ヨーグルト乳酸桿菌への 遺伝子導入法の開発

多くの発酵食品の製造や酒類の醸造にとって、乳酸菌は大変重要な微生物である。乳酸をはじめとし乳酸菌が生産する香味成分は、発酵食品に独特の風味を付与している。また、乳酸によって酸性環境が維持され製造中の有害微生物の汚染防止にも役立っている。更には腸内細菌として健康維持にも寄与している。このように我々になじみが深く、また有用な微生物である乳酸菌の最新の遺伝学、遺伝子工学的研究の成果についてヨーグルト乳酸桿菌を中心として紹介していただいた。

佐々木 隆・佐々木泰子・伊藤喜之

1. はじめに

新しい遺伝学的方法を用いて、産業的に重要な微生物の遺伝現象を解明し、更には菌株の効率的な育種・改良を可能にすることは、種々の産業の今後の発展にとって極めて魅力的であり、今まで数多くの進歩や成功例が報告されてきた。

食品産業で用いられる微生物について見ると、酵母、カビ、納豆菌、酢酸菌などで基礎的な研究成果が得られ、実用化を視野に入れた研究が進んでいることは周知のことであろう。

これに対し、各種の食品製造で重要な働きをする乳酸菌についてはこれまで遺伝学研究がそれほど進んでいなかった。しかし、ここ十年ほどの間に貴重な成果が次々と得られ、チーズ製造に用いられている *Lactococcus* 属の乳酸球菌では欧米の研究者を中心に精力的な研究が行われ、近い将来の応用が可能であろうと考えられるほどになっている。

もちろん、新しく改良された乳酸菌を応用する場合には、食品レベルでの安全性を確保することが大前提であるため、実際に応用される前に更に多くの基礎的研究の積み重ねが必要であることはいうまでもない。

本稿では、まず、食品産業で有用な乳酸菌の遺伝学的研究について概説し、次に今まで成功例がなかったヨーグルト乳酸桿菌への遺伝子導入に関する我々の研究結果について述べる。

2. 乳酸菌遺伝学研究の現状

乳酸菌とは、糖を代謝してできる最終産物のうちモル比で 50% 以上が乳酸であるグラム陽性細菌のことで、通常、*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* の 5 属の細菌を指す。食品産業では極めて重要な細菌群で、チーズ、ヨーグルト、発酵ソーセージ、漬物、ワイン、日本酒、味噌、醤油など数多くの発酵食品及び飼料（サイレージ）の製造に古くから利用されてきた。また、乳酸やデキストランの工業生産にも用いられ、更に、一部の乳酸菌は腸管や腔などに棲息して人間の健康維持に貢献している（第1表）。

乳酸菌の遺伝学研究は、このような有用性と結び付いて発展してきた¹⁾。古くから研究され、現在遺伝学研究が最も進んでいるのは、チーズスターターとして用いられてきた *Lactococcus* 属乳酸球菌である。ファージの感染や様々な原因で発酵停滞が起こりチーズ生産が失敗することがあるが、欧米各国にとってチーズ生産は産業的

第1表 乳酸菌の利用例

1) 発酵食品製造	
原材料	産 物
乳	チーズ、ヨーグルト、発酵乳、発酵バター、等
肉、魚	発酵ソーセージ、マリネ、等
植物	日本酒、ワイン、味噌・醤油、ビクルス、漬物、サワーブレッド、サイレージ（飼料）等
2) 工業原料製造：乳酸、デキストラン等	
3) 健康関連：（腸内常在細菌として作用）、整腸剤等	

Development of Gene Transfer Systems for *Lactobacillus bulgaricus*

Takashi SASAKI, Yasuko SASAKI and Yoshiyuki ITO (Meiji Institute of Health Science, Meiji Milk Products Co., Ltd.)

に重要であるため、その原因を究明し、失敗のない安定なチーズ生産を行うことは経済的に大きな意味を持つ。

従って、国立の研究所や大学で精力的に研究が行われ、発酵停滞の原因のいくつかが解明された。例えば、*Lactococcus* 属の乳酸菌の多くは牛乳中のカゼイン等を分解する酵素や乳糖の代謝に関わる遺伝子がプラスミド上に存在するため、その脱落によって発酵停滞が起こることなどが判明した。

そして、これらの遺伝子がクローニングされ詳細に解析された²³⁾。現在ではこれらの遺伝子を染色体に組み込むことによって安定化し、発酵停滞が起らないようにする試みがなされている。更に、蛋白質工学によって様々な突然変異体を作成し、苦味ペプチドを作らないように活性を変化させた蛋白分解酵素を選び、チーズの香味を改良しようとする実用的な研究も行われている⁴⁾。

また、乳酸菌ファージについては形態学的及び生理学的に研究されてきたが、乳酸菌の染色体やプラスミドにファージ耐性遺伝子が存在することも明らかになっている。プロファージをキュアリングしたり、耐性遺伝子をチーズスターターに導入することで、ファージ汚染による発酵停滞を克服し安定なチーズ生産を目指す試みも行われている⁵⁾。

一部の乳酸菌は、バクテリオシンと呼ばれる蛋白性の抗菌性物質を生産する。*Lactococcus lactis* が生産するナisinはその代表であり、欧米各国をはじめ多くの国で食品保存料として用いられている。その生合成に関与する遺伝子が最近クローニングされ、ナisin生産量の増大を目指し、また、抗菌スペクトルの広いナisinに改良するための研究が蛋白質工学を利用して行われている⁶⁾。

また、サイレージの効率的生産を目指して、植物の多糖類を分解する酵素 (amylase, endoglucanase) 遺伝子を *Lactobacillus plantarum* (サイレージ用スターター) の染色体に導入した報告⁷⁾もある。

遺伝学研究が本格的に進展したのは、十年ほど前にプロトプラスト法での形質転換⁸⁾が報告されてからである。乳酸菌では、雌雄株による接合や枯草菌等に見られる自然のコンピテンス誘導、または、大腸菌等に見られる化学物質によるコンピテンス誘導が知られていないために形質転換が困難であった。従って、交配実験に基づく遺伝子地図が作られていない。しかし、今までに乳酸菌用の各種のベクターが構築され、今ではエレクトロポレーション法によって *Lactococcus* 属のみならず、*Lactobacillus* 属など多くの菌種で形質転換が可能となっている。最近では、将来の産業的応用を見据えて、有用遺伝子を染色体へ組み込んで安定化しようとする研究

も盛んになってきた⁹⁾。また、多くの乳酸菌の遺伝子がクローニングされ、遺伝子の発現・調節に関する検討も広く行われるようになってきている。

なお、数種の乳酸菌ではパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いて、染色体 DNA の物理地図が作製されている。概して乳酸菌のゲノムは小さく、約 2 メカベース程度のものが多い¹⁰⁾。

また、注目すべき最近の研究動向としては、乳酸菌が美味しく食べられ、しかも安全である利点を活かし、乳酸菌を宿主としてウィルスや病原菌の抗原を発現し「生きた経口ワクチン」を作るための基礎研究が、欧州のいくつかの研究機関で開始されたことである。このように、従来の乳酸菌利用の枠を越えて、乳酸菌の持つ新しい (潜在的な) 可能性を引き出して利用する動きは、今後の乳酸菌の利用について示唆に富んでいると思われる。

もちろん、食品やワクチン等へ応用する場合、改良された乳酸菌が人にとって安全であることが絶対に必要な条件であるため、乳酸菌遺伝学に関わる研究者は、以前から食品レベルでの安全性を確保する方法や材料について真剣に検討しており、また現在も盛んに研究されている。

3. ヨーグルト乳酸桿菌染色体への遺伝子導入

このように、産業的に重要な一部の乳酸菌については、既にいくつかの遺伝子がクローニングされ、遺伝子を導入する方法 (形質転換など) も整備されつつある。

従って極言するならば、これらの乳酸菌 (少なくとも研究室株) では応用に必要な最低限の基礎的な技術が存在しているので、今後必要なのは「どのような効果を求めて、どのように育種の戦略を立てるか」、問題なのはそのアイデアである、と言って良いかも知れない。

しかし、乳酸菌は多くの属、種を包含しているためすべての乳酸菌で研究が同様に進んでいるわけではない。我々が研究しているヨーグルト乳酸桿菌 (= *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 以下 *L. bulgaricus* と略す) は産業的有用性が高く世界中で研究されてきたにもかかわらず、遺伝子導入がうまく行かない代表例であった。

今から数年前に研究を始めた頃は、他の乳酸桿菌と同様に *L. bulgaricus* でも形質転換が可能だろうと考えたが、実際に研究してみると一筋縄では行かないことが判明した。そこで形質転換と同時に、より簡単に成功すると予測した接合伝達性プラスミド pAM₅₁ の導入を本菌で試みた。

(1) 接合伝達性プラスミド導入の試み

Enterococcus faecalis 由来の pAM β 1 (第1図 A) は、エリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子と接合伝達に關する遺伝子群を有する 26.5 kb のプラスミドである¹¹⁾。本プラスミドの宿主域は極めて広く、pAM β 1 を保持する供与菌から接合によって、属が同じ場合はもちろん、属が異なる細菌へも伝達され、*Lactobacillus* 属を含むグラム陽性細菌のほとんどすべての属でプラスミドとして複製できることが知られていた。従って、*L. bulgaricus* でも同様の結果が得られると期待して検討を開始した。

しかし、今まで報告されていた様々な方法を用いて検討を繰り返したが、予測に反して接合伝達株は全く得られなかった。更に、欧米の研究者達からの情報によって本菌の接合伝達の成功例が全くないことが判明したため、*L. bulgaricus* に適した新しい方法が必要だと考えた。

まず、他の乳酸桿菌を用いて接合伝達について調べた結果、一般にプラスミド供与菌と受容菌の物理的接触を強めることによって、高い接合伝達頻度が得られることが判明した¹²⁾。そこで、培養方法や接合伝達方法を詳細に検討し、供与菌と受容菌 (*L. bulgaricus*) の物理的接触を強くする独自の方法を考案して接合伝達を試みた。

その結果、極めて低頻度であったが Em 耐性の接合伝達株を得ることに初めて成功した。Em の MIC は、受容菌の *L. bulgaricus* では 0.2 μ g/ml であったが接合伝達株では高濃度 (1 mg/ml 以上) であり自然突然変異体ではないと考えられた。しかし、今までの報告とは異なり、自律複製する pAM β 1 プラスミドは検出されなかった (なお、プラスミドは異なるが、フランスの LANGELLA ら¹³⁾は接合伝達で導入された pIP 501 プラスミドが本菌で複製されると報告している)。

(2) ヨーグルト乳酸桿菌染色体への組み込み

pAM β 1 をプローブとして接合伝達株の DNA を Southern hybridization 法で調べた結果、pAM β 1 プラスミド 1 コピーが染色体に組み込まれており、自律複製

第1図 接合伝達性プラスミド

するプラスミドは存在しないことが判明した¹⁴⁾。従って、pAM β 1 は *L. bulgaricus* では複製できず、選択条件下で染色体へ組み込まれたもののみが子孫に伝えられると推定された。これは、今まで他の細菌で報告された結果と異なり予想外であった。また同時に、*L. bulgaricus* でのプラスミドの複製については、他の乳酸菌の結果と異なる面があることを示唆し、後述の形質転換法の開発の際に参考になった。

図らずもこれらの結果から、pAM β 1 プラスミドが本菌染色体へ遺伝子を組み込むためのベクターとして利用できることが示唆された。

この可能性を確かめるため、*L. bulgaricus* 染色体の一部の DNA 配列と、異種遺伝子 (*L-LDH* 遺伝子: ヨーグルト生産菌 *Streptococcus thermophilus* M-192 株からクローニングした¹⁵⁾) を pAM β 1 に挿入してプラスミド p β LD1 (第1図 B) を構築した。このプラスミドを *L. bulgaricus* へ接合伝達によって導入した結果、Em 耐性を示す接合伝達株が pAM β 1 の場合より高い頻度で得られた。Southern hybridization 法で調べた結果、接合伝達株では p β LD1 が染色体の相同部位 (プラスミドに挿入した *L. bulgaricus* 染色体の DNA 配列と同じ部位) に組み込まれ、しかも、D-乳酸のみしか生成しない本菌で、挿入した *L-LDH* 遺伝子が発現し、接合伝達株は D-乳酸と同時に L-乳酸も生成した。

これらの結果から、pAM β 1 をベクターとすることによって、*L. bulgaricus* 染色体の目的の位置に、目的の遺伝子を挿入すること (=ターゲッティング) が可能であることが示された¹⁶⁾。今まで、産業的に重要であるにもかかわらず *L. bulgaricus* 染色体へ外来遺伝子を導入する方法は全く存在しなかったが、この方法によって、本菌の遺伝学的解明を行い、更には、育種・改良を行う可能性が拓けた。

(3) 遺伝子交換によるヨーグルト乳酸桿菌育種の試み

次に、これらの結果を応用して本菌での「遺伝子交換」を試みた。*L. bulgaricus* は D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) を持ち D-乳酸のみを生成するが、この遺伝子を外来の *L-LDH* 遺伝子と交換して、L-乳酸のみを生産する *L. bulgaricus* を作出することを計画した。

ヨーグルトは、ご承知のように牛乳を原料として、基本的には2種の乳酸菌 (*L. bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus*) の発酵で作られるが、前者は D-乳酸を、後者は L-乳酸を生成する。人間の体内には L-乳酸のみが存在するので、ヨーグルト中の乳酸を 100% L-乳酸にできれば、より良く生体の生理に適合するヨーグルトができると考えられる (もちろん、ヨーグルト中にあ

第2図 遺伝子交換のためのプラスミドの構築

第3図 接合伝達を利用した遺伝子交換体作製の概略

る D-乳酸が悪いということではなく、現在のヨーグルトを成人が仮に毎日 1 リットルずつ食べ続けたとしても何ら問題は生じない。L-型の乳酸のみを含むヨーグルトは、*L. bulgaricus* の D-LDH 遺伝子を *S. thermophilus* の L-LDH 遺伝子と交換することで可能になるので、本実験を計画した。更に、*L. bulgaricus* の酵素遺伝子 1 つを変更することによって、表現型の明確な変化が得られる点がモデル実験として適していると考えられたので、本テーマを選んだ。

さて、研究戦略を第2図と第3図に示す。すなわち、*L. bulgaricus* の D-LDH 遺伝子を外来の L-LDH 遺伝子とそっくり交換し、ベクター等不要の遺伝子が全く残らないようにするために、以下に述べる方法で研究を進めた。

その結果、目的とする「LDH 遺伝子交換体」を得ることができた^{17,18)}。その概略を紹介する。

- ① まず、*L. bulgaricus* の D-LDH 遺伝子と *S. thermophilus* の L-LDH 遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した。
- ② 次に、L-LDH 遺伝子の翻訳領域と、D-LDH 遺伝子の 5'-及び 3'-非翻訳領域（各々 353 bp, 582 bp）の各 DNA 断片を PCR 法によって取得した。これらの DNA 断片を結合し、D-LDH 遺伝子の翻訳領域が L-LDH 遺伝子のそれと入れ代わった DNA 断片を得た。
- ③ この DNA 断片を、ベクターである pAMB1 に挿入して、pβL-Int1 プラスミドを構築した（第2図）。
- ④ この pβL-Int1 プラスミドを、供与菌の *Lactococcus lactis* (pβL-Int1) から接合伝達によって *L. bulgaricus* へ導入し、Em 耐性の接合伝達株を得たが、これらは D-乳酸と L-乳酸の両方を生産した。

また、p β L-Int 1 は染色体の D-LDH 遺伝子の 5'-または 3'-非翻訳領域部位で組み込まれていることが判明した（1 回目の相同組み換え）。

⑤ 次に、Em 非存在下でこれらの接合伝達株の継代を繰り返して、2 回目の相同組み換えを起こしたものを選択した。2 回目の相同組み換えを起こすと Em 感受性になることを利用して、継代後単一コロニーを多数分離した後、感受性のものを選択した。継代の条件等にもよるが、20 回継代した後、全体のうち約 10% 程度が感受性クローンであった。

⑥ 感受性クローンが生成する乳酸の旋光性を調べると、L-乳酸または D-乳酸のみを生成した。L-乳酸のみを生成するものは、目的の「LDH 遺伝子交換体」と予想されたが、これらを「LL 株」と呼ぶ（なお、D-乳酸のみを生成したものは、1 回目と 2 回目の相同組み換えが同じ部位で起こったため、親株の *L. bulgaricus* と全く同一の遺伝子構成に戻ったためと考えられる）。

⑦ 得られた「LL 株」を詳細に調べた結果、以下のことが判明した。生成する乳酸の旋光性を除いて、調べたすべての性質（糖の資化性、生育温度、細胞形態、各種の抗生物質に対する感受性等）が親株と同一であった（親株は D-LDH 活性のみを有し D-乳酸を生成したが、「LL 株」は D-LDH 活性を持たず L-LDH 活性のみを有し、L-乳酸を生成した）。

また、Southern hybridization 法で調べた結果「LL 株」染色体には導入した L-LDH 遺伝子が存在し、L-LDH 遺伝子とベクターの DNA 配列が存在しなかった。更に PFGE 法で調べると、導入した L-LDH 遺伝子は *L. bulgaricus* 染色体の D-LDH 遺伝子部位に挿入されていることが示唆された。

⑧ 以上より、「LL 株」は目的の「LDH 遺伝子交換体」であることが証明され、L-乳酸のみを生産する *L. bulgaricus* が初めて作出された。

この株では、元来存在する D-LDH 遺伝子が、他のヨーグルト生産菌由来の L-LDH 遺伝子と交換された以外には遺伝的な変化がないはずである（第 3 図）。

従って、「LL 株」は理論的には全く安全で、かつ、ヨーグルト生産等に関わる諸性質が変化せずに保持されていると期待され、染色体に導入された L-LDH 遺伝子が安定であるため、産業的利用に適すると考えられる。

もちろん、実際に応用するには今後、安全性や社会的な受容性等に関する慎重かつ十分な検討が必要であることはいうまでもない。しかし、本方法によって遺伝子交換のみならず、有用遺伝子の導入や増幅、更には不要遺伝子の破壊も可能であると考えられ、ヨーグルト乳酸桿

菌を育種する有力な方法が示された。

今まで遺伝子導入法が知られていなかった本菌で、実用性のある育種法を確立した意義は大きいと自負している。

4. 形質転換系の構築

さて、次に形質転換の結果をごく簡単に述べる。

乳酸菌の形質転換は、当初プロトプラスト法で行われたが、乳酸菌のプロトプラストは再生が困難で、しかも操作が煩雑であるため、本方法では一部の菌株以外では成功しなかった。1987 年になってエレクトロポレーション法が乳酸菌でも使えることが判明した^{19,20)} ことに加え、宿主域の広い乳酸菌用のベクターが開発されたため、現在までに多くの菌種で形質転換が可能となった。しかし、産業的に重要な乳酸菌の中では例外的に *L. bulgaricus* の形質転換は困難であると認識されていた。

我々は当初、プロトプラスト法による形質転換を検討したがうまく行かなかったため、広宿主域の乳酸菌用プラスミドを用いてエレクトロポレーション法を試みた。他の乳酸菌などで報告された方法を参考にして系統的に実験を繰り返したが、全く形質転換体を得ることができなかった。そこで原点に立ち返って考え直し、以下の工夫を行って初めて形質転換体を得ることができた。

（1）ヨーグルト乳酸桿菌のプラスミドの利用

第 1 の工夫は、宿主である *L. bulgaricus* 由来のプラスミドを用いてベクターを構築することであった。

前述したように、本菌では広宿主域プラスミド pAM β 1 の複製ができないと推定されたので、形質転換成功のためには慎重にプラスミドを選択することが重要だと考えられた。そこで、本菌で確実に複製できるレプリコンが必要であったが、*L. bulgaricus* のプラスミドは知られていなかったため、スクリーニングを行った。その結果、幸運にも 50 株以上の中からただ 1 株、プラスミドを保持する株（M-878 株）を見つけた。このプラスミドを pBUL1 と命名し、全塩基配列（7,894 bp）を決定した²¹⁾。これに選択マーカーとして Em 耐性遺伝子を挿入して、本菌で確実に複製できるベクター pX3（9.0 kb, 第 4 図）を構築した²¹⁾。

（2）エレクトロポレーション法の改良

M-878 株から pBUL1 をキューリングした株を宿主とし、pX3 を用いてエレクトロポレーション法で形質転換を試みた。この方法で簡単に形質転換体を得られると予想したが、実際にはそれほど容易ではなかった。

エレクトロポレーション法とは、宿主細胞に高電圧パルスを加えて細胞膜に瞬間的な孔を開け、プラスミド DNA を導入する技術である。宿主細胞は高電圧パルス

第4図 ヨーグルト乳酸桿菌用プラスミド

第5図 形質転換に及ぼす培地 pH の影響

に耐えて生き延びなければならないが、*L. bulgaricus* は一般に高電圧パルスに弱く死にやすい。形質転換体を得られないのは、このためではないかと考え、対策を検討した。

様々な要因を調べたが、結論的には宿主細胞を培養する培地の pH が重要であることが判明し、pH=5.5 が最適であった(第5図)。培地の初発 pH を 5.5 にすることで初めて Em 耐性の形質転換体が1個得られた。この株は、pX3 プラスミドを保持していたので真の形質転換体であることが示された²²⁾。

また、この株から調製した pX3 プラスミドを用いると形質転換頻度が百倍から千倍高くなったため、*L. bulgaricus* に制限・修飾系が存在することが示唆された。

その後、何度かの実験の中で偶然にも「制限・修飾系」を欠損する *L. bulgaricus* の変異株を得ることができた²³⁾。現在、この変異株を宿主として形質転換について検討を進めているが、pX3 プラスミド 1 µg DNA 当たり約 10^5 以上の形質転換体を得られ、*L. bulgaricus* で効率の良い形質転換が可能となった。本菌の効率の良い形質転換は、現時点では他のどの研究室でも成功していない。

幸運にも我々は、*L. bulgaricus* へ遺伝子を導入する方法として、接合伝達と形質転換の2つを開発することができた。今後、これらを使って本菌の遺伝現象を解明し、より有用な乳酸菌へ改良する研究を進めたい。

(なお、pBUL1 プラスミドや、*L. bulgaricus* の接合伝達、形質転換、遺伝子交換等については他の雑誌に投稿する予定なので、勝手ながら、詳細な結果に興味をお持ちの方は後日それらをご覧になることをお願いしたい。)

5. おわりに

乳酸菌は、古くから様々な面で人類に多大の恩恵を与えてきた。そして今後、遺伝学研究が進展するとともに乳酸菌が持つ潜在的な可能性が引き出され、食品産業や健康増進への利用が、今までより一層盛んに行われるであろう。

そのためには、多種多様な乳酸菌に対する理解を更に深め、形質転換等の基礎的な遺伝学的手法、並びに安全性を確保する方法論を確立することが重要である。現在、欧州を中心として乳酸菌遺伝学のダイナミックな動きが起きている。日本でも、もっと多くの乳酸菌遺伝学の研究が行われ、乳酸菌が有効に活用されることを念じながら筆を置きたい。

<明治乳業(株)ヘルスサイエンス研究所>

文 献

- 1) L. L. MCKAY and K. A. BALDWIN: *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 3 (1990)
- 2) W. M. DE VOS, I. BOERRIGTER, R. J. VAN ROOIJEN, B. REICHE and W. HENGSTENBERG: *J. Biol. Chem.*, **265**, 22554 (1990)
- 3) J. KOK: *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 15 (1990)
- 4) P. VOS, I. J. BOERRIGTER, G. BUIST, A. J. H. ANDRIKMAN, M. NIJHUIS, M. B. DE REUVER, R. J. SIEZEN, G. VENEMA, W. M. DE VOS and J. KOK: *Protein Engineering*, **4**, 479 (1991)
- 5) C. HILL: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 87 (1993)
- 6) T. R. KLAENHAMMER: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39 (1993)
- 7) T. SCHEIRLINCK, J. MAHILLON, H. JOOS, P. DHAESE and F. MICHELIS: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2130 (1989)
- 8) J. K. KONDO and L. L. MCKAY: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1213 (1982)
- 9) 佐々木泰子: バイオサイエンスとインダストリー, **52**, 22 (1994)
- 10) P. LE BOURGEOIS, M. LAUTIER and P. RITZEN-THALER: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 109 (1993)
- 11) D. B. CLEWELL, Y. YAGI, G. M. DUNNY and S. K. SCHULTZ: *J. Bacteriol.*, **117**, 283 (1974)
- 12) Y. SASAKI, N. TAKETOMO and T. SASAKI: *J. Bacteriol.*, **170**, 5939 (1988)

- 13) P. LANGELLA and A. CHOPIN : *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**, 149 (1988)
 - 14) 佐々木泰子, 佐々木 隆 : 農化, **64**, 482 (1990)
 - 15) 伊藤喜之, 佐々木 隆 : 農化, **64**, 507 (1990)
 - 16) 佐々木泰子, 伊藤喜之, 佐々木 隆 : 農化, **67**, 398 (1993)
 - 17) 伊藤喜之, 佐々木泰子, 佐々木 隆 : 農化, **67**, 399 (1993)
 - 18) Y. SASAKI, Y. ITO and T. SASAKI : *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, p.9 (Abstract A 10) (1993)
 - 19) S. K. HARLANDER : (1987) Streptococcal Genetics (L. FERRETTI and R. CURTIS, eds., pp.229-233, American Society for Microbiology, Washington, DC.
 - 20) B. M. CHASSY and J. L. FLICKINGER : *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 173 (1987)
 - 21) 伊藤喜之, 佐々木泰子, 佐々木 隆 : 農化, **65**, 447 (1991)
 - 22) 佐々木 隆, 佐々木泰子, 伊藤喜之 : 農化, **67**, 398 (1993)
 - 23) 佐々木 隆, 佐々木泰子, 伊藤喜之 : 乳酸菌研究集談会誌, **4**, 16 (1993)
-