

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5933909号
(P5933909)

(45) 発行日 平成28年6月15日(2016.6.15)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C O 7 C 67/58 (2006.01)

C O 7 C 69/24 (2006.01)

C O 7 C 69/533 (2006.01)

C O 7 C 69/58 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C O 7 C 67/58 Z N A

C O 7 C 69/24

C O 7 C 69/533

C O 7 C 69/58

請求項の数 10 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-511091 (P2009-511091)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月18日(2007.5.18)
 (65) 公表番号 特表2010-505388 (P2010-505388A)
 (43) 公表日 平成22年2月25日(2010.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/011923
 (87) 国際公開番号 W02007/136762
 (87) 国際公開日 平成19年11月29日(2007.11.29)
 審査請求日 平成22年5月18日(2010.5.18)
 審判番号 不服2014-10542 (P2014-10542/J1)
 審判請求日 平成26年6月4日(2014.6.4)
 (31) 優先権主張番号 60/802,016
 (32) 優先日 平成18年5月19日(2006.5.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/801,995
 (32) 優先日 平成18年5月19日(2006.5.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 514258384
 アールイージー ライフ サイエンスズ
 リミテッド ライアビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国 アイオワ州 エームズ
 サウス ベル アベニュー 416
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪酸およびその誘導体の生産

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂肪酸エステルを産生するように改変された培養微生物であって、該改変された微生物が、アセチル-CoA カルボキシラーゼ (EC 6.4.1.2) をコードする外来性核酸配列、ろうエステルシンターゼ (EC 2.3.1.75) をコードする外来性核酸配列、および、チオエステラーゼ (3.1.2.-、3.1.1.-) をコードする外来性核酸配列を含み、ここで該核酸配列が発現され、該改変された微生物が fadDを発現し、かつ、脂肪酸エステルを産生する、前記改変された培養微生物。

【請求項 2】

fadEが減弱されている請求項 1 の改変された微生物。

10

【請求項 3】

該微生物が、発酵ブロス、および少なくとも 10 mg / L の脂肪酸エステルまたは少なくとも 10 mg / L のろうを含む容器中にて培養されている請求項 1 ~ 2 のいずれかの改変された微生物。

【請求項 4】

該培養微生物が 1 から 5 の二重結合を含む脂肪酸エステルを産生する請求項 1 ~ 3 のいずれかの改変された微生物。

【請求項 5】

該培養微生物が 8 から 30 の炭素鎖長を含む脂肪酸エステルを産生する請求項 1 ~ 4 のいずれかの改変された微生物。

20

【請求項 6】

脂肪酸エステルが 1 から 5 の分枝点を含む請求項 1 ~ 5 のいずれかの微生物。

【請求項 7】

該微生物が、アルスロバクター・エスピー(*Arthrobacter* sp.)、バシラス・エスピー(*Bacillus* sp.)、ボツリオコッカス・ブラウニ(*Botryococcus braunii*)、クロマチウム・エスピー(*Chromatium* sp.)、クラドスポリウム・レシナ(*Cladosporium resina*)(ATCC22711)、クロストリジウム・パステウリアヌム・ブイケーエム(*Clostridium pasteurianum* VKM)、クロストリジウム・テナノモルフム(*Clostridium tenanomorphum*)、クロストリジウム・アシディウリキ(*Clostridium acidurici*)、コリネバクテリウム種(*Corynebacterium* species)、シアノバクテリア種(*cyanobacterial species*)(ノストック・ムスコルム(*Nostoc muscorum*)、アナシステイス(シネココッカス)・ニドゥランス(*Anacystis (Synechococcus) nidulans*)、フォルミジウム・ルリダム(*Phormidium luridum*)、クロログロエア・フリツキ(*Chlorogloea fritschii*)、トリコデスミウム・エリタエウム(*Trichodesmium erythraeum*)、オシラトリア・ウィリアムシ(*Oscillatoria williamsii*)、ミクロコレウス・キトノブラセイス(*Microcoleus chthonoplaseis*)、コッククロリス・エラベンス(*Coccochloris elabens*)、アグメネルム・クアドルプリカツム(*Agmenellum quadruplicatum*)、プレクトネマ・テレブランズ(*Plectonema terebrans*)、エム・ヴァギナツス(*M. vaginatus*)およびシー・スコプロルム(*C. scopulorum*)、デスルフォビブリオ・デスルフリカンス(*Desulfovibrio desulfuricans*)(ATCC29577)、キネオコッカス・ラジオトレランス(*Kineococcus radiotolerans*)(BAA-149)、ミクロコッカス・ルテウス(*Micrococcus luteus*)(FD533、ATCC 272、381、382、ISU、540、4698、7468、27141)、ミクロコッカス・エスピー(*Micrococcus* sp.)(ATCC 146、398、401、533)、ミクロコッカス・ロセウス(*Micrococcus roseus*)(ATCC 412、416、516)、ミクロコッカス・リソデイクチクス(*Micrococcus lysodeikticus*)、マイコバクテリウム種(*Mycobacterium* species)、ペニシリウム・エスピー(*Penicillium* sp.)、アスペルギルス・エスピー(*Aspergillus* sp.)、トリコデルマ・ビリダ(*Trichoderma virida*)、プルラリア・プルランス(*Pullularia pullulans*)、ジェオトガリコッカス・エスピー(*Jeotgalicoccus* sp.)(エム・カンディカンス(*M. candidans*))(ATCC 8456)、ロドシュードモナス・スフェロイド(*Rhodopseudomonas spheroids*)、クロロビウム・エスピー(*Chlorobium* sp.)、ロドスピリリウム・ルブラム(*Rhodospirillum rubrum*)(ATCC11170)、ロドミクロビウム・バニエリ(*Rhodomicrobium vannielii*)、ステノトロフォモナス・マルトフィリア(*Stenotrophomonas maltophilia*)(ATCC 13637、17444、17445、17666、17668、17673、17674、17679、17677)、サッカロマイコデス・ルドウィギ(*Saccharomyces ludwigii*)(ATCC 22711)、サッカロマイセス・エスピー(*Saccharomyces* sp.)(オビフォルムス(*oviformus*)、ルドウィギ(*ludwigii*)、トロピカリス(*tropicalis*))、ビブリオ・ファーニッシ(*Vibrio furnissii*)M1、ビブリオ・マリヌス(*Vibrio marinus*)MP-1、ビブリオ・ポンチクス(*Vibrio ponticus*)、セッラティア・マリノルブラ(*Serratia marinorubra*)、ウスティラゴ・マイデイス(*Ustilago maydis*)、ウスティラゴ・ヌダ(*Ustilago nuda*)、ウロシステイス・アグロピリ(*Urocystis agropyri*)、スファセロテカ・レイリアナ(*Sphaerolotheca reiliana*)、またはティレティア・エスピー(*Tilletia* sp.)(フォエチダ(*foetida*)、カリエス(*caries*)、コントロヴェルサ(*controversa*))である、請求項 1 ~ 6 のいずれかの改変された微生物。

【請求項 8】

該微生物が大腸菌(*E. coli*)である請求項 1 ~ 6 のいずれかの改変された微生物。

【請求項 9】

以下の工程を含む、精製脂肪酸エステルを得る方法：

- 請求項 1 ~ 8 のいずれかの微生物を、脂肪酸エステルを産生するのに十分な条件下で培養容器中で培養する工程；
- 脂肪酸エステルを有機相中に分離させる工程；および、
- 有機相から脂肪酸エステルを得る工程。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

該微生物が炭素源の存在下で培養される請求項 9 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願とのクロスリフェレンス

本出願は、2006年5月19出願の米国仮出願第60/802,016号、2006年5月19出願の米国仮出願第60/801,995号、2007年3月28日出願の米国仮出願 60/908,547および2007年2月13日出願のPCT出願番号 PCT/US2007/003736からの優先権を主張し、これらはすべて引用により本明細書に含まれる。

【 0 0 0 2 】

10

分野

脂肪酸生合成経路からの生成物(脂肪酸誘導体)を生産する遺伝子操作された微生物、およびその使用方法が提供される。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

背景

技術開発に伴って、燃料源への依存が高まっており、かかる燃料源はますます制限され取得が困難となってきている。今までにない速度で起こっている化石燃料の燃焼により、世界の燃料需要はすぐに現在の燃料の供給を上回ってしまうであろう。

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

そのため、太陽光、水力、風力、およびバイオマスなどの再生可能エネルギー源を利用する努力がなされてきている。石油源に由来しない燃料の新しい源を作るためのバイオマスの利用(即ち、バイオ燃料)が1つの選択肢として現れている。バイオ燃料(バイオディーゼル)は、長鎖アルカンおよびエステルでできている生分解性、クリーンな燃焼の可燃燃料である。バイオディーゼルは、「真の」バイオディーゼルと称される純粋な形態、または、通常の石油ディーゼルといくらかの濃度にて混合物として、ほとんどの内燃ディーゼルエンジンにおいて利用可能である。バイオディーゼルを作る現在の方法は、トリアシルグリセリド(主に植物油)のエステル交換を含み、これは脂肪酸エステルと望ましくない副産物であるグリセリンの混合物を導き、したがって、経済的非効率をもたらす異種の生成物および廃棄物が生じる。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

概要

脂肪酸生合成経路に由来する生成物(脂肪酸誘導体)を合成することができ、所望によりかかる生成物を発酵プロセスに放出することが出来る組換え微生物が本明細書に開示される。かかる脂肪酸誘導体はとりわけ、バイオ燃料および特殊化学製品として有用である。これらバイオ燃料および特殊化学製品は、さらなる製品、例えば、栄養サプリメント、ポリマー、パラフィン代用品およびパーソナルケア製品の製造に利用できる。

40

【 0 0 0 6 】

本明細書に開示される組換え微生物は、これらに限定されないが以下を含む様々な脂肪酸誘導体を生じるよう操作することが出来る：短鎖アルコール、例えば、エタノール、プロパノール、イソプロパノールおよびブタノール、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、炭化水素およびろうエステル(wax ester)。

【 0 0 0 7 】

一つの例において、本開示は、再生可能な炭素源から生じる脂肪酸誘導体を生産し、所望によりそれを放出するように微生物を改変する方法を提供する。かかる微生物は、例えば、脂肪酸誘導体を生産し、ある例においては分泌するために、再生可能な炭素源を代謝することができる1以上のタンパク質をコードする外来性 DNA 配列を導入することによ

50

り、遺伝子操作される。改変された微生物は、出発物質として再生可能な炭素源（バイオマス）を用いて有用な脂肪酸誘導体を生産するために発酵プロセスにおいて利用可能である。いくつかの例において、既存の遺伝子操作しやすい微生物が、生育、生産の制御および生合成経路効率を下げる副反応の低減または排除のためのその経路の操作の容易性により用いられる。さらに、かかる改変された微生物は、貯蔵または輸送のための特定の方法の必要なく、直接バイオ燃料として利用可能な燃料を作るために再生可能な炭素源を消費するためにも利用できる。別の例において、炭化水素を天然に生産する微生物が、脂肪酸生産を高める外来性核酸配列の発現により炭化水素を過剰生産するように操作される。

【 0 0 0 8 】

規定された炭素鎖長、分枝、および飽和レベルを有する脂肪酸誘導体を生産する微生物を本明細書において提供する。具体的な例において、均質な生成物の生産は、発酵および分離に伴う総コストを低下させる。いくつかの例において、少なくとも1つのチオエステラーゼ (EC 3.1.2.14)、および少なくとも1つのろうシンターゼ (EC 2.3.1.75)をコードする1以上の外来性核酸配列を含む微生物が提供される。別の例において、少なくとも1つの チオエステラーゼ (EC 3.1.2.14) および少なくとも1つの アルコール アセチルトランスフェラーゼ (2.3.1.84)をコードする1以上の外来性核酸配列を含む微生物が提供される。さらに別の例において、少なくとも1つの チオエステラーゼ (EC 3.1.2.14)、少なくとも1つの アシル-CoAレダクターゼ (EC 1.2.1.50)および少なくとも1つの アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)をコードする1以上の外来性核酸配列を含む微生物が提供される。少なくとも1つの チオエステラーゼ (EC 3.1.2.14)および 少なくとも1つの 脂肪アルコール形成アシル-CoAレダクターゼ (1.1.1.*)をコードする1以上の外来性核酸配列を発現する微生物も提供される。外来性核酸配列によってコードされるチオエステラーゼ ペプチドは、均質な生成物を提供するために選択されうる。

【 0 0 0 9 】

いくつかの例において、脂肪酸誘導体を生産するよう操作される微生物は、大腸菌 (*E. coli*)、ゼット・モビリス (*Z. mobilis*)、ロドコッカス・オパクス (*Rhodococcus opacus*)、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*)、ビブリオ・ファーニッシ (*Vibrio furnissii*)、サッカロマイセス・セレピシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ストレプトマイセテス (*Streptomyces*)、ステノトロホモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) またはマイクロコッカス・ロイテウス (*Micrococcus leuteus*) およびそれらの類縁体である。

【 0 0 1 0 】

別の例において、炭化水素を内因的に生産する微生物を、脂肪酸生合成経路を本明細書に記載のように最適化することによって炭化水素を過剰生産するよう操作することが出来る。炭化水素を生産することが知られており、本明細書に提供する教示を用いて炭化水素を過剰生産するよう操作されうる例示的な微生物としては、アルスロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.)、バシラス・エスピー (*Bacillus* sp.)、ボツリオコッカス・ブラウニ (*Botryococcus braunii*)、クロマチウム・エスピー (*Chromatium* sp.)、クラドスポリウム・レシナ (*Cladosporium resina*) (ATCC22711)、クロストリジウム・パステウリアヌム・ブイケーエム (*Clostridium pasteurianum* VKM)、クロストリジウム・テナノモルフム (*Clostridium tenanomorphum*)、クロストリジウム・アシディウリキ (*Clostridium acidurici*)、コリネバクテリウム種 (*Corynebacterium* species)、シアノバクテリア種 (*cyanobacterial* species) (ノストック・ムスコルム (*Nostoc muscorum*)、アナシスティス (*Anacystis*) (シネココッカス (*Synechococcus*))・ニドゥランス (*nidulans*)、フォルミジウム・ルリダム (*Phormidium luridum*)、クロログロエア・フリツキ (*Chlorogloea fritschii*)、トリコデスミウム・エリタエウム (*Trichodesmium erythaeum*)、オシラトリア・ウィリアムシ (*Oscillatoria williamsii*)、マイクロコレウス・キトノブラセイス (*Microcoleus chthonoplas eis*)、コッコクロリス・エラペンス (*Coccochloris elabens*)、アグメネルム・クアドルプリカツム (*Agmenellum quadruplicatum*)、プレクトネマ・テレブランズ (*Plectonema tereb*

10

20

30

40

50

rans)、エム・ヴァギナツス(*M. vaginatus*)および シー・スコプロルム(*C. scopulorum*)、
 デスルフォビブリオ・デスルフリカンス(*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC29577)、
 キネオコッカス・ラジオトレランス(*Kineococcus radiotolerans*) (BAA-149)、ミクロコッ
 カス・ルテウス(*Micrococcus luteus*) (FD533、ATCC 272、381、382、ISU、540、4698、74
 68、27141)、ミクロコッカス・エスピー(*Micrococcus sp.*) (ATCC 146、398、401、533)、
 ミクロコッカス・ロセウス(*Micrococcus roseus*) (ATCC 412、416、516)、ミクロコッカス
 ・リソデイクチクス(*Micrococcus lysodeikticus*)、マイコバクテリウム種(*Mycobacteriu*
m spieces)、ペニシリウム・エスピー(*Penicillium sp.*)、アスペルギルス・エスピー(*As*
pergillus sp.)、トリコデルマ・ピリダ(*Trichoderma virida*)、プルラリア・プルランス
 (*Pullularia pullulans*)、ジェオトガリコッカス・エスピー(*Jeotgalicoccus sp.*) (エム
 ・カンディカンス(*M. candidans*)) (ATCC 8456)、ロドシュードモナス・スフェロイド(*Rho*
dopseudomonas spheroids)、クロロビウム・エスピー(*Chlorobium sp.*)、ロドスピリリ
 ウム・ルブラム(*Rhodospirillum rubrum*) (ATCC11170)、ロドミクロビウム・バニエリ(*Rh*
odomicrobium vannielii)、ステノトロフォモナス・マルトフィリア(*Stenotrophomonas m*
altophilia) (ATCC 13637、17444、17445、17666、17668、17673、17674、17679、17677)
 、サッカロマイコデス・ルドウィギ (*Saccharomycodes ludwigii*) (ATCC 22711)、サッカ
 ロマイセス・エスピー(*Saccharomyces sp.*) (オビフォルムス(*oviformus*)、ルドウィギ(*l*
udwigii)、トロピカリス(*tropicalis*))、ビブリオ・ファーニッシ M1、ビブリオ・マリヌ
 ス(*Vibrio marinus*) MP-1、ビブリオ・ポンチクス(*Vibrio ponticus*)、セッラティア・マ
 リノルブラ(*Serratia marinorubra*)、ウスティラゴ・マイディス(*Ustilago maydis*)、ウ
 スティラゴ・ヌダ(*Ustilago nuda*)、ウロシステイス・アグロピリ(*Urocystis agropyri*)
 、スファセロテカ・レイリアナ(*Sphacelotheca reiliana*)、およびティレティア・エス
 ピー(*Tilletia sp.*) (フォエチダ(*foetida*)、カリエス(*caries*)、コントロヴェルサ(*contr*
oversa))が挙げられる。

10

20

【 0 0 1 1 】

脂肪酸誘導体の生産を可能とする外来性核酸配列を発現するよう操作されていることに
 加えて、微生物はさらに 1 以上の機能的に欠失または減弱された内因性遺伝子を有しう
 る。例えば、ackA (EC 2.7.2.1)、ackB (EC 2.7.2.1)、adhE (EC 1.1.1.1、1.2.1.10)、fab
 F (EC 2.3.1.179)、fabR (受入番号 NP_418398)、fadE (EC 1.3.99.3、1.3.99.-)、GST
 (EC 6.3.2.3)、gpsA (EC 1.1.1.94)、ldhA (EC 1.1.1.28)、pflB (EC 2.3.1.54)、plsB
 (EC 2.3.1.15)、poxB (EC 1.2.2.2)、pta (EC 2.3.1.8)、グルタチオンシンターゼ (EC 6
 .3.2.3) およびそれらの組合せが減弱化されう。

30

【 0 0 1 2 】

脂肪酸誘導体の生産を可能とする外来性核酸配列を発現するよう操作されていることに
 加えて、微生物はさらに 1 以上の過剰発現されるさらなる遺伝子を有しう。例えば、pd
 h、panK、aceEF (ピルビン酸および 2-オキソグルタル酸 デヒドロゲナーゼ 複合体のE1p
 デヒドロゲナーゼ 成分およびE2p ジヒドロリボアミドアシルトランスフェラーゼ 成分
 をコードする、受入番号: NP_414656、NP_414657、EC: 1.2.4.1、2.3.1.61、2.3.1.12)、
 accABCD /fabH /fabD/fabG/acpP/fabF (FASをコードする、受入番号: CAD85557、CAD8555
 8、NP_842277、NP_841683、NP_415613、EC: 2.3.1.180、2.3.1.39、1.1.1.100、1.6.5.3
 、2.3.1.179)、脂肪-アシルCoAレダクターゼをコードする遺伝子 (受入番号: AAC45217、
 EC 1.2.1.-)、UdhAまたは類似の遺伝子 (ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ
 をコードする、受入番号: CAA46822、EC:1.6.1.1) および脂肪-アシルCoAレダクターゼ
 をコードする遺伝子(受入番号: AAC45217、EC 1.2.1.-)。

40

【 0 0 1 3 】

いくつかの例において、本明細書に記載する微生物は、発酵プロス 1 リットル当たり少
 なくとも 1 mgの脂肪酸誘導体を生産する。別の例において、微生物は発酵プロス 1 リッ
 トル当たり少なくとも 100 mg/L、500 mg/L、1 g/L、5 g/L、10 g/L、20 g/L、25 g/L、3
 0 g/L、35 g/L、40 g/L、50 g/L、100 g/L、または 120 g/Lの脂肪酸誘導体を生産する。
 いくつかの例において、脂肪酸誘導体は微生物から生産および放出され、さらに別の例に

50

において、微生物は生成物の分離の前に溶解される。

【0014】

いくつかの例において、脂肪酸誘導体は、少なくとも 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、または34 炭素長の炭素鎖を含む。いくつかの例において 少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、または 95%の作られる脂肪酸誘導体生成物は、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、または 34 炭素長の炭素鎖を含む。さらに別の例において、少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、または 95%の脂肪酸誘導体生成物は 1、2、3、4、または5の不飽和点を含む。

【0015】

脂肪酸誘導体を生産する方法も提供される。これらの方法は、本明細書に記載する微生物を培養する工程および発酵プロセスから生成物を分離する工程を含む。

【0016】

これらおよびその他の例は、以下の詳細な記載においてさらに記載する。

【0017】

図面の簡単な説明

図1はFAS 生合成経路を示す。

【0018】

図2は、ろう(wax)を生産する生合成経路を示す。ろうは、宿主細胞内で生産されたアルコールを用いて宿主細胞中で生産されうるかまたは、外来性アルコールを培地に添加することによって生産されうる。ろうを生産するよう設計された微生物は、外来性核酸配列およびチオエステラーゼ (EC 3.1.2.14) 配列を用いてろうシンターゼ 酵素(EC 2.3.1.75)を生産する。ろうの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸合成に関与する酵素 (FAS 酵素 EC 2.3.1.85)、アシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)、脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (EC 1.1.1.*)、アシル-CoAレダクターゼ (1.2.1.50) およびアルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)が含まれる。

【0019】

図3は、脂肪アルコールを生産する生合成経路を示す。規定された炭素鎖長を有する脂肪アルコールは、チオエステラーゼ(EC 3.1.2.14)、およびアシル-CoAレダクターゼ(EC 1.2.1.50)、アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) と脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)との組合せをコードする外来性核酸配列を発現させることによって生産されうる。脂肪アルコールの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸合成に関与する酵素 (FAS 酵素EC 2.3.1.85)、およびアシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)が含まれる。

【0020】

図4は、脂肪酸エステルを生産する生合成経路を示す。規定された炭素鎖長を有する脂肪酸エステルは、様々なチオエステラーゼ(EC 3.1.2.14)、アシル-CoAレダクターゼ (1.2.1.50)、アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)、および脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)の組合せ、ならびに、アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.84)を外来性に発現させることにより生産されうる。脂肪酸エステルの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸 合成に関与する酵素 (FAS 酵素 EC 2.3.1.85)およびアシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)が含まれる。

【0021】

図5は、pCDFduet-1-fadD-acr1および様々なチオエステラーゼ遺伝子を含むプラスミドで共形質転換された実施例4に記載の株による脂肪アルコール 生産を示す。この株を振盪フラスコ中で0.4% グルコースを含むM9 ミネラル培地で25 で好氣的に培養した。飽和C10、C12、C14、C16 および C18 脂肪アルコールが同定された。少量の C16:1およびC18:1脂肪アルコールもいくつかのサンプルにおいて検出された。脂肪アルコールを細胞ペレットから酢酸エチルを用いて抽出し、N-トリメチルシリル (TMS) イミダゾールを用いて誘導体化し、検出を向上させた。

【0022】

10

20

30

40

50

図6は、生産株からの脂肪アルコールの放出を示す。生産された脂肪アルコールのおよそ 50% が37 °C で培養された場合に細胞から放出された。

【 0 0 2 3 】

図7A-7D は、アルコール アセチルトランスフェラーゼ (AAT、EC 2.3.1.84)を発現する生産宿主およびろうシンターゼ (EC 2.3.1.75)を発現する生産宿主により生産されたオクチルオクタノエート (C8C8)のGS-MS スペクトルを示す。図7Aは、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはADP1 (ろうシンターゼ)を発現した。図7B は、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはSAATを発現した。図7Cは、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはADP1 (ろうシンターゼ)またはSAATを含んでいなかった。図7Dは、C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) (ここでpHZ1.43 プラスミドはSAATを発現した)により生産されたC8C8のマスマスペクトルおよびフラグメンテーションパターンを示す。

10

【 0 0 2 4 】

図8は、*A. baylyi* ADP1 (WSadp1) からのろうシンターゼが生産宿主において*Cuphea hookeriana* からのチオエステラーゼ遺伝子と共発現された場合に作られたエチルエステルの分布を示す。

【 0 0 2 5 】

図9Aおよび9Bは、GC/MS 分析のクロマトグラムを示す。図9Aは、プラスミド pCDFDuet-1-fadD-WSadp1、pETDuet-1-tesAで形質転換された大腸菌 LS9001 株の培養物のエチル抽出物のクロマトグラムを示す。エタノールを発酵に加えた。図9Bは、エチルヘキサデカノエートおよび参照として用いた エチルオレエートのクロマトグラムを示す。

20

【 0 0 2 6 】

図10は、脂肪酸誘導体生産を高めるために過剰発現または減弱されうる様々な遺伝子を同定する表を示す。この表はまた、脂肪酸誘導体生成物の構造を変化させるよう調節されうる様々な遺伝子も同定する。当業者であれば、脂肪酸誘導体の構造を変化させるのに用いられる遺伝子のいくつかは、脂肪酸誘導体の生産も上昇させることを理解するであろう。

【 0 0 2 7 】

30

略語および用語

以下の用語および方法の説明は、本開示を詳細に説明するため、および本開示を実施する当業者へのガイドのために提供する。本明細書において用いる場合、「含む」とは、「包含する」という意味であり、単数形「ある」または「1つの」または「その」は、特に断りのない限り複数形を包含する。例えば、「細胞を含む」という記載は、1または複数のかかる細胞を包含し、「チオエステラーゼを含む」という記載は、1以上のチオエステラーゼ ペプチドおよび当業者に知られたその均等物に対する言及を包含する、といった具合である。用語「または」とは、特に断りのない限り、記載された選択肢である複数の要素の1つの要素または2以上の要素の組合せを意味する。例えば、「チオエステラーゼ 活性または脂肪アルコール-形成アシル-CoAレダクターゼ活性」という表現は、チオエステラーゼ 活性、脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ 活性、または脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ 活性とチオエステラーゼ 活性との両方の組合せを指す。

40

【 0 0 2 8 】

特に断りのない限り、本明細書において用いるすべての技術および科学用語は本開示が属する分野の当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似または同等の方法および材料が本開示の実施または試験において使用できるが、好適な方法および材料を以下に記載する。材料、方法および実施例は単に例示のためのものであり、限定の意図はない。本開示のその他の特徴は以下の詳細な説明および請求の範囲から明らかである。

50

【 0 0 2 9 】

受入番号: 本明細書にわたり、受入番号は、米国の国立衛生研究所により維持されるNCBI データベース (National Center for Biotechnology Information) に由来する。受入番号は、2007年3月27日にデータベースにおいて提供されているものである。

【 0 0 3 0 】

酵素分類番号 (EC): 本明細書にわたり提供されているEC 番号は東京大学に部分的に支援されているKyoto Encyclopedia of Genes and Genomicsに維持されているKEGG Ligand データベースに由来する。EC番号は、2007年3月27日にデータベースにおいて提供されているものである。

【 0 0 3 1 】

10

減弱する: あるものの影響、活性または強度を弱めることである。一例において、フィードバック阻害または生成物または反応物ではない組成物によって起こる阻害(非経路特異的フィードバック)に対する特定の酵素の感受性は、酵素活性が化合物の存在によって影響されないように弱められる。例えば、fabH 遺伝子およびその対応するアミノ酸配列は温度感受性であり、温度変化に対する感受性を低下するよう変化されうる。fabH 遺伝子の減弱は分枝アミノ酸が望ましい場合に利用できる。別の例において、活性が低くなるよう改変された酵素は減弱されたと称されうる。

【 0 0 3 2 】

酵素の機能的欠失は、酵素の減弱のために用いられ得る。機能的欠失は、遺伝子配列または遺伝子配列の転写を制御する配列に対してなされる突然変異、部分的または完全な欠失、挿入、またはその他の変異であって、遺伝子産物の生産を低下または阻害するか、または遺伝子産物を非機能的にするものである (即ち、plsB 遺伝子に対する本明細書に記載する突然変異)。例えば、大腸菌におけるfabRの機能的欠失は、脂肪酸合成経路の抑制を低下させ、大腸菌により不飽和の脂肪酸(UFA)を生産させる。いくつかの例において、機能的欠失は、ロックアウト突然変異として記載される。

20

【 0 0 3 3 】

当業者であれば酵素活性を減弱させる多くの方法が存在することを理解している。例えば、減弱は、核酸配列を変化させることによりアミノ酸配列変化を導入すること、より活性の低いプロモーターの制御下に遺伝子をおくこと、目的遺伝子を標的化する干渉RNA、リボザイムまたはアンチセンス配列を発現させること、またはその他の当該技術分野で知られた技術により達成することが出来る。

30

【 0 0 3 4 】

炭素源: 一般に、原核または単純な真核細胞生育のための炭素の源として使用するために好適な基質または化合物をいう。炭素源は様々な形態であり得、これらに限定されないが、ポリマー、炭水化物、酸、アルコール、アルデヒド、ケトン、アミノ酸、ペプチド等が含まれる。これらには、例えば、様々な単糖、例えば、グルコース、オリゴ糖、多糖、セルロース性材料、キシロース、およびアラビノース、二糖、例えば、スクロース、飽和または不飽和脂肪酸、コハク酸、乳酸、酢酸、エタノール等またはそれらの混合物が含まれる。炭素源はさらに光合成産物であってもよく、これに限定されないが、グルコースが含まれる。

40

【 0 0 3 5 】

cDNA (相補的 DNA): 内部の非コードセグメント (イントロン) および転写を規定する調節配列を欠くDNA片である。cDNAは、細胞から抽出したメッセンジャー RNAからの逆転写により合成されうる。

【 0 0 3 6 】

欠失: 核酸分子からの1以上のヌクレオチドまたはタンパク質からの1以上のアミノ酸の除去であり、その両側の領域が一緒にされ連結される。

【 0 0 3 7 】

検出可能: 存在していることが確認できること。例えば、反応物からの生成物の生産、例えば、C18 脂肪酸の生産は、以下の実施例11に示す方法を用いて検出可能である。

50

【 0 0 3 8 】

DNA: デオキシリボ核酸。DNAはほとんどの生物の遺伝子材料を含む長鎖 ポリマーである(いくつかのウイルスは、リボ核酸、RNAを含む遺伝子を有する)。DNA ポリマーにおける反復単位は4種類のヌクレオチドであり、そのそれぞれはアデニン、グアニン、シトシンおよびチミン の4つの塩基の1つを含み、それはデオキシリボース糖に結合しており、糖にはリン酸基が結合している。DNA 分子におけるコドンと称されるヌクレオチドのトリプレットがペプチドにおけるアミノ酸をコードする。コドンという用語はまた、DNA 配列が転写されるmRNAにおける3つのヌクレオチドの対応する(および相補的な) 配列についても用いられる。

【 0 0 3 9 】

10

内因性:核酸分子および特定の細胞または微生物に言及して本明細書において用いる場合、細胞中において組換え操作技術を用いて細胞に導入されたものではない核酸配列またはペプチドをいう。例えば、遺伝子は、細胞が元々天然から単離された場合に細胞中に存在していた。遺伝子は、制御配列、例えば、転写または翻訳を活性化するプロモーターまたはエンハンサー配列が組換え技術を介して改変された場合も内因性であると考えられる。

【 0 0 4 0 】

外来性:核酸分子および特定の細胞に言及して本明細書において用いる場合、天然にみられる特定の細胞に起因していない核酸分子をいう。したがって、非天然核酸分子は細胞にいったん導入されると細胞に対して外来性であるとみなされる。天然の核酸分子も特定の細胞に対して外来性であることがある。例えば、細胞 X から単離された全長コード配列は、そのコード配列が細胞 Yに導入されると、XとYとが同じ細胞タイプであっても細胞 Yに対して外来性核酸である。

20

【 0 0 4 1 】

発現:遺伝子にコードされる情報が細胞の構造および機能、例えば、タンパク質、トランスファー RNA、またはリボソーム RNAに変換されるプロセスである。発現した遺伝子には mRNAに転写され、次いでタンパク質に翻訳されるものもあるし、RNAに転写されるがタンパク質に翻訳されないものもある(例えば、トランスファーおよびリボソーム RNA)。

【 0 0 4 2 】

30

脂肪エステル: 脂肪酸からできたあらゆるエステルを含む。脂肪酸における炭素鎖は本明細書に記載する修飾のあらゆる組合せを含みうる。例えば、炭素鎖は1以上の 不飽和点、1以上の分枝点、例えば環状分枝を含み得、短鎖または長鎖に操作されうる。脂肪酸エステルを形成するためにはあらゆるアルコールが利用でき、例えば、脂肪酸生合成経路由来のアルコール、生産宿主により非脂肪酸生合成経路を介して生産されたアルコール、および発酵プロセスにおいて供給されるアルコールが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

脂肪酸誘導体:宿主生物の脂肪酸生合成経路から部分的にはできている生成物を含む。脂肪酸生合成経路は、本明細書に記載のように脂肪酸誘導体を生産するよう操作されうる脂肪酸 シンターゼ 酵素を含み、いくつかの例においてさらなる酵素とともに発現されて所望の炭素鎖特徴を有する脂肪酸誘導体を生産することができる。例示的な脂肪酸誘導体としては、例えば、短鎖および長鎖アルコール、炭化水素および脂肪酸エステル、例えば、
ろうが挙げられる。

40

【 0 0 4 4 】

発酵プロセス:微生物(即ち、炭素を活性に代謝する微生物)の生命を支持するあらゆる培地を含む。発酵培地は通常炭素源を含む。炭素源は、さらなる酵素の有無に拘わらず、微生物によってエネルギーのために利用されうるあらゆるものでありうる。

【 0 0 4 5 】

炭化水素: 元素、炭素 (C) および水素 (H)を含む化学物質を包含する。すべての炭化水素は、炭素バックボーンおよびそのバックボーンに結合した水素原子からなる。この用

50

語は、用語「脂肪族炭化水素」の短縮形として用いられることがある。基本的に3つのタイプの炭化水素が存在する：(1)少なくとも1つの芳香族環を有する芳香族炭化水素；(2)アルカンとも称され、二重、三重または芳香族結合を有さない、飽和炭化水素；および(3)炭素原子間に1以上の二重または三重結合を有し、アルケン、アルキンおよびジエンに分けられる不飽和炭化水素。液体の地質から抽出された炭化水素は、石油（逐語的には「ロックオイル」）またはミネラルオイルと称され、ガス状の地質由来の炭化水素は天然ガスと称される。すべてが有機化学物質の生産のための原材料としての燃料および原料の重要な源であり、石油地質学的手段を用いて地球の地表面下に通常見いだされる。堆積岩中の石油備蓄はエネルギーおよび化学工業のための炭化水素の主な源である。炭化水素は経済的に非常に重要である。というのはそれらは主な化石燃料（石炭、石油、天然ガス、等）およびバイオ燃料ならびにプラスチック、ろう、溶媒および油の構成成分を包含するからである。

10

【0046】

単離：「単離された」生物学的成分（例えば、核酸分子、タンパク質、または細胞）は実質的に成分が天然に存在するその他の生物学的成分、例えば、その他の染色体および染色体外 DNA およびRNA、およびタンパク質から分離または精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準的精製方法によって精製された核酸分子およびタンパク質を含む。この用語はまた、宿主細胞において組換え発現により調製された核酸分子およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸分子およびタンパク質も包含する。

【0047】

20

一例において、単離されているとは、それが由来する生物の天然ゲノムにおいてそれが直近に隣接している配列の両方（一方は5'末端および一方は3'末端）に直近していない天然核酸分子をいう。

【0048】

微生物：古細菌ドメイン、真正細菌ドメインおよび真核生物ドメインに由来する原核および真核微生物種を含み、後者には酵母および糸状菌、原生動物、藻類、またはより高等の原生生物が含まれる。用語「微生物細胞」および「微生物(microbe)」は微生物という用語と互換的に用いられる。

【0049】

核酸分子：RNAとDNA分子との両方を包含し、限定されないが、cDNA、ゲノムDNA、およびmRNAが含まれる。合成核酸分子、例えば、化学合成されたものまたは組換え生産されたものが含まれる。核酸分子は二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖である場合、核酸分子はセンス鎖またはアンチセンス鎖であり得る。さらに、核酸分子は環状または直鎖状であり得る。

30

【0050】

作動可能に連結：第一の核酸配列が第二の核酸配列と機能的関係に位置している場合、第一の核酸配列は第二の核酸配列に作動可能に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したDNA配列は近接しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。単一のメッセージRNAとしてタンデムに転写される別々の遺伝子の立体配置はオペロンと称される。したがって単一のプロモーターの転写調節下に、例えばプラスミドベクター中に遺伝子を近接させることは、合成オペロンを構成する。

40

【0051】

ORF（オープンリーディングフレーム）：一連の、終止コドンなしにアミノ酸をコードするヌクレオチドトリプレット（コドン）。これら配列は通常ペプチドへと翻訳されうる。

【0052】

過剰発現：ある遺伝子が、その遺伝子の内因性転写速度と比較して高い速度で転写されるようにされている場合である。いくつかの例において、過剰発現はさらにその遺伝子の内因性翻訳速度と比較して遺伝子の翻訳の高い速度も含む。過剰発現を試験する方法は

50

当該技術分野で周知であり、例えば 転写された RNA レベルはrtPCRを用いて評価でき、タンパク質 レベルはSDS pageゲル分析を用いて評価できる。

【 0 0 5 3 】

精製:精製という用語は完全に純粋であることを要求するわけではない;むしろ、それは相対的用語として意図される。したがって、例えば、精製脂肪酸誘導体調製物、例えば、ろう、または脂肪酸エステル調製物は、生成物が細胞内の環境におけるよりも生成物がより高濃度にあるものである。例えば、精製ろうは、それに付随しうる細胞成分(核酸、脂質、炭水化物、及びその他のペプチド)から実質的に分離されたものである。別の例において、精製ろう調製物は、ろうが実質的に汚染物質、例えば、発酵の後に存在しうるもの、を含まないものである。

10

【 0 0 5 4 】

一例において、脂肪酸エステルはサンプルの少なくとも 約 50重量%が脂肪酸エステルで構成されている場合、例えばサンプルの少なくとも 約 60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、98%、または99% あるいはそれ以上が脂肪酸エステルから構成されている場合、精製されている。ろう、脂肪アルコールおよび脂肪酸エステルの精製に用いる方法の例としては、以下の実施例11に記載の方法が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

組換え:組換え核酸分子またはタンパク質は、天然ではない配列を有するもの、配列の2つの別々のセグメントの人工的組合せにより作られた配列を有するもの、またはその両方である。この人工的組合せは、例えば、核酸分子またはタンパク質の単離されたセグメントの化学合成または人工的操作によって、例えば、遺伝子操作技術によって達成される。組換えはまた、人工的に操作されているが、核酸が単離された生物にみられるものと同じ調節配列およびコード領域を含む核酸分子を記載するのにも用いられる。組換え細胞または微生物は、外来性 核酸分子、例えば、組換え核酸分子を含むものである。

20

【 0 0 5 6 】

放出:化合物の細胞の内側(細胞内)から細胞の外側(細胞外)への移動である。移動は能動的であっても受動的であってもよい。放出が能動的である場合、それは1以上のトランスポーターペプチドによって促進され得、いくつかの例においてそれはエネルギーを消費しうる。放出が受動的である場合、それは膜を横切る拡散を介して起こり得、細胞外環境から連続的に所望の化合物を回収することによって促進され得、さらなる拡散が促進される。化合物の放出は細胞の溶解によっても達成されうる。

30

【 0 0 5 7 】

界面活性剤:それが溶解されている液体の表面張力を低下させることが出来る物質である。それは典型的には水溶性頭部と炭化水素鎖または尾部から構成される。水溶性基は親水性であり、イオン性または非イオン性であり得、炭化水素鎖は疎水性である。界面活性剤は様々な製品、例えば、洗浄剤および洗剤に用いられており、織物、革および紙の補助剤として、化学的プロセスにおいて、化粧品および医薬品において、食品産業および農業においても使用されている。さらに、それは環境にアクセスしにくいことが見いだされている粗製油の抽出および単離を助けるためにまたは水乳濁液としても利用されうる。

【 0 0 5 8 】

異なる用途を特徴とする4つのタイプの界面活性剤が存在する。アニオン性界面活性剤は洗浄剤様活性を有し、一般に洗浄用途に用いられる。カチオン性界面活性剤は長鎖炭化水素を含み、タンパク質および合成 ポリマーの処理にしばしば用いられ、あるいは織物柔軟剤およびヘアコンディショナーの成分である。両性界面活性剤も長鎖炭化水素を含み、典型的にはシャンプーに用いられる。非イオン性界面活性剤は 一般にクリーニング製品に用いられる。

40

【 0 0 5 9 】

形質転換または組換え細胞:例えば分子生物学技術によって例えば、 アシル-CoA シンターゼをコードする核酸分子といった核酸分子が導入された細胞である。形質転換は核酸分子が細胞に導入されうるあらゆる技術を含み、例えば、これらに限定されないが、ウイ

50

ルスベクターによるトランスフェクション、コンジュゲーション、プラスミドベクターによる形質転換、および裸のDNAの、エレクトロポレーション、リポフェクション、およびパーティクルガン加速による導入が挙げられる。

【0060】

生成物の生産を可能とする条件下: 所望の生成物、例えば、脂肪酸、炭化水素、脂肪アルコール、ろう、または脂肪酸エステルを微生物が生産するのを可能とするあらゆる発酵条件である。発酵条件には、通常、温度範囲、通気レベル、および一緒にすると微生物の生育を可能とする培地の選択が含まれる。例示的な培地としてはブロスまたはゲルが含まれる。一般に、培地は炭素源、例えば、グルコース、フルクトース、セルロース等を含み、これは微生物によって直接代謝されうるか、あるいは酵素が炭素源の代謝を促進するために培地中に使用されうる。培養条件が生成物の生産を可能とするかを決定するために、微生物を24、36、または48時間培養すればよく、サンプルを得て分析するとよい。例えば、細胞が培養されるサンプルまたは培地における細胞を、所望の生成物の存在について試験するとよい。生成物の存在を試験する場合、例えば、以下の実施例に提供するアッセイを用いることが出来る。

10

【0061】

ベクター: 細胞に導入されると、形質転換細胞を生じる核酸分子である。ベクターは、細胞中でそれを複製可能とする核酸配列、例えば、複製起点を含みうる。ベクターはまた、1以上の選択可能マーカー遺伝子および当該技術分野において知られているその他の遺伝的要素を含みうる。

20

【0062】

ろう: 決められたセットの物理的条件下で固体または柔軟な物質を形成する様々な脂肪酸エステルである。ろうと称される脂肪酸エステルは一般にろうではない脂肪酸エステルよりも長い炭素鎖を有する。例えば、ろうは一般に室温で柔軟な物質を形成する。

【0063】

詳細な説明

1. 脂肪酸誘導体の生産

外来性DNA配列が形質転換される宿主生物は改変された宿主生物でもよく、例えば、アシル-ACPまたはアシル-CoAの生産を上昇させるよう、脂肪酸誘導体および中間体の異化を低下させるよう、または生合成経路の特定の点でのフィードバック阻害を低下させるよう改変された生物であってもよい。本明細書に記載する遺伝子を改変することに加えて、さらなる細胞資源を、脂肪酸、例えば、乳酸、コハク酸を過剰生産するよう転用してもよく、および/または、酢酸経路を減弱させてもよく、アセチル-CoAカルボキシラーゼ (ACC) を過剰発現させてもよい。本明細書に記載する生産宿主に対する改変は、ゲノムの改変、染色体外発現系、またはその組合せを介するものであってよい。経路の概観を、図1および2に提供する。

30

【0064】

A. アセチル-CoA - マロニル-CoA からアシル-ACP

脂肪酸シンターゼ (FAS) はアシル鎖の開始および伸長を触媒するペプチドの一群である (Marrakchi et al., Biochemical Society, 30:1050-1055, 2002)。アシルキャリアタンパク質 (ACP) はFAS経路における酵素とともに、生産される脂肪酸の長さ、飽和および分枝の程度を制御する。FASに含まれる酵素としては、AccABCD、FabD、FabH、FabG、FabA、FabZ、FabI、FabK、FabL、FabM、FabB、およびFabFが挙げられる。所望の生成物に応じて、これらの遺伝子の1以上が減弱または過剰発現されうる。

40

【0065】

例えば、生産宿主における脂肪酸生合成経路は、前駆体であるアセチル-CoAおよびマロニル-CoAを用いる (図2)。これら成分を過剰生産するよう操作された大腸菌またはその他の宿主生物は、特定の生産物 (例えば、脂肪酸エステル、炭化水素、脂肪アルコール) を提供するための後での遺伝子操作工程のための出発点として役立ちうる。数種類の改変を組み合わせまたは別々に行うことが出来、それにより宿主株によるアセチル CoA

50

/マロニル CoA/脂肪酸および脂肪酸誘導体生産が上昇する。例えば、アセチル CoA 生産を上昇させるために、すべて構成的、またはその他の制御可能なプロモーターの制御下にある、pdh、panK、aceEF、(ビルビン酸および2-オキソグルタル酸 デヒドロゲナーゼ複合体のE1p デヒドロゲナーゼ 成分および E2p ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ 成分をコードする)、fabH /fabD/fabG/acpP/fabF、およびいくつかの例においてさらなる脂肪-アシルCoAレダクターゼおよびアルデヒド デカルボニラーゼをコードするDNAを有するプラスミドを構築できる。これらの遺伝子の例示的なGenbank 受入番号は以下の通り: pdh (BAB34380、AAC73227、AAC73226)、panK (coaAとしても知られる、AAC76952)、aceEF (AAC73227、AAC73226)、fabH (AAC74175)、fabD (AAC74176)、fabG (AAC74177)、acpP (AAC74178)、fabF (AAC74179)。

10

【 0 0 6 6 】

さらに、対応する遺伝子のヌルまたは欠失 突然変異を含む条件的に複製可能なまたは複製不可能なプラスミドによる形質転換により、またはプロモーターまたはエンハンサー配列を置換することにより操作された微生物において、fadE、gpsA、ldhA、pflb、adhE、pta、poxB、ackA、および/または ackB をノックアウトしてもよいし、それらの発現レベルを低下させてもよい。これらの遺伝子の例示的な Genbank 受入番号は以下の通り; fadE (AAC73325)、gpsA (AAC76632)、ldhA (AAC74462)、pflb (AAC73989)、adhE (AAC74323)、pta (AAC75357)、poxB (AAC73958)、ackA (AAC75356)、および ackB (BAB81430)。

【 0 0 6 7 】

20

その結果得られる操作された微生物は、所望の環境、例えば、グリセロールが制限された環境(培養培地において1% w/v未満)において培養するとよい。したがって、かかる微生物はアセチル-CoA 生産 レベルが上昇する。マロニル-CoA 過剰生産は、上記の微生物を、デノボに合成されたプラスミドに含まれるaccABCD (アセチル CoA カルボキシラーゼ、例えば 受入番号 AAC73296、EC 6.4.1.2) をコードするDNA により操作することによって影響されうる。脂肪酸 過剰生産は、デノボに合成されたプラスミドにリパーゼ (例えば 受入番号 CAA89087、CAA98876)をコードするDNAをさらに含めることによって達成できる。

【 0 0 6 8 】

いくつかの例において、アセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACC)は、その細胞内濃度を例えばネイティブな 発現 レベルと比較して少なくとも 2-倍、例えば、 少なくとも 5-倍、または少なくとも 10-倍上昇させるように過剰発現される。

30

【 0 0 6 9 】

さらに、plsB (例えば 受入番号 AAC77011) D311E 突然変異をアシル-CoAのプールに対する制限を除くために利用できる。

【 0 0 7 0 】

さらに、sfa遺伝子(FabAのサプレッサー、例えば 受入番号 AAN79592)の過剰発現を生産宿主に含めて、モノ不飽和 脂肪酸の生産を上昇させることが出来る(Rock et al., J. Bacteriology 178:5382-5387、1996)。

【 0 0 7 1 】

40

B. アシル-ACP から脂肪酸

脂肪酸誘導体の均質な集団の生産のために生産宿主を操作するために、1以上の 内因性遺伝子を減弱または機能的に欠失させることができ、1以上の チオエステラーゼを発現させることが出来る。例えば、C10 脂肪酸誘導体は、C18:1-ACPを使用するチオエステラーゼ C18 (例えば 受入番号AAC73596およびPOADA1)の減弱、およびC10-ACPを使用するチオエステラーゼ C10 (例えば 受入番号 Q39513)の発現により生産できる。このようにして、炭素鎖長10を有する脂肪酸誘導体の比較的均質な 集団が結果として得られる。別の例において、C14 脂肪酸誘導体は非-C14 脂肪酸を生産する内因性 チオエステラーゼを減弱させ、チオエステラーゼ 受入番号 Q39473 (C14-ACPを使用する)を発現させることにより生産することができる。さらに別の例において、C12 脂肪酸誘導体は C12-ACPを使

50

用するチオエステラーゼ（例えば 受入番号 Q41635）を発現させ、非-C12 脂肪酸を生産するチオエステラーゼを減弱することによって生産することができる。アセチル CoA、マロニル CoA、および脂肪酸過剰生産は当該技術分野において知られている方法、例えば細胞溶解の後に放射性前駆体、HPLC、およびGC-MSを用いることによって確認することが出来る。

【 0 0 7 2 】

表 1

チオエステラーゼ

【表 1】

受入番号	起源生物	遺伝子	主に生産される生成物
AAC73596	大腸菌(E.coli)	リーダー 配列を有さない tesA	C18:1
Q41635	Umbellularia californica	fatB	C12:0
Q39513;	Cuphea hookeriana	fatB2	C8:0 -C10:0
AAC49269	Cuphea hookeriana	fatB3	C14:0 -C16:0
Q39473	Cinnamomum camphor um	fatB	C14:0
CAA85388	Arabidopsis thaliana	fatB[M141T]*	C16:1
NP 189147; NP 193041	Arabidopsis thaliana	fatA	C18:1
CAC39106	Bradyrhizobium japoni cum	fatA	C18:1
AAC72883	Cuphea hookeriana	fatA	C18:1

10

20

*Mayer et al., BMC Plant Biology 7:1-11, 2007

【 0 0 7 3 】

C. 脂肪酸からアシル-CoA

生産宿主は、様々な長さの脂肪酸を生産することが知られているペプチドを用いて操作することができる。脂肪酸を作る 1 つの方法は、1 以上の アシル-CoA シンターゼ ペプチド (EC 2.3.1.86) の発現を上昇させること、または 1 以上の アシル-CoA シンターゼ ペプチド (EC 2.3.1.86) のより活性な形態を発現させることを含む。

30

【 0 0 7 4 】

本明細書において用いる場合、アシル-CoA シンターゼは、酵素 分類番号 EC 2.3.1.86 におけるペプチド、ならびに脂肪酸からアシル-CoAの変換を触媒することが出来るその他のあらゆるペプチドを含む。さらに、当業者であれば、いくつかのアシル-CoA シンターゼ ペプチドはその他の反応を同様に触媒すること、例えばいくつかのアシル-CoA シンターゼ ペプチドは脂肪酸に加えてその他の基質を受け入れることを理解している。かかる非特異的 アシル-CoA シンターゼ ペプチドも、それゆえ含まれる。アシル-CoA シンターゼ ペプチド 配列は公共源から入手できる。例示的なGenBank 受入番号を図10に提供する。

40

【 0 0 7 5 】

D. アシル-CoAから脂肪アルコール

生産宿主はアシル-CoAから脂肪アルコールを生産することが知られているポリペプチドを用いて操作することができる。脂肪アルコールを作る 1 つの方法は、脂肪アルコール形成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)、またはアシル-CoAレダクターゼ (EC 1.2.1.50) およびアルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) の発現を上昇させることまたはそれらのより活性な形態を発現させることを含む。以下、脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)、アシル-CoAレダクターゼ (EC 1.2.1.50) および

50

アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)を脂肪アルコール形成ペプチドと総称する。いくつかの例において3つのすべての脂肪アルコール 形成遺伝子を生産宿主において過剰発現させるとよく、さらに別の例において 1以上の脂肪アルコール 形成遺伝子を過剰発現させるとよい。

【 0 0 7 6 】

本明細書において用いる場合、脂肪アルコール形成ペプチドは、酵素 分類番号 EC 1.1.1.*、1.2.1.50、および1.1.1.1におけるペプチド、ならびにアシル-CoAから脂肪アルコールへの変換を触媒することが出来るその他のすべてのペプチドを含む。さらに、当業者であれば、いくつかの脂肪アルコール形成ペプチドはその他の反応も同様に触媒すること、例えばいくつかのアシル-CoAレダクターゼ ペプチドは脂肪酸に加えてその他の基質も受け入れることを理解している。かかる非特異的 ペプチドも、それゆえ含まれる。脂肪アルコール形成ペプチド配列は公共源から入手できる。 例示的な GenBank 受入番号を図10に提供する。

【 0 0 7 7 】

脂肪アルコールは炭化水素に基づく界面活性剤とも記載される。界面活性剤生産のために、微生物は再生可能な炭素源から界面活性剤を生産するよう改変される。かかる微生物は、脂肪酸を 脂肪アルデヒドに変換することができるタンパク質をコードする第一の外來性 DNA 配列と脂肪アルデヒドをアルコールに変換することができるタンパク質をコードする第二の外來性 DNA 配列とを含む。いくつかの例において、第一の外來性 DNA 配列は脂肪酸 レダクターゼをコードする。一つの態様において、第二の外來性 DNA 配列は哺乳類ミクロソーム アルデヒド レダクターゼまたは長鎖 アルデヒド デヒドロゲナーゼをコードする。さらなる例において、第一および第二の外來性 DNA 配列は、 *Arthrobacter* AK 19、*Rhodotorula glutinins*、*Acinobacter* sp 株 M-1、または *Candida lipolytica* からの複数酵素複合体に由来する。一つの態様において、第一および第二の 異種 DNA 配列は *Acinobacter* sp 株 M-1または *Candida lipolytica*からの複数酵素複合体に由来する。

【 0 0 7 8 】

界面活性剤 生産に利用できる脂肪酸を長鎖 アルコールに変換するタンパク質をコードする異種 DNA 配列のさらなる源としては、これらに限定されないが、*Mortierella alpina* (ATCC 32222)、*Cryptococcus curvatus*、(*Apiotricum curvatum*とも称される)、*Alcanivorax jadensis* (T9T =DSM 12718 =ATCC 700854)、*Acinetobacter* sp. H01-N、(ATCC 14987)およびロドコッカス・オパクス (PD630 DSMZ 44193)が挙げられる。

【 0 0 7 9 】

一例において、脂肪酸誘導体は6から36 炭素原子に限定された炭素原子を含有する飽和または不飽和 界面活性剤生成物である。別の例において、界面活性剤生成物は24から 32 炭素原子に限定された炭素原子を含有する。

【 0 0 8 0 】

界面活性剤を生産するために適当な 宿主は 真核または原核微生物のいずれでもよい。例示的な 宿主としては、*Arthrobacter* AK 19、*Rhodotorula glutinins*、*Acinobacter* sp 株 M-1、*Arabidopsis thaliana*、または *Candida lipolytica*、サッカロマイセス・セレピシエ、およびアセチル CoA カルボキシラーゼを発現するよう操作された大腸菌が挙げられる。脂質および油の形態で高レベルの界面活性剤 前駆体を合成する生得的な能力を示す宿主、例えば、ロドコッカス・オパクス、*Arthrobacter* AK 19、*Rhodotorula glutinins*、アセチル CoA カルボキシラーゼを発現するよう操作された大腸菌、及びその他の油性細菌、酵母、および真菌も利用可能である。

【 0 0 8 1 】

E. 脂肪アルコールから脂肪エステル

生産宿主は様々な 長さの脂肪エステルを生産することが知られているポリペプチドを用いて操作することができる。脂肪エステルを作る1つの方法は、1以上の アルコール O-アセチルトランスフェラーゼ ペプチド (EC 2.3.1.84)の発現を上昇させることまたは

そのより活性な形態を発現させることを含む。これらのペプチドはアセチル-CoA とアルコールとからCoAおよび酢酸エステルを形成する反応を触媒する。いくつかの例において、アルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドは、選択されたチオエステラーゼ ペプチド、FAS ペプチドおよび脂肪アルコール形成ペプチドとともに発現させることが出来、それによって炭素鎖長、飽和および分枝の程度が制御できる。場合によっては、bkd オペロンを、分枝脂肪酸 前駆体の生産を可能にするために共発現させることができる。

【0082】

本明細書において用いる場合、アルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドは、酵素 分類番号 EC 2.3.1.84におけるペプチド、ならびにアセチル-CoAとアルコールとからCoAおよび酢酸エステルを形成する変換を触媒することが出来るあらゆるその他のペプチドを含む。さらに、当業者であれば、アルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドはその他の反応も同様に触媒すること、例えばいくつかのアルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドは脂肪アルコールまたはアセチル-CoA チオエステルに加えてその他の基質、即ち例えば、その他のアルコールおよびその他のアシル-CoA チオエステルを受け入れることを認識しているであろう。かかる非特異的または多様な特異性のアルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドも、それゆえ含まれる。アルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチド 配列は公共源から入手可能である。例示的な GenBank 受入番号を図10に提供する。特定の アルコール 0-アセチルトランスフェラーゼ ペプチドの活性を特徴づけるアッセイは当該技術分野で周知である。ドナーアシル基 またはアクセプター アルコール 部分に対する新規な活性および特異性を有する操作された 0-アセチルトランスフェラーゼおよび 0-アシルトランスフェラーゼを作ることが可能である。操作された酵素は、当該技術分野においてよく記載されている合理的および進化的アプローチを介して作成することが出来る。

【0083】

F. アシル-CoAから脂肪エステル(バイオディーゼルおよびろう)

生産宿主は、アシル-CoAとアルコールから脂肪酸エステルを生産することが知られているペプチドを用いて操作することができる。いくつかの例において、アルコールは発酵培地中に提供され、別の例において、生産宿主が本明細書に記載のようにアルコールを提供しうる。当業者であれば、構造的に、脂肪酸エステルは A および B側を有していることを認識しているであろう。本明細書に記載のように、エステルのA側はアルコールにより寄与される炭素鎖を記載するために用いられ、エステルのB側はアシル-CoAにより寄与される炭素鎖を記載するために用いられる。いずれの鎖も飽和または不飽和であってよく、分枝していてもしていなくてもよい。生産宿主は脂肪アルコールまたは短鎖 アルコールを生産するよう操作することができる。生産宿主はまた、特定のアシル-CoA 分子を生産するよう操作することもできる。本明細書において用いる場合、脂肪酸エステルは、脂肪アシル-チオエステルおよびアルコールに由来するエステルであり、エステルのA側およびB側は独立に長さにおいて異なってもよい。一般に、エステルのA側は 少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、または8 炭素の長さであり、エステルのB側は、8、10、12、14、16、18、20、22、24、または26 炭素の長さである。A側およびB側は、直鎖または分枝鎖、飽和または不飽和であってよい。

【0084】

脂肪エステルの生産、例えばアシル-CoAとアルコールからのろうの生産は、既知のポリペプチドを用いて操作することができる。本明細書において用いる場合、ろうは長鎖 脂肪酸エステルであり、エステルのA側およびB側は長さにおいて独立に異なってもよい。一般に、エステルのA側は少なくとも 8、10、12、14、16、18、20、22、24、または26 炭素の長さである。同様に、エステルのB側は少なくとも 8、10、12、14、16、18、20、22、24、または26 炭素の長さである。A側および B側は、モノ-、ジ-、トリ- 不飽和であってよい。脂肪エステルの生産、例えばアシル-CoAとアルコールからのろうの生産は既知のポリペプチドを用いて操作することができる。脂肪エステルを作る 1つの方法は、1以

上の ろうシンターゼ (EC 2.3.1.75) の発現を上昇させることまたはそれらのより活性な形態を発現させることを含む。

【 0 0 8 5 】

本明細書において用いる場合、ろうシンターゼは、酵素 分類番号 EC 2.3.1.75におけるペプチド、ならびにアシル-チオエステルの脂肪エステルへの変換を触媒することが出来るその他のあらゆるペプチドを含む。さらに、当業者であれば、いくつかのろうシンターゼ ペプチドはその他の反応も同様に触媒すること、例えばいくつかのろうシンターゼ ペプチドは 短鎖 アシル-CoAと短鎖 アルコールとを受け入れて脂肪エステルを生産することを認識しているであろう。かかる非特異的 ろうシンターゼも、それゆえ含まれる。ろうシンターゼ ペプチド 配列は公共源から入手可能である。例示的な GenBank 受入番号を図10に提供する。ろうシンターゼ 活性を同定する方法は米国特許第7,118,896号に提供されており、これは引用により本明細書に含める。

10

【 0 0 8 6 】

具体的な例において、所望の生成物が脂肪エステルに基づくバイオ燃料である場合、微生物は、再生可能エネルギー 源から作られる脂肪エステルを生産するよう改変される。かかる微生物は、発現されると該微生物に再生可能エネルギー 源から飽和、不飽和または分枝脂肪エステルを合成する能力を付与するろうエステル シンターゼをコードする外来性 DNA 配列を含む。いくつかの態様において、ろうエステル 合成 タンパク質としては、これらに限定されないが以下が挙げられる：脂肪酸 エロンガーゼ(elongase)、アシル-CoAレダクターゼ、アシルトランスフェラーゼまたはろうシンターゼ、脂肪アシル トランスフェラーゼ、ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ、アシル-coA ろうアルコール アシルトランスフェラーゼ、二機能性 ろうエステル シンターゼ/アシル-CoA:ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ、これらはSimmondsia chinensis、Acinetobacter sp. 株 ADP1 (以前はAcinetobacter calcoaceticus ADP1)、Pseudomonas aeruginosa、Fundibacter jadensis、Arabidopsis thaliana、または Alkaligenes eutrophusからの複数酵素複合体から選択される。一つの態様において、脂肪酸 エロンガーゼ、アシル-CoAレダクターゼまたは ろうシンターゼは、Alkaligenes eutrophus およびろうおよび脂肪酸エステルを生産することが文献公知であるその他の生物由来の複数酵素複合体からのものである。

20

【 0 0 8 7 】

脂肪エステル 生産に有用なろう 合成 タンパク質をコードする異種 DNAのさらなる源としては、これらに限定されないが、Mortierella alpina (例えば ATCC 32222)、Cryptococcus curvatus、(Apiotricum curvatumとも称される)、Alcanivorax jadensis (例えば T9T =DSM 12718 =ATCC 700854)、Acinetobacter sp. H01-N、(例えば ATCC 14987) およびロドコッカス・オパクス (例えば PD630、DSMZ 44193)が挙げられる。

30

【 0 0 8 8 】

本明細書に記載する方法は、様々な長さの脂肪エステルの生産を可能とする。一例において、脂肪エステル生成物は、炭素原子含量が24から46 炭素原子である飽和または不飽和 脂肪エステル生成物 である。一つの態様において、脂肪エステル生成物は炭素原子含量が24 から32 炭素原子である。別の態様において、脂肪エステル生成物の炭素含量は14 および20 炭素である。別の態様において、脂肪エステルはC18:1のメチルエステルである。別の態様において、脂肪酸エステルはC16:1のエチルエステルである。別の態様において、脂肪エステルはC16:1のメチルエステルである。別の態様において、脂肪酸エステルはオクタノールのオクタデシル エステルである。

40

【 0 0 8 9 】

脂肪エステルの生産に有用な宿主は真核または原核微生物であり得る。いくつかの態様において、かかる宿主としては、これらに限定されないが、サッカロマイセス・セレビシエ、Candida lipolytica、大腸菌、Arthrobacter AK 19、Rhodotorula glutinins、Acinetobacter sp 株 M-1、Candida lipolytica 及びその他の油性微生物が挙げられる。

【 0 0 9 0 】

50

一例において *Acinetobacter* sp. ADP1由来の座位 AA017391におけるろうエステル シンターゼ(Kalscheuer and Steinbuchel, J. Biol. Chem. 278:8075-8082, 2003に記載、引用により本明細書に含める)が用いられる。別の例において、*Simmondsia chinensis*由来の座位 AAD38041におけるろうエステル シンターゼが用いられる。

【0091】

所望により、ろうエステル 排出輸送体、例えば、FATP ファミリーのメンバーを、ろうまたはエステルの細胞外環境への放出の促進のために利用できる。利用できるろうエステル 排出輸送体の一例は *Drosophila melanogaster* 由来の 座位 NP_524723における脂肪酸 (長鎖) 輸送タンパク質 CG7400-PA、アイソフォーム Aである。

【0092】

G. アシル-ACP、アシル-CoAから炭化水素

多様な微生物が、炭化水素、例えば、アルカン、オレフィンおよび イソプレノイドを生産することが知られている。これらの炭化水素の多くは脂肪酸生合成に由来する。これらの炭化水素の生産は、ネイティブな宿主における脂肪酸 生合成に關与する遺伝子を制御することによって制御することが出来る。例えば、藻類 ボツリオコッカス・ブラウニにおける炭化水素 生合成は、脂肪アルデヒドの脱カルボニルを介して起こる。脂肪アルデヒドは脂肪アシル - チオエステルの脂肪-アシルCoAレダクターゼによる還元によって生産される。したがって、最終的なアルカンの構造は、アルカン 生合成に導かれる脂肪酸鎖 長を制御する特定の遺伝子、例えば、チオエステラーゼを発現するようボツリオコッカス・ブラウニを操作することによって制御することが出来る。ボツリオコッカス・ブラウニにおける分枝鎖 脂肪酸 生合成をもたらす酵素の発現は、分枝鎖 アルカンの生産をもたらす。脂肪酸の不飽和化を生じさせる遺伝子の導入はオレフィンの生産をもたらす。これら遺伝子のさらなる組合せは、生産される炭化水素の最終的構造に対するさらなる制御を提供しうる。より高いレベルのネイティブなまたは操作された炭化水素を生産するために、脂肪酸およびその前駆体の生合成 またはその他の生成物への分解に關与する遺伝子を発現、過剰発現、または減弱させることができる。これらアプローチのそれぞれは脂肪アルコールの還元を介してアルカンを生産する *Vibrio furnissi* M1 およびその機能的ホモログにおけるアルカンの生産に適用できる (脂肪アルコール生合成および生産の操作について上記参照)。これらアプローチのそれぞれは、*Micrococcus leuteus*、ステノトロフォモナス・マルトフィリア、*Jeogalicoccus* sp. (ATCC8456)の多くの株および関連微生物により生産されるオレフィンの生産にも適用できる。これら微生物は脂肪酸 前駆体のヘッドトゥーヘッドの 縮合に由来する長鎖内部オレフィンを生産する。本明細書に記載する方法を用いて脂肪酸 前駆体の構造およびレベルを制御することにより、様々な鎖長、分枝、および飽和レベルのオレフィンの形成が導かれる。

【0093】

炭化水素は、一級アルコールの還元のための進化したオキシド/レダクターゼを用いて生産することもできる。一級脂肪アルコールは微生物、例えば、ビブリオ・ファーニッシ M1においてアルカンを生産するのに用いられることが知られている(Myong-Ok, J. Bacteriol., 187:1426-1429, 2005)。NAD(P)H 依存的 オキシド/レダクターゼが原因となる触媒である。合成 NAD(P)H 依存的 オキシドレダクターゼは進化的操作の使用を介して生産することができ、生産宿主において発現させて脂肪酸誘導体を生産することができる。当業者であれば脂肪アルコール レダクターゼの所望の活性を有するための「進化」のプロセスが周知であることを理解している (Kolkman and Stemmer Nat Biotechnol. 19:423-8, 2001, Ness et al., Adv Protein Chem. 55:261-92, 2000, Minshull and Stemmer Curr Opin Chem Biol. 3:284-90, 1999, Huisman and Gray Curr Opin Biotechnol. Aug;13:352-8, 2002, および米国特許出願 2006/0195947参照)。NAD(P)H 依存的 オキシドレダクターゼのライブラリーは標準的方法、例えば、変異性 PCR、部位特異的ランダム突然変異誘発、部位特異的 飽和 突然変異誘発、または部位指向特異的 突然変異誘発によって作成される。さらに、ライブラリーは天然 NAD(P)H 依存的 オキシドレダクターゼコード配列の「シャッフリング」を介して作成されうる。ライブラリーは好適な宿主、例え

10

20

30

40

50

ば、大腸菌にて発現される。オキシド/レダクターゼ ライブラリーの異なるメンバーを発現する個々のコロニーは次いで脂肪アルコールの還元を触媒しうるオキシド/レダクターゼの発現について分析される。例えば、各細胞は、全細胞生体変換、細胞抽出物、透過性細胞、または精製酵素としてアッセイされうる。脂肪アルコール レダクターゼは、分光光度法または蛍光定量法でNAD(P)Hの脂肪アルコール 依存的 酸化をモニターすることによって同定される。アルカンの生産は GC/MS、TLC、またはその他の 方法によってモニターされる。このようにして同定されたオキシド/レダクターゼは、アルカン、アルケン、および関連分枝炭化水素の生産に用いられる。これはインビトロまたはインビボで達成される。後者は、進化した脂肪アルコール レダクターゼ遺伝子を脂肪アルコールを生産する生物、例えば、本明細書に記載するものにおいて発現させることによって達成される。脂肪アルコールはアルカンを生産するであろうアルコール レダクターゼのための基質として作用する。その他のオキシドレダクターゼもこの反応を触媒するように操作され得、例えば、分子状水素、グルタチオン、FADH、またはその他の 還元補酵素を使用する。

【0094】

II. 脂肪酸誘導体 生産を上昇させるための生産株の遺伝子操作

脂肪酸誘導体の生産のための生合成経路に關与する異種 DNA 配列は、当該技術分野で周知の技術、例えば エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポソーム-媒介トランスフェクション、コンジュゲーション、形質導入等を用いて宿主細胞に安定にまたは一過性に導入されうる。安定な形質転換のために、DNA 配列はさらに、選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性、例えばネオマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、カナマイシンに対する耐性、栄養要求欠損を補完する遺伝子等を含みうる。

【0095】

本開示の様々な態様は、代謝または生合成経路に關与するタンパク質をコードする異種 DNA 配列を含む発現 ベクターを利用する。好適な 発現 ベクターとしては、これらに限定されないが、ウイルスベクター、例えば、バキュロウイルス ベクター、ファージ ベクター、例えば、バクテリオファージ ベクター、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、細菌人工染色体、ウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ-随伴ウイルス、SV40、単純ヘルペス ウイルス等に基づくウイルスベクター)、P1-に基づく人工染色体、酵母 プラスミド、酵母 人工染色体、および特定の目的宿主(例えば、大腸菌、シュドモナス・ピスムおよびサッカロマイセス・セレビシエ)に特異的なその他のベクターが挙げられる。

【0096】

有用な 発現 ベクターは形質転換宿主細胞の選択のための表現形質を提供する1以上の選択可能マーカー遺伝子を含みうる。選択可能マーカー遺伝子は選択培養培地において培養された形質転換宿主細胞の生存または生育に必要なタンパク質をコードする。選択可能マーカー遺伝子を含むベクターで形質転換されていない宿主細胞は培養培地で生育できない。典型的な選択遺伝子は (a) 抗生物質 またはその他の 毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリンに耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養要求欠損を補完するタンパク質、または(c)複合培地から入手できない必須栄養素を供給するタンパク質をコードし、例えば、バチルスのためのD-アラニン ラセマーゼをコードする遺伝子が挙げられる。別の態様において、選択可能マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸 レダクターゼをコードするもの、またはネオマイシン 耐性を付与するもの (真核細胞培養における使用のため)、またはテトラサイクリンまたはアンピシリン 耐性を付与するもの (原核宿主細胞、例えば、大腸菌における使用のため)である。

【0097】

発現 ベクターにおいて生合成経路遺伝子産物をコードするDNA 配列は適当な発現制御配列(プロモーター、エンハンサー等)に作動可能に連結して、コードされた遺伝子産物の合成を導く。かかるプロモーターは微生物またはウイルス起源であってよく、CMVおよびSV40が挙げられる。使用する宿主/ベクター系に応じて、多数の好適な転写および翻訳 制

10

20

30

40

50

御要素、例えば構成的および誘導可能 プロモーター、転写 エンハンサー 要素、転写 ターミネーター等のいずれもが発現 ベクターにおいて利用できる (例えば、Bitter et al.、Methods in Enzymology、153:516- 544、1987参照)。

【 0 0 9 8 】

原核 宿主細胞における使用に好適な プロモーターとしては、これらに限定されないが、T4、T3、Sp6およびT7 ポリメラーゼを認識できるプロモーター、バクテリオファージラムダのP_R および P_L プロモーター、大腸菌のtrp、recA、熱ショック、および lacZ プロモーター、枯草菌のアルファ-アミラーゼおよびシグマ-特異的プロモーター、バチルスバクテリオファージのプロモーター、ストレプトマイセス プロモーター、バクテリオファージ ラムダの int プロモーター、pBR322のベータ・ラクタマーゼ遺伝子のbla プロモーター、およびクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ 遺伝子のCAT プロモーターが挙げられる。原核 プロモーターは Glick、J. Ind. Microbiol. 1:277、1987; Watson et al.、MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE、4th Ed.、Benjamin Cummins (1987); およびSambrook et al.、前掲により概説されている。

【 0 0 9 9 】

真核 宿主における使用に好適な 真核 プロモーターの非限定的な例はウイルス起源のものであり、マウス メタロチオネイン I 遺伝子のプロモーター(Hamer et al.、J. Mol. Appl. Gen. 1:273、1982);ヘルペス ウイルスのTK プロモーター (McKnight、Cell 31:355、1982); SV40 初期プロモーター (Benoist et al.、Nature (London) 290:304、1981);ラウス肉腫 ウイルス プロモーター;サイトメガロウイルス プロモーター (Foecking et al.、Gene 45:101、1980);酵母 gal4 遺伝子 プロモーター (Johnston、et al.、PNAS (USA) 79:6971、1982; Silver、et al.、PNAS (USA) 81:5951、1984); および IgG プロモーター (Orlandi et al.、PNAS (USA) 86:3833、1989)が挙げられる。

【 0 1 0 0 】

微生物 宿主細胞は、誘導可能 プロモーターに作動可能に連結した生合成経路 遺伝子産物をコードする異種 DNA 配列により遺伝子的に改変されうる。誘導可能 プロモーターは当該技術分野で周知である。好適な 誘導可能 プロモーターとしては、これらに限定されないが、タンパク質、代謝産物または化学物質によって影響を受けるプロモーターが挙げられる。これらとしては:ウシ 白血病 ウイルス プロモーター、メタロチオネイン プロモーター、デキサメタゾン-誘導可能 MMTV プロモーター、SV40 プロモーター、MRP pol III プロモーター、テトラサイクリン-誘導可能 CMV プロモーター (例えば、ヒト 最初期 CMV プロモーター)ならびにtrpおよびlac オペロン由来のものが挙げられる。

【 0 1 0 1 】

いくつかの例において、遺伝子的に改変される宿主細胞は構成的 プロモーターに作動可能に連結された生合成経路 遺伝子産物をコードする異種 DNA 配列により遺伝子的に改変される。好適な 構成的 プロモーターは当該技術分野において知られており、例えば、構成的 アデノウイルス 主要後期 プロモーター、構成的 MPSV プロモーター、および構成的 CMV プロモーターが挙げられる。

【 0 1 0 2 】

いくつかの例において、改変された宿主細胞は、生合成経路に関与する単一のタンパク質をコードする外来性 DNA 配列により遺伝的に改変されたものである。別の態様において、改変された宿主細胞は生合成経路に関与する2以上のタンパク質をコードする外来性 DNA 配列、例えば、生合成経路における第一および第二の酵素をコードする外来性 DNA 配列により遺伝的に改変されたものである。

【 0 1 0 3 】

宿主細胞が遺伝的に改変されて生合成経路に関与する2以上のタンパク質を発現する場合、かかるDNA 配列はそれぞれ単一または別々の発現 ベクターに含まれうる。かかるDNA 配列が単一の発現 ベクターに含まれる場合、いくつかの態様において、ヌクレオチド配列は共通の制御要素 (例えば、プロモーター)に作動可能に連結しており、例えば、共通の制御要素が単一の発現 ベクターにおけるすべての生合成経路 タンパク質をコードす

るDNA 配列の発現を制御する。

【 0 1 0 4 】

改変された宿主細胞が生合成経路に関与する 2 以上のタンパク質をコードする異種 DNA 配列により遺伝子的に改変されている場合、DNA 配列の 1 つは誘導可能 プロモーターに作動可能に連結し、1 以上のDNA 配列は構成的 プロモーターに作動可能に連結しているもよい。

【 0 1 0 5 】

いくつかの態様において、生合成経路 中間体の細胞内 濃度 (例えば遺伝子的に改変された宿主細胞における中間体濃度)は最終生成物の収量をさらに追加するよう高められ得る。中間体の細胞内 濃度は多数の方法で高められ得、例えば、これらに限定されないが、生合成経路のための基質の培養培地中の濃度の上昇;生合成経路において活性な酵素の触媒活性の上昇;生合成経路において活性な酵素のための基質 (例えば一次基質)の細胞内量の上昇;等が挙げられる。

10

【 0 1 0 6 】

いくつかの例において、脂肪酸誘導体または中間体は細胞の細胞質中に生産される。細胞質濃度は多数の方法で高められ得、例えば、これらに限定されないが、脂肪酸の補酵素 Aへの結合によるアシル-CoA チオエステル形成が挙げられる。さらに、アシル-CoAの濃度は細胞におけるCoAの生合成の上昇によっても高められ得、例えば、パントテン酸 生合成 に関与する遺伝子(panD)の過剰発現またはグルタチオン 生合成に関与する 遺伝子(グルタチオンシンターゼ)のノックアウトによってなされる。

20

【 0 1 0 7 】

III.炭素鎖 特徴

本明細書に提供する教示を用いて一定範囲の生成物を生産することができる。かかる生成物としては、炭化水素、脂肪アルコール、脂肪酸エステルおよび/または糖が挙げられる。かかる生成物のいくつかはバイオ燃料および特殊化学製品として有用である。かかる生成物は微生物において設計および生産されうる。生成物は分枝点、飽和レベル、および炭素鎖長を含むよう生産され得、これらの生成物は多くの用途における使用のために望ましい出発物質となる (図10は様々な脂肪酸誘導体を作るために単独でまたは組み合わせて用いられうる様々な 酵素の説明を提供する)。

【 0 1 0 8 】

別の例において、様々な種または操作された 変異体に由来する外来性 FAS 遺伝子の発現を宿主細胞に導入することができ、その結果、ネイティブな 宿主のものとは構造的に(長さ、分枝、不飽和度等において)異なる脂肪酸 代謝産物の生合成が導かれる。これら異種遺伝子産物はまた宿主細胞における天然の複雑な調節機構によって影響を受けないよう選択または操作することができ、それゆえ所望の商品の生産のためにより制御可能な様式で機能する。例えば、パチルス・スプチリス、サッカロマイセス・セレピシエ、ストレプトマイセス・エスピーピー、ラルストニア、ロドコッカス、コリネバクテリア、プレバクテリア、マイコバクテリア、油性酵母等に由来するFAS 酵素を生産宿主において発現させることが出来る。

30

【 0 1 0 9 】

当業者であれば、生産宿主が操作されて脂肪酸生合成経路から特定のレベルの不飽和、分枝、または炭素鎖長を含む脂肪酸を生産する場合、その結果得られる操作された脂肪酸は、脂肪酸誘導体の生産に利用できることを認識している。したがって、生産宿主から作られた脂肪酸誘導体は、操作された脂肪酸の特徴を示しうる。例えば、生産宿主は操作されて分枝、短鎖 脂肪酸をつくり得、そして脂肪アルコール 生産に関連する本明細書に提供する教示を用いて(即ちアルコール形成酵素、例えば、 FARを含む)、生産宿主は分枝した短鎖 脂肪アルコールを生産する。同様に、炭化水素は規定されたレベルの分枝、不飽和、および/または 炭素鎖長を有する脂肪酸を生産するよう生産宿主を操作することにより生産され得、したがって、均一な炭化水素集団が作られる。さらに、不飽和アルコール、脂肪酸エステル、または炭化水素が望ましい場合、脂肪酸生合成経路を操作して、低

40

50

レベルの飽和脂肪酸を生産させることができ、さらなるデサチュラーゼが飽和生成物の生産を低めるよう発現されうる。

【0110】

A. 飽和

生産宿主は、生産宿主を fabB を過剰発現するよう操作することにより、または低温で生産宿主を培養することにより(例えば 37 未満)、不飽和脂肪酸を生産するよう操作されうる。FabB はシス- δ^3 デセノイル-ACP を優先し、大腸菌における不飽和脂肪酸生産がもたらされる。FabB の過剰発現により、かなりのパーセンテージの不飽和脂肪酸の生産が導かれる(de Mendoza et al., J. Biol. Chem., 258:2098-101, 1983)。これら不飽和脂肪酸は、脂肪酸誘導体、例えば、脂肪アルコール、エステル、ろう、オレフィン、アルカン等を生産するよう操作された生産宿主において中間体として利用することが出来る。当業者であれば、fabA の減弱、または FabB の過剰発現および特定のチオエステラーゼの発現により(以下に記載)、所望の炭素鎖長を有する不飽和脂肪酸誘導体が生産されうることを理解している。あるいは、脂肪酸生合成のリプレッサー、FabR (Genbank 受入番号 NP_418398) を欠失させてもよく、それによっても大腸菌における不飽和脂肪酸生産が上昇する(Zhang et al., J. Biol. Chem. 277:pp. 15558, 2002.)。不飽和脂肪酸のさらなる上昇は FabM (トランス-2,シス-3-デセノイル-ACP イソメラーゼ、Genbank 受入番号 DAA05501) の過剰発現および *Streptococcus pneumoniae* からの FabK (トランス-2-エノイル-ACP レダクターゼ II, Genbank 受入番号 NP_357969) の発現制御 (Marrakchi et al., J. Biol. Chem. 277: 44809, 2002)、および大腸菌 Fab I ((トランス-2-エノイル-ACP レダクターゼ、Genbank 受入番号 NP_415804) の欠失により達成できる。さらに、不飽和脂肪酸エステルのパーセンテージを高めるためには、微生物は、fabB (β -ケトアシル-ACP シンターゼ I、受入番号: BAA16180、EC:2.3.1.41 をコードする)、Sfa (fabA のサプレッサー、受入番号: AAC44390 をコードする) および gnsA および gnsB (ともに secG ヌル突然変異体 サプレッサー、a.k.a. 冷ショックタンパク質、受入番号: ABD18647.1、AAC74076.1 をコードする) を過剰発現するとよい。

【0111】

いくつかの例において、内因性 fabF 遺伝子を減弱することができ、それにより生産されるパルミトレイン酸 (C16:1) のパーセンテージが上昇する。

【0112】

B. 環状部分を含む分枝

分枝点、環状部分、およびそれらの組合せを含む脂肪酸誘導体を本明細書に提供する教示を用いて生産することができる。

【0113】

直鎖状脂肪酸(sFA)を天然に生産する微生物を1以上の外来性核酸配列を発現させることによって分枝鎖脂肪酸(brFA)を生産するように操作することができる。例えば、大腸菌は直鎖状脂肪酸(sFA)を天然に生産する。大腸菌をbrFAを生産するよう操作するために、いくつかの遺伝子を導入し、発現させて、分枝前駆体を提供し(bkd オペロン)、分枝前駆体からの脂肪酸生合成を開始させることができる(fabH)。さらに、生物はbrFAの伸長(例えば ACP、FabF) および/または通常sFAを導き、導入された遺伝子と競合しうる対応する大腸菌遺伝子(例えば、FabH、FabF)の欠失のための遺伝子が発現することが出来る。

【0114】

分枝アシル-CoAである 2-メチル-ブツリル-CoA、イソバレリル-CoAおよびイソブツリル-CoAはbrFAの前駆体である。ほとんどの brFA-含有微生物においてそれらは分枝アミノ酸(イソロイシン、ロイシンおよびバリン)から2工程で合成される(以下に詳細に記載する)(Kadena, Microbiol. Rev. 55: pp. 288, 1991)。微生物を brFAを生産するよう、またはbrFAを過剰生産するよう操作するために、これら2工程における1以上の酵素の、発現または過剰発現を操作するとよい。例えば、いくつかの例において、生産宿主は1工程を達成しうる内因性酵素を有し得、それゆえ、第二工程に関与する酵素のみを組換え

により発現させなければならない。

【 0 1 1 5 】

分枝脂肪酸の形成における第一工程は、対応する α -ケト 酸の 分枝鎖 アミノ酸 アミノトランスフェラーゼによる生産である。大腸菌はかかる酵素、IlvE (EC 2.6.1.42; Genbank 受入番号 YP_026247)を有している。いくつかの例において、異種 分枝鎖 アミノ酸 アミノトランスフェラーゼを発現させてはならない。しかし、アミノトランスフェラーゼ 反応 が脂肪酸誘導体 生産のために選択された宿主生物におけるbrFA 生合成の律速であると判明すれば、大腸菌 IlvE またはその他の分枝鎖 アミノ酸 アミノトランスフェラーゼ、例えばラクトコッカス・ラクティスからのilvE (Genbank 受入番号 AAF34406)、シュードモナス・プチダからのilvE (Genbank 受入番号 NP_745648) またはストレプトマイセス・コエリカラー からのilvE (Genbank 受入番号 NP_629657)を宿主微生物において過剰発現させることができる。

【 0 1 1 6 】

第二工程、 α -ケト酸の対応する 分枝鎖 アシル-CoAへの酸化的脱炭酸は、分枝鎖 α -ケト 酸 デヒドロゲナーゼ 複合体(bkd; EC 1.2.4.4.)により触媒され(Denoya et al. J. Bacteriol. 177:pp. 3504, 1995)、これは E1 α / β (デカルボキシラーゼ)、E2 (ジヒドロリポイル トランスアシラーゼ) および E3 (ジヒドロリポイル デヒドロゲナーゼ) サブユニットからなり、ピルビン酸および α -ケトグルタル酸 デヒドロゲナーゼ 複合体に類似している。表2は、生産宿主において発現されて分枝鎖 アシル-CoA 前駆体を提供しうるいくつかの微生物からの可能性のあるbkd 遺伝子を示す。基本的には、brFAを有する、および/または、分枝鎖アミノ酸上で生育するあらゆる微生物は、生産宿主、例えば、大腸菌における発現のための単離 bkd 遺伝子の源として利用できる。さらに、大腸菌はE3 成分 (そのピルビン酸 デヒドロゲナーゼ複合体の一部として; lpd、EC 1.8.1.4、Genbank 受入番号 NP_414658)を有し、それはそれゆえ、E1 α / β および E2 bkd 遺伝子のみを発現するのに十分であり得る。

【 0 1 1 7 】

表 2

選択された微生物からのBkd 遺伝子

【表 2】

生物	遺伝子	Genbank 受入番号 #
ストレプトマイセス・コエリカラー	bkdA1 (E1 α)	NP_628006
	bkdB1 (E1 β)	NP_628005
	bkdC1 (E2)	NP_638004
ストレプトマイセス・コエリカラー	bkdA2 (E1 α)	NP_733618
	bkdB2 (E1 β)	NP_628019
	bkdC2 (E2)	NP_628018
ストレプトマイセス・アヴェルミチリス	bkdA (E1a)	BAC72074
	bkdB (E1b)	BAC72075
	bkdC (E2)	BAC72076
ストレプトマイセス・アヴェルミチリス	bkdF (E1 α)	BAC72088
	bkdG (E1 β)	BAC72089
	bkdH (E2)	BAC72090
バチルス・スブチリス	bkdAA (E1 α)	NP_390288
	bkdAB (E1 β)	NP_390288
	bkdB (E2)	NP_390288
シュードモナス・プチダ	bkdA1 (E1 α)	AAA65614
	bkdA2 (E1 β)	AAA65615
	bkdC (E2)	AAA65617

【 0 1 1 8 】

別の例において、イソブツリル-CoAは生産宿主、例えば大腸菌においてクロトニル-CoA

レダクターゼ (Ccr、EC 1.1.1.9)およびイソブツリル-CoA ムターゼ (ラージサブユニット IcmA、EC 5.4.99.2; スモールサブユニット IcmB、EC 5.4.99.13) (Han and Reynolds J. Bacteriol. 179:pp. 5157、1997)の共発現を介して作ることが出来る。クロトニル-CoAは大腸菌およびその他の微生物における脂肪酸 生合成の中間体である。選択された微生物からのccrおよびicm 遺伝子の例を表3に示す。

【 0 1 1 9 】

表3

選択された微生物からのccrおよびicm 遺伝子

【表 3】

生物	遺伝子	Genbank 受入番号 #
ストレプトマイセス・コエリ カラー	ccr icmA icmB	NP_630556 NP_629554 NP_630904
ストレプトマイセス・シナモ ネンシス	ccr icmA icmB	AAD53915 AAC08713 AJ246005

10

【 0 1 2 0 】

bkd 遺伝子の発現に加えて(上記参照)、brFA 生合成の開始は、分枝鎖 アシル CoAに対する特異性を有する β -ケトアシル-アシル-キャリアタンパク質 シンターゼ III (FabH、EC 2.3.1.41) を利用する (Li et al. J. Bacteriol. 187:pp. 3795、2005)。かかる FabHの例を表 4に挙げる。あらゆるbrFA-含有微生物の脂肪酸 生合成に關与するFabH 遺伝子を生産宿主において発現させることが出来る。天然には brFAを作らない生産宿主からのBkd およびFabH 酵素は brFA 生産を支持しないことがあり得、それゆえ、BkdおよびFabHは組換えにより発現されうる。同様に、Bkd およびFabH 生産の内因性 レベルはbrFAの生産に十分でないことがあり得、それゆえ、それらは過剰発現されうる。さらに、脂肪酸 生合成機構のその他の成分を発現させることが出来、例えば、アシル キャリアタンパク質 (ACP) および β -ケトアシル-アシル-キャリアタンパク質 シンターゼ II 候補はアシル キャリアタンパク質 (ACP) および β -ケトアシル-アシル-キャリアタンパク質 シンターゼ II (fabF、EC 2.3.1.41)である (候補は表 4に挙げる)。これらの遺伝子の発現に加えて、内因性脂肪酸 生合成 経路におけるいくつかの遺伝子は生産宿主において減弱されうる。例えば、大腸菌においてbrFA 生合成を干渉する可能性の最も高い候補はfabH (Genbank 受入番号 # NP_415609) および/または fabF 遺伝子(Genbank 受入番号 # NP_415613)である。

20

30

【 0 1 2 1 】

上記のように、brFA 合成 およびアルコール 合成を支持する遺伝子が発現させることの組合せを介して分枝鎖 アルコールが生産されうる。例えば、アルコール レダクターゼ、例えば、Acinetobacter baylyi ADP1からのAcr1がbkd オペロンと共発現される場合、大腸菌はイソペンタノール、イソブタノールまたは 2-メチル ブタノールを合成することができる。同様に、Acr1が ccr/icm 遺伝子と共発現される場合、大腸菌はイソブタノールを合成することができる。

40

【 0 1 2 2 】

生産宿主、例えば、大腸菌を ω -環状脂肪酸(cyFA)を合成することができる生物に変換するために、いくつかの遺伝子が導入され発現されなければならず、それによって環状前駆体であるシクロヘキシルカルボニル-CoAが提供される (Cropp et al. Nature Biotech. 18:pp. 980、2000)。表 4に示す遺伝子 (fabH、ACP および fabF)は発現されると ω -環状 脂肪酸の開始および伸長を可能としうる。あるいは、相同性遺伝子が cyFAを作る微生物から単離され得、大腸菌において発現されうる。

【 0 1 2 3 】

表4

50

brFAを有する選択された微生物からのFabH、ACPおよびfabF 遺伝子

【表 4】

生物	遺伝子	Genbank 受入番号 #
ストレプトマイセス・コエリ カラー	fabH1 ACP fabF	NP_626634 NP_626635 NP_626636
ストレプトマイセス・アヴェ ルミチリス	fabH3 fabC3 (ACP) fabF	NP_823466 NP_823467 NP_823468
バチルス・スプチリス	fabH_A fabH_B ACP fabF	NP_389015 NP_388898 NP_389474 NP_389016
ステノトロフォモナス・マル トフィリア	SmalDRAFT_0818 (FabH) SmalDRAFT_0821 (ACP) SmalDRAFT_0822 (FabF)	ZP_01643059 ZP_01643063 ZP_01643064
レジオネラ・ニューモフィラ	FabH ACP fabF	YP_123672 YP_123675 YP_123676

10

20

【 0 1 2 4 】

以下の遺伝子の発現は大腸菌におけるシクロヘキシルカルボニル-CoAの提供に十分である：ストレプトマイセス・コリヌスのアンサトリエニン 遺伝子 クラスターからのansJ、ansK、ansL、chcA およびansM (Chen et al., Eur. J. Biochem. 261:pp. 1999、1999) またはストレプトマイセス sp. HK803 のホスラクトマイシン B 遺伝子 クラスターからのplmJ、plmK、plmL、chcA およびplmM (Palaniappan et al., J. Biol. Chem. 278:pp. 35552、2003)とともに、S. collinus、S. avermitilisまたはS. coelicolorからのchcB 遺伝子 (Patton et al. Biochem., 39:pp. 7595、2000) (Genbank 受入番号について表5 参照)。

【 0 1 2 5 】

表5

シクロヘキシルカルボニル-CoA合成のための遺伝子

【表 5】

生物	遺伝子	Genbank 受入番号 #
ストレプトマイセス・コリヌ ス	ansJK ansL chcA ansL chcB	U72144* AF268489
ストレプトマイセス sp. HK8 03	pmlJK pmlL chcA pmlM	AAQ84158 AAQ84159 AAQ84160 AAQ84161
ストレプトマイセス・コエリ カラー	chcB/caiD	NP_629292
ストレプトマイセス・アヴェ ルミチリス	chcB/caiD	NP_629292

30

40

chcAのみがGenbank entry U72144においてアノテーションされており、ansJKLM はChen et al.による(Eur. J. Biochem. 261:pp. 1999、1999)。

50

【 0 1 2 6 】

表4に挙げる遺伝子 (fabH、ACP およびfabF)は ω -環状脂肪酸の開始および伸長を起こさせるのに十分である。というのはそれらは広い基質特異性を有しうるからである。これらのいずれかの遺伝子と表5からのansJKLM/chcABまたはpmIJKLM/chcAB 遺伝子の共発現がcyFAを生じない場合は、cyFAを作る微生物からのfabH、ACP および/または fabF ホモログを単離し(例えば縮重 PCR プライマーまたは異種 DNA プローブの使用により)、共発現させればよい。表6は ω -環状 脂肪酸を含む選択された微生物を示す。

【 0 1 2 7 】

表 6

ω -環状 脂肪酸を含む微生物の例

【表 6】

生物	文献
クルトバクテリウム・プシルム	ATCC19096
アリシクロバチルス・アシドテレストリス	ATCC49025
アリシクロバチルス・アシドカルダリウス	ATCC27009
アリシクロバチルス・シクロヘプタニクム*	Moore, J. Org. Chem. 62:pp. 2173, 1997

* cyFA 生合成の前駆体としてシクロヘプチルカルボニル-CoAを使用しシクロヘキシルカルボニル-CoAを使用しない。

【 0 1 2 8 】

C. エステル特徴

当業者であれば、エステルはA側とB側とを含むことを理解している。本明細書に記載のように、B側には宿主生物におけるデノボ合成から生産される脂肪酸が寄与する。いくつかの例において、宿主がさらに操作されてアルコール、例えば脂肪アルコールを作る場合、A側もまた宿主生物により生産される。さらに別の例において、A側は培地において提供されうる。本明細書に記載のように、所望のチオエステラーゼ 遺伝子を選択することにより、B側、および脂肪アルコールが作られる場合、A側は、特定の炭素鎖特徴を有するよう設計されうる。これらの特徴には、不飽和点、分枝、および所望の炭素鎖長が含まれる。長鎖脂肪酸エステルを作る例示的な方法であって、AおよびB側が生産宿主によって生産される方法を以下の実施例6に提供する。同様に、実施例5は、中鎖 脂肪酸エステルを作る方法を提供する。AおよびB側の両方が生産宿主によって寄与される場合、それらは類似の炭素鎖特徴を有する脂肪酸生合成経路中間体を用いて生産される。例えば、生産される脂肪酸エステルの少なくとも 50%、60%、70%、または80%は、 6、4、または 2 炭素、長さにおいて変動するA側および B側を有する。A側およびB側はまた、類似の分枝および飽和レベルを示す。

【 0 1 2 9 】

A側に寄与するための脂肪アルコールの生産に加えて、宿主はその他の短鎖アルコール、例えば、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、イソブタノール、およびブタノールを当該技術分野で周知の技術を用いてA側上に取り込むために生産しうる。例えば、ブタノールは宿主生物によって作られうる。ブタノール生産細胞を作るために、LS9001 株 (以下の実施例1に記載)をさらに操作して大腸菌 K12からのatoB (アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ)、Butyrivibrio fibrisolvensからの β -ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、Clostridium beijerinckii からのクロトナーゼ、Clostridium beijerinckii からのブチリル CoA デヒドロゲナーゼ、Cladosporium fulvum からのCoA-アシル化 アルデヒド デヒドロゲナーゼ (ALDH) およびClostridium acetobutylicumのアルデヒド-アルコール デヒドロゲナーゼをコードするadhE をpBAD24 発現 ベクターにおいてprpBCDE プロモーター系の下で発現させることが出来る。同様に、エタノールはKa

Ischeuer et al., Microbiology 152:2529-2536、2006に教示される方法を用いて生産宿主において生産され得、これは引用により本明細書に含める。

【0130】

IV. 発酵

脂肪酸誘導体の生産および単離は特定の発酵技術の使用によって促進されうる。生産を最大化させ、コストを削減する1つの方法は、炭化水素生成物に変換される炭素源のパーセンテージを上昇させることである。通常の細胞の生活環において、炭素は、細胞機能、例えば、脂質、糖類、タンパク質、有機酸および核酸の生産に用いられる。生育に関連する活性に必要な炭素の量を減らすと、炭素源の出力への変換効率を高めることが出来る。これは、所望の密度、例えば、対数増殖期のピークに達する密度までまず微生物を培養することにより達成できる。かかる点において、複製チェックポイント遺伝子が細胞の増殖の停止に利用されうる。具体的には、クオラムセンシングメカニズム(Camilli and Basler Science 311:1113、2006; Venturi FEMS Microbio Rev 30:274-291、2006;および Reading and Sperandio FEMS Microbiol Lett 254:1-11、2006に概説)を利用して、遺伝子、例えば、p53、p21、またはその他のチェックポイント遺伝子を活性化することが出来る。細胞複製を停止するよう活性化され得、大腸菌において生育できる遺伝子としては umuDC 遺伝子が挙げられ、その過剰発現は静止期から対数増殖期への進行を停止する (Murli et al., J. of Bact. 182:1127、2000)。UmuCは非コード損傷に対する損傷乗り越え合成を行うことが出来るDNAポリメラーゼであり、これは多くのUVおよび化学物質突然変異誘発の機構の基礎である。umuDC 遺伝子産物は損傷乗り越え合成のプロセスに用いられ、DNA損傷チェックポイントとしても働く。UmuDC 遺伝子産物には UmuC、UmuD、umuD'、UmuD'₂C、umuD'₂ およびumuD₂が含まれる。同時に、生成物生産遺伝子は活性化され、したがって複製および維持経路が用いられる必要性が最小となり、一方脂肪酸誘導体を作られる。

【0131】

炭化水素生成物に変換される入力炭素のパーセンテージはコスト推進要因である。効率的であるほど(即ちパーセンテージが高いほど)、プロセスは安価となる。酸素-含有炭素源(即ち、グルコースおよびその他の炭水化物に基づく源)について、酸素は二酸化炭素の形態で放出されなければならない。2酸素原子が放出される度に、1炭素原子が放出され、最大理論的代謝効率は ~34% (w/w) となる(脂肪酸由来生成物について)。この値はしかし、その他の炭化水素生成物および炭素源については変化する。文献における典型的な効率は ~<5%である。炭化水素生成物を生産する操作された微生物は 1、3、5、10、15、20、25、および 30%を超える効率を有しうる。一例において微生物は約 10%から約 25%の効率を示す。別の例において、かかる微生物は約 25%から約 30%の効率を示し、別の例においてかかる微生物は >30%の効率を示す。

【0132】

最終生成物が細胞から放出されるいくつかの例において、連続プロセスを実施することが出来る。このアプローチにおいて、脂肪酸誘導体を生産する生物を含むリアクターは複数の方法で組み立てられうる。一例において、培地の一部が除かれ放置される。脂肪酸誘導体は水層から分離され、それはまた、発酵チャンバに戻される。

【0133】

一例において、発酵チャンバは連続的還元が行われている発酵物を封入する。この例において、安定な還元環境が作られるであろう。電子のバランスは二酸化炭素の放出(気体形態における)により維持されるであろう。NAD/H および NADP/H バランスを増強する努力は電子のバランスの安定化において役立ちうる。

【0134】

細胞内 NADPHの利用能はまたNADH:NADPH トランスヒドロゲナーゼを発現するよう生産宿主を操作することによっても増強されうる。1以上の NADH:NADPH トランスヒドロゲナーゼの発現は解糖において生産されたNADH をNADPHに変換し、それは脂肪酸誘導体の生産を促進する。

【 0 1 3 5 】

組換え宿主微生物から輸送タンパク質を介して脂肪酸誘導体を連続的に生産および排出するシステムが本明細書に開示される。多くの輸送および流出タンパク質が多様な化合物を排出するよう働き、特定のタイプの脂肪酸誘導体に対して選択的であるように進化しうる。したがって、いくつかの態様においてABC トランスポーターをコードする外来性 DNA 配列が組換え宿主微生物によって機能的に発現され、それによって微生物は脂肪酸誘導体を培養培地に排出する。一例において、ABC トランスポーターは*Caenorhabditis elegans*、*Arabidopsis thaliana*、*Alkaligenes eutrophus* または*Rhodococcus erythropolis* (座位 AAN73268)由来のABC トランスポーターである。別の例において、ABC トランスポーターは、CER5 (座位At1g51500 または AY734542)、AtMRP5、AmiS2およびAtPGP1から選
10
択されるABC トランスポーターである。いくつかの例において、ABC トランスポーターは CER5である。さらに別の例において、CER5 遺伝子は*Arabidopsis*由来である(座位 At1g51500、AY734542、At3g21090 およびAt1g51460)。

【 0 1 3 6 】

輸送タンパク質は、例えば、以下から選択される流出タンパク質であり得る：大腸菌由来のAcrAB、TolC およびAcrEF または *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来のtll1618、tll1619 およびtll0139。

【 0 1 3 7 】

さらに、輸送タンパク質は、例えば、*Drosophila melanogaster*、*Caenorhabditis elegans*、*Mycobacterium tuberculosis* またはサッカロマイセス・セレビシエから選択される
20
脂肪酸 輸送タンパク質 (FATP)または哺乳類 FATPのいずれかでありうる。FATPはさらに基質の流れの方向を反転させるために逆転した膜領域により再合成されうる。具体的には、タンパク質の親水性 ドメイン (または膜ドメイン)を構成するアミノ酸配列はそれぞれの特定のアミノ酸について同じコドンを維持しつつ逆転されうる。かかる領域の同定は当該技術分野で周知である。

【 0 1 3 8 】

生産宿主はまた脂肪酸誘導体を放出する内因性の能力について選択されうる。生成物の生産および発酵プロセスへの放出の効率は細胞内生成物の細胞外生成物に対する比として表現されうる。いくつかの例において比は、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、または 1:5でありうる。
30

【 0 1 3 9 】

生産宿主はさらに組換えセルロソーム、例えば、PCT出願番号 PCT/US2007/003736に記載のものを発現するよう操作され得、これは生産宿主がセルロース性材料を炭素源として利用することを可能にする。例えば、生産宿主はさらにインペルターゼ (EC 3.2.1.26)を発現するよう操作され得、それによってスクロースが炭素源として利用可能となる。

【 0 1 4 0 】

同様に、生産宿主はIngram et al.の米国特許第5,000,000、5,028,539、5,424,202、5,482,846、および5,602,030号に記載の教示を用いて操作され得、それによって生産宿主は炭素を効率的に同化し得、セルロース性材料が炭素源として利用可能になる。

【 0 1 4 1 】

IV. 生産後プロセッシング

発酵において生産された脂肪酸誘導体は発酵培地から分離されうる。脂肪酸誘導体を水性培地から分離するために知られているあらゆる技術を利用できる。本明細書において提供する1つの例示的な分離プロセスは二相(二相性)分離プロセスである。このプロセスは、遺伝子操作された生産宿主を脂肪酸誘導体を生産するのに十分な条件下で培養すること、誘導体を有機相に回収することおよび有機相を水性発酵プロセスから分離することを含む。この方法はバッチおよび連続発酵設定の両方において実施できる。

【 0 1 4 2 】

二相性分離は脂肪酸誘導体が比較的混ざり合わないことを利用して分離を容易にする。混ざり合わないこととは、化合物が水に比較的溶解できないことをいい、化合物の分配係
50

数によって規定される。分配係数、Pは、有機相にある化合物の平衡濃度(二相性 システムにおいて有機相は通常生産 プロセスにおいて脂肪酸誘導体によって形成される相であるが、いくつかの例において有機相は供給されうる(例えば、生成物分離を促進するためのオクタン層))を 水相 (即ち発酵ブロス)において平衡にある濃度によって割ったものであると規定される。二相系について記載する場合、Pは通常logPとして議論される。log Pが10の化合物は有機相に10:1に分配され、logPが 0.1の化合物は水相に10:1に分配される。当業者であれば、生産される脂肪酸誘導体が高い logP値を有するように発酵ブロスと有機相とを選択することにより、脂肪酸誘導体 は発酵槽において非常に低濃度であっても有機相に分離されることを理解している。

【0143】

10

本明細書に記載する方法により生産された脂肪酸誘導体は発酵ブロスならびに細胞質において比較的混ざり合わない。それゆえ、脂肪酸誘導体は細胞内または細胞外のいずれかで有機相に回収される。生成物の有機相における回収は、脂肪酸誘導体の細胞機能に対する影響を小さくし、生産宿主がより多くの生成物を生産することを可能とする。言い換えると、脂肪酸誘導体の濃度は宿主細胞に対する顕著な影響を有さない。

【0144】

本明細書に記載のように生産される脂肪アルコール、脂肪酸エステル、ろう、および炭化水素は均質な 化合物の生産を可能とし、ここで少なくとも 60%、70%、80%、90%、または95%の生産された脂肪アルコール、脂肪酸エステルおよびろうは、 4未満の炭素、または 2未満の炭素のみ変動する炭素鎖長を有する。これらの化合物は比較的均一な程度の飽和を有するよう生産され得、例えば、少なくとも 60%、70%、80%、90%、または95%の 脂肪アルコール、脂肪酸エステル、炭化水素およびろうはモノ-、ジ-、またはトリ- 不飽和である。かかる化合物は直接燃料、パーソナルケア添加剤、栄養サプリメントとして利用できる。かかる化合物はまた、後の反応、例えば エステル交換、水素化、水素化、熱分解のいずれかまたは両方を介した触媒的クラッキングまたはエポキシド化反応によりその他の生成物を作るための原材料としても利用できる。

20

【0145】

V. 燃料組成物

本明細書に記載する脂肪酸誘導体は燃料として利用できる。当業者であれば、燃料の意図される目的に応じて、異なる脂肪酸誘導体を生産および利用できることを理解している。例えば、寒冷気候において使用されることが意図される自動車 燃料のためには、分枝脂肪酸誘導体が望ましく、本明細書に提供する教示を用いて、分枝 炭化水素、脂肪酸エステルおよびアルコールを製造できる。本明細書に記載する方法を用いて、所望の燃料品質を有する比較的均質な 脂肪酸誘導体を含む燃料を生産することができる。かかる燃料は、炭素フィンガープリント法、石油由来燃料またはトリグリセリド由来バイオディーゼルと比較した場合に不純物が無いことにより特徴づけられ得、さらに、脂肪酸誘導体に基づく燃料をその他の燃料または燃料添加剤と組み合わせることで所望の性質を有する燃料を生産することができる。

30

【0146】

A. 炭素 フィンガープリント法

40

生物学的に生産された脂肪酸誘導体は、燃料、例えば、 アルコール、ディーゼルおよびガソリンのための新しい原材料である。脂肪酸誘導体を用いて作られたいくつかのバイオ燃料は再生可能な源から生産されているわけではなく、したがって、新規な組成物である。かかる新規な燃料は二重炭素-同位体 フィンガープリント法に基づいて石油化学の炭素由来の燃料とは区別されうる。さらに、特定の生物由来の炭素源(例えば、グルコース対 グリセロール) は二重炭素-同位体 フィンガープリント法により判定できる (米国特許第7,169,588号参照、これは引用により本明細書に含める)。

【0147】

この方法は有用なことに化学的に同一の材料を識別し、生成物における炭素をバイオスフェア (植物) 成分の生育の源 (および可能であれば年数)によって割り当てる。同位体

50

である、 ^{14}C および ^{13}C はこの問題に対して補完的情報を提供する。核半減期が5730年である放射炭素日付同位体 (^{14}C)は、明確に検体の炭素を化石(「死んだ」)およびバイオスフェア(「生きた」)原材料に割り当ててを可能にする[Currie, L. A. "Source Apportionment of Atmospheric Particles," Characterization of Environmental Particles, J. Buffle and H. P. van Leeuwen, Eds., 1 of Vol. I of the IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc) (1992) 3 74]。放射炭素日付における基本的な前提は、大気中の ^{14}C 濃度の一定性が生きた生物中の ^{14}C の一定性を導くことにある。単離されたサンプルを扱う場合、サンプルの年齢は以下の関係 $t = (-5730/0.693) \ln(A/A_{\text{sub.0}})$ (式5)によっておよそ推定でき、ここで t =年齢、5730年は放射炭素の半減期、および A および $A_{\text{sub.0}}$ はそれぞれサンプルおよび現代の標準の ^{14}C 比活性である[Hsieh, Y., Soil Sci. Soc. Am J., 56, 460, (1992)]。しかし1950年からの大気中の核実験および1850年からの化石燃料の燃焼のために、 ^{14}C は第二の地球化学時間特性を獲得している。大気中の CO_2 におけるその濃度--およびしたがって生きたバイオスフェアにおけるその濃度は--1960年代中頃の核実験のピークにおいてはおよそ二倍となっている。それ以来徐々に定常状態 宇宙線生成 (大気中) 基底同位体率 ($^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$)は約 1.2×10^{12} に戻っており、およそその緩和 「半減期」は7-10年である(この後者の半減期は文字通りに解釈してはならず;むしろ原子力時代の始まりからは詳細な大気核の入力/崩壊関数を使用して大気およびバイオスフェア ^{14}C の変動を追跡しなくてはならない)。この後者のバイオスフェア ^{14}C 時間特徴が最近のバイオスフェア 炭素の年数付けの保証を提供する。 ^{14}C は加速器質量分析 (AMS)により測定でき、「現代炭素比(fraction of modern carbon)」(f_M)という単位により結果が与えられる。 f_M はNational Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Materials (SRMs) 4990Bおよび 4990Cにより規定され、これらはそれぞれシュウ酸標準 H_2OxI および H_2OxII として知られている。基本的定義は $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ 同位体比 H_2OxI の0.95倍に関連する (AD 1950を参照)。これは崩壊を修正した産業革命前の木にほぼ匹敵する。現在生きているバイオスフェア(植物材料)については、 f_M はおよそ1.1である。

【0148】

安定な炭素同位体比 ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$)は源の識別および割当への補完的な経路を提供する。所定の生物由来材料における $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ 比は二酸化炭素が固定された時点の大気中の二酸化炭素における $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ 比と一致し、また正確な代謝経路を反映する。地域的変動も起こる。石油、 C_3 植物(広葉)、 $\text{C}_{\text{sub.4}}$ 植物(イネ科植物)、および海洋炭酸塩はすべて $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ および対応するデルタ ^{13}C 値が有意に異なっている。さらに、 C_3 および C_4 植物の脂質は代謝経路の結果として同じ植物の炭水化物成分に由来する材料とは異なる分析となる。測定の精度の範囲内で、 ^{13}C は同位体分別効果によって大きな変動を示し、本発明にとってもっとも顕著なのは光合成機構である。植物における炭素同位体比における相違の主な原因は、植物における光合成 炭素 代謝の経路、特に一次カルボキシル化の際に起こる反応、即ち大気中 CO_2 の最初の固定における相違と密接に関連している。植物の2つの大きいクラスは、「 C_3 」(またはカルビン・ベンソン) 光合成回路を組み込むものと、「 C_4 」(またはハッチ・スラック) 光合成回路を組み込むものである。 C_3 植物、例えば、広葉樹および 針葉樹は、温帯気候領域において優勢である。 C_3 植物において、一次 CO_2 固定またはカルボキシル化 反応には、酵素 リブローズ-1,5-二リン酸 カルボキシラーゼが関与し、最初の安定な生成物は3-炭素化合物である。一方、 C_4 植物には、暖地型牧草、トウモロコシおよびサトウキビなどの植物が含まれる。 C_4 植物においては、さらなる酵素、ホスホエノール-ピルビン酸 カルボキシラーゼを伴うさらなるカルボキシル化 反応が一次カルボキシル化 反応である。第一の安定な 炭素 化合物は4-炭素酸であり、これは後で脱炭酸される。こうして放出される CO_2 は再び C_3 回路によって固定される。

【0149】

C_4 および C_3 植物の両方がある範囲の $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ 同位体比を示すが、典型的な値は約-10~-14/mil (C_4)および -21~-26/mil (C_3)である [Weber et al., J. Agric. Food Chem., 45, 2942 (1997)]。石炭および石油は一般にこの後者の範囲に入る。 ^{13}C 測定尺度は

元タピー・ディー・ベレムナイト(PDB) 石灰石によって設定されたゼロにより規定され、ここで値はこの材料からの変位の千当たり部数によって示される。「 $\Delta^{13}\text{C}$ 」値は千当たり部数(per mil)、%の略であって、以下のように計算される：

【数 1】

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{サンプル}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{標準}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{標準}}} \times 100\% \quad (\text{式 } 6)$$

【0150】

PDB 参照物質 (RM) がなくなって以来、一連の代替的なRMがIAEA、USGS、NIST、およびその他の選択された国際的同位体研究室の協力によって開発された。PDBからのmil当たり変位の表記が $\Delta^{13}\text{C}$ である。マス 44、45 および46の分子イオンに対する高精度安定比質量分析 (IRMS) によって CO_2 に対して測定がなされる。

10

【0151】

脂肪酸誘導体および関連するバイオ燃料、化学物質、および混合物は、石油化学物質由来の対応物と ^{14}C (fM) および二重炭素-同位体 フィンガープリント法によって完全に識別でき、新規組成物であることが示される。

【0152】

本明細書に記載する脂肪酸誘導体はバイオ燃料および化学物質の生産において有用性を有する。本発明により提供されるこの新規な脂肪酸誘導体に基づく生成物の組成物はさらに石油化学物質源のみに由来する物質から二重炭素-同位体 フィンガープリント法に基づいて区別することが出来る。これら生成物を識別する能力は商業目的でこれら材料を追跡することにおいて有益である。例えば、「新しい」および「古い」炭素 同位体 プロファイルの両方を含む燃料または化学物質は「古い」材料のみからできている燃料および化学物質から識別できる。したがって、本発明の材料はその特有のプロファイルに基づいて、競争の規定および寿命の決定のために商業利用できる。

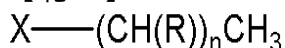
20

【0153】

いくつかの例において、 $\delta^{13}\text{C}$ が 約 -10.9から約 -15.4の脂肪酸誘導体を含むバイオ燃料組成物が作られ、ここで 脂肪酸誘導体は組成物における生物由来材料 (再生可能資源、例えば、セルロース性材料および糖に由来する) の少なくとも 約 85% を占める。別の例において、バイオ燃料組成物は下記式を有する脂肪酸誘導体を含む：

30

【化 1】



[式中、

Xは、 CH_3 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^1$ ； $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ ；または $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^4$ ；

Rは各 nについて独立に非存在、Hまたは低級脂肪族；

nは 8~34の整数、例えば、10~24；および、

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は独立にHおよび低級アルキルから選択される]。

典型的には、Rが低級 脂肪族である場合、R は分枝、非分枝または環状 低級 アルキルまたは低級 アルケニル 部分である。例示的な R基としては、限定されないが、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、シクロペンテニル 等が挙げられる。脂肪酸誘導体は さらに $\delta^{13}\text{C}$ が約 -10.9 から 約 -15.4であるとして特徴づけられ；脂肪酸誘導体が組成物における生物由来材料の少なくとも 約 85% を占める。いくつかの例においてバイオ燃料組成物における脂肪酸誘導体は現代炭素比($f_M^{14}\text{C}$)少なくとも 約 1.003、1.010、または 1.5を有することを特徴とする。

40

【0154】

B. 脂肪酸誘導体

様々な 脂肪酸エステルについてのセタン価(centane number) (CN)、粘度、融点、および燃焼熱が例えば、Knothe、Fuel Processing Technology 86:1059-1070、2005において特徴づけられており、これは引用により本明細書に含める。本明細書に提供する教示を用

50

いて、生産宿主を Knothe、Fuel Processing Technology 86:1059-1070、2005に記載の脂肪酸エステル of the いくつかを生産するよう操作することができる。

【0155】

アルコール（短鎖、長鎖、分枝または不飽和）は、本明細書に記載する生産宿主によって生産することができる。かかるアルコールは直接燃料として利用可能であるし、あるいはそれらは、エステル、即ち上記のようにエステルのA側を作るために利用することが出来る。かかるエステルは単独でまたはその他の本明細書に記載する脂肪酸誘導体と組合せて、有用な燃料である。

【0156】

同様に、本明細書に記載する微生物から生産される炭化水素はバイオ燃料として利用可能である。かかる炭化水素に基づく燃料は、分枝点、規定された飽和度、および特定の炭素長を含むよう設計することが出来る。バイオ燃料として単独でまたはその他の脂肪酸誘導体と組合せて使用する場合、炭化水素はさらに、添加剤またはその他の従来型の燃料（アルコール、トリグリセリド由来のディーゼルおよび石油に基づく燃料）と組み合わせられてもよい。

【0157】

C. 不純物

本明細書に記載する脂肪酸誘導体はバイオ燃料の製造に有用である。かかる脂肪酸誘導体は脂肪酸から直接作られ、トリグリセリドの化学的加工から作られるものではない。したがって、開示された脂肪酸誘導体を含む燃料は、トリグリセリド由来のバイオ燃料、例えば、植物油および脂肪に由来する燃料に通常付随するものよりも少ない不純物を含有する。

【0158】

本明細書に記載する粗脂肪酸誘導体バイオ燃料（脂肪酸誘導体をその他の燃料、例えば、従来型の燃料と混合する前のもの）は、石油化学的ディーゼルまたはバイオディーゼルよりも少ないエステル交換触媒を含有する。例えば、脂肪酸誘導体は、約 2%未満、1.5%、1.0%、0.5%、0.3%、0.1%、0.05%、または0%のエステル交換触媒またはエステル交換触媒に起因する不純物を含みうる。エステル交換触媒としては、例えば、水酸化物触媒、例えば、NaOH、KOH、LiOH、および酸性触媒、例えば、鉍酸触媒およびルイス酸触媒が挙げられる。エステル交換触媒に起因する触媒および不純物としては、これらに限定されないが、スズ、鉛、水銀、カドミウム、亜鉛、チタン、ジルコニウム、ハフニウム、ホウ素、アルミニウム、リン、ヒ素、アンチモン、ビスマス、カルシウム、マグネシウム、ストロンチウム、ウラン、カリウム、ナトリウム、リチウム、およびそれらの組合せが挙げられる。

【0159】

同様に、本明細書に記載する粗脂肪酸誘導体バイオ燃料（脂肪酸誘導体をその他の燃料、例えば、石油化学的ディーゼルまたはバイオディーゼルと混合する前のもの）は、トリグリセリドから作られたバイオ燃料よりも少ないグリセロール（またはグリセリン）を含む。例えば、脂肪酸誘導体は、約 2%未満、1.5%、1.0%、.5%、.3%、.1%、.05%、または0%のグリセロールを含みうる。

【0160】

脂肪酸誘導体に由来する粗バイオ燃料はまた、トリグリセリドからできたバイオディーゼルと比較して少ない遊離アルコール（即ち、エステルを作るために用いられるアルコール）を含む。これは部分的には生産宿主によるアルコールの利用効率に起因する。例えば、脂肪酸誘導体は、約 2%未満、1.5%、1.0%、.5%、.3%、.1%、.05%、または 0%の遊離アルコールを含む。

【0161】

開示された脂肪酸誘導体に由来するバイオ燃料は、さらに石油由来ディーゼルと比較して硫黄濃度が低いことによっても特徴づけられ得る。例えば、脂肪酸誘導体由来のバイオ燃料は約 2%未満、1.5%、1.0%、.5%、.3%、.1%、.05%、または 0%の硫黄を有しうる。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 2 】

D. 添加剤

燃料添加剤は燃料またはエンジンの性能を増強するために用いられる。例えば、燃料添加剤は、凍結/ゲル化点、曇り点、潤滑性、粘度、酸化安定性、発火性、オクタン レベル および引火点を変化させるために利用されうる。米国においては、すべての燃料添加剤は環境保護庁に登録しなければならない、燃料添加剤を販売する会社および燃料添加剤の名称は公共に庁のウェブサイトから入手でき、庁に接触することによっても入手できる。当業者であれば本明細書に記載する脂肪酸誘導体は所望の性質を付与するために1以上のかかる添加剤と混合されうることを理解している。

【 0 1 6 3 】

当業者であれば、本明細書に記載する脂肪酸誘導体は、その他の燃料、例えば、トリグリセリド由来のバイオディーゼル、様々なアルコール、例えば、エタノールおよびブタノール、および石油由来生成物、例えば、ガソリンと混合できることを理解するであろう。いくつかの例において、ゲル化点の低い脂肪酸誘導体、例えば、C16:1 エチルエステルまたはC18:1 エチルエステルが生産される。このゲル化点の低い脂肪酸誘導体をトリグリセリド由来のバイオディーゼルと混合すると燃料全体としてのゲル化点が低下する。同様に、脂肪酸誘導体、例えば、C16:1 エチルエステルまたはC18:1 エチルエステルは石油由来ディーゼルと混合されると少なくともそしてしばしば5%を超えるバイオディーゼルである混合物が提供されうる。いくつかの例において、混合物は少なくとも20%またはそれ以上の脂肪酸誘導体を含む。

【 0 1 6 4 】

例えば、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%の炭素鎖が8:0、10:0、12:0、14:0、14:1、16:0、16:1、18:0、18:1、18:2、18:3、20:0、20:1、20:2、20:3、22:0、22:1または22:3の脂肪酸誘導体を含むバイオ燃料組成物を作ることが出来る。かかるバイオ燃料組成物はさらに、曇り点を約5未満、または0に低下させうる曇り点を低下させる添加剤、界面活性剤またはマイクロエマルジョンから選択される少なくとも1つの添加剤、少なくとも約5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%、85%、90%、または95%のトリグリセリド由来のディーゼル燃料、石油由来ガソリンまたは石油由来ディーゼル燃料を含みうる。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 6 5 】

【図1】図1はFAS 生合成経路を示す。

【図2】図2は、ろう(wax)を生産する生合成経路を示す。ろうは、宿主細胞内で生産されたアルコールを用いて宿主細胞中で生産されうるかまたは、外来性アルコールを培地に添加することによって生産されうる。ろうを生産するよう設計された微生物は、外来性核酸配列およびチオエステラーゼ (EC 3.1.2.14) 配列を用いてろうシンターゼ 酵素 (EC 2.3.1.75)を生産する。ろうの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸合成に関与する酵素 (FAS 酵素 EC 2.3.1.85)、アシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)、脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (EC 1.1.1.*)、アシル-CoAレダクターゼ (1.2.1.50) およびアルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)が含まれる。

【図3】図3は、脂肪アルコールを生産する生合成経路を示す。規定された炭素鎖長を有する脂肪アルコールは、チオエステラーゼ (EC 3.1.2.14)、およびアシル-CoAレダクターゼ (EC 1.2.1.50)、アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) と脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)との組合せをコードする外来性核酸配列を発現させることによって生産されうる。脂肪アルコールの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸合成に関与する酵素 (FAS 酵素 EC 2.3.1.85)、およびアシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)が含まれる。

【図4】図4は、脂肪酸エステルを生産する生合成経路を示す。規定された炭素鎖長を有する脂肪酸エステルは、様々なチオエステラーゼ (EC 3.1.2.14)、アシル-CoAレダクターゼ (1.2.1.50)、アルコール デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)、および脂肪アルコール 形

10

20

30

40

50

成アシル-CoAレダクターゼ (FAR、EC 1.1.1.*)の組合せ、ならびに、アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.84)を外来性に発現させることにより生産されうる。脂肪酸エステルの生産を高めるよう調節されうるその他の酵素には、脂肪酸合成に関与する酵素 (FAS 酵素 EC 2.3.1.85)およびアシル-CoA シンターゼ (EC 2.3.1.86)が含まれる。

【図5】図5は、pCDFDuet-1-fadD-acr1および様々なチオエステラーゼ遺伝子を含むプラスミドで共形質転換された実施例4に記載の株による脂肪アルコール生産を示す。この株を振盪フラスコ中で0.4% グルコースを含むM9 ミネラル培地で25℃で好氣的に培養した。飽和C10、C12、C14、C16 および C18 脂肪アルコールが同定された。少量の C16:1および C18:1 脂肪アルコールもいくつかのサンプルにおいて検出された。脂肪アルコールを細胞ペレットから酢酸エチルを用いて抽出し、N-トリメチルシリル (TMS) イミダゾールを用いて誘導体化し、検出を向上させた。

10

【図6】図6は、生産株からの脂肪アルコールの放出を示す。生産された脂肪アルコールのおよそ 50% が37℃で培養された場合に細胞から放出された。

【図7】図7A-7D は、アルコール アセチルトランスフェラーゼ (AAT、EC 2.3.1.84)を発現する生産宿主およびろうシンターゼ (EC 2.3.1.75)を発現する生産宿主により生産されたオクチルオクタノエート (C8C8)のGS-MS スペクトルを示す。図7Aは、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはADP1 (ろうシンターゼ)を発現した。図7B は、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはSAATを発現した。図7Cは、株 C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B)の酢酸アセチル抽出物を示し、ここでpHZ1.43 プラスミドはADP1 (ろうシンターゼ)またはSAATを含んでいなかった。図7Dは、C41(DE3、 Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) (ここでpHZ1.43 プラスミドはSAATを発現した)により生産されたC8C8のマススペクトルおよびフラグメンテーションパターンを示す。

20

【図8】図8は、*A. baylyi* ADP1 (WSadp1) からのろうシンターゼが生産宿主において*Cuphea hookeriana* からのチオエステラーゼ遺伝子と共発現された場合に作られたエチルエステルの分布を示す。

【図9】図9Aおよび9Bは、GC/MS 分析のクロマトグラムを示す。図9Aは、プラスミド pCDFDuet-1-fadD-WSadp1、pETDuet-1-tesAで形質転換された大腸菌 LS9001 株の培養物のエチル抽出物のクロマトグラムを示す。エタノールを発酵に加えた。図9Bは、エチルヘキサデカノエートおよび参照として用いた エチルオレエートのクロマトグラムを示す。

30

【図10】図10は、脂肪酸誘導体生産を高めるために過剰発現または減弱されうる様々な遺伝子を同定する表を示す。この表はまた、脂肪酸誘導体生成物の構造を変化させるよう調節されうる様々な遺伝子も同定する。当業者であれば、脂肪酸誘導体の構造を変化させるのに用いられる遺伝子のいくつかは、脂肪酸誘導体の生産も上昇させることを理解するであろう。

【実施例】

【0166】

図1はアシル-ACPの合成に直接関与する酵素を示すFAS 経路の図である。ろう/脂肪酸エステル、および脂肪アルコールの生産を上昇させるために、1以上の酵素が過剰発現または突然変異されてフィードバック阻害を低下させうる。さらに、非脂肪酸に基づく生成物を作る中間体を代謝する酵素(副反応)は、脂肪酸生合成経路を介した炭素の流れを上昇させるために機能的に欠失または減弱されうる。以下の実施例1、2、および8は、脂肪酸生産を上昇させるために改変された例示的な 生産宿主を提供する。

40

【0167】

図2、3 および4は、脂肪アルコールおよびろう/脂肪酸エステルをそれぞれ作るよう操作されうる生合成経路を示す。図2に示すように、各基質 (アセチル-CoA、マロニル-CoA、アシル-ACP、脂肪酸、およびアシル-CoA)の各生成物 (アセチル-CoA、マロニル-CoA、アシル-ACP、脂肪酸、およびアシル-CoA) への変換は、示された酵素クラスのメンバーである数種類のポリペプチドを用いて達成することが出来る。以下の実施例は、特定の脂肪

50

アルコールおよびろう/脂肪酸エステルおよび炭化水素を生産するよう操作されたまたは操作されうる微生物を記載する。

【0168】

実施例 1、生産宿主構築

例示的な生産宿主は LS9001である。LS9001 はfadE 遺伝子 (アシル-CoA デヒドロゲナーゼ)を機能的に欠失させるようOverexpress.com (Saint Beausine、France)からのC41(DE3)を改変することによって作られた。

【0169】

簡単に説明すると、大腸菌のfadE ノックアウト 株は、fadEの上流の約 830 bpを増幅するプライマー YafV_NotI およびIvry_OIならびに、fadEの下流の約 960 bpを増幅するプライマーLpcaf_olおよび LpcaR_Bamを用いて作られた。オーバーラップ PCR を用いて全長fadE 遺伝子のインフレームの欠失のためのコンストラクトを作成した。fadE 欠失コンストラクトを対抗選択のためのSacB 遺伝子を含む温度感受性 プラスミド pKOV3にクローニングし、fadEの 染色体欠失を Link et al., J. Bact. 179:6228-6237、1997の方法にしたがって作った。その結果得られた株は、脂肪酸および脂肪アシル-CoAを分解することが出来なかった(この機能的欠失を本明細書においてΔ fadEと称する)。

【0170】

生産宿主に含まれうるさらなる改変は、大腸菌におけるアセチル-CoA カルボキシラーゼ 活性を担う4つの遺伝子(accA、B、CおよびD、受入番号: NP_414727、NP_417721、NP_417722、NP_416819、EC 6.4.1.2)を担持するプラスミドの導入を含む。 accABCD 遺伝子を2工程でバイシストロン性 オペロンとしてpACYCDuet-1 (Novagen、Madison、WI)の NcoI/HindIII およびNdeI/AvrII 部位にクローニングし、その結果得られた プラスミド を pAS004.126と命名した。

【0171】

生産宿主に含まれうるさらなる改変には以下が含まれる: aceEF (ピルビン酸および2-オキソグルタル酸 デヒドロゲナーゼ 複合体のE1p デヒドロゲナーゼ 成分およびE2p ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ 成分をコードする)の過剰発現;およびかかるタンパク質をコードすることが当該技術分野において知られているいずれかの生物、例えば、大腸菌、Nitrosomonas europaea (ATCC 19718)、バチルス・スブチリス、サッカロマイセス・セレビシエ、ストレプトマイセス・エスピーピー、ラルストニア、ロドコッカス、コリネバクテリア、ブレビバクテリア、マイコバクテリア、油性酵母等からのfabH/fabD/fabG/acpP/fabF (FASをコードする)を生産宿主において発現させることが出来る。同様に、生産宿主を操作して大腸菌 ホモログの代わりにまたは大腸菌ホモログに加えてPisum sativum 由来のaccABCD (アセチル co-A カルボキシラーゼをコードする)を発現させることが出来る。しかし、生産宿主がブタノールも生産する場合、 Pisum sativum ホモログを発現させることはあまり望ましくない。

【0172】

いくつかの例示的な生産宿主において、遺伝子はLink、et al., J. Bacteriol. 179:6228-6237、1997の方法を用いてノックアウトまたは減弱されうる。例えば、ノックアウトまたは減弱されうる遺伝子としては、 gpsA (生合成 sn-グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする、受入番号 NP_418065、EC: 1.1.1.94); IdhA (乳酸 デヒドロゲナーゼをコードする、受入番号 NP_415898、EC: 1.1.1.28); pflb (ギ酸 アセチルトランスフェラーゼ 1をコードする、受入番号: P09373、EC: 2.3.1.54); adhE (アルコール デヒドロゲナーゼをコードする、受入番号: CAA47743、EC: 1.1.1.1、1.2.1.10); pta (ホスホトランスアセチラーゼをコードする、受入番号: NP_416800、EC: 2.3.1.8); poxB (ピルビン酸 オキシダーゼをコードする、受入番号: NP_415392、EC: 1.2.2.2); ackA (酢酸キナーゼをコードする、受入番号: NP_416799、EC: 2.7.2.1) およびそれらの組合せが挙げられる。

【0173】

同様に、PlsB[D311E] 突然変異をLS9001に導入して fadE 欠失についての上記方法を用

10

20

30

40

50

いてPlsBを減弱させることができる。いったん導入されると、この突然変異はリン脂質生産に転用される炭素の量を低下させる(図1参照)。簡単に説明すると、PlsB[D311E]をコードする対立遺伝子はアスパラギン酸 311のためのGAC コドンをグルタミン酸のためのGAA コドンにより置換することにより作成される。この変化した対立遺伝子は遺伝子 合成により作られ、染色体 plsB 野生型 対立遺伝子は突然変異体 plsB[D311E] 対立遺伝子に Link et alの方法 (上記参照)を用いて交換される。

【 0 1 7 4 】

実施例 2、生産宿主 改変

以下のプラスミドを脂肪酸誘導体の合成に用いられる様々な タンパク質の発現のために構築した。コンストラクトは標準的 分子生物学 方法を用いて作成し、すべてのクローニングされた遺伝子はIPTG-誘導可能 プロモーター(T7、tacまたは lac プロモーター)の制御下に置いた。

【 0 1 7 5 】

大腸菌の ' tesA 遺伝子 (リーダー 配列を有さないチオエステラーゼ A 遺伝子 受入番号 NP_415027 (Cho and Cronan、The J. of Biol. Chem.、270:4216-9、1995、EC: 3.1.1.5、3.1.2.-))を NdeI/AvrII で消化した pETDuet-1 (本明細書に記載するpETDuet-1はNovagen、Madison、WIから入手可能である)にクローニングした。Umbellularia California、Cuphea hookeriana およびCinnamomum camphorum 由来のFatB-型植物 チオエステラーゼ (TE) をコードする遺伝子(受入番号: UcFatB1=AAA34215、ChFatB2=AAC49269、ChFatB3=AAC72881、CcFatB=AAC49151)を個々に3種類のベクターにクローニングした: (i) NdeI/AvrII で消化した pETDuet-1、(ii) XhoI/HindIII で消化した pBluescript KS+ (Stratagene、La Jolla、CA)(N-末端 lacZ::TE 融合 タンパク質を作るために使用)および(iii) XbaI/HindIIIで消化した pMAL-c2X (New England Lab、Ipswich、MA) (n-末端 MalE::TE 融合を作るために使用)。大腸菌由来のfadD 遺伝子 (アシル-CoA シンゼターゼをコードする)を、そのNdeI/AvrII部位内にAcinetobacter baylyi ADP1由来のacr1 遺伝子 (アシル-CoAレダクターゼ)を含むNcoI/HindIII で消化したpCDFDuet-1 誘導体にクローニングした。表7はいくつかの例示的な生産株を作るために作成されたプラスミドの概要を提供し、当業者であれば異なるプラスミドおよびゲノム 改変を同様の株の達成のために利用できることを認識するであろう。

【 0 1 7 6 】

表7

生産宿主において用いられたプラスミドの概要

【表 7】

プラスミド	起源生物 遺伝子産物	受入番号 EC 番号
pETDuet-1-tesA	大腸菌 TesA	受入番号: NP_415027、EC: 3.1.1.5、3.1.2.-
pETDuet-1-TEuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	Umbellularia California UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-TEch pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	Cuphea hookeriana ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-TEcc pBluescript-TEcc TEci	Cinnamomum camphorum CcFatB	AAC49151
pCDFDuet-1-fadD-acr1	大腸菌	fadD:受入番号 NP_416319、EC 6.2.1.3 acr1:受入番号 YP_047869

10

20

30

40

50

【 0 1 7 7 】

選択された発現 プラスミドは、適合性の レプリコンおよび抗生物質耐性 マーカーを含み、そして4つのプラスミド 発現系が確立できる。それゆえ、LS9001は、(i) TE-発現プラスミドのいずれか、(ii) *acr1*も発現するFadD-発現プラスミド、および(iii) ろうシンターゼ 発現 プラスミドにより共形質転換されうる。IPTGにより誘導されると、その結果得られた 株は、炭素源、例えば、 グルコースから上昇した濃度の脂肪アルコールを生産する。生産される脂肪アルコールの炭素鎖長および飽和の程度は発現されるチオエステラーゼ 遺伝子に依存する。

【 0 1 7 8 】

実施例 3、組換え 大腸菌 株における脂肪アルコールの生産

10

脂肪アルコールを生産宿主において外来性のチオエステラーゼ 遺伝子およびアシル-CoAレダクターゼ 遺伝子 (FAR)を発現させることにより生産した。より具体的には、プラスミドpCDFDuet-1-fadD-*acr1* (アシル-CoAレダクターゼ) およびpETDuet-1-*tesA* (チオエステラーゼ)を大腸菌 株 LS9001 (実施例 1に記載)に形質転換し、対応する形質転換体を100 mg/L のスペクチノマイシンおよび 50 mg/Lのカルベニシリンを追加したLBプレートにおいて選択した。LS9001/pCDFDuet-1-fadD-*acr1* の4つの形質転換体を独立に 50 mg/Lのカルベニシリンおよび100 mg/L のスペクチノマイシンを追加した3 mLの M9 培地に接種した。形質転換体を含むサンプルを25 でシェーカー (250 rpm) でOD₆₀₀が0.5となるまで培養した。1.5 mLの各サンプルを30 mLの上記の培地を含む250 mL フラスコに移した。その結果得られた培養物を25 でシェーカーで OD₆₀₀が0.5 -1.0となるまで培養した。IPTGを次いで終濃度1 mMとなるように添加し、培養を40 時間続けた。

20

【 0 1 7 9 】

細胞を次いで4000 rpmで沈降させ、細胞ペレットを1.0 mL のメタノールに懸濁した。3 mLの酢酸エチルを次いで懸濁した細胞と混合した。3 mLのH₂Oを次いで混合物に添加し、混合物を20 分間超音波処理した。その結果得られた サンプルを4000 rpmで5 分間遠心分離し、脂肪アルコールを含む有機相 (上相)を GC/MS 分析に供した。総アルコール (テトラデカノール、ヘキサデカノール、ヘキサデセノールおよびオクタデセノールを含む)収率は約 1-10 mg/Lであった。空のベクターのみを担持する大腸菌 株を同様に培養した場合、0.2-0.5 mg/Lのみの脂肪アルコールが 酢酸エチル抽出物中にみられた。

【 0 1 8 0 】

30

実施例 4、生産宿主からの脂肪アルコールの生産および放出

Acr1 (アシル-CoAレダクターゼ)を、唯一の炭素およびエネルギー 源としてグルコース上で培養した大腸菌で発現させた。大腸菌は少量の 脂肪アルコール、例えば、ドデカノール (C12:0-OH)、テトラデカノール (C14:0-OH)およびヘキサデカノール (C16:0-OH)を生産した。別のサンプルにおいて、大腸菌においてFadD (アシル-CoA シンターゼ) を *acr1*と共に発現させたところ、脂肪アルコール 生産の5倍の上昇が観察された。

【 0 1 8 1 】

別のサンプルにおいて、*acr1*、*fadD*、*accABCD* (アセチル-CoA カルボキシラーゼ) (実施例 1に記載のように構築した*accABCD*を担持するプラスミド)を野生型 大腸菌C41(DE3) および大腸菌 C41(DE3 Δ *fadE*、アシル-CoA デヒドロゲナーゼを欠く株)において様々な別個のチオエステラーゼ(TE)とともに発現させた。この結果さらに脂肪アルコール 生産が上昇し、脂肪アルコールプロファイルが改変された (図5参照)。例えば、大腸菌 *tesA* (pETDuet-1-*tesA*) のこの系における過剰発現は、C12:0-OH、C14:0-OH およびC16:0-OHのおよそ60-倍の上昇を達成し、C14:0-OH が主要な脂肪アルコールであった。非常に類似の結果がChFatB3 酵素 (pMAL-c2X-TEcuにおける*Cuphea hookeriana*由来FatB3)を発現させた場合に得られた。UcFatB1 酵素 (pMAL-c2X-TEucにおける*Umbellularia californica*由来FatB1)を発現させた場合、脂肪アルコール 生産はおよそ 20-倍上昇し、C12:0-OH が主な脂肪アルコールであった。

40

【 0 1 8 2 】

ChFatB3 およびUcFatB1の発現もそれぞれ顕著な量の不飽和脂肪アルコール C16:1-OH

50

およびC14:1-OHの生産を導いた。脂肪アルコールの存在は tesAの発現から作られたサンプルの上清においてもみられた(図6)。37 において およそ 等量の 脂肪アルコールが上清および細胞ペレットにみられ、25 では およそ 25%の脂肪アルコールが上清にみられた。

【 0 1 8 3 】

実施例 5、中鎖脂肪酸エステル

様々な植物における酢酸アシル生産を担うアルコール アセチルトランスフェラーゼ (AAT、EC 2.3.1.84)は、中程度の長さのろう、例えば、 オクチルオクタノエート、デシルオクタノエート、デシル デカノエート等を生産するために利用できる。中鎖 アルコール (例えば、 C6、C8)および中鎖 アシル-CoA (または 脂肪酸、例えば、 C6またはC8)から合成された脂肪エステルは比較的低い融点を有する。例えば、ヘキシル ヘキサノエートは融点が-55 であり、オクチルオクタノエートは融点が -18から-17 である。これら化合物の低い融点によりこれらはバイオ燃料として使用するための良好な候補となる。

【 0 1 8 4 】

この実施例において、SAAT 遺伝子を 生産宿主 C41(DE3、 Δ fadE)において大腸菌由来fadDおよび acr1 (A. baylyi ADP1由来アルコール レダクターゼ) とともに共発現させ、オクタン酸を発酵プロセスに提供した。この結果、オクチルオクタノエートが生産された。同様に、A. baylyi ADP1由来のろうシンターゼ 遺伝子を生産宿主においてSAAT 遺伝子の代わりに発現させた場合、オクチルオクタノエートが生産された。

【 0 1 8 5 】

組換え SAAT 遺伝子は DNA 2.0 (Menlo Park、CA 94025)を用いて合成した。合成された DNA は公表された遺伝子配列 (受入番号 AF193789)に基づき、NcoI部位を除くように改変した。合成された SAAT 遺伝子 (BamHI-HindIII 断片として)をBamHIと HindIIIとで直鎖化した pRSET B (Invitrogen、Carlsbad、California)にクローニングした。その結果得られたプラスミド、pHZ1.63Aを、大腸菌由来fadD 遺伝子およびA. baylyi ADP1由来acr1 遺伝子を担持するpAS004.114Bとともに大腸菌 生産宿主に共形質転換した。形質転換体を2%グルコースを含む3 mLのM9 培地で培養した。IPTG 誘導 および0.02%の オクタン酸の添加の後、培養を25 で 40 時間続けた。その後、3 mLの酢酸アセチルを全培養物に添加し、ミキサーで数回混合した。酢酸アセチル 相を GC/MSで分析した。

【 0 1 8 6 】

驚くべきことに、酢酸アセチル抽出物において、酢酸アシルはみられなかった。しかし、新規な化合物がみられ、化合物はオクチルオクタノエートであった。一方 SAAT 遺伝子を有さない対照 株[C41(DE3、 Δ fadE)/pRSET B+pAS004.114B]はオクチルオクタノエートを生産しなかった。A. baylyi ADP1由来のろうシンターゼ 遺伝子がpHZ1.43によって担持される株 [C41(DE3、 Δ fadE)/pHZ1.43 B+pAS004.114B]もオクチルオクタノエートを生産した(図7B参照)。

【 0 1 8 7 】

SAAT 活性がオクチルオクタノエートを生産するという知見は以前報告されておらず、これは、中鎖 ろう、例えば、 オクチルオクタノエート、オクチル デカノエートの生産を可能とし、これらは融点が低く、トリグリセリドに基づくバイオディーゼルにかわるバイオ燃料としての使用のための良好な候補である。

【 0 1 8 8 】

実施例 6、大腸菌 株 LS9001 におけるろうエステルの生産

ろうエステルを 脂肪アルコール 形成アシル-CoAレダクターゼ、チオエステラーゼ、およびろうシンターゼを発現するよう大腸菌 生産宿主を操作することによって生産した。したがって、生産宿主はエステルのAおよびB側の両方を生産し、両方の側の構造はチオエステラーゼ 遺伝子発現により影響を受けた。

【 0 1 8 9 】

より具体的には、A. baylyi ADP1由来ろうシンターゼ (WSadp1と称する、受入番号 AA 017391、EC: 2.3.175)を A. baylyi ADP1 由来のゲノム DNAを鋳型として用いて以下のブ

10

20

30

40

50

ライマーにより増幅した。プライマーは、(1) WSadp1_NdeI、5' -TCATATGCGCCCATACATCCG -3' および(2) WSadp1_AvrI、5' - TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTTAGTT-3' であった。PCR産物を NdeI およびAvrIIで消化し、pCOALDeut-1 にクローニングし、 pHZ 1.43を得た。WSadp1 を担持するプラスミドをpETDuet-1' tesAおよびpCDFDuet-1-fadD-acr1の両方と共に 大腸菌 株 LS9001に共形質転換し、形質転換体を50 mg/Lのカナマイシン、50 mg/Lのカルベニシリン および100 mg/L のスペクチノマイシンを追加したLBプレートで選択した。3つの形質転換体を3 mLの LBKCS (50 mg/Lのカナマイシン、50 mg/Lのカルベニシリン、100 mg/L のスペクチノマイシンおよび10 g/Lのグルコースを追加したLBブロス) に接種し、37 のシェーカー (250 rpm)で培養した。培養物のOD₆₀₀が0.5 に達すると、1.5 mL の各培養物を50 mLの LBKCSを含む250 mL フラスコに移し、フラスコをシェーカー (250 rpm)で 37 で培養物のOD₆₀₀が0.5-1.0となるまで培養した。IPTGを次いで終濃度1 mMにて添加した。誘導した培養物を37 シェーカーでさらに40-48 時間培養した。

【0190】

培養物を次いで50 mL コニカルチューブに入れ、細胞を 3500 X gで10 分間遠沈した。細胞ペレットを次いで5 mLの 酢酸エチルと混合した。酢酸エチル抽出物をGC/MSで分析した。ろう (C16C16、C14:1C16、C18:1C18:1、C2C14、C2C16、C2C16:1、C16C16:1 およびC2C18:1を含む)の細胞内収率は約 10 mg/Lであった。空のベクターのみを含む大腸菌 株を同様に培養した場合、0.2 mg/Lのみのろうが酢酸エチル抽出物にみられた。

【0191】

実施例 7、生産宿主からの脂肪-エチルエステルの生産および放出

LS9001 株を A. baylyi由来ろうシンターゼ 遺伝子を担持するプラスミド(プラスミド pHZ1.43)、Cuphea hookeriana由来チオエステラーゼ 遺伝子を担持するプラスミド(プラスミド pMAL-c2X-TEcu)および大腸菌 由来fadD 遺伝子を担持するプラスミド (プラスミド pCDFDuet-1-fadD)で形質転換することによって改変した。この組換え 株を25 で50mg/Lの カナマイシン、100 mg/Lの カルベニシリンおよび 100 mg/Lの スペクチノマイシンを含む3 mLの M9 培地で培養した。IPTG 誘導の後、培地を終濃度 1% エタノールおよび2 % グルコースとなるよう調整した。培養物を IPTG 誘導後40 時間培養した。細胞を 3500 X g で 10 分間の遠心分離により消費培地から分離した。細胞ペレットを3 mLの M9 培地に再懸濁した。細胞 懸濁液および消費培地を次いで1体積の酢酸エチルにより抽出した。その結果得られた細胞懸濁液からの酢酸エチル 相および上清を GC-MS 分析に供した。結果はC16 エチルエステルがもっとも主要なエステル 種 (このチオエステラーゼについて予想されるとおり、表1参照)であり、生産された脂肪酸エステルの20%が細胞から放出されたことを示した(図8参照)。pCOLADuet-1 (ろうシンターゼ 遺伝子について空の ベクター)、pMAL-c2X-TEuc (U. californica由来fatB含有)およびpCDFDuet-1-fadD (大腸菌由来fadD 遺伝子)を含む対照 大腸菌 株 C41(DE3、Δ fadE) は検出可能な量の脂肪-エチルエステルを生産することができなかった。脂肪酸エステルを市販の パルミチン酸 エチルエステルを参照として用いて定量した。 脂肪酸エステルは、メタノールまたは イソプロパノールを発酵ブロスに添加する以外は本明細書に記載する方法を用いても作られ、予測される脂肪酸エステルが生産された。

【0192】

実施例 8、組換え 大腸菌 株において生産される脂肪-エチルエステルの組成に対する様々な チオエステラーゼの影響

チオエステラーゼ、FatB3 (C. hookeriana)、TesA (大腸菌)、および FatB (U. californica) をろうシンターゼ (A. baylyi)と同時に発現させた。pHZ1.61と称するプラスミドを NotI-AvrII 断片 (acr1 遺伝子担持) を pHZ1.43由来のNotI-AvrII 断片により置換することにより構築し、fadDおよびADP1 ろうシンターゼが1つのプラスミドにあり、両方のコード配列が別々の T7 プロモーターの制御下にあるようにした。pHZ1.61の構築により実施例 6に記載の 3つのプラスミド システムではなく2つのプラスミド システムを使用することが可能となった。 pHZ1.61を様々な上記のチオエステラーゼ 遺伝子を担持する様々な プラスミドの何れかと共に大腸菌 C41(DE3、Δ fadE)に共形質転換した。

【 0 1 9 3 】

これら形質転換体によって生産される総脂肪酸 エチルエステル(上清および細胞内 脂肪酸 エチルエステル)を本明細書に記載する技術を用いて評価した。脂肪酸 エチルエステルの収率および 組成を表 8に要約する。

【 0 1 9 4 】

表 8

組換え 大腸菌 C41(DE3、 Δ fadE)/pHZ1.61および 様々なチオエステラーゼ遺伝子を担持するプラスミドによる脂肪酸 エチルエステルの収率(mg/L)および組成

【表 8】

チオエ ステラ ーゼ	C2C10	C2C12: 1	C2C12	C2C14: 1	C2C14	C2C16: 1	C2C16	C2C18: 1	合計
'TesA	0.0	0.0	6.5	0.0	17.5	6.9	21.6	18.1	70.5
ChFatB 3	0.0	0.0	0.0	0.0	10.8	12.5	11.7	13.8	48.8
ucFatB	6.4	8.5	25.3	14.7	0.0	4.5	3.7	6.7	69.8
pMAL	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	12.8	7.6	26.0

10

注: TesA、pETDuet-1-tesA; chFatB3、pMAL-c2X-TEcu; ucFatB、pMAL-c2X-TEuc; pMAL、pMAL-c2X、本研究に用いたチオエステラーゼ 遺伝子について空の ベクター。

20

【 0 1 9 5 】

実施例 9、生産宿主構築

脂肪酸 生産を制御する遺伝子は微生物の間で保存されている。例えば、表 9は炭化水素を生産する微生物において発現することが知られている本明細書に記載する多くの遺伝子のホモログを示す。脂肪酸 生産を上昇させ、それゆえ、微生物、例えば、表 9に示すものにおける炭化水素 生産を上昇させるために、異種 遺伝子、例えば、大腸菌由来のものを発現させることができる。当業者であれば表 9に示す微生物に内因性の遺伝子を、本明細書に記載する方法を用いて過剰発現、または減弱させることができることを理解している。さらに、図10に示す遺伝子を内因的に炭化水素を生産する微生物において発現または減弱させて規定された炭素鎖長、飽和点および分枝点を有する特定の炭化水素 の生産を可能とすることが出来る。

30

【 0 1 9 6 】

例えば、アセチル-CoA カルボキシラーゼをコードする外来性核酸配列がK. radiotoleransに導入される。以下の遺伝子はK. radiotoleransにおけるアセチル-CoA カルボキシラーゼ タンパク質生成物を含む; アセチル CoA カルボキシラーゼ、アルファ サブユニット (accA/ ZP_00618306)、アセチル-CoA カルボキシラーゼ、ピオチンカルボキシル キャリアタンパク質 (accB/ ZP_00618387)、アセチル-CoA カルボキシラーゼ、ピオチン カルボキシラーゼ サブユニット (accC / ZP_00618040)、および アセチル-CoA カルボキシラーゼ、ベータ (カルボキシルトランスフェラーゼ) サブユニット (accD/ ZP_00618306)。これらの遺伝子をプラスミドにクローニングし、K. radiotolerans 発現系、例えば、Ruyter et al., Appl Environ Microbiol. 62:3662-3667、1996に開示の発現系の制御下で合成 アセチル-CoA カルボキシラーゼ オペロン (accABCD)を作らせる。プラスミドの K. radiotoleransへの形質転換は 脂肪酸生産を促進する。K. radiotoleransの炭化水素生産株を操作して本明細書に開示される方法を用いて特定の炭素鎖長を有する分枝、不飽和炭化水素を作ることが出来る。

40

【 0 1 9 7 】

表9

炭化水素 生産宿主

【表 9 - 1】

生物	遺伝子名	受入番号 / 配列番号 / 座位	EC 番号	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20				
	accA	YP_388034	6.4.1.2	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G22	accC	YP_388573/YP_388033	6.3.4.14, 6.4.1.2	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G23	accD	YP_388034	6.4.1.2	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G28	fabH	YP_388920	2.3.1.180	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G29	fabD	YP_388786	2.3.1.39	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G30	fabG	YP_388921	1.1.1.100	
			3.1.26.3,	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G31	acpP	YP_388922/YP_389150	1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G32	fabF	YP_388923	2.3.1.179	10
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G33	gpsA	YP_389667	1.1.1.94	
			1.1.1.27,	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G34	ldhA	YP_388173/YP_390177	1.1.1.28	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accA	942060 - 943016	6.4.1.2	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accB	3440869 - 3441336	6.4.1.2	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accC	3441351 - 3442697	6.3.4.14, 6.4.1.2	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accD	2517571 - 2516696	6.4.1.2	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fadE	1003232 - 1000791	1.3.99.-	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	plsB(D311E)	333843 - 331423	2.3.1.15	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	aceE	840558 - 843218	1.2.4.1	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	aceF	843248 - 844828	2.3.1.12	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabH	1579839 - 1580789	2.3.1.180	20
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabD	1580826 - 1581749	2.3.1.39	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabG	CAA74944	1.1.1.100	
			3.1.26.3,	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	acpP	1582658 - 1582891	1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabF	1582983 - 1584221	2.3.1.179	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	gpsA	124800 - 125810	1.1.1.94	
			1.1.1.27,	
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	ldhA	1956806 - 1957789	1.1.1.28	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accA	ZP_00618306	6.4.1.2	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accB	ZP_00618387	6.4.1.2	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accC	ZP_00618040 /ZP_00618387	6.3.4.14, 6.4.1.2	30

【表 9 - 2】

<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accD	ZP_00618306	6.4.1.2	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fadE	ZP_00617773	1.3.99.-	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	plsB(D311E)	ZP_00617279	2.3.1.15	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	aceE	ZP_00617600	1.2.4.1	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	aceF	ZP_00619307	2.3.1.12	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabH	ZP_00618003	2.3.1.180	10
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabD	ZP_00617602	2.3.1.39	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabG	ZP_00615651	1.1.1.100	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	acpP	ZP_00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabF	ZP_00617605	2.3.1.179	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	gpsA	ZP_00618825	1.1.1.94	
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	ldhA	ZP_00618879	1.1.1.27, 1.1.1.28	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accA	YP_425310	6.4.1.2	20
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accB	YP_427521	6.4.1.2	
		YP_427522/YP_425144/YP_427028/YP_426209/		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accC	YP_427404	6.3.4.14, 6.4.1.2	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accD	YP_428511	6.4.1.2	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fadE	YP_427035	1.3.99.-	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceE	YP_427492	1.2.4.1	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceF	YP_426966	2.3.1.12	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabH	YP_426754	2.3.1.180	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabD	YP_425507	2.3.1.39	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabG	YP_425508/YP_425365	1.1.1.100	
			3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	acpP	YP_425509		30
		YP_425510/YP_425510		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabF	/YP_425285	2.3.1.179	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	gpsA	YP_428652	1.1.1.94	
			1.1.1.27, 1.1.1.28	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ldhA	YP_426902/YP_428871		
<i>Vibrio furnissii</i>	accA		1, 16 6.4.1.2	
<i>Vibrio furnissii</i>	accB		2, 17 6.4.1.2	
<i>Vibrio furnissii</i>	accC		3, 18 6.3.4.14, 6.4.1.2	
<i>Vibrio furnissii</i>	accD		4, 19 6.4.1.2	
<i>Vibrio furnissii</i>	fadE		5, 20 1.3.99.-	
<i>Vibrio furnissii</i>	plsB(D311E)		6, 21 2.3.1.15	
<i>Vibrio furnissii</i>	aceE		7, 22 1.2.4.1	40
<i>Vibrio furnissii</i>	aceF		8, 23 2.3.1.12	
<i>Vibrio furnissii</i>	fabH		9, 24 2.3.1.180	
<i>Vibrio furnissii</i>	fabD		10, 25 2.3.1.39	

【表 9 - 3】

<i>Vibrio furnissii</i>	fabG		11, 26	1.1.1.100 3.1.26.3,	
<i>Vibrio furnissii</i>	acpP		12, 27	1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Vibrio furnissii</i>	fabF		13, 28	2.3.1.179	
<i>Vibrio furnissii</i>	gpsA		14, 29	1.1.1.94 1.1.1.27,	
<i>Vibrio furnissii</i>	ldhA		15, 30	1.1.1.28	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	accA	ZP_01643799		6.4.1.2	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	accB	ZP_01644036		6.4.1.2	10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	accC	ZP_01644037		6.3.4.14, 6.4.1.2	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	accD	ZP_01644801		6.4.1.2	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	fadE	ZP_01645823		1.3.99.-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	plsB(D311E)	ZP_01644152		2.3.1.15	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	aceE	ZP_01644724		1.2.4.1	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	aceF	ZP_01645795		2.3.1.12	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	fabH	ZP_01643247		2.3.1.180	20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	fabD	ZP_01643535		2.3.1.39	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	fabG	ZP_01643062		1.1.1.100 3.1.26.3,	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	acpP	ZP_01643063		1.6.5.3, 1.6.99.3	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	fabF	ZP_01643064		2.3.1.179	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	gpsA	ZP_01643216		1.1.1.94 1.1.1.27,	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	ldhA	ZP_01645395		1.1.1.28	

【0198】

30

表9について、受入番号は 2007年4月15日のGenBank、Release 159.0 からのものである。EC 番号は、2007年4月のKEGG、Release 42.0 (+ 05/09/07までの、およびその日を含む日々のアップデート) からのものである。Erwinia amylovora 株 Ea273 についての結果は、Sanger sequencing center、5/9/07の完全ショットガン配列から得、Erwiniaについての位置はSanger 偽染色体上の位置を示し、Vibrio furnissii M1からの配列は9/28/06のLS9 VFM1 偽染色体、v2 buildからのものであり、完全遺伝子を含み、フランキング配列を含みうる。

【0199】

実施例 10、さらなる例示的な生産株

以下の表10は、さらなる 例示的な 生産株を示す。2 例の生合成経路が脂肪酸、脂肪アルコールおよびろうエステル生産のために記載されている。遺伝子操作された宿主は、大腸菌からのaccABCD 遺伝子、大腸菌からのtesA 遺伝子および大腸菌からのfadD 遺伝子の発現を 宿主細胞にクローニングすることによって生産できる。宿主細胞はリストに加えて大腸菌、酵母から選択しうる。これらの遺伝子は実施例1 および2に上記する 1 以上の遺伝子操作を含むよう改変された宿主細胞へと形質転換されうる。表10に示すように、さらなる生産宿主を示した外来性 遺伝子を用いて作ることが出来る。

【0200】

表10

遺伝子操作された生産株の作成に有用な遺伝子の組合せ

40

【表 10 - 1】

ペプチド	遺伝子源	遺伝子	脂肪酸		脂肪アルコール		ろう / 脂肪エステル	
			実施例 1	実施例 2	実施例 1	実施例 2	実施例 1	実施例 2
アセチル-CoA カルボキシラーゼ	<i>E. coli</i>	accABCD	X	X	X	X	X	X
チオエステラーゼ	<i>E. coli</i>	tesA	X		X		X	X
	<i>Cinnamomum camphora</i>	ccFatB						
	<i>Umbellularia californica</i>	umFatB		X		X		
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB2						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB3						
	<i>Cuphea hookerian</i>	chFatA						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatA1						
	<i>Arabidopsis thalian</i>	AtFatB1[M141T]						
アシル-CoA シンターゼ	<i>E. coli</i>	fadD	X	X	X	X	X	X
アシル-CoA レダクターゼ	<i>Bombyx mori</i>	bFAR						
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	acr 1			X		X	
	<i>Simmondsia chinensis</i>	FAR				X		X
	<i>Triticum aestivum</i>							

10

20

【表 10 - 2】

	<i>Mus musculus</i>	mFAR1						
	<i>Mus musculus</i>	mFAR2						
	<i>Acinetobacter</i> sp M1	acr M1						
	<i>Homo sapiens</i>	hFAR						
ろうシンターゼ / アルコール アシル-トランス フェラーゼ	<i>Fundibacter jadensis</i> DSM 12178	WST9						
	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N	WSHN					x	
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	WSadp1						x
	<i>Mus musculus</i>	mWS						
	<i>Homo sapiens</i>	hWS						
	<i>Fragaria x ananassa</i>	SAAT						
	<i>Malus x domestica</i>	MpAAT						
	<i>Simmondsia chinensis</i>	JJWS (AAD38041)						
デカルボニラーゼ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	cer1						
	<i>Oryza sativa</i>	cer1						
トランスポーター	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N						x	x
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cer5						

10

20

30

【0201】

実施例 11、発酵

宿主 微生物をprpBCDE プロモーター系の下でpBAD24において大腸菌からのumuC および umuDを適当な最終-生成物の生産遺伝子によるこの遺伝子のデノボ合成を介して発現させるよう操作することができる。スモールスケールの炭化水素 生成物の生産のために、pBAD24(アンピシリン 耐性および最終生成物合成 経路を有する)ならびに pUMVC1 (カナマイシン 耐性およびアセチル CoA/マロニル CoA 過剰発現系を有する)を担持する大腸菌 BL 21(DE3) 細胞を37 °Cで2L フラスコ中の、75 µg/mL アンピシリンおよび50 µg/ml カナマイシンを追加した500 ml LB 培地中で>200 rpmで振盪しながら培養物の OD₆₀₀ が > 0.8となるまで一晩インキュベートした。OD₆₀₀ が> 0.8に達すると、細胞に25 mM プロピオン酸ナトリウム (pH 8.0)を補給し、操作した遺伝子系を活性化して、生産させ、細胞増殖を停止させた (umuCおよび umuD タンパク質の活性化を介して)。誘導は 6 時間30 分で行った。インキュベーションの後、培地を GC-MSを用いて生成物について調査する (以下に記載のように)。

40

【0202】

ラージスケールの生成物の生産のためには、操作された微生物を10 L、100 Lまたはそれ以上のバッチで培養し、発酵させ、適当な場合プラスミドにコードされる特定の遺伝子に基づいた所望の生成物の発現を誘導する。pBAD24 (アンピシリン 耐性および最終生成物合成 経路を有する)ならびに pUMVC1 (カナマイシン 耐性およびアセチル-CoA/マロニ

50

ル-CoA 過剰発現系を有する)を担持する大腸菌 BL21(DE3) 細胞を 500 mL の種培養物からインキュベートし、LB 培地 (グリセロール 非含有) 中での10 L 発酵 (100 L 発酵のために5 L)にて 3 で >200 rpm で振盪しながら培養物の OD₆₀₀ が> 0.8に達するまで (典型的には 16 時間) 50 µg/mL カナマイシンおよび75 µg/mL アンピシリンとともにインキュベートする。培地を 25 mM プロピオン酸ナトリウム (pH 8.0)を維持するよう連続的に補給するよう処理し、操作された遺伝子系を生産 ならびに細胞増殖の停止のために活性化する (umuCおよびumuD タンパク質の活性化を介して)。培地に連続的にグルコースを補給し濃度 90g/100 mLを維持する。1 時間の誘導の後、全細胞体積の10%を超えないアリコートを取り出し、撹拌せずに放置し、炭化水素 生成物が表面に上昇し、自発的な相分離が起こるようにする。炭化水素成分を次いで収集し、水相を反応 チャンバに戻す。反応 チャンバは連続的に作動させる。OD₆₀₀ が 0.6を下回ると、細胞を種培養物から培養した新しいバッチと交換する。

10

【0203】

ろうエステル 生産のために、単離に続いて、ろうエステルを簡単に1 M HClで洗浄してエステル結合を開裂させ蒸留水で徹底的に洗浄してpH 7に戻す。

【0204】

実施例 12、生成物特徴決定

脂肪アルコールおよび脂肪酸エステルを特徴づけ、定量するために、電子衝撃質量分析 (MS)検出に結合したガスクロマトグラフィー (GC)を用いた。脂肪アルコール サンプルをまず過剰の N-トリメチルシリル (TMS) イミダゾールで誘導体化して検出感受性を高めた。脂肪酸エステルは誘導体化は必要なかった。脂肪アルコール-TMS 誘導体と脂肪酸エステルとの両方を酢酸エチルなどの適当な 揮発性溶媒に溶解した。サンプルを30m DP-5 キャピラリーカラムで以下の方法を用いて分析した。GC/MS カラムへの1 µL スプリットレス注入の後、オーブンを100 に3 分間維持した。温度を20 /分の速度で320 に上げた。オーブンを320 にさらに5 分間維持した。キャリアガスであるヘリウムの流速は1.3 mL/分であった。MS 四極子(quadrapole)は50から550 m/zを走査する。生成物ピークの保持時間およびフラグメンテーションパターンを確実な参照と比較してピークの実体を確認した。

20

【0205】

例えば、ヘキサデコン酸 エチルエステルは 10.18 分にて溶出した (図9A および9B)。284 マスユニットの親イオンが容易に観察された。マス断片化の際に生じた娘イオンはより豊富であった。これは80 マスユニットのもっとも優勢な娘イオンを含んでいた。誘導体化脂肪アルコール ヘキサデカノール-TMSは10.29 分に溶出し、313の親イオンが観察できた。もっとも優勢なイオンは299マスユニットのM-14イオンであった。

30

【0206】

定量を様々な 濃度の 適当な確実な参照を注入することにより上記のGC/MS 方法によって行った。この情報を用いて応答 (全統合イオン計数)対 濃度により標準曲線を作成した。

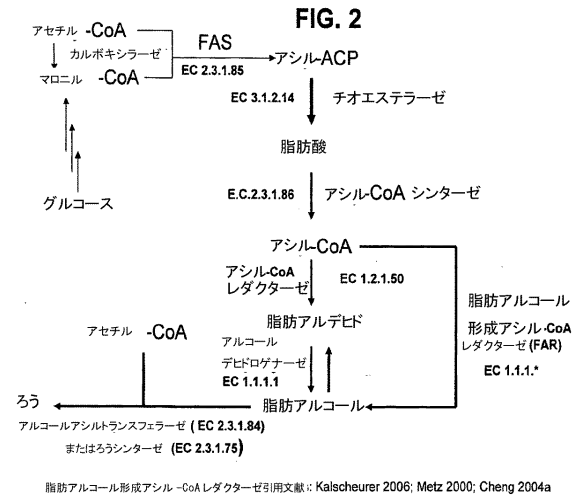
【0207】

均等物

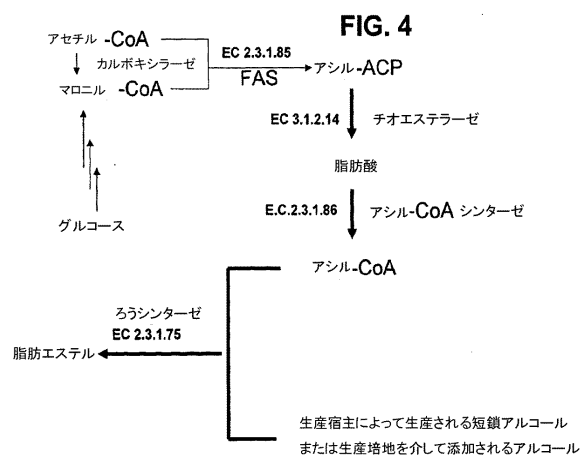
40

本発明の特定の実施例が明示的に本明細書に開示されるが、上記の明細書および実施例は例示的なものであり限定的なものではない。本発明の多くの改変が実施例を含む本明細書を読むと当業者に明らかであろう。本発明の完全な範囲は均等物の完全な範囲と共に実施例および明細書を参照してかかる改変と共に決定されるべきである。

【圖 2】

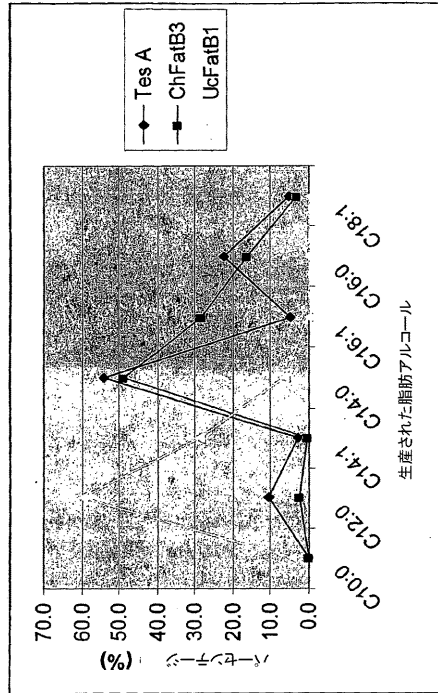


【 図 4 】



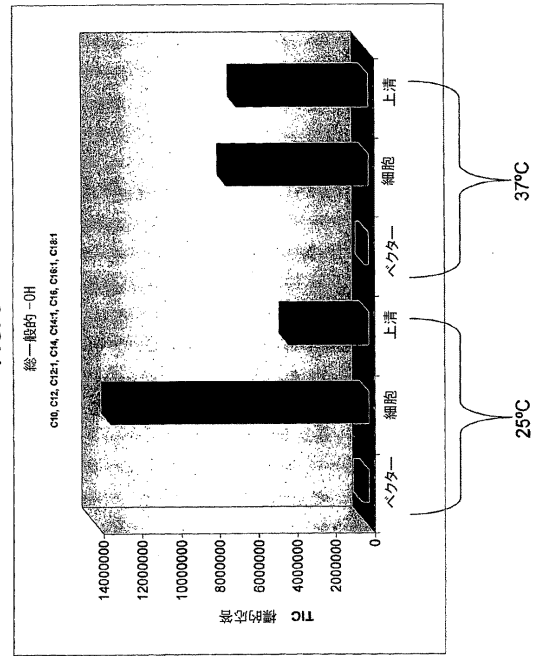
【図 5】

FIG. 5



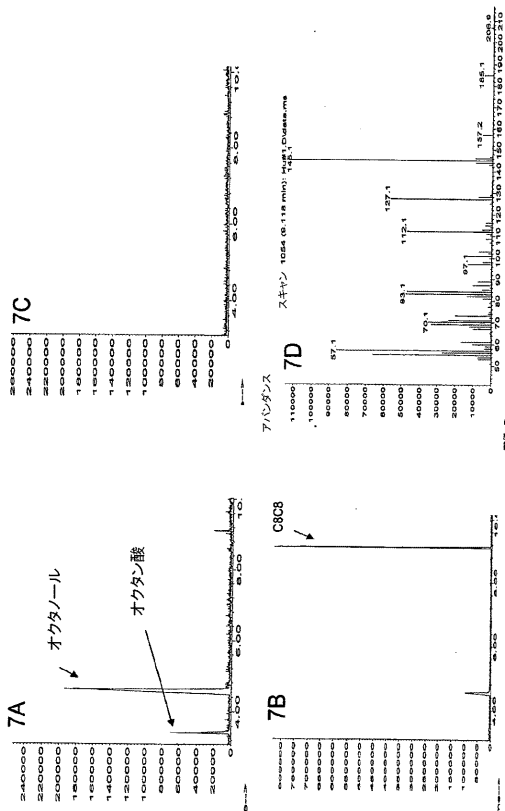
【図 6】

FIG. 6



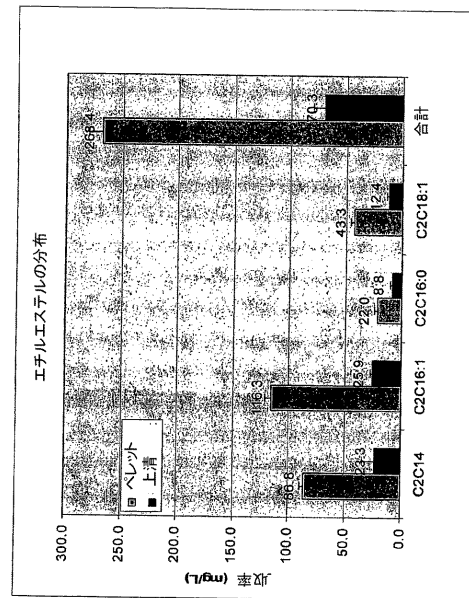
【図 7】

FIGS. 7A-7D



【図 8】

FIG. 8



【 図 1 0 - 1 2 】

[illegible]

*** END OF SHEET ***

【配列表】

0005933909000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 0 L 1/02 (2006.01)		C 1 0 L 1/02	
C 1 0 L 1/182 (2006.01)		C 1 0 L 1/182	
C 1 0 L 1/32 (2006.01)		C 1 0 L 1/32	D
C 1 1 C 3/00 (2006.01)		C 1 1 C 3/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 5/02 (2006.01)		C 1 2 P 5/02	
C 1 2 P 7/04 (2006.01)		C 1 2 P 7/04	

(31)優先権主張番号 PCT/US2007/003736

(32)優先日 平成19年2月13日(2007.2.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/908,547

(32)優先日 平成19年3月28日(2007.3.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ジェイ・ディ・キースリング

アメリカ合衆国 9 4 7 0 8 カリフォルニア州バークレー、スターリング・アベニュー 1 1 6 0 番

(72)発明者 フ・ジハオ

アメリカ合衆国 9 4 5 4 6 カリフォルニア州カストロ・バレー、グリッドン・ストリート 1 9 0 4 5 番

(72)発明者 クリス・ソマービル

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、キンボール・ウェイ 1 0 0 番

(72)発明者 ジョージ・チャーチ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、キンボール・ウェイ 1 0 0 番

(72)発明者 デイビッド・ベリー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、キンボール・ウェイ 1 0 0 番

(72)発明者 リサ・フリードマン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、キンボール・ウェイ 1 0 0 番

(72)発明者 アンドレアス・シャーマー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、キンボール・ウェイ 1 0 0 番

- (72)発明者 シェイン・ブルベイカー
アメリカ合衆国 9 4 6 0 9 カリフォルニア州オークランド、フォーティフィフス・ストリート 3 7
2 番
- (72)発明者 スティーブン・ピー・デル・カーディレ
アメリカ合衆国 9 4 0 0 2 カリフォルニア州ベルモント、サウスビュー・コート 6 1 1 番

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 ▲高▼ 美葉子

審判官 田村 明照

- (56)参考文献 Appl. Environ. Microbiol., 2006, Vol. 82, No. 2, pp
. 1373 - 1379
J. Bio. Chem. 2003, vol. 278, No. 10, pp8075 - 8082

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
IPC C12N 15/00-15/90
C12N 1/20- 1/21
P u b M e d