってグループ化される。これまでのところ、hlyA遺伝子におけるタイプはグループ1～グループ9の9つのグループに（特許文献3、図1参照）、cIpC遺伝子におけるタイプはグループ1～グループ14の14のグループに（同文献、図2参照）、inlA遺伝子におけるタイプはグループ1～グループ17の17のグループに（同文献、図3参照）、picA遺伝子におけるタイプはグループ1～21に分類される（同文献、図4参照）ことが明らかにされている。

[0009] これらのうちで、病原性が高いと推定される臨床株（臨床から分離された *L. monocytogenes*）は、特許文献1の表1に示されているように、グループA～Lの12のグループに分類される（同文献表1参照）。従って、検出されたリステリア菌における *hlyA* 遺伝子、*cipC* 遺伝子、*inlA* 遺伝子、*plcA* 遺伝子における特徴的な一塩基置換の類型（グループ）が、同文献の表1に示されたグループA～Lに一致すれば、当該検出菌は病原性が高いと類推できる。また、このとき、従来から用いられてきた血清型による分類を加味して判断することも可能であるが、血清型による分類を加味した場合にも、病原性が高いと類推可能な菌株は、前記グループA～Lの12グループに分類される（同文献、表1参照）。

[0010] すなわち、上記4つの遺伝子における特徴的な一塩基置換（SNP）を検出して、当該一塩基置換による類型を調べることにより、検出されたリステリア菌の病原性を推定できる。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開平6-233699号公報

特許文献2：特開2004-154141号公報

特許文献3：特開2007-312660号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Fukiko Ueda et al., Comparison of Genomic Structures in the Serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* Isolated from Meats and Listeriosis Patients in Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 58(2005), 289-293

非特許文献2：Marc Yde, and Annie Genicot, Use of PFGE to characterize clonal relationships among Belgian clinical isolates of *Listeria monocytogenes*, J Med Microbiol, 53 (2004), 399-402

非特許文献3：Lehner, et al., A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the *listeriolysin O* (*hlyA*) locus, J. Microbiol. Med 34(1999), 165-171

非特許文献4：五十君静信，山本茂貴，牧野壮一ら、2003年 食品由来リステリア菌の健康に関する研究 平成14年度 総括・分担研究報告書

非特許文献5：Rodriguez-Lazaro, D. et al., Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay, FEMS. Microbiol. Lett., 233(2004), 257-267

非特許文献6：Thomas, E. J. G et al., Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction, Appl. Environ. Microbiol., 57(1991), 2576-2580

非特許文献7：Monica K. Borucki and Douglas R. Call, *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 12(2003), 5537-5540

非特許文献8：Ken-ichi Honjoh, Kumiko Fujihara et al., Subtyping of *Listeria monocytogenes* Based on Nucleotide Polymorphism in the *clpG*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* Genes and Rapid Identification of *L. monocytogenes* Genetically Similar to Clinical Isolates, Food Sci. Technol. Res., 14(6), 557-564, 2008

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本願発明者らは、引き続き、臨床由来又は食品・環境由来のリステリア菌について追加調査を行ったところ、*hlyA*遺伝子の塩基配列をもとに見いだされた特定の塩基配列を有するプライマーを組み合わせることによっても、リステリア菌のみを特異的に検出できることを見だし、本願発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

- [0014] 本発明においては、配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと配列番号12～16及び18～20に示される何れかの塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット（表8におけるプライマーセットNo. 1～5及び7～9の何れか）、若しくは配列番号11に示す塩基配列を有

するプライマーと配列番号4に示す塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット（表8におけるプライマーセットNo. 12）を用いてリアルタイムPCR法（RT-PCR）法を適用することになっている。

- [0015] これらのプライマーは、それぞれ試験した全てのL. monocytogenesで保存され、類縁菌であるL. ivanovii 及び L. seeligeri ではSNPの多い領域の塩基配列から見いだされたものである。配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーをforward側のプライマーとして用いる際には、配列番号12～16及び18～20に示される何れかの塩基配列を有するプライマーがreverse側のプライマーとして用いられる。配列番号11に示される塩基配列を有するプライマーをreverse側のプライマーとして用いる際には、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーがforward側のプライマーとして用いられる。

発明の効果

- [0016] 本発明によると、L. monocytogenesを特異的かつ迅速に検出することができる。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1] hlyA遺伝子内の塩基配列に基づくL. monocytogenesの分類系統樹を示す図である。

[図2]新たに分類系統樹に追加された菌グループにおけるhlyA遺伝子の1126-1527（402bp）塩基部分のCLUSTAL W multiple sequence alignmentを示す図である。

[図3] inlA遺伝子内の塩基配列に基づくL. monocytogenesの分類系統樹を示す図である。

[図4]新たに分類系統樹に追加された菌グループにおけるinlA遺伝子の1192-1799（608bp）塩基部分のCLUSTAL W multiple sequence alignmentの一部を示す図である。

[図5]図4の続図である。

[図6] clpC遺伝子内の塩基配列に基づくL. monocytogenesの分類系統樹を

示す図である。

[図7]新たに分類系統樹に追加された菌グループにおける c l p C 遺伝子の 489-1124 (636bp) 塩基部分の CLUSTAL W multiple sequence alignment を示す図である。

[図8] p l c A 遺伝子内の塩基配列に基づく L. monocytogenes の分類系統樹を示す図である。

[図9]新たに分類系統樹に追加された菌グループにおける p l c A 遺伝子の 153-865 (713bp) 塩基部分の CLUSTAL W multiple sequence alignment の一部を示す図である。

[図10]図9の続図である。

[図11]MLST 57 グループの分類系統樹を示す図である。

[図12] (a) (b) はプライマーセット7を用いた L. monocytogenes (一部) の検出における蛍光強度の増加曲線であって、(a) は積分値、(b) は微分値を示す。(c) は RT-PCR 終了後の電気泳動図である。(c) の下部に記載された数字は菌株 No. である。

[図13] (a) (b) はプライマーセット7を用いた L. monocytogenes (残部) の検出における蛍光強度の増加曲線であって、(a) は積分値、(b) は微分値を示す。(c) は RT-PCR 終了後の電気泳動図である。(c) の下部に記載された数字は菌株 No. である。

[図14] (a) (b) はプライマーセット7を用いた L. monocytogenes 以外の菌の検出における蛍光強度の増加曲線であって、(a) は積分値、(b) は微分値を示す。(c) は RT-PCR 終了後の電気泳動図である。(c) の下部に記載された数字は菌株 No. である。

[図15] (a) はタカラバイオ社のキットを用いた L. monocytogenes (一部) の検出における蛍光強度の増加曲線 (積分値)、(b) は RT-PCR 終了後の電気泳動図である。(b) の下部に記載された数字は菌株 No. である。

[図16] (a) はタカラバイオ社のキットを用いた L. monocytogenes (一部)

の検出における蛍光強度の増加曲線（積分値）、（b）（c）はR T－P C R終了後の電気泳動図である。（b）（c）の下部に記載された数字は菌株N o. である。

[図17]（a）はタカラバイオ社のキットを用いたL. monocytogenes以外の菌の検出における蛍光強度の増加曲線（積分値）、（b）はR T－P C R終了後の電気泳動図である。（b）の下部に記載された数字は菌株N o. である。

[図18]（a）はA B I社のキットを用いたL. monocytogenes（一部）の検出における蛍光強度の増加曲線（積分値）、（b）はR T－P C R終了後の電気泳動図である。（b）の下部に記載された数字は菌株N o. である。

[図19]（a）はA B I社のキットを用いたL. monocytogenes（残部）の検出における蛍光強度の増加曲線（積分値）、（b）（c）はR T－P C R終了後の電気泳動図である。（b）（c）の下部に記載された数字は菌株N o. である。

[図20]（a）はA B I社のキットを用いたL. monocytogenes以外の菌の検出における蛍光強度の増加曲線（積分値）、同図（b）はR T－P C R終了後の電気泳動図である。（b）の下部に記載された数字は菌株N o. である。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明は、L. monocytogenes（以下、「リステリア菌」とのみ表記する場合がある）を検出する際に、リステリア菌のh l y A遺伝子における特徴的な塩基変異部分を増幅させるために、配列番号1に示す塩基配列を有するプライマーと配列番号12～16及び18～20に示す何れかの塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、若しくは配列番号11に示す塩基配列を有するプライマーと配列番号4に示す塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットを用いることに特徴がある。つまり、本発明のプライマーセットを用いてリステリア菌のh l y A遺伝子を増幅させる点が特許文献3に記載された方法と異なるものの、検出されたリステリア菌の分類・同定方法は、当該特許文献における考え方とは何ら異なるものでは

ない。従って、本発明のプライマーセットを用いて増幅された h l y A 遺伝子をはじめ、c l p C 遺伝子、i n l A 遺伝子、p l c A 遺伝子における特徴的な塩基置換の類型化（グループ化）は、特開 2007-312660 号公報に記載された方法と同一であり、本発明において、グループ化の説明部分は特開 2007-312660 号の記載が援用される。

[0019] 本発明においては h l y A 遺伝子の増幅に、配列番号 1 に示す塩基配列を有するプライマー（forward）と配列番号 12～16 及び 18～20 に示す何れかの塩基配列を有するプライマー（reverse）とからなるプライマーセット（プライマーセット No. 1～5 及び 7～9）若しくは配列番号 11 に示す塩基配列を有するプライマー（reverse）と配列番号 4 に示す塩基配列を有するプライマー（forward）とからなるプライマーセット（プライマーセット No. 12）の何れかが用いられる。この中でも、プライマーセット 7 に示す配列番号 1 で示される塩基配列を有するプライマー（forward）と配列番号 8 で示される塩基配列を有するプライマー（reverse）のプライマーセットが好ましく用いられる。食中毒の原因菌とされる大腸菌 O157 を検出せず、広範囲の DNA 濃度（0.0001～100 ng/ml）で検出することができる。

[0020] 次に下記の実施例に基づいて本発明について詳細に説明する。

実施例 1

[0021] [リステリア菌の分類]

新たに臨床的に分離されたリステリア菌（臨床株）及び食品・環境から分離されたリステリア菌（食品・環境由来株）90 株について、下記方法に基づき、h l y A 遺伝子、c l p C 遺伝子、i n l A 遺伝子、p l c A 遺伝子の各一塩基置換についてグループ化を行った。

[0022] (L. monocytogenes h l y A 遺伝子部分塩基配列の決定)

被検菌株を TSB 5ml で 37℃、一晚静置培養し、培養液 1ml を 5,100 × g で 10 分間遠心分離して集菌後、DNA Tissue Kit（キアゲン社）を用い、付属のプロトコールに従ってゲノム DNA の調製を行った。

[0023] h l y A 遺伝子の内部塩基配列を増幅するための P C R に用いるプライマーとして、既に全塩基配列が決定されている *L. monocytogenes* EDG-e 株（血清型 1/2a）および F2365（血清型 4b）において共通性の高い塩基配列部分から作成された F 2 - R 2 プライマーセット（F 2 : AAATCATCGACGGCAACCT（配列番号 1）、R 2 : ATTTGGGATAAAGCGTGGTG（配列番号 1 1））を用いた。このプライマーセットは、h l y A 遺伝子の 1 0 7 0 - 1 5 5 8 塩基対を増幅するためのものである。なお、F 2 プライマー及び R 2 プライマーはそれぞれ特許文献 3 において用いられたプライマーと同じである。増幅は、熱変性（9 5 °C、1 min）の後、9 5 °C、3 0 sec → 5 5 °C、3 0 sec → 7 2 °C、6 0 sec の反応を 3 5 サイクル行った。P C R 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した後、市販の P C R 産物精製キットで精製し、その塩基配列は株式会社バイオマトリックス研究所（千葉県流山市）に依頼して決定した。

[0024] （h l y A 遺伝子の類型化）

塩基配列の決定の結果、h l y A 遺伝子におけるグループは、特許文献 3 に開示された 9 グループから 5 グループ増えて計 1 4 グループに類型化された。表 1 には、h l y A 遺伝子におけるグループ分けを示した。この表 1 には、特許文献 3 に示された菌株 1 2 6 株（菌株番号 4 0、4 1、4 3、7 2、1 1 6 は欠番）と、今回新たにグループ化された菌株 6 6 株（菌株番号 1 3 2 ~ 1 9 7）の計 1 9 2 株すべてについて、改めてグループ化した結果が示されている。その系統樹（Neighbor joining 法による）を図 1 に示した。また、追加された 5 グループ（グループ 1 0 ~ 1 4）の S N P を含む配列部分（1 1 2 6 - 1 5 2 7 b p）を図 2 及び配列番号 2 1 ~ 2 5（それぞれグループ 1 0 ~ 1 4 に対応）に示した。

[0025]

[表1]

グループ 番号	食品環境由来株										臨床由来株		
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b
1		19,22,26,27,29, 30,31,102,103, 105,139,167							24	140		175,178	
2		107											
3		74,134,135			63,67		F2365,3,6,7,14,15, 16,20,28,45,46,51, 53,54,55,56,57, 58,60,61,64, 145,146,147,148, 149,150,161,162, 164,169,170,193,					122,124, 173,179, 183	125,126, 128,129, 130,131, 182,184, 185,186, 197
4		18,42,47,49,50,68, 69,70,71,73,75,76, 77,78,79,80,81,82, 83,84,85,86,87,88, 89,90,91,92,93,94, 95,96,97,98,99, 100,142,187, 188,192			44,48, 163				62			123	127
5	2,4,5,9,10,11, 12,36,143, 159,165		23			25				108,109	117,118,119, 120,121, 174,180		
6	EDG-e,1,8,17,33, 34,37,38,133,136, 137,160,166,171, 190,191,194,196		32 151,152,153, 154,155,156, 157,158								172,177		
7	65,66,144			115						110,111,113	176		
8			13										
9	21,35,39,101, 104,106,112, 132,141,195									114	181		
10	189												
11								168					
12	138												
13							52						
14						59							

[0026] h l y A遺伝子と同様に特許文献3に記載された方法に準じて、i n l A遺伝子、c l p C遺伝子、p l c A遺伝子の各一塩基置換についてもグルー

プ化を行った。その結果をそれぞれ表 2～表 4 に示した。この結果、i n l A 遺伝子ではこれまでの 17 グループから 27 グループに、c l p C 遺伝子ではこれまでの 14 グループから 17 グループに、p l c A 遺伝子ではこれまでの 21 グループから 30 グループにそれぞれ増加した。改めてグループ化された i n l A 遺伝子の系統樹が図 3 に示され、i n l A 遺伝子において追加された 11 グループの S N P を含む配列部分（1192－1799 b p）が図 4～5 及び配列番号 26～35（それぞれグループ 18～27 に対応）に示された。改めてグループ化された c l p C 遺伝子の系統樹が図 6 に示され、c l p C 遺伝子において追加された 3 グループの S N P を含む配列部分（489－1124 b p）が図 7 及び配列番号 36～38（それぞれグループ 15～17 に対応）に示された。また、改めてグループ化された p l c A 遺伝子における系統樹が図 8 に示され、p l c A 遺伝子において追加された 9 グループの S N P を含む塩基配列（153－865 b p）が図 9～10 及び配列番号 39～47（それぞれグループ 22～30 に対応）に示された。

[0027]

[表2]

Group	食品・環境由来株										臨床株		
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b
1			13,151,153, 154,156,158										
2	EGD-e,17,33,34,133,137, 191,194		32, 152,155,157								172		
3	1,8,190,196												
4	65,66												
5	138,144			115						110,111	176		
6	2,4,5,9,10,11,12,36, 143,159,165,189			23		25				108,109, 113	117,118,121, 174,180		
7											120		
8	21,35,37,38,39,101,104,106, 112,132,136,141,166										181		
9											119		
10		19,22,26,27,29,30, 102,103,105,107										175,178	
11		31											
12		18,42,47,49,50,68,69,70,71,73,74, 75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85, 86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96, 97,98,99,100,142,187,188,192			44, 48, 163					114, 140		123,124, 173, 179,183	197
13													127
14					63, 67		F2365,3,6,7,14,15,16,20,28,45, 46,51,52,53,54,55,56,57,58,59, 60,61,64,145,146,147,148,150, 161,162,164,169,170,193	24, 62					125,129, 130,131, 182,185, 186
15													128
16													126
17												122	
18	160												
19							149						
20											177		
21	195												
22		167											
23													
24	171												184
25		139											
26		134,135											
27								168					

[0028] [表3]

Group	食品・環境由来株										臨床株		
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b
1	21,35,39,101,104, 106,112,132,141, 195										181		
	2,4,5,9,10,11, 12,36,143,159, 165,189			23		25				108, 109	117,118, 174,180		
3	EDG-e, 17,33,133,137, 144,191,194		13,32, 151,152,153,154, 155,156,157,158	115						110, 111, 113	172,176		
4	34												
5											121		
6											120		
7											119		
8	37,38,65,66										177		
9	1,8,190,196												
10													
11								3					
12		18,42,47,49,50,68,69,70,71, 73,74,75,76,77,78,79,80,81, 82,83,84,85,86,87,88,89,90, 91,92,93,94,95,96,97,98,99, 100,187,188			48					114		123	127
		19,22,26,27,29,30,31, 102,103,105,107,134, 135,139,142, 167,192			44, 163		F2365, 6,7,15,16,28, 149,161,162, 164,169,193		24	140		122,124, 173,175, 178,179, 183	125,126,128, 129,131,184, 185,186,197
14					63, 67		20,45,46,51,52, 53,54,55,56,57, 58,59,60,61,64, 145,146,147,148 150,170,		62				130, 182
15	136, 160,166,171												
16	138												
17								168					

[0029] [表4]

[illegible]

[0030] これらの結果から、これまでに分離された臨床株、食品・環境株計 192 株の MLST は、表 5 及び図 11 に示す計 57 グループに分類された。また、各菌株の属性が表 6 及び表 7 に示された。これらの菌株について血清型による分類から見ると、血清型 1/2a では食品・環境株は 17 の群に、臨床株は 8 つの群に分類された。これらのうち食品・環境株は特定のグループに集中することはなかったが、臨床株は 11 株中 4 株が MLST グループ 45 にまとまって分類され、当該 MLST グループ 45 が比較的病原性が高いと類推される。一方、血清型 1/2b では食品・環境株は 11 の群に、臨床株は 5 つの群に分類された。これらのうち、食品・環境株は MLST グループ 4 及び 13 にまとまって分類されたが、臨床株は特定のグループに集中して分類されることはなかった。血清型 4b では食品・環境株、臨床株共に MLST グループ 7 群に分類され、そのほとんどが MLST グループ 22 及び 24 に分類された。

[0031] 従って、調査対象となる検体から検出されたリステリア菌が、MLST グループ 22、24、45 に属すると判断されるならば当該リステリア菌は病原性が高いものと類推される。一方、MLST グループ 4 及び 13 に属すると判断されるならば当該リステリア菌が病原性である可能性が低いものと類推される。

[0032]

[表5]

MLST	各遺伝子型による分類				備考
	hly	inlA	clpC	plcA	
1	3	16	13	3	
2	3	23	13	3	
3	1	12	13	4	
4	1	10	13	9	
5	1	22	13	9	
6	1	11	13	9	
7	2	10	13	9	
8	1	25	13	8	
9	3	26	13	24	
10	3	12	13	24	
11	4	12	13	2	
12	4	12	13	8	
13	4	12	12	8	
14	4	12	12	10	
15	4	12	12	5	
16	9	12	12	6	
17	4	13	12	7	
18	3	12	12	8	
19	3	12	13	28	
20	3	12	13	4	
21	3	14	10	8	
22	3	14	13	8	
23	3	14	11	8	
24	3	14	14	3	
25	13	14	14	3	
26	14	14	14	3	
27	4	14	14	3	
28	3	19	13	22	
29	3	15	13	12	
30	3	17	13	11	
31	1	14	13	1	
32	11	27	17	29	InlA 741-746aa欠失
33	6	3	9	13	
34	7	4	8	15	
35	12	5	16	25	
36	8	1	3	19	Truncated inlA (526aa)
37	6	1	3	19	Truncated inlA (526aa)
38	6	2	3	19	Truncated inlA (684aa)
39	6	2	4	19	Truncated inlA (699aa)
40	6	2	3	21	
41	6	24	15	30	
42	7	5	3	21	
43	7	6	3	21	
44	6	18	15	23	
45	5	6	2	16	
46	5	6	2	17	
47	5	6	2	18	
48	5	6	5	16	
49	10	6	2	16	
50	5	9	7	16	
51	5	7	6	16	
52	9	8	1	14	
53	9	8	1	26	
54	9	21	1	27	Truncated inlA (491aa)
55	6	8	15	23	
56	6	8	8	20	
57	6	20	8	25	

[0033] [表6]

Group	Strain No.														
	Strain from food and environment										Clinical strain				
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b	4b	
1														126	
2														184	
3										140					
4		19,22,26,27,29,30,102,103,105										175,178			
5		167													
6		31													
7		107													
8		139													
9		134,135										173,183			
10															
11		142			44										
12		192			163										
13		18,42,47,49,50,68,69,70,71,73,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,96,97,98,99,100,187,188										123			
14		95													
15					48										
16										114					
17														127	
18		74													
19														197	
20												124,179			
21									3						
22									6,7,15,16,28,161,162,164,169,193, F2365				125,129,131, 185,186		
23									14						
24					63, 67				20,45,46,51,53,54,55,56,57,58,60, 61,64,145,146,147,148,150,170,				130,182		
25									52						
26									59						
27										62					
28									149						
29														128	
30												122			

[0034] [表7]

Group	Strain No.													
	Strain from food and environment										Clinical strain			
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4c	4e	UT	1/2a	1/2b	4b	
31									24					
32								168						
33	1,8,190,196													
34	65,66													
35	138													
36		13												
37			151,153,154,156,158											
38	17,33,137,EGD-e		32,152,155,157								172			
39	34													
40	133,191,194													
41	171													
42	144			115						110,111	176			
43										113				
44	160													
45	2,4,5,9,12,36,143,159,165			23		25				108,109	117,118,174,180			
46	11													
47	10													
48											121			
49	189													
50											119			
51											120			
52	21,35,39,101,104,106,112,132,141													
53											181			
54	195													
55	136,166													
56	37,38													
57											177			

[0035] [新たな h l y A 遺伝子検出用のプライマーセットの設計]

次に、上記で決定された塩基配列をもとに試験を行った全てのリステリア菌で保存され、リステリア菌の類縁菌である L. ivanovii 及び L. seeligeri で S N P の多い領域の塩基配列から数種のプライマーを作製し、その検出精度の検討を行った。ここでは、遺伝子型グループ間で最も S N P が少なく、プライマーの塩基配列を決定しやすいと考えられた h l y A 遺伝子の塩基配列を基にプライマーセットを設計した。そして、表 8 に示す 18 通りの組み合わせで P C R 反応を行い、最も検出感度および特異性の高いプライマーセットを選択した。用いられたプライマーの塩基配列を表 9（配列番号 1～20）に示す。

[0036] [表8]

セットNo.	forward	reverse
1	F2(配列番号1)	R1153(配列番号12)
2	F2(配列番号1)	R1298(配列番号13)
3	F2(配列番号1)	R1348(配列番号14)
4	F2(配列番号1)	R1361(配列番号15)
5	F2(配列番号1)	R1369(配列番号16)
6	F2(配列番号1)	R1375(配列番号17)
7	F2(配列番号1)	R1401(配列番号18)
8	F2(配列番号1)	R1464(配列番号19)
9	F2(配列番号1)	R1489(配列番号20)
10	F1138(配列番号2)	R2(配列番号11)
11	F1281(配列番号3)	R2(配列番号11)
12	F1340(配列番号4)	R2(配列番号11)
13	F1353(配列番号5)	R2(配列番号11)
14	F1384(配列番号6)	R2(配列番号11)
15	F1444(配列番号7)	R2(配列番号11)
16	F1450(配列番号8)	R2(配列番号11)
17	F1461(配列番号9)	R2(配列番号11)
18	F1471(配列番号10)	R2(配列番号11)

[0037]

[表9]

プライマー名	hlyA構造遺伝子上の位置	塩基長 (bp)	塩基配列 (5'-3')
F2	1070-1088	19	AAATCATCGACGGCAACCT(配列番号1)
F-1138	1138-1155	18	ACACCAGGAGTTCCCAT(配列番号2)
F-1281	1281-1298	18	CGTTGCTCAATTCAACAT(配列番号3)
F-1340	1340-1359	20	TTGTTCAACATAAAAACTGG(配列番号4)
F-1353	1353-1370	18	AAACTGGAGCCAAAACAA(配列番号5)
F-1384	1384-1401	18	GCTCATTTACATCGTCC(配列番号6)
F-1444	1444-1463	20	AAAGAATGCACTGGTTTAGC(配列番号7)
F-1450	1450-1468	19	TGCACTGGTTTAGCTTGGG(配列番号8)
F-1461	1461-1479	19	AGCTTGGAATGGTGGAGA(配列番号9)
F-1471	1471-1489	19	TGGTGGAGAACGGTAATTG(配列番号10)
R2	1558-1539	20	ATTTCCGATAAAGCGTGGTG(配列番号11)
R-1153	1153-1135	19	TGGGAACCTCCTGGTGTTC(配列番号12)
R-1298	1298-1281	18	ATGTTGAATTGAGCAACG(配列番号13)
R-1348	1348-1327	20	GTTGAACAATTCGTTACCT(配列番号14)
R-1361	1361-1340	22	CTCCAGTTTTTATGTTGAACAA(配列番号15)
R-1369	1369-1349	21	TGTTTTCGCTCCAGTTTTTAT(配列番号16)
R-1375	1375-1356	20	TTTTATTGTTTCGCTCCAG(配列番号17)
R-1401	1401-1384	18	GGACGATGTGAAATGAGC(配列番号18)
R-1464	1464-1444	21	AGCTAAACCAAGTGCATTCTTT(配列番号19)
R-1489	1489-1471	19	CAATTACGTTCTCCACCA(配列番号20)

[0038] (供試菌と鋳型DNA濃度)

供試菌として *L. monocytogenes* No. 4 株を選択した。鋳型ゲノムDNA濃度を $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.0\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.01\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.001\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.0001\text{ ng}/\mu\text{l}$ とした。また、大腸菌 O157 のゲノムDNA ($45\text{ ng}/\mu\text{l}$) をNegative controlに用いた。

[0039] (リアルタイムPCRの条件)

反応にはSYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ社) を用いた。Mx3000P (登録商標) Real-Time PCR System (STRATAGENE社) を用いて以下の条件でリアルタイムPCR (RT-PCR) を行った。

[0040] <反応液組成>

2 × SYBR <u>Premix Ex Taq</u>	$5.0\ \mu\text{l}$
Forward primer (20 mM)	$0.1\ \mu\text{l}$
Reverse primer (20 mM)	$0.1\ \mu\text{l}$
50 × Rox Reference Dye II	$0.2\ \mu\text{l}$

Template	0.4 μ l
水	4.2 μ l
Total	10.0 μ l

〈反応条件〉 サイクル数：35サイクル

95°Cで10min、

95°C 5sec、57°C 15sec、72°C 10secを1サイクルとした。

[0041] 各プライマーセットによるリアルタイムPCR検出結果を表10に示す。表10は各鋳型濃度ごとにCt値の低い順（検出感度の高い順）にプライマーセットの番号を上から下に並べたものである。プライマーセット6, 10, 11及び13～18ではNegative controlである大腸菌O157（鋳型DNA濃度45ng/ml）でも強い増幅が認められたため、これらの結果は表10には記載されていない。この試験では、プライマーセット7が各鋳型濃度で平均的に検出感度が高いことが示された。このプライマーセット7によって、L. monocytogenesを特異的かつ高感度に検出できると言える。もっとも、プライマーセット7以外の各プライマーセット（プライマーセット1～5, 8, 9, 12）においても、同様にhlyA遺伝子増幅用のプライマーセットとして用いることができる。これらのプライマーセットも、プライマーセット7と同様に大腸菌O157を検出せず、L. monocytogenesを特異的に検出できると言える。

[0042]

[表10]

	鋳型DNA濃度(ng/ml)						
	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
C t 値(検 出感 度の 低い 順 の 高い 順)	7	7	7	7	12	12	7
	3	3	3	12	7	7	12
	5	4	12	3	3	3	3
	8	5	5	5	5	5	5
	12	12	4	8	4	4	4
	4	8	8	4	8	1	1
	9	9	9	9	1	9	8
	2	2	1	1	9	8	2
	1	1	2	2	2	2	9

[0043] [L. monocytogenes検出用市販PCRキットとの比較]

次に、上記プライマーセット7と市販されているL. monocytogenes検出用キットとの検出比較を行った。供試菌には、今回分類されたMLST 57グループのうちから遺伝子型の異なる49グループについて、各グループから任意に取り出した代表株各1株と、L. monocytogenes以外のリステリア属細菌とリボプリンターシステムで同定されたリステリア属細菌12株の菌株を用いてリアルタイムPCRを行った。鋳型としてDNA濃度が5pg/ μ lのものをそれぞれ1 μ l用いた。市販品にはタカラバイオ社CycleavePCR（登録商標） L. monocytogenes (inlA gene) Detection KitおよびABI社遺伝子増幅キットTaqMan（登録商標） L. monocytogenes Detection Kitを用いた。各キットによる検出は、各附属の方法に従って実施した。鋳型としては同様にDNA濃度5pg/ μ lのものをそれぞれ1 μ l用いた。Mx3000P（登録商標） Real-Time PCR System（STRATAGENE社）を用いてリアルタイムPCRを行ない、得られた各菌株毎のCt値を表11、12に示した。表11はL. monocytogenesの結果を、表12はそれ以外の菌株の結果を示す。また、プライマーセット7を用いた検出における蛍光強度の増加曲線及び反応終了後の電気泳動写真を図12～14に示す。同様にタカラバイオ社のキットによる結果を図15～17に、ABI社のキットによる結果を図18～20に示す。なお、電気泳動では、図15～17では4%のゲルが使用され、その他では1.5%

のゲルが使用された。

[0044] [表11]

菌種	MLSTによる分類	菌株番号	Ct値		
			タカラバイオ社 Listeria monocytogenes Detection Kit	ABI社 TaqMan® Listeria monocytogenes Detection Kit	プライマーセット7 による検出
L. monocytogenes	21	3	30.45	27.17	25.6
L. monocytogenes	45	5	31.25	28.48	26.81
L. monocytogenes	22	7	31.09	29.23	27.27
L. monocytogenes	33	8	29.34	26.1	25.41
L. monocytogenes	47	10	32.26	27.22	28.03
L. monocytogenes	46	11	30.85	27.81	28.7
L. monocytogenes	36	13	31.7	28.64	27.64
L. monocytogenes	23	14	31.86	29.25	28.98
L. monocytogenes	4	30	31.87	28	28.82
L. monocytogenes	6	31	29.52	26.69	28.04
L. monocytogenes	38	33	29.35	27.91	27.11
L. monocytogenes	39	34	32.3	28.86	27.91
L. monocytogenes	56	38	29.97	26.3	25.4
L. monocytogenes	52	39	31.62	26.8	29.01
L. monocytogenes	15	48	31.05	28.09	28.7
L. monocytogenes	25	52	30.65	28.16	27.7
L. monocytogenes	24	53	32.59	28.93	26.97
L. monocytogenes	26	59	30.56	28.02	27.39
L. monocytogenes	27	62	30.59	30.27	24.65
L. monocytogenes	34	66	30.93	30.09	23.91
L. monocytogenes	13	70	30.61	29.93	24.59
L. monocytogenes	18	74	31.19	30.34	25.47
L. monocytogenes	14	95	30.41	29	24.17
L. monocytogenes	7	107	30.81	29.4	23.92
L. monocytogenes	43	113	31.3	30.09	25.4
L. monocytogenes	16	114	31.36	30.49	25.81
L. monocytogenes	9	135	30.76	29.79	23.87
L. monocytogenes	35	138	30.6	29.63	24.74
L. monocytogenes	8	139	30.25	29.64	24.81
L. monocytogenes	3	140	30.42	29.83	25.18
L. monocytogenes	11	142	30.41	29.68	25.12
L. monocytogenes	42	144	30.7	29.96	24.88
L. monocytogenes	28	149	30.61	30.05	25.66
L. monocytogenes	37	153	30.55	30.07	24.54
L. monocytogenes	44	160	31.37	30.18	24.27
L. monocytogenes	55	166	30.47	29.43	24.99
L. monocytogenes	5	167	30.87	29.79	25.26
L. monocytogenes	32	168	30.9	29.87	23.93
L. monocytogenes	41	171	30.72	29.52	25.06
L. monocytogenes	10	173	30.74	29.95	25.03
L. monocytogenes	57	177	31.1	29.99	23.8
L. monocytogenes	20	179	31.22	29.46	24.46
L. monocytogenes	53	181	31.37	31.08	24.9
L. monocytogenes	2	184	30.38	30.09	24.59
L. monocytogenes	49	189	31.4	30.39	24.39
L. monocytogenes	40	191	30.88	29.75	23.96
L. monocytogenes	12	192	31.51	29.79	24.73
L. monocytogenes	54	195	31.7	30.67	24.77
L. monocytogenes	19	197	29.87	29.92	24.57

[0045]

[表12]

L.monocytogenes以外のListeria属細菌					
<i>L. innocua</i>		LIS30	34.04	41.48	No Ct
<i>L. innocua</i>		LIS31	35.37	39.42	No Ct
<i>L. seeligeri</i>		LIS33	44.55	37.75	No Ct
<i>L. seeligeri</i>		LIS34	35.23	37.13	No Ct
<i>L. welshimeri</i>		LIS35	No Ct	35.79	36.88
<i>L. welshimeri</i>		LIS36	34.33	34.99	41.08
<i>L. grayi</i>		LIS37	33.56	35.07	38.06
<i>L. welshimeri</i>		40	44.64	35.34	No Ct
<i>L. innocua</i>		41	33.17	36.2	No Ct
<i>L. innocua</i>		42	35.07	37.66	34.9
<i>L. innocua</i>		43	35.49	36.57	No Ct
<i>L. innocua</i>		50	31.8	32.74	32.49

[0046] 本発明のプライマーセット及びタカラバイオ社及びA B I社キットでも全てのL. monocytogenes株を検出できた。しかしながら、新たに設計されたプライマーセット7を用いた場合には、L. monocytogenes以外のリステリア属細菌では2株のL. innocuaで増幅が認められたが、他のL. monocytogenes以外のリステリア属細菌（LIS30, LIS31, LIS33, LIS34, LM40, LM41, LM43）では目的の産物は増幅されなかった（図14参照）。これに対してタカラバイオ社のキットでは、L. monocytogenes以外のリステリア属細菌9株でバンドの増幅が認められたが、他のLIS33, LIS35, LM40株では増幅が認められなかった（図17参照）。A B I社のキットでは、L. monocytogenes以外のリステリア属細菌では1株（LIS30）のL. innocuaではCt値が41.48と40サイクル以上であったが、他のL. monocytogenes以外のリステリア属細菌では40サイクル以前に蛍光強度の立ち上がりが認められた。なお、A B I社のキットでは、I P Cと目的遺伝子の増幅産物のサイズがほとんど同じ為バンドが分離できず、L. monocytogenes以外の全ての株で増幅が認められた（図20参照）。

[0047] これらの結果から、プライマーセット7では、全てのL. monocytogenesを検出でき、更にL. monocytogenes以外のリステリア属細菌を検出してしまう率は、市販のキットよりもかなり低く、L. monocytogenesに対する特異性が高いことが示された。

[0048] 以上のように、本発明のプライマーセット、特に配列番号1に示される塩

基配列を有するプライマーと配列番号 18 に示される塩基配列を有するプライマーセットを用いて、RT-PCRを行うことにより、L. monocytogenesのみを比較的高い精度で検出することが可能になる。

請求の範囲

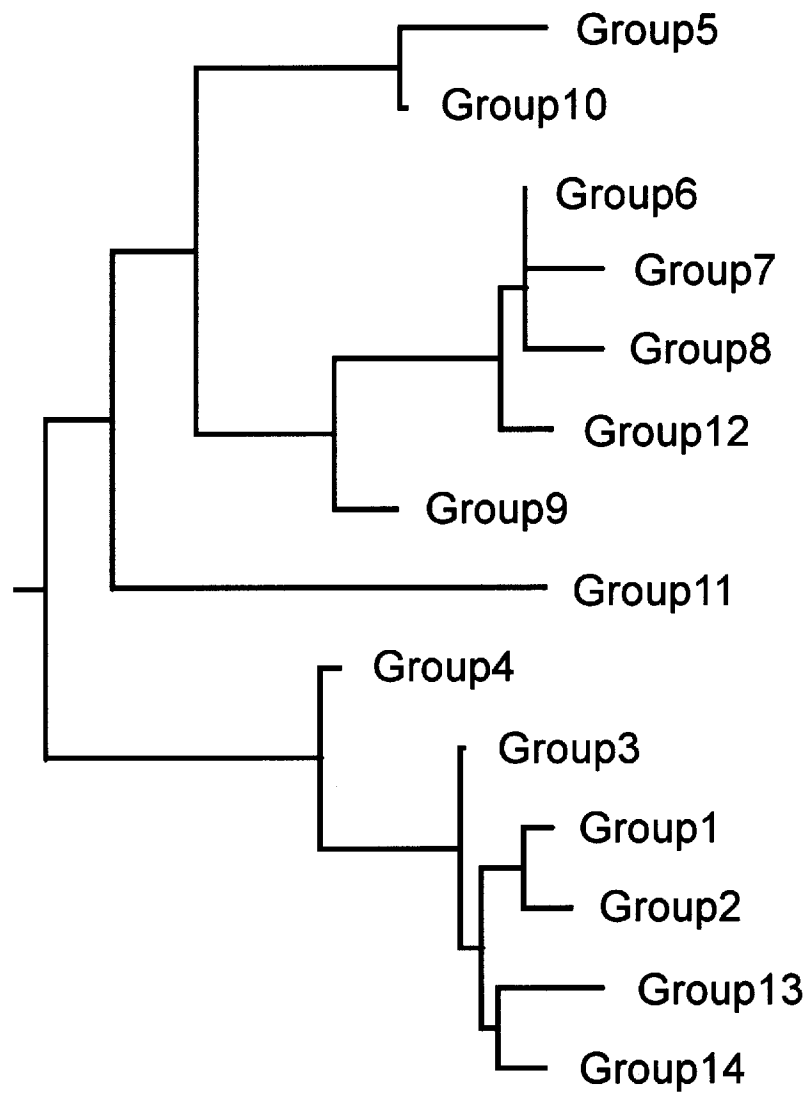
[請求項1] リステリア モノサイトゲネス菌 (*Listeria monocytogenes*) の hly A 遺伝子内の特定の一塩基置換を挟む配列領域を増幅する核酸増幅用プライマーセットであって、

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと配列番号 12 ~ 16 及び 18 ~ 20 に示される何れかの塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、若しくは配列番号 11 に示される塩基配列を有するプライマーと配列番号 4 に示す塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット。

[請求項2] リステリア モノサイトゲネス菌 (*Listeria monocytogenes*) の hly A 遺伝子内の特定の一塩基置換を挟む配列領域を増幅する核酸増幅用プライマーセットであって、

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと配列番号 18 に示される塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット。

[図1]

***hlyA* (1126-1527bp)**

120
 GAA TTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGATAATATTGAACAACACTTCAAAAGCTTATATACA
 GAA TTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGATAATATTGAACAACACTTCAAAAGCTTATATACA
 GAA TTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGATAATATTGAACAACACTTCAAAAGCTTATATACA
 GAA TTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGATAATATTGAACAACACTTCAAAAGCTTATATACA
 GAA TTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGATAATATTGAACAACACTTCAAAAGCTTATATACA

 240
 GATGAATAAAATTATGATCCTGAAGGTACGAAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA
 GATGAATAAAATTATGATCCTGCAGGTACGAAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA
 GATGAAGTAAATTATGATCCTGAAGGTACGAAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA
 GATGAATAAAATTATGATCCTGAAGGTACGAAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA
 GATGAATAAAATTATGATCCTGAAGGTACGAAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA

 360
 AATATTAATGTTTACGCCAAAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTA
 AATATTAATGTTTACGCCAAAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTA
 AATATTAATGTTTACGCTAAAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTA
 AATATTAATGTTTACGCTAAAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTA
 AATATTAATGTTTACGCTAAAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTA

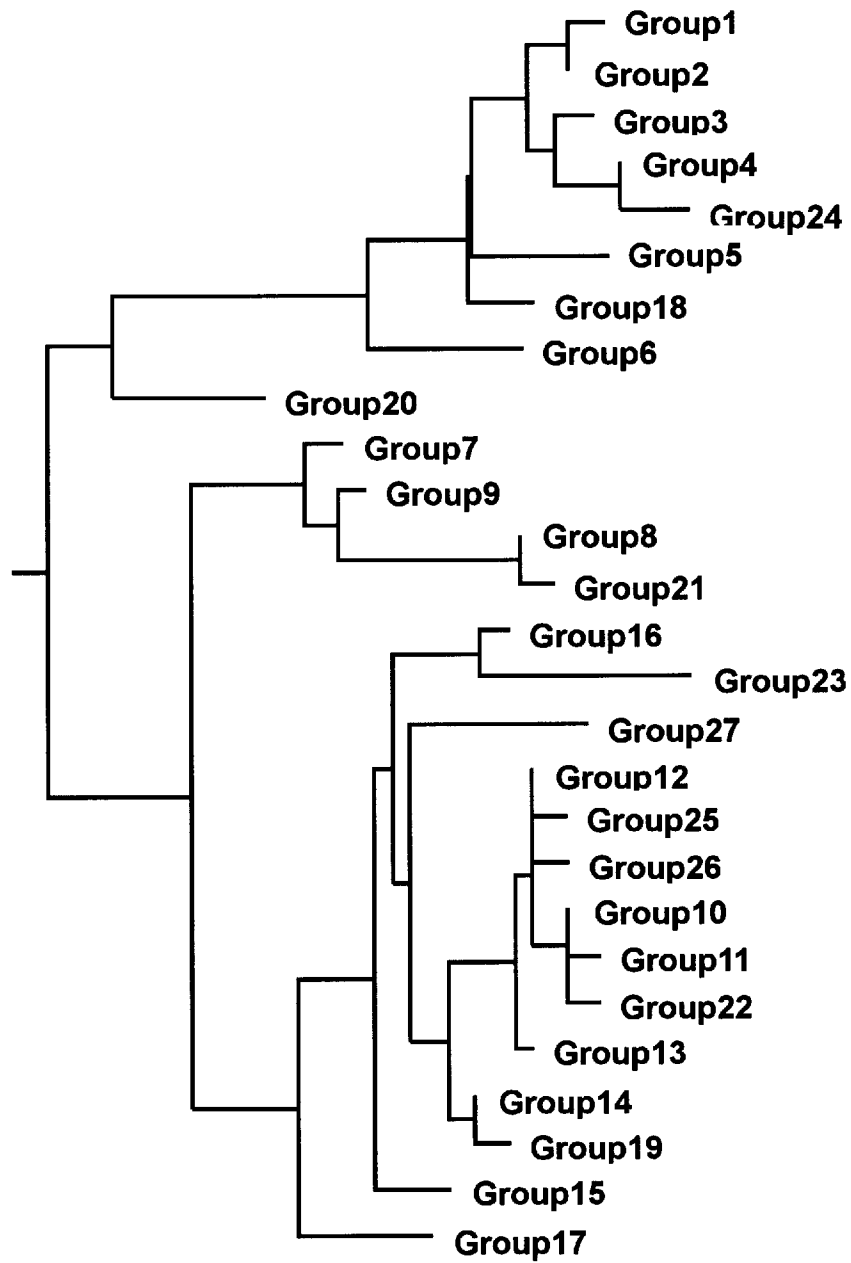
60
 TTTAATCGAGAAACACCCAGGAGTCCCATTCGTTATACAACAAACTTCCTAAAAGACAAT
 TTTAACC GGGAAACACCCAGGAGTCCCATTCGTTATACAAGAAATTCCTAAAAGACAAT
 TTTAATCGAGAAACACCCAGGAGTCCCATTCGTTATACAACAAACTTCCTAAAAGACAAT
 TTTAACC GGGAAACACCCAGGAGTCCCATTCGTTATACAACAAACTTCCTAAAAGACAAT
 TTTAATCGAGAAACACCCAGGAGTCCCATTCGTTATACAACAAACTTCCTAAAAGACAAT

 180
 GATGGAATAAATTAAATTGATCAGTCTGGAGGATAGTGTGCTCAATTCAACATCTCTTGG
 GATGGAATAAATTAAATCGACCAGTCTGGAGGATAGTGTGCTCAATTCAACATCTCTTGG
 GATGGAATAAATTAAATGATCAGTCTGGAGGATAGTGTGCTCAATTCAACATCTCTTGG
 GATGGAATAAATTAAATCGATCGATCAGTCTGGAGGATAGTGTGCTCAATTCAACATCTCTTGG
 GATGGAATAAATTAAATCGATCGATCAGTCTGGAGGATAGTGTGCTCAATTCAACATCTCTTGG

 300
 AACAAATAAAGCAAGTTAGTCAATTCACATCGTCCATCTATTGCCAGGTAACGCAAGA
 AACAAATAAAGCAAGTTAGTCAATTCACATCGTCCATCTATTGCCAGGTAACGCAAGA
 AACAAATAAAGCAAGTACGTCATTCACATCGTCCATCTATTGCCAGGTAACGCGAGA
 AACAAATAAAGTAAGCTAGTCAATTCACATCGTCCATCTATTGCCAGGTAACGCAAGA
 AACAAATAAAGTAAGCTAGTCAATTCACATCGTCCATCTATTGCCAGGTAACGCGAGA

402
 ATTGATGACCGGAACCTACCAGTTGTGAAAAATAGAAATATC
 ATTGATGACCGGAACCTACCAGTTGTGAAAAATAGAAATATC
 ATTGATGACCGGAACCTACCAGTTGTGAAAAATAGAAATATC
 ATTGATGACCGGAACCTACCAGTTGTGAAAAATATAGAAATATC
 ATTGATGACCGGAACCTACCAGTTGTGAAAAATATAGAAATATC

[図3]

***inlA*(1192-1799bp)**

[illegible]

Gruppo 18 ACTATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAAACCGTGACGACGCCACCTTAAGGCCAAATT
19 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACGACGCCACCTTAAGGCCAAATT
20 ACTATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAAACCGTGACGACGCCACCTTAAGGCCAAATT
21 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACGTAGCCACCTTAAGGCCAAATT
22 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACACAGCCACCTTAAGGCCAAATT
23 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGCGGAAACAGTGACGACGCCACCTTAAGGCCAAATT
24 ACTATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAAACCGTGACGACGCCACCTTAAGGCCAAATT
25 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACACAGCCACCTTAAGGCCAAATT
26 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACACAGCCACCTTAAGGCCAAATT
27 ACCATTGGAAAAGGAACGACAAACATTTAGTGGAACTGTGACGCCAGCCACCTTAAGGCCAAATT
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

[5]

420
 Gruop 18 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTCACACATTGTGGTTGGTTTGAT
 19 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTATACATTGTGGTGGTTTGAT
 20 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTCACACATTGTGGTTGGTTTGAT
 21 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTACACATTATGGTGGTTTGAT
 22 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTATACATTGTGGTGGTTTGAT
 23 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTACACATTATGGTGGTTTGAT
 24 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTCACACATTGTGGTTGGTTTGAT
 25 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTATACATTGTGGTGGTTTGAT
 26 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTATACATTGTGGTGGTTTGAT
 27 TTATTGACTGAACCCAGCTAAGCCGTTAAAGAAAGGTTATACATTGTGGTGGTTTGAT

 480
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC
 GCCCAAAACAGGGGGAACATAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATC

 *** ** *

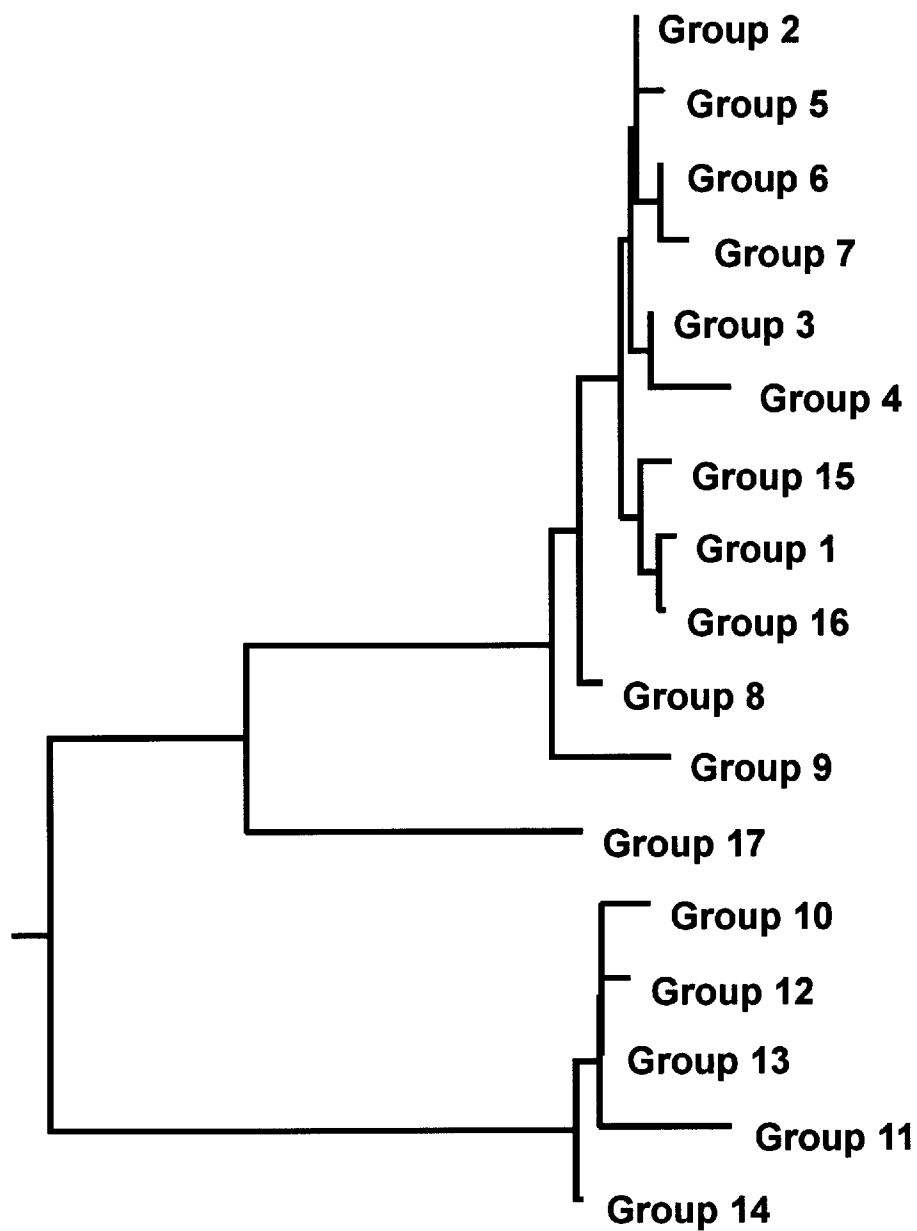
540
 Gruop 18 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGAGATGACGGTGTA
 19 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 20 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 21 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 22 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 23 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 24 AATTATATGACCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGAGATGACGGTGTA
 25 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 26 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA
 27 GATTATATGGGCAATTTTAGTATTAAAGCTACAGAGCAACCTTTGATATGACGGTGTA

 600
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACACCACCAACAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACACCACCAACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACGGCACCACCAAAAA
 ACAACATCTCAACAGTAGATTATCAAGGTTGTTACAAGAACCTACAGCACCACCAAAAA

 *** ** *

608
 Gruop 18 GAAGGTTA
 19 GAAGGTTA
 20 GAAGGTTA
 21 GAAGGTTA
 22 GAAGGTTA
 23 GAAGGTTA
 24 GAAGGTTA
 25 GAAGGTTA
 26 GAAGGTTA
 27 GAAGGTTA

[図6]

***clpC*(489-1124bp)**

[7]

120
 TCGTCTAAAGAAATCCAACGTGTGATTGAAGTACTTAGTCGGCGGACGAAAAATAACCC
 126 TCGTCTAAAGAAATCCAACGTGTGATTGAAGTACTTAGTCGGCGGACGAAAAATAACCC
 132 CCGTCTAAAGAAATCCAACGTGTGATTGAAGTACTTAGTCGGCGGACGAAAAATAACCC

 60

Gruop 15 TAGTTGGCACGTGACTTAACGGTTATTGCTCGGGAAGATAAATTTGGATCGGGTTATTGG
 16 TAGTTGGCACGTGACTTAACGGTTATTGCTCGGGAAGATAAATTTGGATCGGGTTATTGG
 17 TAGTTGGCACGTGACTTAACAGTTATTGCTCGGGAAGATAAATTTGGACCGGGTTATTGG

240
 AATTGTTCGTAATGAAGTACCTGAGACCTTACGTGGAAACGTTAATGACATTGGATAT
 AATTGTTCGTAATGAAGTACCTGAGACCTTACGTGGAAACGTTAATGACATTGGATAT
 AATTGTTCGTAATGAAGTACCTGAGACCTTACGTGGAAACGTTAATGACATTGGATAT

 180

Gruop 15 GGTACTCATTGGGAACCTGGTGTGCGTAAACAGCGATTGCTGAAGGCTTAGCGCAACA
 16 GGTACTCATTGGGAACCTGGTGTGCGTAAACAGCGATTGCTGAAGGCTTAGCGCAACA
 17 GGTACTCATTGGGAACCGGTGTTGGTAAACAGCGATTGCAGAGGCTTAGCGCAACA

360
 AATGGATGAAATTCGCAAGCTGGTAATGTTATTCTATTATTGATGAGTTGCATACITTT
 AATGGATGAAATTCGCAAGCTGGTAATGTTATTCTATTATTGATGAGTTGCATACITTT
 AATGGATGAAATTCGCAAGCTGGTAATGTTATTCTATTATTGATGAGTTGCATACITTT

 300

Gruop 15 GGGAACTGTTGTGGCAGGTACAAAATATCGTGGTGAATTCGAAGACCGTTTGAAGAAAGT
 16 GGGAACTGTTGTGGCAGGTACAAAATATCGTGGTGAATTCGAAGACCGTTTGAAGAAAGT
 17 GGGGACTGTTGTAGCTGGTGAACAAATATCGTGGTGAATTCGAAGACCGTTTGAAGAAAGT

480
 AGCTCGTGGAGAGTTGCAATGTATTGGGGCAACAACGCTCGACGAGTACCGTAAATATAT
 AGCTCGTGGAGAGTTGCAATGTATTGGGGCAACAACGCTGGACGAGTACCGTAAATATAT
 AGCTCGTGGAGAGTTGCAATGTATTGGGGCAACAACGCTGGATGAGTACCGTAAATACAT

 420

Gruop 15 AATTGGTGTGTTGGGGGGGAGGTGCGATTGATGCAATCGAATATCTTGAAGCGACCGCT
 16 AATTGGTGTGTTGGGGGGGAGGTGCGATTGATGCAATCGAATATCTTGAAGCGACCGCT
 17 AATCGGTGTGTTGGGGGGGAGGTGCGATTGATGCAATCGAATATCTTGAAGCGACCTCT

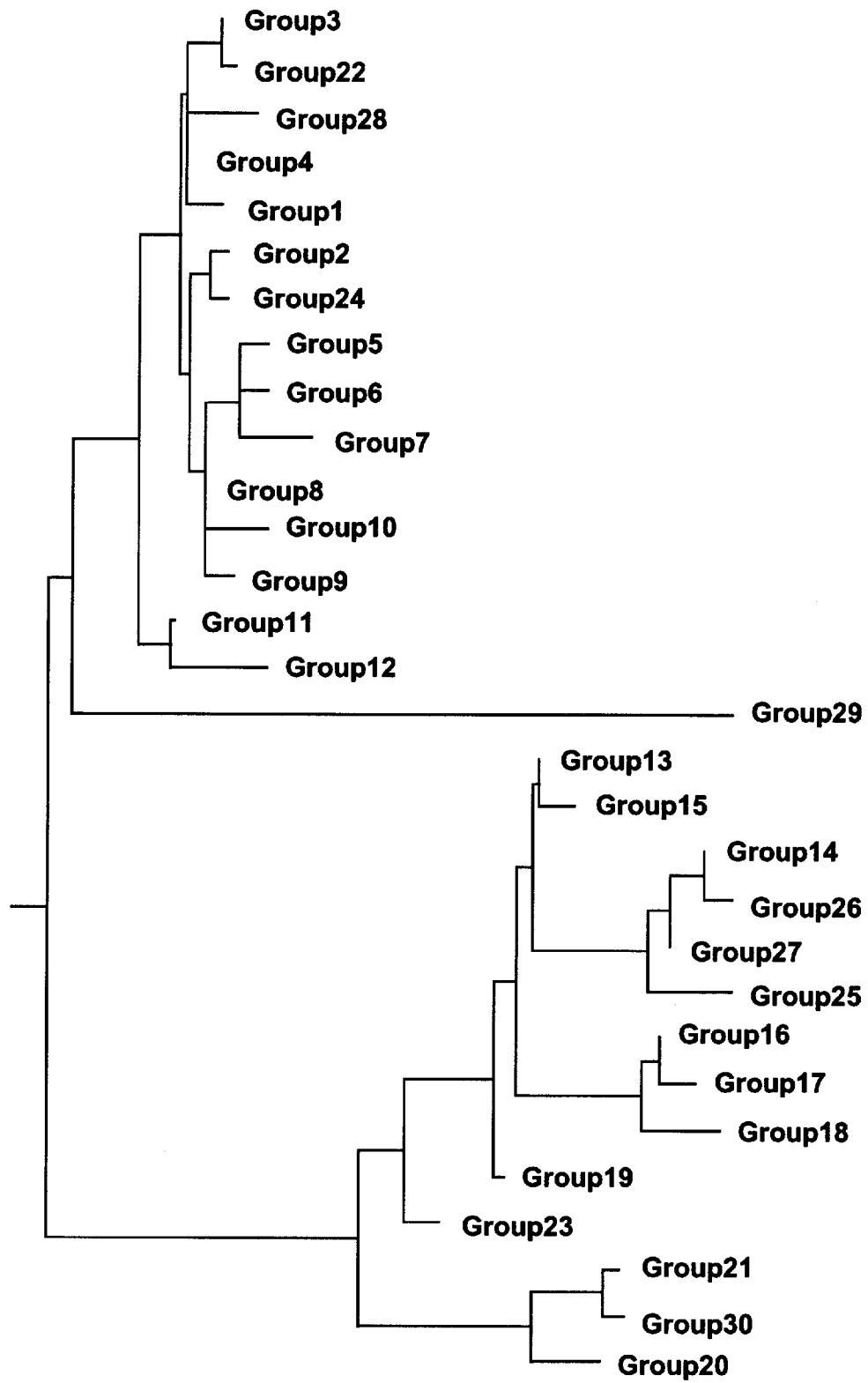
600
 AGAAGAATCTATTCAAAATTTTACATGGATTGGGTGATCGTTATGAAGCGCATCACCGAGT
 AGAAGAATCTATTCAAAATTTTACATGGATTGGGTGATCGTTATGAAGCGCATCACCGAGT
 AGAAGAATCTATTCAAAATTTTACATGGATTGGGTGATCGTTATGAAGCGCATCACCGTGT

 540

Gruop 15 TGAANAAGATGCTGGCTTGAGAGACGTTTCAACCGATTAAAGTAGACGAACCAACTGT
 16 TGAANAAGATGCTGGCTTGAGAGACGTTTCAACCGATTAAAGTAGACGAACCAACTGT
 17 CGAANAAGATGCGGGCTTGAGAGACGTTTCAACCAATCAAAGTAGATGAACCAACTGT

636
 Gruop 15 TGCAATTACGGATGAAGCATTGAGCGCGCTGTTCCG
 16 TGCAATTACGGATGAAGCATTGAGCGCGCTGTTCCG
 17 TGCAATTACGGATGAAGCTCTTGAGGCTGCTGTTCCG

[図8]

***plcA*(153-865bp)**

[9]

60
 Gruo 22 TCTACCTGACACAACGAGCCTAGCAGCACTCTCTATACCAAGGTACACATGATAGGATGAG
 23 TCTACCTGACACAACGAGCCTAGCAGCACTCTCTATACCAAGGTACACATGATAGGATGAG
 24 TCTACCTGACACAACGAGCCTAGCAGCACTCTCTATACCAAGGTACACATGATAGGATGAG
 25 TCTACCTGATACAACAACCTAGCAGCGCTCTCTATCCAGGTACACATGATAGGATGAG
 26 TCTACCTGATACAACAACCTAGCAGCGCTCTCTATCCAGGTACACATGATAGGATGAG
 27 TCTACCTGACACAACAACCTAGCAGCGCTCTCTATCCAGGTACACATGATAGGATGAG
 28 TCTACCTGACACAACGAGCCTAGCAGCACTCTCTATACCAAGGTACACATGATAGGATGAG
 29 TCTACCTGACACAACGAGCCTAGCAGCACTCTCTATCCAGGTACACATGATAGGATGAG
 30 TCTACCTGACACAACAACCTAGCAGCGCTCTCTATACCAAGGTACACATGATAGGATGAG
 ***** * ***** * ***** * ***** * *****
 120
 CTATAAGGGAGACATGACGTGGACATTAAACCAACCCACTGGCTCAAAACACAAACGATGTC
 CTATAAGGGAGACATAACATGGACATTAAACCAACCCACTAGCTCAAAACACAAACGATGTC
 CTATAAGGGAGACATGACGTGGACATTAAACCAACCCACTGGCTCAAAACACAAACGATGTC
 TTACAAGGGAGACATAACATGGACATTAAACCAACCCACTAGCTCAAAACACAAACGATGTC
 TTACAAGGGAGACATAACATGGACATTAAACCAACCCACTAGCTCAAAACACAAACGATGTC
 TTACAAGGGAGACATAACATGGACATTAAACCAACCCACTAGCTCAAAACACAAACGATGTC
 CTATAAGGGAGACATGACGTGGACATTAAACCAACCCACTGGCTCAAAACACAAACGATGTC
 TTACAAGGGAGACATAACATGGACATTAAACCAACCCACTAGCTCAAAACACAAACGATGTC
 CTATAAGGGAGACATAACGTGGACATTAAACCAACCCACTGGCTCAAAACGCAAAACGATGTC
 ** ***** ** ***** ***** ***** ***** *****
 240
 CAAATTTACCATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAACATTTACGATGGGCCAATTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAAATTTACGATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAACATTTACCATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAACATTTACCATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAACATTTACCATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAAATTTACGATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAAATTTACGATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 CAAATTTACCATGGGCCAATTTTTAAATGCATCAGTTTACGGTGTATTAGAAACGAT
 *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 360
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 GAACAGCAATGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 GAACAGCAATGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 AAACAGCAACGATAGTTTTGATTATCGGATCCAACCCATTAAACACATTTACAAGATTA
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 60
 Gruo 22 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 23 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 24 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 25 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 26 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 27 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 28 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 29 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 30 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 180
 Gruo 22 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 23 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 24 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 25 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 26 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 27 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 28 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 29 ATTGTACCAACAACCTAGAACGAGGAATACGGTATATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 30 ATTGTATCAACAATTAGAACGAGGAATACGGTACATCGATATTAGAGCAAAAGACAATCT
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 300
 Gruo 22 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 23 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 24 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 25 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 26 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 27 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 28 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 29 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 30 TACTCAATTTTTAAAGAAAAATCCAAAGAAACCAATTATTATGCGTTTAAAGACGAGCA
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

[図10]

Group	420	480
22	TTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAAATTCACA
23	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAACTCAGC
24	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAAATTCAAA
25	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAACTCAGC
26	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAACTCAGC
27	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAACTCAGC
28	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAAATTCACA
29	TTTTTACACCACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTGAAAGATATCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAAATTCACA
30	TTTTTACACTACTCCAGAACTGACACGAGCAATAAATCCCTACATTAAAGATGTCCG	CGGAAAAATATTATTACTTTTCAGAGAACCACACAAAAAGCCATTAGTCATTAACTCAGC

Gruppo	540	500
22	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCATCCAAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCATATCAAGCTTCTTAAAGCGGA
23	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCACCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCCAAAGCGGA
24	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCATCCAAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCTTAAAGCGGA
25	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCACCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCCAAAGCGGA
26	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCACCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCCAAAGCGGA
27	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCACCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCCAAAGCGGA
28	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCATCCAAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAATCTTCTTAAAGCGGA
29	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCATCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCTTAAAGCGGA
30	CAAAATTCGGCATGCAGTTCGGCGCACCTAACCAAGTAATTCAGATGACTACAAATGGTCC	GAGTGTGAAAACAAAAATTCAAAGAGATTGTCAGAGCTGCTTATCAAGCTTCCAAAGCGGA
	***** * *****	***** *****

660 713

Grup 22 CAACAAAGTGTTCCTTAACCATATTAGTGCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

23 CAATAAAGTTTTCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

24 CAACAAAGTGTTCCTTAACCATATTAGTGCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

25 CAATAAAGTTTTCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAACTTTTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

26 CAATAAAGTTTTCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAACTTTTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

27 CAATAAAGTTTTCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAACTTTTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

28 CAACAAAGTGTTCCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

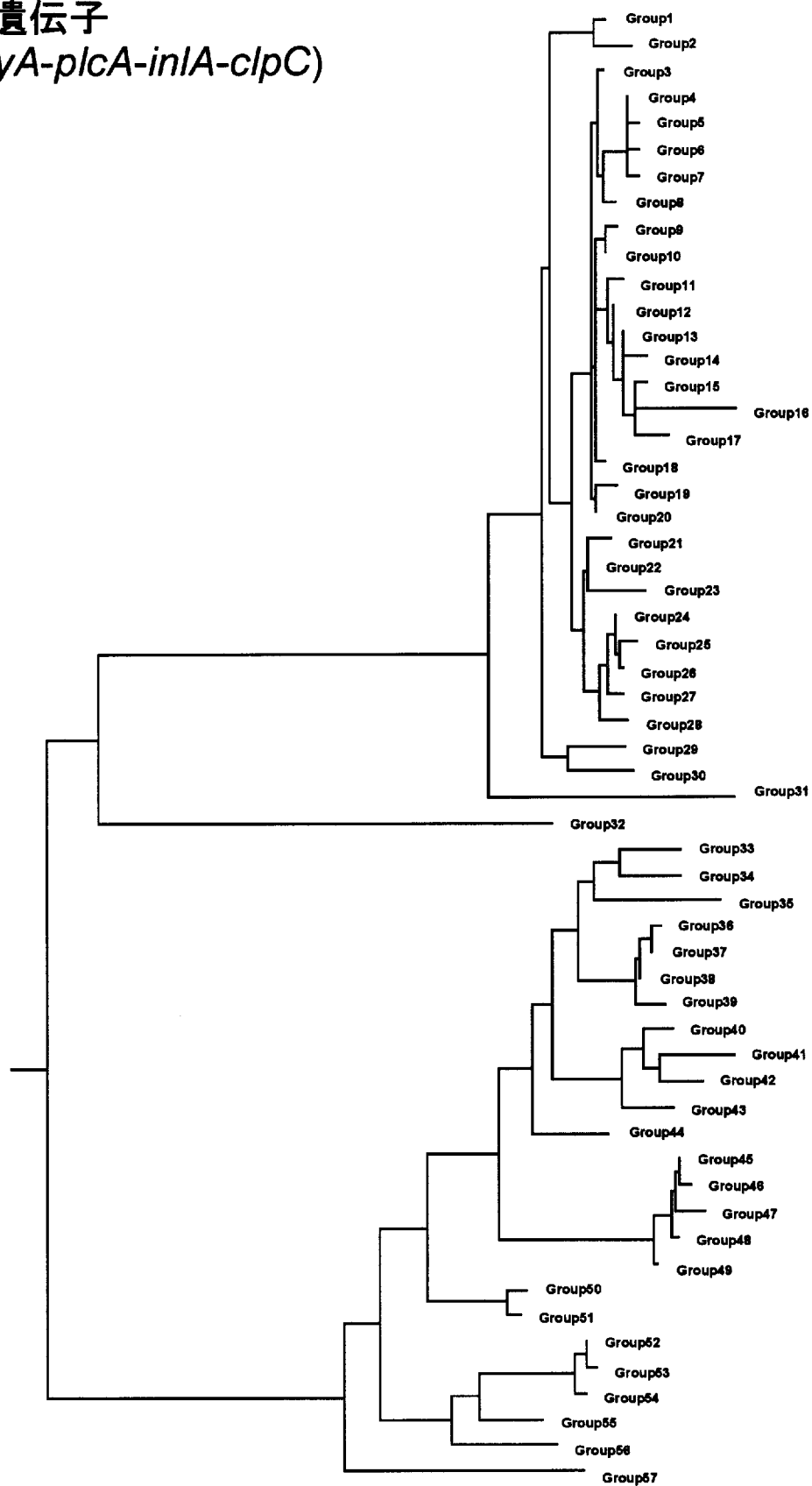
29 CAACAAAGTGTTCCTTAACCATATTAGTGCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

30 CAATAAAGTTTTCTTAACCATATTAGGCCACCTTCATTAAACATTCACACCTCGTCAGTA TGCTGCAGCATTTAAACAACAACAAAGTAGAGCAGTTTCGTACTCAACTTAAACATCGG

*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

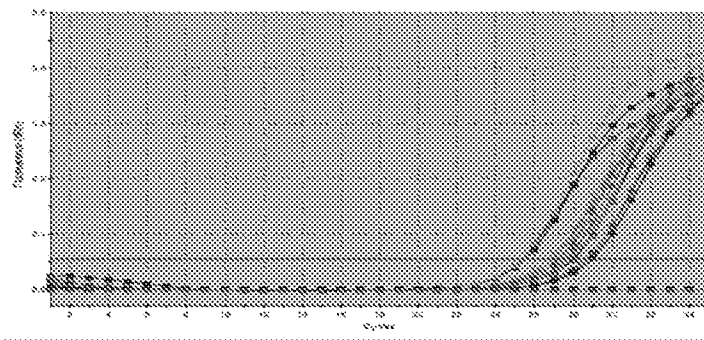
[図11]

四遺伝子
(*hlyA-plcA-inlA-clpC*)

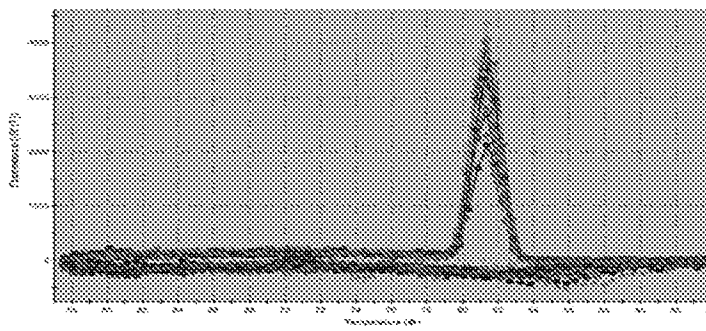


[図12]

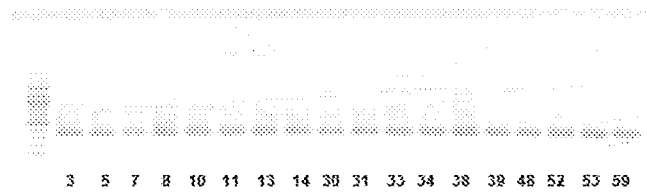
(a)



(b)

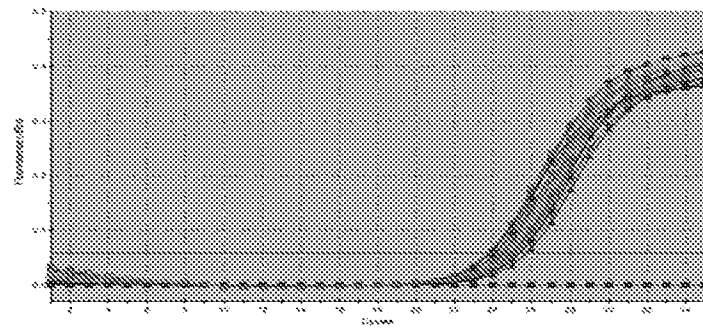


(c)

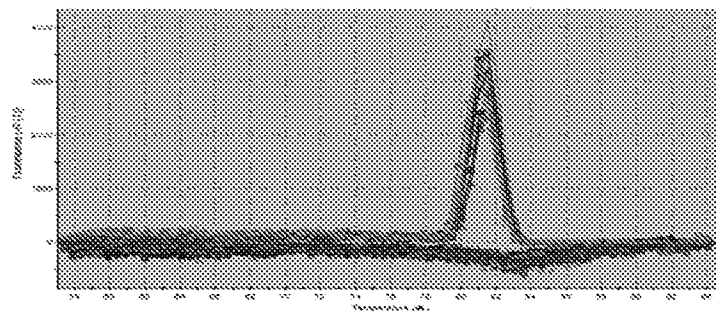


[図13]

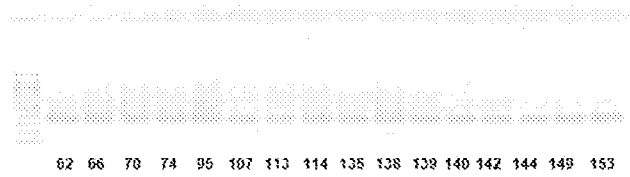
(a)



(b)

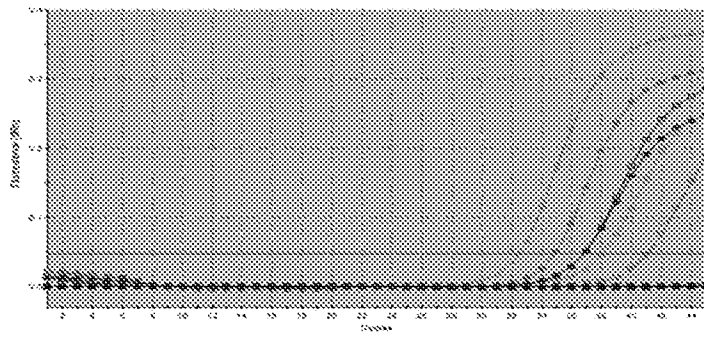


(c)

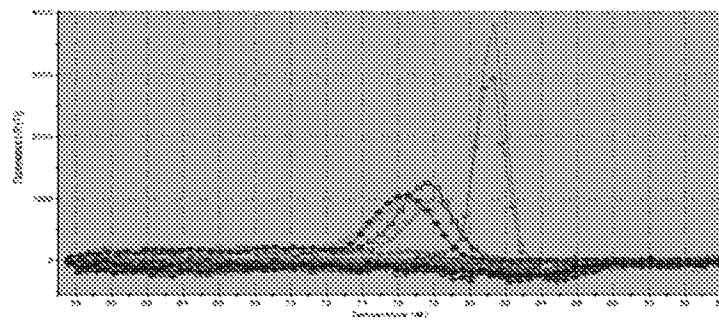


[図14]

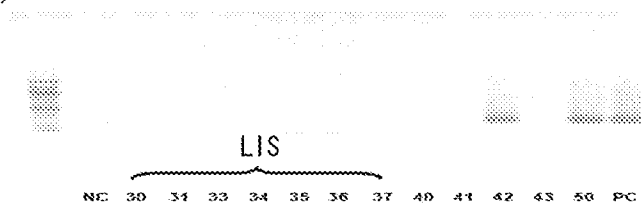
(a)



(b)

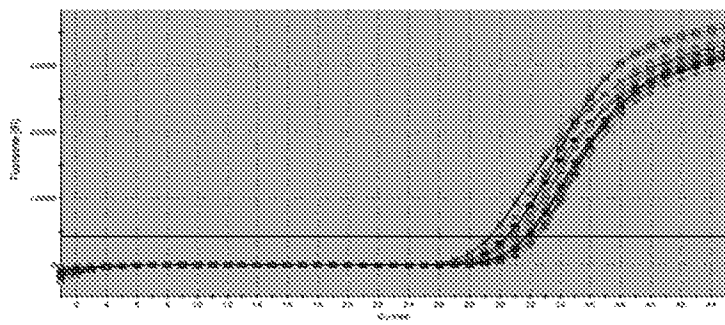


(c)

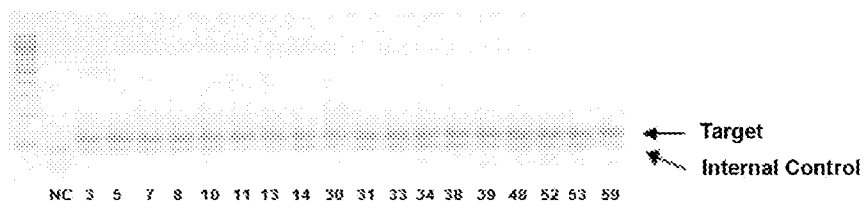


[図15]

(a)

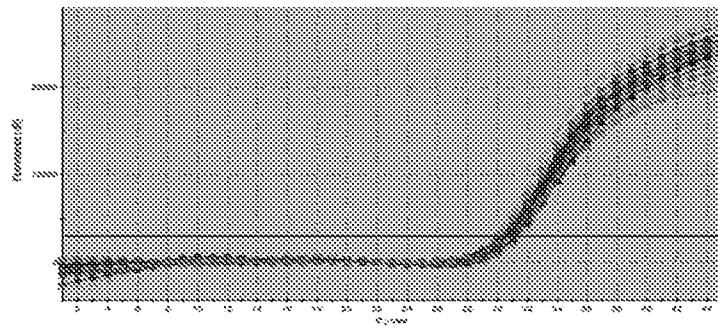


(b)

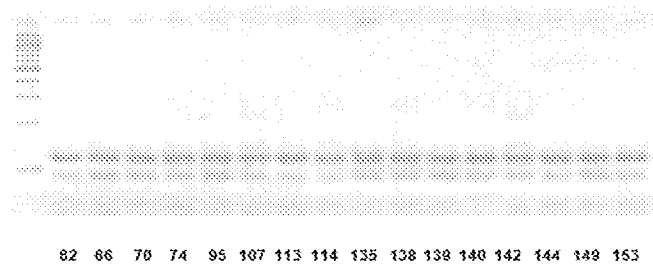


[図16]

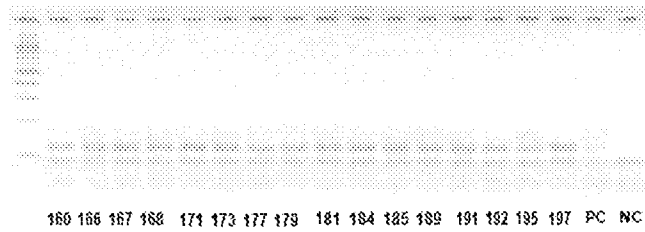
(a)



(b)

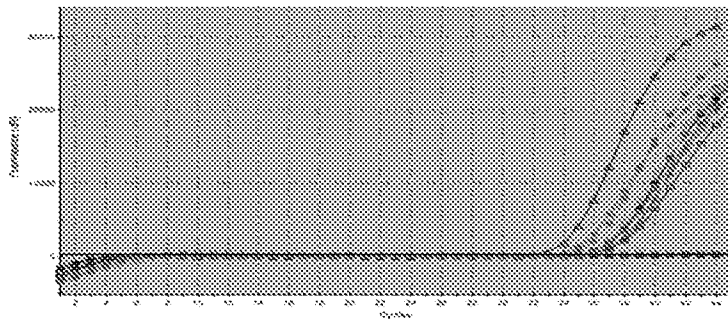


(c)

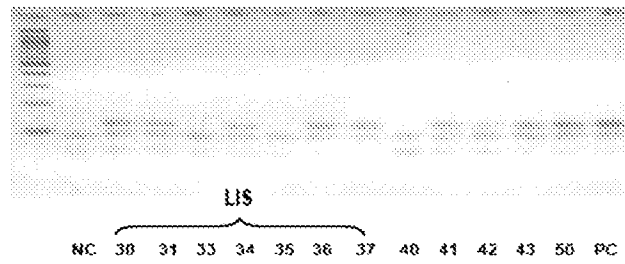


[図17]

(a)

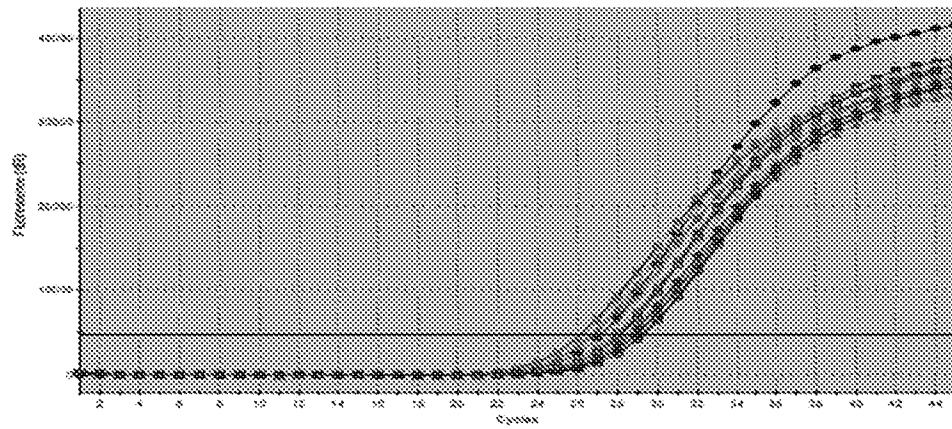


(b)

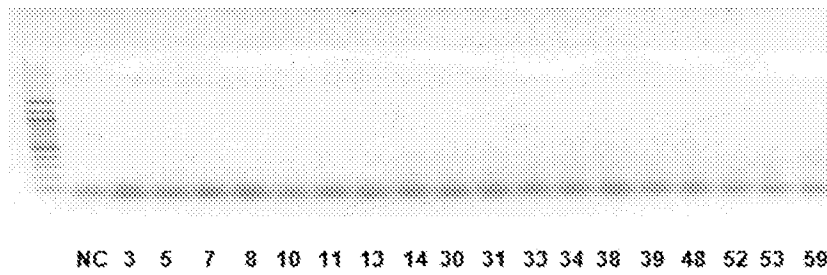


[図18]

(a)



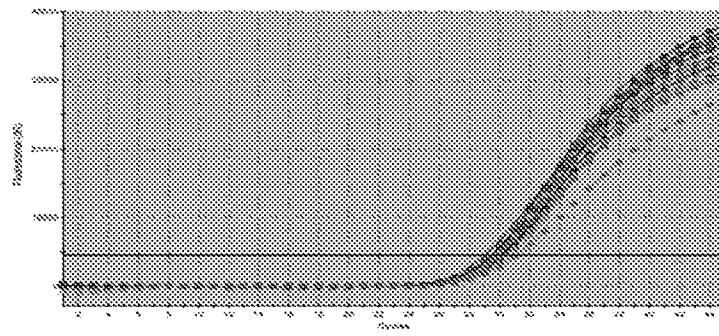
(b)



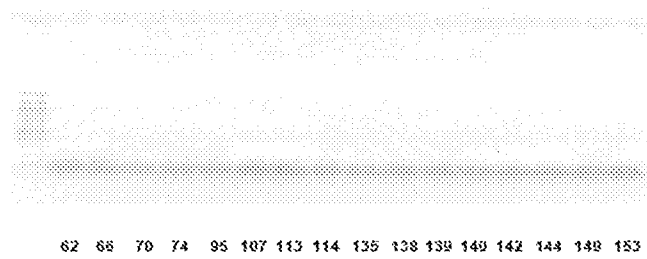
NC 3 5 7 8 10 11 13 14 30 31 33 34 38 39 48 52 53 59

[図19]

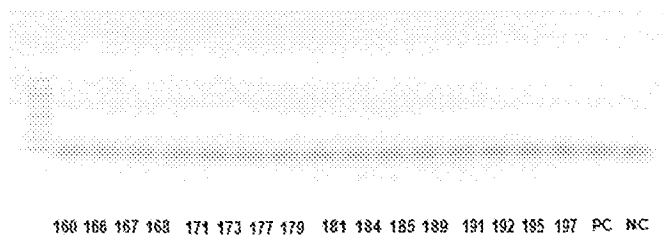
(a)



(b)

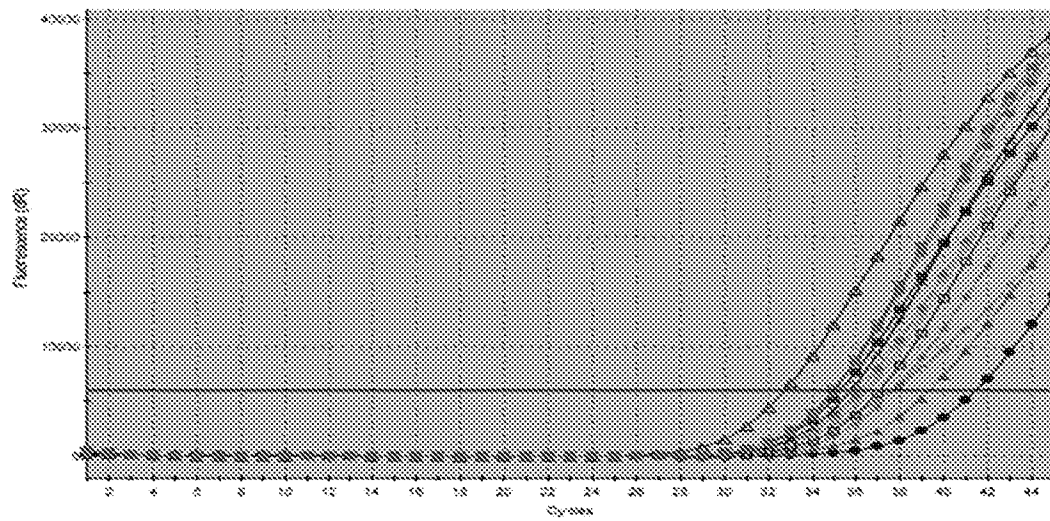


(c)



[図20]

(a)



(b)

