(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
2020年1月30日(30.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/021740 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 9/02 (2006.01)	*C12N 15/113* (2010.01)
C07K 14/195 (2006.01)	*C12N 15/115* (2010.01)
C07K 16/28 (2006.01)	*C12N 15/31* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)	*C12N 15/53* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)	*C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)	*C12P 21/02* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)	*C23F 11/14* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	*C23F 11/167* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/003606

(22) 国際出願日： 2019年2月1日(01.02.2019)

(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 2018-140309 2018年7月26日(26.07.2018) JP

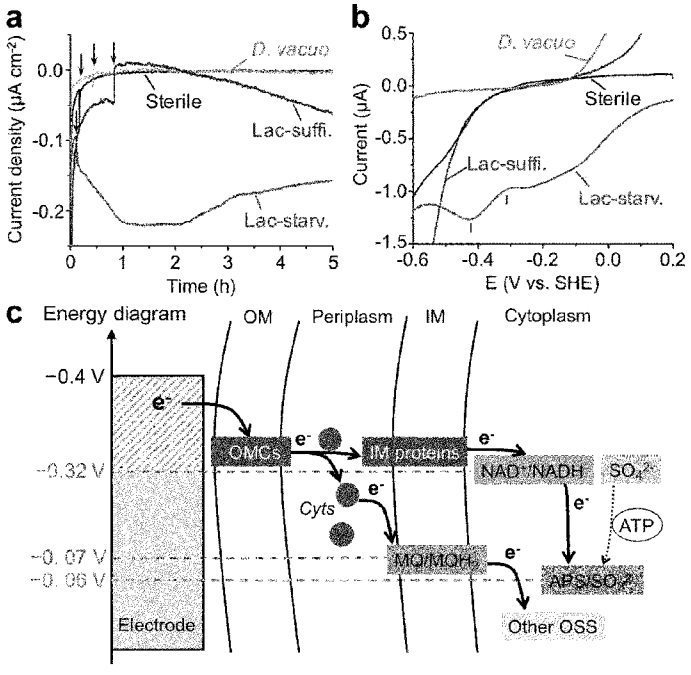
(71) 出願人: 国立研究開発法人物質・材料研究機構(**NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE**) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 岡 本 章 玄 (**OKAMOTO Akihiro**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). トウ ギョウ(**DENG Xiao**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP).

(54) **Title:** ENZYMES PARTICIPATING IN EXTRACELLULAR ELECTRON TRANSFER AND UTILIZATION OF SAME

(54) 発明の名称： 細胞外電子移動作用に関与する酵素及びその利用

[図3]



(57) **Abstract:** It has been considered that metal corrosion arises since hydrogen sulfide produced by sulfate-reducing bacteria takes electrons from iron and thus converts iron into iron sulfide. However, it is known that corrosion proceeds even after the surface of iron has been coated with iron sulfide and thus iron no longer comes into contact with hydrogen sulfide. The cause of this phenomenon had been unknown. The present inventors examined the electron uptake mechanism by precisely analyzing cellular membranes of sulfate-reducing bacteria, which proliferate using iron as an electron source,

WO 2020/021740 A1

[続葉有]

(74) 代理人：中 谷　智 子 (NAKATANI Tomoko)；〒4600003 愛知県名古屋市中区錦一丁目２０番１９号 名神ビル Aichi (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, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 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)）

from the viewpoints of bioinformatics, biochemistry, electrochemistry and microscopic approach. As a result, the present inventors newly found enzymes having different structures from membrane enzymes which have been known as participating in electron withdrawal. The present inventors confirmed that electrons are drawn from electrodes exclusively when these enzymes are expressed in a large amount, and clarified for the first time that iron corrosion is caused by electron withdrawal directly from iron by bacteria due to the action of these enzymes, thereby completing the present invention.

(57) 要約：従来，金属腐食の原因は，鉄が硫酸還元菌の作る硫化水素に電子を奪われることにより，硫化鉄に変化するためと考えられてきた。しかし，硫化鉄が鉄表面を覆って鉄が硫化水素と接触しなくなった後も腐食が進行することが知られており，この原因については不明であった。本発明者らは，鉄を電子源として増殖する硫酸還元菌の細胞膜を生物情報学，生化学，電気化学および顕微鏡法を用いて詳細に分析し電子取り込み機構を解析した。その結果，これまで知られていた電子を引き抜きに関与する膜酵素とは構造が異なる酵素群を新規に見出すことに成功した。本発明者らは，該酵素が多く発現しているときのみ電極から電子が引き抜かれていることを確認し，鉄腐食は細菌がこの酵素の働きにより鉄から電子を直接引き抜くことにより生じることを初めて明らかにし，本発明を完成させた。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞外電子移動作用に関与する酵素及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は，細胞外電子移動作用に関与する酵素，及び当該酵素を標的とする金属材料の腐食の防止方法に関する。

背景技術

[0002] 石油採掘用パイプラインが鉄腐食により破断すると，石油流出など大きな事故につながるため，腐食の原因を明らかにして，効率的に腐食を防ぐことが試みられている。従来，腐食の原因は，鉄が硫酸還元菌の作る硫化水素に電子を奪われることにより，硫化鉄に変化するためと考えられてきた。しかし，硫化鉄が鉄表面を覆って鉄が硫化水素と接触しなくなった後も腐食が進行することが知られており，この原因については不明であった。

[0003] 有機基質の酸化に伴うSO_4^{2-}，SO_3^{2-}，$S_2O_3^{2-}$，S^0，Sn^{2-}などの酸化された硫黄種（ＯＳＳ）の微生物による還元は，有機貧酸素嫌気性海洋地下におけるエネルギー生産の主なメカニズムの１つである（非特許文献１－３）。水の放射性分解や鉱物－水反応を介して形成される水素（H_2）は，浅海の堆積物から海洋のほぼ半分を占める深い地殻にまで及ぶ有機枯渇環境の主要なエネルギー源であると考えられている（非特許文献４－６）。しかし，H_2が地下の硫黄呼吸を行う細菌集団を維持するのに十分であるかどうかは不明である（非特許文献７，８）。また，地下環境で見出された栄養細菌の微生物エネルギー要求は依然として不明であった（非特許文献９）。地下の環境における硫黄呼吸細菌の遍在性と豊富さから，希少なH_2や有機基質に加えて硫化鉱物（ＭｎＳ，ＦｅＳ，FeS_2）のような豊富な固体基質をエネルギー源として利用するかどうか，またそれをどのように利用するかを解明することは，特に，浅い堆積物中のH_2（ｎ～μＭ）と硫酸塩（数ｍＭ）との間の顕著な不均衡を考慮すると，太陽光線から隔離された生態系の理解を深めると考えられていた。

[0004] 海洋硫酸還元細菌（ＳＲＢ）が元素状鉄から直接電子取り込みを行うモデルがＤｉｎｈらに（非特許文献１０）によって最初に提案された。彼らは鉄顆粒を唯一の電子供与体として供給された海洋底質からＳＲＢを単離した。また，最近の研究は，導電性フィラメントを介したＳＲＢによる直接的な電子の取り込みは，海洋堆積物中のメタン資化性古細菌および難培養ＳＲＢの共培養物におけるメタンの嫌気性酸化に重要であることを示唆している（非特許文献１１－１３）。このような細胞外電子輸送は潜在的に固体鉱物を電子源として使用することを可能にするため，微生物のＯＳＳの還元反応に伴う鉱物からの電子の取り込みは，H_2および有機物が限定された堆積物中で起こる可能性がある。しかし，提唱されている電子取り込みプロセスの生物学的メカニズムおよびエネルギー論は明らかとはなっておらず，エネルギー制限された海洋堆積物における電子取り込み機構の分布および重要性は依然として不明であった。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｇ．Ｍｕｙｚｅｒら，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６，４４１－４５４（２００８）．

非特許文献2：Ｍ．Ｍｕｓｓｍａｎｎら，Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７，４０５－４１８（２００５）．

非特許文献3：Ｋ．Ｒａｖｅｎｓｃｈｌａｇら，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂ．６６，３５９２－３６０２（２０００）．

非特許文献4：Ｔ．Ｍ．Ｈｏｅｈｌｅｒら，Ｇｅｏｃｈｉｍ．Ｃｏｓｍｏｃｈｉｍ．Ａｃ．６２，１７４５－１７５６（１９９８）．

非特許文献5：Ｓ．Ｄ’Ｈｏｎｄｔら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１０６，１１６５１－１１６５６（２００９）．

非特許文献6：Ｄ．Ｃｈｉｖｉａｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ３２２，２７５－２７８（２００８）．

非特許文献7：Ｒ．Ｔ．Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ２８１，９７６

－９７７（１９９８）．

非特許文献8：Ｆ．Ｉｎａｇａｋｉら，Ｓｃｉｅｎｃｅ３４９，４２０－４２４（２０１５）．

非特許文献9：Ｔ．Ｍ．Ｈｏｅｈｌｅｒら，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１１，８３－９４（２０１３）．

非特許文献10：Ｈ．Ｔ．Ｄｉｎｈら，Ｎａｔｕｒｅ４２７，８２９－８３２（２００４）．

非特許文献11：Ｓ．Ｅ．ＭｃＧｌｙｎｎら，Ｎａｔｕｒｅ５２６，５３１－Ｕ１４６（２０１５）．

非特許文献12：Ｓ．Ｓｃｈｅｌｌｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ３５１，７０３－７０７（２０１６）．

非特許文献13：Ｇ．Ｗｅｇｅｎｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ５２６，５８７－Ｕ３１５（２０１５）．

発明の概要

[0006] 本発明者らは，鉄を電子源として増殖する硫酸還元菌の細胞膜を生物情報学，生化学，電気化学および顕微鏡法を用いて詳細に分析し電子取り込み機構を解析した。その結果，これまで知られていた電子を引き抜きに関与する膜酵素とは構造が異なる酵素群を新規に見出すことに成功した。本発明者らは，該酵素が多く発現しているときのみ電極から電子が引き抜かれていることを確認し，鉄腐食は細菌がこの酵素の働きにより鉄から電子を直接引き抜くことにより生じることを初めて明らかにし，本発明を完成させた。

[0007] よって，具体的には本発明は，以下の（１）～（２２）に記載の発明に関する：

（１） 配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列；配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列；配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ

酸配列において，１～２０個のアミノ酸が置換され，欠失し，挿入され，又は付加されたアミノ酸配列；あるいは，Ｂｌａｓｔにより配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と相同性スコア２００以上を示すアミノ酸配列を有する細胞表面タンパク質。

（２）　細胞外電子移動作用を有する，（１）に記載のタンパク質。

（３）　シトクロム酵素又はβプロペラタンパク質である，（１）又は（２）に記載のタンパク質。

（４）　（１）～（３）のいずれか１項に記載のタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸分子。

（５）　配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列，又は，配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列と相補的な配列を有する核酸とストリンジェントな条件下で結合する塩基配列を有する，（４）に記載の核酸分子。

（６）　（４）又は（５）に記載の核酸分子を含むベクター。

（７）　（６）に記載のベクターを有する宿主細胞。

（８）　（７）に記載の宿主細胞を培養して（１）～（３）のいずれか１項に記載のタンパク質を発現させることを含む，（１）～（３）のいずれか１項に記載のタンパク質の製造方法。

（９）　（１）～（３）のいずれか１項に記載のタンパク質に結合する，抗体若しくはその免疫反応性断片，又はアプタマー，あるいは，（４）又は（５）に記載の核酸分子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマー。

（１０）　（１）～（３）のいずれか１項に記載のタンパク質の細胞外電子移動作用を阻害する作用を有する，（９）に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡ。

（１１）　（１０）に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片，アプタマー

，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡを含有する組成物。

（１２）　金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を同定することを含む，金属材料の腐食原因タンパク質の決定方法。

（１３）　前記電子伝達酵素の同定が，電子伝達反応中心を有するタンパク質を決定することにより行われる，（１２）に記載の方法。

（１４）　前記電子伝達酵素の選択が，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質を選択することにより行われる，（１２）に記載の方法。

（１５）　（１２）～（１４）の方法により金属材料の腐食原因タンパク質として決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造することを含む，腐食防止剤の製造方法。

（１６）　（１２）～（１４）の方法により金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を同定すること，及び

決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造することを含む，腐食防止剤の製造方法。

（１７）　金属材料の表面に存在する菌における当該電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法。

（１８）　電子伝達酵素が請求項１～３のいずれか１項に記載の酵素である，（１７）に記載の方法。

（１９）　当該電子伝達酵素の機能又は発現を阻害が，負の電位を持つ金属材料の電位を－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥより正の電位にして細菌の電子を引く抜く代謝を止めることにより行われる，（１７）に記載の方法。

（２０）　（１１）に記載の組成物を金属材料の表面に接触させることを含

む，（１８）に記載の方法。

（２１）　（１５）又は（１６）に記載の製造方法により製造された抗体又はアプタマーを金属材料の表面に接触させることを含む，（１７）に記載の方法。

（２２）　金属材料の表面に存在する菌から電子伝達酵素を同定すること，及び，

同定された金属材料の表面に存在する菌における電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法。

（２３）　外部環境に設置された金属材料の腐食防止方法であって，

外部環境から細胞表面酵素をもつ細菌を含む試料を採取すること，

試料中に存在する細胞表面電子伝達酵素を同定すること，

前記酵素に結合する抗体又はその免疫反応断性片又はアプタマー，あるいは前記酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを調製すること，

前記抗体，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡを配管に流通させることを有する，金属材料の防食方法。

[0008]　一態様において，本発明は細胞外電子移動作用に関与するタンパク質に関する。本発明のタンパク質は，細胞外からの電子引き抜きに関与することから，細胞膜（特には外膜（ＯＭ））に存在する。本明細書において，「細胞表面タンパク質」とは，当該タンパク質が細胞膜に存在することを意味し，細胞膜の外側，内側または細胞膜を貫通する，のいずれの状態で存在していてもよい。すなわち，「細胞表面タンパク質」とは，細胞の表面に露出することを必須とするものではなく，たとえば，ＯＭの内膜（ＩＭ）側に位置するタンパク質も含む。また，細胞表面タンパク質は，細胞表面，及び／又は，細胞膜近傍に局在するために必要なシグナルペプチドを少なくとも有するタンパク質であってもよい。

[0009]　本発明のタンパク質は，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択されるいずれか１つの配列に記載のアミノ酸配列を有す

る。なお，これらの配列がシグナル配列を含む場合，本発明のタンパク質は当該シグナル配列を含まないアミノ酸配列を有して板もよい。あるいは，本発明のタンパク質は，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有してもよい。アミノ酸配列の同一性は，２種類のタンパク質間において，比較対象とするアミノ酸配列範囲における種類が同一なアミノ酸数の割合（％）を意味し，例えば，ＢＬＡＳＴ，ＦＡＳＴＡ等の公知のプログラムを用いて決定することができる。上述の本発明のタンパク質が有する同一性としては，８０％以上よりも高い同一性であってもよく，例えば，８５％以上，９０％以上，９５％以上，９８％以上，又は９９％以上の同一性であってもよい。

[0010] あるいは，本発明のタンパク質は，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列において，１～２０個，１～１０個，１～８個，１～５個，１～３個のアミノ酸が置換され，欠失し，挿入され，又は付加されたアミノ酸配列を有していてもよい。

[0011] あるいは，本発明のタンパク質は，Ｂｌａｓｔにより配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と相同性スコア２００以上を示すアミノ酸配列であってもよい。相同性スコアは，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と目的のタンパク質のアミノ酸配列をアラインメントし，比較対象とする各アミノ酸の点数をスコアマトリックスから求め，その総和として計算することができる（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｓｉｃ．ｔｉｔｅｃｈ．ａｃ．ｊｐ／ｓｕｐｅｒｃｏｎ／ｓｕｐｅｒｃｏｎ２００４－ｅ／ａｌｉｇｎｍｅｎｔＥ．ｈｔｍｌ参照）。例えば，相同性スコアは，公知のＢＬＡＳＴプログラムを用いて決定することができる。スコアマトリックスとしては，ＢＬＯＳＵＭ６２やＰＡＭ３２などが知られており，本明細書において好ましくはＢＬＯＳＵＭ６２である

。

[0012] 本発明のタンパク質は，細胞外電子移動作用を有する。本明細書において，「細胞外電子移動作用」とは，当該タンパク質を有する細胞が電子供与可能な固体表面に接触することにより，当該固体表面から直接電子を引き抜く作用を意味する。あるタンパク質が細胞外電子移動作用を有するか否かは，当該タンパク質を発現させた細胞を電極が唯一の電子供与体である反応器に加え，３０分～２４時間後の陰極電流密度を測定することにより決定することができる。陰極電流密度が増加した場合には，当該タンパク質は細胞外電子移動作用を有すると決定される。

[0013] 好ましくは，本発明のタンパク質は，シトクロム酵素，βプロペラタンパク質，又はポリンタンパク質である。シトクロム酵素は，酸化還元機能を持つヘム鉄を含有する，ヘムタンパク質の一種であり，シトクロムａ，ｂ，ｃ，ｄ，ｆ及びｏなどが知られている（Ｃｈｅｍ． Ｒｅｖ．（２０１４）１１４（８）：４３６６－４４６９）。よって，あるタンパク質が，ヘム結合モチーフ（ＣＸＸＣＨ，ＣＸＸＸＣＨ，ＣＸＸＸＸＣＨ，又はＣＸＸＸＸＸＣＨ；Ｃはシステイン，Ｈはヒスチジン）を有するタンパク質であり，かつ，電子伝達能を有するタンパク質である場合には，シトクロム酵素であると決定することができる。また，βプロペラタンパク質は，βシートでできた羽根状の構造が４～８枚中央の軸の周りを円錐状に取り囲んだ立体構造を有するタンパク質である。あるタンパク質がβプロペラタンパク質であるか否かは，立体構造解析又は立体構造シミュレーションにより，判別することができる。ポリンタンパク質は，逆平衡βシートによるβバレル構造を含む膜貫通タンパク質である。ポリンタンパク質もシトクロムタンパク質と複合体を形成して細胞外電子移動に関与することが知られている（Ｍａｒｃｕｓ Ｊ． Ｅｄｗａｒｄｓら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ Ａｐｒｉｌ １０， ２０１８）。あるタンパク質がポリンタンパク質であるか否かは，立体構造解析又は立体構造シミュレーションにより，判別することができる。好ましくは，これらのシトクロム酵素，βプ

ロペラタンパク質，又はポリンタンパク質は，細胞膜（好ましくは，外膜）に存在するタンパク質である。また，βプロペラタンパク質及び／又はポリンタンパク質は，シトクロム酵素と複合体を形成することにより，細胞外電子移動作用を発揮することから，好ましくは，βプロペラタンパク質及び／又はポリンタンパク質はシトクロム酵素と複合体を形成している。

[0014] 別の態様において，本発明は前記タンパク質をコードする塩基配列を有する核酸分子に関する。本発明の核酸分子は，前記タンパク質をコードする塩基配列を有する限り，他の配列を有していてもよい。一例として，本発明の核酸分子は，配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列，又は，配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列と相補的な配列を有する核酸とストリンジェントな条件下で結合する塩基配列を有する。本明細書において，ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするとは，当業者に通常用いられるハイブリダイゼーション条件でハイブリダイズすることを意味する。例えば，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｎｕａｌ，Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）又は，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｅｙ Ｏｎｌｉｎｅ Ｌｉｂｒａｒｙ等に記載の方法によりハイブリダイズするか否かを決定することができる。例えば，ハイブリダイズの条件は，６×ＳＳＣ（０．９Ｍ ＮａＣｌ，０．０９Ｍ クエン酸三ナトリウム）または６×ＳＳＰＥ（３Ｍ ＮａＣｌ，０．２Ｍ NaH_2PO_4，２０ｍＭ ＥＤＴＡ・２Ｎａ，ｐＨ７．４）中４２℃でハイブリダイズさせ，その後４２℃で０．５×ＳＳＣで洗浄する条件であってもよい。

[0015] さらに，本発明は前記核酸分子を含むベクターに関する。当該ベクターは，前記核酸分子を宿主細胞に導入可能なベクターであれば特に限定されるものではなく，宿主細胞に応じて任意のプラスミドベクター，並びにレトロウ

イルスベクター，アデノウイルスベクター，レンチウイルスベクター，アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのウイルスベクターを用いることができる。

[0016] 本発明は前記ベクターを有する宿主細胞も包含する。宿主細胞としては，細菌，酵母，動物細胞，昆虫細胞，植物細胞等，目的のタンパク質の発現に適した細胞を適宜選択することができる。

[0017] 別の態様において，本発明は前記タンパク質や前記核酸分子の機能又は発現を阻害する物質（本明細書において，「阻害物質」という）に関する。特には，本発明は，前記タンパク質に結合する，抗体若しくはその免疫反応性断片，又はアプタマー，あるいは，前記核酸分子と結合するアンチセンス核酸分子，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーに関する。これらの阻害物質は，好ましくは，直接的又は間接的に本発明のタンパク質の細胞外電子移動作用を阻害する作用を有する。本発明は，このような阻害物質を含有する組成物を包含し，当該組成物は金属腐食防止剤として使用することができる。金属としては，鉄を挙げることができる。

発明の効果

[0018] 本発明のタンパク質を標的とする腐食防止方法は，殺菌剤などの環境への影響が大きい薬剤を使用することなく，鉄腐食などを防止することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]ＯＳＳ中のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５の相同細胞外シトクロムの分布を表す図である。（ａ）１６Ｓ　リボソーマルＲＮＡ（ｒＲＮＡ）配列アライメントによる系統樹を示す。（ｂ）Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のＤＦＥ＿４５０遺伝子およびＤＦＥ＿４６４遺伝子によりコードされたもの，並びにそれらのホモログ（ＮＣＢＩ　ｂｌａｓｔｐ，ｍａｘ　ｓｃｏｒｅ＞　２００を用いて同定された）である，Ｇ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓ　ＰＣＡのＯｍｃＢ，ＯｍｃＥ，ＯｍｃＳ及びＯｍｃＺ，Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ　ＭＲ－１のＯｍｃＢ及びＭｔｒＣ，及びＡｃｉｄｉ

ｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓ ＡＴＣＣ ２３２７０のＣｙｃ２を含むＯＭＣのアミノ酸配列に由来するタンパク質系統樹を示す。ｂはｂａｃｔｅｒｉｕｍを表す。スケールバーは，推定された配列分散またはアミノ酸変化を表す。

[図2]（ａ）乳酸飢餓細胞から単離し，クマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）およびヘム反応性３，３ ’，５，５’－テトラメチルベンジジン－H_2O_2で染色した内膜（ＩＭ）および外膜（ＯＭ）画分のタンパク質プロファイルを示す。ヘム陽性バンド（＃および＊で示される）では，ＤＦＥ＿４６１およびＤＦＥ＿４４９の転写物がＬＣ－ＭＳによって検出された。非特異的なヘム染色により，フェロキシダーゼ（ＤＦＥ＿１１５４，１４．１ｋＤａ，△で示す）に対応するマイナーバンドが検出された。（ｂ）（左）ＯＭタンパク質濃度によって正規化された乳酸飢餓（赤色）および充足（青色）Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５細胞から抽出されたＯＭ画分の吸収スペクトルを示す。実線および点線は，それぞれ還元および酸化条件下で測定したスペクトルを示す。（右）４１９ｎｍでのソレットピーク吸収の比較を示すグラフである。（ｃ）Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５ゲノム中で近接して位置する７つのマルチヘムシトクロムおよび２つのβプロペラタンパク質（斜線棒）の乳酸飢餓細胞及び乳酸充足細胞による発現を示すグラフである。

[図3]インタクトなＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５細胞を用いたインビボ電気化学測定の結果を示す。（ａ）唯一の電子供与体として－０．４Ｖ（対ＳＨＥ）に保たれたインジウム－錫ドープ酸化物電極を備えた嫌気性反応器中で行った陰極電流対時間測定の結果を示すグラフである。反応器に加えた乳酸飢餓Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５細胞，乳酸充足Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５細胞，H_2－消費性Ｄ．ｖａｃｕｏｌａｔｕｍ，および滅菌培地を，それぞれ，赤色，青色，ピンク色および黒色の線で示す。矢印は，細胞または無菌培地を反応器に添加した時期を示す。（ｂ）パネルａにおける電流発生後に測定されたリニアスイープボルタモグラムを示す。

（ｃ）ＮＡＤＨおよび／または還元メナキノン（MQH_2）を生成することができる外膜シトクロム（ＯＭＣｓ）の酸化還元電位が，ＯＳＳおよび中間体（例えばアデノシンホスホサルフェート（ＡＰＳ））の減少を促進する，ＩＳ５株の細胞外電子取り込みモデルのエネルギーダイアグラムを示す。Ｃｙｔは，ペリプラズムＣ型シトクロムを表す。

[図4]乳酸飢餓状態のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞およびそのナノワイヤの顕微鏡写真を示す。（ａ及びｂ）電極表面に付着した細胞の走査電子顕微鏡画像である。ａおよびｂのスケールバーは，それぞれ１０μｍおよび５００ｎｍを表す。（ｃ～ｅ）シトクロム反応性３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）－Ｈ　$_2O_2$で染色された細胞の透過電子顕微鏡画像である。（ｃ）H_2O_2非存在下におけるＤＡＢ染色陰性の結果を示す。（ｄ及びｅ）H_2O_2添加によるＤＡＢ染色陽性の結果を示す。スケールバーは，ｃおよびｄでは５００ｎｍに対応し，ｅでは５０ｎｍを表す。竹様のナノワイヤ構造は，ＤＡＢ染色陽性でのみ明瞭に視認可能であった。（ｆ及びｇ）タンパク質特異的ＮａｎｏＯｒａｎｇｅ（緑色）および膜特異的ＦＭ　４－６４ＦＸ（赤色）で染色された細胞の蛍光顕微鏡画像である。スケールバーは５μｍを表す。矢じりはナノワイヤを示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明のタンパク質は，本発明のベクターを有する宿主細胞を，当該宿主細胞に適した培地中，当該宿主細胞による当該タンパク質の発現に適した培養条件下で培養して当該タンパク質を発現させることにより製造することができる。

[0021] また，本発明は，金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を金属材料の腐食原因タンパク質であると同定することを含む，金属材料の腐食原因タンパク質の決定方法に関する。金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質に関する情報は，当該菌を培養し，培養物中のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を決定することにより得ることができる。配列決定されたタンパク質が，電子伝達酵素であるか否かは，電

子伝達反応中心を有するか否かにより決定することができる。本明細書において，電子伝達反応中心としては，特に制限されないが，例えば，ヘム結合ドメイン，及び，鉄イオンクラスター等を含む。また，前記電子伝達酵素は，好ましくは，細胞表面タンパク質，又は膜タンパク質（好ましくは，外膜タンパク質）である。よって，一態様において，本発明は，金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から膜タンパク質でありかつ電子伝達酵素であるタンパク質を金属材料の腐食原因タンパク質であると同定することを含む，金属材料の腐食原因タンパク質の決定方法に関する。候補タンパク質が膜タンパク質（又は外膜タンパク質）であるか否かは，得られた遺伝子の塩基配列情報から，解析することができる。一例として，前記電子伝達酵素は，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列，又はＪｉｎｇ Ｌｉｕら，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ（２０１４）１１４：４３６６－４４６９に開示されたタンパク質と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を選択することにより行ってもよい。特に，タンパク質を構成する一部のアミノ酸を，当該アミノ酸と類似する性質（電荷や親／疎水性）のアミノ酸と置換されてもその構造や活性を維持しやすいことが知られている。８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質は，オリジナルのアミノ酸配列に対してこのような「保存的アミノ酸置換」を行うことにより得ることができる。２つまたはそれより多いアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なる場合，％配列同一性または類似性の程度は，置換の保存的特性を修正するために上向きに調節してもよい（Ｐｅａｒｓｏｎ，ＭｅｔｈｏｄｓＭｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４３：３０７－３１（１９９４）参照）。このような保存的アミノ酸置換としては，グリシン，アラニン，バリン，ロイシン，およびイソロイシンなどの脂肪族側鎖を有するアミノ酸間の置換，セリンおよびトレオニンなどの脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸間の置換，アスパラギンおよびグルタミンなどのアミド含有側鎖を有するアミノ酸間の置換，フェニルアラニン，チロシン，ヒスチジ

ン，およびトリプトファンなどの芳香族側鎖を有するアミノ酸間の置換，リジン，アルギニン，およびヒスチジンなどの塩基性側鎖を有するアミノ酸間の置換，アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性側鎖を有するアミノ酸間の置換，システインおよびメチオニンなどの硫黄含有側鎖を有するアミノ酸間の置換，グリシン，アスパラギン，グルタミン，セリン，スレオニン，チロシン，システイン，およびトリプトファンなどの非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸間の置換，アラニン，バリン，ロイシン，イソロイシン，プロリン，フェニルアラニン，およびメチオニンなどの非極性側鎖を有するアミノ酸間の置換，スレオニン，バリン，およびイソロイシンなどのβ分岐側鎖を有するアミノ酸間の置換が含まれ，例えば，バリン－ロイシン－イソロイシン，フェニルアラニン－チロシン，リジン－アルギニン，アラニン－バリン，グルタミン酸塩－アスパラギン酸塩，およびアスパラギン－グルタミン間の置換を挙げることができる。

[0022] 別の態様において，本発明は，前記方法により金属材料の腐食原因タンパク質として決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造することを含む，腐食防止剤の製造方法に関する。よって，本発明は，前記方法により金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を同定すること，及び，決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造することを含む，腐食防止剤の製造方法を含む。

[0023] 本発明の抗体は，ポリクローナル抗体であっても，モノクローナル抗体であってもよい。更に，本発明の抗体は，ヒト，マウス，ラット，ハムスター，モルモット，ラビット，イヌ，サル，ヒツジ，ヤギ，ラクダ，ニワトリ，アヒル等の抗体であってよく，好ましくは，ハイブリドーマを作製することができる動物の抗体であり，より好ましくはマウス，ラット又はウサギの抗

体である。本発明の抗体のイムノグロブリンクラスは特に限定されるものではなく，ＩｇＧ，ＩｇＭ，ＩｇＡ，ＩｇＥ，ＩｇＤ，又はＩｇＹのいずれのイムノグロブリンクラス（アイソタイプ）であってもよく，好ましくはＩｇＧである。また，本発明の抗体がＩｇＧの場合，いずれのサブクラス（ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，又はＩｇＧ４）であってもよい。また，本発明の抗体は，モノスペシフィック，バイスペシフィック（二重特異性抗体），トリスペシフィック（三重特異性抗体）（例えば，ＷＯ１９９１／００３４９３号）であってもよい。また，本発明の抗体は，抗体の免疫反応性断片を含む。本明細書において，「抗体の免疫反応性断片」とは，抗体の一部分（部分断片）を含むタンパク質又はペプチドであって，抗体の抗原への作用（免疫反応性・結合性）を保持するタンパク質又はペプチドを意味し，例えば，Ｆ（ａｂ’）$_2$，Ｆａｂ’，Ｆａｂ，Ｆａｂ$_3$，一本鎖Ｆｖ（以下，「ｓｃＦｖ」という），（タンデム）バイスペシフィック一本鎖Ｆｖ（ｓｃ（Ｆｖ）$_2$），一本鎖トリプルボディ，ナノボディ，ダイバレントＶＨＨ，ペンタバレントＶＨＨ，ミニボディ，（二本鎖）ダイアボディ，タンデムダイアボディ，バイスペシフィックトリボディ，バイスペシフィックバイボディ，デュアルアフィニティリターゲティング分子（ＤＡＲＴ），トリアボディ（又はトリボディ），テトラボディ（又は［ｓｃ（Ｆｖ）$_2$］$_2$），若しくは（ｓｃＦｖ－ＳＡ）$_4$）ジスルフィド結合Ｆｖ（以下，「ｄｓＦｖ」という），コンパクトＩｇＧ，重鎖抗体，又はそれらの重合体を挙げることができる。

[0024] 本明細書において「アプタマー」とは，特定の分子と特異的に結合する核酸分子又はペプチドを意味する。アプタマーが核酸である場合，ＲＮＡであってもＤＮＡであってもよい。核酸の形態は二本鎖であっても一本鎖であってもよい。アプタマーの長さは標的分子に特異的に結合することができれば特に限定されないが，例えば，１０～２００ヌクレオチド，好ましくは，１０～１００ヌクレオチド，より好ましくは１５～８０ヌクレオチド，さらに好ましくは１５～５０ヌクレオチドのものである。アプタマーは，当業者において周知の方法を用いて選択することができ，例えば，ＳＥＬＥＸ法（Ｓ

ｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ Ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）（Ｔｕｅｒｋ，Ｃ． ａｎｄ Ｇｏｌｄ，Ｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：５０５－５１０）を用いることができる。

[0025] 本明細書において，「アンチセンス核酸」とは，標的とする配列に相補的な配列を有する核酸分子のことであり，ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよい。また，アンチセンス核酸は標的配列と１００％相補的である必要はなく，上述のストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズすることができれば，相補的でない塩基を含んでいてもよい。アンチセンス核酸は細胞に導入されると，標的配列に結合し，転写，ＲＮＡのプロセッシング，翻訳又は安定性を阻害する。また，アンチセンス核酸は，アンチセンスポリヌクレオチドの他に，ポリヌクレオチドミメティックス，変異された骨格（ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｂａｃｋ ｂｏｎｅ）を備えるものを含む。このようなアンチセンス核酸は，標的配列情報を基に，当業者周知に方法を利用して適宜設計及び製造（例えば，化学合成）することができる。

[0026] 「ｄｓＲＮＡ」とは，ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）により，少なくとも１部において標的配列と相補的な配列を有し，標的配列を有するｍＲＮＡと結合することにより当該ｍＲＮＡを分解して，それにより標的配列の翻訳（発現）を抑制する二本鎖ＲＮＡ構造を含むＲＮＡのことである。ｄｓＲＮＡは，ｓｉＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ）及びｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）を含む。ｄｓＲＮＡは，標的遺伝子発現を抑制する限り，標的配列と１００％の相同性を備える必要はない。また，ｄｓＲＮＡは，安定化その他の目的で，その一部がＤＮＡに置換されていてもよい。ｓｉＲＮＡとして，好ましくは，２１～２３塩基を備える二本鎖ＲＮＡである。ｓｉＲＮＡは，当業者周知の方法，例えば，化学合成又は自然発生ＲＮＡのアナログとして得ることができる。ｓｈＲＮＡは，ヘアピンターン構造をとるＲＮＡ短鎖である。ｓｈＲＮＡは当業者周知の方法，例えば，化学合成又はｓｈＲＮＡをコードする遺伝子を細胞に導入し，発現

させることにより得ることができる。

[0027] 別の態様において，本発明は，金属材料の表面に存在する菌における電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法に関する。電子伝達酵素は，本発明のタンパク質であってもよいし，前記方法により適宜決定されたタンパク質であってもよい。電子伝達酵素の機能又は発現の阻害は，電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを含有する組成物を金属材料の表面に接触させることにより行うことができる。よって，本発明は，前記方法により金属材料の表面に存在する菌から電子伝達酵素を同定すること，及び，同定された電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法を含む。金属材料は，好ましくは外部環境，たとえば，淡水又は海水などの水中に存在していてもよい。よって，別の態様において，本発明は，外部環境に設置された金属材料の腐食防止方法であって，外部環境から細胞表面酵素もつ細菌を含む試料を採取すること，試料中に存在する細胞表面電子伝達酵素を同定すること，前記酵素に結合する抗体又はその免疫反応断性片又はアプタマー，あるいは前記酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｓｉＲＮＡ，又はアプタマーを調製すること，前記抗体，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｓｉＲＮＡを配管に流通させることを有する，金属材料の防食方法を含む。

[0028] また，別の態様において，本発明は負の電位を持つ金属材料の電位を－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥ以上（すなわち，－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥと同じかそれよりも正の方向に大きい値，例えば，－０．２，－０．１，０，０．１，及び０．２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥなど）として，又は－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥよりも上げて細菌の電子を引く抜く代謝を止めることにより，金属材料の表面に存在する菌における電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法に関する。ここで，「Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥ」とは，標準水素電極を基準とした電極電位を意味する。本発明者らの見出した

ところによれば，０．３Ｖ付近のエネルギーが電子を引き抜く代謝を動かすのに最低限必要となるエネルギーであることから，負の電位を持つ金属材料の電位を－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥ以上又は－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥよりも上げることにより，細菌の電子を引く抜く代謝を止めることができる。金属材料の電位の測定は，参照電極で測定することができ，例えば，配管の内部の場合，銀－塩化銀電極により測定することができる。この場合、電位の測定は銀－塩化銀電極で行い，標準水素電極の値に変換してＶ　ｖｓ．ＳＨＥの値を得ることができる。また，電位の測定は，ポテンショスタットを用いて電位の調整を行いながら同時に行うこともできる。電位の調整は，ポテンショスタットなどの金属材料に電圧をかけることができる手段を用いて適宜行うことができる。

[0029] 以下，実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし，本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお，本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

実施例

[0030] （微生物の培養）

Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５（ＤＳＭ番号１５５７９）は，CO_2／N_2（２０：８０，ｖ／ｖ）の無酸素条件下，２８℃で１００ｍｌのＤＳＭＺ１９５ｃ培地を含むブチルゴム栓付きバイアル中で前培養した。５日後，培養物には少量の黒色硫化鉄沈殿剤が含まれていた。細胞懸濁液の一部を，２１または１１０ｍＭの乳酸塩を供給された新鮮なＤＳＭＺ１９５ｃ培地で１０倍に希釈し，さらに上記条件下で５日間培養して乳酸飢餓状態または乳酸充足状態をそれぞれ生じさせた。乳酸塩の代わりに１５ｍＭフマル酸塩を唯一の電子供与体として添加したことを除いて，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５と同じ条件を用いて，Ｄｅｓｕｌｆｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｖａｃｕｏｌａｔｕｍ（ＪＣＭ　１２２９５）を培養した。Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ　ＭＲ－１は，単離されたコロニーから白金耳で採取した細胞をＬＢ培地に再懸濁して好気的に培養した後，３０℃で１５時

間激しく振とう培養した。培養物を５０００×ｇで１０分間遠心分離し，得られたペレットを洗浄し，電子供与体および受容体（６０ｍＭの乳酸塩および１ｍＭのフマル酸塩）の改変された濃度で，Ｇｏｒｂｙら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０３，１１３５８－１１３６３（２００６））によって記載された無酸素化学的に規定された培地３ｍｌに再懸濁した。細胞培養物（ＯＤ６００ｎｍ １．５）を，１００％N_2環境下のブチルゴム栓付きバイアル５ｍｌに入れ，攪拌せずに３０℃で１０時間さらに培養した。１０．０ｍＭ NH_4Cl，１．０ｍＭ K_2HPO_4，０．５ｍＭ $MgCl_2$，０．５ｍＭ $CaCl_2$，５．０ｍＭ $NaHCO_3$，１０ｍＭ Na^+－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ ７．０），０．５ｇ ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ，及びそれぞれ電子供与体および受容体として１０ｍＭ酢酸ナトリウム及び４０ｍＭ フマル酸ナトリウムを１Ｌ中に含有する無酸素性ＰＳ培地でＧｅｏｂａｃｔｅｒ ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓ ＰＣＡ（ＡＴＣＣ ５１５７３）を培養した。３０℃で５日培養した後，細胞培養物を定常期に達するまでさらに３日間２４℃で培養した。大腸菌は，単離されたコロニーから白金耳で採取した細胞をＬＢ培地に再懸濁して好気的に培養した後，３７℃で激しく振とうしながら１２時間培養した。

[0031]（ゲノム配列解析と解析）

Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５の核酸分子をＮｕｃｌｅｏｂｏｎｄ ＡＸＧ Ｃｏｌｕｍｎ Ｋｉｔ（ＴａｋａｒａＢｉｏ）を用いて新鮮な細胞ペレットから抽出した。単一分子リアルタイム（ＳＭＲＴ）細胞シークエンスのために，ＰａｃＢｉｏ ＲＳＩＩシーケンサー（Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）上に１５ｋｂ挿入ライブラリーを構築した。１１ｋｂｐの平均サイズを有する合計５７，２９９個のインサートが完全に配列決定された。ＳＭＲＴ分析（バージョン２．３，Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で実施されたＨＧＡＰプロトコルを使用して，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５ゲノムを構築した。生成された出力は２つの円形コンティグから成っていた。最初のコンティグは，３，７０２，１８２塩基対（ｂｐ

）であり，平均カバレッジは１３５．３６倍であり，第２コンティグは６４，９６３ｂｐであり，平均のカバレッジは３７．７７倍であった。両方のコンティグの末端の重複を除去し，環状化して，単一の３，６７７，０５５ｂｐの環状染色体および４３，０５２ｂｐの環状プラスミドを得た。ゲノムアノテーションをＭｉＧＡＰ（Ｈ．Ｓｕｇａｗａｒａら，ｐａｐｅｒ ｐｒｅｓｅｎｔｅｄ ａｔ ｔｈｅ ２０ｔｈ Ｉｎｔ．Ｃｏｎｆ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ １－２，Ｋａｎａｇａｗａ，Ｊａｐａｎ，２００９）で行ったところ，染色体に３，３７５個のコード配列，６２個のｔＲＮＡ遺伝子，および６個のｒＲＮＡ遺伝子を含んでおり，プラスミド中に５６個のコード配列を含んでいた。ヘム結合タンパク質の同定のために，ゲノムをヘム結合モチーフＣＸｎＣＨ（ｎ＝ ２～５）について検索した。同定されたヘムタンパク質の細胞内の位置は，Ｐｓｏｒｔｂ（Ｎ．Ｙ．Ｙｕら，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２６，１６０８－１６１５（２０１０））を用いて予測した。

[0032] （トランスクリプトーム解析）

ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ ＲＮＡキット（ＴａｋａｒＢｉｏ）を用いて全ＲＮＡを調製した。Ｒｉｂｏ－Ｚｅｒｏ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｋｉｔ（グラム陰性細菌）を用いてｒＲＮＡを除去し，ＴｒｕＳｅｑ Ｓｔｒａｎｄｅｄ ｍＲＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ（イルミナ）を用いたシーケンシングのために核酸分子ライブラリーをメーカーのガイドラインに従って調製した。ＲＮＡ品質は，Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ，ＵＳＡ）で確認した。ｃ核酸分子ライブラリーをＨｉＳｅｑ ２５００装置（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）でライブラリー当たり５１００万～５４００万個の１００ｂｐのｐａｉｒ－ｅｎｄ ｒｅａｄｓを生成して配列決定した。品質管理された配列読み取り結果を，ＴｏｐＨａｔ（Ｃ．Ｔｒａｐｎｅｌｌら，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２５，１１０５－１１１１（２００９）；Ｄ．Ｋｉｍら，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ． １４，（２０１３

）．）を用いてＤ．　ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のドラフトゲノムにマッピングし，９７．４％の最小マッピング同一性を得た。乳酸飢餓または乳酸充足状態で培養されたＩＳ５株細胞の相対的発現パターンを比較するため，ＦＰＫＭ測定基準を用いて配列読み取り結果を定量した。ＦＰＫＭ値は，アデニル酸キナーゼ（ａｄｋ）および組換えタンパク質Ａ（ｒｅｃＡ）の２つのハウスキーピング遺伝子の平均によってさらに正規化した。

[0033]（膜画分抽出）

乳酸飢餓状態（１．５８ｇ）および乳酸充足状態（２．２５ｇ）のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞の２Ｌの細胞培養物を７１９７ｇ，４℃で２０分間遠心分離し，湿潤ペレットを回収した。細胞を洗浄し，１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８）に再懸濁して，ＭｙｅｒｓおよびＭｙｅｒｓ（Ｃ．Ｒ．Ｍｙｅｒｓら，　Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７４，３４２９－３４３８（１９９２））に記載された方法で，ＥＤＴＡ－リゾチーム－Ｂｒｉｊ５８方法を用いて破壊した。ペレットが形成されなくなるまで，７１９７×ｇ，４℃で１０分間の遠心分離を繰り返し，破片および破砕されていない細胞を除去した。上清を超遠心分離チューブに移し，日立タイプのＳ５０Ａ－２１３０ローターを用いて，４５，９００ｒｐｍ（ＲＣＦｍａｘ　１７７，０００×ｇ），４℃で２時間遠心分離して膜混合物をペレット化した。内膜（ＩＭ）と外膜（ＯＭ）を分離するため，膜ペレットを，０．５ｍｌの１０ｍＭ　Ｎａ$^{+}$－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）バッファーに再懸濁し，同バッファーで調製した３５％～５５％（ｗｔ／ｗｔ）のスクロース勾配に添加し，日立タイプのＳ５０ＳＴ－２０６９ローターで２８，５００ｒｐｍ（ＲＣＦｍａｘ　８２，０００×ｇ），４℃で１７時間遠心分離した。ＩＭおよびＯＭ画分は異なるスクロース勾配に分離された。膜画分をピペットを用いて１．５ｍｌチューブに注意深く移した。ＯＭ画分を室温で２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で１０分間洗浄して付着したＩＭを溶解することによりさらに精製し，その後日立タイプのＳ１１０ＡＴ－２１１５ローターを用いて，５１，２００ｒｐｍ（ＲＣＦｍａｘ　１５０，０００×ｇ），４℃で２

時間遠心してペレット化した。ＩＭおよびＯＭの分離は，ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）－ ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）にかけたものを，ＧｅｌＣｏｄｅ Ｂｌｕｅ Ｓａｆｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔａｉｎ（サーモサイエンティフィック社（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））でタンパク質染色して確認した。

[0034]（抽出されたＯＭ画分のスペクトル分析）

乳酸飢餓細胞および乳酸充足細胞から抽出されたＯＭ画分を含む溶液中のタンパク質濃度は，それぞれ８５２．１μｇ／ｍｌおよび５０２１．０μｇ／ｍｌ（乳酸飢餓細胞の約６倍）であった。次いで，Ｓｈｉｍａｄｚｕ ＵＶ Ｐｒｏｂｅ ＭＰＣ－２２００を用いて，乳酸飢餓細胞及び乳酸充足細胞のＯＭ画分を，それぞれ０．３４ｍｇ（０．４ｍｌ×８５２．１μｇ／ｍｌ）および２．０ｍｇ（０．４ｍｌ×５０２１．０μｇ／ｍｌ）を用いてＵＶ－ｖｉｓ吸収スペクトルを測定し，ｃ型シトクロムのＯＭ分画への局在を同定した（光路，２ｍｍ；スリット幅，５．０ｎｍ；スキャン速度，培地）。吸収スペクトルは，室温で空気酸化および亜ジチオン酸還元条件下で測定した。ヘム含有量の定量的比較のために，吸収スペクトルのベースラインを差し引き，４１９ｎｍでのＳｏｒｅｔピーク強度を得て，３４１μｇの同じタンパク質で正規化した。

[0035]（ＯＭシトクロムをコードする遺伝子の同定）

ＯＭシトクロムをコードする遺伝子を同定するため，高いシトクロム含量を有する乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞から単離したＯＭ画分を電気泳動し，次にＴｈｏｍａｓら（Ｐ．Ｅ．Ｔｈｏｍａｓら，Ａｎａｌ． Ｂｉｏｃｈｅｍ．７５，１６８－１７６（１９７６））に記載されたテトラメチルベンジジン－H_2O_2法を用いてヘム染色した。 ５つの優性ヘム陽性バンドを切り出し，ゲル中，３７℃でトリプシン（ＴＰＣＫ処理，Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）を用いて一晩分解した。消化されたペプチドは，Ｑ Ｅｘａｃｔｉｖｅ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて，ナノ液体クロマトグラフィーータンデ

ム質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）によって分析した。ペプチドは，ナノＥＳＩスプレーカラム（７５μｍ［ＩＤ］×１００ｍｍ［Ｌ］，ＮＴＣＣ分析カラムＣ１８，３μｍ，Ｎｉｋｋｙｏ Ｔｅｃｈｎｏｓ）を用いて，０％～３５％の緩衝液Ｂ（１００％アセトニトリルおよび０．１％ギ酸）の直線勾配を流速３００ｎＬ／分で１０分間かけて分離した（Ｅａｓｙ ｎＬＣ；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。質量分析計を陽イオンモードで操作し，データ依存ＴＯＰ１０法を用いてＭＳおよびＭＳ／ＭＳスペクトルを取得した。ローカルＭＡＳＣＯＴサーバ（バージョン２．５，Ｍａｔｒｉｘ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ；パラメータ：Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｍａｓｓ Ｔｏｌｅｒａｎｃｅ，±１５ｐｐｍ；フラグメント質量トレランス，±２０ｍｍｕ；およびＭａｘ Ｍｉｓｓｅｄ Ｃｌｅａｖａｇｅｓ，３；機器タイプ，ＥＳＩ－ＴＲＡＰ）を用いて，インハウスで予測されたＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５ ６０２２９ ＯＲＦデータベース（ゲノムおよびプラスミド中の３４３１コード配列；１０８９１１７残基）に対してＭＳ／ＭＳスペクトルを検索した。

[0036]（系統樹の構築）

Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５の細胞外シトクロムに対する相同タンパク質の検索のために，ＩＳ５株のＤＦＥ＿４５０およびＤＦＥ＿４６４によってコードされるタンパク質配列を，ｂｌａｓｔｐアルゴリズムを用いたＮＣＢＩ非重複データベースの質問配列として使用した。２００以上の最大ｂｌａｓｔスコアを有するタンパク質は，高度に同一であるとみなされた。同一タンパク質のアミノ酸配列をＮＣＢＩタンパク質データベースから収集した。１６Ｓ ｒＲＮＡ系統樹の構築のため，ＮＣＢＩヌクレオチドデータベースから１６Ｓ ｒＲＮＡ配列を収集し，ＭＵＳＣＬＥ（Ｒ．Ｃ．Ｅｄｇａｒ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３２，１７９２－１７９７（２００４））を用いてアラインし，ＭＥＧＡ ７（Ｓ．Ｋｕｍａｒら，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｅｖｏｌ．３３，１８７０－１８７４（２０１６））を用いて隣接結合法（Ｎ．Ｓａｉｔｏｕら，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｅｖｏｌ．４，

４０６－４２５（１９８７））により分析した。タンパク質系統樹の構築のために，信頼性の低いカラムを削除したアミノ酸配列（８９．２％の残基が残存）を，ＧＵＩＤＡＮＣＥ　２を用いてアラインし（Ｉ．Ｓｅｌａら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．４３，Ｗ７－１４（２０１５）），ＭＥＧＡ　７（Ｓ．Ｋｕｍａｒら，（２０１６）前掲）を用いて最大尤度法で分析した。

[0037]（全細胞電気化学分析）

電気化学的測定は，１００％N_2を充填した単一のＣＯＹ嫌気性チャンバー内に保持された３電極反応器で行った。スプレー熱分解によりガラス基板上に成長させた酸化インジウムスズ（ＩＴＯ）（ＳＰＤ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｉｎｃ．，Ｊａｐａｎ）を作用電極（抵抗８Ω／ｓｑｕａｒｅ，厚さ１．１ｍｍ，表面積３．１ｃｍ^2）として使用し，反応器の底に設置した。白金線およびＡｇ／ＡｇＣｌ（ｓａｔ．ＫＣｌ）をそれぞれカウンター電極および参照電極として使用した。次の組成を有する塩培地を電解質として使用した：４５７ｍＭ　ＮａＣｌ，４７ｍＭ　$MgCl_2$，７．０ｍＭ　ＫＣｌ，５．０ｍＭ　$NaHCO_3$，１．０ｍＭ　$CaCl_2$，１．０ｍＭ　K_2HPO_4，１．０ｍＭ　NH_4Cl，２５ｍＭ　Na^+－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５），１ｍＬの亜セレン酸タングステン酸塩溶液（１２．５ｍＭ　ＮａＯＨ，１１．４μＭ　$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$，１２．１μＭ　$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$），および１ｍｌの微量元素溶液ＳＬ－１０（ＤＳＭＺ培地３２０に記載されている）。塩培地には，電子受容体として２１ｍＭ　Na_2SO_4，炭素源として１ｍＭ酢酸塩を添加し，ビタミンまたは還元試薬は添加しなかった。塩培地を０．２２μｍフィルターに通過させて滅菌し，次いで１００％N_2で１５分間パージすることにより脱気した。合計４．５ｍｌの滅菌無酸素塩溶液を電解質として電気化学反応器に加えた。電気化学的測定の間，反応器は攪拌せずに操作した。菌株ＩＳ５およびＤ．ｖａｃｕｏｌａｔｕｍ細胞は，５０ｍｌの培養物から遠心分離により回収し，０．５ｍｌの無酸素塩培地に再懸濁し，次いで最終ＯＤ６００ｎｍが０．１および０．３となるように反応

器に添加した。自動分極システム（ＶＭＰ３，Ｂｉｏ　Ｌｏｇｉｃ　Ｃｏｍｐａｎｙ，フランス）を用いて，クロノアンペロメトリー，リニアスイープボルタンメトリー（ＬＳＶ）および示差パルスボルタンメトリー（ＤＰＶ）を測定した。ＤＰＶは，５．０ｍＶのパルス増分，５０ｍＶのパルス振幅，３００ｍｓのパルス幅，および５．０秒のパルス周期の条件下で測定した。ＬＳＶは０．１ｍＶ／ｓの走査速度で測定した。電位走査は負の方向に行った。

[0038]（走査電子顕微鏡法）

電気化学的測定を行った後，ＩＴＯ電極を反応器から取り出し，２．５％グルタルアルデヒドで固定し，次いで電極を５０ｍＭ　Na^+－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）に３回浸漬することによって洗浄した。洗浄した試料を，同じ緩衝液中の２５％，５０％，７５％，９０％および１００％エタノール勾配で脱水し，ｔ－ブタノールに３回交換し，次いで真空下で凍結乾燥した。乾燥試料を蒸発白金で被覆し，次にＫｅｙｅｎｃｅ　ＶＥ－９８００顕微鏡を用いて観察した。

[0039]（透過電子顕微鏡法）

５０ｍｌの細胞培養物中の乳酸飢餓及び乳酸充足Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞を，５０００×ｇで８分間遠心分離することにより回収し，直ちに２％パラホルムアルデヒドおよび２．５％グルタルアルデヒドを含有する脱気溶液中，氷上で固定した。固定後，すべての操作を２ｍｌエッペンドルフチューブで行った。１．５ｍｌの５０ｍＭ　Na^+－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４，３５ｇ／Ｌ　ＮａＣｌ）中に穏やかに再懸濁した後，遠心分離（５０００×ｇ，４分）することにより５回洗浄した。ＭｃＧｌｙｎｎら（Ｓ．Ｅ．ＭｃＧｌｙｎｎら，Ｎａｔｕｒｅ　５２６，５３１－Ｕ１４６（２０１５））記載の方法に従い，シトクロム反応性の３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）－H_2O_2染色，OsO_4染色，および樹脂包埋を逐次行った。膜小胞を可視化するため，コンビナトリアル重金属染色を行い膜のコントラストを強調した。Ｄｅｅｒｉｎｃｋら（Ｔ．Ｊ．Ｄｅｅｒｉｎｃｋら，ＮＣ

ＭＩＲ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ３Ｄ ＥＭ： ａ ｎｅｗ ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｆｏｒ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｐｅｃｉｍｅｎｓ ｆｏｒ ｓｅｒｉａｌ ｂｌｏｃｋ ｆａｃｅ ｓｃａｎｎｉｎｇ ｅｌｅｃｔｒｏｎ ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ． Ａｖａｉｌａｂｌｅ ａｔ ｈｔｔｐｓ：／／ｎｃｍｉｒ．ｕｃｓｄ．ｅｄｕ／ｓｂｅｍ－ｐｒｏｔｏｃｏｌ（２０１０））が記述した方法を若干修正し，哺乳動物組織およびカコジル酸緩衝液の代わりに，それぞれ細菌細胞および５０ｍＭ Ｎａ$^{+}$－ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４，３５ｇ／Ｌ ＮａＣｌ）を用いて初期細胞洗浄を行った。得られた樹脂ブロックをダイヤモンドナイフ（ＤｉＡＴＯＭＥ，Ｕｌｔｒａ３５°）で８０ｎｍに切断し，浮遊切片を銅マイクログリッド（Ｎｉｓｈｉｎ ＥＭ）に載せた。薄い切片を調べ，８０ｋＶで操作されるＪＥＭ－１４００顕微鏡を用いて画像化した。

[0040] （蛍光顕微鏡法）

乳酸飢餓状態のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５細胞を，脱気した２％グルタルアルデヒド溶液で固定し，Ｐｉｒｂａｄｉａｎら（Ｓ．Ｐｉｒｂａｄｉａｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １１１，１２８８３－１２８８８（２０１４））の記載に従って，それぞれタンパク質特異的および膜特異的蛍光色素である，ＮａｎｏＯｒａｎｇｅ試薬およびＦＭ４－６４ＦＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で染色した。それぞれの蛍光をＦＩＴＣフィルターおよびＴＸＲフィルターをそれぞれ装備したＬｅｉｃａ ＤＦＣ４５０Ｃ落射蛍光顕微鏡で×１００油浸対物レンズの下で観察した。

[0041] （実施例１）Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ ＩＳ５の外膜ヘムタンパク質の同定

ＳＲＢにおける電子取り込みプロセスは，鉄還元細菌（Ｄ．Ｅ．Ｒｏｓｓら，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ６，ｅ１６６４９（２０１１）；Ａ．Ｏｋａｍｏｔｏら，Ａｎｇｅｗ． Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．５３，１０９８８－１０９９１（２０１４）；Ｌ．Ａ．ＳｈｉらＥｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｐ

．１，２２０－２２７（２００９））による細胞外電子伝達中に起こるように，外膜（ＯＭ）ヘムタンパク質またはナノフィラメント（Ｈ．Ｖｅｎｚｌａｆｆら，Ｃｏｒｒｏｓ．Ｓｃｉ．６６，８８－９６（２０１３）；Ｄ．Ｅｎｎｉｎｇら，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂ．８０，１２２６－１２３６（２０１４））を必須の構成とすると推測されている。本発明者らは，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５の３．７Ｍｂｐ環状ゲノム全体を配列決定し，少なくとも４つのヘム結合モチーフを含むマルチヘムシトクロムをコードする２６の遺伝子を同定した。これらは直接的な電子伝達経路であるＯＭを貫通するシトクロム複合体（ＯＭシトクロム，ＯＭＣｓ）の形成と，モデル鉄還元細菌であるＳｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓおよびＧｅｏｂａｃｔｅｒ　ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓにおける，細胞外固形分の減少に必須である。Ｇ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓの導電性ナノフィラメントをコードする遺伝子はＩＳ５株のゲノムには見出されなかったが，遺伝子ＤＦＥ＿４５０およびＤＦＥ＿４６４によってコードされるマルチヘムシトクロムは細胞外であると予測され，したがって，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５における細胞外電子取り込みの需要な構成要素であると考えられた。ＮＣＢＩ非重複タンパク質データベースを検索し，ＤＦＥ＿４５０およびＤＦＥ＿４６４にコードされているものと相同なＯＭＣｓは，SO_4^{2-}，SO_3^{2-}，$S_2O_3^{2-}$，S^0，及びSn^{2-}を減少させる，プロテオバクテリア門，サーモデスルフォバクテリア門およびアクウィフェクス門の堆積細菌の培養物および未培養物の間で広く分布していた（図１ａ）。注目すべきことに，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５　ＯＭＣのホモログは，Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ，Ｇ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓおよびＡｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｆｅｒｒｏｘｉｄａｎｓのＯＭＣとは明確に配列が相違していた（図１ｂ）。これらの保存されたＯＭＣｓがＯＳＳ呼吸細菌に広く存在することから，この特徴不明瞭な微生物群は，可溶性電子供与体が制限される条件下で還元硫化物鉱物からＯＭＣを介して電子を抽出できることが示唆された。

[0042] そこで，本発明者らは，乳酸含量が限定された培地で培養された細胞のＯＭ抽出およびトランスクリプトーム解析の両方を行うことにより，可溶性電子供与体が制限された条件下において，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５がＯＭＣを高度に発現することを確認した。播種５日後には乳酸は完全に消費され，粗膜画分は内膜と外膜に明らかに分離された（図２ａ）。抽出されたＯＭ画分のＵＶ－ｖｉｓ吸収スペクトルは，酸化および還元ｃ型シトクロムに特徴的なＳｏｒｅｔおよびＱバンド吸収を示した（図２Ｂ左図）。スペクトルデータの解析により，乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞は，５日間の培養後に３０ｍＭ以上の乳酸塩が残存していた乳酸充足条件下で培養された細胞より少なくとも１０倍のＯＭＣを有することが示された（図２Ｂ右図）。Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５　ＯＭＣｓをコードする遺伝子を解明するために，乳酸飢餓細胞の電気泳動ＯＭ画分は，ヘム染色（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン－H_2O_2）で処理してＯＭＣｓを可視化し，次いでヘム陽性バンド中のタンパク質のアミノ酸配列を決定した。このアプローチを用いて，それぞれ１２および１４のヘム結合部位を有するシトクロムをコードするＤＦＥ＿４４９およびＤＦＥ＿４６１の遺伝子産物を検出した（図２ａ）。ヘム陽性バンドには他のシトクロムは検出されなかったが，トランスクリプトーム解析では，ＤＦＥ＿４５０およびＤＦＥ＿４６４によりコードされる２つの細胞外シトクロムを含む他のシトクロムが乳酸飢餓条件下で過剰発現していることが明らかになった（図２ｃ）。これにより，ＩＳ５細胞は電子供与体飢餓状態となると，電子摂取のためのＯＭＣの発現を促進することが示唆された。

[0043] 本発明者らは，乳酸飢餓状態のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞が，乳酸塩が十分な状態の細胞と比較して著しく高い効率で電極表面から電子を抽出できることを電気化学的測定によりさらに確認した。H_2の発生を防ぐために－０．４Ｖ（標準水素電極対比）に保たれたインジウム－錫ドープ酸化物（ＩＴＯ）電極を備えた３電極嫌気性反応器を用いて（Ｘ．Ｄｅｎｇら，Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　８３，５２９－５３１（２０１５

）），硫酸塩還元を伴う細胞外電子取り込みによって生成された電流を測定した。乳酸飢餓状態のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞を電極が唯一の電子供与体として働く反応器に導入すると，陰極電流密度は直ちに増加し，１時間以内に＞０．２μＡｃｍ$^{-2}$まで増加した（図３ａ）。対照的に，H_2を消費するＳＲＢ　Ｄｅｓｕｌｆｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｖａｃｕｏｌａｔｕｍまたは滅菌培地を反応器に導入すると，検出された電流増加は無視できるほどであった。乳酸塩充足Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞を添加しても陰極電流は急激には増加せず，わずかな電流増加およびバックグラウンド非ファラデー性電流の変化があった。これにより，細胞培養中の乳酸塩濃度がＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞の電子取り込み能力を変化させることが示された。ＩＳ５細胞の倍増時間は乳酸塩を含む嫌気的増殖条件下で約１３．５時間であるが，３日後のＩＴＯ電極上の乳酸飢餓ＩＳ５細胞の数は有意に増加しないまま，ＩＳ５細胞の陰極電流の生成が継続した。これは電極が乳酸塩よりもはるかに少ない量のエネルギーをＩＳ５細胞に提供することを示唆している。陰極電流測定後にリニアスイープ（ＬＳ）ボルタンメトリーによって測定された硫酸還元電流の潜在的依存性は，乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞において硫酸還元が－０．３Ｖから開始され，－０．４２Ｖの電位で最大化されたことを示した（図３ｂ）。対照的に，乳酸塩充足ＩＳ５，H_2消費Ｄ．ｖａｃｕｏｌａｔｕｍまたは滅菌培地のＬＳボルタンメトリーでは硫酸塩還元の有意な電流は観察されなかった。観察された－０．３Ｖの硫酸塩還元の開始電位は，示差パルスボルタンメトリーから求めた乳酸飢餓状態のＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のレドックスプロファイルと一致した。

[0044] 特に，－０．１Ｖでの乳酸飢餓細胞のＬＳボルタンメトリーで観察された別のピークは，生合成された硫化鉄の還元に割り当てることができ，これは，乳酸飢餓ＩＳ５細胞において２時間後にピーク電流発生後わずかに電流が減少する原因が，硫化鉄の生成が細胞と電極表面との間の直接接触を阻害し得るためと説明するものである（図３Ａ）。－０．３Ｖの硫酸塩還元の閾値

電極電位は，ＮＡＤＨの酸化還元電位に類似しているが，フェレドキシンよりも陽性であり，このことはＮＡＤＨがペリプラズムのシトクロムから細胞質アデノシンホスホサルフェートレダクターゼに電子を受け取る一次電子輸送成分として役立つことを示唆している（図３ｃ）。これらの結果は，同定された電子取り込みメカニズムが，硫酸塩還元プロセスを駆動するために，電子の形態のエネルギーのほぼ最小量を必要とすることをさらに示唆している。他のＯＳＳ（SO_3^{2-}，$S_2O_3^{2-}$，S^0およびSn^{2-}）に電子を供与する最も重要な薬剤（例えばメナキノン）の生成も，ＮＡＤＨと同等またはそれ以上の正の酸化還元電位で起こるので，ここで同定されたＯＭＣの新しい群は，海洋堆積物を含む電子供与体に限られた環境において特に，ＯＳＳ呼吸細菌の微生物エネルギー獲得プロセスの重要な構成要素となりうる。さらに，電子取り込みと結びついたＩＳ５の成長は，電極上では無視できる程度であったが，代謝を行うために最小限ではあるが十分なエネルギー要求は，地下の貧食環境で観察された非常に遅い成長速度に関連し得る（Ｔ．Ｍ．Ｈｏｅｈｌｅｒら，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１１，８３－９４（２０１３））。

[0045] 電気化学的測定後の電極表面の走査型電子顕微鏡観察により，乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞は電極上に単一層のバイオフィルムを形成した（図４ａ）。これは，細胞外電子伝達能を有する多くの細菌株と同様であり，電子取り込みがＯＭＣｓを介して起こるという概念に合致した。さらに，ナノフィラメント構造が細胞間及び細胞から電極表面まで伸びるように観察された（図４ｂ）。Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ　ＭＲ－１によって産生された同様のナノワイヤはＯＭ（Ｓ．Ｐｉｒｂａｄｉａｎら，Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１１１，１２８８３－１２８８８（２０１４）；Ｙ．Ａ．Ｇｏｒｂｙら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０３，１１３５８－１１３６３（２００６））の伸長であることが示されていることから，ＩＳ５株のＯＭ画分で検出されたシトクロムも観察されたナノワイヤに局在すると考えられる。

[0046] ＯＭＣについて観察されたように，乳酸塩の制限に応答して，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５細胞でナノワイヤ様構造の形成が誘導された。ナノワイヤ上のＯＭＣの分布を調べるため，チトクローム反応性の３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）－H_2O_2染色を施した細胞の薄切片について透過型電子顕微鏡検査を行ったところ，ヘム鉄の中心はOsO_4に対して高い結合親和性を示しながらＤＡＢポリマーの形成を触媒した。陽性染色対照として，ナノワイヤ形成を促進する条件下で増殖させたＳ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓおよびＧ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓ細胞を使用した（Ｙ．Ａ．Ｇｏｒｂｙら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０３，１１３５８－１１３６３（２００６）；Ｇ．Ｒｅｇｕｅｒａら，Ｎａｔｕｒｅ　４３５，１０９８－１１０１（２００５））。ＯＭＣｓの発現分析と一致するように，乳酸飢餓ＩＳ５細胞（図４ｃ～ｅ）の外縁は，乳酸充足細胞の約２倍の強度で染色された。Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓおよびＧ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓ細胞で同様の染色強度が観察された一方，陰性染色対照として使用したＯＭＣがない大腸菌細胞では，膜領域と比較して細胞内でより強い染色を示した。Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のナノワイヤは３０～５０ｎｍの直径を有する竹様構造に似ており，陽性ＤＡＢ染色でのみ明瞭に見ることができ，ナノワイヤ表面上のシトクロムの高い被覆率を示唆している。ＩＳ５ナノワイヤは，Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓのものよりわずかに薄いが，両方とも同一のセグメント構造および強力なシトクロム陽性染色を示し，ＩＳ５ナノワイヤもＳ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓにおいて提唱されているような電子移動の役割を果たすことが示唆された。対照的に，Ｇ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓナノワイヤは約７ｎｍの直径を有し，弱陽性と陰性の両方のＤＡＢ染色を示した。これらの相違は，Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓのナノワイヤがＯＭ（Ｓ．Ｐｉｒｂａｄｉａｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１１１，１２８８３－１２８８８（２０１４））の延長であることを示唆する以前の構造モデルと一致しており，一方でＧ．ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓのものは主にＩＶ型ピリンＰｉｌＡ（

Ｇ．Ｒｅｇｕｅｒａら，Ｎａｔｕｒｅ　４３５，１０９８－１１０１（２００５））からなっている。

[0047] Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のナノワイヤの組成をより詳細に調べるために，乳酸飢餓状態の細胞を，それぞれタンパク質特異的蛍光色素及び膜特異的蛍光色素である，ＮａｎｏＯｒａｎｇｅおよびＦＭ４－６４ＦＸで染色した（図４ｆ及びｇ）。タンパク質と膜の両方について染色されたＩＳ５株のナノワイヤの蛍光顕微鏡観察により，ナノワイヤが細胞膜の延長であり，Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓのナノワイヤ（Ｓ．Ｐｉｒｂａｄｉａｎら，（２０１４）前掲）と同一であることが明らかとなった。透過型電子顕微鏡で観察された竹様構造と合わせて，ＩＳ５株およびＳ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓのナノワイヤは，数十ナノメートルサイズのＯＭ小胞の整列したアラインメントであると考えられた。透過型電子顕微鏡において膜のコントラストを強調する重金属染色を行ったところ，乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞における膜小胞の分泌およびそれらのアラインメントを観察した。よって，抽出された乳酸飢餓状態のＩＳ５細胞のＯＭ画分もナノワイヤを含む可能性が高いことが示された。これらのデータは，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のＯＭＣｓおよびナノワイヤが細胞外固体からの電子取り込みを仲介することを示唆している。

[0048] いくつかの鉄還元細菌株で確認されているように，同定されたマルチヘムシトクロムは，Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のＯＭを貫通するタンパク質複合体を形成し得ると考えられた。抽出されたＯＭ画分中に検出されたＤＦＥ＿４４９およびＤＦＥ＿４６１によってコードされるシトクロムがペリプラズムにあると予測され，これらの遺伝子は細胞外シトクロムをコードすると推定されるＤＦＥ＿４５０およびＤＦＥ＿４６４に近接したゲノムに位置するので，ＤＦＥ＿４４９およびＤＦＥ＿４６１は，ＯＭ　ＭｔｒＣＡＢシトクロム複合体中のペリプラズムデカヘムシトクロムであり，シュワネラ種の金属還元に重要な（Ａ．Ｓ．Ｂｅｌｉａｅｖら，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３９，７２２－７３０（２００１）；Ｃ．Ｒｅｙｅｓら，Ｊ．

Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．　１９４，　５８４０－５８４７　（２０１２）．），Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ　ＭｔｒＡと同様の機能を果たすＯＭ結合ペリプラズムシトクロムをコードしていると考えられた。トランスクリプトーム解析から，鉄還元細菌でβバレルタンパク質についてみられるように（Ｒ．Ｓ．Ｈａｒｔｓｈｏｒｎｅら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０６，２２１６９－２２１７４（２００９）），タンパク質－タンパク質相互作用部位として機能し，ＯＭＣを安定化させることができる３つの他のシトクロムおよび２つのＮＨＬ－リピートβ－プロペラタンパク質を含むタンパク質をコードする遺伝子ＤＦＥ＿４４８～４５１およびＤＦＥ＿４６１～４６５の同等の発現レベルが明らかとなった（図２ｃ）。また，同種のβ－プロペラタンパク質も，多数の海底堆積物中のＯＳＳ－呼吸細菌で同定され，潜在的なＯＭＣ複合体がこの微生物群の間で広く保存され得ることが示唆された。同様の電子摂取は，ＩＳ５（図１ｂ）とは異なるＯＭＣ（Ｃｙｃ２）を有する（Ｔ．　Ｉｓｈｉｉら，Ｆｒｏｎｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６，（２０１５）；Ａ．Ｙａｒｚａｂａｌら，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８４，１５０２－１５０２（２００２））Fe^{2+}酸化Ａ．ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓでも報告されているが，嫌気性条件下での硫化物鉱物の細菌酸化は硫化鉄から放出されたFe^{2+}イオンの間接的酸化であると考えられており（Ｋ．Ｌ．Ｓｔｒａｕｂら，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂ．　６２，１４５８－１４６０（１９９６）；Ｃ．Ｊ．Ｊｏｒｇｅｎｓｅｎら，Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．４３，４８５１－４８５７（２００９）），本発明が示した直接電子摂取モデルとは異なる。

[0049] メタン古細菌と混合培養した様々な難培養ＳＲＢ株においてＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５のＯＭＣｓと相同なメタンの嫌気的酸化を行うＯＭＣｓをコードする遺伝子が同定されているように（図１），メタン資化性古細菌とのコンソーシアムを形成する様々な（図１）において同定されたので，観察されたＤ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５　ＯＭＣｓの電子取り込み能力は，ＳＲＢがＯＭＣまたはナノワイヤを介して古細菌細胞から電子を

直接受け取ることができるという，最近提案されたモデルを支持している（Ｓ．Ｅ．ＭｃＧｌｙｎｎら，（２０１５）前掲；　Ｓ．Ｓｃｈｅｌｌｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５１，７０３－７０７（２０１６）；Ｇ．Ｗｅｇｅｎｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ　５２６，５８７－Ｕ３１５（２０１５））。本電気化学的データによれば，メタン酸化コンソーシアムにおけるＳＲＢは，－０．３Ｖよりも負の電位を有する電子を必要とし，これはメタン栄養性古細菌からの電子によって２，７－ＡＱＤＳ（－０．１８５Ｖの酸化還元電位）が減少する（Ｓ．Ｓｃｈｅｌｌｅｒら，（２０１６）前掲）ことと合致する。同定されたクレードのＯＭＣｓ及びこれらのヘムタンパク質が介在する電子移動過程のエネルギー論に関連するこれらの知見により，可溶性エネルギー源の限られた条件下での堆積物中のＯＳＳ誘発微生物の微生物エネルギー産生のみならず，ＳＲＢを含有する合成学的コンソーシアムにおける種間電子伝達に関する理解を深めると期待される。

産業上の利用可能性

[0050] 本発明のタンパク質は，細胞外からの電子引き抜きに関与することから，本発明のタンパク質の発現または機能を阻害することにより，細菌の電子引き抜きに基づく事象を阻害することができ，それにより，鉄腐食などを予防または阻止することができる。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列；配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列；配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列において，１～２０個のアミノ酸が置換され，欠失し，挿入され，又は付加されたアミノ酸配列；あるいは，Ｂｌａｓｔにより配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と相同性スコア２００以上を示すアミノ酸配列を有する細胞表面タンパク質。

[請求項2] 細胞外電子移動作用を有する，請求項１に記載のタンパク質。

[請求項3] シトクロム酵素又はβプロペラタンパク質である，請求項１又は請求項２に記載のタンパク質。

[請求項4] 請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸分子。

[請求項5] 配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列，又は，配列番号１，３，５，７，９，１１，１３，１５及び１７から選択される１つの配列に記載の塩基配列と相補的な配列を有する核酸とストリンジェントな条件下で結合する塩基配列を有する，請求項４に記載の核酸分子。

[請求項6] 請求項４又は請求項５に記載の核酸分子を含むベクター。

[請求項7] 請求項６に記載のベクターを有する宿主細胞。

[請求項8] 請求項７に記載の宿主細胞を培養して請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のタンパク質を発現させることを含む，請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のタンパク質の製造方法。

[請求項9] 請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のタンパク質に結合する

，抗体若しくはその免疫反応性断片，又はアプタマー，あるいは，請求項４又は請求項５に記載の核酸分子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマー。

[請求項10] 請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のタンパク質の細胞外電子移動作用を阻害する作用を有する，請求項９に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡ。

[請求項11] 請求項１０に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡを含有する組成物。

[請求項12] 金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を同定することを含む，金属材料の腐食原因タンパク質の決定方法。

[請求項13] 前記電子伝達酵素の同定が，電子伝達反応中心を有するタンパク質を決定することにより行われる，請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 前記電子伝達酵素の選択が，配列番号２，４，６，８，１０，１２，１４，１６及び１８から選択される１つの配列に記載のアミノ酸配列と８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質を選択することにより行われる，請求項１２に記載の方法。

[請求項15] 請求項１２～１４の方法により金属材料の腐食原因タンパク質として決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造することを含む，腐食防止剤の製造方法。

[請求項16] 請求項１２～１４の方法により金属材料の表面に存在する菌の細胞表面タンパク質から電子伝達酵素を同定すること，及び

決定された電子伝達酵素に結合する抗体若しくはその免疫反応性断片又はアプタマー，あるいは該電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを製造するこ

とを含む，腐食防止剤の製造方法。

[請求項17] 金属材料の表面に存在する菌における当該電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法。

[請求項18] 電子伝達酵素が請求項１～３のいずれか１項に記載のタンパク質である，請求項１７に記載の方法。

[請求項19] 当該電子伝達酵素の機能又は発現を阻害が，負の電位を持つ金属材料の電位を－０．３２Ｖ　ｖｓ．ＳＨＥ以上にして細菌の電子を引く抜く代謝を止めることにより行われる，請求項１７に記載の方法。

[請求項20] 請求項１１に記載の組成物を金属材料の表面に接触させることを含む，請求項１８に記載の方法。

[請求項21] 請求項１５又は請求項１６に記載の製造方法により製造された抗体又はアプタマーを金属材料の表面に接触させることを含む，請求項１７に記載の方法。

[請求項22] 金属材料の表面に存在する菌から電子伝達酵素を同定すること，及び，

同定された金属材料の表面に存在する菌における電子伝達酵素の機能又は発現を阻害することを含む，金属材料の腐食の防止方法。

[請求項23] 外部環境に設置された金属材料の腐食防止方法であって，

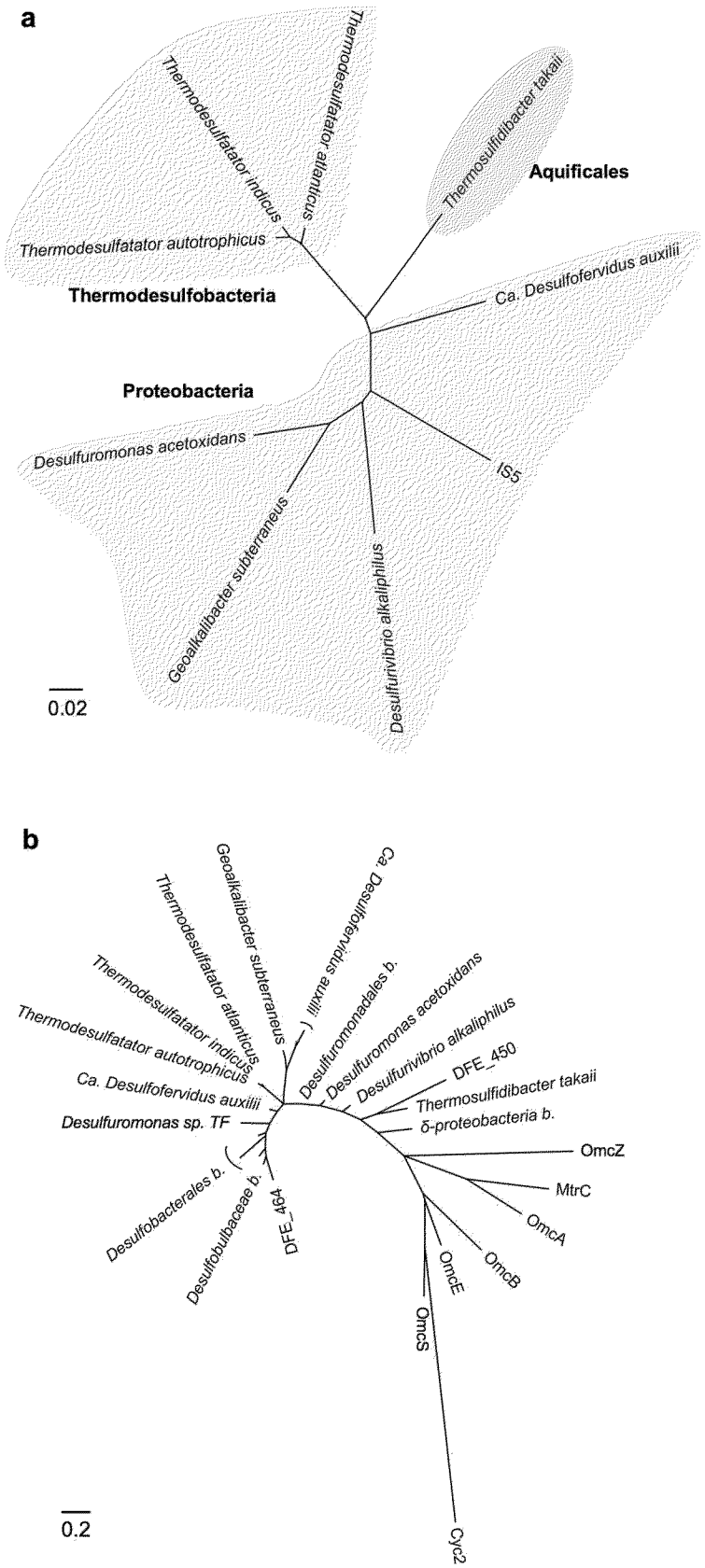
外部環境から細胞表面酵素をもつ細菌を含む試料を採取すること，

該試料中に存在する細胞表面電子伝達酵素を同定すること，

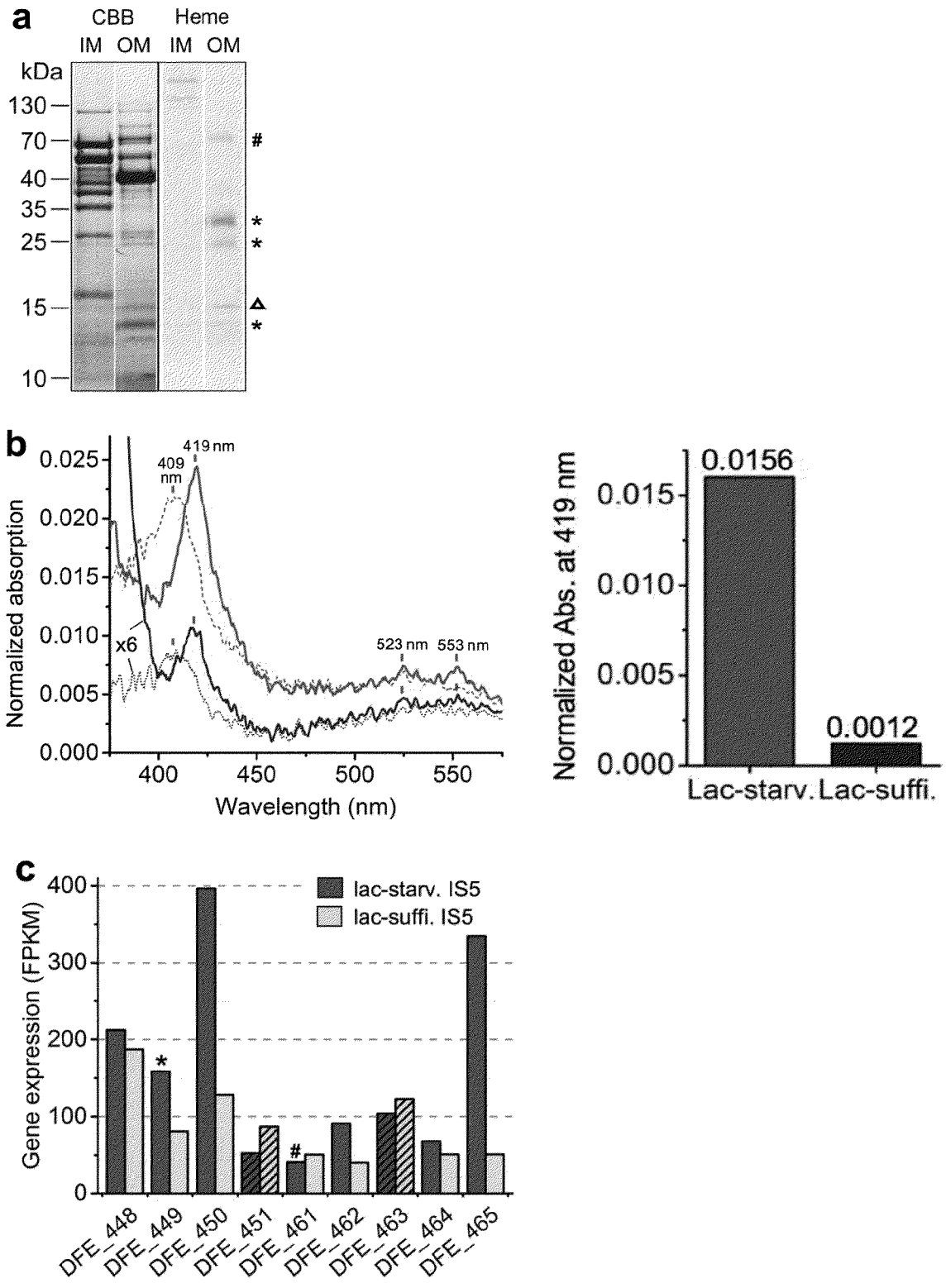
前記細胞表面電子伝達酵素に結合する抗体又はその免疫反応断性片又はアプタマー，あるいは前記細胞表面電子伝達酵素をコードする遺伝子と結合するアンチセンス核酸，ｄｓＲＮＡ，又はアプタマーを調製すること，

前記抗体，アプタマー，アンチセンス核酸，又はｄｓＲＮＡを配管に流通させることを有する，金属材料の防食方法。

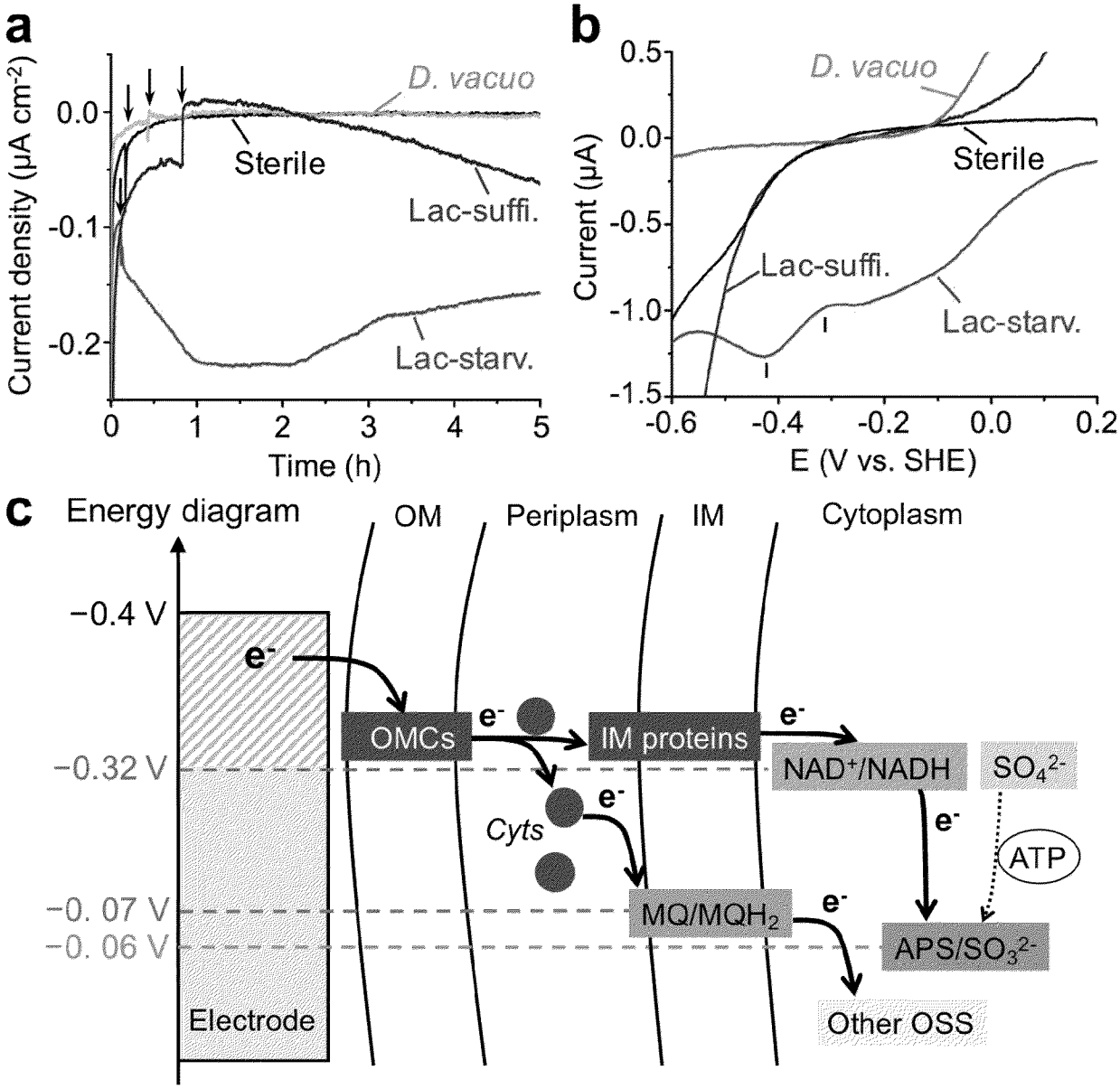
[図1]


a
Thermodesulfatator indicus
Thermodesulfatator autotrophicus
Thermodesulfatator atlanticus
Thermosulfidibacter takaii
Aquificales
Thermodesulfobacteria
Ca. Desulfofervidus auxilii
Proteobacteria
Desulfuromonas acetoxidans
Geoalkalibacter subterraneus
Desulfurivibrio alkaliphilus
IS5
0.02
b
Geoalkalibacter subterraneus
Thermodesulfatator atlanticus
Thermodesulfatator indicus
Thermodesulfatator autotrophicus
Ca. Desulfofervidus auxilii
Desulfuromonas sp. TF
Desulfobacterales b.
Desulfobulbaceae b.
DFE_464
Ca. Desulfofervidus auxilii
Desulfuromonadales b.
Desulfuromonas acetoxidans
Desulfurivibrio alkaliphilus
DFE_450
Thermosulfidibacter takaii
δ-proteobacteria b.
OmcZ
MtrC
OmcA
OmcB
OmcE
OmcS
Cyc2
0.2

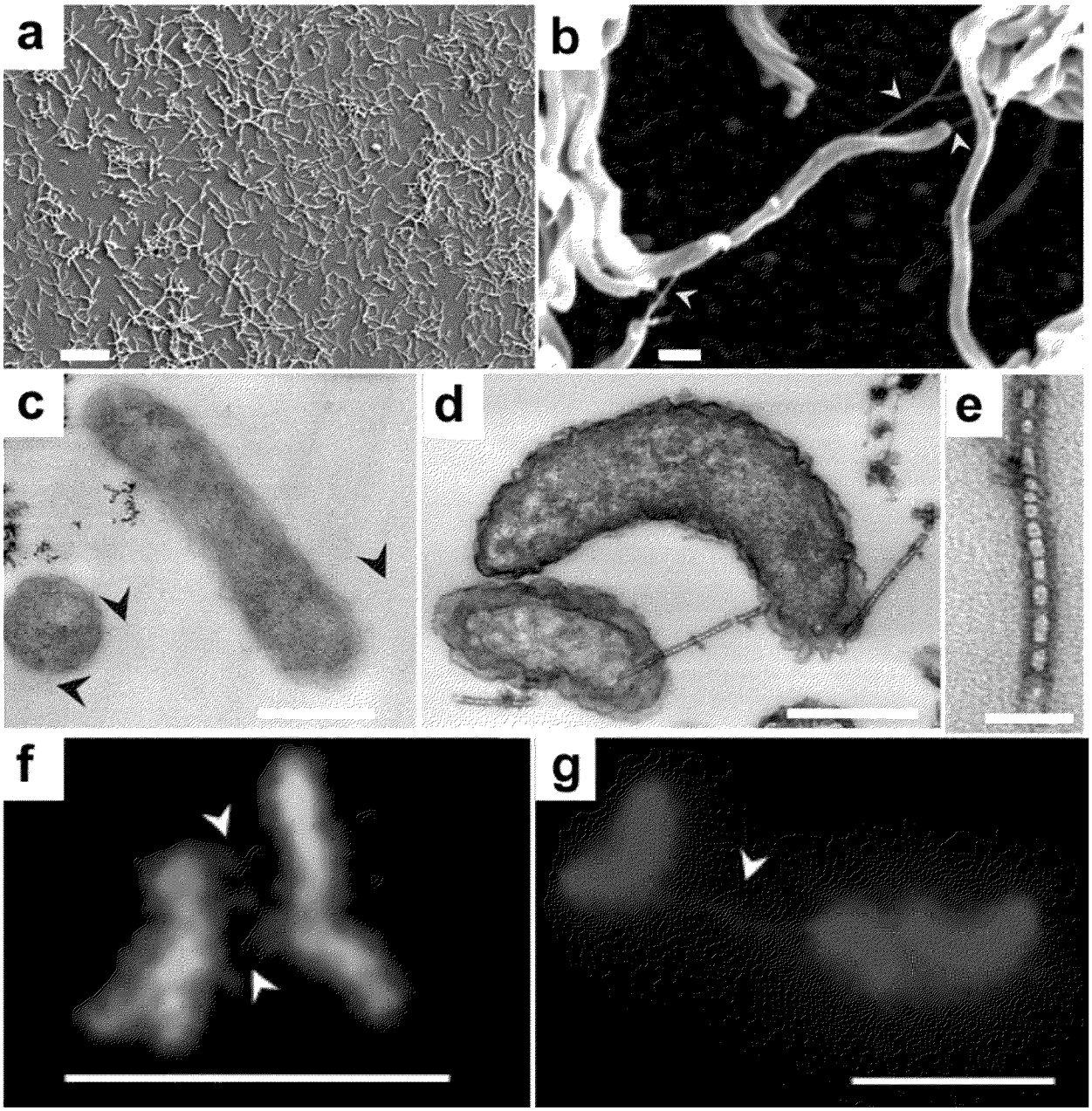
[図2]


a
CBB
Heme
IM OM IM OM
kDa
130
70
40
35
25
15
10
#
*
*
△
*
b
Normalized absorption
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
419 nm
409 nm
x6
523 nm
553 nm
400
450
500
550
Wavelength (nm)
Normalized Abs. at 419 nm
0.0156
0.0012
Lac-starv.
Lac-suffi.
c
Gene expression (FPKM)
400
300
200
100
0
lac-starv. IS5
lac-suffi. IS5
*
#
DFE_448
DFE_449
DFE_450
DFE_451
DFE_461
DFE_462
DFE_463
DFE_464
DFE_465

[図3]


a
Current density (μA cm-2)
0.0
-0.1
-0.2
D. vacuo
Sterile
Lac-suffi.
Lac-starv.
0
1
2
3
4
5
Time (h)
b
Current (μA)
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
D. vacuo
Sterile
Lac-suffi.
Lac-starv.
-0.6
-0.4
-0.2
0.0
0.2
E (V vs. SHE)
c
Energy diagram
OM
Periplasm
IM
Cytoplasm
−0.4 V
−0.32 V
−0. 07 V
−0. 06 V
e-
OMCs
IM proteins
Cyts
NAD+/NADH
SO4 2-
ATP
MQ/MQH2
APS/SO3 2-
Other OSS
Electrode

[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. [see extra sheet]

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl. C12N9/02, C07K14/195, C07K16/28, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/113, C12N15/115, C12N15/31, C12N15/53, C12N15/63, C12P21/02, C23F11/14, C23F11/167

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019
Registered utility model specifications of Japan 1996-2019
Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, MEDLINE (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	「鉄腐食の原因菌が電子を引き抜く酵素を持つことを証明～酵素を標的とした薬剤など環境負荷の低い防食対策への展開に期待～」, Press Release [online], INTERNET, 国立研究開発法人 物質・材料研究機構, 14 February 2018 [retrieved: 15 April 2019], https://www.nims.go.jp/news/press/2018/02/hdfqf1000009hdu9-att/p201802170.pdf, in particular, summary (Iron-Corroding Bacteria Shown to Possess Enzymes Enabling them to Extract Electrons from Extracellular Solids: Discovery May Facilitate the Development of Environmental-Friendly Anti-biocorrosion Measures, Such as Enzyme-Targeted Chemicals. National Institute for Materials Science.)	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15.04.2019	23.04.2019
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DENG, X. et al., "Multi-heme cytochromes provide a pathway for survival in energy-1imited environments.", SCIENCE ADVANCES [online], INTERNET, vol. 4, no. 2, 16 February 2018, eaao5682(pp. 1-8, Supplementary Materia1), [retrieved on: 15 April 2019], DOI: 10.1126/sciadv.aao5682, in particular, abstract, fig. 1-4	1-23
X Y	DENG, X. et al., "Electron extraction from an extracellular electrode by Desulfovibrio ferrophilus strain IS5 without using hydrogen as an electron carrier.", ELECTROCHEMISTRY, 05 July 2015, vol. 83, no. 7, pp. 529-5531, DOI: 10.5796/electrochemistry. 83.529, in particular, abstract, page 531, fig. 2-3	12-13, 15-23 1-23
X Y	OKAMOTO, A. et al., "Cation-limited kinetic model for microbial extracellular electron transport via an outer membrane cytochrome C complex.", BIOPHYSICS AND PHYSICOBIOLOGY, 2016, vol. 13, pp. 71-76, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_71, in particular, abstract	12-13, 15-23 1-23
X Y	DENG, X. et al., "Iron corrosive sulfate reducing bacteria uptake extracellular electrons via outer membrane c-type cytochromes.", ECS MEETING ABSTRACT 2016, 04 October 2016, vol. 44, 3245, [online], INTERNET, [retrieved on: 15 April 2019], http:// ma.ecsdl.org/content/MA2016-02/44/3245, in particular, abstract	1-14 1-23
X Y	DENG, Xiao et al. “Electron uptake of sulfate reducing bacteria by using outer-membrane cytochromes”. 日本微生物生態学会第 30 回土浦大会, October 2015, vol. 30, OE-25, [online], INTERNET, [retrieved: 15 April 2019], http://www.microbial-ecology.jp/meeting/?p=2716, in particular, main text, lines 1-17 (2015 JSME annual meeting & 7th JTK symposium.)	1-14 1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	DENG, Xiao et al. “Desulfovibrio ferrophilus strain IS5 extracts electrons from solid compounds by outer membrane c-type cytochromes”. 日本化学会第95春季年会(2015)講演予稿集 III, 11 March 2015, p. 853, 2JF-16, in particular, main text, lines 1-22 (The 95th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan.)	1-14 1-23
X Y	DENG, X. et al., "Uniquely small outer membrane cytochrome-c as a possible electron carrier for direct electron uptake in a sulfate reducing bacterium.", Biophysics, August 2015, vol. 55, supplement 1-2, p. S218, column 2N1410, [online], INTERNET, [retrieved on: 15 April 2019], https://doi,org/10.2142/biophys.55.1, in particular, lines 1-10	1-14 1-23
A	MYERS, J. M., et al., "Isolation and sequence of omcA, a gene encoding a decaheme outer membrane cytochrome c of Shewanella putrefaciens MR-1, and detection of omcA homologs in other strains of S. putrefaciens.", BIOCHIMICA ET BIOPHYSlCA ACTA, 1998, vol. 1373, pp. 237-251	1-23
A	INOUE, K. et al., "Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme c-type cytochrome essential for optimal current production by Geobacter sulfurreducens.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2010, vol. 76, no. 12, pp. 3999-4007, DOI: 10.1128/AEM.00027 10	1-23
P, X	DENG, X. et al., "Electrode potential dependency of single-cell activity identifies the energetics of slow microbial electron uptake process.", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY [online], 13 November 2018, vol. 9, article 2744 (pp. 1-8), INTERNET, DOI: 10.3389/fmicb.2018.02744	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[see extra sheet]

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

[Continuation of Box A]

C12N9/02(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12N15/31(2006.01)i, C12N15/53(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C23F11/14(2006.01)i, C23F11/167(2006.01)i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/003606

[Continuation of Box No. III]

Claims 1-11 set forth an invention (invention groups 1-9 for respective proteins) related to a plurality of proteins. Claims 12-14 set forth an invention (invention group 10) pertaining to a method for determining a causative protein of corrosion of a metallic material. Claims 15-16 set forth an invention (invention group 11) pertaining to a method for producing a corrosion inhibitor. Claims 17-23 set forth an invention (invention group 12) pertaining to a method for preventing corrosion of a metallic material. However, proteins that are derived from D. ferrophilus IS5 and are related to corrosion of metallic materials were already known prior to the priority date of the present application. This technical feature does not make a contribution over the prior art, and thus this technical feature cannot be said to be a special technical feature. Moreover, no other identical or corresponding special technical feature exists between these invention groups. As such, these invention groups cannot be classified as a single invention, and the present application is considered to encompass 12 invention groups.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／００３６０６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/02, C07K14/195, C07K16/28, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/113, C12N15/115, C12N15/31, C12N15/53, C12N15/63, C12P21/02, C23F11/14, C23F11/167

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, MEDLINE (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	「鉄腐食の原因菌が電子を引き抜く酵素を持つことを証明～酵素を標的とした薬剤など環境負荷の低い防食対策への展開に期待～」，プレスリリース [online]，INTERNET，国立研究開発法人 物質・材料研究機構，2018.02.14，[検索日：2019年4月15日]，https://www.nims.go.jp/news/press/2018/02/hdfqf1000009hdu9-att/p201802170.pdf，特に概要欄	1-23

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１５．０４．２０１９	２３．０４．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５
野村　英雄
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	DENG, X., et al., "Multi-heme cytochromes provide a pathway for survival in energy-limited environments.", SCIENCE ADVANCES [online], INTERNET, Vol.4, No.2, 2018.02.16, eaao5682(pp.1-8, Supplementary Material), [検索日：2019年4月15日], DOI: 10.1126/sciadv.aao5682, 特にAbstract, 図1-4	1-23
X Y	DENG, X., et al., "Electron extraction from an extracellular electrode by Desulfovibrio ferrophilus strain IS5 without using hydrogen as an electron carrier.", ELECTROCHEMISTRY, 2015.07.05, Vol.83, No.7, pp.529-5531, DOI: 10.5796/electrochemistry.83.529, 特にAbstract, 531頁, 図2-3	12-13,15-23 1-23
X Y	OKAMOTO, A., et al., "Cation-limited kinetic model for microbial extracellular electron transport via an outer membrane cytochrome C complex.", BIOPHYSICS AND PHYSICOBIOLOGY, 2016, Vol.13, pp.71-76, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_71, 特にAbstract	12-13,15-23 1-23
X Y	DENG, X., et al., "Iron corrosive sulfate reducing bacteria uptake extracellular electrons via outer membrane c-type cytochromes.", ECS MEETING ABSTRACT 2016, 2016.10.04, Vol.44, 3245, [online], INTERNET, [検索日：2019年4月15日], http://ma.ecsdl.org/content/MA2016- 02/44/3245, 特にAbstract	1-14 1-23
X Y	DENG, X., et al., "Electron uptake of sulfate reducing bacteria by using outer-membrane cytochromes.", 日本微生物生態学会第30回土浦大会, 2015.10, Vol.30, OE-25, [online], INTERNET, [検索日：2019年4月15日], http://www.microbial-ecology.jp/meeting/?p=2716, 特に本文1-17行	1-14 1-23
X Y	DENG, X., et al., "Desulfovibrio ferrophilus strain IS5 extracts electrons from solid compounds by outer membrane c-type cytochromes.", 日本化学会第95春季年会(2015)講演予稿集III, 2015.03.11, p.853, 2 J4-16欄, 特に本文1-22行	1-14 1-23
X Y	DENG, X., et al., "Uniquely small outer membrane cytochrome-c as a possible electron carrier for direct electron uptake in a sulfate reducing bacterium.", 生物物理, 2015.08, Vol.55, Supplement 1-2, p.S218, 2N1410欄, [online], INTERNET, [検索日：2019年4月15日], https://doi.org/10.2142/biophys.55.1, 特に本文1-10行	1-14 1-23

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	MYERS, J.M., et al., "Isolation and sequence of omcA, a gene encoding a decaheme outer membrane cytochrome c of Shewanella putrefaciens MR-1, and detection of omcA homologs in other strains of S. putrefaciens.", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1998, Vol.1373, pp.237-251	1-23
A	INOUE, K., et al., "Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme c-type cytochrome essential for optimal current production by Geobacter sulfurreducens.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2010.06, Vol.76, No.12, pp.3999-4007, DOI: 10.1128/AEM.00027-10	1-23
P, X	DENG, X., et al., "Electrode potential dependency of single-cell activity identifies the energetics of slow microbial electron uptake process.", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY [online], 2018.11.13, Vol.9, Article 2744 (pp.1-8), INTERNET, DOI: 10.3389/fmicb.2018.02744	1-23

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／００３６０６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項１－１１には、複数のタンパク質に関連する発明（各タンパク質ごとの発明群１－９）が記載されており、請求項１２－１４には、金属材料の腐食原因タンパク質の決定方法に関する発明（発明群１０）が記載されており、請求項１５－１６には、腐食防止剤の製造方法に関する発明（発明群１１）が記載されており、請求項１７－２３には、金属材料の腐食の防止方法に関する発明（発明群１２）が記載されている。しかしながら、Ｄ．ｆｅｒｒｏｐｈｉｌｕｓ　ＩＳ５に由来し、金属材料の腐食に関連するタンパク質は、本願優先日前に既に知られており、当該技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明群の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。したがって、これら発明群は一つの発明に区分できず、本願には１２の発明群が含まれていると認められる。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類
C12N9/02(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12N15/31(2006.01)i, C12N15/53(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C23F11/14(2006.01)i, C23F11/167(2006.01)i