

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7514918号
(P7514918)

(45)発行日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(24)登録日 令和6年7月3日(2024.7.3)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A Z N A
C 1 2 P	1/04 (2006.01)	C 1 2 P	1/04	Z
C 1 2 P	21/00 (2006.01)	C 1 2 P	21/00	A
A 2 3 L	33/195 (2016.01)	C 1 2 P	21/00	B
C 1 2 R	1/01 (2006.01)	A 2 3 L	33/195	
請求項の数 10 (全38頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-519493(P2022-519493)	(73)特許権者	522120255	
(86)(22)出願日	令和2年10月22日(2020.10.22)		ソーラー フーズ オサケユイチア	
(65)公表番号	特表2023-500430(P2023-500430 A)		フィンランド国 5 3 8 5 0 , ラッペー	
			ンランタ ラザーカトゥ 6	
(43)公表日	令和5年1月6日(2023.1.6)	(74)代理人	100145849	
(86)国際出願番号	PCT/FI2020/050699		弁理士 井澤 真樹子	
(87)国際公開番号	WO2021/084159	(72)発明者	サミ ホルムストローム	
(87)国際公開日	令和3年5月6日(2021.5.6)		フィンランド国 0 2 6 6 0 , エスポー	
審査請求日	令和4年5月23日(2022.5.23)		ヴァルスミエヘンティエ 1 3 ベー ア	
(31)優先権主張番号	19205786.7		ーエス 2	
(32)優先日	令和1年10月29日(2019.10.29)	(72)発明者	ユハ ベッカ ピットカエーネン	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		フィンランド国 0 1 6 4 0 , ヴァンタ	
微生物の受託番号	VTTCC VTT E-193585	審査官	アー ヴィーカテティエ 4 3 アー	
前置審査			大久保 智之	
最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 菌株、及び、単一細胞タンパク質又はバイオマス生産のための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオマスの生産方法であって、
単離された細菌株VTT-E-193585を培養することであって、
前記培養は、エネルギー源としての水素と無機炭素源とを用いた連続培養において細菌
株を培養することを含み、前記無機炭素源は二酸化炭素を含み、
さらに、培養中に生産されたバイオマスの収穫の工程と、選択的に、バイオマスの乾燥
の工程とを含む方法。

【請求項 2】

前記培養での培養物における溶存酸素が、5%と10%の間に維持される請求項 1 に記載の
方法。

【請求項 3】

アンモニウム、尿素及び/又は硝酸塩が窒素源として使用される請求項 1 又は 2 に記載の
方法。

【請求項 4】

培養培地はミネラルを含み、
前記ミネラルは、1g/L未満の塩化物塩を含み、又は塩化物塩を含まない請求項 1 乃至 3
のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養培地は、ビタミン類を含まない請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記培養物の pH は、5.5 と 8.0 の間に維持される請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記培養物は、25 と 40 の間の温度で育成される請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細菌株は、0.04 ~ 0.12 / 時間で育成される請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

単離された細菌株 VTT-E-193585 を培養することを含み、さらに、
培養中に生産されたバイオマスの収穫の工程と、選択的に、バイオマスの乾燥の工程と、
前記バイオマスからのタンパクの単離の工程であって、タンパク質画分と非タンパク質
成分を含む画分が得られる工程と、
前記タンパク質画分、又は前記非タンパク質成分を含む画分から、食品を製造するさら
なる工程と、を含む食品を製造する方法。

【請求項 10】

前記培養は、エネルギー源としての水素と無機炭素源とを用いた連続培養において細菌
株を培養し、前記無機炭素源は二酸化炭素を含み、
アンモニウム、尿素及び/又は硝酸が窒素源として使用される請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物を使用するタンパク質及び/又は他の高分子の生産に関する。特に、本発明は、ガス及びミネラルが細胞に供給される、細菌を使用してタンパク質又はバイオマスを生産するための新規の細菌株及び連続培養方法に関する。本発明は又、食べ物や飼料等のこれらの方法の製品、及び、これらの製品の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

世界人口の増加、気候変動及び水不足は、伝統的な農業、及び、食糧と飼料の十分な供給にますます脅威をもたらしている。そのため、タンパク質などの有機分子の代替供給源が研究されている。潜在的な代替は、単一細胞生産、すなわち微生物を使用したタンパク質及び/又は他の高分子の生産である。

【0003】

エネルギー源として水素ガスを、及び、唯一の炭素源として二酸化炭素を用いた最小限のミネラル培地で増殖することができる化学合成独立栄養微生物が示されてきた。これらの微生物のレビューについては、例えば、「Shively et al. (1998) Annu Rev Microbiol 52:191」が参照できる。特許出願 WO2018144965 は、ガス状基質を高タンパク質バイオマスに変換するための様々な微生物及びバイオプロセスを記載している。「Andersen et al. (1979) Biochim Biophys Acta 585:1-11」は、従属栄養及び独立栄養条件下で容易に増殖する水素細菌である *Alcaligenes eutrophus* の変異株について記載している。リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (ルビスコ) 活性が変化した変異体の特質が説明されている。「Ohmiya et al. (2003) J. Biosci. Bioeng. 95:549-561」は、扱いにくいバイオマス利用への微生物遺伝子の適用を示している。「Yu Jian et al. (2013) Int J Hydrogen Ener 38:8683-8690」は、水素酸化細菌分離株による二酸化炭素の固定について記載している。中程度の酸素濃度 (10 mol%) で、50% という高エネルギー効率が測定された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】国際公開 WO 2 0 1 8 / 1 4 4 9 6 5 号公報

【非特許文献】

【0005】

【文献】Shivelyetal (1998) Annu Rev Microbiol 52 : 191

【文献】Andersenetal (1979) Biochim Biophys Acta 585 : 1-11

【文献】Ohmiya et al. (2003) J. Biosci. Bioeng. 95:549-561

【文献】Yu Jianetal (2013) Int J Hydrogen Ener 38 : 8683-8690

【発明の概要】

【0006】

しかしながら、さまざまな化学合成独立栄養微生物は、増殖速度、収量、バイオマス組成、及び食品成分としての使用に関連する特性、例えば、人間の消費における安全性、味、匂い、口当たり、調理における技術的及び機能的特性等の点で異なる特性を持っている。すべての化学合成独立栄養微生物が十分な速度を持ち、十分な収量を供給するわけではなく、すべてのプロセスが経済的に実行可能なラージスケールプロセスに現実的にアップスケールできるわけではない。機能性タンパク質の十分な産生を得るために、例えば、食品や飼料の用途では、ラージスケールで大規模に実行できる適切な生産物と適切なプロセスを見出すことが重要である。このニーズは、本発明によって対処される。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

第1の主要な態様において、本発明は、単離された細菌株VTT-E-193585又はその誘導体に関する。

20

【0008】

さらなる態様において、本発明は、本発明の細菌株又はその誘導体を含む培養組成物に関する。さらに、本発明は、バイオマス及び/又はタンパク質の生産のための方法に関し、前記方法は、本発明の細菌株又はその誘導体を培養することを含む。

【0009】

さらなる態様において、本発明は、バイオマス及び/又はタンパク質の生産のための方法に関し、前記方法は、エネルギー源としての水素及び無機炭素源を用いて連続培養においてキサントバクテラ(Xanthobacter)属の細菌株を培養することを含み、前記無機炭素源は二酸化炭素を含む。

30

【0010】

さらなる主要な態様において、本発明は、本発明の方法によって得られる又は得られうる大容量のタンパク質、バイオマス又は非タンパク質の細胞又は化学成分、並びに本発明の方法によって得られる又は得られうる食品又は飼料製品に関する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は600nmで測定された光学密度(黒丸)及びVTT-E-193585として寄託された単離細菌株の化学合成独立栄養生物200 L培養中の光学密度プロープの読み取り値を示す。

【図2】図2はさまざまな窒素源においてVTT-E-193585として寄託された単離細菌株の化学合成独立栄養生物200mLの並行培養中に600nmで測定された光学密度を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

[定義]

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語、例えば、菌株の文脈では、それが自然環境から分離されていることを意味する。好ましくは、単離された菌株は純粋であり、すなわち他の菌株を含まない。

【0013】

「誘導体」という用語は、本明細書において菌株の文脈で使用される場合、参照株から誘導される、すなわち、開始点として参照株を使用して生成される菌株を指す。例えば、

50

遺伝子操作された、あるいは突然変異した、又は遺伝子改変された菌株は、そのような誘導体の実施形態である。遺伝子改変には、点突然変異、ならびに遺伝子座全体又はその断片の挿入又は欠失を含む挿入又は欠失が含まれる。誘導体は、好ましくは、参照株と比較して、4、3、2、又は1等の5未満等の10未満の遺伝子改変を有する。

【0014】

本明細書で使用される場合、名詞「培養物」は、液体培地中の生細胞の懸濁液を指す。

【0015】

用語「バイオマス」は、細菌発酵の分野における通常の意味を持ち、細胞材料を指す。

【0016】

本明細書で使用される場合、用語「連続培養」は、新鮮な培地が培養物に連続的に添加され、細菌培養物を含む培地が本質的に同じ速度で連続的に除去される培養プロセスを指す。

10

【0017】

[発明の概要と実施例]

第1の主要な態様において、本発明は、単離された細菌株VTT-E-193585又はその誘導体に関する。

【0018】

VTT-E-193585株は、フィンランドのナーンタリにあるバルト海の海岸から単離された。この生物は、限られた酸素条件で、エネルギー源として水素を、炭素源として二酸化炭素を含む最小限のミネラルの培地を使用して、適切なバイオリクター条件で成長することができる。

20

16Sシーケンシングとイルミナメタゲノミクスシーケンシングは、この株がキサントバクター属に属するものである可能性が最も高いことを示しているが、既知の種ではない。

乾燥細胞粉末はタンパク質含有量が高く、すべての必須アミノ酸を含んでいるため、細菌株は食品や飼料の用途に非常に適している。

また、飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸が多く、高レベルのビタミンB群が含まれている。アレルギーや毒性を引き起こす可能性のあるペプチドグリカンやリボ多糖のレベルは低い。

毒性分析が実施され、その菌株について遺伝子毒性又は細胞毒性は見られなかった。さらに、この菌株は一般的に抗生物質に対する感受性を有する。

30

【0019】

菌株VTT-E-193585 (SoF1) は、2019年6月11日に、ブダペスト条約に基づく国際寄託機関であるフィンランドのVTT技術研究センター(VTT Technical Research Centre of Finland Ltd、PO Box 1000、FI-02044 VTT、フィンランド)のVTTカルチャーコレクションに寄託された。

菌株の特徴及び菌株を培養するための方法に関するさらなる情報は、本明細書の実施例に示されている。

【0020】

好ましい実施形態において、菌株がVTT-E-193585株の誘導体である場合、その誘導体は、エネルギー源として水素ガスを使用し、唯一の炭素源として二酸化炭素を使用して成長する能力を保持している。

40

【0021】

一実施形態では、菌株がVTT-E-193585株の誘導体である場合、その誘導体は、配列番号1に記載の16SリボソームRNA又は配列番号1と最大20ヌクレオチドの相違、例えば、配列番号1と1~10、例えば1~5、例えば、1、2又は3ヌクレオチドの相違等のようなヌクレオチドの相違を有する16SリボソームRNAを含む。

【0022】

[配列番号1 (SEQ ID NO:1) : VTT-E-193585株の16SリボソームRNA]

CTTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGT
CGAGCGCCCAGCAATGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGATGTGCCCAATG

50

GTACGGAATAACCCAGGGAACTTGGACTAATACCGTATGAGCCCTTCGGGGGAAAGAT
TTATCGCCATTGGATCAACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCACCA
AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC
CAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCGCCGGTGAAG
ATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGT
TAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTGATACTGGCGACCT
TGAGTTCGAGAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATGCTAG
CCGTTGGGCAGCTTGCTGTTCACTGGGCGCAGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGA
GTACGGTTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAAATTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGA
TTTCCAGAGATGGATCTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCG
TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTA
GTTGCCAGCATTCACTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GTGGTGACAGTGGGATGCGAAAGGGCGACCTCTAGCAAATCTCCAAAAGCCATCTCAGT
TCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCA
GCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG
TTGGCTTTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCCGCAAGGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGG
TCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC
CTCCTTT

【 0 0 2 3 】

別の態様において、本発明は、本発明の細菌株又はその誘導体を含む培養物に関する。好ましい実施形態では、培養物の容量は100mL以上、例えば1L以上、例えば10L以上、例えば1,000L以上、例えば、10,000L以上、例えば、50,000L以上、例えば100,000L以上、例えば、200,000L以上である。

【 0 0 2 4 】

さらなる態様において、本発明は、バイオマス及び／又はタンパク質の生産のための方法に関する。前記方法は、本発明の細菌株又はそれらの誘導体を培養することを含む。

一実施形態は、バイオマスの生産のための方法である。

別の実施形態は、タンパク質の生産のための方法である。

一実施形態は、方法は、エネルギー源としての水素及び二酸化炭素を含む無機炭素源を用いて、連続培養で菌株を培養することを含む方法である。

さらなる実施形態は、エネルギー源としての水素及び二酸化炭素を含む無機炭素源を用いて連続培養で菌株を培養することを含むバイオマスの生産のための方法である。

方法の様々なさらなる実施形態を本明細書で以下に説明する。

【 0 0 2 5 】

さらなる主な態様において、本発明は、バイオマス及び／又はタンパク質の生産のための方法に関し、前記方法は、エネルギー源としての水素及び二酸化炭素を含む無機炭素源を用いた連続培養においてキサントバクター属の細菌株を培養することを含む。

一実施形態は、バイオマスの生産のための方法である。

別の実施形態では、タンパク質の生産のための方法である。

方法の様々なさらなる実施形態は本明細書で以下に説明する。

【 0 0 2 6 】

ゲノム配列によると、番号VTT-E-193585で寄託された株は、二酸化炭素分子がリブロース1,5-ビスリン酸の5炭素鎖に結合し、グリセリン酸3-リン酸の2つの分子を形成する炭素固定に、おそらくカルビン-ベンソン-バッシュム回路を使用する。

10

20

30

40

50

これにより、菌株は成長に必要な他のすべての有機分子を合成することができる。

水素からのエネルギーは、 NAD^+ を還元するヒドロゲナーゼ及び/又は NiFeSe ヒドロゲナーゼを介して細胞に入る可能性が最も高い。

本質的には、それは、水素(H_2)が酸化されて H^+ になり、 NAD^+ が還元されて NADH になるレドックス反応である。ATPに加えて、 NADH は生体内の主要なエネルギー担体の1つである。

あるいは、他のエネルギー等価物は、 H_2 を使用する別のヒドロゲナーゼ酵素によって還元される。

カルビン-ベンソン-バッシェム回路は、 CO_2 を固定するためにATP及び $\text{NADH}/\text{NADP H}$ の形でエネルギーを必要とする。

この株は、酸化的リン酸化によってATPを生成する可能性が最も高く、これは、膜を隔てたプロトン濃度勾配を生成する4つのタンパク質複合体で構成されている。

プロトン濃度勾配は、主に NADH からのエネルギーを使用して生成される。プロトン濃度勾配はATP合成酵素複合体を駆動してATPを生成する。ゲノム配列によると、この菌株は細菌のF型ATP合成酵素を持っている。

【0027】

方法が無機炭素源を用いて菌株を培養することを含むことに特定される場合、無機炭素源が培養物の主要な炭素源であることが理解されるべきである。

従って、培養物中に少量の有機炭素源が存在する可能性があるが、培養物の主な代謝及び成長は、炭素源としての無機炭素源、好ましくは二酸化炭素の利用に基づいている。

好ましくは、有機物である培養物に供給される炭素の割合は、方法中に培養物に供給されるすべての炭素の5%未満、例えば、1%未満、例えば0.1%未満である。好ましくは、有機炭素源は方法に供給されない。

【0028】

同様に、方法がエネルギー源として水素(H_2)を用いて菌株を培養することを含むことが特定される場合、水素が培養における主要なエネルギー源であることが理解されるべきである。

従って、窒素源として供給される可能性のあるアンモニアや少量の有機化合物など、培養物に存在する他の少量のエネルギー源が存在する可能性があるが、培養物の主な代謝と成長は、エネルギーとしての水素の利用に基づいている。

方法全体において、水素は水電解によって生成されることが好ましく、すなわち、電気で水を水素ガスと酸素ガスに分解する。よって、水素ガスと酸素ガスは、近くの電解槽からバイオリアクターに供給される。あるいは、電極をバイオリアクター内に配置して、別個の電解槽ではなく、バイオリアクター内で水素と酸素を生成することもできる。

【0029】

二酸化炭素を含む無機炭素源は、一酸化炭素等の他の無機炭素源を含み得る。一実施形態では、ガス状の炭素源のみが培養物に供給される。好ましい実施形態では、二酸化炭素が培養物に供給される唯一の無機炭素源であり、実際に唯一の炭素源である。

一実施形態では、ガス及びミネラルのみが培養物に供給され、供給されるガス中の二酸化炭素のレベルは、10%から50%の間、例えば15%から45%の間、例えば20%から40%の間、例えば25%から35%の間、例えば26%から30%の間である。

【0030】

別の実施形態では、ガス及びミネラルが培養物に供給され、供給されるガス中の水素(H_2)のレベルは、30%から80%の間、例えば35%から75%の間、例えば40%から70%の間、例えば45%から65%の間、例えば50%から60%の間である。

【0031】

別の実施形態では、ガス及びミネラルが培養物に供給され、供給されるガス中の酸素(O_2)のレベルは、10%から25%の間、例えば15%から20%の間、例えば16%から18%の間である。

別の実施形態では、供給される酸素のレベルは、培養物中の溶存酸素のレベルが5%から

10

20

30

40

50

10%の間に維持されるようなレベルである。

【0032】

好ましい実施形態では、ガス及びミネラルのみが培養物に供給され、供給されるガスは、 H_2 、 CO_2 及び O_2 を含み、 H_2 のパーセンテージは40%から70%の間、 CO_2 のパーセンテージは18%から28%の間、 O_2 の割合は12%から22%の間である。

【0033】

典型的には、本発明の方法は、窒素源の添加を含む。窒素源は、例えば、水酸化アンモニウム、硫酸アンモニウム又は塩化アンモニウムなどのアンモニウム塩、アンモニア、尿素又は硝酸カリウム等の硝酸塩の形態で供給され得る。他の実施形態では、窒素ガス(N_2)が窒素源として供給される。好ましい実施形態では、窒素源は、水酸化アンモニウム又は硫酸アンモニウムなどのアンモニウム塩である。

10

【0034】

一実施形態では、供給される窒素源は、100mg/Lから10g/Lの間、例えば250mg/Lから4g/Lの間、例えば0.5g/Lから2g/Lの間、例えば0.75g/Lから1.5g/Lの間の濃度の水酸化アンモニウムである。

【0035】

典型的には、本発明の方法は、アンモニウム、リン酸塩、カリウム、ナトリウム、バナジウム、鉄、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、モリブデン、マンガン、ホウ素、亜鉛、コバルト、セレン、ヨウ素、銅及び/又はニッケルを含むミネラル等のミネラルの添加を含む。

20

適切なミネラル媒体は周知技術であり、例えば、「Thermophilic Bacteria CRC Press、フロリダ州ボカトン、Jacob K. Krist jansson編、1992年」の87ページの表4等に記載されている。

【0036】

一実施形態では、添加されるミネラルは、次のものの一又は二以上である。

アンモニア、アンモニウム(例えば、塩化アンモニウム(NH_4Cl)、硫酸アンモニウム($(NH_4)_2SO_4$))、硝酸塩(例えば、硝酸カリウム(KNO_3))、尿素又は有機窒素源;リン酸(例えば、リン酸二ナトリウム(Na_2HPO_4)、リン酸カリウム(KH_2PO_4)、リン酸(H_3PO_4)、二チオリン酸カリウム($K_3PS_2O_2$)、オルトリン酸カリウム(K_3PO_4)、リン酸二ナトリウム($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)リン酸二カリウム(K_2HPO_4)又はリン酸一カリウム(KH_2PO_4));硫酸塩;酵母エキス;キレート鉄(例えば、EDTA又はクエン酸でキレート化);カリウム(例えば、リン酸カリウム(KH_2PO_4)、硝酸カリウム(KNO_3)、ヨウ化カリウム(KI)、臭化カリウム(KBr));及び他の無機塩、ミネラル及び、微量栄養素(例えば、塩化ナトリウム($NaCl$)、硫酸マグネシウム($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)又は塩化マグネシウム($MgCl_2$)、塩化カルシウム($CaCl_2$)、硫酸カルシウム($CaSO_4$)又は炭酸カルシウム($CaCO_3$)、硫酸マンガン($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)又は塩化マンガン($MnCl_2$)、塩化第二鉄($FeCl_2$)、硫酸第一鉄($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)又は塩化第一鉄($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)、重曹($NaHCO_3$)又は炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)、硫酸亜鉛($ZnSO_4$)又は塩化亜鉛($ZnCl_2$)、モリブデン酸アンモニウム(NH_4MoO_4)又はモリブデン酸ナトリウム($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)、硫酸銅($CuSO_4$)又は塩化銅($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)、塩化コバルト($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)又は硫酸コバルト($CoSO_4$)、塩化アルミニウム($AlCl_3 \cdot 6H_2O$)、塩化リチウム($LiCl$)、ホウ酸(H_3BO_3)、塩化ニッケル($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)又は硫酸ニッケル($NiSO_4$)、塩化スズ($SnCl_2 \cdot H_2O$)、塩化バリウム($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)、セレン酸銅($CuSeO_4 \cdot 5H_2O$)、セレン酸ナトリウム(Na_2SeO_4)又は亜セレン酸ナトリウム(Na_2SeO_3)、メタバナジン酸ナトリウム($NaVO_3$)、クロム塩)。

30

40

【0037】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、 NH_4OH 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $NaVO_3 \cdot H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaSO_4$ 、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 H_3BO_3 、 $CoSO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $NiSO_4$ のうちの1つ又は複数又はすべての添加を含む。

50

【 0 0 3 8 】

一実施形態では、細胞に供給される培地は、1g/L未満の塩化物塩、例えば、0.25g/L未満の塩化物塩、例えば0.1g/L未満の塩化物塩、例えば0.025g/L未満の塩化物塩、例えば0.01g/L未満の塩化物塩を含む。一実施形態では、塩化物塩は培養物に供給されない。

【 0 0 3 9 】

別の実施形態では、方法中にビタミンは供給されない。すなわち、培養物に供される培地はビタミンを含まない。

【 0 0 4 0 】

別の実施形態では、方法中にアミノ酸は供給されない。すなわち、培養物に供される培地はアミノ酸を含まない。

10

【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、方法中に有機化合物は供給されない。すなわち、培養物に供される培地は有機化合物を含まない。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態において、細菌培養物のpHは、特定のレベルで制御される。特定の実施形態において、pHは、細菌の維持及び/又は成長、及び/又は有機化合物の生産のための最適範囲内に制御される。一実施形態では、培養物中のpHは、5.5から8.0の間、例えば、6.8等のように6.5から7.0の間に維持される。

【 0 0 4 3 】

特定の実施形態では、細菌培養物の温度が制御される。特定の実施形態において、温度は、細菌の維持及び/又は成長、及び/又は有機化合物の生産のための最適範囲内に制御される。一実施形態では、培養物は、25 から40 の間、例えば、30 °C等の28 °Cから32 °Cの間の温度で増殖される。

20

【 0 0 4 4 】

典型的には、本発明の方法は、バイオリアクター内で実施される。バイオリアクターは細胞の成長曲線の特定の段階で維持されうる細胞の培養に利用される。

バイオリアクターの使用は、化学合成独立栄養成長生物を培養するために多くの点で有利である。一般に、溶存二酸化炭素、酸素、及び水素などの他のガス、ならびに他の溶存栄養素、微量元素、温度及びpHの制御を含む成長条件の制御は、バイオリアクター内で容易になる。

30

栄養培地及びガスは、バッチ添加として又は定期的に、又は検出された枯渇又はプログラムされた設定値に応答して、又は培養物が成長及び/又は維持されている間継続的に、バイオリアクターに添加されうる。連続培養方法では、栄養培地及びガスはバイオリアクターに継続的に添加される。

さらに、バクテリア含有培地は、バイオリアクターから継続的に除去される。

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態において、細菌培養物の容量は、100mL以上、例えば1L以上、10L以上、例えば100L以上、例えば1,000L以上、例えば10,000L以上、例えば50,000L以上、例えば100,000L以上、例えば200,000L以上である。

【 0 0 4 6 】

40

一実施形態では、培養物の生産性は、細胞乾燥重量が0.1gを超える、例えば0.2gを超える、例えば0.3gを超える、例えば0.4gを超える、例えば0.5gを超える、例えば0.6gを超える、例えば0.7gを超える、例えば0.8gを超える、例えば1gを超える等の0.9gを超えるような1時間あたり1リットルあたりの細胞乾燥重量である。

【 0 0 4 7 】

細菌は、細胞バンクから直接接種することも、又は、小規模な種子培養を介して接種することも可能である。好ましくは、培養物への新鮮な培地の供給及び細菌を含む使い切った培地の除去は、バイオリアクター内の容量が同じままであるように、同じ速度で行われる。

【 0 0 4 8 】

50

一実施形態では、適切な細胞密度に到達する初期段階の後、バクテリアは定常状態または疑似定常状態で増殖し、5を超える、例えば50から200の間、例えば50から100の間、例えば10を超える、例えば20を超えるOD₆₀₀において、対数期に継続的に留まる。

【0049】

本発明の方法の一実施形態では、細菌株は、0.04~0.12h⁻¹の増殖速度を有する。

【0050】

本発明の方法の別の実施形態では、連続相における液体供給速度は、成長速度の50~80%である。

【0051】

キサントバクターは、キサントバクター科のグラム陰性菌の属である。

10

【0052】

一実施形態では、本発明の方法で使用されるキサントバクター株は、カルビン - ペンソ - バッシャム回路を使用して二酸化炭素を有機化合物、例えば、生物に不可欠なグルコース等、に変換する株である。

【0053】

一実施形態では、本発明の方法で使用されるキサントバクター株は、水素(H₂)を細胞エネルギー等価物に変換するためにNiFeSeヒドロゲナーゼを使用する株である。

【0054】

一実施形態では、本発明の方法で使用されるキサントバクター株は、水素(H₂)を細胞エネルギー等価物に変換するためにNAD⁺ - 還元ヒドロゲナーゼを使用する株である。

20

【0055】

一実施形態は、窒素固定が可能な本発明の方法で使用されるキサントバクター株である。

【0056】

一実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、*X. agilis*、*X. aminoxidans*、*X. autotrophicus*、*X. flavus*、*X. tagetidis*、*X. viscosus*、*Xanthobacter* sp. 126、*Xanthobacter* sp. 91及びVTT-E-193585株からなる群から選択される。

【0057】

好ましい実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、VTT-E-193585または*X. tagetidis*である。最も好ましくは、本発明の方法で使用される株は、VTT-E-193585である。

30

【0058】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号1に示される16SリボソームRNA、又は配列番号1と最大20ヌクレオチドの相違を有する16SリボソームRNA、例えば、配列番号1と1~10の相違、例えば1~5の相違、例えば、1、2または3ヌクレオチドの相違を有する16SリボソームRNAである。

【0059】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号3に示される配列を有するリブローズ - 1,5 - ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ルビスコ)ラージチェーンをコードする遺伝子、又は配列番号3に示される配列に対して、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう93%超の同一性を有する配列を有する。

40

【0060】

別の実施形態において、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号5に示される配列を有するリブローズ - 1,5 - ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ルビスコ)スモールチェーンをコードする遺伝子、又は配列番号5に示される配列に対して例えば86%超の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう83%超の同一性を有する配列を有する。

【0061】

[配列番号2 (SEQ ID NO:2) : リブローズニリン酸カルボキシラーゼラージチェーンの

50

ATGGGTGCCGAAGCAACCGTCGGGCAGATCACGGACGCCAAGAAGAGATACGCCGCCCG
CGTGCTGAAGTACGCCCAGATGGGCTACTGGAACGGCGACTACGTTCCCAAGGACACCG
ACCTCCTGGCGGTGTTCCGCATCACCCCCCAGGCGGGCGTGGAACCGGTGGAAGCCGCC
GCGGCGGTGCGCGGCGAAAGCTCCACCGCTACCTGGACCGTGGTGTGGACCGACCGGCT
CACCGCCGCCGACGTCTACCGCGCCAAGGCCTACAAGGTGGAGCCGGTGCCGGGCCAGG
AAGGCCAGTATTTCTGCTACATCGCCTATGATCTCGATTTGTTTCGAGGAAGGCTCCATC
GCCAACCTCACGGCGTCGATCATCGGCAACGTCTTCTCCTTCAAGCCGCTGAAGGCGGC
GCGGCTGGAGGACATGCGGCTTCCCGTCGCCTATGTGAAGACCTTCCGCGGCCCGCCCA
CCGGCATCGTGCTCGAGCGCGAGCGCCTGGACAAGTTCGGCCGCCCCCTTCTGGGCGCC
ACCACCAAGCCGAAGCTTGGCCTCTCGGGCAAGAATTACGGCCGCGTGGTCTATGAGGC
CCTCAAGGGCGGCCTCGACTTCGTGAAGGACGACGAGAACATCAACTCGCAGCCCTTCA
TGCACTGGCGCGATCGCTTCTCTATTGCATGGAGGCCGTCAACAAGGCCCAGGCCGAG
ACCGGCGAGGTGAAGGGGCACTATCTCAACATCACCGCCGGGACCATGGAGGAGATGTA
CCGCCGCGCCGAGTTCGCCAAGGAAGTGGGCTCCGTGGTGGTGATGGTGGATCTCATCA
TCGGCTGGACCGCCATCCAGTCCATGTCCAAGTGGTGCCGCGAGAACGACATGATCCTG
CACATGCACCGTGCGGGCCATGGCACCTACACGCGCCAGAAGAGCCACGGCGTCTCCTT
CCGCGTCATCGCCAAGTGGCTGCGGCTCGCCGGCGTCGACCACCTGCACACCGGCACCG
CCGTGGGCAAGCTGGAAGGCGACCCCATGACCGTGCAGGGCTTCTACAATGTCTGCCGC
GAGACGACGACGCAGCAGGACCTCACCCGCGGCCTGTTCTTCGAGCAGGACTGGGGCGG
CATCCGCAAGGTGATGCCGGTGGCCTCCGGCGGCATCCATGCGGGCCAGATGCACCAGC
TCATCGACCTGTTTCGGCGAGGACGTGGTGCTCCAGTTCGGCGGCGGCACCATCGGCCAC
CCGGACGGCATCCAGGCCGGCGCCACCGCCAACCGCGTGCGGCTGGAAACCATGATCCT
CGCCCGCAACGAGGGCCGCGACATCAGGAACGAGGGCCCGGAAATCCTGGTGGAAGCCG
CCAAATGGTGCCGTCCGCTGCGCGCGGCGCTCGATACCTGGGGCGAGGTGACCTTCAAC
TACGCCTCCACCGACACGTCCGATTACGTGCCACCGCGTCCGTTCGCCTGA

[配列番号 3 (SEQ ID NO: 3) : リブロース二リン酸カルボキシラーゼラージチェーンのアミノ酸配列]

MGAEATVGQITDAKKRYAAGVLKYAQMGYWNGDYVPKDTDLLAVFRITPQAGVDPVEA
AAAVAGESSTATWTVVWTDRLTAADVYRAKAYKVEPVPGQEGQYFCYIAYDLDLFEES
IANLTASIIGNVFSFKPLKAARLEDMRLPVAYVKTFRGPPTGIVVERERLDKFGRLLGAT
TKPKLGLSGKNYGRVVYEALKGGLDFVKDDENINSQPFMHWRDRFLYCMEAVNKAQAE
TGEVKGHYLNITAGTMEEMYRRAEFAKELGSAVVVMVDLIIGWTAIQSMSNWCRENDMIL
HMHRAHGHTYTRQKSHGVSFRVIAKWRLLAGVDHLHTGTAVGKLEGDPMTVQGFYNVC
RETTTQQDLTRGLFFEQDWGGIRKVMPPVASGGIHAGQMHQLIDLFGEDVVLQFGGGTIG
HPDGIQAGATANRVALETMILARNEGRDIRNEGPEILVEAAKWCRPLRAALDTWGEVTF
NYASTDTSYVPTASVA

[配列番号 4 (SEQ ID NO: 4) : リブローズ二リン酸カルボキシラーゼスモールチェーンのヌクレオチド配列]

ATGCGCATCACCCAAGGCTCCTTCTCCTTCTGCGGACCTCACCGACACGCAGATCAA
GGCCCAGGTGCAATATTGCCTGGACCAGGGCTGGGCGGTCTCGGTGGAGCACACCGACG
ATCCCCACCCGCGCAACACCTATTGGGAGATGTGGGGCCCGCCCATGTTTCGATCTGCGC
GACGCGGCCGCGGTCTTCGGCGAGATCGAAGCCTGCCGGGCCGCCAATCCCGAGCATT
TGTGCGGGTGAACGCCTTCGATTCCAGCCGCGGATGGGAGACGATCCGCCTGTCTTCA
TCGTTTCAGCGGCCACCGTGGAAGAGGGCTTCCGCCTCGACCGCACCGAAGGCAAGGGC
CGCAACCAGAGCTACGCCATGCGCTACCGGGCGCAGTTCGCGCCGCGCTGA

[配列番号 5 (SEQ ID NO: 5) : リブローズ二リン酸カルボキシラーゼスモールチェーン

のアミノ酸配列]

Amino acid sequence of Ribulose biphosphate carboxylase small chain:

MRITQGSFSFLPDLTDTQIKAQVQYCLDQGWAVSVEHTDDPHRNTYWEMWGPPMFD
LRDAAGVFGEIEACRAANPEHYVRVNAFDSSRGWETIRLSFIVQRPTVEEGFRLDRTEGK
GRNQSYAMRYRAQFAPR

【 0 0 6 5 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号7に示される配列を有するNAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットアルファをコードする遺伝子配列、又は配列番号7に示される配列に対して、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう70%超の同一性を有する配列を含む。

10

【 0 0 6 6 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号9に示される配列を有するNAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットベータをコードする配列、又は配列番号9に示される配列に対して、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう77%超の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 6 7 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号11に示される配列を有するNAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットガンマをコードする遺伝子、又は配列番号11に示される配列に対して、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、99%超の同一性のよう70%超の同一性を有する配列を含む。

20

【 0 0 6 8 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号13に示される配列を有するNAD⁺-還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットデルタをコードする遺伝子、又は配列番号13に示される配列に対して、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう79%超の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 6 9 】

30

[配列番号6 (SEQ ID NO:6) : NAD⁺-還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットアルファのヌクレオチド配列]

ATGATGCCATCTGAGCCGCACGGCGCGGGCATGCCGCCCCACGGGAAGCGGCCGCGGT
TCCACCCCCCAGGAGGTGAGCGCGGTGGTGGCCGAGGTGGTCGCGGATGCCGTGGCAT
CGGTGGGCGGCGCACGCACCCGGCTCATGGACATCGTCCAGCTGGCCCCAGCAGCTCTC
GGCCATCTCTCCGAAGAGACCATGGCGGGCATTGCCGCGCGGCTCGCCATTCCGCCGGT
GGAAGTGGCGGACATGGTGTCTTCTACGCCTTCTGAACCGCGCGCCCAAGGGCCGCT
ACCACATCCGCCTGTGCGCGAGCCCCATCTCGCTGATGAAGGGCGCCGAGGCGGTGGCT
GCCGCCTTCTGCCAGATCCTCGGCATCGCCATGGGCGAGACCTCGCAGGATGGCGACTT
CACCCTGGAATGGACCAACGACATCGGCATGGCCGACCAGGAGCCGGCCGCCCTCGTCA
ACGGCACGGTGATGACGCAGCTCGCGCCCGGCGATGCGGCCATCATCGTCGGCCGGCTG
CGGGCCCATCACGCGCCCAATGCCCTGCCGCTGTTCCCTGGAGCCGGCGTGGCCGGCTC
CGGCCTGCCCCATGCCCGGATCCGCCCCAGCCTGGTGATGCCGGGACAGCTTCTGTTCC
GCGAGGACCACACGACGCCGGGCGCCGGCATCAAGGCGGCACTCGCCCTACCCCGGAC
GAAGTGGTGCAGAAGGTCTCCGCCGCGCGCCTGCGCGGGCGGGGTGGCGCCGGCTTTCC
CACCGGTCTCAAATGGAAGCTCTGCCGCCAGTCGCCCGCCACCACCCGCCATGTGATCT
GCAATGCGGACGAGGGCGAGCCCGGCACCTTCAAGGATCGCGTGCTGCTCACGCAGGCG
CCGCACCTCATGTTTCGACGGCATGACCATCGCCGGCTACGCCTTGGGGGCGCGGGAGGG
CGTGGTCTATCTGCGCGGCGAGTACGCCTATCTGTGGGAGCCTCTGCATGCGGTCCTGC
GCGAGCGCTATGGGCTCGGGCTCGCCGGCGCGAACATCCTGGGACACGCGGGCTTCGAC

40

50

TTCGACATCCGCATCCAGCTGGGCGCCGGCGCCTATATCTGCGGGCGAGGAATCCGCGCT
GGTGAATCGCTGGAAGGCAAGCGCGGCTCGCCCCGCGACCGCCCCCCTTCCCCACCG
TGCGCGGCCATCTCCAGCAGCCCACCGCCGTGGACAATGTGGAGACCTTCGCCTGCGCC
GCCCCGATCCTGGAGGATGGCGTGGAGGCGTTTCGCGGGCATCGGCACGCCCCGAATCCGC
CGGCACGAAGCTCCTCTCGGTGTGCGGGCGATTGCCCGCGCCCCGGCGTGTATGAGGTGC
CCTTCGGCCTCACGGTGAACGCGCTGCTCGACCTTGTGCGCGCGCCGGACGCCGCCTTC
GTGCAGATGGGTGGGCCGTCCGGCCAATGCGTGGCGCCGAAGGATTACGGCCGCCGCAT
CGCCTTCGAGGACCTGCCACCGCGGCTCGGTGATGGTGTTTCGGCCCCGGGGCGCGACG
TGCTCGCCATGGTGCGCGAGTTCGCGGATTTCTTCGCCGGCGAATCCTGCGGCTGGTGC
ACGCCCTGCCGGGTGGGCACACCTTGCTCAAGGAAGAGCTGGACAAGCTCCTCGCCAA
CCGCGCCACCCTCGCCGACATCCGCGCGCTGGAGACCCTGGCCACGACCGTCTCCCGCA
CCAGCCGCTGCGGCCTCGGCCAGACGGCGCCCAACCCCATCCTTTCCACCATGCGCAAC
CTGCCGGAAGCCTATGAGGCGAGGCTGAGGCCCGAAGACTTCCTGCCCTGGGCCTCGCT
CGACGAGGCGCTGAAGCCCGCCATCGTCATCCAGGGCCGCGCGCCCGTGCCGGAGGAAG
AGGCATGA

【 0 0 7 0 】

[配列番号 7 (SEQ ID NO: 7) : NAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットアルファの
アミノ酸配列]

MMPSEPHGAGMPPPREAAVPTPQEVSAVVAEVDADAVASVGGARTRLM DIVQLAQQR
LGHLSEETMAAIAARLAIPPVEVADMVSFYAFLNRAPKGRYHIRLSRSPISLMKGAEAVA
AAFCQILGIAMGETSQDGDFTLEWTNDIGMADQEPAAALVNGTVM TQLAPGDAAIIVGRL
RAHHAPNALPLFPGAGVAGSGLPHARIRPSLVMPGQLLFREDHTTPGAGIKAALALTPDE
VVQKVSAARLRGRGGAGFPTGLKWKLCRQSPATTRHVICNADEGEPTFKDRVLLTQAP
HLMFDGMTIAGYALGAREGVVYLRGEYAYLWEPLHAVLRERYGLGLAGANILGHAGFDF
DIRIQLGAGAYICGEESALVESLEGKRGSPRDRPPFPTVRGHLQQPTAVDNVETFACAARI
LEDGVEAFAGIGTPESAGTKLLSVSGDCPRPGVYEVFPGLTVNALLDLVGAPDAAFVQMG
GPSGQCVAPKDYGRRIAFEDLPTGGSVMVFPGPRDVLAMVREFADFFAGESCGWCTPCR
VGTTLLKEELDKLLANRATLADIRALETATTVSRTSRCGLGQTAPNPILSTMRNLPEAYE
ARLRPEDFLPWASLDEALKPAIVIQGRAPVPEEEA

【 0 0 7 1 】

[配列番号 8 (SEQ ID NO: 8) : NAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットベータのヌ
クレオチド配列]

ATGAGCCGGGGATCCCCGATGCCGGGAAAGACCGCACCATGAGCGCCACCGACGGCAC
CACCGCCCCCGCAAGATCGTCATCGATCCGGTGACCCGCGTGGAGGGCCACGGCAAGG
TCACCATCCGCCTGGATGAAGCCGGCGCGGTGGAGGATGCGCGTTTCCACATCGTGGAG
TTCCGCGGCTTCGAGCGGTTTCATCCAGGGCCGGATGTACTGGGAAGTGCCCTTATCAT
CCAGCGGCTGTGCGGCATCTGCCCGGTGAGCCACCATCTGGCGGCGGCGAAAGCCATGG
ACCAGGTGGCGGGCGTGGACCGCGTACCGCCCACCGCCGAGAACTGCGCCGGCTGATG
CATTATGGGCAGGTGCTGCAATCCAACGCTTTGCACATCTTCCACCTCGCCTCGCCCCGA
CCTCCTGTTTCGGCTTCGACGCGCCGGCCGAGCAGCGCAACATCATCGCCGTGCTCCAGC
GTTATCCGGAGATCGGCAAATGGGCGATCTTCATCAGGAAGTTCGGCCAGGAGGTCATC
AAGGCCACCGGCGGGCGCAAGATCCATCCCACCGAGCGCCATTCCCGGCGGGGTCAACCA
GAACCTCGCCGTGGAGGACCGCGACGCCCTGCGCGCCAAGGTGGGCGAGATCATCAGCT
GGTGCATGGCGGCGCTGGACCATCACAAGGCCTATGTGGCGGAAAACGGGGCGCTGCAT
GACAGCTTCGCCGCCTTCCCCTCCGCCTTCATGAGCCTCGTGGGGCCGGATGGCGGCAT
GGACCTTTATGACGGCACCTGCGGGTGATCGATGCCGAGGGCGCCCCCTCATCGAAG
GCGCGCCGCCCCGCTCCTACCGCGACCACCTCATCGAGGAGGTGCGGCCCTGGAGCTAT
CTGAAATTCCCCCATCTGCGCGCCTTCGGCCGCGACGATGGCTGGTATCGGGTCGGCCC
CCTCGCCCAGGTCAATTGCGCCGCGTCCATCGACACGCCCGCGCCGAGGCGGCCCGGC
GGGACTTCATGGCCGAGGGCGGCGGCAAGCCGGTGCATGCCACCCTCGCTTATCACTGG

10

20

30

40

50

GCGCGGCTCATCGTGCTGGTCCATTGCGCGGAGAAGATCGAACAGCTGCTGTTTCGACGA
CGACCTGCAAGGCTGCGATCTGCGTGCGGAGGGCACCCGGCGCGGGGAAGGCGTCGCCT
GGATCGAGGCGCCGCGCGGCACCCTCATCCACCATTACGAGGTGGACGAGAACGACCAG
GTGCGCCGCGCCAACCTCATCGTCTCCACCACCCACAATAACGAGGCCATGAACCGCGC
CGTGCGGCAGGTGGCGAAGACGGACCTTTCCGGTCGCGAGATCACCGAAGGGCTGCTGA
ACCATATCGAGGTGGCCATCCGCGCCTTCGACCCCTGCCTGTCCTGCGCCACCCATGCG
CTGGGCCAGATGCCGCTGATCGTGACGCTTGAAGATGCCTCCGGCGCAGAGATCGCCCG
CGGAGTGAAGGAATGA

【 0 0 7 2 】

[配列番号 9 (SEQ ID NO: 9) : NAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットベータのアミノ酸配列]

10

MSRGSPDAGKDRTMSATDGTAPRKIVIDPVTRVEGHGKVTIRLDEAGAVEDARFHIVEF
RGFERFIQGRMYWEVPLIIQRLCGICPVSHHLAAAKAMDQVAGVDRVPPTAEKLRRLMH
YGQVLQSNALHIFHLASPDLLFGFDAPAEQRNIIAVLQRYPEIGKWAIFIRKFGQEVIKAT
GGRKIHPTSAIPGGVNQNLAVEDRDALRAKVGEIISWCMAALDHHKAYVAENRALHDSF
AAFPSAFMSLVGPDGGMDLYDGLTRVIDAEGAPLIEGAPPASYRDHLIEEVRPWSYLKFP
HLRAFGRDDGWYRVGPLAQVNCAASIDTPRAEAARRDFMAEGGGKPVHATLAYHWARL
IVLVHCAEKIEQLLFDDDLQGCDLRAEGTRRGEGVAWIEAPRGTLIHHEVDENDQVRR
NLIVSTTHNNEAMNRAVRQVAKTDLSGREITEGLLNHIEVAIRAFDPCLSCATHALGQMP
LIVTLEDASGAEIARGVKE

20

【 0 0 7 3 】

[配列番号10 (SEQ ID NO:10) : NAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットガンマのヌクレオチド配列]

ATGAGCGAGACCCCTTCACCTTTACCGTGACGGCATCGCGGTCCCGGCCACCCCGG
CCAGAGCGTCATCGAGGCGTGCGATGCGGCGGGCATCTATATCCCGCGCCTGTGCCACC
ACCCGGACCTGCCGCCGGCGGGCCATTGCCGGGTGTGCACCTGCATCATCGACGGGCGG
CCGGCCAGCGCCTGCACCATGCCCGCCGCCAGGGGCATGGTGGTGGAGAACGAGACGCC
CGCTTTGCTGGCGGAGCGGCGCACGCTGATCGAGATGCTGTTTCGCGGAAGGCAACCATT
TCTGCCAGTTCTGCGAGGCGAGCGGGCATTGCGAATTGCAGGCGCTGGGCTACCTGTTC
GGCATGGTGGCCCCGCCCTTCCCCCATCTGTGGCCGAAGCGGCCGGTGGATGCCAGCCA
TCCGGATATCTATATCGACCACAATCGCTGCATCCTGTGCTCGCGCTGCGTGCGGCCT
CGCGCACCTGGACGGCAAGTCCGTGTTTCGGCTTCGAGGGGCGCGGCATCGAGATGCAT
CTGGCGGTGACCGGCGGGCACCTGGACGACAGCGCCATCGCCGCCGCCGACAGGGCGGT
TGAGATGTGCCCGGTGGGCTGCATCGTCCTCAAGCGCACCGGCTACCGCACGCCCTATG
GCCGGCGGCGCTACGACGCCGCGCCCATCGGCTCCGACATCACCGCCCGGCGCGGCGGC
GCGAAGGACTGA

30

【 0 0 7 4 】

[配列番号11 (SEQ ID NO:11) : NAD⁺還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットガンマのアミノ酸配列]

40

MSETPFTFTVDGIAVPATPGQSVIEACDAAGIYIPRLCHHPDLPPAGHCRVCTCIIDGRPA
SACTMPAARGMVVENETPALLAERRTLIEMLFAGEGNHFCQFCEASGDCELQALGYLFGM
VAPPFPHLWPKRPVDASHPDIYIDHNRCILCSRCVRASRTLKGKSVFGFEGRGIEMHLAV
TGGHLDDSAIAAADRAVEMCPVGCIVLKRTGYRTPYGRRRYDAAPIGSDITARRGGAKD

【 0 0 7 5 】

[配列番号12 (SEQ ID NO:12) : NAD⁺-還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットデルタのヌクレオチド配列]

ATGGCCAAGCCCAAACTCGCCACCTGCGCGCTGGCCGGCTGCTTCGGCTGCCACATGTC
CTTCCTGGACATGGACGAGCGCATCGTTCGAGCTCATCGACCTGGTGGACCTCGACGTCT
CGCCCCTCGACGACAAGAAAACTTCACCGGCATGGTGGAAATCGGCCTGGTGGAAAGGC
GGCTGCGCCGACGAGCGCCATGTGAAGGTGCTGCGCGAGTTCCGCGAGAAATCCCGCAT

50

CCTGGTGGCGGTGGGCGCCTGCGCCATCACCGGCGGCATCCCGGCATTGCGCAACCTCG
CCGGCCTCGACGAATGCCTGAGGGAAGCCTACCTCACCGGCCCCACGGTGGAAGGCGGC
GGGCTCATTCCCAACGACCCGGAGCTGCCGCTGCTGCTGGACAAGGTCTATCCGGTGCA
GGACTTCGTGAAGATCGACCATTTCTGCCCCGGCTGCCCGCCCTCGGCCGACGCCATCT
GGGCGGCTCTGAAGGCGCTGCTGACCGGCACCGAGCCGCATCTGCCCTACCCGCTTTTC
AAGTACGAATGA

【 0 0 7 6 】

[配列番号13 (SEQ ID NO:13) : NAD⁺-還元ヒドロゲナーゼHoxSサブユニットデルタの
アミノ酸配列]

MAKPKLATCALAGCFGCHMSFLDMDERIVELIDLVDLDVSPLDKKNFTGMVEIGLVEG
GCADERHVKVLRERFREKSRILVAVGACAITGGIPALRNLAGLDECLREAYLTGPTVEGGGL
IPNDPELPLLLDKVYPVQDFVKIDHFLPGCPPSADAIWAALKALLTGTEPHLPYPLFKYE

10

【 0 0 7 7 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号15に示される配列を
有するNiFeSeヒドロゲナーゼラージサブユニットをコードする遺伝子、又は配列番号15
に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超
の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう
に84%超の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 7 8 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号17に示される配列を
有するNiFeSeヒドロゲナーゼスモールサブユニットをコードする遺伝子、又は配列番号1
7に示される配列に対して、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%
超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のように90%超の同一性を有
する配列を含む。

20

【 0 0 7 9 】

[配列番号14 (SEQ ID NO:14) : ペリプラズミックNiFeSeヒドロゲナーゼラージサブ
ユニットのヌクレオチド配列]

TCCAGACCCGGGCAACATTGCTCCATGTGCTGGGACCCCTGGCCGGCCGCTGGCCCCAT
ACCCTCGCGCTCCAGCCCGGCGGGGTGACCCGAAGCGCCGACCAGCACGACCGCATGCG
CCTGCTCGCGACGCTGAAGGCGGTGCGGGCGGCGCTGGAAGAGACCTTGTTTCGGCGCGC
CTTTGGAAGAGGTGGCGGCCCTGGACGGCGCCGCGCCGTGGAGGCCTGGCGCGCCAAC
GGCCCGGAAGGGGATTTCCGCCTGTTCTTGGAGATCGCCGCCGACCTGGAGCTGGACCG
GCTCGGCCGCGCGCACGACCGCTTCTCTCCTTCGGCGCCTACGCCAGGACGAGGGGC
GCCTTTATGGCGCCGGCACCTTCGAGGCGGGACGGCGGGAGGGCTCGATCCCAACGCC
ATCACCGAGGACCACGCCTTCGCCCGCATGGAGGACCGCGCGGCGCCCCATGCGCCCTT
TGACGGCTCCACCTTCCCCGATGCCGACGACACCGAGGGCTACACCTGGTGCAAGGCGC
CGCGCCTTGCCGGCCTGCCCTTCGAGACCGGCGCCTTCGCCCGGCAGGTGGTGGCGGGC
CATCCGCTCGCCCGGGACCTCGTGACGCGGGAAGGCGGCACTGTGCGCAGCCGCGTGGT
CGGCCGGCTGCTGGAAACCGCGCGCACCTTGATCGCCATGGAGGGCTGGGTGAAGGAAC
TGCGGGCCCGAAGGGCCCTGGTGCGCCAGGGCCACCTGCCCGAGGAAGGCCGCGCCTTC
GGCCTCACCGAGGCGGCGCGCGGGGCGCTCGGCCACTGGATGGTGGTGGAGAAGGGCCG
CATTGCCCGCTACCAGATCATCGCCCCACCACTGGAATTCTCCCCCGCGACGGCG
CGGGCCTGCCCGGCCCGCTGGAGACGGCCCTGGTGGGCGCGCCCGTGCGGCAGGGAGAG
ACGACGCCCGTGAGCGTGACGACATCGTGCGCTCCTTCGACCCGTGCATGGTCTGCAC
TGTGCATTGA

30

40

【 0 0 8 0 】

[配列番号15 (SEQ ID NO:15) : ペリプラズミックNiFeSeヒドロゲナーゼラージサブ
ユニットのアミノ酸配列]

MSAETRRLVVGPFNRVEGDLEVRLDVQDGRVQQAFVSSPLFRGFERILEGRDPRDALVIA
PRICGICSVSQSHAAALALAGLQGIAPTHDGRIATNLIVAAENVADHLTHFHVFFMPDFA

50

RAVYEDRPWFAQAARRFKANQGVSVRRALQTRATLLHVLGTLAGRWPHTLALQPGGV
RSADQHDMRLLATLKAVRAALEETLFGAPLEEVAALDGAAVEAWRANGPEGDFRLFL
EIAADLELDRLGRAHDRFLSFGAYAQDEGRLYGAGTFEAGTAGGLDPNAITEDHAFARME
DRAAPHAPFDGSTFPDADDTEGYTWCKAPRLAGLPFETGAFARQVVAGHPLARDLVTRE
GGTVRSRVVGRLLLETARTLIAMEGWVKELRPEGPWCAQGHLPQEGRAFGLTEAARGALG
HWMVVEKGRIARYQIIAPTTWNFSPRDGAGLPGPLETALVGAPVRQGETTPVSVQHIVR
SFDPCMVCVTH

【 0 0 8 1 】

[配列番号16 (SEQ ID NO:16) : ペリプラズミックNiFeSeヒドロゲナーゼスモールサブ
ユニットのヌクレオチド配列]

ACGGGGGAGGAAGCCCGCGCCATCTTCGACGCCATCCTTGCCGGCGTTATCGTCCTCGA
CGCCCTGTGCGTGGAAGGCGCGCTGCTGCGCGGGCCGAACGGCACCGGGCGCTTCCATG
TGCTGGCGGGCACGGACACCCCCACCATCGACTGGGCGCGGCAGCTCGCCGGCATGGCG
CGCCACGTGGTGGCGGTGGGCACCTGCGCCGCCTATGGGGGCGTGACGGCGGGCGGGCAT
CAACCCACCGATGCCTGCGGCCTCCAGTTCGACGGACGCCGGAAGGGTGGGGCGCTGG
GGGCGGACTTCCGCTCCCGCTCGGGGCTTCCGGTCATCAATGTGGCCGGCTGCCCCACC
CATCCCAACTGGGTGACGGAAACCCTGATGCTGCTCGCCTGCGGCCTGCTGGGCGAGGC
CGACCTCGACGTCTATGGCCGCCCGCGCTTCTATGCGGACCTGCTGGTGCATCACGGCT
GCCCCGCGCAACGAATACTATGAATACAAGGCGAGCGCCGAGAAGATGAGCGACCTCGGC
TGCATGATGGAGCATCTGGGCTGCCTCGGCACCCAGGCCACGCCGACTGCAACACGCG
CCTTTGGAATGGCGAGGGCTCGTGACCCGCGGCGGCTATGCCTGCATCAACTGCACGG
CGCCGGAATTGAGGAGCCGGGCCACGCCTTCTGGAGACGCCCAAGATCGGCGGCATC
CCCATCGGCCTGCCCACCGACATGCCCAAGGCCTGGTTTCATCGCCTTGTCTCCCTCGC
CAAGGCGGCGACGCCGGAGCGGCTGCGCAAGAACGCGGTGTCCGACCATGTGGTCACGC
CGCCCGCCGTCAAGGACATCAAGCGGCGATGA

【 0 0 8 2 】

[配列番号17 (SEQ ID NO:17) : ペリプラズミックNiFeSeヒドロゲナーゼスモールサブ
ユニットのアミノ酸配列]

MSTPFSVLWLQSGGCGGCTMSLLCAEAPDLATTLDAAGIGFLWHPALSEETGEEARAIFD
AILAGVIVLDALCVEGALLRGPNGTGRFHVLAGTDTPTIDWARQLAGMARHVVAVGTCA
AYGGVTAAGINPTDACGLQFDGRRKGGALGADFRSRSGLPVINVAGCPHPNWNVTETLM
LLACGLLGEADLDVYGRPRFYADLLVHHGCPRNEYEYKASAEKMSDLGCMMEHLGCLG
TQAHADCNTRLWNGEGSCTRGGYACINCTAPEFEPEGHAFLETPKIGGIPIGLPTDMPKA
WFIALSSLAKAATPERLRKNAVSDHVVTPPAVKDIKRR

【 0 0 8 3 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号19に示される配列を
含むATP合成酵素ガンマチェーンatpG_1をコードする遺伝子、又は配列番号19に示され
る配列に対して、例えば80%超の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性
、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超
の同一性のように70%超の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 8 4 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号21に示される配列を
有するATP合成酵素サブユニットアルファatpA_1をコードする配列、又は配列番号21に
示される配列に対して、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超
の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例え
ば99%超の同一性のように78%超の同一性を有する配列を含む。

【 0 0 8 5 】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号23に示される配列を
有するATP合成酵素サブユニットb atpF_1をコードする遺伝子、又は配列番号23に示さ
れる配列に対して、例えば70%以上の同一性、例えば80%以上の同一性、例えば90%超の

10

20

30

40

50

同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう62%超の同一性を有する配列を含む。

【0086】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号25に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットc、ナトリウムイオン特異性atpE_1をコードする遺伝子、又は配列番号25に示される配列に対して、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう90%超の同一性を有する配列を含む。

【0087】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号27に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットa atpB_1をコードする遺伝子配列、又は配列番号27に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう80%超の同一性を有する配列を含む。

10

【0088】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号29に示される配列を有するATP合成酵素イプシロンチェーン atpC_1をコードする遺伝子、又は配列番号29に示される配列に対して、例えば80%超の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう71%超の同一性を有する配列を含む。

20

【0089】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号31に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットベータ atpD_1をコードする遺伝子、又は配列番号31に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう84%超の同一性を有する配列を含む。

【0090】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号33に示される配列を含むATP合成酵素サブユニットベータ atpD_2をコードする遺伝子、又は配列番号33に示される配列に対して、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう97%超の同一性を有する配列を含む。

30

【0091】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号35に示される配列を有するATP合成酵素ガンマチェーン atpG_2をコードする遺伝子、又は配列番号35に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう86%超の同一性を有する配列を含む。

【0092】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号37に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットアルファ atpA_2をコードする遺伝子、又は配列番号37に示される配列に対して、例えば99%超の同一性のよう98%超の同一性を有する配列を含む。

40

【0093】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号39に示される配列、又は配列番号39に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、95%超の同一性、96%超の同一性、97%超の同一性、98%超の同一性、99%超の同一性のよう85%超の同一性を有するATP合成酵素サブユニットデルタ atpHをコードする遺伝子を含む。

【0094】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号41に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットb atpF_2をコードする遺伝子、又は配列番号41に示さ

50

れる配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう87%超の同一性を有する配列を含む。

【0095】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号43に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットb' atpG_3をコードする遺伝子、又は配列番号43に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう81%超の同一性を有する配列を含む。

【0096】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号45に示される配列を有するATP合成酵素サブユニットc atpE_2をコードする遺伝子、又は配列番号45に示される配列に対して、例えば99%超の同一性のよう98%超の同一性を有する配列を含む。

【0097】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号47に示れる配列を有するATP合成酵素サブユニット a atpB_2をコードする遺伝子、又は、前記配列番号47の配列に対して、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう92%超の同一性を有する配列を含む。

【0098】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号49に示される配列を有するATP合成酵素タンパク I atpIをコードする遺伝子、又は、前記配列番号49の配列に対して、例えば70%超の同一性、例えば80%超の同一性、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう60%超の同一性を有する配列を含む。

【0099】

[配列番号18 (SEQ ID NO:18) : ATP合成酵素ガンマチェーンatpG_1のヌクレオチド配列]

GTGACCGAGCGCCTGTCCGACGTCAACGCCCGCATCGCCTCGGTGCGGCAGCTCTCATC
GGTCATCACGGCCATGCGGGGCATTGCGGCGGCGCGGGCGCGGGAGGCGCGGGGTCTGGC
TCGACGGCATCCGCGCCTATGCGCAGACCATCGCCGAGGCCATCGGCCATGTGCTCGCC
GTGCTGCCCCGAGGAGGCCCGCGCCCGGTCTCTCCGGGCACCGGCATCGGGGCCATGCGGT
CATCGCCCTGTGCGCGGAGCAGGGCTTTGCCGGCGTCTTCAACGAGCGGGTGCTGGACG
AGGCCGCCCGGCTGCTGACCGGCGGGGCGGGGCGGGCCGAGCTGCTGCTGGTGCGGCGAC
CGGGGCCTGATGGTGCGCCCGCGAGCGGGGGCTCGATGTCTCCTGGTTCGGTGCCCATGGT
GGCCCATGCGGGCCAGGCCTCGGCGCTGGCGGACCGCATCAGCGAGGAGCTCTACCGGC
GGATCGATGCGGGACGGGTGACGCGGGTGTCGGTGGTGCACGCCGAGCCCGCCGCGTCC
GCCGCCATCGAGACGGTGGTGAAAGTGCTGGTGCCGTTGCACTTCGCCCCGCTTCCCCCT
GGCGCGGGTGGCATCCGCCCGCTCATGACCATGCCGCCGCCGCGGCTGCTGGCCAGC
TGTCGGAGGAATATGTGTTCCGCGAGCTGTGCGAGGCGCTCACCTTGTCTTCGCGGCG
GAGAACGAGGCCCGCATGCGGGCCATGATCGCCGCCCGCGCCAATGTGGCCGATACCCT
GGAGGGCCTCGTCGGCCGCGCCCGGCAGATGCGCCAGGAGGAGATCACCAACGAGATCA
TCGAGCTGGAAGGCGGCGCCGGCAGCGCCCGGCATGCGGATTGA

【0100】

[配列番号19 (SEQ ID NO:19) : ATP合成酵素ガンマチェーンatpG_1のアミノ酸配列]
MTERLSDVNARIASVRQLSSVITAMRGIAAARAREARGRLDGIRAYAQTIAEAIGHVLAVL
PEEARARSSGHRHRGHAVIALCAEQGFAGVFNERNVLDEAARLLTGGAGPAELLLVGDRGL
MVARERGLDVSWSVPMVAHAGQASALADRISSEELYRRIDAGRVTRVSVVHAEPAAASAI
ETVVKVLVPFDFARFPLARVASAPLMTMPPPRLLAQLSEEYVFAELCEALTLSFAAENEA
RMRAMIAARANVADTLEGLVGRARQMRQEEITNEIELEGGAGSARHAD

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

[配列番号20 (SEQ ID NO:20) : ATP合成酵素サブユニットアルファatpA_1のヌクレオチド配列]

ATGAGCACGGGCGCGCAAGCGAGCGAGGATTGGCTCACCCGGAGCCGGGCGGCCCTGGC
CGGGACGCGCCTTTCCAGCAATCCCAATCGGTGGGCCGGGTGGAGGAGATGGCCGACG
GCATCGCCCGCGTCTCCGGCCTGCCGGATGTGCGGCTCGACGAGCTTCTCACCTTCGAG
GGCGGCCAGACCGGCTATGCCCTCACCTCGATCGCACCGAGATCGCCGTGGTGCTGCT
GGATGACGCCTCCGGCGTGGAGGCGGGCGCCCGGGTGTTCGGCACCGGCGAGGTGGTGA
AGGTGCCGGTGGGGCCGGGGCTGCTGGGCCGCATCGTCGACCCCTCGGCCGGCCCATG
GACCGCTCCGAGCCGGTGGTGGCGCAGGCGCACCATCCCATCGAGCGGCCGGCGCCGGC
CATCATCGCCCGCGACCTGGTCTCGCAGCCGGTTCAGACCGGCACGCTGGTGGTGGATG
CGCTGTTCTCCCTCGGCCGGGGCCAGCGCGAGCTCATCATCGGCGACCGGGCTACCGGC
AAGACCGCCATCGCGGTGGACACCATCATCAGCCAGAAGCATTCGGACATCGTGTGCAT
CTACGTGGCGGTGGGCCAGCGCGCCCGCCCGTGGAGCGGGTGGTGGAGGCGGTGCGCG
CCCACGGGGCGATCGAGCGCTGCATCTTCGTGGTGCCTCGGCCGCCGCTCGCCAGGG
CTGCAATGGATCGCGCCGTTCGCCGGCATGACCATGGCGGAATATTTCCGCGACAACGG
CCAGCATGCGCTCATCATCATCGATGATCTACCAAGCATGCGGCCACCCATCGCGAGC
TGGCGCTGCTCACCCACGAGCCGCCGGGCCGCGAGGCCATCCCGGCGACATCTTCTAT
GTGCACGCCCCGCTTCTGGAGCGGGCCGCCAAGCTCTCCGCCGAGCTGGGCGGTGGCTC
GCTCACGGCCCTGCCCATCGCGGAGACGGACGCGGGAAACCTCTCCGCCTATATCCCA
CCAACCTCATCTCCATCACCGATGGGCAGATCGTGCTGGATTGCGGGCTGTTGCGGGCC
AACCAGCGCCCGGCGGTGGATGTGGGCCTCTCCGTGAGCCGGGTGGGCGGCAAGGCGCA
GCATCCCGCGCTTCGGGCCGTGTCCGGGCGCATCCGGCTCGATTATCCAGTTCCTGG
AGCTGGAAATGTTACCCGCTTCGGCGGCATCACCGATACCCGCGTGAAGGCGCAGATC
ACCCGGGGCGAGCGCATCCGCGCGCTGCTCACCCAGCCGCGCTTTTCCACCCTGCGCCT
TCAGGACGAGGTGGCGCTGCTGGCCGCGCTGGCGGAGGGGGTGTTCGACACTTTGGCCC
CGGGGCTGATGGGCGCCGTGCGTGCCCGCATTCCGGCCCAGCTGGATGCGCAGGTGAAG
GACGTGGCCTCGGCCCTCGCCGAGGGCAAGGTGCTGGAGGAGGGCTTGACGCCCCGTCT
CGTGGCGGCCGTGCGGGCCGTGCGGGCGGACGTGGCCGCGACCGCGAAGGCCGGGCCGT
GA

10

20

30

【 0 1 0 2 】

[配列番号21 (SEQ ID NO:21) : ATP合成酵素サブユニットアルファatpA_1のアミノ酸配列]

MSTGAQASEDWLTRSRAALAGTRLSQQSQSVGRVEEMADGIARVSGLPDVRLDELLTFE
GGQTGYALTLDRTIEIAVLLDDASGVEAGARVFGTGEVVKVPVGPGLLGRIVDPLGRPMD
RSEPVVAQAHHPIERPAPAIIRDLSQPVQTGTLVVDALFSLGRGQRELIIGDRATGKTA
IAVDTIISQKHSDIVCIYVAVGQRAAAVERVVEAVRAHGAIERCIFVVASAAASPGLQWIA
PFAGMTMAEYFRDNGQHALLIIDDLTKHAATHRELALLTHEPPGREAYPGDIFYVHARLL
ERAAKLSAELGGGSLTALPIAETDAGNLSAYIPTNLISITDGQIVLDSRLFAANQRPADV
LSVSRVGGKAQHPALRAVSGRIRLDYSQFLELEMFTRFGGITDTRVKAQITRGERIRALLT
QPRFSTLRLQDEVALLAALAEVFDTLAPGLMGAVRARIPAQLDAQVKDVASALAEKGV
LEELHARLVAAVRAVAADVAATAKAGP

40

【 0 1 0 3 】

[配列番号22 (SEQ ID NO:22) : ATP合成酵素サブユニットb atpF_1のヌクレオチド配列]

ATGCAGATCGACTGGTGGACGCTGGGCCTGCAGACGGTCAACGTCCTCGTTCTCATCTG
GCTCCTGAGCCGCTTCTGTTCAGCCGGTGGCGCAGGTCATCGCGCAGCGCCGTGCCG
AGATCGAGAAGCTGGTGGAGGATGCGCGCGCCGCCAAGGCCGCCGAGGCCGAGCGG
GACACGGCGAAGGCGGAGGAGGCGCGCCTTGCCGCCGAGCGCGGGCGCCCGCATGGCGGC
GGTCGCCAAGGAGGCGGAGGCGCAGAAGGCGGCATTGCTGGCCGCCGCCAAGACCGAGG

50

CCGAGGCCCTGCACGCGGCCGCGGAAGCGGCCATCGTCCGGGCGCGGGCGAGCGAGGAG
GAAGCCGCGCCGACCGCGCCAGCCGCCTTGCCGTGGACATCGCCGCCAAGCTGCTGGA
CCGGCTGCCCCGACGACGCCCGGGTCGCGGGCTTCATCGATGGCCTCGCCGAGGGGCTTG
AAGCCCTGCCCCGAGGCGAGCCGGGCGGTGATCGGCGTCGACGGCGCGCCAGTGCGCGTG
ACGGCCGCGCGCGCCCTTATGCCGGCGGAGGAGGAGGCCTGCCGCACGCGGCTCTCCCA
GGCGCTGGGCCGTCCGGTGACGCTGGCCGTGACCATCGACCCCGCCCTCATCGCCGGCC
TGGAGATGGAGACGCCCCACGCGGTGGTGCGCAATTCCTTCAAGGCCGATCTCGACCGC
GTCACCGCGGCGCTCACCCATCATGGGACCTGA

【 0 1 0 4 】

[配列番号23 (SEQ ID NO:23) : ATP合成酵素サブユニットb atpF_1のアミノ酸配列]
MQIDWWTGLGLQTVNVLVLIWLLSRFLFKPVAQVIAQRRAEIEKLVEDARAAKAAAEAEER
DTAKAEERLAAERGARMAAVAKEAEAQKAALLAAKTEAEALHAAAEAAIVRARASEE
EAAADRASRLAVDIAAKLLDRLPDDARVAGFIDGLAEGLEALPEASRAVIGVDGAPVRVT
AARALMPAEEEACRTRLSQLGRPVT LAVTIDPALIAGLEMETPHAVVRNSFKADLDRVT
AALTHHGT

10

【 0 1 0 5 】

[配列番号24 (SEQ ID NO:24) : ATP合成酵素サブユニットc、ナトリウムイオン特異性
atpE_1のヌクレオチド配列]

ATGACTGTGCGAGATGGTCAGCATCTTCGCGGCGGCGCTCGCCGTCTCCTTCGGCGCCAT
CGGGCCGGCCCTGGGCGAGGGCCGGGCGGTGGCCGCGGCCATGGACGCCATCGCCCGCC
AGCCGGAGGCGGCCGGAACCTTGTCGCGCACGCTCTTCGTCGGCCTCGCCATGATCGAG
ACCATGGCGATCTACTGCCTGGTGATCGCGCTCCTGGTGCTCTTCGCCAATCCGTTCTG
GAAGTGA

20

【 0 1 0 6 】

[配列番号25 (SEQ ID NO:25) : ATP合成酵素サブユニットc、ナトリウムイオン特異性
atpE_1のアミノ酸配列]

MTVEMVSIFAAALAVSFGAIGPALGEGRAVAAAMDIAIRQPEAAGTLSRTLFLVGLAM IET
MAIYCLVIALLLVLFANPFVK

【 0 1 0 7 】

[配列番号26 (SEQ ID NO:26) : ATP合成酵素サブユニットa atpB_1のヌクレオチド配
列]

30

ATGGGCTCGCCGCTGATCCTCGAACCCCTGTTCCATATCGGGCCCGTGCCCATCACCGC
GCCGGTGGTGGTCACCTGGCTCATCATGGCCGCCTTCATTGGGCTGGCGCGGCTCATCA
CCCGGAAGCTTTCCACCGATCCCACCCGACCCAGGCGGCGGTGGAAACGGTGCTGACC
GCCATCGATTCCCAGATCGCCGACACCATGCAGGCCGATCCCGCGCCTTATCGCGCGCT
CATCGGCACCATCTTCCTTTATGTGCTGGTGCCAACTGGTCCTCGCTCATCCCGGGCA
TCGAGCCGCCCACGGCGCATATCGAGACCGATGCGGCGCTCGCTTTCATCGTGTTGCGC
GCCACCATCGGGTTCGGGTTGAAGACAAGGGGTGTGAAGGGCTATCTCGCCACCTTCGC
CGAACCTCCTGGGTGATGATCCCGCTCAATGTGGTGGAGCAGATCACCCGGACCTTCT
CGCTCATCGTGCGCCTGTTGCGCAACATCATGAGCGGGGTGTTGCTGGTGGCATCATC
CTGTCCCTCGCCGGGCTGCTGGTGCCCATCCCCCTCATGGCGCTCGATCTCCTGACCGG
CGCCGTGCAGGCCTACATCTTCGCGGTGCTGGCCTGCGTGTTTCATCGGCGCGGCCATTG
GCGAGGCGCCGGCAAAGCCCCAATCGAAGGAGCCAGGGAAAACATCATGA

40

【 0 1 0 8 】

[配列番号27 (SEQ ID NO:27) : ATP合成酵素サブユニットa atpB_1のアミノ酸配列]
MGSPLILEPLFHIGPVPITAPVVVTWLIMAAFIGLARLITRKLSTDPTRTQAAVETVLTAI
DSQIADTMQADPAPYRALIGTIFLYVLVANWSSSLIPGIEPPTAH IETDAALAFIVFAATIGF
GLKTRGVKGYLATFAEPSWVMIPLNVVEQITRTFSLIVRLFNGNIMSGVFVVGII LSLAGLL
VPIPLMALDLLTGAVQAYIFAVLACVFIGAAIGEAPAKPQSKEPGKTS

【 0 1 0 9 】

50

GTGAGCGCGCCGCTGCACCTCACCATCACACGCGCGGCCGTTCTGGTGGACCGTGC
CGACATCGTGGCCCTGCGTGCCGAGGACGAGAGCGGCAGCTTCGGCATCCTGCCCGGCC
ATGCGGATTTCTTGACCGTTCTGGAGGCCTGCGTGGTGCCTTCAAGGATGGGGCCGAC
GGCGTGCAATTATTGTGCTCTCAGTGGTGGCGTGCTGTGCGTTCGAGGAGGGCCGGCGCAT
CGCCATCGCCTGCCGTACGGGCACGGTGAGCGACGACCTGGTCGCCCTGGAAGGGGCGG
TGGACGCCATGCGTTCGGCGGAGAGCGATGCCGACAAGCGGGCCCGGGTGGAGCAGATG
CGCCTTCATGCCACGCCGTGCGCCAGCTCCTGCACTATCTGCGGCCCGGCCGGGCCGG
CGGCGTGGCGCCGGCCGCCGCGCCGGAGGAGGGGCCGTCATGA

10

MSAPLHLTITTPAAVLVDRADIVALRAEDESFGILPGHADFLTVEACVVRFKDGADG
VHYCALSGGVLSVEEGRRIAIACRQGTVSDDLVALEGAVDAMRSAESDADKRARVEQMR
LHAHAVRQLLHYLRPGRAGGVAPAAAPEEGPS

ATGGCAGCGGCAGATGAGGAGGCGCAATCGGCCGCCGGCCCCGCTCGGGCCGGGTGGT
GGCCGTGCGCGGC GCGGTGATCGACATCGCCTTTGCCCAGCCTCCGCTGCCGCCGCTGG
ACGACGCCCTTCTCATCACCGACGGCCGGGGCGGCACGGTGCTGGTGGAGGTGCAGAGC
CATATGGATCGGCACACGGTGCGCGCCATCGCCCTTCAGGCCACCACCGGCCTCAGCCG
GGGGCTGGAGGCGGCGCGGGTGGGCGGGCCGGTGAAGGTGCCGGTGGGAGACCATGTGC
TCGGCCGCCTCCTGGATGTCACCGGCGCCATCGGCGACAAGGGCGGGCCGCTGCCGGCC
GACGTGCCACGCGGCCGATCCACCACGCGCCGCCATCCTTCGCCGCGCAGGGCGGCAC
GTCCGATCTGTTTTCGCACCGGCATCAAGGTCATCGACCTCCTGGCGCCCCCTCGCCCAGG
GCGGCAAGGCGGCCATGTTGCGCGGGGCCGGCGTGGGCAAGACCGTGCTGGTGATGGAG
CTGATCCACGCCATGGTGGCGAGCTACAAGGGCATCTCGGTGTTTGCCGGCGTGGGGGA
GCGCTCCCGCGAGGGCCACGAGATGCTGCTGGACATGACCGATTCCGGCGTGCTCGACC
GCACCGTTCTGGTCTATGGCCAGATGAACGAGCCCCCGGGGCCCGCTGGCGGGTGCCC
ATGACGGCGCTGACCATCGCCGAATATTTCCGCGACGAGAAGCACCAGAACGTCCTGCT
GCTGATGGACAACATCTTCCGCTTCGTCCAGGCGGGGGCGGAGGTCTCCGGCCTTTTG
GCCGTCCGCCCTCCCGGGTGGGATACCAGCCGACGCTGGCGAGCGAGGTGGCGGCGCTC
CAGGAACGCATCACCTCCGTGGGCGAGGCCTCGGTGACCGCCATCGAGGCGGTCTACGT
GCCGGCGGATGACTTCACCGATCCCGCCGTGACCACCATCGCCGCCACGTGGATTCCA
TGGTGGTGCTCTCCCGCGCCATGGCGGCGGAGGGCATGTATCCGGCGGTGGACCCCATC
TCCTCCTCGTCGGTGCTGCTCGACCCGCTCATCGTGGGGGACGAGCATGCGCGCGTCGC
CAACGAGGTGCGCCGGACCATCGAGCATTATCGCGAGCTTCAGGATGTGATCTCGCTGC
TGGGCATGGAGGAATTGGGCACCGAGGATCGCCGCATCGTGGAGCGGGCGCGCCGGCTC
CAGCGCTTCCTACCCAGCCCTTCACGGTCACCGAGGCCTTCACCGGCGTGCCCGGCCG
CTCGGTGGCCATCGCCGACACCATCGCCGGCTGCAGGATGATCCTGTCCGGCGCCTGCG
ACGACTGGCAGGAAAGCGCCCTCTACATGGTGGGCACCATCGACGAGGCCCGCCAGAAG
GAGGAGGCCGCTCGCGCCAAGGCGGGGCAGGGCGCCCCGGCCGGGACGGCAGCCGAGAC
GGCGGAGGCCGCCCGCTGA

20

30

40

MAAADEEAQSAAGPASGRVVAVRGAVIDIAFAQPPLPPLDDALLITDGRGGTVLVEVQSH
MDRHTVRAIALOATTGLSRGLEAARVGGPVKVPVGDHVLGRLLDVTGAIGDKGGPLPAD

50

VPTRPIHHAPPSFAAQGGTSDLFRTGIKVIDLLAPLAQGGKAAMFGGAGVGKTVLVMELI
HAMVASYKGISVFAGVGERSREGHEMLLDMTDSGVLDRTVLVYGQMNPPGARWRVP
MTALTIAEYFRDEKHQNVLLLMDNIFRFVQAGAEVSGLLGRPPSRVGYQPTLASEVAALQ
ERITSVGEASVTAIEAVYVPADDFDPAVTTIAAHVDSMVVLSRAMAAEGMYPVAVDPIS
SSVLLDPLIVGDEHARVANEVRRRTIEHYRELQDVISLLGMEELGTEDRRIVERARRLQRF
L
TQPFTVTEAFTGVPGRSVAIADTIAGCRMILSGACDDWQESALYMGVTIDEARQKEEAAR
AKAGQGAPAGTAAETAEEAAP

【 0 1 1 3 】

[配列番号32 (SEQ ID NO:32) : ATP合成酵素サブユニットベータ atpD_2のヌクレオチド配列]

ATGGCGAACAAGGTCGGACGCATCACCCAGATCATCGGCGCCGTCGTCGACGTGCAGTT
CGACGGGCATCTGCCGGCGATTCTCAACGCGATCGAGACCACCAACCAGGGCAACCGGC
TGGTGCTCGAAGTGGCTCAGCATCTCGGCGAGAACACCGTGCGCTGCATCGCCATGGAT
GCCACTGAAGGCCTGGTGCGTGCCAGGAGGTGGCCGACACCGATGCGCCCATCCAGGT
GCCCGTGGGCGCCGCCACCCTCGGCCGCATCATGAACGTGATCGGCGAGCCGGTGGACG
AGCTGGGCCCCATCGAGGGCGAAGCGCTGCGCGGCATCCATCAGCCGGCCCCCTCCTAT
GCGGAGCAGGCCACGGAAGCTGAGATCCTCGTCACCGGCATCAAGGTGGTGGATCTGCT
GGCGCCCTATTCCAAGGGCGGCAAGGTGGGCCTGTTGCGCGGCGCCGGCGTGGGCAAGA
CCGTGCTCATCATGGAGCTGATCAACAACGTGGCCAAGGCGCACGGCGGCTATTCCGTG
TTCGCCGGCGTGCGGTGAGCGCACCCGCGAGGGCAACGACCTCTACCACGAGATGATCGA
GTCCAACGTGAACAAGGACCCGCGACGAGAACAATGGCTCGGCGGCCGGTTCCAAGTGCG
CCCTGGTCTATGGCCAGATGAACGAGCCGCCCGGCGCCCGCGCCCGCGTGGCCCTCACC
GGCCTCACCGTCGCCGAGCATTTCCGCGACCAAGGGCCAGGACGTGCTGTTCTTCGTGGA
CAACATCTTCCGCTTCACCCAGGCGGGCTCCGAGGTGTGCGGCGCTTCTCGGCCGCATCC
CCTCGGCGGTGGGCTACCAGCCGACGCTGGCCACCGACATGGGCCAGCTGCAGGAGCGC
ATCACCAACCACCAAGGGCTCCATCACCTCGGTGCAGGCCATCTACGTGCCGGCGGA
CGATCTGACCGATCCGGCGCCGGCCGCCTCCTTCGCCCATCTGGACGCCACCACGGTGC
TGTCGCGCTCCATCGCGGAGAAGGGCATCTACCCGGCGGTGGATCCGCTGGACTCCACC
TCGCGCATGCTGTCTCCCGCCATCCTCGGCGACGAGCACTACAACACCGCGCGCCAGGT
GCAGCAGACCCTGCAGCGCTACAAGGCGCTCCAGGACATCATCGCCATCCTGGGCATGG
ACGAACTCTCCGAAGAGGACAAGCTCACCGTGGCCCGCGCCCGCAAGATCGAGCGCTTC
CTCTCCCAGCCCTTCCACGTGGCCGAGGTGTTACCGGTTGCGCCGGCAAGCTGGTCTGA
CCTCGCCGACACCATCAAGGGCTTCAAGGGCCTGGTGGACGGCAAGTACGACTACCTGC
CCGAGCAGGCCTTCTACATGGTGGGCACCATCGAAGAAGCCATCGAGAAGGGCAAGAAG
CTGGCGGCCGAGGCGGCCTGA

【 0 1 1 4 】

[配列番号33 (SEQ ID NO:33) : ATP合成酵素サブユニットベータ atpD_2のアミノ酸配列]

MANKVGRITQIIGAVVDVQFDGHLPAILNAIETTQGNRLVLEVAQH LGENTVRCIAMDA
TEGLVRGQEVADTDAPIQVPVGAATLGRIMNVIGEPVDELGPIEGEALRGIHQ PAPS YAE
QATEAEILVTGIKVVDLLAPYSKGGKVGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAG
VGERTREGNDLYHEMIESNVNKDPHENNGSAAGSKCALVYGQMNPPGARARVALTGLT
VAEHFRDQGQDVLFFVDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGQLQERITTT
TKGSITSVQAIYVPADDLTDPAAPASFAHLDTTVLSRSIAEKGIYPVAVDPLDSTSRMLSP
AILGDEHYNTARQVQQT LQRYKALQDI IAILGMDELSEEDKLTVARARKIERFLSQPFHVA
EVFTGSPGKLVLDLADTIKGFKGLVDGKYDYLPEQAFYMGVTIEEAIEKGKKLAAEEA

【 0 1 1 5 】

[配列番号34 (SEQ ID NO:34) : ATP合成酵素サブユニットガンマチェーン atpG_2のヌクレオチド配列]

ATGGCGAGTCTGAAGGACCTGAGAAACCGCATTCCTCGGTGAAGGCGACGCAGAAGAT

10

20

30

40

50

CACCAAGGCGATGCAGATGGTCGCCGCGGCGAAGCTGCGTCGCGCCCAGGCGGCGGCTG
AAGCGGCCCGTCCCTATGCGGAACGCATGGAGACGGTGCTCGGAAATCTTGCTCCGGC
ATGGTGGTGGGCGCGCAGGCGCCTGTTCTCATGACCGGGACGGGCAAGAGCGACACCCA
CTGCTGCTGGTGTGCACCGGCGAGCGCGGCCTGTGCGGCGCCTTCAACTCGTCCATCG
TGCGCTTCGCCCAGAGCGGGCGCAGCTGCTGCTGGCCGAGGGCAAGAAGGTGAAAATC
CTGTGCGTGGGCCGCAAGGGCCACGAGCAGCTGCGCCGCATCTACCCGGACAACATCAT
CGACGTGGTGGACCTGCGCGCGGTGCGCAACATCGGCTTCAAGGAGGCCGACGCCATCG
CCCGCAAGGTGCTGGCCCTGCTCGATGAAGGCGCATTTCGACGTCTGCACGCTCTTCTAC
TCCCACTTCAGGAGCGTGATCGCCAGGTGCCGACGGCCAGCAGCTCATTCCGGCCAC
CTTCGACGAGCGGCCGGCCGTGCGCGATGCGCCGGTCTATGAATATGAGCCGGAGGAGG
AGGAGATCCTCGCCGAGCTGCTGCCGCGCAACGTGGCGGTGCAGATCTTCAAGGCCCTC
CTCGAGAACCAGGCTTCTTTCTATGGCTCCCAGATGAGCGCCATGGACAACGCCACGCG
CAATGCGGGCGAGATGATCAAGAAGCAGACGCTCACCTACAACCGTACCCGCCAGGCCA
TGATCACGAAGGAACATCATCGAGATCATCTCCGGCGCCGAGGCCGTCTGA

【 0 1 1 6 】

[配列番号35 (SEQ ID NO:35) : ATP合成酵素サブユニットガンマチェーンatpG_2のアミノ酸配列]

MASLKDLRNRIASVKATQKITKAMQMVAALKLRRQAQAAEAARPYAERMETVLGNLAS
GMVVGAQAPVLMTGTGKSDTHLLLVCTGERGLCGAFNSSIVRFARERAQLLLAEGKKVKI
LCVGRKGHEQLRRIYPDNIIDVVDLRAVRNIGFKEADAIARKVLALLDEGAFDVCTLFYSH
FRSVIAQVPTAQQLIPATFDERPAVADAPVYEYEPEEEEEILAE LLPRNVAVQIFKALLENQ
ASFYGSQMSAMDNATRNAGEMIKKQTLTYNRTRQAMITKELIEIISGA EAV

【 0 1 1 7 】

[配列番号36 (SEQ ID NO:36) : ATP合成酵素サブユニットアルファatpA_2のヌクレオチド配列]

ATGGACATTCGAGCCGCTGAAATCTCTGCCATCCTGAAAGAGCAGATCCAGAATTTTCGG
CCAGGAGGCGGAAGTCTCCGAGGTGGGTGAGGTTCTGTCCGTGGGTGACGGCATCGCGC
GCGTCTACGGCCTCGACAACGTCCAGGCGGGCGAGATGGTTCGAGTTTCGAGAACGGCACG
CGCGGCATGGCGCTGAACCTCGAGCTCGACAATGTGCGCATCGTGATCTTCGGTTCCGA
CCGCGAGATCAAGGAAGGCCAGACCGTCAAGCGGACCGGCGCCATCGTGGACGCCCCCG
TCGGCAAGGGCCTGCTCGGCCGCGTCTGCGGACGCTCTCGGCAACCCGATCGACGGCAAG
GGCCCGATCATGTTACCGAGCGTCGCCGGGTGACGTGAAGGCGCCGGGCATCATCCC
GCGCAAGTCGGTGCACGAGCCCATGCAGACCGGCCTGAAGGCCATCGATGCGCTCATCC
CCATCGGCCGCGGCCAGCGCGAGCTCATCATCGGCGACCGCCAGACCGGCAAGACCGCC
GTGGCGCTCGACTCGATCCTGAACCAGAAGCCCATCAACCAGGGCGACGACGAGAAGGC
CAAGCTCTACTGCGTCTATGTGCGGGTGGGCCAGAAGCGTTTCACTGTGCGCGAGTTTCG
TGAAGGTGCTCGAGGAGCACGGCGCGCTGGAATATTCCATCGTCTGTCGCCGCCACCGCC
TCGGACGCGGCCCCCATGCAGTTCTGCGCGCGTTACCGGCACCGCCATGGGCGAGTA
TTTCCGCGACAACGGCATGCACGCCCTCATCATCCATGATGACCTGTCCAAGCAGGCCG
TGGCCTACCGCCAGATGTGCTGCTGCTGCGCGCCCGCCGGGCGCGAGGCCTATCCC
GGCGATGTGTTCTACCTGCACTCCCGCCTCTTGGAGCGCGCCGCCAAGCTCAATGACGA
GCACGGCGCCGGCTCGCTGACCGCCCTGCCGGTGATCGAGACCCAGGCCAACGACGTGT
CGGCCTACATCCCGACCAACGTGATCTCCATCACCGACGGTCAGATCTTCCTTGAATCC
GATCTGTTCTACCAGGGCATCCGCCCGGCGGTGAACGTGGGCCTGTGCGGTGTGCGCGT
GGGCTCTTCGGCCAGATCAAGGCGATGAAGCAGGTGGCCGGCAAGATCAAGGGCGAGC
TCGCCAGTATCGCGAGCTGGCGGCCTTCGCCAGTTTCGGTTTCGGACCTGGACGCGGCC
ACCCAGAAGCTGCTGAACCGCGGCGCCCGCCTCACCGAGCTGCTGAAGCAGAGCCAGTT
CTCGCCCCTCAAGGTGGAGGAGCAGGTGGCGGTGATCTATGCCGGCACCAATGGCTATC
TCGATCCGCTGCCGGTCTCCAAGGTGCGCGAGTTCGAGCAGGGTCTGCTCCTGTGCTG
CGCTGCGAGCATCCGGAGATCCTGGACGCCATCCGCACGTCCAAGGAGCTTTCCAAGGA

10

20

30

40

50

CACCGCCGAGAAGCTGACGAAGGCCATCGACGCCTTCGCCAAGAGCTTCTCCTGA

【 0 1 1 8 】

[配列番号37 (SEQ ID NO:37) : ATP合成酵素サブユニットアルファatpA_2のアミノ酸配列]

MDIRAAEISAILKEQIQNFGQEAEVSEVGQVLSVGDGIARVYGLDNVQAGEMVEFENGTR
GMALNLELDNVGIVIFGSDREIKEGQTVKRTGAIVDAPVGKGLLGRVVDALGNPIDGKGPI
MFTERRRVDVKAPGIIIPKSVHEPMQTGLKAIDALIPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVALDS
ILNQKPINQGDDEKAKLYCVYVAVGQKRSTVAQFVKVLEEHLGALEYSIVVAATASDAAP
MQFLAPFTGTAMGEYFRDNGMHALIIHDDLKQAVAYRQMSLLLRPPGREAYPGDVFY
LHSRLLERA AKLNDEHGAGSLTALPVIETQANDVSAYIPTNVISITDGQIFLESDFYQGIR
PAVNVGLSVSRVGSSAQIKAMKQVAGKIKGELAQYRELAAFAQFGSDLDAATQKLLNRGA
RLTELLKQSQFSPLKVVEEQVAVIYAGTNGYLDPLPVSKVREFEQGLLLSLRSQHPEILDAI
RTSKELSKDTAEKLTKAIDAFKSF

10

【 0 1 1 9 】

[配列番号38 (SEQ ID NO:38) : ATP合成酵素サブユニットデルタatpHのヌクレオチド配列]

GTGGCGGAAACGATCGTGTTCAGGCATGGCGGGACGCTATGCGACCGCGCTGTTTCGAGCT
GGCGGACGAAGCCGGTGCCATCGATTCCGTCCAGGCGGATCTTGATCGCCTGTCCGGCC
TTCTGGCCGAGAGCGCGGATCTGGCGCGGCTGGTCAAGAGCCCGGTCTTCACCGCCGAG
CAGCAGCTCGGCGCGATGGCGGCCATTCTCGATCAAGCAGGCATTTCCGGCCTTGCGGG
CAAATTCGTGAAGCTGGTGGCGCAGAACCGCCGCTGTTTCGCACTGCCGCGCATGATTG
CCGAATACGCCGTCCTGGTGGCCCGGAAGAAGGGCGAGACCTCGGCGAGCGTGACCGTT
GCCACCCCCCTGAGCGATGAGCATCTGGCCACGCTCAAGGCGGCCCTGGCTGAAAAGAC
CGGCAAGGACGTGAAGCTCGACGTCACCGTCGATCCGTCCATCCTCGGTGGTCTCATCG
TGAAGCTCGGCTCGCGCATGGTCGATGCTTCCCTGAAGACCAAACCTCAATTCTATCCGG
CATGCGATGAAAGAGGTCCGCTGA

20

【 0 1 2 0 】

[配列番号39 (SEQ ID NO:39) : ATP合成酵素サブユニットデルタatpHのアミノ酸配列]

MAETIVSGMAGRYATALFELADEAGAIIDSVQADLDRLSGLLAESADLARLVKSPVFTAEQ
QLGAMAAILDQAGISGLAGKFVKLV AQNRRLFALPRMIAEYAVLVARKKGETSASVTVAT
PLSDEHLATLKAALAEKTGKDKLDVTVDPSILGGLIVKLGSRMVDASLKTKLNSIRHAM
KEVR

30

【 0 1 2 1 】

[配列番号40 (SEQ ID NO:40) : ATP合成酵素サブユニットb atpF_2のヌクレオチド配列]

ATGACCGAAATGGAACCTGGCTGAGCTCTGGGTGCCATCGCCTTCCTGGTTTTTCGTAGG
CCTCCTGATCTATGCGGGCGCCACCGCGCCATCGTCTCCGCCCTGGATTCCCGCGGCT
CGCGCATCGCCTCGGAACCTGGAGGAGGCCCGTCGGCTCAAGGAAGAGGCCCAAGAGCTG
GTGGCCGAATTCAAGCGCAAGCAGCGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAATCCATCGTCAC
CGGCGCCAAGGCCGAGGCCGAGCGCCTCGCCGCCGAGGCCAAGGCCAAGATCGAGGATT
TCGTACCCGCGCGACCAAGATGGCCGAGGACAAGATCGCCCAGGCCGAGCATCAGGCT
CTGGCGGACGTGAAGTCCATCGCCGCCGAGGCCGCGGCCAAGGCCGCGGAGGTGATCCT
CGGCGCCCAGGCCACCGGCGCGGTGGCGGAGCGTCTGCTGTGCGGGCGCCATCTCCGAGG
TCAAGACCAAGCTCAACTGA

40

【 0 1 2 2 】

[配列番号41 (SEQ ID NO:41) : ATP合成酵素サブユニットb atpF_2のアミノ酸配列]

MTEMELAE LWVAIAFLVFVGLLIYAGAHRAIVSALDSRGSRIASELEEARRLKEEAQKLVA
EFKRKQREAEAEAESIVTGAKAEERLAAEAKAKIEDFVTRRTKMAEDKIAQAEHQALAD
VKSIAAEAAKAAEVILGAQATGAVAERLLSGAISEVKTCLN

【 0 1 2 3 】

50

[配列番号42 (SEQ ID NO:42) : ATP合成酵素サブユニットb' atpG_3のヌクレオチド配列]

ATGATGATTGCATGGAAGCGGACCTTCGCAGTCGTGACCTTCGGGGCCGCCCTGATGGC
CATGCCCCGTCGCGGGCGTGGTTCGCAGCTGAGACTTCTCCCGCTCCGGCGGCAGTGGCGC
AGGCCGATCATGCGGTGCCACCGAGGCGGGCCGGCCAGGGCACCGCCGATGCGGCCCCAT
GCCGCCGCGCGGGCGAGGCCGCCCATGGTGGCGCGGCCAAGCACGAAACCCATTTCCC
GCCCTTCGACGGCACCCACCTTCGCCTCCAGTTGCTGTGGCTCGCCGTCACCTTCGGCC
TGCTTTACTACCTCATGAGCAAGGTCACGCTGCCGCGCATCGGCCGCATCCTGGAAGAG
CGCCACGACCGCATCGCCGATGATCTGGAGGAAGCCTCCAAGCATCGCGCCGAGAGCGA
GGCCGCCCAGCGGGCCTATGAGAAGGCGCTGAGCGAGGCCCGCGCGAAGGCCCATTTCCA
TCGCCGCGGAAACCCGCGACCGCCTTGCCGCCACGCCGACACCAACCGCAAGGCGCTG
GAGAGCGAGCTACCGCCAAGCTGCAGGCGGCCGAGGAGCGCATCGCCACCACCAAGAG
CGAAGCCCTCACCCATGTGCGCGGCATCGCGGTGGACGCCACCCAATCCATCGTCTCCA
CCCTCATCGGTGTGCGCCCCGCGGCGGCCGACGTGGAAAAAGCGGTGGACGGCGCCCTG
TCCAGCACGGCCAGGCCTGA

【0124】

[配列番号43 (SEQ ID NO:43) : ATP合成酵素サブユニットb' atpG_3のアミノ酸配列]

MMIAWKRTFAVVTFGAALMAMPVAGVVAAETSPAPAAVAQADHAVPTEAAGQGTADA
AHAAAPGEAAHGGAAKHETHFPFDGTTFASQLLWLAVTFGLLYLMSKVTLPRIGRILE
ERHDRIADDLEEASKHRAESEAAQRAYEKALSEARAKAHSIAAETRDRLAAHADTNRKAL
ESELTAKLQAAEERIATTKSEALTHVRGIAVDATQSIIVSTLIGVAPAAADVEKAVDGALSQ
HGQA

【0125】

[配列番号44 (SEQ ID NO:44) : ATP合成酵素サブユニットc atpE_2のヌクレオチド配列]

ATGGAAGCGGAAGCTGGAAAGTTTCATCGGTGCCGGCCTCGCCTGCCTCGGCATGGGTCT
CGCTGGCGTCGGCGTCGGTAACATCTTCGGTAACTTCCTCTCCGGCGCCCTGCGCAACC
CGTCCGCTGCCGACGGCCAGTTCCGCCGCGCCTTCATCGGCGCCGCCCTCGCGGAAGGT
CTCGGCATCTTCTCGCTGGTTCGTTGCGCTCGTCCTGCTGTTTCGTGGCCTGA

【0126】

[配列番号45 (SEQ ID NO:45) : ATP合成酵素サブユニットc atpE_2のアミノ酸配列]

MEAEAGKFIGAGLACLGMLAGVGVGNIFGNFLSGALRNPSAADGQFARAFIGAALAEGL
GIFSLVVALVLLFVA

【0127】

[配列番号46 (SEQ ID NO:46) : ATP合成酵素サブユニットa atpB_2のヌクレオチド配列]

ATGACCGTCGATCCGATCCACCAAGTTCGAGATCAAGCGCTACGTGGATCTGCTGAACGT
CGGCGGTGTCCAGTTCTCCTTACCAACGCAACGGTGTTCATGATTGGCATCGTCCTGG
TGATTTTCTTCTTCTGACTTTCGCGACACGCGGTTCGCACCCTTGTGCCGGGCCGGATG
CAGTCGGCGGCGGAGCTGAGCTACGAGTTCATCGCCAAGATGGTGC GCGACGCGGCCGG
CAGCGAGGGAATGGTGTTCCTTCCCTTCGTCTTCTCGCTCTTCATGTTTCGTGCTGGTGGC
GAACGTATTGGGGCTCATCCCCTACACCTTCACGGTGACCGCCACCTCATCGTCACCG
CCGCCCTGGCGGCGACGGTGATCCTACCGTCATCATCTACGGCTTCGTGCGGCACGGC
ACCCACTTCCTGCACCTGTTTCGTGCCGTGCGGGCGTGCCGGGCTTCCTCCTGCCCTTCCTC
GTGGTGATCGAGGTGGTGTGTTCTGTCGCGGCCCATCAGCCTCTCGCTGCGTCTGTT
CGCCAACATGCTGGCGGGCCACATCGCCCTCAAGGTGTTTCGCCTTCTTCGTGCTGGGAC
TGGCCTCGGCCGGCGCGATCGGCTGGTTCGGCGCCACCCTGCCCTTCTTCATGATCGTG
GCGCTCACCGCGCTGGAGCTGCTGGTGGCGGTGCTGCAGGCCTACGTGTTTCGCGGTGCT
GACCTCGATCTACCTCAACGACGCCATCCATCCCGGCCACTGA

【0128】

10

20

30

40

50

[配列番号47 (SEQ ID NO:47) : ATP合成酵素サブユニットa atpB_2のアミノ酸配列]
MTVDPIHQFEIKRYVDLLNVGGVQFSFTNATVFMIGIVLVIFFFLTFATRGRTLVPGRMQS
AAELSYEFIAKMVRDAAGSEGMVFFPFVFSLFMFVLVANVLGLIPYTFTVT AHLIVTAAL
AATVILTVIYGFVRHGTHFLHLFVPSGVPGFLLPFLVVIEVVSFLSRPISLSLRLFANMLA
GHIALKVFAFFVVG LASAGAIGWFGATLPFFMIVALTALELLVAVLQAYVFAVLTSIYLND
AIHPGH

【0129】

[配列番号48 (SEQ ID NO:48) : ATP合成酵素タンパクI atpIのヌクレオチド配列]
ATGTCCGAGCCGAATGATCCATCCCGCAGGGACGGTGCGAAGGCGAAAGACGAGACGCA
GGACTCCCGGCCCGGTGAGGCGGATCTTGCTCGGCGCCTCGATGCGCTCGGCACCTCCA
TCGGTCAGGTCAAGTCCAGAAGCGGGGAGCCCGCGGCGACGCCGCGCAAGGACACCTCC
TCGGCCTCCGGCGCGGCCCTGGCGTTTTCGGCTGGGCGCCGAGTTTGTTCAGGCGTGCT
GGTGGGCTCGCTCATCGGCTACGGGTTGGATTATGCGTTTTCGCGATTTTCGCCCTGGGGGC
TGATCGCCTTCACGCTGATCGGCTTTGCCGCCGGCGTCCTGAACATGCTGCGCGTGGCG
AACAGCGATGCCAAGCGCCACAGCGCGGACAGGTGA

【0130】

[配列番号49 (SEQ ID NO:49) : ATP合成酵素タンパクI atpIのアミノ酸配列]
MSEPNDPSRRDGAKAKDETQDSRPGEADLARRLDALGTSIGQVKSRSGEPAATPRKDTSS
ASGAALAFRLGAEFVSGVLVGSGLIGYGLDYAFAISPWG LIAFTLIGFAAGVLNMLRVANS
D AKRHSADR

【0131】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号51に示される配列を有するニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチェーン nifD_1をコードする遺伝子、又は配列番号51に示される配列に対して、例えば70%超の同一性、例えば92%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう60%超の同一性を有する配列を含む。

【0132】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号53に示される配列を有するニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチェーン nifD_2をコードする遺伝子、又は配列番号53に示される配列に対して、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう60%超の同一性を有する配列を含む。

【0133】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号55に示される配列を有するニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチェーン nifK_1をコードする遺伝子、又は配列番号55に示される配列に対して、例えば90%超の同一性、例えば95%超の同一性、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう87%超の同一性を有する配列を含む。

【0134】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号57に示される配列を有するニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチェーン nifK_2をコードする遺伝子、又は配列番号57に示される配列に対して、例えば96%超の同一性、例えば97%超の同一性、例えば98%超の同一性、例えば99%超の同一性のよう95%超の同一性を有する配列を含む。

【0135】

別の実施形態では、本発明の方法で使用される細菌株は、配列番号59に示される配列を有するニトロゲナーゼ 鉄タンパク nifHをコードする遺伝子、又は配列番号59に示される配列に対して98.5%超の同一性を有する配列を含む。

【0136】

[配列番号50 (SEQ ID NO:50) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチェーン nifD_1のヌクレオチド配列]

10

20

30

40

50

ATGAGTTCGCTCTCCGCCACTATTCAACAGGTCTTCAACGAGCCGGGCTGCGCGAAGAA
CCAGAATAAGTCCGAGGCGGAGAAGAAGAAGGGCTGCACCAAGCAGCTGCAACCCGGCG
GAGCGGCCGGCGGCTGCGCGTTTCGACGGCGCGAAGATCGCGCTCCAGCCCTTGACCGAC
GTGCCCCACCTGGTGCACGGCCCCATCGCCTGCGAAGGCAATTCTGGGACAATCGTG
CGCCAAGTCCTCCGGCTCGAACATCTGGCGCACCGGCTTCACCACGGACATCAACGAAA
CCGACGTGGTGTTCGGCGGCGAGAAGCGTCTGTTCAAGTCCATCAAGGAAATCATCGAG
AAGTACGACCCGCGCGGCTCTTCGTCTATCAGACCTGCGTCCCCGCCATGATCGGCGA
CGACATCGACGCGGTGTGCAAGGCGGCCAGGGAGAAGTTCGGAAAGCCGGTGATCCCGA
TCAATCCCCCGGCTTCGTGGGGCCGAAGAATCTCGGCAACAAGCTCGCCGGCGAGGCG
CTCCTCGACCATGTGATCGGCACCGAGGAGCCCGATTACACGACGGCCTACGACATCAA
CATCATCGGCGAATAACAATCTCTCCGGCGAGTTGTGGCAGGTGAAGCCGCTGCTGGACG
AGCTGGGCATCCGCATCCTCGCCTGCATCTCCGGCGACGGGAAGTACAAGGATGTGGCG
TCCTCCCACCGCGCCAAGGCGGCGATGATGGTGTGCTCCAAGGCCATGATCAACGTGGC
CCGCAAGATGGAGGAGCGCTACGACATCCCCTTCTTCGAAGGCTCCTTCTACGGCATCG
AGGATAGCTCCGATTCCCTGCGCGAGATTGCGCGCATGCTCATCGAGAAGGGCGCCGAT
CCGGAGCTGATGGACCGCACCGAGGCGCTGATTGAGCGGGAAGAGAAGAAGGCGTGGGA
CGCCATCGCCGCCTACAAGCCCCGCTTCAAGGACAAGAAGGTGCTGCTCATCACCGGCG
GCGTGAAATCCTGGTGGTGGTGGCAGCGCTCCAGGAAGCCGGCCTCGAACTGGTGGGC
ACCTCGGTGAAGAAGTCCACCAAGGAGGACAAGGAGCGCATCAAGGAACTGATGGGCCA
GGACGCCACATGATCGACGACATGACGCCCCGCGAAATGTACAAGATGCTGAAGGACG
CCAAGGCGGACATCATGCTCTCGGGCGGGCGCTCGCAATTCATCGCGCTCAAGGCCGCC
ATGCCCTGGCTCGACATCAACCAGGAGCGCCACCACGCCTATATGGGCTATGTGGGCAT
GGTGAAGCTGGTCGAGGAGATCGACAAGGCGCTCTACAATCCCGTGTGGGAACAGGTGC
GCAAGCCCCGCCCGTGGGAAAATCCGGAAGACACCTGGCAGGCCCGTGCCTCGCCGAA
ATGGAGGCGGAGGCCGCGCGCTCGCCGCGGATCCGGTGCCTCGCGCGGAAGAGGTGCGCCG
GTCCAAGAAGATCTGCAATTGCAAGAGCGTCGACCTCGGAACCATGAGGACGCCATCA
AGGCTCACGCGCTGACCACCGTGGAGGGTGTGCGAGAGCACACCAATGCCTCGGGAGGC
TGCGGAGCCTGCAGCGGGCGGATCGAGGAGATCTTCGAGGCCGTGGGCGTTGTGCGCGC
CCCGCCTCCCGCGGAGGCCGCCCGCTCTCCGCAGGAGATCGCGCCCGATCCGCTCGCTG
CGGAGGAAAAGCGCCGCGCCAAGAAGGCCTGCGGCTGCAAGGAGGTAGCGGTGCGCACC
ATTGAGGATGCCATCCGCGCCAAGGGTCTGCGAAACATCGCGGAGGTGCGTGCGGCCAC
CGATGCCAACACCGGCTGCGGCAATTGCCAGGAGCGGGTGGAGGGCATCCTCGACCGGG
TTCTCGCCGAGGCGGCCTCAGAACTCCAGGCGGCGGAATAG

【 0 1 3 7 】

[配列番号51 (SEQ ID NO:51) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチ
ェーンnifD_1のアミノ酸配列]

MSSLSATIQVFNEPGCAKNQNKSEAEKKKGCTKQLQPGGAAGGCAFDGAKIALQPLTD
VAHLVHGPIACEGNSWDNRGAKSSGSIWRTGFTTDINETDVVFGEKRLFKSIKEIIEKY
DPPAVFVYQTCVPAMIGDDIDAVCKAAREKFGKPVIPINSPGFVGPKNLGNKLAGEALLD
HVIGTEEPDYTTAYDINIIGEYNLSGELWQVKPLLELGIRILACISGDGKYKDVASSHRAK
AAMMVCSKAMINVARKEERYDIPFFEGSFYGIEDSSDSLREIARMLIEKGADPELMDRT
EALIEREEKAWDAIAAYKPRFKDKKVLITGGVKSWSVVAALQEAGLELVGTSVKKSTK
EDKERIKELMGQDAHMIDDMTPREMYKMLKDAKADIMLSGGRSQFIALKAAMPWLDIN
QERHHAYMGYVGMVKLVVEIDKALYNPVWEQVRKPAPWENPEDTWQARALAEEMEA
AALAADPVRAEEVRRSKICNCKSVDLGTIEDAIKAHALTTVEGVREHTNASGGCGACSG
RIEEIFEAVGVVAAPPPAEAAPSQEIAPDPLAAEEKRRRAKKACGCKEVAVGTTIEDAIRAK
GLRNIAEVRAATDANTGCGNCQERVEGILDRVLAEEASELQAAE

【 0 1 3 8 】

[配列番号52 (SEQ ID NO:52) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチ
ェーンnifD_2のヌクレオチド配列]

10

20

30

40

50

ATGAGTGTGCGCACAGTCCCAGAGCGTCGCCGAGATCAAGGCGCGCAACAAGGAACTCAT
CGAAGAGGTCTCTCAAGGTCTATCCCGAGAAGACCGCCAAGCGCCGCGCCAAGCACCTGA
ACGTCCACGAAGCCGGCAAGTCCGACTGCGGCGTGAAGTCCAACATCAAGTCCATCCCG
GGCGTGATGACCATCCGCGGTTGCGCTTATGCCGGCTCCAAGGGTGTGGTGTGGGGTCC
CATCAAGGACATGATCCACATCTCCACGGCCCCGGTGGGCTGCGGCCAGTATAGCTGGG
CCGCCCGCCGCAACTACTATATCGGCACGACCGGCATCGACACCTTCGTGACGATGCAG
TTCACCTCCGACTTCCAGGAGAAGGACATCGTCTTCGGCGGGCGACAAGAAGCTCGCCAA
GATCATGGACGAGATCCAGGAGCTGTTCCCGCTGAACAACGGCATCACCGTTCAGTCCG
AGTGCCCCATCGGCCTCATCGGCGACGACATCGAGGCCGTCTCCAAGCAGAAGTCCAAG
GAGTATGAGGGCAAGACCATCGTGCCGGTGCGCTGCGAGGGCTTCCGCGGCGTGTCCCA
GTCCCTGGGGCCACCACATCGCCAACGACGCCATCCGCGATTGGGTGTTTCGACAAGATCG
CGCCCGACGCGGAGCCGCGCTTTGAGCCGACCCCGTACGACGTCGCCATCATCGGCGAC
TACAATATCGGTGGTGACGCCTGGTCGTCCCGTATCCTCCTGGAGGAGATGGGCCTGCG
CGTGATCGCCCAGTGGTCCGGCGACGGTTCGCTCGCTGAGCTGGAGGCCACCCCGAAGG
CCAAGCTCAACGTGCTGCACTGCTACCGCTCCATGAACTACATCTCGCGCCACATGGAA
GAGAAGTACGGTATCCCGTGGTGCGAGTACAACTTCTTCGGTCCTTCCAAGATCGCCGA
GTCCCTGCGCAAGATCGCCAGCTACTTCGACGACAAGATCAAGGAAGGCGCGGAGCGCG
TCATCGCCAAGTATCAGCCGCTCATGGATGCGGTGATCGCGAAGTATCGTCCCCGCCTC
GAGGGCAAGACCGTGATGCTGTACGTGGGCGGCCTGCGTCCCCGTCACGTCATCGGCGC
CTACGAGGACCTGGGCATGGAAGTGGTGGCACGGGCTACGAGTTCGCCCATACGACG
ACTACCAGCGCACCGCCAGCACTACGTCAAGGATGGCACCATCATCTATGACGACGTG
ACCGGCTACGAGTTCGAGAAGTTCGTGAGAAGATCCAGCCGGACCTGGTTCGGTTCGGG
CATCAAGGAAAAGTACGTCTTCCAGAAGATGGGCGTGCCGTTCCGCCAGATGCACTCCT
GGGACTACTCGGGCCCCGTACCACGGCTATGACGGCTTCGCGATCTTCGCGCGCGACATG
GACATGGCCATCAACAGCCCCGTGTGGAAGATGACCCAGGCTCCGTGGAAGAGCGTCCC
CAAGCCGACGATGCTCGCGGCTGAATGA

【 0 1 3 9 】

[配列番号53 (SEQ ID NO:53) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク アルファチ
ェーンnifD_2のアミノ酸配列]

MSVAQSQSVAEIKARNKELIEEV LKVYPEKTAKRRAKHLNVHEAGKSDCGVKSNIKSIPG
VMTIRGCAYAGSKGVVWGPIKDMIHISHGPVGGQYSWAARRNYIYIGTTGIDTFVTMQF
TSDFQEKDIVFGGDKKLAKIMDEIQELFPLNNGITVQSECPIGLIGDDIEAVSKQKSKEYEG
KTIVPVRCEGFRGVSQSLGHHIANDAIRDWVFDKIAPDAEPRFEPTPYDVAIIGDYNIGGD
AWSSRILLEEMGLRVIAQWSGDGSLAELEATPKAKLNLVHCYRSMNYISRHMEEKYIGIP
WCEYNFFGPSKIAESLRKIASYFDDKIKEGAERVIKYQPLMDAVIAKYRPRLEGKTVMLY
VGGLRPRHVIGAYEDLGMEVVGTYEFAHNDDYQRTAQHYVKDGTIIYDDVTGYEFEKF
VEKIQPDLVGSGIKEKYVFQKMGVPFRQMHSWDYSGPYHGYDGF AIFARDMDMAINSPV
WKMTQAPWKSVPKPTMLAAE

【 0 1 4 0 】

[配列番号54 (SEQ ID NO:54) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチ
ェーンnifK_1のヌクレオチド配列]

ATGGCCACCGTTTTCCGTCTCCAAGAAGGCCTGCGCGGTCAACCCCTCAAGATGAGCCA
GCCGGTGGGCGGCGCGCTCGCCTTCATGGGCGTGCGCAAGGCCATGCCGCTGCTGCACG
GCTCGCAGGGCTGCACCTCCTTCGGCCTGGTGCTGTTTCGTGCGCCACTTCAAGGAAGCC
ATCCCCATGCAGACCACCGCCATGAGCGAGGTGGCGACGGTTCTGGGCGGCCCTTGAGAA
TGTGGAGCAGGCCATTCTCAACATCTACAATCGCACCAAGCCGGAGATCATCGGCATCT
GCTCCACCGGCGTACCGGAGACCAAGGGCGATGATGTGACGGCTACATCAAGCTGATC
CGGGACAAGTATCCCCAGCTGGCCGACTTCCCGCTGGTCTATGTCTCCACCCCGATTT
CAAGGACGCCTTCCAGGACGGTTGGGAGAAGACCGTGCGGAAGATGGTGGAGGCGCTGG
TGAAGCCCGCCGCGGACAAGCAGAAGGACAAGACCCGCGTCAACGTCCTGCCCGGCTGC

10

20

30

40

50

CACCTCACGCCCCGGCGATCTGGATGAGATGCGGACCATCTTCGAGGATTTCTGGGCTCAC
ACCCTATTTCTGCCGGATCTGGCCGGCTCGCTGGATGGGCATATCCCCGAGGACTTCT
CGCCCACCACCATCGGCGGCATCGGCATCGATGAGATCGCCACCATGGGCGAGGCGGCC
CACACCATCTGCATCGGCGCGCAGATGCGCCGGGCGGGCGAGGCCATGGAGAAGAAGAC
CGGCATTCCCTTCAAGCTGTTTCGAGCGCCTGTGCGGCCTGGAGGCGAACGACGCCTTCA
TCATGCACCTGTGCGAGATCTCCGGCCGGCCGGTGCCGGTGAAGTATCGCCGGCAGCGG
GGCCAGCTGGTGGATGCCATGCTGGACGGCCACTTCCATCTGGGCGGTGCAAGGTGGC
CATGGGGGCGGAGCCGGACCTGCTCTACGACGTGGGCTCCTTCTGACGAGATGGGCG
CCCACATCCTTTCCGCGGTACCAACCACCCAGTCGCCGGTGCTGGCGCGCCTGCCTGCC
GAGGAGGTGCTTATCGGCGACCTGGAGGATCTGGAGACCCAGGCGAAGGCGCGCGGATG
CGATCTCCTGCTCACCCATTCCCATGGGCGCCAGGCGGCGGAGCGCCTCCACATCCCCT
TCTACCGGATCGGCATTCCCATGTTTGACCGGCTGGGGGCGGGGCATCTGTTGTGCGGTG
GGCTATCGCGGCACCCGCGACCTCATCTTCCATCTCGCCAACCTTGTGATCGCCGACCA
CGAGGAAAATCACGAGCCGACGCCCGACACCTGGGCCACCGGCCATGGCGAGCATGCCG
CCGCCCCCACTTCCCATGA

【 0 1 4 1 】

[配列番号55 (SEQ ID NO:55) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチェ
ーンnifK_1のアミノ酸配列]

MATVSVSKKACAVNPLKMSQPVGGALAFMGVRKAMPLHGSQGCTSFGLVLFVRHFKE
AIPMQTTAMSEVATVLGLENVEQAILNIYNRTKPEIIGICSTGVTETKGGDVGDIKLR
DKYPQLADFLVYVSTPDFKDAFQDGWEKTVAKMVEALVKPAADKQKDKTRVNVLPGC
HLTPGDLDEMRTIFEDFGLTPYFLPDLAGSLDGHIPEDFSPTTIGGIGIDEIATMGEEAHTI
CIGAQMRRAGEAMEKKTGIPFKLFLERLCGLEANDAFIMHLSQISGRPVVPKYRRQRGQLV
DAMLDGHFHLGGRKVAMGAEPDLLYDVGSLHEMGAHILSAVTTTQSPVLARLPAAEVL
IGDLEDLETQAKARGCDLLLTHSHGRQAAERLHIPFYRIGIPMFDRLGAGHLLSVGYRGTR
DLIFHLANLVIADHEENHEPTPDTWATGHGEHAAAPTSH

【 0 1 4 2 】

[配列番号56 (SEQ ID NO:56) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチェ
ーンnifK_2のヌクレオチド配列]

ATGCCACAAAATGCTGACAATGTGCTCGATCACTTCGAGCTCTTCCGTGGTCCCGAATA
CCAGCAGATGCTGGCCAATAAGAAAAAGATGTTTCGAGAACCCCCGCGATCCGGCCGAAG
TCGAGCGCGTGCGGGAATGGGCGAAGACTCCTGAATACAAGGAGCTGAACTTCGCCCCG
GAGGCGCTCACCGTGAATCCGGCCAAGGCTTGTCAGCCGCTGGGCGCGGTGTTTCGTGCG
CGTCGGCTTCGAGAGCACGATCCCCTTCGTGCACGGCTCGCAGGGTTGCGTCGCGTATT
ACCGCTCGCACCTCTCCCGCCACTTCAAGGAGCCGTCTCCTGCGTCTCCTCGTCCATG
ACCGAGGATGCGGCGGTGTTTCGGCGGCCTCAACAACATGATTGACGGCCTCGCCAACAC
CTACAACATGTACAAGCCGAAGATGATCGCCGTCTCCACCACCTGCATGGCGGAAGTCA
TCGGCGACGATCTGAACGCCTTCATCAAGACCGCGAAGGAAAAGGGCTCGGTTCCGGCC
GAATACGACGTGCCCTTCGCCCACACCCCGGCGTTTCGTGGCAGCCATGTCACCGGCTA
CGACAATGCGCTCAAGGGCATCCTCGAGCACTTCTGGGACGGCAAGGCCGGCACCGCGC
CGAAGCTGGAGCGCGTTCCCAACGAGAAGATCAACTTCATCGGCGGCTTCGACGGCTAC
ACCGTCGGCAACACTCGCGAAGTGAAGCGCATCTTCGAGGCGTTTCGGCGCCGATTACAC
CATCCTCGCCGACAATTCCGAAGTGTTTCGACACCCCGACCGACGGCGAGTTCCGCATGT
ATGACGGCGGCACGACCCTGGAGGACGCGGCGAACGCGGTGCACGCCAAGGCCACCATC
TCCATGCAGGAATACTGCACGGAGAAGACCCTGCCCATGATCGCCGGTCATGGCCAGGA
CGTGGTCGCCCTCAACCACCCCGTGGGCGTGGGCGGCACCGACAAGTTCCTCATGGAGA
TCGCCCCGCTCACCGGCAAGGAGATCCCCGAGGAGCTGACCCGCGAGCGCGGCCGTCTC
GTGGACGCTATCGCGGACTCTTCCGCGCACATCCACGGCAAGAAGTTCGCCATCTACGG
CGATCCGGATCTGTGCCTGGGCCTCGCCGCGTTCTGCTGGAGCTGGGCGCCGAGCCGA
CCCATGTGCTGGCCACCAACGGCACCAAGAAGTGGGCCGAGAAGGTTTCAGGAACTGTTC

10

20

30

40

50

GACTCTTCGCCGTTTCGGCGCCAACTGCAAGGTCTATCCCGGCAAGGACCTGTGGCACAT
GCGCTCGCTCCTGTTTCGTGGAGCCGGTGGATTTTCATCATCGGCAACACCTACGGCAAGT
ATCTCGAGCGCGACACGGGCACCCCGCTGATCCGTATCGGCTTCCCGGTGTTTCGACCGT
CACCACCACCGCCGCTCCGGTGTGGGGCTATCAGGGCGGCATGAACGTCCTGATCAC
GATCCTCGACAAGATCTTTGACGAGATCGACCGCAACACCAACGTGCCGGCCAAAGACCG
ACTACTCGTTTCGACATCATTCGTTGA

【 0 1 4 3 】

[配列番号57 (SEQ ID NO:57) : ニトロゲナーゼ モリブデン - 鉄タンパク ベータチェ
ーンnifK_2のアミノ酸配列]

MPQNADNVLDHFELFRGPEYQQMLANKKKMFENPRDPAEVERVREWAKTPEYKELNFA
REALTVNPAKACQPLGAVFVAVGFESTIPFVHGSQGCVAAYYRSHLSRHFKEPSSCVSSSM
TEDAAVFGGLNNMIDGLANTYNMYKPKMIAVSTTCMAEVIGDDLNAFIKTAKEKGSVPA
EYDVPFAHTPAFVGSHVTGYDNALKGILEHFWDGKAGTAPKLERVPNEKINFIGGFDDGYT
VGNTREVKRIFEAFGADYTLADNSEVFDTPDGEFRMYDGGTTLEDAANAVHAKATISM
QEYCTEKTLPMIAGHGQDVVALNHPVGVGGTDKFLMEIARLTGKEIPEELTRERGRVLDA
IADSSAHIHGKKFAIYGDPDLCLGLAAFLLELGAEPHVLATNGTKKWAKEKVQELFDSSPF
GANCKVYPGKDLWHMRSLLFVEPVDFIIGNTYGKYLERDTGTPLIRIGFPVFDRHHHHRR
PVWGYQGGMNVLITLDKIFDEIDRNTNVPKTDYSFDIIR

10

【 0 1 4 4 】

[配列番号58 (SEQ ID NO:58) : ニトロゲナーゼ 鉄タンパクnifHのヌクレオチド配列]

20

GTGGAGTCCGGTGGTCCTGAGCCGGGCGTGGGCTGCGCCGGCCGCGGCGTGATCACCTC
CATCAACTTCCTGGAGGAGAACGGCGCCTACGAGGACATCGACTATGTGTCCTACGACG
TGCTGGGCGACGTGGTGTGCGGCGGCTTCGCCATGCCCATCCGCGAGAACAAGGCGCAG
GAAATCTACATCGTGATGTCCGGCGAGATGATGGCCATGTATGCGGCCAACAAACATCTC
CAAGGGCATCCTGAAGTATGCCAATTCCGGCGGCGTGCGCCTGGGCGGGCTGGTCTGCA
ACGAGCGCCAGACCGACAAGGAGCTGGAGCTGGCGGAGGCTCTGGCGAAGAAGCTCGGG
ACCGAGCTGATCTACTTCGTGCCGCGCGACAACATCGTGACGATGCCGAGCTGCGCCG
CATGACAGTGATCGAGTATGCGCCCGATTCCGCCCCAGGCCAGCACTACCGGAACCTGG
CCGAGAAGGTGCACGCCAACAAAGGGCAACGGCATCATCCCGACCCCGATCACCATGGAC
GAGCTGGAAGACATGCTCATGGAGCACGGCATCATGAAGGCCGTGGACGAGAGCCAGAT
CGGCAAGACCGCCGCGGAGCTCGCCGTCTGA

30

【 0 1 4 5 】

[配列番号59 (SEQ ID NO:59) : ニトロゲナーゼ 鉄タンパクnifHのアミノ酸配列]

MESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENGAYEDIDYVSVDVLGDVVCGGFAMPIRENKAQE
IYIVMSGEMMAMYAANNISKGILKYANSGGVRLGGLVCNERQTDKELELAEALAKKLGTE
LIYFVPRDNIVQHAELRRMTVIEYAPDSAQAQHYRNLAEKVHANKGNIGIIPITMDELE
DMLMEHGIMKAVDDESQIGKTAAELAV

【 0 1 4 6 】

(下流工程)

一実施形態では、本発明の方法は、培養中に生成されたバイオマスを収穫するさらなる
ステップを含む。バイオマスは、例えば沈降（重力に基づく沈降）、ろ過、遠心分離また
は凝集によって収穫されうる。凝集には、凝集剤の添加が要求されていてもよい。遠心分
離は、例えば、連続フロー遠心分離機を使用して実施されてもよい。

40

【 0 1 4 7 】

一実施形態では、収穫されたバイオマスはその後乾燥される。乾燥は、例えば、遠心分
離、ドラム乾燥、蒸発、凍結乾燥、加熱、噴霧乾燥、真空乾燥及び/又は真空濾過等を含
む公知の方法を用いて実施されうる。乾燥したバイオマスは、その後、製品、例えば、食
品又は飼料製品、又は、飼料又は食品の成分等の製品に使用することができる。

【 0 1 4 8 】

別の実施形態では、収穫されたバイオマスの細胞は溶解される。いくつかの実施形態で

50

は、溶解物を不溶性画分と可溶性画分とに分離することができ、そのいずれか又は両方を、その後濃縮または乾燥し、その後、例えば、食品又は飼料製品等の製品に使用することができる。

【 0 1 4 9 】

一実施形態では、バイオマスが収穫され、タンパク質が前記バイオマスから単離されて、タンパク質画分及び非タンパク質成分を含む画分が得られる。従って、一実施形態では、方法はタンパク質の生産のためであり、菌株VTT-E-193585又はその誘導体を培養するステップ、続いてバイオマスを収穫するステップ、及び前記バイオマスからタンパク質を単離するさらなるステップを含む。

別の実施形態では、この方法はタンパク質の生産のためのものであり、エネルギー源としての水素及び二酸化炭素を含む無機炭素源を用いて連続培養でキサントバクター属の細菌株を培養することを含み、その後バイオマスを収穫するステップ、および前記バイオマスからタンパク質を単離するさらなるステップが続く。

10

タンパク質の単離方法によって、得られる画分はより純粋な場合とより低純粋の場合がある。従って、「タンパク質画分 (protein fraction)」という用語は、タンパク質が豊富な画分を意味する。タンパク質画分であってもかなりの量の他の成分を含み得、またかなりの量のタンパク質は最終的に「非タンパク質成分を含む画分」中に存在しうる。

【 0 1 5 0 】

タンパク質の単離は、どのような適切な方法を用いて実施してもよい。例えば、一実施形態では、タンパク質は、細胞を機械的に破壊し、1つ又は複数のろ過ステップ、例えば、細孔サイズを小さくしながら複数のフィルターで連続ろ過するようなる過ステップで細胞片からタンパク質を分離するようなる、任意の適切な方法を使用して実施することができる。

20

機械的破壊は、ボールミル粉碎、超音波処理、ホモジナイゼーション、高圧ホモジナイゼーション、機械的剪断等を用いて実施することができる。

結果的に得られるろ過されたタンパク質画分はタンパク質が豊富になるが、他の、より微細な成分も含まれる。タンパク質は、任意に、適切な方法を用いてこの画分からさらに精製することができる。

【 0 1 5 1 】

別の実施形態では、タンパク質画分は、エタノール抽出とそれに続く1つ又は複数の濾過ステップを実行することによって単離される。そのような方法は、例えば、大豆タンパク質の調製 (例えば、Berk FAO Agricultural Services Bulletin No. 97 (1992) による「Technology of production of edible flours and protein products from soybeans」の第5章「大豆タンパク質濃縮物」を参照) 等から知られている。

30

結果的に得られるろ過されたタンパク質画分はタンパク質が豊富になるが、他のより細かい成分も含まれる。タンパク質は、任意に、適切な方法を用いてこの画分からさらに精製することができる。

【 0 1 5 2 】

一実施形態では、本発明の方法は、本発明の方法から得られたタンパク質画分を加水分解してアミノ酸及び小ペプチドを得るためのさらなるステップを含む。

40

【 0 1 5 3 】

本発明の方法の一実施形態では、方法は、前記バイオマス、前記タンパク質画分又は非タンパク質成分を含む画分から、食品または飼料製品を製造するさらなるステップを含む。

前記さらなるステップは、前記バイオマス、タンパク質画分又は非タンパク質成分を含む画分を、食品又は飼料製品の製造中に添加することによって、食品または飼料製品に単に組み込むことを含み得る。

他の実施形態では、バイオマス又はそれらの画分のさらなる精製又は改変は、食品又は飼料製品へのその組み込みの過程で行われる

【 0 1 5 4 】

さらなる態様では、本発明は、本発明による方法によって得られる、又は得られる可能

50

性がある、バイオマス、タンパク質、または非タンパク質成分などの製品に関する。

【 0 1 5 5 】

一実施形態では、本発明の方法で得られる製品は、40%を超えるタンパク質、例えば40%から99%の間のタンパク質、例えば40%から90%の間のタンパク質、例えば40%から60%の間のタンパク質を含む。

特定の実施形態では、製品は、25%から75%の間のタンパク質、0%から20%の間の脂質、及び、5%から40%の間の炭水化物を含む。

さらなる実施形態では、製品は、40%から60%の間のタンパク質、0%から15%の間の脂質、及び10%から25%の間の炭水化物を含む。

さらに別の実施形態では、本発明の方法で得られた製品は、45%から55%の間のタンパク質、5%から10%の間の脂質、及び10%から20%の間の炭水化物を含む。

10

【 0 1 5 6 】

上記のとおり、さらなる態様における本発明は、本発明の方法によって得られる、または得られる可能性のある食品または飼料製品に関する。

本明細書で使用される場合、「食品」および「飼料」という用語は、加工食品等の従来の食品及び飼料製品だけでなく、プロテインバー、粉末又はシェイク、肉の代替品、食品成分、プロバイオティクス、プレバイオティクス、栄養補助食品等の食品および飼料サプリメントなどの関連製品も含むことを意図している。

特定の実施形態において、前記バイオマス、前記タンパク質画分、又は非タンパク質成分を含む前記画分は、ベジタリアン又はヴィーガン食品の生産に利用される。

20

【 0 1 5 7 】

本発明は、以下に示す非限定的な実施例でさらに説明される。

【実施例】

【 0 1 5 8 】

(実施例1) 化学合成独立栄養増殖が可能な細菌株の分離

フィンランドのナントリにあるバルト海の海岸から、土壌と海水を含む50mLのサンプルを滅菌ファルコンチューブに収集した。土壌サンプルの一部を、滅菌三角フラスコ内で10mLのミネラル培地と混合した。

培地は、1g/L NH_4OH 、0.23g/L KH_2PO_4 、0.29g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.005g/L $\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.2g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g/L CaSO_4 、0.00015g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.005g/L MnSO_4 、0.0005g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.0015g/L H_3BO_3 、0.001g/L CoSO_4 、0.00005g/L CuSO_4 、0.0001g/L NiSO_4 、を水道水で調製して構成された。

30

土壌と培地の懸濁液を、温度30 の振とうインキュベーター内で、以下のガス混合物で連続的にフラッシュされた密閉スチールボックス中でインキュベートした。

ガス混合物：150mL/minの N_2 、18mL/minの H_2 、3mL/min O_2 及び6mL/minの CO_2 。

三角フラスコ内の培地9mLに1mLの懸濁液を無菌状態で加えて7日間隔で培養を更新し、インキュベーションボックスに戻した。4回目の希釈後、懸濁液に目に見える土壌は残っていなかった。

40

バイオリアクター培養用のバイオマスを増殖させるために、細胞懸濁液の量を100mLに増やした。15容器的200mLパラレルバイオリアクターシステム (Medicel Explorer、Medicel Oy、フィンランド) で190mLのミネラル培地に接種した場合は懸濁液の光学密度 (OD_{600}) は、1.53であった。

培養条件は、800rpm攪拌、温度30 及びpHは1M NaOH で6.8に設定した。

14mL/minの H_2 、3mL/minの O_2 及び6mL/minの CO_2 のガス混合物がセパレーターを通して供給された。

リアクターのヘッドスペースには、300ml/minでエアが流された。連続培養は、6mL/hのミネラル培地が供給され、細胞懸濁液をキャピラリーを介して反応器から吸引し、容量200mLの一定に保った。

50

反応器から引き出された細胞懸濁液は4 で保存された。バイオリアクターから毎日自動的にサンプルを採取し、600nmでの吸光度を測定して成長をモニターした。

498時間のバイオリアクター培養の後、サンプルを無菌的に採取し、懸濁液を希釈して、上記のミネラルと2%細菌寒天を含む寒天ミネラル培地プレートにプレATINGした。プレートは、三角フラスコについての上述した条件と同じ条件でインキュベートされた。

次に、コロニーを寒天プレートから選び、新しい寒天プレートにストリークして、1つのコロニー内の1つの生物を分離した。これを2回繰り返した。単一コロニーを拾い上げ、96ウェルのマイクロタイタープレートの200 μ Lの培地に懸濁した。

懸濁液を温度30 でインキュベートし、150mL/minのN₂、18mL/minのH₂、3mL/minのO₂及び6mL/minのCO₂で連続的にフラッシュしたEnzyScreen気密ボックス内で625rpmで振とうした。1つのウェルから懸濁液を三角フラスコに移し、新鮮な培地を補充した。バイオリアクター培養を行うのに十分なバイオマスが得られるまで、容量を増やした。生物はVTT-E-193585としてVTT培養コレクションに寄託された。

【0159】

サンプルの16SrRNAシーケンスは、サンプルに1つの生物しか含まれていないことを示した。同じサンプルをイルミナのNextSeqシーケンスに使用して、1x150bpのメタゲノムショットガンシーケンスを提供した。Unicycler (Wick et al, 2017 PLoS計算生物学13:e1005595)を使用して、101個のコンティグからなるメタゲノムシーケンスのdenovoアセンブリが作成された。総ゲノム長は4,846,739bpで、GC含量は67.9%だった。遺伝子予測と機能アノテーションは、Prokkaを使用して実行された (Seemann, 2014 Bioinformatics 30:2068)。ゲノムアノテーションは4,429個の遺伝子を生成した。

Roary panゲノムアラインメント (Page et al, 2015 Bioinformatics 31:3691) は、キサントバクter種間でVTT-E-193585をグループ化した。

従って、この菌株はXanthobacter sp.として同定され、最も近いゲノムはXanthobacter tagetidisであった。

オーソログスフラグメント (OrthoANI) のみを考慮したアラインメントベースの平均ヌクレオチド同一性の計算 (Lee et al, 2016 Int J Syst Evol Microbiol 66:1100) は、Xanthobacter tagetidis (ATCC 700314; GCF_003667445.1) と80.4%の最良の一致を示した。

提案された種の境界カットオフは95~96%であった (たとえば、Chun et al, 2018 Int J Syst Evol Microbiol, 68:461-466を参照)。

Xanthobacter autotrophicus Py2は79.6%の一致性を示したが、Xanthobacter sp. 91は79.0%だった。

よって、VTT-E-193585として寄託された単離された細菌株は、門: Proteobacteria、網: Alpha Proteobacteria、目: Rhizobiales、に属すると結論付けることができた。最も可能性の高い科はXanthobacteraceae、及び属はXanthobacterである。

VTT-E-193585細菌株は、既知の種に明確に割り当てることができなかった。

【0160】

推定抗菌薬耐性遺伝子の検索が実施された。ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) ツールを使用して、blastn又はblastpを使用してArg-Annot、NCBI、ResFinder、ecOH、Megares、及びVFDBデータベースに対してゲノムを検索した。

ヌクレオチドレベルとタンパク質レベルの両方について、同一性とカバー長の両方に50%のしきい値が設定された。2つの推定抗菌薬耐性遺伝子のみが同定された。

これらの2つの遺伝子には、抗生物質耐性に関連するアミノ酸の変化が含まれていなかったため、耐性の表現型は予想されていない。

【0161】

(実施例2) 分離された細菌株のパイロット培養と分析

VTT-E-193585として寄託された分離菌株は、従来の200リットルの攪拌槽型バイオリアクター (MPF-U、丸菱、日本) で培養された。

混合は、400rpmで回転するラシュトン型インペラを使用して行った。培養温度は30

10

20

30

40

50

に維持した。ソフトウェア制御により8MNaOHまたは3.6MH₃PO₄を添加することによりpHを6.8±0.2に維持した。

培養培地は、1g/L NH₄OH、0.23g/L KH₂PO₄、0.29g/L Na₂HPO₄・2H₂O、0.005g/L NaVO₃・H₂O、0.2g/L FeSO₄・7H₂O、0.5g/L MgSO₄・7H₂O、0.01g/L CaSO₄、0.00015g/L Na₂MoO₄・2H₂O、0.005g/L MnSO₄、0.0005g/L ZnSO₄・7H₂O、0.0015g/L H₃BO₃、0.001g/L CoSO₄、0.00005g/L CuSO₄、0.0001g/L NiSO₄を水道水で調製して構成された。

1.8～10.5L/minの水素ガス、0.6～2.5L/minの酸素ガス及び1.8～5L/minの二酸化炭素ガスを含む混合物が、主なエネルギー源及び炭素源として定期的に供給された。

ガス混合物の組成を調整することにより、溶存酸素レベルを7.2±0.5%に維持した。培養用の接種材料は、実施例1に記載されているように調製された。

10

サンプルを手動で採取し、600nmでの吸光度を測定して細胞密度を光学密度として分析すること（Ultrospec 2100 pro UV /可視分光光度計、Biochrom Ltd.、England）、及び、105℃のオーブンで一晩乾燥させて細胞乾燥重量（CDW）を測定することにより増殖をモニターした。光学密度も、適切な吸光度プローブ（Trucell 2、Finesse Ltd、USA）を用いてモニターされた。

培養の増殖カーブを図1に示す。

バッチフェーズでの最大成長率は0.06h⁻¹であった。最大細胞密度は92時間で4.5g_{CDW}/Lだった。

92時間培養した後、上記のような新鮮な培養培地の供給を0.01h⁻¹の希釈率で開始した。継続的な供給の間、細胞密度は平均2.9g_{CDW}/Lであった。培養液は常に冷却した（10℃）タンクに集められ、そこから300リットルのバッチで連続遠心分離機（BTPX-205, Alfa-Laval AB, Sweden）に供給された。

20

分離器から収集された細胞含有スラリーを大気圧のダブルドラムドライヤー（Buflovak 6x8 ADDD、Hebeler process Solutions LLC、USA）に供給し、4バールの蒸気で加熱し、ドラムを3.5rpmで回転させた。

これにより、乾物含量が約96%の乾燥細胞粉末が得られた。

乾燥細胞粉末の分析結果は、近似組成については表1に、アミノ酸組成については表2に、脂肪酸組成については表3に、ビタミン含有量については表4に示す。分析は、乾燥した細胞粉末がすべての必須アミノ酸を含む高いタンパク質含有量を持っていることを示している。また、飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸が多く、及び、ビタミンB群が多く含まれていた。

30

ペプチドグリカン含有量はわずか0.002mg/g_{CDW}であり、リボ多糖含有量は0.01mg/g_{CDW}であった。これらの濃度は可能な限り低いことが有益であろう。

比較すると、同時に分析された市販の乳酸菌調製物では、ペプチドグリカン含有量は0.244mg/g_{DW}であり、リボ多糖含有量は0.015mg/g_{DW}であった。

細胞毒性および遺伝子毒性アッセイは、培養の上清サンプルを使用して行われた。Hep G2又はHeLa229ヒト細胞株に対する細胞毒性は観察されなかった。

Escherichia coli WP2 trp⁻又はCM871uvrArecAlexA株に対する遺伝子毒性は観察されなかった。

40

【0162】

【表 1】

VTT-E-193585 として寄託された分離菌株の乾燥細胞粉末の分析結果

パラメタ	方法	単位	値
水分	Drying at 103 °C	g/100g	3.3
タンパク	Kjeldahl (N x 6,25)	g/100g	72.2
脂質	Weibull-Stoldt	g/100g	6.0
飽和脂肪酸	Calculation based on Table 3	g/100g	1.8
モノ不飽和脂肪酸	Calculation based on Table 3	g/100g	3.8
多価不飽和脂肪酸	Calculation based on Table 3	g/100g	0.4
オメガ 3 脂肪酸	Calculation based on Table 3	g/100g	< 0.01
オメガ 6 脂肪酸	Calculation based on Table 3	g/100g	0.4
食物繊維	Gravimetric	g/100g	10.5
灰	Ashing at 550 °C	g/100g	5.8
グルコース	HPLC-ELSD	g/100g	< 0.15
フルクトース	HPLC-ELSD	g/100g	< 0.1
スクロース	HPLC-ELSD	g/100g	< 0.1
ラクトース	HPLC-ELSD	g/100g	< 0.25
マルトース	HPLC-ELSD	g/100g	< 0.2
総糖類	Calculation	g/100g	< 0.8
炭水化物	Calculation	g/100g	2.2
エネルギー	Calculation	kJ/100g	1572
エネルギー	Calculation	kcal/100g	373

【 0 1 6 3 】

【表 2】

VTT-E-193585 として寄託された分離菌株の乾燥細胞粉末のアミノ酸組成

パラメタ	方法	単位	値
リジン	Ion chromatography	%	3.95
メチオニン	Ion chromatography	%	1.60
システイン	Ion chromatography	%	0.39
アスパラギン酸	Ion chromatography	%	6.82
スレオニン	Ion chromatography	%	3.47
セリン	Ion chromatography	%	2.75
グルタミン	Ion chromatography	%	8.84
プロリン	Ion chromatography	%	3.14
グリシン	Ion chromatography	%	4.40
アラニン	Ion chromatography	%	6.94
バリン	Ion chromatography	%	4.96
イソロイシン	Ion chromatography	%	3.34
ロイシン	Ion chromatography	%	6.08
チロシン	Ion chromatography	%	2.99
フェニルアラニン	Ion chromatography	%	4.58
ヒスジチン	Ion chromatography	%	1.66
アルギニン	Ion chromatography	%	4.96
トリプトファン	HPLC	%	1.34

【 0 1 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 3】

VTT-E-193585 として寄託された分離菌株の乾燥細胞粉末の脂肪酸組成

パラメタ	方法	単位	値
C16:0 (パルミチン酸)	GC-MS	%	24.8
C16:1 (パルミトレイン酸)	GC-MS	%	3.0
C18:0 (ステアリン酸)	GC-MS	%	4.4
C18:1n9 (オレイン酸)	GC-MS	%	59.9
C18:2n6 (リノール酸)	GC-MS	%	6.1
C18:3n3 (α-リノレン酸)	GC-MS	%	0.4

10

【 0 1 6 5 】

【表 4】

VTT-E-193585 として寄託された分離菌株の乾燥細胞粉末のビタミン含有

パラメタ	方法	単位	値
ビタミン A (RE)	HPLC	IU/100 g	<100
ビタミン E (TE)	HPLC	mg/100 g	0.33
ビタミン D3	HPLC	IU/100 g	<10
ビタミン D2	HPLC	IU/100 g	21.6
ビタミン C	HPLC	mg/100 g	<1
塩化チアミン塩酸塩	LC-MS/MS	mg/100 g	0.9
ビタミン B1 (チアミン)	Calculation	mg/100 g	0.708
ビタミン B2 (リボフラビン)	HPLC	mg/100 g	6.27
ピリドキシン塩酸塩	HPLC	mg/100 g	3.39
ビタミン B6 (ピリドキシン)	Calculation	mg/100 g	2.79
ビタミン B12	LC-MS/MS	µg/100 g	224
塩化コリン	LC-MS/MS	mg/100 g	14.3
ピオチン n	LC-MS/MS	µg/100 g	15.6
葉酸	Microbiological	µg/100 g	1270
ナイアシン(ビタミン B3)	Microbiological	mg/100 g	23.2
パントテン酸	Microbiological	mg/100 g	6.53

20

【 0 1 6 6 】

(実施例 3) 異なる窒素源で単離された細菌株の培養

VTT-E-193585として寄託された分離された細菌株は、 1 5 容器の 2 0 0 m L パラレル バイオリアクターシステム (Medicel Explorer、Medicel Oy、フィンランド) 内で培養された。混合は、800rpmで回転するラシュトン型インペラを使用して行われた。

30

培養は、温度30 に維持された。p Hは1M NaOHを添加することで6.8に維持された。培地は、0.23g/L KH₂PO₄、0.29g/L Na₂HPO₄・2H₂O、0.005g/L NaVO₃・H₂O、0.2g/L FeSO₄・7H₂O、0.5g/L MgSO₄・7H₂O、0.01g/L CaSO₄、0.00015g/L Na₂MoO₄・2H₂O、0.005g/L MnSO₄、0.0005g/L ZnSO₄・7H₂O、0.0015g/L H₃BO₃、0.001g/L CoSO₄、0.00005g/L CuSO₄、及び0.0001g/L NiSO₄を水道水で調製して構成された。

さらに、窒素源は、 4 つの培養物は18.7 mM NH₄OHを含み、 4 つの培養物は9.34 mM尿素(OC(NH₂)₂)を含み、 4 つの培養物は18.7 mM硝酸カリウム(KNO₃)を含み、 3 つの培養物は培地中の窒素源なしとなるように変えた。22 mL/min の水素ガス、3.2mL/minのエア、及び6.4mL/minの二酸化炭素ガスを含む混合物が、主なエネルギー源及び炭素源として定期的に供給された。

40

さらに空気を使用すると、すべての栽培に窒素ガスも供給された。サンプルを自動的に採取し、600nmでの吸光度を測定して細胞密度を光学密度として分析することにより、増殖をモニターした (Ultrospec 2100 pro UV /可視分光光度計、Biochrom Ltd.、英国) 。

培養物の成長曲線を図2に示す。アンモニアと尿素での成長は同等であった。硝酸塩または窒素ガスでの成長は、アンモニア又は尿素よりも明らかに遅かった。

培養の終わりに向かって、硝酸塩での成長は、唯一の窒素源としての窒素ガスでの成長

50

よりも良かった。それにもかかわらず、窒素ガスが唯一の窒素源である培養においても成長があり、VTT-E-193585として寄託された分離菌株は窒素固定が可能であることを示している。

【 0 1 6 7 】

(実施例 4) 抗生物質感受性の特性

VTT-E-193585として寄託された分離細菌株に対するゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、シプロフロキサシン、コリスチンおよびホスホマイシンの抗生物質感受性をCLSI M07-A111標準（臨床検査標準協会。好氣的に増殖する細菌の希釈抗菌薬感受性試験の方法、第11版 CLSI標準M07、2018）に従って測定した。

10

アンピシリン、シプロフロキサシン、コリスチンにはハンドメイドの微量希釈プレートを用、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン及びテトラサイクリンにはVet MIC Lact-1プレート（SVA National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden）でブロス微量希釈法を使用し、ホスホマイシンには、陽イオン調整ミューラーヒントンプロス培地（LabM、LAB114、陽イオン Mg^{2+} および Ca^{2+} を別々に添加）を使用して、 $35 \pm 2^{\circ}C$ で 48 ± 1 時間の好気性条件で寒天希釈法を使用して測定した。

Escherichia coli ATCC 25922がクオリティコントロール株として使用され、好気性条件で $35 \pm 2^{\circ}C$ で 18 ± 2 時間培養された。菌株の抗生物質感受性の結果を表5に示す。

分離細菌菌株は一般的に抗生物質に感受性があることがわかった。ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、およびテトラサイクリンのVTT-E-193585の最小発育阻止濃度（MIC）値は、*E. coli* ATCC 25922よりも低いか同等であったが、アンピシリン、シプロフロキサシン、コリスチン、およびホスホマイシンの場合、MIC値はVTT-E-193585より高かった。

20

【 0 1 6 8 】

【 表 5 】

最小発育阻止濃度(MIC, $\mu g/ml$) VTT-E-193585 菌株及び大腸菌 *Escherichia coli* ATCC25922 に対する抗生物質の値

	VTT-E-193585 48 h $\pm$ 1 h	<i>E. coli</i> ATCC 25922 18 h $\pm$ 2 h
ゲンタマイシン	0.5	0.5
カナマイシン	2	4
ストレプトマイシン	0.5	4
テトラサイクリン	0.25	1
アンピシリン	16	8
シプロフロキサシン	0.06	0.008
コリスチン	4	2
ホスホマイシン	32	0.5

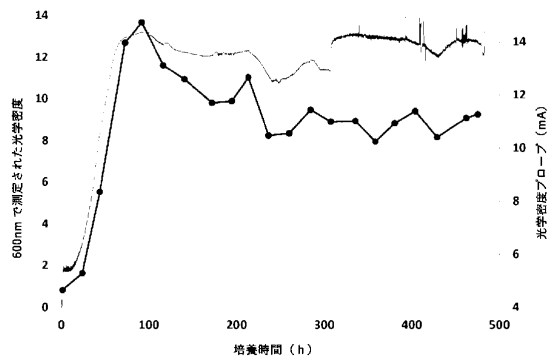
30

40

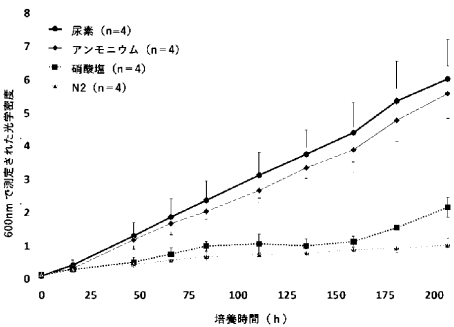
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

【配列表】

[0007514918000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 1 2 R1:01

(56)参考文献

特開昭 6 2 - 0 5 8 9 8 9 (J P , A)
特表 2 0 1 9 - 5 1 7 7 7 5 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 8 / 1 4 4 9 6 5 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 3 8
C 1 2 P 2 1 / 0 0 - 0 8
UniProt / GeneSeq
SwissProt / GeneSeq