

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/127716

発行日 平成26年7月24日 (2014. 7. 24)

(43) 国際公開日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2013-505767 (P2013-505767)	(71) 出願人 599016431 学校法人 芝浦工業大学 東京都江東区豊洲3丁目7番5号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/071442	
(22) 国際出願日 平成23年9月21日 (2011. 9. 21)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-65289 (P2011-65289)	(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日 平成23年3月24日 (2011. 3. 24)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 山下 光雄 東京都江東区豊洲3丁目7番5号 学校法人芝浦工業大学内
	(72) 発明者 池 道彦 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人大阪大学内
	Fターム(参考) 4B024 AA17 BA08 CA01 DA09 EA10 GA11 4B050 CC03 DD02 LL05 4B064 AA04 CA21 CB16 DA16 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セレン酸還元活性を示すタンパク質

(57) 【要約】

本発明の課題は、セレン酸還元活性を示すタンパク質、それをコードする遺伝子、それらを使用するセレン酸の還元方法を提供することである。本発明によれば、以下からなる群より選択されるタンパク質が提供される。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質 ;

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質 ; および

(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 9 8 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下からなる群より選択されるタンパク質：

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
- (c) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。

10

【請求項 2】

以下からなる群より選択されるタンパク質：

- (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
- (b) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
- (c) 配列番号 4 のアミノ酸配列と 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。

20

【請求項 3】

以下からなる群より選択されるタンパク質：

- (a) 配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
- (b) 配列番号 6 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
- (c) 配列番号 6 のアミノ酸配列と 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。

30

【請求項 4】

以下からなる群より選択されるタンパク質：

- (a) 配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
- (b) 配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
- (c) 配列番号 8 のアミノ酸配列と 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。

40

【請求項 5】

請求項 1 記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 6】

以下からなる群より選択される、請求項 5 記載の核酸。

- (a) 配列番号 1 の塩基配列からなる核酸；

50

(b) 配列番号 1 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

【請求項 7】

請求項 2 記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 8】

以下からなる群より選択される、請求項 7 記載の核酸。

(a) 配列番号 3 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 3 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

10

【請求項 9】

請求項 3 記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 10】

以下からなる群より選択される、請求項 9 記載の核酸。

(a) 配列番号 5 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 5 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

20

【請求項 11】

請求項 4 記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 12】

以下からなる群より選択される、請求項 11 記載の核酸。

(a) 配列番号 7 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 7 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

30

【請求項 13】

請求項 5 又は 6 に記載の核酸を含む組み換えベクター。

【請求項 14】

請求項 7 又は 8 に記載の核酸を含む組み換えベクター。

【請求項 15】

請求項 9 又は 10 に記載の核酸を含む組み換えベクター。

【請求項 16】

請求項 11 又は 12 に記載の核酸を含む組み換えベクター。

【請求項 17】

請求項 5 又は 6 に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

40

【請求項 18】

請求項 7 又は 8 に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 19】

請求項 9 又は 10 に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 20】

請求項 11 又は 12 に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 21】

請求項 1 記載のタンパク質、請求項 2 記載のタンパク質、請求項 3 記載のタンパク質、及び請求項 4 記載のタンパク質を宿主細胞において発現させることを含む、セレン酸の還元

50

方法。

【請求項 2 2】

請求項 5 又は 6 記載の核酸、請求項 7 又は 8 記載の核酸、請求項 9 又は 10 記載の核酸、及び請求項 11 又は 12 記載の核酸を宿主細胞に導入することによって、請求項 1 記載のタンパク質、請求項 2 記載のタンパク質、請求項 3 記載のタンパク質、及び請求項 4 記載のタンパク質を宿主細胞において発現させる、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、セレン酸還元活性を示すタンパク質、それをコードする遺伝子、それらを使用するセレン酸の還元方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

微量金属（レアメタル）の一種であるセレンは、生物にとって必須元素であるが、水溶性のセレン化合物（セレン酸、亜セレン酸など）は生物に対する毒性を有する。セレンは、コピー機、ガラスの着色など幅広い用途に使用されているので、その供給源の確保は重要である。また、廃水、廃棄物中のセレン化合物の人の健康および生態系への影響が問題となっている。セレン酸の無毒化および除去の方法としては、樹脂吸着、電気化学的方法などが従来より検討されているが、効率、コストなどの問題から実用には至っていなかった。また、このような方法によってセレンを回収して再利用することはできなかった。

20

【0003】

本発明者らは、セレン化合物の生物学的処理方法の開発を目指して、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株を単離した（特許文献1）。*Pseudomonas stutzeri* NT-1株は、セレン酸を亜セレン酸に効率的に還元し、さらに亜セレン酸を元素態セレンへ還元する能力を有する。元素態セレンは水に不溶性であり、無毒であるので、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株を使用すれば、比較的安価に、セレン化合物を含有する廃水などを無毒化し、そこからセレンを回収して再利用できる可能性がある。微生物を利用したセレン化合物の処理およびセレンの回収をより効率的に行うためには、処理条件の検討や設備の開発に加えて、セレン化合物の還元に関与する分子機構を明らかにする必要がある。しかし、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株については、セレン化合物の還元に関与する分子機構は明らかになっていない。

30

【0004】

一方、特許文献2には、グラム陽性細菌*Bacillus selenatarsenatis* SF-1株に由来するセレン酸還元活性を増強する能力を有するタンパク質、それをコードする遺伝子、それらを使用するセレン酸の還元方法が記載されている。*Pseudomonas stutzeri* NT-1株では好気・嫌気両条件下でセレン酸を還元し、菌体外にセレンを生成し、亜セレン酸の還元能力が大きいのに対し、*Bacillus selenatarsenatis* SF-1株は嫌気条件下でセレン酸を還元し、菌体内にセレンが蓄積し、亜セレン酸の還元能力が小さいという、相違点がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0005】

【特許文献1】特開2010-142166号公報

【特許文献2】国際公開W02010/070968号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、セレン酸還元活性を示すタンパク質、それをコードする遺伝子、それらを使用するセレン酸の還元方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株からセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする遺伝子を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の態様は以下に関する。

- [1] 以下からなる群より選択されるタンパク質：
(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質；
(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
(c) 配列番号2のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。 10
- [2] 以下からなる群より選択されるタンパク質：
(a) 配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質；
(b) 配列番号4のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
(c) 配列番号4のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。 20
- [3] 以下からなる群より選択されるタンパク質：
(a) 配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質；
(b) 配列番号6のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
(c) 配列番号6のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。 30
- [4] 以下からなる群より選択されるタンパク質：
(a) 配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質；
(b) 配列番号8のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および
(c) 配列番号8のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質。 40
- [5] [1]記載のタンパク質をコードする核酸。
- [6] 以下からなる群より選択される、[5]記載の核酸。
(a) 配列番号1の塩基配列からなる核酸；
(b) 配列番号1のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸 50

配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

[7] [2] 記載のタンパク質をコードする核酸。

[8] 以下からなる群より選択される、[7] 記載の核酸。

(a) 配列番号 3 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 3 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

[9] [3] 記載のタンパク質をコードする核酸。

10

[10] 以下からなる群より選択される、[9] 記載の核酸。

(a) 配列番号 5 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 5 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

[11] [4] 記載のタンパク質をコードする核酸。

[12] 以下からなる群より選択される、[11] 記載の核酸。

(a) 配列番号 7 の塩基配列からなる核酸；

(b) 配列番号 7 のヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号 6 のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸。

20

[13] [5] 又は [6] に記載の核酸を含む組み換えベクター。

[14] [7] 又は [8] に記載の核酸を含む組み換えベクター。

[15] [9] 又は [10] に記載の核酸を含む組み換えベクター。

[16] [11] 又は [12] に記載の核酸を含む組み換えベクター。

[17] [5] 又は [6] に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

[18] [7] 又は [8] に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

[19] [9] 又は [10] に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

30

[20] [11] 又は [12] に記載の核酸を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

[21] [1] 記載のタンパク質、[2] 記載のタンパク質、[3] 記載のタンパク質、及び [4] 記載のタンパク質を宿主細胞において発現させることを含む、セレン酸の還元方法。

[22] [5] 又は [6] 記載の核酸、[7] 又は [8] 記載の核酸、[9] 又は [10] 記載の核酸、及び [11] 又は [12] 記載の核酸を宿主細胞に導入することによって、[1] 記載のタンパク質、[2] 記載のタンパク質、[3] 記載のタンパク質、及び [4] 記載のタンパク質を宿主細胞において発現させる、[13] に記載の方法。

【発明の効果】

40

【0009】

本発明によって、セレン酸還元活性を示すタンパク質、それをコードする遺伝子、それらを使用するセレン酸の還元方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、トランスポゾン変異とinverse PCRを示す。

【図2】図2は、0.5 mMのセレン酸を含むTSBプレート上での変異株によるセレン酸還元を示す。

【図3】図3は、1 mMのセレン酸または亜セレン酸を含む液体培地における*Pseudomonas stutzeri* NT-I株の野生株及び変異株を24時間培養したときのセレン酸還元を示す

50

。

【図4】図4は、NT-IAM2及びNT-IAM4ゲノムにおけるmini-Tn5挿入部位の隣接領域を示す

。

【図5】図5は、NT-IAM3ゲノムにおけるmini-Tn5挿入部位の隣接領域を示す。

【図6】図6は、SerABDCの組み立てと輸送の模式図を示す。

【図7】図7は、*T. selenatis*、*P. stutzeri* NT-1、*B. selenatarsenatis* SF-1のセレン酸還元酵素遺伝子オペロンの構成の比較を示す。

【図8】図8は、serABDC遺伝子を含むpGEM-Teasyベクター（左側）又はpGEM-Teasyベクターのみ（右側）を大腸菌*Escherichia coli* DH5 株に導入した形質転換体の写真を示す

。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本明細書において使用する「セレン化合物」なる用語は、セレンを含有する化合物を指す。セレン化合物の例としてはセレン酸、亜セレン酸などが挙げられる。本明細書において使用する「元素態セレン」なる用語は、他の元素と化合物を形成していない元素の形態のセレンを指す。

【0012】

本明細書において使用する「セレン酸還元活性」なる用語は、セレン酸を亜セレン酸に還元する活性を指す。本明細書において使用する「セレン酸還元酵素」なる用語は、セレンの亜セレン酸への還元を触媒するタンパク質を指す。本明細書において使用する「亜セレン酸還元活性」なる用語は、亜セレン酸を元素態セレンに還元する活性を指す。本明細書において使用する「亜セレン酸還元酵素」なる用語は、亜セレン酸の元素態セレンへの還元を触媒するタンパク質を指す。

【0013】

Pseudomonas stutzeri NT-1株は、セレン酸還元活性、および亜セレン酸還元活性を有することが知られている（特許文献1）。セレン酸還元活性は、セレン酸から生成される亜セレン酸を定量することによって測定することができる。亜セレン酸還元活性は、亜セレン酸から生成される元素態セレンを定量することによって測定することができる。核酸にコードされるタンパク質が有するセレン酸還元活性は、例えば、この遺伝子を、*Escherichia coli* (Bebien, M. et al., *Microbiology*, 148:3865-3872 (2002)) に導入した際に元素態セレンが生成することを、セレン酸含有培地上でのコロニーによる赤色の呈色を観察することによって確認することができる。

【0014】

本発明のタンパク質は、NT-1株由来のSerA、SerB、SerD、及びSerCであるが、serAの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2に示し、serBの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号3及び4に示し、serDの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号5及び6に示し、serCの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号7及び8に示す。

【0015】

NT-1株のserABDCはORFの連続性からオペロンであることが推測される。Blastx解析により、SerAはモリブデンを含むcatalytic subunit、SerBは鉄-硫黄クラスターを含むfour cluster protein subunit、SerDはモリブデン酵素の組み立てに関与するシャペロンたんぱく質、SerCはヘムを含む水溶性タンパク質であることが示唆された。この構成は*Thauer a selenatis*のセレン酸還元酵素遺伝子serABDCと酷似している。一方で、*Bacillus selenatarsenatis*のセレン酸還元酵素遺伝子srdBCAは、srdBが鉄-硫黄クラスターを含むfour cluster protein subunit、srdCが膜貫通領域を持つmembrane anchor protein subunit、srdAがモリブデンを含むcatalytic subunitをそれぞれコードしており、serABDCオペロンとはORFの順序が異なり、また、srdBCAオペロンにはシャペロンたんぱく質をコードするORFがない点が異なっている（図7）。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

SerAは推定分子量103 kDaで、モリブデンを含むcatalytic subunitであると推測される。このサブユニットは細菌のモリブデン酵素に広く見出されるもので、セレン酸のような電子受容体に電子を与え、還元する反応を直接的に触媒していると考えられている。このサブユニットは、一般的にモリブデンの他に鉄-硫黄クラスターの種類である[4Fe-4S]クラスターを持っていることが知られている。NT-I株のSerAについても、そのアミノ酸配列上に[4Fe-4S]クラスター結合モチーフを構成すると推測されるCys77、Cys81、Cys115、Cys122、の4つのシステイン残基が見出されたことから、セレン酸還元を触媒するcatalytic subunitとして機能していると推測される。

【 0 0 1 7 】

SerBは推定分子量37 kDaで、鉄-硫黄クラスターを含むfour cluster protein subunitであると推測される。このサブユニットは細菌のモリブデン酵素に広く見出されるもので、電子供与体から受け取った電子をcatalytic subunitに受け渡す役割を持つと考えられている。このサブユニットは一般的に4つの鉄-硫黄クラスター(FS1 - FS4)を含むことが知られている。NT-I株のSerBについても、そのアミノ酸配列上に鉄-硫黄クラスター結合モチーフを構成すると推測されるFS1 : CLGCHTCTMACK (アミノ酸15 - 26)、FS2 : CNHCSNPACLAACP (アミノ酸134 - 147)、FS3 : CKGYRYCVKACP (アミノ酸167 - 178)、FS4 : CIGCYPREVEKGEAPACVKQCS (アミノ酸194 - 214)の4つのモチーフが見出されたことから、4つの鉄-硫黄クラスターを持つと推測される。また、FS1、FS2、FS4は4つのシステイン残基を含んでいるが、FS3は3つのシステイン残基を含むことから、4つの鉄-硫黄クラスターのうち3つは[4Fe-4S]クラスター、残る1つは[3Fe-4S]クラスターであることが推測される。これは、*B. selenatarsenatis* SF-1のSrdBが4つの[4Fe-4S]クラスターを含んでいることと異なっている。

【 0 0 1 8 】

SerDは推定分子量22 kDaで、モリブデン酵素の組み立てに関わるシャペロンたんぱく質であると推測される。このようなたんぱく質は最終的なモリブデン酵素の複合体には加わらないが、catalytic subunitの持つtwin arginine translocation signal peptideに会合することにより未成熟のcatalytic subunitが細胞質から細胞膜外に防ぎ、モリブデン補因子が正常にcatalytic subunitに挿入されるとともに脱会合することによりcatalytic subunitの細胞膜外への輸送を許可するという働きを持つ。*B. selenatarsenatis* SF-1においてはこのような働きを持つたんぱく質は見出されていない。

【 0 0 1 9 】

SerCは推定分子量26 kDaで、ヘムを含む水溶性タンパク質であると推測される。モリブデン酵素は膜貫通領域を含むサブユニットによって細胞膜に結合されているものが多く、*B. selenatarsenatis* SF-1のSrdBCAもこのタイプであると推定されるが、SerCは水溶性タンパク質であることから、NT-I株のSerABCはペリプラズム領域に存在する水溶性酵素であることが推測される。

【 0 0 2 0 】

以下の実施例の表3に示す通り、NT-I株のserABDC構造遺伝子、及び推測されるアミノ酸配列は*Thauera selenatis*のものと83~95%の高い相同性を示す(表3)。なお、アミノ酸配列の同一性の算出にはBLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)を使用した。

【 0 0 2 1 】

本発明によれば、

配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

配列番号4のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配

10

20

30

40

50

列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

配列番号6のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；および

配列番号8のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

も有用である。

【0022】

上記における「1もしくは数個のアミノ酸」とは、例えば1から10個のアミノ酸、好ましくは1から8個のアミノ酸、より好ましくは1から5個のアミノ酸、さらに好ましくは1から3個のアミノ酸を意味する。

【0023】

さらに本発明によれば、

配列番号2のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

配列番号4のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

配列番号6のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；及び

配列番号8のアミノ酸配列と98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質及び配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質；

も有用である。

【0024】

本発明においては、上記のようなセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸が使用される。1つの実施態様において、この核酸は配列番号1、3、5または7の塩基配列からなる核酸である。別の実施態様において、本発明の核酸は、配列番号1、3、5または7の塩基配列からなる核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつそれぞれ所定のタンパク質と組み合わせた場合にセレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする核酸である。本明細書において使用する「ストリンジентな条件」なる用語は、緊縮なハイブリダイゼーションの条件をさす。このような条件は、例えば Sambrook, J. et al. (eds), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)などに記載されている。100ヌクレオチド以上の長いプローブを使用する場合のストリンジентな条件の例としては、6×SSC、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、5×Denhardt's試薬、100µg/mL変性断片化サケ精子DNA中68でのインキュベーション、2×SSC、0.1%SDS中室温での洗浄(SSC濃度を0.1まで下げる、および/または温度を68まで上げる)が挙げられる。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明のセレン酸の還元方法において、セレン酸還元活性を示すタンパク質を宿主細胞において発現させる。宿主細胞としては、任意の細胞を使用することができるが、セレン化合物の存在下で生存できる細菌が好ましい。1つの実施態様において、セレン酸還元活性を示すタンパク質の発現は、このタンパク質をコードする核酸を宿主細胞に導入することによって行われる。この目的のためには、組換えDNA技術が確立されている細菌を宿主として使用することが好ましい。そのような細菌の例としては、限定するものではないが、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*などが挙げられる。核酸の導入には、選択された宿主細胞において複製可能なベクターが使用される。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、ウイルスなどに由来するものが使用できる。核酸を含むベクターには目的の遺伝子の転写の開始および終結を担う配列（プロモーター、ターミネーターなど）、翻訳の開始に必要とされる配列（リボソーム結合部位など）が含まれる。当業者は、宿主細胞に適切なこれらの配列を選択することができる。例えば、セレン酸還元活性を示すタンパク質をコードする配列の上流に本来存在するプロモーターが宿主細胞中で機能する場合はそのプロモーターを利用することができ、あるいは宿主細胞において機能する別のプロモーターの制御下に目的の遺伝子を配置して発現させることもできる。

10

【0026】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

【実施例】

【0027】

実施例1：セレン酸還元変異株の取得

接合伝達によって*Pseudomonas stutzeri* NT-I株にトランスポゾンMini-Tn5(Biomedical, S.L.)を導入し(図1)、変異株ライブラリーを作製した。

具体的には以下の様に行った。受容菌*Pseudomonas stutzeri* NT-I株をTSB培地に植菌し、28度で終夜培養する。トランスポゾンMini-Tn5を含有する供与菌である大腸菌*Escherichia coli* S17-1株をLB培地に植菌し、37度で終夜培養する。同量の受容菌培養液と供与菌培養液を混合し、遠心分離後、上清を捨てる。10mM硫酸マグネシウムを含む極少量のLB培地に懸濁後、懸濁液をLB寒天培地上におき、28-37度で8-18時間培養する。寒天培地上で増殖した混合菌体を10mM硫酸マグネシウム溶液5mLに懸濁する。その懸濁液を適宜希釈し、最終濃度10-30 mg/mLのテトラサイクリンを含むTSB寒天培地に播種し、28度で終夜培養する。この様にして、トランスポゾンMini-Tn5由来のテトラサイクリン遺伝子が、受容菌*Pseudomonas stutzeri* NT-I株のゲノムDNAにランダムに挿入された変異株ライブラリーを作製した。

30

【0028】

ライブラリーより、セレン酸を含む寒天培地上で、元素態セレン生成を示す赤色を呈色しない株を、セレン酸還元能変異株として取得した。Mini-Tn5の導入の結果、3株(NT-IAM2, NT-IAM3, NT-IAM4)のセレン酸還元能変異株が得られた。NT-IAM2及びNT-IAM4は完全に白く、またNT-IAM3は一部赤いもののほとんどの部分が白かった(図2)。また、亜セレン酸を含む培地では、全ての株が赤色のコロニーを形成した。上記の結果から、これらの変異株は、セレン酸を還元できないことが示唆された。

40

【0029】

実施例2：セレン酸還元変異株のセレン酸、亜セレン酸の還元率の測定

TSB 3 g/Lを添加した乳酸無機塩培地で、野生株と各変異株をそれぞれ、28度で24時間好氣的に前々培養した。同培地に、前々培養液をOD = 0.02になるよう植菌し、28-12時間好氣的に前培養した。1 mMのセレン酸または亜セレン酸を含む同培地に、前培養液をOD = 0.02になるよう植菌し、本培養を開始した。バイアルにシリコセンをしたものを好気条件、気相部を窒素置換しブチルゴム栓をしたものを嫌気条件とした。経時的にサンプリングし、セレン酸、亜セレン酸濃度をイオンクロマトグラフィーで測定した。セレン酸または亜セレン酸の初期添加濃度に対する、培養24時間後までに還元されたものの割合をセレン酸または亜セレン酸還元率として示した。

50

【 0 0 3 0 】

測定の結果を図 3 に示す。

野生株は好気条件下、嫌気条件下のいずれにおいてもセレン酸を 9 6 ~ 9 7 % 還元し、また好気条件下において亜セレン酸を 9 5 % 還元した。

一方で、いずれの変異株も、好気、嫌気両条件ともにセレン酸還元率が大きく低下し、特に好気条件下においてはNT-IAM2及びNT-IAM4はまったく還元しなかった。NT-IAM3は、好気、嫌気両条件下においてわずかな還元 (1 1 ~ 1 3 %) を示した。

亜セレン酸については、いずれの変異株も還元率が低下しているが、完全に還元能が失われることはなかった。

従って、3株の変異株において、Mini-Tn5が破壊されている遺伝子は、亜セレン酸還元10
に部分的な影響を持つものの、主にセレン酸還元に関わるものであり、好気、嫌気いずれの条件下でも働いているものと推測された。

【 0 0 3 1 】

実施例 3 : セレン酸還元関連遺伝子群の単離

変異株NT-IAM2, NT-IAM3, NT-IAM4について、(SphI等の制限酵素で変異株のゲノムDNAを切断し、適当なプライマーを作製後)、InversePCR法により、ゲノム中の Mini-Tn5近傍の配列を増幅し、クローニングした (図 1)。決定した配列を含む領域を、全ゲノム配列データより取得した。Blastxによって、遺伝子領域の推定とアノテーションを行い、Blastnによって既知遺伝子との塩基配列との相同性を調べた。

【 0 0 3 2 】

NT-IAM2及びNT-IAM4はともに、Mini-Tn5によって、セレン酸還元関連酵素遺伝子serAが破壊されていることが分かった。serABDCは、そのORFの連続性からオペロンを形成していることが強く示唆された (図 4)。serABDCの周辺には、モリブデン補因子生合成酵素遺伝子moaAや、oxyanionセンサーをコードすると推測されるオペロンの存在が示唆された。serAの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 及び 2 に示し、serBの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 3 及び 4 に示し、serDの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 5 及び 6 に示し、serCの塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 7 及び 8 に示す。また、NT-I株におけるserABDC遺伝子座 (プロモーター領域、serABDCのORF、ターミネーター領域を含む) の塩基配列を配列表の配列番号 9 に示す。

【 0 0 3 3 】

【表 1】

表 1 : 図 4 に示す各ORFによりコードされるタンパク質の推定機能

ORF	Length [bp]	Predictive function
a	1.0	MoaA molybdenum cofactor biosynthesis
b	0.7	SerC selenate reductase gamma subunit
c	0.6	SerD selenate reductase chaperon protein
d	1.0	SerB selenate reductase beta subunit
e	2.8	SerA selenate reductase alfa subunit
f	1.0	AoxX Oxyanion binding protein
g	1.4	Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase
h	1.3	Two component sigma54 specific Fis family transcriptional regulator

【 0 0 3 4 】

NT-IAM3は、Mini-Tn5によって、モリブドプテリン生合成酵素遺伝子moaEが破壊されていることがわかった。moaCDEは、そのORFの連続性からオペロンを形成していることが強く示唆された (図 5)。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2：図 5 に示す各 ORF によりコードされるタンパク質の推定機能

ORF	Length [bp]	Putative function
a	0.7	Phospholipase / carboxylesterase
b	1.4	RhlB ATP-dependent RNA helicase
c	0.2	Hypothetical protein
d	0.5	MoaE molybdopterin biosynthesis protein
e	0.2	MoaD molybdopterin synthase subunit
f	0.5	MoaC molybdenum cofactor biosynthesis protein
g	1.4	PhoH family Phosphate starvation-inducible protein
h	1.0	Metal transporter

10

【 0 0 3 6 】

serABDCが、NT-I株のセレン酸還元酵素をコードしていることが示唆された。セレン酸還元酵素SerABDCは、嫌気条件下でセレン酸を還元する細菌であるThauera selenatisにおいて詳細な生化学的研究が行われており、SerAにはモリブデン補因子であるMo-bis-MGDと[4Fe-4S]クラスター、SerBには3つの[4Fe-4S]クラスターと1つの[3Fe-4S]クラスター、SerCにはheme-bが含まれていることが明らかとなっている。また、SerDはSerAへのモリブドプテリンの組み込みを制御するsystem specific chaperonであることが示唆されて

20

【 0 0 3 7 】

NT-I株のserABDC構造遺伝子、及び推測されるアミノ酸配列はThauera selenatisのものと同様のもので83~95%の高い相同性を示し(表3)、Thauera selenatisのSerABDCと同様の構成をもった酵素であることが推測される。また、Thauera selenatisが嫌気条件下のみでセレン酸を還元するのに対し、NT-I株は好気・嫌気両条件下でセレン酸を還元するという点が大きく異なるが、プロモーター領域の塩基配列の相同性が低いこと(48%)が、セレン酸還元能の発現制御の差異の要因であることが推測された。

【 0 0 3 8 】

【表 3】

30

表 3：NT-I株及びThauera selenatisから単離されたserABDCオペロンの塩基配列及び推定アミノ酸配列の相同性

	Identity				
	Promoter	serA	serB	serD	serC
Nucleotide	48	83	86	86	95
Deduced amino acid	-	83	88	87	93

【 0 0 3 9 】

NT-I株のセレン酸還元酵素SerABDCの組み立てと輸送は、図6のように推測される。SerAおよびSerBは細胞質でMo-bis-MGDや、鉄・硫黄クラスターに組み込まれる。SerAのN末端領域にはTATシグナルペプチドが存在しており、折りたたまれた酵素を細胞膜外に輸送するTAT経路によって、SerABはペリプラズム領域に輸送される。SerDはSerAにMo-bis-MGDが挿入されるまではTATシグナルペプチドに結合していることにより、補因子挿入が不完全のままにSerABが輸送されることを防ぐ。また、SerCはN末端領域にSecシグナルペプチドが存在しており、Sec経路によってペリプラズムに輸送された後、折りたたまれ、heme-bが挿入される。SerABCは最終的にペリプラズムで会合し、セレン酸を触媒する。

40

【 0 0 4 0 】

また、SerAに挿入されるMo-bis-MGDは2分子のGPTとモリブデン酸よりMoaA, MoaC, MoaDEを含む一連の合成酵素群によって合成される。MoaA及びMoaCは、GTPの環状化反応

50

、MoaDEはチオール基の導入を触媒することが知られている。

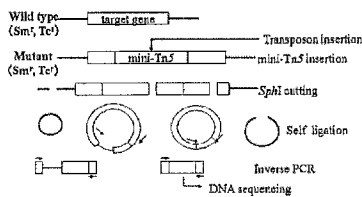
【 0 0 4 1 】

実施例 4：セレン酸還元酵素をコードする遺伝子の発現

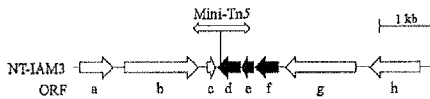
上記の実施例 3 で示した serABDC 遺伝子を含むように PCR にて DNA を増幅した。増幅産物を pGEM-T Easy ベクター (Promega 社) と結合し、大腸菌 *Escherichia coli* DH5 株を形質転換した。形質転換体の写真を図 8 に示す。図 8 の右側は、pGEM-T Easy というベクターだけを保有するネガティブコントロールとなる大腸菌を示し、図 8 の左側は、pGEMserABDC というベクターを保有するポジティブコントロールとなる大腸菌を示す。これは、pGEM-T Easy ベクターに lac プロモーターと逆方向に serABDC オペロンが挿入されたプラスミド DNA を保有した大腸菌である。即ち、serABDC オペロン由来のプロモーターから転写されていることが示唆される。どちらの大腸菌も 0.5 mM のセレン酸を加えた LB 寒天培地で増殖し、左側のベクター pGEMserABDC を保有する大腸菌の方が赤色になっていることが観察された。

10

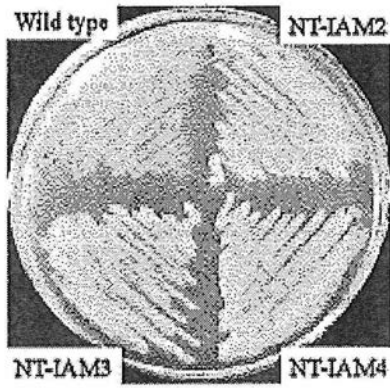
【 図 1 】



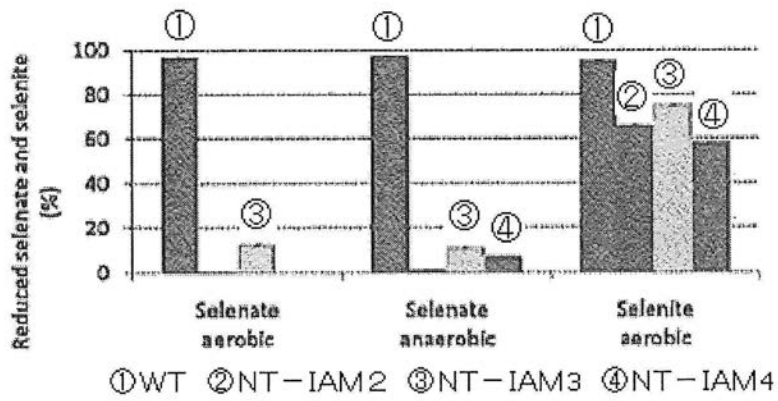
【 図 5 】



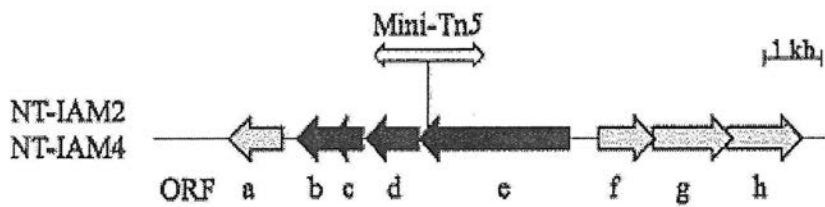
【 図 2 】



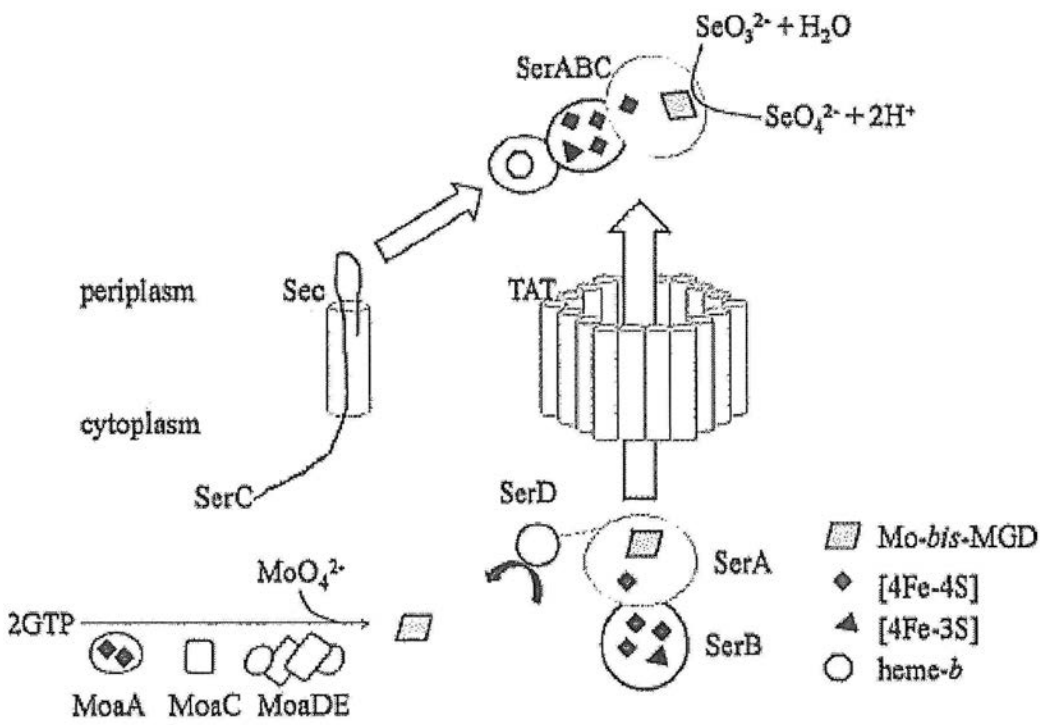
【 図 3 】



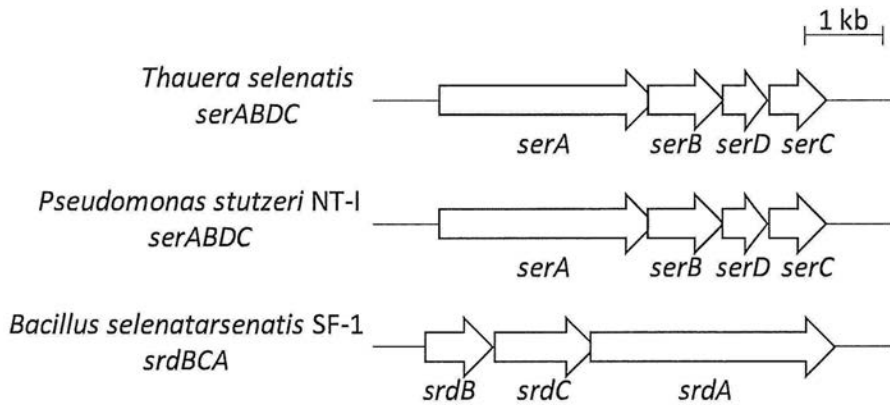
【 図 4 】



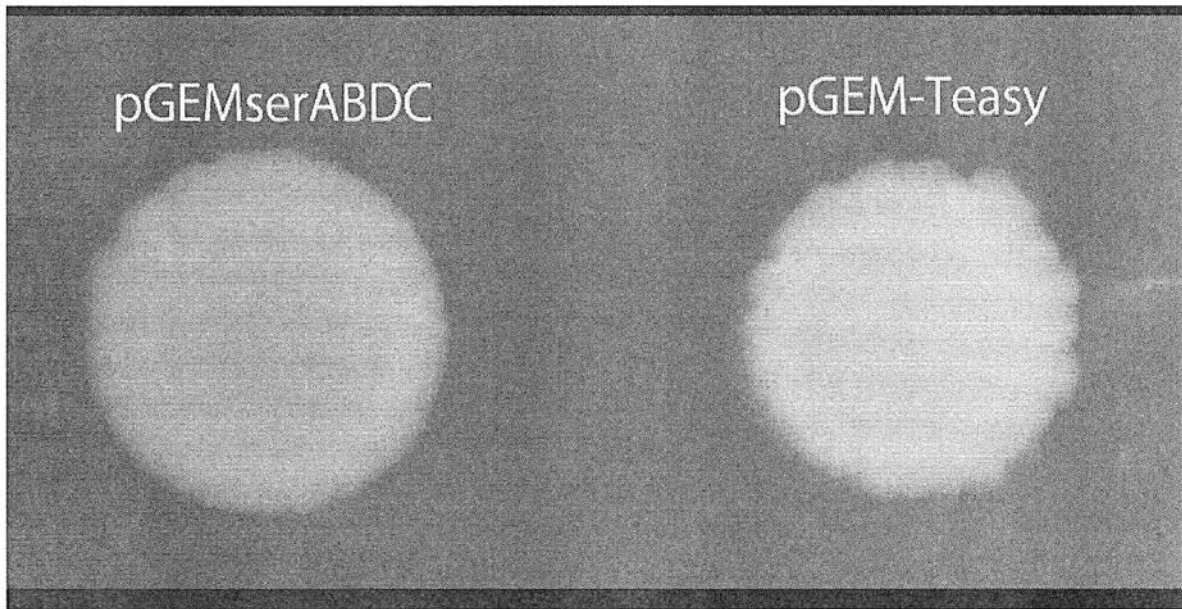
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2012127716000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/071442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P3/00(2006.01)i		
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) C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P3/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-142166 A (Shibaura Institute of Technology), 01 July 2010 (01.07.2010), entire text (Family: none)	1-22
Y	Emiko MIWA et al., "Pseudomonas stutzeri NT-I no Selenic Acid Kangenno Hen'ikabu no Shutoku to sono Kaiseki", Japanese Journal of Water Treatment Biology, 15 October 2010 (15.10.2010), separate volume, no.30, page 15	1-22
Y	Dridge EJ. et al., Investigation of the redox centres of periplasmic selenate reductase from Thauera selenatis by EPR spectroscopy., Biochem J., 2007, Vol.408, No.1, p.19-28	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 30 November, 2011 (30.11.11)		Date of mailing of the international search report 13 December, 2011 (13.12.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/071442

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Toshifumi SAKAGUCHI, "Kaiyo Biseibutsu ni yoru Selenium Kaishu no Kanosei", Journal of Japanese Society for Extremophils, 2010, vol.9, no.2, pages 116 to 128	1-22
Y	Thorell HD. et al., A gene cluster for chlorate metabolism in Ideonella dechloratans., Appl. Environ. Microbiol., 2003, Vol.69, No.9, p.5585-5592	1-22
A	Masashi KURODA et al., "Identification of genes related to selenate reduction in Pseudomonas stutzeri NT-I", Dai 62 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 September 2010 (25.09.2010), page 107, 2P-2004	1-22

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 1 4 4 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P3/00(2006.01)i			
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. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P3/00			
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			
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 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, 医学・薬学予稿集全データベース			
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	
Y	JP 2010-142166 A (学校法人 芝浦工業大学) 2010.07.01, 全文 (ファミリーなし)	1-22	
Y	三輪恵美子他, Pseudomonas stutzeri NT-I のセレン酸還元能変異株の取得とその解析, 日本水処理生物学会誌, 2010.10.15, 別巻第30号, 第15頁	1-22	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 30.11.2011		国際調査報告の発送日 13.12.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 長谷川 茜	4 N 3 2 2 8
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 1 4 4 2
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
Y	Dridge E.J. et al., Investigation of the redox centres of periplasmic selenate reductase from <i>Thauera selenatis</i> by EPR spectroscopy., Biochem J., 2007, Vol.408, No.1, p.19-28	1-22
Y	阪口利文, 海洋微生物によるセレン回収の可能性, Journal of Japanese Society for Extremophils, 2010, Vol.9, No.2, p.116-128	1-22
Y	Thorell HD. et al., A gene cluster for chlorate metabolism in <i>Ideonella dechloratans</i> ., Appl. Environ. Microbiol., 2003, Vol.69, No.9, p.5585-5592	1-22
A	黒田真史他, <i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の単離及び解析, 第62回日本生物工学会大会講演要旨集, 2010.09.25, 第107頁、 2P-2004	1-22

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 P	3/00	(2006.01)	C 1 2 P	3/00	Z	
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成21年度経済産業省産業技術研究開発委託事業(レアメタル抽出技術開発)、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの)

Fターム(参考) 4B065 AA26X AA41Y AB01 AC14 BA01 CA01 CA56

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。