

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-141065

(P2004-141065A)

(43) 公開日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 38 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-309721 (P2002-309721)	(71) 出願人	000006884
(22) 出願日	平成14年10月24日 (2002.10.24)		株式会社ヤクルト本社
			東京都港区東新橋1丁目1番19号
		(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(72) 発明者	佐藤 隆
			東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
			会社ヤクルト本社内
		(72) 発明者	木脇 真祐美
			東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
			会社ヤクルト本社内
		(72) 発明者	白沢 幸生
			東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式
			会社ヤクルト本社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】新規プラスミド及び当該プラスミドを含むシャトルベクター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】発現効率、操作性、安定性、形質転換体の判別が容易な性質を有する乳酸菌用シャトルベクターの提供。

【解決手段】ラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドであって、ラクトースオペロンをコードする遺伝子と、複製必須領域と、反復配列とを有することを特徴とするプラスミド；該プラスミドの複製必須領域を含むDNAと、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含むDNAと、大腸菌と乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子を含むDNAとを有することを特徴とする乳酸菌用シャトルベクター。

【効果】本発明の乳酸菌用シャトルベクターは、従来のシャトルベクターに比べて宿主中での安定性が高く、また操作性にも優れることから、食品又は医薬品を製造するためのベクターとして有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドであって、配列番号 1 で示されるラクトースオペロンをコードする遺伝子と、配列番号 2 で示される複製必須領域と、配列番号 3 で示される反復配列とを有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 2】

図 1 の制限酵素地図で示されるプラスミド p L Y 1 0 1。

【請求項 3】

配列番号 2 で示されるラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドの複製必須領域を含む DNA と、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含む DNA と、大腸菌及び乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子を含む DNA とを有することを特徴とする乳酸菌用シャトルベクター。 10

【請求項 4】

配列番号 2 で示されるラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドの複製必須領域を含む DNA が、配列番号 4 で示される DNA 断片である請求項 3 記載のシャトルベクター。

【請求項 5】

請求項 1 若しくは 2 記載のプラスミド又は請求項 3 若しくは 4 記載シャトルベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、食経験のある乳酸菌由来のプラスミド及び当該プラスミド由来の遺伝子を含むシャトルベクターに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

乳酸菌製剤の製造や発酵乳、チーズなどの製造には獣乳を培地として、乳酸菌が培養されるが、この時、乳酸菌の有する生理効果、例えば整腸効果や免疫賦活効果を得るために、乳酸菌の生菌数を高くすることが好ましい。

しかし、培養を長期間継続すると、経済性、作業性が悪く、乳酸蓄積による酸度上昇のため、生菌数が増加し難い。そこで、増殖効率を高める目的で、クロレラエキス、ビタミン類、ペプチド類等の増殖促進物質を培地に添加することが行われているが、これらの添加には、発酵乳等の風味への影響やコストの上昇といった問題があった。また、近年、遺伝子操作技術が急速に発展していることから、ベクターの移入等により乳酸菌の増殖能を高めることも期待されるが、現状では、菌の増殖に関わる遺伝子が特定できておらず、このような遺伝子操作による増殖性の向上は行われていない。 30

【0003】

一方、インビトロ (in vitro) の遺伝子操作においては、所望の外来遺伝子を宿主細胞に移入させ、その遺伝子情報を発現させるには、宿主細胞に適合したベクターを使用することが必要とされるが、乳酸菌においては、形質転換能が低い、DNA の抽出が容易でない等の理由により、大腸菌や枯草菌とは異なり、専ら乳酸菌及び他の菌の両方で複製可能なシャトルベクターとしての開発が試みられ、例えば p B E 3 1 (特許文献 1 参照) や p H 4 6 1 1 (特許文献 2 参照) が知られている。 40

【0004】

乳酸菌用シャトルベクターは、研究用途での使用のみならず、有用な外来遺伝子を宿主乳酸菌に導入し、これを発現させることによる乳酸菌の機能性向上等の観点からも期待されている。例えば、本出願人は、前記 p B E 3 1 を用いてコレラ菌の線毛 (toxin coregulated pili: TCP) の構成タンパク質である TcpA を菌体表面に発現させたラクトバチルス・カゼイを作製し、これをマウスの腹腔内へ投与することにより、血清の抗 TcpA 抗体価が上昇することを確かめている。このことは、シャトルベクターにより形質転換された宿主乳酸菌が、異種蛋白質を発現し、それがワクチンとして 50

の活性を有することを示しており、医薬用途への利用の可能性を示唆するものである。

【0005】

しかしながら、従来の乳酸菌用シャトルベクターは、発現効率が十分でない、コロニー形成まで時間がかかる、ベクターが宿主中で不安定である等の問題を有していた。また、遺伝子操作により機能性等を向上させた乳酸菌について、ヒトへの利用を考慮した場合には、安全性の面から、ベクターとして食経験のある乳酸菌由来のプラスミド等を用いたものを利用し、乳酸菌の形質転換を行うことが望ましいが、既存のベクターには、そのようなものはなく、食経験豊富な乳酸菌由来のベクターを得ることが期待されている。

【0006】

【特許文献1】

特開平6-253861号公報

【特許文献2】

特開平4-5889号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、乳酸菌の増殖性を高める遺伝子上の知見を得るとともに、発現効率、操作性、安定性、形質転換体（組換え体）の判別が短時間に行える等の性質を持った良好な乳酸菌用シャトルベクターを提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、食経験豊富な乳酸菌であるラクトバチルス・カゼイにはプラスミドが存在し、当該プラスミドにより菌の増殖が高められていることを見出すと共に、当該プラスミド由来の複製必須領域を用いた乳酸菌用シャトルベクターが、優れた安定性、操作性、発現効率等を有することを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、ラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドであって、配列番号1で示されるラクトースオペロンをコードする遺伝子と、配列番号2で示される複製必須領域と、配列番号3で示される反復配列とを有することを特徴とするプラスミドを提供するものである。

【0010】

また本発明は、上記配列番号2で示されるラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドの複製必須領域を含むDNAと、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含むDNAと、大腸菌及び乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子を含むDNAとを有することを特徴とする乳酸菌用シャトルベクターを提供するものである。

【0011】

更に本発明は、上記プラスミド又はシャトルベクターを含む形質転換体を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明プラスミドは、ラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）から単離し得るプラスミドであり、配列番号1で示されるラクトースオペロンをコードする遺伝子と、配列番号2で示される複製必須領域と、配列番号3で示される反復配列とを有する。

ラクトバチルス・カゼイとしては、例えばラクトバチルス・カゼイ YIT9029（FERM BP-1366）が挙げられ、それから得られたプラスミド pLY101 が本発明のプラスミドに包含される。

【0013】

本発明のプラスミドに含まれる遺伝子領域のうち、配列番号2で示されるDNA領域は、複製必須領域、すなわちプラスミドの自律複製に必要な領域であり、複製開始部位及び複

10

20

30

40

50

製蛋白質遺伝子（rep 遺伝子）を含む。

また、配列番号 1 で示される DNA 領域は、乳糖資化に必要な遺伝子を含むラクトースオペロンをコードする遺伝子領域であり、配列番号 3 で示される DNA 領域は、282 塩基対を単位とする 14 回の反復配列を有する。

そして、このプラスミドは、後記実施例 3 に示すように、それを含む乳酸菌の増殖能を向上させる作用を有する。

【0014】

本発明プラスミドは、通常用いられる遺伝子工学的手法に従って、ラクトバチルス・カゼイから分離して調製することができる。例えば、ラクトバチルス・カゼイ YIT9029 株を培養し、次いでこれを集菌し、これを乳酸菌を溶菌させる公知の方法、例えば N-アセチルムラミダーゼ、リゾチームを用いて溶菌し、得られた溶菌物から、例えば塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心分離のような通常用いられる方法によって、プラスミドを分離・精製することにより得ることができる。

【0015】

培養は、通常乳酸菌に用いられる培地や培養条件により行えばよいが、例えば、培地として、乳糖を添加した MRS 培地等を用い、静置培養等の培養法により、約 34℃～37℃ の範囲で、通常約 1 日間～約 2 日間培養するのが好ましい。

【0016】

得られたプラスミドは、公知のプラスミドと同様に、制限酵素による切断、リガーゼによるライゲーション等の遺伝子操作を行うことができる。

【0017】

プラスミドの構造決定は、通常の遺伝子工学的手法に準じた方法を用いることができる。すなわち、本発明プラスミドの各種制限酵素消化断片を大腸菌を宿主生物とするプラスミドベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した後、当該プラスミドベクターの DNA を抽出し、これを市販の塩基配列決定装置（シーケンサー）に供する。決定された塩基配列は市販のパーソナルコンピュータ用の遺伝子解析ソフトウェアなどを使用すれば、制限酵素地図の作成や既往の核酸塩基配列データとの比較検討などを行うことができる。

【0018】

ラクトバチルス・カゼイ YIT9029（FERM BP-1366）から単離されたプラスミド pLY101 は、約 66.8 Kb の大きさを持ち、その制限酵素地図は図 1 に示すとおりである。

【0019】

本発明のプラスミドの複製必須領域を含む DNA と、大腸菌等の細菌で自律複製可能なプラスミドの複製必須領域を含む DNA とを連結し、乳酸菌及び大腸菌の双方で自律複製可能なシャトルベクターとすることにより、プラスミドの調製、目的遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドの調製等の操作を大腸菌を用いて行うことができる。

すなわち、本発明の乳酸菌用シャトルベクターは、配列番号 2 で示されるラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドの複製必須領域を含む DNA と、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含む DNA と、大腸菌及び乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子とを連結させてなり、乳酸菌及び大腸菌の双方で複製可能なものである。

【0020】

配列番号 2 で示される複製必須領域を含む DNA 及び大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含む DNA は、複製必須領域を含むものであれば当該プラスミドの全体であってもよく、或いは一断片であってもよい。例えば、配列番号 2 で示される複製必須領域を含む DNA としては、配列番号 2 で示される複製必須領域の他に、pUC19 由来の複製必須領域、pAMβ1 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子等を含む DNA 断片（p101-Pvu、配列番号 4）等が挙げられる。

【0021】

大腸菌で自律複製可能なプラスミドとしては、制限酵素地図、配列等が良く知られている、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG 50

399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pACYC177等が挙げられ、複製必須領域として、複製開始部位とrep遺伝子を含み、更にマルチクローニングサイトを含むpUC19、pUC18、pBR322、pACYC177等が好ましく、特にpUC19が好ましい。

【0022】

また、本発明のプラスミド若しくはシャトルベクター又はそれらの一部に、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を含むDNAを連結することにより、形質転換体中でのマーカー遺伝子の表現型によって、形質転換体の検出が容易となる。乳酸菌及び大腸菌に使用可能なマーカー遺伝子としては、エリスロマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子等が挙げられる。

10

【0023】

斯かる本発明の乳酸菌用シャトルベクターは、例えば、ラクトバチルス・カゼイ YIT9029から単離されたプラスミドpLY101を、適当な制限酵素で切断し、得られた断片を大腸菌で複製可能でありかつ大腸菌と乳酸菌で選択可能なマーカー遺伝子を持つプラスミドに挿入し、大腸菌内で増やした後乳酸菌に形質転換することにより製造することができる。

【0024】

かくして得られる本発明の乳酸菌用シャトルベクターの例としては、図4に示す制限酵素地図を有するpCAT1-1が挙げられる。

【0025】

本発明のプラスミド及びシャトルベクターは、ラクトバチルス・カゼイをはじめとする乳酸菌及び大腸菌中で複製できるので、常法によりこれらのプラスミド又はシャトルベクターのいずれかの位置に外来遺伝子を挿入し、得られる組換えプラスミドで宿主微生物を形質転換すれば、その外来遺伝子の遺伝情報を宿主微生物内で発現させることが可能となる。

20

【0026】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0027】

実施例1

ラクトバチラス・カゼイ YIT9029からのプラスミドpLY101の単離
プラスミドの抽出は、文献(App. Environ. Microbiol. 53: 2987-2991, 1987)に従って行った。即ち、0.1%ブドウ糖を含むILS培地で34℃、定常期初期まで培養した菌体を集菌、洗浄し、同量の1M蔗糖を含む10mMリン酸緩衝液(pH6.9)に懸濁した。リゾチームとN-アセチルムラミダーゼSGをそれぞれ40μg/ml及び2μg/mlになるよう加え、37℃、20分間保温してプロトプラストを作製した。プロトプラストを25分の1量の50mMトリス塩酸バッファー(pH8.0)-20mMEDTA溶液に懸濁し、SDSを0.1%になるよう加え、60℃、10分間インキュベートして溶菌した。溶菌液のアルカリ処理、中和処理、フェノール抽出をAnderson and McKayの方法(Appl. Environ. Microbiol. 46: 549-552, 1983)に従って行った後、2度の塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心分離によりプラスミドDNAを精製した。

30

【0028】

実施例2 pLY101のシーケンシング

pLY101のDNAをDNA分解酵素I(Deoxyribonuclease I)で部分分解して得たDNA断片をベクターM13mp18にクローン化し、各クローンからDNAを調製した。BigDye Terminator(PEバイオシステムズ社)でシーケンシング反応を行い、ABI377型DNAシーケンサー(PEバイオシ

40

50

ステムズ社)で塩基配列の読み取りを行った。塩基配列データの編集連結はソフトウェア AutoAssembler (PEバイオシステムズ社)を用いて行った。

【0029】

得られたプラスミドDNA (pLY101)の全塩基配列からコンピューターにより制限酵素切断部位を検索し、まとめたものが図1の制限酵素地図である。全体の長さは約66.8キロ塩基対(Kb)である。

【0030】

また、塩基配列データから検索したORF (Open reading frame)のうち、公開されている遺伝子配列データベースと相同性検索をすることにより、乳糖資化に必要な遺伝子を含むラクトースオペロン (配列番号1)及びDNA複製起点とDNA複製に必須の遺伝子が隣接している複製必須領域 (配列番号2)を同定した。また、反復配列の検索から、282塩基対を単位とする14回の反復配列 (配列番号3)を見出した。

【0031】

実施例3 ラクトバチルス・カゼイYIT9029とpLY101が欠失した株との増殖性の比較

ラクトバチルス・カゼイYIT9029を、ブドウ糖を糖源とした培地で長期間継代培養するとpLY101が欠失した株ラクトバチルス・カゼイYIT0291が得られた。この株は乳糖を糖源とした培地では増殖できない。しかし、この株を、乳糖を糖源とした寒天培地で培養することにより乳糖を資化できる様な復帰株ラクトバチルス・カゼイYIT10024が得られた。即ち、pLY101を有しているのはラクトバチルス・カゼイYIT9029だけで、他の2株 (ラクトバチルス・カゼイYIT0291とラクトバチルス・カゼイYIT10024)はpLY101を有していない。以下に、この3株を用いて乳糖を糖源とした培地での増殖性を比較した。

MRS培地で前培養した菌体を生理的食塩水で2回洗浄後、BaseLT培地に2%接種し、経時的にクレット値を測定しながら24時間培養した。クレット値の経時変化を図2に示す。

用いたBaseLT培地の組成は表1の通りである。

【0032】

【表1】

BaseLT 培地	
1. 0%	トリプチカーゼ ペプトン
2. 0%	乳糖
0. 3%	硫酸アンモニウム
0. 1%	リン酸2水素カリウム
0. 2%	リン酸水素2カリウム
0. 1%	ツイーン80
0. 0575%	硫酸マグネシウム
0. 0155%	硫酸マンガン
0. 0034%	硫酸鉄

【0033】

YIT9029が良い増殖を示したのに対し、YIT0291は低い増殖性しか示さなかった。乳糖を資化できるとされているYIT10024はYIT9029とYIT029

1 の中間の値を示したが、増殖性は Y I T 9 0 2 9 のレベルまで回復しなかった。Y I T 9 0 2 9 と Y I T 1 0 0 2 4 の、乳糖培地での増殖性の差は、Y I T 9 0 2 9 が有している p L Y 1 0 1 の為であると考えられる。更に、24 時間後の培養上清の p H を比較した。表 2 にその結果を示す。Y I T 0 2 9 1 では、p H の低下は僅かであったが、Y I T 1 0 0 2 4 及び Y I T 9 0 2 9 では、大きく酸性側に傾いていた。ここでも、Y I T 1 0 0 2 4 と Y I T 0 9 2 9 とでは、p H の下がり具合に違いが見られた。

【0034】

【表 2】

24 時間培養後のBaseTL培養上清のpH

菌株	なし	YIT 0291	YIT 10024	YIT 9029
PH	6.6	6.4	4.8	3.6

10

【0035】

次にこの p H の変化は何によるものかを調べる為に、24 時間後の培養上清の有機酸測定を行った。酢酸、コハク酸は僅かながら検出されたが、ここでは主要の有機酸である乳酸の値のみを表 3 に示す。

【0036】

【表 3】

24 時間培養後のBaseLT培養上清の有機酸濃度

菌株	なし	YIT 0291	YIT 10024	YIT 9029
乳酸濃度 (mM)	検出限界以下	2.45	17.85	45.20

20

【0037】

B a s e L T 培地での増殖性・p H・有機酸濃度のどの項目を見ても Y I T 1 0 0 2 4 と Y I T 9 0 2 9 には違いが見られた。両株とも乳糖を資化し得るが、その資化性に関しては差があり、その差はプラスミド p L Y 1 0 1 を保持しているか否かの差である。

30

乳酸菌は乳糖などの糖源を資化して乳酸を産生する事が特徴であり、工業的にも乳酸菌が産生する乳酸は重要であり、効率良く乳酸を産生する菌は有用性が高い。以上、プラスミド p L Y 1 0 1 を有する事により、乳糖を糖源とした培地（例えば、脱脂粉乳培地）で優れた増殖性を発揮し、効率良く乳酸を産生する事が判明し、p L Y 1 0 1 の有用性が明らかにされた。

【0038】

実施例 4 シャトルベクター p C A T 1 - 1 の作製

大腸菌で複製するベクター p N D E 4 （特願 2 0 0 2 - 0 4 3 4 1 4 号明細書）を制限酵素 B s p H I と H i n d I I I で切断し、エリスロマイシン耐性遺伝子を含む 1 7 6 8 b p の断片を得た。大腸菌で複製するプラスミド p B R 3 2 2 を制限酵素 B s p H I と A v a I で切断し、大腸菌用複製領域を含む 1 4 1 4 b p の断片を得た。両断片を連結し、p B R E 1 とした。p B R E 1 を制限酵素 H i n d I I I で切断し、T 4 D N A ポリメラーゼにより平滑化した後再連結することによって、H i n d I I I サイトが N h e I サイトに変換した p B R E 2 を得た。p B R E 2 を制限酵素 B a m H I と S p h I で切断し、p S G - T E R M （特開平 1 0 - 1 1 7 7 8 3 号公報）を制限酵素 B a m H I と N s p V で切断して得られたエリスロマイシン耐性遺伝子由来プロモーターを含む 1 2 0 b p の断片と、黄色ブドウ球菌由来のプラスミド p C 1 9 4 のクロラムフェニコール耐性遺伝子を P C R で増幅して得られた 7 2 2 b p の N s p V - S p h I 断片を挿入して、p B R E 3 - c a t を得た。p B R E 3 - c a t を N h e I で切断後 T 4 D N A ポリメラーゼにより平滑化し、同じく平滑化した p L Y 1 0 1 の複製領域を含む 4 9 8 3 b p の P v u I 断片（

40

50

配列番号 2) と連結して、pCAT1-1 を得た (図 3、図 4)。

【0039】

実施例 5 シャトルベクター pCAT1-1 の安定性

シャトルベクター pCAT1-1 を保持したラクトバチルス・カゼイ YIT9029 をエリスロマイシンを含む MRS 培地で定常期 ($2 \sim 5 \times 10^9$ cfu/ml) まで培養し、薬剤を含まない MRS 培地で 10^6 倍に希釈したのち再び定常期に達するまで 36 ~ 48 時間培養した。それを適宜希釈し、薬剤を含まない MRS 寒天培地上でコロニーを作らせ、そのうち 164 コロニーをエリスロマイシンを含む同寒天培地に釣菌した。その結果、薬剤耐性を保持してコロニーを形成し得たものは、164 個中 161 個であり、耐性保持率は 98.2% であった。一方、エンテロコッカス・フェカリス由来のプラスミド pAM β 1 の複製領域を持つシャトルベクター pSAK-NS (特開平 10-117783 号公報) を保持したラクトバチルス・カゼイ YIT9029 株について同様の操作を行った。その結果、調べた 154 個のコロニーのうち薬剤耐性を保持していたものは 13 個であり、耐性保持率は 8.4% であった。以上の結果から、pLY101 の複製領域を持つシャトルベクターがラクトバチルス・カゼイ YIT9029 内で安定に保持されることが明らかとなり、pAM β 1 の複製領域を持つベクターに比べて優れていることがわかった。

10

【0040】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

<120> New plasmid, shuttle vector containing the same

<130> P04801410

10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5773

20

<212> DNA

<213> Lactobacillus casei YIT9029

<400> 1

tagacagggtt ctcaacaaac gccacagctt gaccagtggc atgatcaatg ccaaagtttc 60

gcgcagcacc gatgccacga tggtcattaa aaccggtcgc gtgaaaatta gggatacctt 120

30

taacaaaatc agccactgtc tgagcgggtac catcagtaga ggcatcgtcg atgagccaaa 180

gttcaaaaatc aatigtittgt tgctggatac tttttaatgt ctacaggcaga taatgacctt 240

aatigtaagt tggcacaacg atggttaaat ctaagttcga cgtaattgcc tccttgaagc 300

40

tcgttttgat cattatcgtc aaattaacgg aggcgtcaaa taaagtgatt cgttttaga 360

gacatgacta gcactgatca ttaaagaaca aaaggcaaca cagataattg tcctaaaaaa 420
 ctgacgaagg ctgtctggat ggacactgtt gaaaaagaaa aaagaacagc aaactaaaga 480
 tgctacaaaa aataaaataa aacgtttaca ttctgttcag atatggtaca atttgtttgt 540
 tgataggaat attcaatgtg gattgtgact atttaattag gcgagaccac aaatcgcagt 600
 gctgatcgca gtgctgatcg cagcgcgtga ttgttggttt tttctttgca ctgggagggt 660
 atgacaactt gccaaaaata tctcagattt ttaacaacaa cgtggccctg gttgatctag 720
 acaaccgcgg ccaagccgtt gtaaggggac gtggcatcgc ttttcagaag aggcgaggag 780
 atgttatccc gacaaagcag atagagaaga tcttttatct agcgaacgag acttcccgac 840
 aaaatttcta ctttctctta aaaaatatc cgattgacgt ggtgacgact acctatgaaa 900
 ttattgaigt tgcacagaaa caatatcgac tgaaagtgtt tgattatata tacattacct 960
 tgagtatca tatttacgag gcatataaac gctatcaggc agggacttat caagaaacaa 1020
 tggtagcaga ttttcatatt caatatccgg ccgaatatgc ggtggctaaa caggcactgc 1080
 aaatcatatg cacgaacctt ggcgttcagt tccacagtc ggaaataaaa aatctggcgt 1140
 tgcactttat caacgcttcc ggcgaagacg atggcgagca ggttttttgt aaaagcaatg 1200

10

20

30

40

aagcctcact tagtcaactt gtacaagaag tgttgaagcg tcatcacatt actcgctctc 1260
 attcaaatgg caactactat gaccgattta tgattcatct ccagtatctc atcgaccgac 1320
 tgcagcgtgt tgatacatat gccgttacca ttgtccctga gggttgccact gaacttaagc 1380
 aaaactatcc gcagtcctac aagattgcct cagaaatitc cgatgaaatt aaggatcaac 1440
 tctatcgtag taigagttag gacgaacgac ttacttcat catccacatt cagcgattga 1500
 taaacgaagc accagcccag aatcattcac aaaacgattc attataacgc gctcgtagtc 1560
 gtagaagcct acacataagg gctttgaagc aatctaccaa agattgggcc agtttgcttc 1620
 aagcacgctt atgctttggc ttccaagcgc tcaggaggaa aagactcatg aataaggttt 1680
 ttgataaatt aaaaccgggt ttgaagcca tcgtcgttaa caaatatatt tccgcgattc 1740
 gtagtggctt tatcgcatgt atgccgatca tcatcttctc aagtatctt atgatggttg 1800
 cttatgttcc gaacgcttgg gggttttact ggccagacaa cgtaacgaat acgttgatgg 1860
 ttgcttataa ctattccatg ggcttgctgg cactgtttgt ggccggaacg actggtaaaa 1920
 actigaciga cagcaagaac ctigaattac cgaaaacaaa tcaaattaat ccagtggccg 1980
 tcatgtggc gtcigaaatt tctttgtca tttgtcgat ctgcccgtt aaaaccggtg 2040
 ttgacctgac ttacatgggg actcaggat tgatctgcgc ttatatcgtt gggttgatcg 2100

10

20

30

40

tgccaaat	at	ttactacg	tc	tgtattaaga	acaatgtcac	gattaaatta	ccagagcagg	2160
taccaggtaa	tatcgcccag	tcatttaaag	acctatccc	gatgggcctt	tctgtgacag	2220		
ccttcigget	tttcggtggt	ggcttcaaag	cggcaacggg	tactgtattg	ccacgctgga	2280		
tcattcaagt	actttcgccg	cttttccaag	ccagcgattc	ttatctaggc	ttagccctga	2340		
tigctggcgc	gatggctttc	ttctggttct	gtgggtgcca	aggcccatca	attgttcagc	2400		
cggctgttgt	cccgattatg	attgcgaata	cagcagctaa	cttcagcaa	tatcaggcag	2460		
ggcaacaigt	ctcgcacgtt	tggccatga	acacgatgga	ctacgtcatg	aatittgggtg	2520		
gaaccggagc	aacatttgtg	gtagctttca	tcattgtgtt	tgcggcccga	tcagcgcaat	2580		
taaaagccgt	tggtaaggct	gcctttgtgc	catgcacttt	cggggticaat	gaacctgttt	2640		
tgttcggaat	gccgattatc	atgaatccca	ttttcttcat	tccgttctta	gcaaccccga	2700		
tcgtgaacgt	tigcttattc	aaattctttg	tgagtgact	tggcatgaac	agtatgatgt	2760		
acaccatgcc	atggacagtt	ccgggaccga	tgggatttt	gatttcgact	gggtttgccc	2820		
cgttggcitt	cgtctttgtt	ctactgacgt	tggttctgga	cgttgcgata	tacttcccat	2880		
tcattcgcgt	ttaigacagc	acactcttag	ctgaagaaaa	agctaaggaa	gaggtcattg	2940		

10

20

30

40

aagacgacgg catggctgtt ctggcgagtg acacagtgtc accttctatc ccgactgggt 3000
 tgactgttgc gactgccaca gacgacgatg cgacccatgt gttgcctgaa acagcccat 3060
 ctgcccacgg cgaagcctat ttcaaacaaa atgaagttaa tgttttagtg ttgtgtgctg 3120
 gtggiggaaac aagcgggtatt ctggccaacg cgctaaacaa actgtctaag gaacgcgggt 3180
 taaagctctc ggccgccgcc cgcgcttatg gacaggatat ggatttgatc aaagatatga 3240
 acatgggtcat ccttgcgccg caaatggaaa gcatgaaagg taatttaaaa aagatcaccg 3300
 ataagtaigg cgtaagctg gtcacaacaa ctggtcggca atacattgaa ttaaccaaca 3360
 atggigacaa ggcacttgat ttgttgaat ccaatcttg agacacttaa caggaggtaa 3420
 ttaagcaatg agtaaacagc tacctcaaga ttttgtaatg ggccggggcaa ccgccgcta 3480
 tcaagtcgaa ggagccacca aggaagacgg taaaggtcgc gtgctttggg acgattttct 3540
 ggataaacag gggcgggtca agcccgacc ggacgcggat tttatcatc gttatgatga 3600
 agattiggca ttagcggaaa aatacggcca tcaagtgatt cgggtgtcaa ttgcctggtc 3660
 gcgaattttt ccgatgggtg ccggggaagt tgagccacgc ggggttgctt ttaccacaa 3720
 gctcttcgcg gatgtgccg cccatcatat cgaaccgttt gttacgtiac atcattttga 3780
 tacgcccga cgttgcacg aagccgggtga ttgggtgagt caagagaagt tggacgactt 3840

10

20

30

40

tgiggcttat gcgaagtttt gctttgaaga attttccgaa gtgaagtatt ggaicaccat	3900
taatgaaccg acctcaatgg ccgttcaaca atatacaagc gggacattcc cgcttgccga	3960
gtctggacgt ttigataaga cgttccaagc tgaacacaat caaatggigg cgcatgcccg	4020
tatcgtaat ctatataagt caatgcaatt aggtggccaa attggaattg ttcattgcgtt	4080
gcaaactggt tateccctaca gtgatagcgc tgtggatcac catgccgccg agttgcagga	4140
cgctttggaa aatcgattgt atctggatgg cacattagct ggcgaatatc accaagaaac	4200
tttggcgcct gtgaaggaaa ttctggatgc caatcatcaa ccgatgtttc aatcgacacc	4260
gcaggaaaatg aaggctattg atgaagcggc ccattcagta gactttgttg gggicaataa	4320
ttatttcagc aagtggttgc gtgcctatca tggcaaatca gagaccattc ataattggcga	4380
cggcaccaaaa ggctcttcgg tcgcgcggct gcaaggcgtt ggcgaggaaa aactcccaga	4440
tggcattgag acgacagatt gggattggtc gatttatcca cgaggaaatgt atgacatact	4500
gatgcggatt cataatgact atccgttggc gccagtgacc tacgtgacag aaaatgggtat	4560
tggctttaaa gaaagcttgc cagaaaatgc gacccctgac accgtgattg aagatccaaa	4620
acggattgat tatgtaaaga aatatctgtc cgcaatggct gatgctatcc atgatggcgc	4680

10

20

30

40

aaatgtcaaa ggttacttca tctggtcact tcaagatcaa ttttcttgga caaacggtta 4740
 cagtaaacga tatggctctgt tcttcgttga tttccaaca caaaatcggt ataatcaaca 4800
 aagtgccgag tgggttaagt ctgtgagtga gaccacatc attccggatt aaaaagtttt 4860
 tggctatita gacagcaagg attgaatcgg agggaaaacg atggctacta aagaagaaat 4920
 ttcaatgggt gggtttgcac ttgtggcgta tgcaggcgat gctcgaacgg ctgctgtgca 4980
 tgcacttgat gccgctgaag caggcgattt cgataaggca aacgaatigg ttgagaaggc 5040
 ccaacaggat atcaatgaag cccacaacca acagaccag ctcttaagtc aagaagctgg 5100
 cggctcgaa atggatgtca ctttatcat ggttcattgt caagatacgt tgatgacaac 5160
 catgtgctc atgatgaaa cacgtacat gattcgcatg titaagcgga tcaaagaact 5220
 tgagaacaag cagtaaatga gtcacatca tttctcgata aaatgatagt cgaatcgatc 5280
 agcatttctt ccaaatgacg aactttgctg ttagcgctc ctcaataatt gaacagaagt 5340
 aacccaaaaa ctaggcgctg ggcacataca gcgcctagtt tttctatttc ggaagtttgt 5400
 caaatggigt tgaaggatag tttctatctt ttggagatct cctcgtgtgg gagatctttt 5460
 ttgtgtttt attagtgcg gcgtttaatc tgggtgtgtg tctgaatatc gtacttgaag 5520
 gcataacaaa taagcctacc atcgtgacgt tattgtggta gataatctag gcaatcagct 5580

10

20

30

40

ggtagacgcg tgtgaacata ttggcctgat tggagaagcc ataacaagca cgtttgagct 5640
 ccttgatctt acggttgatg cccctctatcg gtccgttaga gtaggacgat ttggcggcgt 5700
 taattactcc attaagattc ttccgtaggg tatgcatggc cgtatctagg ggcgtgccgt 5760
 aagaacctgt cta 5773

10

(210) 2
 (211) 4983
 (212) DNA
 (213) Lactobacillus casei YIT9029

20

(400) 2
 cgaicgtaaa aggaaccatt cgcgtgattg atgagcacc gtcgatcaaa agtccgaacg 60
 caaaaigcct gtcttacaac tctgaacgt gctagaatag ccattgtaac aactcctttc 120
 ttaggatcag cagcaccaag agaaacacaa aaataagggg cgcgctgcct gctggcaacg 180
 cgccccacac ttctcttgt ttggctgcta ttttgacgtc tcttactttc gctctaagac 240
 ttctctaaga gaagtccac agcggtcaca aggtctgta aaataaactt gccgcgtta 300
 acgcggtgaa gacggcagtt gctaggctag cggtgactag ttctagtaac agtcacagtg 360
 cgcttatcct ggattggtag tctaggtcag tgctgtgatg ctgtcttatt tttttgtatt 420

30

40

ccccttgcta ctgttgattc tgaattcaag ataacacttg aatittitiga atgcaagcat 480
 tagtigitag aggaacaaat taagtaaggc aaacatgtgt tgaattgagc aggtagacaa 540
 acgaatgitt gccatatttt attataggac ctggttcctt tttagacaag aatittitcta 600
 attcttgtct ttctttttgc tcttctctag gtgggctaac tcttcacgaa ccttatgatg 660
 gcggcgaatc actttacgaa ctccggttatg tttttgctgt gcagaatcaa atggcccccg 720
 gtaatctttc tgcgttgtc gctcagttct ttgtccttgt ttgacttgaa cagacgaggc 780
 atattggcct gtgaactcaa tcataaattg atctgggtaca acccggccat ctgttaattg 840
 ccgctgcctt tgtttggtaa cataaagcac catcacatca tgtagctggc catctttgcc 900
 acgaacatgc gcaactcgcc ctaatggccg atccggaatg accaaatcat cagggactag 960
 ccagtagtat ttagtcggtc gaatgcgctt tggcgtcatg aagtaacctg ccatcatagt 1020
 aacttttcca agtaccttga cgtgacgatt acgatgctgc gtaaaggctt ttaactccgt 1080
 atcagtcctt gtttgttctt ggatcaagcg ttctttgacg gcggcatagc tgtgctttct 1140
 agcttcttcc gctcgttgat tagcagtttt ttgtgcctct gccagaatat cctctcgttc 1200
 atcaggatca ctcgtttgaa tcatgagtaa atgcagaccg gcacgttctg cctcagttag 1260

10

20

30

40

ctccttgagg ttttgagcg ctacctcttc cggaaaggct tcacgtttcc gttgattaaa 1320
 ctccttagaa ttcatcaggg tcgcctccat tagctgtcat gagtgatttg ttccagtatg 1380
 ccaccaaggt ctccttcata gcaccaaaca agtaattttc gacattgita atttttttac 1440
 tgcagaacg taaaacgta aaaaaccggc gcatagtctt gttgatcatt tcttggcacc 1500
 gcggatcatc taggacaatt gccgttcctt catgttcctt ttctacagcc ttttggcat 1560
 ttagaataat gcctagaaag cgacgcattt gtttaggcga gcgacaccaa agccctagta 1620
 gttaacacc ttctttgttg agaaagaggc cgccatttgc tgattcaggt aaataatctt 1680
 tggcccttct cactaggctc tgattttgtt tacgaataat ttccggggaa tattgatcgg 1740
 tagaaaagtc gaacttttct gtctctttat tgtctctagc ttgtgtctct aagtctttat 1800
 atgatatac taaagaattt tcagttccgc ttgtagcaag ggattgaggg actttatcgc 1860
 gggctaaaga atttttagtt ccgctttag caagggatg aggcatttta tgtcgggcta 1920
 aagaattttt agttccgctt gtagcagggg atatagtact ttgacttgct tcattctcgc 1980
 gttgtacac gtcggttgca gatacatga gatcgccaa atataagcga ttgggattat 2040
 tccgtttcat ttccggatca aagccattt ttttctggaa gaggaggitt gcttgttcta 2100
 actctttttt ggttttgatt accttgggtt cggagcagtt caaaatctgt tgaagctcag 2160

10

20

30

40

tatttgaaaa aatgaagtaa atatttccgt ttctgtccac ccagtcattg tgaagcgaat	2220
attccagtcg atctttcaaa atgacgtacg ccaactttgc ttctgcagaa aggtttttgt	2280
atgtaggact gtacaaaaga acttttggaa actgaaagaa aagagtcctg taaacttttg	2340
tcgcttggta aaatttaaaa ctccaattta ttgggttcat tttaaaaact ccttgttggt	2400
catctattta tggtagagca aacaaacatt tgataattcc atataacaac acgactgtat	2460
actagtata acgtcctgta aaggactata gttaaaataa taattctggt ataccagtat	2520
acccgtatac tcagtagatg tgtataccag tatactggta tactgggtata cagaccttt	2580
tttgcataaa ctatttttga tcaaaaaagc ttaaaaaaat agcgcttaag gcgatatata	2640
aaaagaattc aaggtataca ggtatacctg tataccttga attctccctt atatcgtcaa	2700
aaagtatacc ggtatacttt tacaaaggta ttcatagggt ctataatgtt tgtaggaagg	2760
cggtatttat atggctaaaa cttacgttgt tgggaacttc aagggcgggt ttggtaaaac	2820
aaaaaccgtt acgatgctag cttatgagag tgcagtaaaa aagagaagaa agactttggt	2880
aattgacctt gatcctcaag gtaatgcaac aagcgttctt ggacgaacag gcggcttgag	2940
tgccattact aagaatgtaa cagatgggtt tatcagcgga aacttacgga accaaataac	3000

10

20

30

40

aaaagtata ccccgcttgg atattattgg tgcaagtacg agcttttagaa cgttiaccaaa 3060
 gtgtttaatg tcaaaatttc cggaggacga agatcagcaa atgctgtatt tgaagacact 3120
 gctggaaccc ttaaaggatc aatatgacag tatttacctt gatgttccgc cgactatctc 3180
 ggatttcica gacaatgcaa tgatggctgc tgattactgc attattgttc ttcaaacaca 3240
 agaactcict ctgatggcg caaagactta tatttcttac atgcaatatt tagcaaataa 3300
 ctataattct gatttagatg ttcttggaaat aattccatgt atgttgcgac ctggtggtag 3360
 ggtagatgaa gatgttctac atgcggctcg ggatctttat gggaacaacg ttttacacac 3420
 cgttgtaaaa tatcaggaac gactaaaggc atatgatgct gaaggaatcc atatcaacaa 3480
 aaccacacta ggctacgaag atagtggga tattagagca cataaagitt ttgaaagtgt 3540
 ictagacgaa ctagatgaaa atcaaaagaa acttgataaa taccgagaag gtgagctaaa 3600
 tgagtacga gagcattcaa ccgattattg accatcataa aagaaagcaa tcaagcggat 3660
 tagagcggaa gcaagtctca attgcaggga caaatgattt ttcggctact attgataaga 3720
 aggttgigaa taataactcg ccagcggatg attctcgata caaagcgact acaacaatga 3780
 aaataacacc agtaacaaac ttgaagtgc agactttaaa gccatttata aatgagcaaa 3840
 agtctagiga tcgttcagat acaatgaatg acttaataaa tgttttgatt gaaagttata 3900

10

20

30

40

ttggaaaaaa tctgactgca cggcaggcaa atgcgtacaa ccaaattgitt gggttacagc 3960
 tcagtatggt gaaacctaaa caaaaataag caccatacgt gtttgagcac agtacattaa 4020
 gtgcaattaa aagttacaga cgattatgtc cgtgaattaa atcttcaaga atatcagaat 4080
 cagggtgaat taaatgccgt gtgttgcgt atccaatgtt taggttagaa tgcitcttca 4140
 aagaggaaaag aaaatgctca tattggcctt tatcacgttt aaagcaggca atctcatagc 4200
 ttttgatcaa ctttgctttg aaccgctgca tgtagatgaa gaatgagtag cagicttcaa 4260
 agtggttatc gaccaccacc aaccaataac gagtgtgcgg cgcacgggtg aagtaatgat 4320
 cgtactgtga cagcatggat tggatgccaa gccgcagttc ggitttcctt tccatgatgc 4380
 ccaccaacca atccggcacg atcaattgcg gtcgcgcctt tttctttgga gtaaccccg 4440
 acaattgctt tgtagccata tagttgacga atcttgtcaa ttgtttgatc taacaaaacg 4500
 ttgtcttctt ccttctctgc tgactcaa atagactaagct gcatcgagct tgcitgactg 4560
 atgcgattaa cacgaactga aacatttctg acggcatggc cgttccactt actatggaag 4620
 agaaagcgag cggcgcgaat caaatcgta gtgcggtttg tgggatcaat cttcatttgc 4680
 gcaccgaaac cggagggtgc cgctcttct gcatcagcat aaccaatccc aacgctaatt 4740

10

20

30

40

acttcacctt gtacttgatg gtgacgaagt cggcccgcca ctatgatcggc gatctcactg 4800
 agcacgactt caatctccct tgcctgcgtg taatcacgca tgagtacctg actattgcc 4860
 tagcccttgt tctcggcgcg tggcaaatag cgacgagta aatccgagta atcaataccc 4920
 catgaatgga aatacaaggc atcgccgaga acgccgaagc gttgatgtaa taaaagccga 4980
 tcg 4983

10

<210> 3
 <211> 3949
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus casei YIT9029

20

<400> 3
 aacaaagaca gatggtgata ctggtaaagt tcttccggt gccgtgttc atctgtataa 60
 gaaggacggc acaaagcttg ctagtggttt gacgacagat gctaaaggta aaatcaaggt 120
 caatgacttg aagccaggta actactactt tatcgaacaa acagcgccag ctggttatca 180
 attgaacaac agtaagctga acttcacggt tgaatttcag gaaacaacca aggttgcgac 240
 cgtctcggca acgaatgctg agaagactgg ttcagttgtt ttgaacaaga ccgacggcga 300
 tactggtaaa actcttgctg gtgcagtatt cgatctttat aagaaagacg gtactaagat 360

30

40

cgctagcggg ttgacgacag atgctaaggg tcaaatcaag gtcaatgatt tgaagccagg 420
 cgactactac tttgtcgaaa cagcagcgcc agctggctat gaactaaatg acagtaagct 480
 gaacttcacg gtigaattac aaaccacagc caaagttgcg accgtttctg caacaaatgc 540
 tgagaagact ggctcagttg ttttgaacaa gacggatagt gatactggta aagctctttc 600
 cggigccgtg ttcgatcttt ataagaagga cggtactaag atcgctagcg gtttgatgac 660
 agatgctaag ggicaaatca aggtcaatga ttigaagcca ggcgactact actttgtcga 720
 aacagcagcg ccagctggct atgaactaaa tgacagtaag ctgaactica cggttgaatt 780
 acaaaccaca gccaaagtig cgaccgtttc tgcaacaaat gctgagaaga ctggctcagt 840
 igtittgaac aagacggata gtgatactgg taaagctctt tccggigccg tgttcgatct 900
 ttataagaag gacggcacia agcttgctag tggtttgacc acagatgcta agggicaaat 960
 ccaggicaat gattigaagc caggcgacta ctactttgtc gaaacagcag cgccagctgg 1020
 ctaigaacta aatgacagta agctgaactt cacggttgaa ttacaaacca cagccaaagt 1080
 tgcgaccgtt tctgcaacaa atgctgagaa gactggctca gttgtcttga acaagacgga 1140
 tagtgatact ggtaaaactc ttgctgggtc agtatttgat ctgtataaga aggatgggac 1200
 taaggttgct agtggtttga ccacagatgc taagggtcaa atcaaggica atgatttgaa 1260

10

20

30

40

gccaaagcgac tactactttg tcgaaacagc agcaccagct ggttatgaac taaacgacag 1320
 taaatigaac ttcacgggtg aattacaaac cacagccaaa gttagcgaccg tttctgcaac 1380
 aaatgctgag aagactggct cagttgtctt gaacaagacg gatagtgata ctggtaaaac 1440
 tctttctggt gcagtatttg atctgtataa gaaggatggg actaagggtg ctagtgggtt 1500
 gaccacagat gctaagggtc aaatcaaggt caatgacttg aagccagggt actactactt 1560
 tatcgaaaca acagcgccag ctggttatca attgaacaac agtaagctga acttcacggt 1620
 tgaatttcag gaaacaacca aggttagcgac cgtctcggca acgaatgctg agaagactgg 1680
 ttcagttggt ttgaacaaga ccgacggcga tactggtaaa actcttgctg gtgcagtatt 1740
 cgatctttat aagaaagacg gtactaagat cgctagcgggt ttgaccacag atgctaagggt 1800
 tcaaatccag gtcaatgact tgaagccagg cgactactac tttgtcgaac cagcagcgcc 1860
 agctggctat gaactaaatg acagtaagct gaacttcacg gttgaattac aaaccacagc 1920
 caaagttgcg accgtttctg caacaaatgc tgagaagact ggctcagttg tcttgaacaa 1980
 gacggatagt gatactggta aaactctttc tggtagcagta tttgatctgt ataagaagga 2040
 tgggactaag gttgctagtg gtttgaccac agatgctaag ggtcaaatca aggtcaatga 2100

10

20

30

40

ctitgaagcca ggtgactact actttatcga aacaacagcg ccagctgggtt atcaattgaa 2160
 caacagtaag ctgaacttca cgggttgaatt tcaggaaaca accaagggtg cgaccgtctc 2220
 ggcaacgaat gctgagaaga ctgggttcagt tgttttgaac aagaccgacg gcgatactgg 2280
 taaaactctt gctgggtgcag tattcgatct ttataagaaa gacgggtacta agatcgctag 2340
 cggtttgacg acagatgcta aggggtcaaatt caagggtcaat gatttgaagc caggcgacta 2400
 ctactttgtc gaaacagcag cgccagctgg ctatgaacta aatgacagta agctgaactt 2460
 cacgggttgaa ttacaaacca cagccaaagt tgcgaccgtt tctgcaacaa atgctgagaa 2520
 gactggctca gtgttttga acaagacgga tagtgatact ggtaaagctc tttccgggtgc 2580
 cggttcgat ctttataaga aggacgggtac taagatcgct agcgggttga tgacagatgc 2640
 taagggtcaa atcaagggtc atgatttgaa gccaggcgac tactactttg tcgaaacagc 2700
 agcgccagct ggctatgaac taaatgacag taagctgaac ttcacgggtg aattacaaac 2760
 cacagccaaa gttagcgaccg tttctgcaac aaatgctgag aagactggct cagttgtctt 2820
 gaacaagacg gatagtata ctggtaaaac tcttgctggg gcagtatttg atcgtataa 2880
 gaaggatggg actaagggtg ctagtgggtt gaccacagat gctaagggtc aaatcaaggt 2940
 caatgatttg aagccaagcg actactactt tgtcgaacaa gcagcgccag ctggctatga 3000

10

20

30

40

actaaatgac agtaagctga acttcacggt tgaattaca accacagcca aagttgacgac 3060

cgtttctgca acaaagctg agaagactgg ctgagttgtc ttgaacaaga cggatagtaga 3120

tactggtaaa actcttgctg gtgcagtatt tgatctgtat aagaaggacg gcacaaagct 3180

tgctagtaggt ttgaccacag atgctaaggg tcaaatccag gtcaatgact tgaagccagg 3240

cgactactac ttgtcgaaa cagcagcacc agctggctat gaactaaatg atagtaagct 3300

gaacttcacg gtcgagttac aaaccacaac caaggttgcg accgtttctg caacaaatgc 3360

cgagaagacg gggtcagttg ttttgaaca gacggatagt gatactggta aaactcttgc 3420

tggtagcagta ttgatctgt ataagaagaa tggcactaag atcgctagcg gttaaagcag 3480

agatgctaag ggtaaaatca aggtcaatga ttgaagcca ggcgactact actttgtcga 3540

aacagcagcg ccagctggct atgaactaaa tgatagtaag ctgaactica cggttgaatt 3600

acaaaccaca accaaagtgc cgaccgttgc tgcaacaaat gccgagaaga cgggttcagt 3660

tgttttgaac aagacagacg gcgatactgg taaaactctt gctggtagcag tgttcgatct 3720

gtacaagaag aatggcacta agatcgctag cggtttgacg acagatgcta aaggccagat 3780

ccaagtcaat gatttgaagc caggcgacta ctactttgtt gaaacagcag caccagctgg 3840

10

20

30

40

ttataaactg agtaacgaaa aaatatcggt tacgggtcaag cttcaactca ataatagaatc 3900

ggctgtgggt gtggcgaaga actttaagaa gactacacca ccaaaccacc 3949

<210> 4

<211> 7469

<212> DNA

<213> Lactobacillus casei YIT9029

<400> 4

cgcaaaaagaa aaacgaaatg atacaccaat cagtgcacaaa aaagatataa tgggagataa 60

gacgggttcgt gttcgtgctg acttgcacca tatcataaaa atcgaaacag caaagaatgg 120

cggaacgta aaagaagtta tggaaataag acttagaagc aaacttaaga gtgtgttgat 180

agtcagiat cttaaaattt tgtataatag gaattgaagt taaattagat gctaaaaatt 240

tgtaattaag aaggagtgat tacatgaaca aaaatataaa atattctcaa aactttttaa 300

cgagtcaaaa agtactcaac caaataataa aacaattgaa tttaaaagaa accgataccg 360

tttacgaaat tgggaacaggt aaagggcatt taacgacgaa actggctaaa ataagtaaac 420

aggtaacgtc tattgaatta gacagtcac tattcaactt atcgtcagaa aaattaaaac 480

tgaatactcg tgtcacttta attcaccaag atattctaca gtttcaattc cctaacaaac 540

10

20

30

40

agaggtataa aatigtgtggg agtatttcctt accatttaag cacacaaatt attaaaaaag 600
 tggtttttga aagccatgcg tctgacatct atctgattgt tgaagaagga ttctacaagc 660
 gtaccttgga tattcaccga acactagggt tgctcttgca cactcaagtc tctgattcagc 720
 aatigcttaa gctgccagcg gaatgccttc atcctaaacc aaaagttaa acgtgtcttaa 780
 taaaacttac ccgccatacc acagatgttc cagataaata ttggaagcta tatacgtact 840
 ttgtttcaaa atgggtcaat cgagaatata gtcaactgtt tactaaaaat cagtttcctc 900
 aagcaatgaa acacgccaaa gtaaacaatt taagtaccgt tacttatgag caagtattgt 960
 ctatttttaa tagttatcta ttatttaacg ggaggaaata attctatgag tctgttttgt 1020
 aaattiggaa agttacacgt tactaaaggg aatgtagata aattattagg tatactactg 1080
 acagcttcca aggagctaaa gaggtcccta gcgtatgcgg tgtgaaatc cgcacagatg 1140
 cgttaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttgccattc aggctgcgca actgtttggga 1200
 agggcgatcg gtgcgggcct ctctgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 1260
 aaggcgatta agttgggtta cgccagggtt ttcccagta cgacgttgta aaacgacggc 1320
 cagigaattc gagctcggta ccccgtaaaa ggaaccattc gcgtgatiga tgagcaccgc 1380
 tctatcaaaa gtccgaacgc aaaatgcctg tcttacaact cctgaacgtg ctagaatagc 1440

10

20

30

40

catigtaaca actcctttct taggatcagc agcaccaaga gaaacacaaa aataaggggc 1500
 gcgctgccctg ctggcaacgc gcccctcact tcgtcttggt ttgctgctat tttagctct 1560
 cctactttcg ctctaagact tctctaagag aagttccaca gcggtcacaa ggtctgttaa 1620
 aataaacttg ccgcgcttaa cgcgggtgaag acggcagttg ctaggctagc ggtgactagt 1680
 tctagtaaca gtcacagtgc gcttatcctg gattggtagt ctaggtcagt gctgtgatgc 1740
 tgtcttattt ttttgtattc ccttgcctac tgttgattct gaattcaaga taacacttga 1800
 attttttgaa tgcaagcatt agtgtgtaga ggaacaaatt aagtaaggca aacatgtgtt 1860
 gaattgagca ggtagacaaa cgaatgttcg cctatattta ttataggacc tggttccttt 1920
 ttagacaaga atttttctaa ttcttgtctt tctttttgct cttctctagg ttggctaact 1980
 cttcacgaac cctatgatgg cggcgaatca ctttacgaac tcggttatgt ttttgctgtg 2040
 cagaatcaaa tggcccccg taatctttct gtcgttgctg ctcagttctt tgtccttggt 2100
 tgacttgaac agacgaggca tattggcttg tgaactcaat cataaatiga tctggtaaca 2160
 cccggccatc ttgtaattgc cgtctctttt gtttggtaac ataaagcacc atcacatcat 2220
 gtagctggcc atctttgcca cgaacatgcg caactcgccc taatggccga tccggaatga 2280

10

20

30

40

ccaaatcatc agggactagc cagtagtatt tagtcggtcg aatgcgcitt ggcgtcatga 2340
 agtaaccigc catcatagta acttttccaa gtacctgac gtgacgatta cgaigctgcg 2400
 taaaggcitt taactccgta tcagtctctg ttigtctctg gatcaagcgt tctttgacgg 2460
 cggcatagct gtgcittcta gcttcttccg ctcggtgatt agcagttttt tgtgcctctg 2520
 ccagaataac ctctcgttca tcaggatcac tcgtttgaat catgagtaaa tgcagaccgg 2580
 cacgttcigc ctacgttagc tctttgaggt ttttgagcgc tacctcttcc ggaaaggcitt 2640
 cacgtttccg ttgattaaac tctttagaat tcatcaggtt cgcttccatt agctgtcatg 2700
 agtgatttgt tccagtatgc caccaaggtc tcttcatag caccaaaca gtaattttcg 2760
 acatgttaa ttttttact gtcagaacgt aaaacgttaa aaaaccggcg catagtcttg 2820
 ttgatcatt ctgggcaccg cggatcatct aggacaattg ccgttccctc atgttccctt 2880
 tctacagcct ttitggcatt tagaataatg cctagaaagc gacgcatttg tttaggcgag 2940
 cgacaccaaa gccctagtag ttcaacacct tcttgttga gaaagaggcc gccatttgct 3000
 gattcaggta aataatcttt ggcccttctc actaggtctt gatitgttt acgaataatt 3060
 tccggggaat attgatcggg agaaaagtcg aactttctg tctctttatt gtctctagct 3120
 tgtgtctcta agtctttata ttgataact aaagaatttt cagttccgct tgtagcaagg 3180

10

20

30

40

gatigagga cttatcgcg ggctaaagaa ttttagttc cgctttagc aaggattga 3240
ggcattttat gtcgggctaa agaattttta gtccgcttg tagcagggga tatagtactt 3300
tgacttgctt cattctcgcg ttgtacacg tcggitgcag atacattgag atcgcccaaa 3360
tataagcgat tgggattatt ccgtttcatt ttcggatcaa agcccatitt tttctggaag 3420
aggaggtttg ctgtttctaa ctcttttttg gttttgatta ccttgggttc ggagcagttc 3480
aaaatctgtt gaagctcagt atttgaaaa atgaagtaa tatttcggtt ttcgtccacc 3540
cagtcattgt gaagcgaata ttccagtcga tctttcaaaa tgacgtacgc caactttgct 3600
tctgcagaaa ggtttttgta tgtaggactg tacaaaagaa cttttggaaa ctgaaagaaa 3660
agagtccegt aaacttttgt cgcttggtaa aattttaaac tcgaatttat tgggttcatt 3720
ttaaaaaactc ctgtgggttc atctatttat ggtagagcaa acaaacattt gataattcca 3780
tataacaaca cgactgtata ctagtataa cgtcctgtaa aggactatag ttaaaataat 3840
aattctggta taccagtata ccgtatact cagtagatgt gtataccagt atactggtat 3900
actgggtatc acgacctttt ttgcataaac tatttttgat caaaaaagct taaaaaata 3960
gcgcttaagg cgatatataa aaagaattca aggtatacag gtataacctgt ataccttgaa 4020

10

20

30

40

ttctccctta tatcgtcaaa aagtataccg gtatactttt acaaaggat tcataggatgc 4080
 tataatgttt gtaggaaggc ggtatttata tggctaaaac ttacgttggt gggaacttca 4140
 agggcggigt tggtaaaaca aaaaccgtta cgatgctagc ttatgagagt gcagtaaaaa 4200
 agagaagaaa gactttggta attgacctag atcctcaagg taatgcaaca agcgttcttg 4260
 gacgaacagg cggcttgagt gccattacta agaattgaac agatgggttt atcagcggaa 4320
 acttacggaa ccaaataaca aaagtatac cccgcttgga tattattggt gcaagtacga 4380
 gcttagaac gtaccaaag ttgttaatgt caaaatttc ggaggacga gatcagcaaa 4440
 tgcgtatgt gaagacactg ctggaacct taaaggatca atatgacagt atttacctg 4500
 atgtccgcc gactatctcg gattctcag acaatgcaat gatggctgct gattactgca 4560
 ttatgttct tcaaacacaa gaactcttc ttgatggcgc aaagacttat atttctaca 4620
 tgaatatt agcaaataac tataattctg atttagatgt tcttggaata attcatgta 4680
 tgttgcgacc tggigttagg gtagatgaag atgttctaca tgcggctcgg gatctttatg 4740
 ggaacaacgt ttacacacc gtgtaaaat atcaggaacg actaaaggca tatgatgctg 4800
 aaggaatcca tatcaacaaa accacactag gctacgaaga tagttgggat attagagcac 4860
 ataaagtitt tgaagtgtt ctagacgaac tagatgaaa tcaaaagaaa ctgataaat 4920

10

20

30

40

accgagaagg tgagctaaat gagtgacgag agcattcaac cgattatiga ccatcataaa 4980
 agaaagcaat caagcggatt agagcggaa caagctcaa ttgcaggac aaatgatttt 5040
 tcggctacta ttgataagaa gggtgtgaat aataactcgc cagcggatga ttctcgatac 5100
 aaagcgacta caacaatgaa aatatacca gtaacaaact tgaagtigca gacittaaag 5160
 ccatttataa atgagcaaaa gtctagtat cgttcagata caatgaatga cttataaat 5220
 gttttgattg aaagtatat tggaaaaat ctgactgcac ggcaggcaaa tgcgtacaac 5280
 caaatgtttg ggttacagct cagtatgtt aaacctaac aaaataagc accatacgtg 5340
 tttagcaca gtacattaag tgcaattaaa agttacagac gattatgtcc gtgaattaaa 5400
 tcttaagaa tatcagaatc aggttgaatt aaatgccgtg tgttgcgata ttcaatgttt 5460
 aggttagaat gctgcttcaa agaggaaaga aaatgctcat attggccttt atcacgttta 5520
 aagcaggcaa tctcatagct ttgatcaac ttgctttga accgctgcat gtagatgaag 5580
 aatgagtagc agtcttcaa gtggttatcg accaccacca accaataacg agtgtgcggc 5640
 gcacgggtga agtaatgatc gtactgtgac agcatggatt ggatgccaag ccgcagttcg 5700
 gtttccttat ccatgatgcc caccaaccaa tccggcacga tcaattgcgg tcgcgccttt 5760

10

20

30

40

ttctttggag taaccccgca caattgcitt gtagccatat agttgacgaa tcttgtcaat 5820
 tgtttgaict aacaaaacgt ttgcttcctc ctctctgtct gactcaaata gactaagctg 5880
 catcgagcct gcttgactga tgcgattaac acgaactgaa acatttctga cggcatggcc 5940
 gtccacata ctaiggaaga gaaagcgagc ggcgcgaaac aaatcgtcag tgcggtttgt 6000
 gggatcaatc ttcatitgct caccgaaacc ggaggtgccc gcctcttctg catcagcata 6060
 accaatccca acgctaata cttcaccttg tacttgatgg tgacgaagtc ggcccgccac 6120
 ttgatcggcg atctcactga gcacgactc aatctccctt gcctgcgtgt aatcacgcat 6180
 gagtacciga ctatigccat agcctttgtt ctggcgcgct ggcaaatagc gacgagtcga 6240
 atccgagtaa tcaatacccc atgaatggaa atacaaggca tcgccgagaa cgccgaagcg 6300
 ttgatgtaat aaaagccggg ggatcctcta gactcgacct gcaggcatgc aagcttggcg 6360
 taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac 6420
 atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca 6480
 ttaatigcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa acctgtctgt ccagctgcat 6540
 taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc 6600
 tcgtcactg actcgctgcg ctgggtcgtt cggctgcggc gagcggatat agctcactca 6660

10

20

30

40

aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 6720
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt ttccatagg 6780
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggig gcgaaacccg 6840
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctggt 6900
ccgacccctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt 6960
tctcaatgct cagctgtag gtatctcagt tcgggttagg tcgttcgctc caagctgggc 7020
tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgtgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 7080
gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 7140
agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gatttcttga agtggtaggc taactacggc 7200
tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac ctccggaaaa 7260
agagtggta gctcttgatc cggcaaaca accaccgctg gtagcggtag ttttttgtt 7320
tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccitt gatctttct 7380
acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 7440
tcaaaaagga tcttcaccta gatccttt 7469

10

20

30

40

【 0 0 4 1 】

【 発明の 効果 】

本発明プラスミドは、乳酸菌の増殖能を向上させる作用を有し、食経験のある乳酸菌から分離されたものであることから安全性も高い。そして、当該プラスミドを用いて構築された乳酸菌用シャトルベクターは、従来のシャトルベクターに比べて宿主中での安定性が高く、また操作性にも優れることから、食品又は医薬品を製造するためのベクターとして有用である。

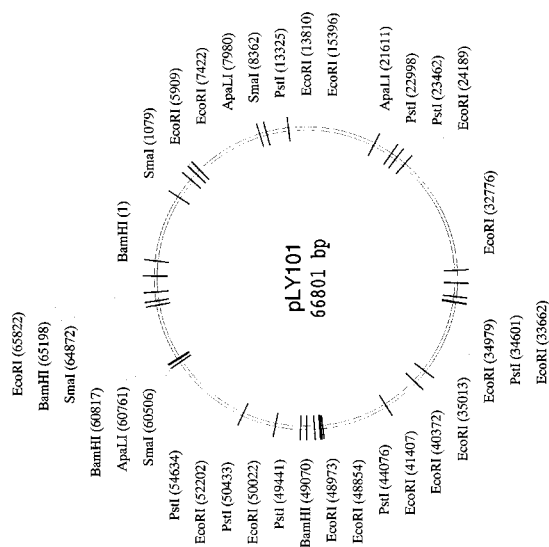
【 図面の 簡単な 説明 】

【 図 1 】 図 1 は、プラスミド p L Y 1 0 1 の制限酵素地図である。

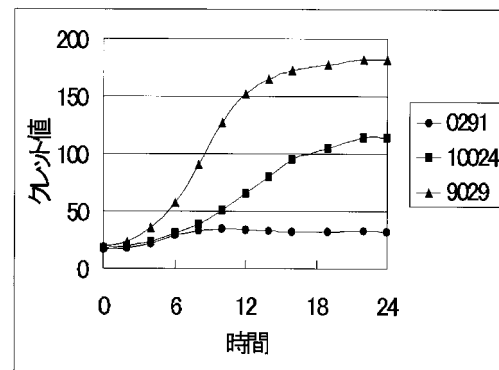
50

- 【図 2】 図 2 は、各菌株のクレット値の変化を示すグラフである。
- 【図 3】 図 3 は、シャトルベクター p C A T 1 - 1 の作成工程を示す図である。
- 【図 4】 図 4 は、シャトルベクター p C A T 1 - 1 の制限酵素地図である。

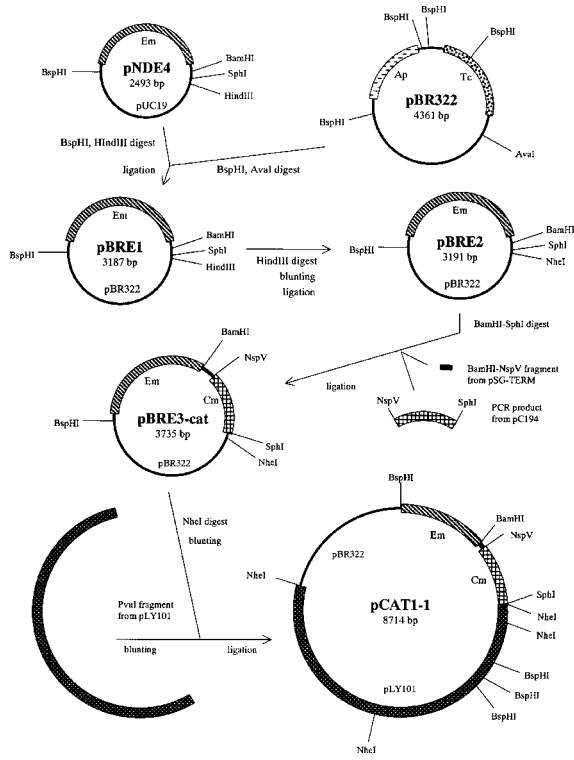
【図 1】



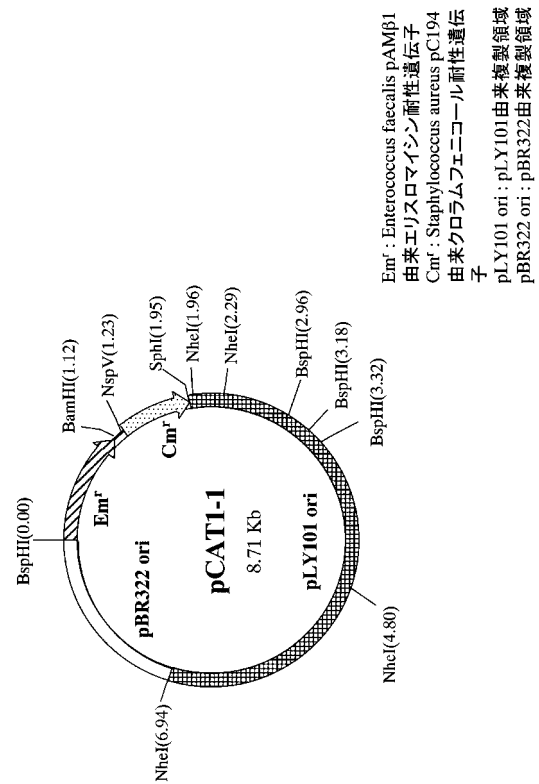
【図 2】



【図 3】



【図 4】



Em^r : Enterococcus faecalis pAMβ1
 由来エリスロマイシン耐性遺伝子
 Cm^r : Staphylococcus aureus pC194
 由来クロラムフェニコール耐性遺伝子
 pLY101 ori : pLY101由来複製領域
 pBR322 ori : pBR322由来複製領域

フロントページの続き

- (72)発明者 久代 明
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 辻 浩和
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 上原 一晃
千葉県銚子市末広町1-12 末広寮14号室
- (72)発明者 三瓶 厳一
東京都杉並区宮前2-17-12
- (72)発明者 溝渕 潔
千葉県千葉市稲毛区小仲台1-4-1 アイ・プレイス稲毛1-809
- Fターム(参考) 4B024 AA01 CA02 EA04 FA15
4B065 AB01 BA02 CA45