(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7216018号
(P7216018)

(45)発行日　令和5年1月31日(2023.1.31)

(24)登録日　令和5年1月23日(2023.1.23)

(51)国際特許分類		FI		
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19	ZNA
C12P	*7/64 (2022.01)*	C12P	7/64	
C12P	*7/04 (2006.01)*	C12P	7/04	
C12N	*15/09 (2006.01)*	C12N	15/09	Z
C07C	*69/145 (2006.01)*	C07C	69/145	

請求項の数　18　（全328頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-563585(P2019-563585)
(86)(22)出願日　平成30年5月17日(2018.5.17)
(65)公表番号　特表2020-520644(P2020-520644A)
(43)公表日　令和2年7月16日(2020.7.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/033151
(87)国際公開番号　WO2018/213554
(87)国際公開日　平成30年11月22日(2018.11.22)
審査請求日　令和2年7月17日(2020.7.17)
(31)優先権主張番号　62/507,654
(32)優先日　平成29年5月17日(2017.5.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

(73)特許権者　517357723
プロヴィヴィ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９０４０４ サンタモニカ コロラド アベニュー １７０１
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　シェパード，ミカ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　昆虫フェロモンの生成のための微生物及び関連する化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシルＣｏＡの内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物であって、

（ａ）一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、ミドリムシ（Euglena gracilis）脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードし、かつ発現する異種核酸分子

を含む、組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項２】

ミドリムシ（Euglena gracilis）脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼが、還元当量としてＮＡＤＰＨの代わりにＮＡＤＨを使用する、請求項１に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項３】

ミドリムシ（Euglena gracilis）脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼが、配列番号７５のアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１又は２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項４】

ミドリムシ（Euglena gracilis）脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼが、配列番

号７５のアミノ酸配列を含む、請求項１又は２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項５】
飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼをコードする核酸分子を少なくとも１つ含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項６】
ｆａｏ１遺伝子の、欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項７】
ａ）脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する１つ以上の酵素；
ｂ）１つ以上の脂肪アルコールデヒドロゲナーゼ；
ｃ）１つ以上の脂肪アルコールオキシダーゼ；
ｄ）脂肪酸のω－ヒドロキシ脂肪酸への変換を触媒する１つ以上の酵素；及び
ｅ）１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ；
から選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異、及び／又は低下を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項８】
（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；
（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；
（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；
（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び
（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項９】
脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、ＣＡＡ０４６６３及びＣＡＧ７９２１４のそれぞれの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項１０】
ＦＡＯ１酵素、並びに脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、Ｃ

ＡＡ０４６６３及びＣＡＧ７９２１４のそれぞれの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１１】

一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールが、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１２】

飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物であって、

（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号５４のアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び

（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号７５のアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子

を含む、組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１３】

ａ）１つ以上の脂肪アルコールデヒドロゲナーゼ；

ｂ）脂肪酸のω－ヒドロキシ脂肪酸への変換を触媒する１つ以上の酵素；及び

ｃ）１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ；

から選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異、及び／又は低下を含む、請求項１２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１４】

（ａ）１つ以上の脂肪アルコールデヒドロゲナーゼ；

（ｂ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び

（ｃ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１５】

脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、ＣＡＡ０４６６３及びＣＡＧ７９２１４のそれぞれの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１２～１４のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１６】

ＦＡＯ１酵素、並びに脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、ＣＡＡ０４６６３及びＣＡＧ７９２１４のそれぞれの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、請求項１２～１４のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。

【請求項１７】
一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールが、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、請求項１２～１６のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物。
【請求項１８】
飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する方法であって：一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で請求項１～１７のいずれか一項に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ微生物を培養することを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２０１７年５月１７日に出願された米国仮出願第６２／５０７，６５４号に対する優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。。
【０００２】
配列表に関する記載
本願に付随する配列表は紙の複製物の代わりにテキスト形式で提供され、及び本明細書によって参照により本明細書に援用される。配列表を含むテキストファイルの名称は、PRVI_020_01WO_SeqList_ST25.txtである。このテキストファイルは約２４０ＫＢであり、２０１８年５月１７日に作成されており、ＥＦＳ－Ｗｅｂから電子的に提出されるものである。
【０００３】
技術分野
本願は、昆虫フェロモン、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体として有用であり得る不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートの生合成に有用な組換え微生物に関する。本願は、本組換え微生物を使用して不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートを生成する方法、並びにこれらの化合物の１つ以上及び／又は本組換え微生物を含む組成物に更に関する。
【背景技術】
【０００４】
背景
世界的な食糧需要の増大に伴い、有効な害虫防除の必要性が高まっている。従来の殺虫剤は、容易に入手可能で即効性があり、且つ確実性が高いため、最も普及している化学防除剤の１つである。しかしながら、これらの化学薬品の過剰使用、誤用、及び乱用が、耐性のある害虫、自然生態系の改変、及びある場合には環境被害につながっている。
【０００５】
昆虫フェロモンの使用による害虫集団の防除は、従来の殺虫剤に代わる実行可能で安全であり、且つ環境に優しい選択肢として支持が広がっている。１９５０年代後期に発見されて以来、これらの分子は、大量捕獲、誘引殺虫、及び交信撹乱を含めた種々の方法による昆虫集団の削減において有効性を示す。後者の交信撹乱方法は、とりわけ非毒性の害虫防除手段に相当し、合成フェロモンが天然に存在するフェロモンをマスクする能力を利用して、それにより混乱及び交信撹乱を生じさせるものである。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
農業用昆虫防除におけるフェロモンの潜在的可能性は大きいが、現在利用可能な技法を用いたフェロモン合成はコストが極めて高く、これは、高価作物以外でのこの持続可能な技術の普及を妨げている。従って、昆虫フェロモン並びに関連するフレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体の費用効率の高い生産に向けた新規技術を開発する必要がある

。本発明者らは、低コスト原料から合成昆虫フェロモンを含めた広範囲に及ぶ不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートを生成する能力を有する組換え微生物の開発によってこの必要性に対処する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

開示の概要

本願は、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートから選択される１つ以上の化合物を生成する生合成経路を有する組換え微生物に関する。本明細書に記載される組換え微生物は、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートから選択される、昆虫フェロモン、フレグランス、又はフレーバー剤などの少なくとも１つの化合物の生成に用いられ得る。

【０００８】

一実施形態では、本組換え微生物は、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒド又は脂肪アルコールを生成する生合成経路を含む。従って、第１の態様において、本願は、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒド又は脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物に関し、この組換え微生物は、（ａ）：飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）：一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドへの変換を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドは、昆虫フェロモンである。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドは、フレグランス又はフレーバー剤である。一部の実施形態では、本組換え微生物は、（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、（ｃ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールは、昆虫フェロモンである。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールはフレグランス又はフレーバー剤である。一部の実施形態では、本組換え微生物は、アルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、このアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼは、（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。

【０００９】

一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有するデサチュラーゼである。

【００１０】

一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、脂肪酸又はその誘導体、例えば脂肪酸ＣｏＡエステルなどのＣ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１、Ｃ１２、又はＣ１３位に二重結合を生じさせる能力を有する。

【００１１】
一例示的実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼはＺ１１デサチュラーゼである。本明細書に記載される様々な実施形態において、Ｚ１１デサチュラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アカオビコハマキ（Argyrotaenia velutiana）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、又はタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）種の生物から単離することができる。更なるＺ１１－デサチュラーゼ、又はそれらをコードする核酸配列は、カイコガ（Bombyx mori）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、サウスウエスタンコーンボーラー（Diatraea grandiosella）、ミスジアオリンガ（Earias insulana）、クサオビリンガ（Earias vittella）、コナガ（Plutella xylostella）、カイコガ（Bombyx mori）又はアメリカウリノメイガ（Diaphania nitidalis）から単離することができる。例示的実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＪＸ６７９２０９、ＪＸ９６４７７４、ＡＦ４１６７３８、ＡＦ５４５４８１、ＥＵ１５２３３５、ＡＡＤ０３７７５、ＡＡＦ８１７８７、及びＡＹ４９３４３８から選択される配列を含む。一部の実施形態では、カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アカオビコハマキ（Argyrotaenia velutiana）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、又はタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）種の生物由来のＺ１１デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号９、１８、２４及び２６から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号４９に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１０及び１６から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５３に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号１１及び２３から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号５０及び５１から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号１２、１７及び３０から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。更なる実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号１３、１９、２５、２７及び３１から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イネヨトウ（S. inferens）由来の配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１及びＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、キメラポリペプチドを含む。一部の実施形態では、完全な又は部分的なＺ１１デサチュラーゼが別のポリペプチドに融合される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼのＮ末端天然リーダー配列が別の種由来のオレオシンリーダー配列に置換される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号１５、２８及び

２９から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号６１、６２、６３、７８、７９及び８０から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１２】

特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、Ｚ１１－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－７，１１－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１５：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－６，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－７，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－８，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－１１，１４－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｚ）－４，６，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｅ）－７，１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｚ，Ｚ）－４，６，１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１７：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－８，１１－１７：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－１１，１４－１８：アシル－ＣｏＡ、又はこれらの組み合わせから選択される一不飽和又は多価不飽和生成物への変換を触媒する。

【００１３】

別の例示的実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼはＺ９デサチュラーゼである。本明細書に記載される様々な実施形態において、Ｚ９デサチュラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nobilalis）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、タバコガ（Helicoverpa assulta）、又はアメリカタバコガ（Helicoverpa zea）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＡＹ０５７８６２、ＡＦ２４３０４７、ＡＦ５１８０１７、ＥＵ１５２３３２、ＡＦ４８２９０６、及びＡＡＦ８１７８８から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由来の配列番号２０に示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由来の配列番号５８に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号２１に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号５９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号２２に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号６０に示されるアミノ酸配列を含む。本開示の他のＺ９デサチュラーゼは、配列番号９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５を含む。一部の実施形態では、Ｚ９－１８特異的デサチュラーゼの過剰発現は、上清中への脂肪アルコールの拡散を向上させるために膜流動性を高めることができる。

【００１４】

特定の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、Ｚ９－１１：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）

－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－４，９－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１５：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－６，９－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１７：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－５，９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１２－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１２－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｚ）－３，６，９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｅ）－９，１２，１５－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｚ）－９，１２，１５－１８：アシル－ＣｏＡ、又はこれらの組み合わせから選択される一不飽和又は多価不飽和生成物への変換を触媒する。

【００１５】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、続く２つの二重結合の不飽和化の触媒能を有する二機能性デサチュラーゼを発現し得る。

【００１６】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする２つ以上の外因性核酸分子を発現し得る。例えば、組換え微生物は、Ｚ１１デサチュラーゼをコードする外因性核酸分子とＺ９デサチュラーゼをコードする別の外因性核酸分子とを発現し得る。

【００１７】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、独立に又は脂肪アシルデサチュラーゼと共に、飽和又は一不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの、共役多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するように作用する脂肪アシルコンジュガーゼを発現し得る。

【００１８】

一実施形態において、本開示は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$アルデヒド又は脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒド又は脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルデヒド又は脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。

【００１９】

別の実施形態では、本組換え微生物は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子を発現する。

【００２０】

更なる実施形態において、本開示は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有

する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子及び脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。

【００２１】

別の実施形態では、本組換え微生物は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子及び脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子を発現する。

【００２２】

更に別のある実施形態では、脂肪アシルコンジュガーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有するコンジュガーゼである。

【００２３】

特定の実施形態では、コンジュガーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、コドリンガ（Cydia pomonella）、エンドウシンクイ（Cydia nigricana）、ホソバヒメハマキ（Lobesia botrana）、ゴママダラメイガ（Myelois cribrella）、ノシメマダラメイガ（Plodia interpunctella）、マッソンマツカレハ（Dendrolimus punctatus）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、カイコガ（Bombyx mori）、キンセンカ（Calendula officinalis）、キカラスウリ（Trichosanthes kirilowii）、ザクロ（Punica granatum）、ツルレイシ（Momordica charantia）、ホウセンカ（Impatiens balsamina）、及びリンゴウスチャイロハマキ（Epiphyas postvittana）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、コンジュガーゼは、GenBank受託番号又はUniprotデータベース：Ａ０Ａ０５９ＴＢＦ５、Ａ０Ａ０Ｍ３Ｌ９Ｅ８、Ａ０Ａ０Ｍ３Ｌ９Ｓ４、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＨ８、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＳ８、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＨ８、Ｂ６ＣＢＳ４、ＸＰ＿０１３１８３６５６．１、ＸＰ＿００４９２３５６８．２、ＡＬＡ６５４２５．１、ＮＰ＿００１２９６４９４．１、ＮＰ＿００１２７４３３０．１、Ｑ４Ａ１８１、Ｑ７５ＰＬ７、Ｑ９ＦＰＰ８、ＡＹ１７８４４４、ＡＹ１７８４４６、ＡＦ１８２５２１、ＡＦ１８２５２０、Ｑ９５ＵＪ３から選択される配列を含む。

【００２４】

本明細書に記載される様々な実施形態において、脂肪アルコール形成アシル－ＣｏＡレダクターゼ、即ち、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼ、又はそれをコードする核酸配列は、カブラヤガ（Agrotis segetum）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、オオタバコガ（Helicoverpa amigera）シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、ミドリムシ（Euglena gracilis）又はサクラスガ（Yponomeuta evonymellus）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、レダクターゼは、GenBank受託番号ＪＸ６７９２１０及びＨＧ４２３１２８、及びUniprot受託番号Ｉ３ＰＮ８６から選択される配列を含む。一部の実施形態では、カブラヤガ（Agrotis segetum）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、オオタバコガ（Helicoverpa amigera）シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、ミドリムシ（Euglena gracilis）又はサクラスガ（Yponomeuta evonymellus）種の生物由来の脂肪アシルレダクターゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、このレダクターゼはカブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１に示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５５に示され

るアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、このレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号２に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号５６に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、このレダクターゼは、配列番号３、３２、４０、７２、７４、７６及び８１から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５５に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号５６に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の配列番号４１及び５７から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）由来の配列番号７３及び８２から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、ミドリムシ（Euglena gracilis）由来の配列番号７５に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）由来の配列番号７７に示されるアミノ酸配列を含む。

【００２５】

［0025］ 一部の実施形態では、本開示は、複数の脂肪アシルレダクターゼ酵素を使用することを教示する。一部の実施形態では、本開示は、同じ脂肪アシルレダクターゼの複数のコピーを含む組換え微生物を教示する。他の実施形態では、本開示は、２つ以上の異なる脂肪アシルレダクターゼを含む組換え微生物を教示する。一部の実施形態では、異なる脂肪アシルレダクターゼは、異なる補因子を用いる。例えば、ミドリムシ（Euglena gracilis）（配列番号７５）由来の脂肪アシルレダクターゼは、還元当量としてＮＡＤＰＨの代わりにＮＡＤＨを使用する。一部の実施形態では、これは、２つ以上の異なるレダクターゼを使用する補因子の平衡を可能にし得る。

【００２６】

［0026］ 一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号４２～４８から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号８３～８９から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００２７】

特定の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの、（Ｚ）－３－ヘキセノール、（Ｚ）－３－ノネノール、（Ｚ）－５－デセノール、（Ｅ）－５－デセノール、（Ｚ）－７－ドデセノール、（Ｅ）－７－ドデセノール、（Ｅ）－８－ドデセノール、（Ｚ）－８－ドデセノール、（Ｚ）－９－ドデセノール、（Ｅ）－９－ドデセノール、（Ｚ）－９－テトラデセノール、（Ｅ）－９－テトラデセノール、（Ｚ）－９－ヘキサデセノール、（Ｚ）－１１－テトラデセノール、（Ｚ）－７－ヘキサデセノール、（Ｚ）－１１－ヘキサデセノール、（Ｅ）－１１－ヘキサデセノール、（Ｅ）－１１－テトラデセノール、又は（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－ヘキサデカジエノール、（１１Ｚ，１３Ｅ）－ヘキサデカジエノール、（Ｅ，Ｅ）－８，１０－ドデカジエノール、（Ｅ，Ｚ）－７，９－ドデカジエノール、（Ｚ）－１３－オクタデセノール、又はこれらの組み合わせから選択される脂肪アルコール生成物への変換を触媒する。

【００２８】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする２つ以上の外因性核酸分子を発現し得る。

【００２９】

［0029］ 更なる実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性

供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ４～Ｃ２２脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３、７８～８０及びGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される。他の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される。更なる実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びカンジ

ダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）からなる群から選択される酵母である。
【００３０】
［0030］一部の実施形態では、本組換え微生物は、好ましくは、≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡを保持する(store)アシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及びジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、表５ｂから選択される。
【００３１】
［0031］一部の実施形態では、本組換え微生物は、好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アシルグリセロールリパーゼは、表５ｃから選択される。
【００３２】
［0032］一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。更なる実施形態では、本組換え微生物は、（ｉ）１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）１つ以上のアシルトランスフェラーゼ；（ｉｉｉ）１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ；（ｉｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールオキシダーゼ；及び（ｖｉ）１つ以上のシトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。
【００３３】
［0033］一部の好ましい実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、所望の鎖長を超える所望の脂肪アシル－ＣｏＡの切断を除去又は低減するように欠失又は下方制御される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。
【００３４】
［0034］一部の実施形態では、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素と異なる。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は

、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を調節する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、表５ａから選択される。

【００３５】

[0035] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ並びにカンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【００３６】

[0036] 一部の実施形態では、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の好ましい実施形態では、ＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ及び／又はＤＧＡＴをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、欠失又は下方制御され、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する１つ以上のＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ又はＤＧＡＴで置換される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素と異なる。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、表５ｂから選択される。

【００３７】

[0037] 一部の好ましい実施形態では、アシルグリセロールリパーゼ（モノ－、ジ－又はトリアシルグリセロールリパーゼ）及びステロールエステルエステラーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、欠失又は下方制御され、長鎖アシルグリセロール基質を選好する１つ以上のアシルグリセロールリパーゼで置換される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ

並びにカンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【００３８】

[0038] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【００３９】

[0039] 一部の実施形態では、飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦$Ｃ_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素と異なる。一部の実施形態では、発現される１つ以上の内因性又は外因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、長鎖アシルグリセロールのエステル結合を加水分解することを選好する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、表５ｃから選択される。

【００４０】

[0040] 一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｅ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ８－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１０－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１２－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１４－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１０：アシル－ｃｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ

１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ６Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ８Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１０Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１２Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３Ｅ１６－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３Ｚ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【００４１】

［0041］ 一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪酸の、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、アルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ｃ４ＨＮ７８、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｎ９ＤＡ８５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｒ８ＸＷ２４、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ａ０ＧＧＭ５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１１７Ｎ１５８及びノストック・プンクチフォルメ（Nostoc punctiforme）ＹＰ＿００１８６５３２４からなる群から選択される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【００４２】

［0042］ 一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼから選択される酵素をコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒド及び≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【００４３】

［0043］ 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを生成する能力を有する微生物に改変する方法であって、以下：（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応す

る一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{4}$～Ｃ$_{22}$脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を微生物中に導入することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である。

【００４４】

［0044］ 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で本明細書に記載される組換え微生物を培養することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを回収するステップを更に含む。更なる実施形態では、回収するステップは、蒸留を含む。更に別の実施形態では、回収するステップは、膜に基づく分離を含む。

【００４５】

［0045］ 一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_{2}$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートにエステル化する。

【００４６】

［0046］ 更なる実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を提供し、この組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触

媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む。

【００４７】

［0047］一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。一部の好ましい実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）；ＹＡＳ１（ＹＡＬＩ１Ｃ０３３４９）、Ｙａｓ２（ＹＡＬＩ０Ｅ３２４１７）、Ｇｓｙｌ１（ＹＡＬＩ０Ｆ１８５０２）、ＨＦＤ１（ＹＡＬＩ０Ｆ２３７９３）、ＨＦＤ２（ＹＡＬＩ０Ｅ１５４００）、ＨＦＤ３（ＹＡＬＩ０Ａ１７８７５）、ＨＦＤ４（ＹＡＬＩ０Ｂ０１２９８）、ＳＤＲ（ＹＡＬＩ０Ａ１９５３６）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。他の好ましい実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上

のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の欠失を含む。

【００４８】

[0048] 一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１１－１６：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への飽和脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。他の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【００４９】

[0049] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、表３ａから選択される。一部の実施形態では、C_6～C_{24}脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【００５０】

[0050] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルデヒド及びC_6～C_{24}脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【００５１】

[0051] 一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号６４、６５、６６及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。他の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カブラヤガ（Agrotis segetum）又はイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来のデサチュラーゼから選択される脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。

【００５２】

[0052] 一部の実施形態では、本開示は、飽和C_6～C_{24}脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールを生成する能力を有するヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物に改変する方法であって、以下：（ａ）飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％

、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５５、５６、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1 Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である。

【００５３】

[0053] 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で本明細書に記載される組換え微生物を培養することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを回収するステップを更に含む。更なる実施形態では、回収するステップは、蒸留を含む。更に別の実施形態では、回収するステップは、膜に基づく分離を含む。

【００５４】

[0054] 一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_{2}$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートにエステル化する。

【００５５】

上記の第１の態様に記載される生合成経路に加え、本願は、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸から誘導される飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰ中間体を利用して不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する追加の生合成経路を提供する。従って、第２の態様において、本願は、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物に関し、この組換え微生物は、（ａ）：Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の、対応する飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、（ｂ）の生成物と比べて２炭素の伸長を有する対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の内因性又は外因性核酸分子；（ｄ）：（ｃ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｅ）（ｄ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$の、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール

への変換を触媒するデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を発現する。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは昆虫フェロモンである。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールはフレグランス又はフレーバー剤である。一部の実施形態では、本組換え微生物は、アルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、このアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼは、（ｅ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、（ｅ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。

【００５６】

一部の実施形態では、アシル－ＡＣＰシンテターゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪酸を基質として利用する能力を有するシンテターゼである。

【００５７】

本明細書に記載される様々な実施形態において、アシル－ＡＣＰシンテターゼ、又はそれをコードする核酸は、ビブリオ・ハーベイ（Vibrio harveyi）、ロドトルラ・グルチニス（Rhodotorula glutinis）、又はヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）種の生物から単離することができる。

【００５８】

一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは可溶性デサチュラーゼである。本明細書に記載される様々な実施形態において、脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼ、又はそれをコードする核酸は、ハナテンジクアオイ（Pelargonium hortorum）、オオトウワタ（Asclepias syriaca）、又はキャッツクロー（Uncaria tomentosa）種の生物から単離することができる。

【００５９】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする２つ以上の外因性核酸分子を発現し得る。

【００６０】

上記に記載したとおり、脂肪酸伸長酵素、即ち脂肪酸シンターゼ複合体を利用して、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの鎖長をα炭素において追加の２炭素だけ伸長させることができる。一部の実施形態では、この追加の２炭素は内因性マロニル－ＣｏＡに由来する。一実施形態では、脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の核酸分子は内因性核酸分子であり、即ち、この核酸分子は組換え微生物にとって天然である。別の実施形態では、脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の核酸分子は外因性核酸分子である。

【００６１】

本明細書に記載される様々な実施形態において、脂肪アルデヒド形成アシル－ＡＣＰレダクターゼ、即ち、脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼ、又はそれをコードする核酸配列は、ハナテンジクアオイ（Pelargonium hortorum）、オオトウワタ（Asclepias syriaca）、及びキャッツクロー（Uncaria tomentosa）種の生物から単離することができる。

【００６２】

上述のとおり、第２の態様に係る組換え微生物は、（ｄ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する能力を有するデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を含む。一実施形態では、デヒドロゲナーゼは内因性核酸分子

によってコードされる。別の実施形態では、デヒドロゲナーゼは外因性核酸分子によってコードされる。例示的実施形態では、デヒドロゲナーゼをコードする内因性又は外因性核酸分子は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、大腸菌（Escherichia coli）、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、又はカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）種の生物から単離される。

【００６３】

上記の第１及び第２の態様に記載される生合成経路に加え、本願は、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸から誘導される飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰ中間体を利用して不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する追加の生合成経路を提供する。従って、第３の態様において、本願は、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物に関し、この組換え微生物は、（ａ）：Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の、対応する飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸への変換を触媒する少なくとも１つの外因性脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ；（ｄ）（ｃ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸のＣｏＡ活性化から誘導される一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、（ｃ）の生成物と比べて２炭素以上の伸長を有する対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するエロンガーゼをコードする１つ以上の内因性又は外因性核酸分子；及び（ｅ）：（ｄ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは昆虫フェロモンである。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールはフレグランス又はフレーバー剤である。一部の実施形態では、本組換え微生物は、アルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、このアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼは、（ｅ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、（ｅ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。

【００６４】

この第３の態様に係る一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを利用して一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰを対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸に変換することができる。一部の実施形態では、可溶性脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを使用して遊離脂肪酸を放出させ、ＣｏＡチオエステルに再活性化させることができる。脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼとして本実施形態に含まれるものとして、Ｑ４１６３５、Ｑ３９４７３、Ｐ０５５２１．２、ＡＥＭ７２５１９、ＡＥＭ７２５２０、ＡＥＭ７２５２１、ＡＥＭ７２５２３、ＡＡＣ４９７８４、ＣＡＢ６０８３０、ＥＥＲ８７８２４、ＥＥＲ９６２５２、ＡＢＮ５４２６８、ＡＡＯ７７１８２、ＣＡＨ０９２３６、ＡＣＬ０８３７６、及びこれらのホモログを含めたが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡは、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの鎖長をα炭素において追加の２炭素ずつ伸長させるのに利用し得るエロンガーゼの基質としての役割を果たし得る。一部の実施形態では、追加の２炭素は内因性マロニル－ＣｏＡに由来す

る。

【００６５】

上記に記載したとおり、一部の実施形態では、第１、第２、又は第３の態様に係る組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。特定の実施形態では、アルコールオキシダーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、カンジダ・ボイジニ（Candida boidinii）、コマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）、ヨモギギク（Tanacetum vulgare）、ホホバ（Simmondsia chinensis）、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）、ミヤコグサ（Lotus japonicas）、又はカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、アルコールオキシダーゼは、GenBank受託番号Ｑ００９２２、Ｆ２ＱＹ２７、Ｑ６ＱＩＲ６、Ｑ８ＬＤＰ０、及びＬ７ＶＦＶ２から選択される配列を含む。

【００６６】

上記に記載したとおり、一部の実施形態では、第１又は第２の態様に係る組換え微生物は、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。特定の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、オオカバマダラ（Danaus plexippus）、ニセアメリカタバコガ（Heliotis virescens）、カイコガ（Bombyx mori）、タマナヤガ（Agrotis ipsilon）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、ニシキギ（Euonymus alatus）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、GenBank受託番号ＡＹ２４２０６６、ＡＹ２４２０６５、ＡＹ２４２０６４、ＡＹ２４２０６３、ＡＹ２４２０６２、ＥＨＪ６５２０５、ＡＣＸ５３８１２、ＮＰ＿００１１８２３８１、ＥＨＪ６５９７７、ＥＨＪ６８５７３、ＫＪ５７９２２６、ＧＵ５９４０６１、ＫＴＡ９９１８４．１、ＡＩＮ３４６９３．１、ＡＹ６０５０５３、ＸＰ＿００２５５２７１２．１、ＸＰ＿５０３０２４．１、ＸＰ＿５０５５９５．１及びＸＰ＿５０５５１３．１から選択される配列を含む。

【００６７】

代替的実施形態では、脂肪アルコールは、化学的方法を用いて、例えば、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物など、化学剤を利用した化学的触媒作用によって脂肪アセテートに変換されてもよい。

【００６８】

一部の実施形態では、不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、発現時に昆虫にとって毒性のあるタンパク質又はポリペプチドをコードする１つ以上の核酸を発現するように更に改変されてもよい。本開示に好適な例示的毒物産生遺伝子は、バチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）、セラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）、及びストレプトミセス属（Streptomyces）のメンバーなどの昆虫病原生物から得ることができる。例示的実施形態では、不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、バチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）（「Ｂｔ」）毒素をコードする核酸を発現するように更に改変されてもよい。追加的又は代替的実施形態では、不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、クモ毒など、他の毒性タンパク質をコードする核酸を発現するように更に改変されてもよい。

【００６９】

一部の実施形態では、不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、発現時に昆虫にとって毒性のあるオリゴヌクレオチドを生成するＲＮＡｉ分子を発現するように更に改変されてもよい。

【００７０】
一部の実施形態では、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、発現時に昆虫にとって毒性のある小分子を生成する代謝経路を発現するように更に改変されてもよい。毒性小分子の非限定的な例としては、アザジラクチン、スピノサド、アベルメクチン、ピレトリン、及び様々なテルペノイドが挙げられる。
【００７１】
本明細書に記載される様々な実施形態において、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は、酵母、糸状菌類、又は藻類などの真核微生物であっても、或いは、細菌などの原核微生物であってもよい。例えば、好適な宿主細胞としては、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、サッカロミセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、ハンゼヌラ属（Hansenula）、クロストリジウム属（Clostridium）、ザイモモナス属（Zymomonas）、大腸菌属（Escherichia）、サルモネラ属（Salmonella）、ロドコッカス属（Rhodococcus）、シュードモナス属（Pseudomonas）、バチルス属（Bacillus）、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、エンテロコッカス属（Enterococcus）、アルカリゲネス属（Alcaligenes）、クレブシエラ属（Klebsiella）、パエニバチルス属（Paenibacillus）、アルスロバクター属（Arthrobacter）、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）、ブレビバクテリウム属（Brevibacterium）、及びストレプトミセス属（Streptomyces）からなる群から選択される属の細胞を挙げることができる。
【００７２】
一部の実施形態では、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路を含む組換え微生物は酵母である。好適な酵母の例としては、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、サッカロミセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、ハンゼヌラ属（Hansenula）、クルイベロミセス属（Kluyveromyces）、イサチェンキア属（Issatchenkia）、ザイゴサッカロミセス属（Zygosaccharomyces）、デバリオミセス属（Debaryomyces）、シゾサッカロミセス属（Schizosaccharomyces）、パキソレン属（Pachysolen）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、トリコスポロン属（Trichosporon）、ロドトルラ属（Rhodotorula）、又はミクソザイマ属（Myxozyma）からなる群から選択される属の酵母が挙げられる。特定の実施形態では、酵母は油産生酵母である。本開示での使用に好適な例示的油産生酵母としては、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、ロドトルラ属（Rhodotorula）、ロドスポリジウム属（Rhodosporidium）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、トリコスポロン属（Trichosporon）、及びリポミセス属（Lipomyces）のメンバー、例えば、限定はされないが、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、ロドスポリジウム・トルロイデス（Rhodosporidium toruloides）、リポミセス・スタルケイ（Lipomycesstarkey）、Ｌ．リポフェルス（L. lipoferus）、Ｃ．レブカウフィ（C. revkaufi）、Ｃ．プルケリマ（C. pulcherrima）、Ｃ．ウチリス（C. utilis）、ロドトルラ・ミヌタ（Rhodotorula minuta）、トリコスポロン・プルランス（Trichosporon pullans）、Ｔ．クタネウム（T. cutaneum）、クリプトコッカス・カルバツス（Cryptococcus curvatus）、Ｒ．グルチニス（R. glutinis）、及びＲ．グラミニス（R. graminis）の種が挙げられる。
【００７３】
当該技術分野において理解されるであろうとおり、内因性酵素は、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテート生合成経路の上流又は経路中の重要な基質及び／又は中間体を望ましくない副生成物に変換し得る。従って、一部の実施形態では、本組換え微生物は、不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテート生合成経路と競合する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。
【００７４】

一実施形態では、本組換え微生物は、脂肪酸のω－ヒドロキシ脂肪酸への変換を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＸＰ＿５０４４０６、ＸＰ＿５０４８５７、ＸＰ＿５０４３１１、ＸＰ＿５００８５５、ＸＰ＿５００８５６、ＸＰ＿５００４０２、ＸＰ＿５０００９７、ＸＰ＿５０１７４８、ＸＰ＿５００５６０、ＸＰ＿５０１１４８、ＸＰ＿５０１６６７、ＸＰ＿５００２７３、ＢＡＡ０２０４１、ＣＡＡ３９３６６、ＣＡＡ３９３６７、ＢＡＡ０２２１０、ＢＡＡ０２２１１、ＢＡＡ０２２１２、ＢＡＡ０２２１３、ＢＡＡ０２２１４、ＡＡＯ７３９５２、ＡＡＯ７３９５３、ＡＡＯ７３９５４、ＡＡＯ７３９５５、ＡＡＯ７３９５６、ＡＡＯ７３９５８、ＡＡＯ７３９５９、ＡＡＯ７３９６０、ＡＡＯ７３９６１、ＡＡＯ７３９５７、ＸＰ＿００２５４６２７８、又はこれらのホモログから選択される１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。組換え細菌微生物に関連して、組換え細菌微生物は、ＢＡＭ４９６４９、ＡＡＢ８０８６７、ＡＡＢ１７４６２、ＡＤＬ２７５３４、ＡＡＵ２４３５２、ＡＡＡ８７６０２、ＣＡＡ３４６１２、ＡＢＭ１７７０１、ＡＡＡ２５７６０、ＣＡＢ５１０４７、ＡＡＣ８２９６７、ＷＰ＿０１１０２７３４８、又はこれらのホモログから選択される１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００７５】

別の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、ＣＡＡ０４６６３、ＣＡＧ７９２１４、ＡＡＡ３４３２２、ＡＡＡ３４３６１、ＡＡＡ３４３６３、ＣＡＡ２９９０１、ＢＡＡ０４７６１、ＡＡＡ３４８９１、又はこれらのホモログから選択される１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。組換え細菌微生物に関連して、組換え細菌微生物は、ＡＡＢ０８６４３、ＣＡＢ１５２７１、ＢＡＮ５５７４９、ＣＡＣ４４５１６、ＡＤＫ１６９６８、ＡＥＩ３７６３４、ＷＰ＿０００９７３０４７、ＷＰ＿０２５４３３４２２、ＷＰ＿０３５１８４１０７、ＷＰ＿０２６４８４８４２、ＣＥＬ８０９２０、ＷＰ＿０２６８１８６５７、ＷＰ＿００５２９３７０７、ＷＰ＿００５８８３９６０、又はこれらのホモログから選択される１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００７６】

組換え微生物が酵母微生物である実施形態では、本組換え微生物は、ペルオキシソームアセンブリ及び／又はペルオキシソーム酵素移入に関与する１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。組換え酵母微生物は、ＸＰ＿５０５７５４、ＸＰ＿５０１９８６、ＸＰ＿５０１３１１、ＸＰ＿５０４８４５、ＸＰ＿５０３３２６、ＸＰ＿５０４０２９、ＸＰ＿００２５４９８６８、ＸＰ＿００２５４７１５６、ＸＰ＿００２５４５２２７、ＸＰ＿００２５４７３５０、ＸＰ＿００２５４６９９０、ＥＩＷ１１５３９、ＥＩＷ０８０９４、ＥＩＷ１１４７２、ＥＩＷ０９７４３、ＥＩＷ０８２８６、又はこれらのホモログから選択される１つ以上の酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００７７】

別の実施形態では、本組換え微生物は、不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを妨げる、即ち、経路基質又は生成物の、望ましくない副生成物への変換を触媒する１つ以上の内因性レダクターゼ又はデサチュラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。

【００７８】

別の実施形態では、本組換え微生物は、所望の生成物、例えば、不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応する不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの望ましくない変換を触媒す

る１つ以上の内因性アルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。

【００７９】

別の実施形態では、本組換え微生物は、１つ以上の不飽和脂肪アシル－ＣｏＡ中間体の生合成経路と競合する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ及びＣＴＲＧ＿０６２０９、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のグリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ及びＣＴＧ＿０４３９０、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のグリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のアシル－ＣｏＡ／ステロールアシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｆ０６５７８ｇ、ＣＴＲＧ＿０１７６４及びＣＴＲＧ＿０１７６５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡ／ステロールアシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００８０】

別の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アルデヒド中間体を酸化する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ａ１７８７５ｇ、ＹＡＬＩ０Ｅ１５４００ｇ、ＹＡＬＩ０Ｂ０１２９８ｇ、ＹＡＬＩ０Ｆ２３７９３ｇ、ＣＴＲＧ＿０５０１０及びＣＴＲＧ＿０４４７１、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００８１】

別の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アセテート生成物を消費する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のステロールエステラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、ＣＴＲＧ＿０１１３８、ＣＴＲＧ＿０１６８３及びＣＴＲＧ＿０４６３０、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のステロールエステラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のトリアシルグリセロールリパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、ＣＴＲＧ＿０００５７及びＣＴＲＧ＿０６１８５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のトリアシルグリセロールリパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のモノアシルグリセロールリパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、ＣＴＲＧ＿０３３６０及びＣＴＲＧ＿０５０４９、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のモノアシルグリセロールリパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上の細胞外リパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ａ２０３５０ｇ、ＹＡＬＩ０Ｄ１９１８４ｇ、ＹＡＬＩ０Ｂ０９３

６１ｇ、ＣＴＲＧ＿０５９３０、ＣＴＲＧ＿０４１８８、ＣＴＲＧ＿０２７９９、ＣＴＲＧ＿０３０５２及びＣＴＲＧ＿０３８８５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上の細胞外リパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【００８２】

組換え微生物が酵母微生物である実施形態では、外因性不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテート経路遺伝子の１つ以上が、サイトゾル、ミトコンドリア、又は小胞体からなる群から選択される酵母コンパートメントに局在する酵素をコードする。例示的実施形態では、外因性経路遺伝子の１つ以上が、小胞体に局在する酵素をコードする。別の実施形態では、少なくとも２つの外因性経路遺伝子が、小胞体に局在する酵素をコードする。更に別の実施形態では、全ての外因性経路遺伝子が、小胞体に局在する酵素をコードする。

【００８３】

さらなる態様において、本願は、本明細書に記載されるとおりの組換え微生物を使用して不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートが生成されるまで、炭素源を供給する原料が入った培養培地で組換え微生物を培養すること、及び任意選択で不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを回収することを含む。生成後、不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートは、限定はされないが、蒸留、膜に基づく分離、ガスストリッピング、溶媒抽出、及び拡張吸着流動床を含め、当該技術分野において公知の様々な方法を用いて発酵培地から単離し得る。

【００８４】

一部の実施形態では、組換え微生物、例えば酵母は、乾燥微粒子の形態で回収及び作製されてもよい。酵母が関わる実施形態では、酵母を乾燥させて粉末状酵母を作製し得る。一部の実施形態では、粉末状酵母の作製方法は、液体酵母組成物を空気中で噴霧乾燥し、続いて任意選択で更に乾燥させることを含む。一部の実施形態では、組換え微生物組成物は乾燥時に不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを含み得る。

【００８５】

本明細書に記載されるとおり、本開示の好ましい組換え微生物は、アルカン及び脂肪酸を炭素源として利用する能力を有し得る。しかしながら、当該技術分野において理解されるであろうとおり、限定はされないが、様々な糖（例えば、グルコース、フルクトース、又はスクロース）、グリセロール、アルコール（例えば、エタノール）、有機酸、リグノセルロース、タンパク質、二酸化炭素、一酸化炭素、並びに前述のアルカン及び脂肪酸を含め、種々の炭素源を利用し得る。一部の実施形態では、本組換え微生物は、好気的条件下で炭素源を不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートに変換し得る。

【００８６】

上記に指摘したとおり、本願は、本明細書に記載されるとおりの組換え微生物を使用して１つ以上の不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する方法を提供する。一部の実施形態では、生成物は昆虫フェロモンである。本開示を携えた当業者は理解するであろうとおり、種々の異なる外因性及び内因性酵素を組換え宿主微生物で発現させて所望の昆虫フェロモンを生成することができる。本明細書に記載される組換え微生物及び方法を用いて生じさせることが可能な脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、又は脂肪アセテートの形態の例示的昆虫フェロモンとしては、限定はされないが、（Ｚ）－１１－ヘキサデセナール、（Ｚ）－１１ヘキサデセニルアセテート、（Ｚ）－９－テトラデセニルアセテート、（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－ヘキサデカジエナール、（９Ｚ，１１Ｅ）－ヘキサデカジエナール、（Ｅ，Ｅ）－８，１０－ドデカジエン－１－オール、（７Ｅ，９Ｚ）－ドデカジエニルアセテート、（Ｚ）－３－ノネン－１－オール、（Ｚ）－５－デセン－１－オール、（Ｚ）－５－デセニルアセテート、（Ｅ）－５－デセン－１－オ

ール、（Ｅ）－５－デセニルアセテート、（Ｚ）－７－ドデセン－１－オール、（Ｚ）－７－ドデセニルアセテート、（Ｅ）－８－ドデセン－１－オール、（Ｅ）－８－ドデセニルアセテート、（Ｚ）－８－ドデセン－１－オール、（Ｚ）－８－ドデセニルアセテート、（Ｚ）－９－ドデセン－１－オール、（Ｚ）－９－ドデセニルアセテート、（Ｚ）－９－テトラデセン－１－オール、（Ｚ）－１１－テトラデセン－１－オール、（Ｚ）－１１－テトラデセニルアセテート、（Ｅ）－１１－テトラデセン－１－オール、（Ｅ）－１１－テトラデセニルアセテート、（Ｚ）－７－ヘキサデセン－１－オール、（Ｚ）－７－ヘキサデセナール、（Ｚ）－９－ヘキサデセン－１－オール、（Ｚ）－９－ヘキサデセナール、（Ｚ）－９－ヘキサデセニルアセテート、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン－１－オール、（Ｚ）－１３－オクタデセン－１－オール、（Ｚ）－１３－ヘキサデセニルアセテート及び（Ｚ）－１３－オクタデセニルアセテート及び（Ｚ）－１３－オクタデセナールが挙げられる。

【００８７】

他の態様において、本願は、本明細書に記載される昆虫フェロモン生成組換え微生物の１つ以上を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、本組成物は、組換え微生物によって生成される１つ以上の昆虫フェロモンを更に含み得る。更なる実施形態では、組換え微生物によって生成される１つ以上の毒性タンパク質又はポリペプチドを更に含み得る。

【００８８】

図面の簡単な説明

本開示の例示的実施形態を図面に示す。

【図面の簡単な説明】

【００８９】

【図１】飽和脂肪アシル－ＣｏＡの、不飽和脂肪アルコールへの変換を示す。

【図２】飽和脂肪酸の、一不飽和又は多価不飽和脂肪アルデヒド、アルコール、又はアセテートへの変換を示す。

【図３】飽和脂肪酸の、一不飽和又は多価不飽和脂肪アルデヒド、アルコール、又はアセテートへの追加的な変換経路を示す。

【図４】飽和脂肪酸の、様々なトリエン、ジエン、エポキシド、及び奇数鎖フェロモンへの変換経路を示す。

【図５】Ｗ３０３Ａ及びＢＹ４７４２　ΔＰＯＸ１からのＺ１１－ヘキサデセノール生成を示す。空のベクター（ＥＶ）、エジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＳＬ）、オオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＨＡ）、カブラヤガ（A. segetum）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＡＳ）を発現する株。エラーバーは、Ｎ＝２の生物学的に独立した試料から求めた標準偏差を表す。

【図６Ａ】空のベクターを発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）を用いたＺ１１－ヘキサデセン酸の生体内変化産物の試料クロマトグラムを示す。黒色の線：基質添加なし。紫色の線：基質としてＺ１１－ヘキサデセン酸を加えた。

【図６Ｂ】オオタバコガ（Helicoverpa armigera）アルコール形成レダクターゼを発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）を用いたＺ１１－ヘキサデセン酸の生体内変化産物の試料クロマトグラムを示す。黒色の線：基質添加なし。紫色の線：基質としてＺ１１－ヘキサデセン酸を加えた。

【図７Ａ】Ｚ１１－ヘキサデセノール標準化合物のＧＣ－ＭＳフラグメンテーションパターンの比較を示す。

【図７Ｂ】生物学的に誘導したＺ１１－ヘキサデセノールのＧＣ－ＭＳフラグメンテーションパターンの比較を示す。

【図８】Ｗ３０３Ａ（野生型）及びＢＹ４７４２　ΔＰＯＸ１（β酸化欠失突然変異体）の生成物分析のため回収した時点におけるバイオマスを示す。空のベクター（ＥＶ）、エジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＳＬ）、オオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＨＡ）、カブラヤガ（A. segetum）レダクターゼ（ＦＡＲ－ＡＳ）を発現する株。エラーバーは、Ｎ＝２の生物学的に独立した試料から求めた標準

偏差を表す。
【図９】標準物質を用いて作成したＺ１１－ヘキサデセノール検量線を示す。試料は実施例３の材料及び方法に記載する抽出及び分析方法で作成した。エラーバーは、Ｎ＝３の試料から求めた標準偏差を表す。
【図１０】伸長ＯＬＥ１プロモーター配列（淡黄色）、ＯＬＥ１プロモーター（オレンジ色）、ＯＬＥ１リーダー配列（濃い灰色）、昆虫デサチュラーゼ配列などのシントン（薄い灰色）、及びＶＳＰ１３ターミネーター配列（青色）を含むｐＯＬＥ１カセットを示す。
【図１１Ａ】ｐＯＬＥ１カセットのバリデーション、及び補完アッセイを示す。ＹＰＤ＋パルミトレイン酸。Ｄａｓｈｅｒ＝ＧＦＰシントン。
【図１１Ｂ】ｐＯＬＥ１カセットのバリデーション、及び補完アッセイを示す。ＹＰＤ－パルミトレイン酸。Ｄａｓｈｅｒ＝ＧＦＰシントン。
【図１１Ｃ】ｐＯＬＥ１カセットのバリデーション、及び補完アッセイを示す。ＣＭ－Ｕｒａグルコース＋パルミトレイン酸。Ｄａｓｈｅｒ＝ＧＦＰシントン。
【図１１Ｄ】ｐＯＬＥ１カセットのバリデーション、及び補完アッセイを示す。ＣＭ－Ｕｒａグルコース－パルミトレイン酸。Ｄａｓｈｅｒ＝ＧＦＰシントン。
【図１１Ｅ】ｐＯＬＥ１カセットのバリデーション、及び補完アッセイを示す。図１１Ａ～図１１Ｄの株のマップ。Ｄａｓｈｅｒ＝ＧＦＰシントン。
【図１２Ａ】ＹＰＤ上でのＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長の補完を示す。
【図１２Ｂ】ＣＭ－Ｕｒａグルコース上でのＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長の補完を示す。
【図１３Ａ】Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１デサチュラーゼ（青色）、キメライラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼ（赤色）を発現するΔＯＬＥ１株の完全脂肪酸スペクトルを示す。
【図１３Ｂ】Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１デサチュラーゼ（赤色）及びキメライラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼ（青色）を発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１株の５．５分～８分の保持時間内に範囲を絞った脂肪酸スペクトルを示す。
【図１４Ａ】標準化合物の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸のＧＣ－ＭＳフラグメンテーションパターンの比較を示す。
【図１４Ｂ】生物学的に誘導した（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸のＧＣ－ＭＳフラグメンテーションパターンの比較を示す。
【図１５】パルミチン酸及びパルミトレイン酸を補足した培養下における様々な脂肪アルコール経路変異体を発現するΔＯＬＥ１からのＣ１６脂肪アルコール生成を示す。エラーバーは代謝産物定量化精度の５％の不確かさを表す。
【図１６】パルミチン酸を供給したとき（黒色）及びパルミチン酸及びパルミトレイン酸を供給したとき（オレンジ色）の脂肪アルコール経路ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃを発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）を用いた生体内変化産物Ｃ１６脂肪酸の代表的なクロマトグラムを示す。パルミチン酸を供給した陰性対照株（空のベクターを有する）（紫色）のプロファイル。
【図１７】脂肪アルコール経路ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＳＬ＿ｒｅｄｕｃ（青色）、ＳＣ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ（赤色）、ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ（緑色）、ＳＣ＿ｄｅｓａｔ－ＳＬ＿ｒｅｄｕｃ（ピンク色）を発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）の細胞ペレットにおいて（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸が検出されたことを示す。
【図１８】パルミチン酸のみを補足した培養下における様々な脂肪アルコール経路変異体を発現するΔＯＬＥ１からのＣ１６脂肪アルコール生成を示す。エラーバーは代謝産物定量化精度の５％の不確かさを表す。
【図１９Ａ】（Ｚ）－１１－ヘキサデセノールの検出を示す。標準物質のフラグメンテーションパターン。フォローアップ実験でｍ／ｚ２９７．３を用いてアルコールを選択的に検出した。内部標準も検出するため、質量２０８及び３８７．３も含めた。
【図１９Ｂ】（Ｚ）－１１－ヘキサデセノールの検出を示す。特定のマスフラグメントの検出に加え、保持時間を第二段階の確認として用いた。保持時間は６．２２である。

【図１９Ｃ】（Ｚ）－１１－ヘキサデセノールの検出を示す。同じ方法でＳＩＭモード（２９７．３）において検出したときの２つの異なる位置異性体９Ｚ－及び１１Ｚ－ヘキサデセノールの比較。
【図２０】ｐＸＩＣＬ発現カセット構成を示す。Ｃ．アルビカンス（C. albicans）ＯＬＥ１リーダー－カブラヤガ（A. segetum）デサチュラーゼ融合物も示す。
【図２１Ａ】ｍＣｈｅｒｒｙ対照の組込みを示す。陰性（水のみ）対照形質転換プレート。
【図２１Ｂ】ｍＣｈｅｒｒｙ対照の組込みを示す。ｐＰＶ０１３７　ｍＣｈｅｒｒｙ形質転換プレート。
【図２１Ｃ】ｍＣｈｅｒｒｙ対照の組込みを示す。陰性対照クローンからのパッチプレート。
【図２１Ｄ】ｍＣｈｅｒｒｙ対照の組込みを示す。ｐＰＶ０１３７クローンからのパッチプレート。
【図２２】観察された総コロニーの関数としての組込み効率を示す。形質転換にＤＮＡを加えない対照プレートは３５０コロニーを有することが観察された（オレンジ色の線で示す）。陽性組込み体であることが確認されたクローンの割合は総コロニー数と正の相関がある。６，０００総コロニーを超えると急激な増加が観察される。このデータは、陽性組込み体の存在によって観察されるバックグラウンド成長が増加することを示唆する。一部の形質転換については効率が十分に高く、バックグラウンド集団が陽性組込み体集団と比べて小さくなった。
【図２３】カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）ＳＰＶ０５３株のクロマトグラムオーバーレイを示す。ｍＣｈｅｒｒｙ（赤色）対照実験と比較して、クルミマダラメイガ（A. transitella）（青色）及びアメリカタバコガ（H. Zea）（緑色）デサチュラーゼについて６．２２分に明らかなピークを認めることができる。従って、Ｚ－１１－ヘキサデセン酸の形成は、活性Ｚ１１－デサチュラーゼを発現する株にのみ観察可能である。
【図２４Ａ】１１Ｚ－位置異性体の確認を示す。２４５ｍ／ｚのイオンフラグメントの特異的ピークが、クルミマダラメイガ（A. transitella）又はアメリカタバコガ（H. Zea）のいずれかに由来するＺ１１－デサチュラーゼを発現するＣ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３にのみ観察された。
【図２４Ｂ】１１Ｚ－位置異性体の確認を示す。標準物質のフラグメンテーションパターン。
【図２４Ｃ】１１Ｚ－位置異性体の確認を示す。ｍＣｈｅｒｒｙ対照のフラグメンテーションパターンは図２４Ｂ、図２４Ｄ及び図２４Ｅのものと著しく異なる。
【図２４Ｄ】１１Ｚ－位置異性体の確認を示す。発現したアメリカタバコガ（H. Zea）由来のデサチュラーゼを含む試料中の新規に形成された化合物のフラグメンテーションパターンは標準と一致する。
【図２４Ｅ】１１Ｚ－位置異性体の確認を示す。発現したクルミマダラメイガ（A. transitella）由来のデサチュラーゼを含む試料中の新規に形成された化合物のフラグメンテーションパターンは標準と一致する。
【図２５Ａ】テトラデカン酸メチルとインキュベートした種々のＣ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３株のＧＣ－ＦＩＤクロマトグラムを示す。スペクトル全体。クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）由来のＺ１１－デサチュラーゼを発現する株についてＺ１１－Ｃ１６：１ピークの出現を観察することができる。
【図２５Ｂ】テトラデカン酸メチルとインキュベートした種々のＣ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３株のＧＣ－ＦＩＤクロマトグラムを示す。Ｃ１４～Ｃ１８範囲の拡大。４．８分に新規ピークが見え、これはＺ１１－Ｃ１４：１に対応する可能性がある。Ｚ９－Ｃ１８：１近傍に別のピークも見え、これはＺ１１－Ｃ１８：１に対応する可能性がある。
【図２６】コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ変異体のみが、ＳＰＶ１４０スクリーニングで検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を生成することを示す

。対照＝ＳＰＶ１４０のｐＰＶ１０１組込み体、イラクサギンウワバ（T. ni）天然＝天然コドン使用のイラクサギンウワバ（T. ni）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ１９５）、イラクサギンウワバ（T. ni）ＨＳ　ｏｐｔ＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化したイラクサギンウワバ（T. ni）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ１９６）、イラクサギンウワバ（T. ni）ＨＳ　ｏｐｔ　Ｙｌリーダー＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化した、且つスワッピングしたＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１リーダー配列を有するイラクサギンウワバ（T. ni）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ１９７）、アメリカタバコガ（H. Zea）天然＝天然コドン使用のアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ１９８）、アメリカタバコガ（H. Zea）ＨＳ　ｏｐｔ＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ１９９）、アメリカタバコガ（H. Zea）ＨＳ　ｏｐｔ　Ｙｌリーダー＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化した、且つスワッピングしたＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１リーダー配列を有するアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ２００）、クルミマダラメイガ（A. transitella）天然＝天然コドン使用のクルミマダラメイガ（A. transitella）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＰＶ２０１）。全てのデータは３つのバイオロジカルレプリケートの平均である。エラーバーは標準偏差を表す。

【図２７】コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ変異体のみが、ＳＰＶ３００スクリーニングで検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を産生することを示す。ラベルは親株及びデサチュラーゼ発現カセットのプラスミドを示す。ｐＰＶ１０１＝ｈｒＧＦＰ対照、ｐＰＶ１９８＝天然コドン使用のアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ、ｐＰＶ１９９＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ、ｐＰＶ２００＝ヒト（Homo sapiens）コドン最適化した、且つスワッピングしたＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１リーダー配列を有するアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ、ｐＰＶ２０１＝天然コドン使用のクルミマダラメイガ（A. transitella）Ｚ１１デサチュラーゼ。

【図２８】ＳＰＶ１４０及びＳＰＶ３００バックグラウンドにおけるデサチュラーゼスクリーニングの最終細胞密度を示す。デサチュラーゼカセットを組み込むＳＰＶ３００株がより高い細胞密度に成長した。

【図２９】ヒト（H. sapiens）コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼを発現するＳＰＶ１４０及びＳＰＶ３００株の個々の分離株Ｚ１１－ヘキサデセン酸力価を示す。

【図３０】カンジダ・ビスワナチイ（トロピカリス）（Candida viswanathii (tropicalis)）のＺ１１－１６ＯＨ生成株（ＳＰＶ０４９０）と対照株（ＳＰＶ０４８８）とを比べた抽出代謝産物のクロマトグラムオーバーレイを示す。

【図３１】一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路との競合を低下又は消失させるために欠失させ又は破壊し得る経路を示す。

【図３２Ａ】ｐＥＸＰクローンのＹＰＤ培地におけるＺ９－１６ＯＨ及びＺ１１－１６ＯＨ力価を示す。２つの独立したコンピテント細胞調製物（Ｃｏｍｐ．細胞調製物１、Ｃｏｍｐ．細胞調製物２）からＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する１０個の分離株を親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びデサチュラーゼ単独陰性対照（ＳＰＶ４５９　Ｈｚ＿ｄｅｓａｔ単独）と比較した。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。＊半限定Ｃ：Ｎ＝８０条件下におけるクローン５及びクローン１８からの１レプリケートが試料ワークアップの間に失われたため、その条件の力価は単一データ点によるものである（Ｎ＝１、Ｃｏｍｐ．細胞調製物１クローン１８及びＣｏｍｐ．細胞調製物２クローン５）。

【図３２Ｂ】ｐＥＸＰクローンの半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地におけるＺ９－１６ＯＨ及びＺ１１－１６ＯＨ力価を示す。２つの独立したコンピテント細胞調製物（Ｃｏｍｐ．細胞調

製物１、Ｃｏｍｐ．細胞調製物２）からＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する１０個の分離株を親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びデサチュラーゼ単独陰性対照（ＳＰＶ４５９　Ｈｚ＿ｄｅｓａｔ単独）と比較した。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。＊半限定Ｃ：Ｎ＝８０条件下におけるクローン５及びクローン１８からの１レプリケートが試料ワークアップの間に失われたため、その条件の力価は単一データ点によるものである（Ｎ＝１、Ｃｏｍｐ．細胞調製物１クローン１８及びＣｏｍｐ．細胞調製物２クローン５）。

【図３３Ａ】ｐＥＸＰ１クローンのＹＰＤ培地における１６炭素脂肪酸種のプロファイルを示す。ＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する５つの選択クローンの１６炭素脂質プロファイルを親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びデサチュラーゼ単独陰性対照（ＳＰＶ４５９　Ｈｚ＿ｄｅｓａｔ単独）と比較する。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。

【図３３Ｂ】ｐＥＸＰ１クローンの半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地における１６炭素脂肪酸種のプロファイルを示す。ＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する５つの選択クローンの１６炭素脂質プロファイルを親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びデサチュラーゼ単独陰性対照（ＳＰＶ４５９　Ｈｚ＿ｄｅｓａｔ単独）と比較する。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。

【図３４】ｐＴＡＬ１クローンの半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地におけるＺ９－１６ＯＨ及びＺ１１－１６ＯＨ力価を示す。ＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＴＡＬプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する９つの分離株を親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びＥＸＰプロモーターを用いてオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ発現をドライブする陽性Ｂｄｒ経路対照（ＳＰＶ５７５、ＳＰＶ５７８）と比較した。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。

【図３５】ｐＴＡＬ１クローンの半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地における１６炭素脂肪酸種のプロファイルを示す。ＴＥＦプロモーター下でアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰプロモーター下でオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現する５つの選択クローンの１６炭素脂質プロファイルを親陰性対照（ＳＰＶ３００）及びＥＸＰプロモーターを用いてオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ発現をドライブする陽性Ｂｄｒ経路対照（ＳＰＶ５７５、ＳＰＶ５７８）と比較する。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。＊は、レプリケートの１つが試料処理中に失われた、Ｎ＝１のクローンを示す。

【図３６】４８時間の生物変換後の半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地における完全Ｂｄｒ経路ｐＴＡＬ１スクリーニング（アメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（ｐＴＥＦ）及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現する株）の完全脂質プロファイルを示す。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。＊は、レプリケートの１つが試料処理中に失われた、Ｎ＝１のクローンを示す。

【図３７Ａ】２４時間の生物変換後の半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地におけるＳＰＶ４７１（天然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）のＺ９－１６ＯＨ力価を示す。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。

【図３７Ｂ】２４時間の生物変換後の半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地におけるＳＰＶ４７１（天

然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）の脂肪酸力価を示す。エラーバーは、各株及び条件についてのテクニカルレプリケート（Ｎ＝２）から測定したＳＥＭ（平均値の標準誤差）を表す。

【図３８】２４時間の生物変換後の半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地におけるＳＰＶ４７１（天然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）完全脂質プロファイルを示す。

【図３９Ａ】ＳＰＶ４７１（天然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）Ｚ９－１６ＯＨ力価の経時変化を示す。１６Ａｃｉｄの生物変換は半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地でパルミチン酸メチル（１６Ａｃｉｄ）基質を使用して行った。

【図３９Ｂ】ＳＰＶ４７１（天然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）Ｚ９－１６Ａｃｉｄ力価の経時変化を示す。１６Ａｃｉｄの生物変換は半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地でパルミチン酸メチル（１６Ａｃｉｄ）基質を使用して行った。

【図４０】[0130]アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性によって制御される選択的β－酸化によって生成されるアシル－ＣｏＡ中間体の例を示す。

【図４１】[0131]特徴付けられたΔ１１デサチュラーゼのＺ１１－１４Ａｃｉｄ（ミリスチン酸メチルを供給される－１４ＭＥ）及びＺ１１－１６Ａｃｉｄ（パルミチン酸メチルを供給される－１６ＭＥ）力価を示す。ＳＰＶ３００＝デサチュラーゼライブラリ組み込み親。ＳＰＶ２９８＝ＳＰＶ３００の原栄養親、陰性対照。ＳＰＶ４５９＝現在最良のデサチュラーゼ（アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、配列番号５４）を含むＳＰＶ３００、陽性対照。ＤＳＴ００６中のデサチュラーゼは、ＳＰＶ４５９において発現されるアメリカタバコガ（H. zea）デサチュラーゼと遺伝子学的に同等であり、内部ライブラリ対照として用いられる。

【図４２】[0132]ＳＰＶ２９８（陰性対照、親株）及びパルミチン酸メチル（１６ＭＥ）又はミリスチン酸メチル（１４ＭＥ）のいずれかにおいて供給されるＳＰＶ４５９（アメリカタバコガ（H. zea）デサチュラーゼを含むＳＰＶ２９８系統、配列番号５４）のＣ１４及びＣ１８生成物プロファイルを示す。

【図４３】[0133]オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ酵素（配列番号４１）の可能なセリン、トレオニン及びチロシンリン酸化部位のバイオインフォマティクス分析を示す。横線は、可能なリン酸化の閾値に類似している。

【図４４】[0134]酵母における発現時のオオタバコガ（Helicoverpa amigera）由来のＦＡＲ酵素の可能なセリン及びトレオニンリン酸化部位のバイオインフォマティクス分析を示す。使用されるサーバ（ワールドワイドウェブアドレス：cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/；Blom,N.,Gammeltoft,S. & Brunak,S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation site1.J. Mol.Biol. 294,1351-1362(1999)）は、酵母において特異的にリン酸化アミノ酸を予測する。横線は、可能なリン酸化部位の閾値に類似している。

【図４５】[0135]Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＳＰＶ６０３における発現時のＨａＦＡＲ突然変異体ライブラリのＺ９／Ｚ１１－１６ＯＨ力価の分析を示す。＊は、親株の既存のコピーに加えて、ＨａＦＡＲ酵素の第２のコピーを示す。

【図４６】[0136]Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＳＰＶ６０３における発現時のＨａＦＡＲ突然変異体ライブラリのＺ９／Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ力価の分析を示す。＊は、親株中の既存のコピーに加えて、ＨａＦＡＲ酵素の第２のコピーを示す。

【図４７】[0137]ＨａＦＡＲ及び誘導される突然変異体を発現する選択された株の脂肪アルコール力価の分析を示す。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、７２時間の期間にわたって振盪フラスコ中で株を培養した。＊は、親株中の既存のコピーに加えて、ＨａＦＡＲ酵素の第２のコピーを示す。分析は、技術的なクアドルプリケート（quadruplicate）に基づいている。

【図４８】[0138]ＨａＦＡＲ及び誘導される突然変異体を発現する選択された株の脂肪酸力価の分析を示す。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、７２時間の期間にわたって振盪フラスコ中で株を培養した。＊は、親株中の既存のコピーに加えて、ＨａＦＡＲ酵素の第２のコピーを示す。分析は、技術的なクアドルプリケートに基づいている。
【図４９】[0139]ＨａＦＡＲ及び誘導される突然変異体を発現する選択された株の脂肪アルコール力価の分析を示す。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチル添加後、２０時間の期間にわたって振盪フラスコ中で株を培養した。分析は、技術的なクアドルプリケートに基づいている。
【図５０】[0140]振盪フラスコ中での時間経過実験における選択された株の脂肪アルコール力価の分析を示す。酵素ＨａＦＡＲ又はＨａＳ１９５Ａのコピーを株ＳＰＶ１０５３（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）及びＳＰＶ１０５４（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入した。培養を振盪フラスコ中での生物学的なトリプリケート（triplicate）として行った。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、７２時間の期間にわたって振盪フラスコ中で株を培養した。
【図５１】[0141]振盪フラスコ中での時間経過実験における選択された株の脂肪酸力価の分析を示す。酵素ＨａＦＡＲ又はＨａＳ１９５Ａのコピーを株ＳＰＶ１０５３（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）及びＳＰＶ１０５４（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入した。培養を振盪フラスコ中での生物学的なトリプリケートとして行った。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、７２時間の期間にわたって振盪フラスコ中で株を培養した。
【図５２】[0142]２４ウェルプレート中でのＦＡＲライブラリスクリーニングにおける新たな株の脂肪アルコール力価の分析を示す。表２４からの各それぞれのＦＡＲ酵素のコピーを株ＳＰＶ１０５４（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入した。培養を２４ウェルプレート中での生物学的なクアドルプリケートとして行った。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、９６時間の期間にわたって株を培養した。
【図５３】[0143]２４ウェルプレート中でのＦＡＲライブラリスクリーニングにおける新たな株の脂肪酸力価の分析を示す。表２４からの各それぞれのＦＡＲ酵素の単一のコピーを株ＳＰＶ１０５４（ΔdgaΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入した。培養を２４ウェルプレート中での生物学的なクアドルプリケートとして行った。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルの添加後、９６時間の期間にわたって株を培養した。
【図５４】[0144]テトラデシル－ＡＣＰ（１４：ＡＣＰ）インプットを使用して、本開示の組換え微生物でＥ－及びＺ－テトラデセニルアセテート（Ｅ１１－１４：ＯＡｃ及びＺ１１－１４：ＯＡＣ）フェロモンのブレンドを生成することができる生合成経路を示す。
【発明を実施するための形態】
【００９０】
配列
　配列番号１～配列番号１０５の配列表は本願の一部であり、参照によって本明細書に援用される。この配列表は本文書の末尾に提供され、コンピュータ可読フォーマットで別途提供される。
【００９１】
詳細な説明
定義
　本開示を解釈する際、以下の定義及び略記を用いるものとする。
【００９２】
　本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「１つの（a）」、「１つの（an）」、及び「その（the）」は、文脈上特に明確に指示されない限り複数の指示対象を含む。従って、例えば「フェロモン」という表現は複数のかかるフェロモンを含み、

及び「微生物」という表現は１つ以上の微生物への言及を含むなどとする。

【００９３】

本明細書で使用されるとき、用語「含む」、「含んでいる」、「包含する」、「包含している」、「有する」、「有している」、「含有する」、「含有している」、又はこれらの任意の他の変化形は、非排他的包含を含むことが意図される。要素のリストを含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置は、必ずしもそれらの要素のみに限定されるわけではなく、明示的に列挙されない、又はかかる組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置に固有の他の要素を含み得る。更に、反する旨が明記されない限り、「又は」は排他的「又は」でなく、包含的「又は」を指す。

【００９４】

用語「約」及び「およそ」は、本明細書で数値を修飾して使用されるとき、その明示された値を挟んだ近い範囲を示す。「Ｘ」が値であった場合、「約Ｘ」又は「およそＸ」は０．９Ｘ～１．１Ｘの値、又は一部の実施形態では０．９５Ｘ～１．０５Ｘの値を指示し得る。「約Ｘ」又は「およそＸ」という任意の表現は、少なくともその値Ｘ、０．９５Ｘ、０．９６Ｘ、０．９７Ｘ、０．９８Ｘ、０．９９Ｘ、１．０１Ｘ、１．０２Ｘ、１．０３Ｘ、１．０４Ｘ、及び１．０５Ｘを具体的に指示する。従って、「約Ｘ」及び「およそＸ」は、例えば「０．９８Ｘ」のクレーム限定についての明細書のサポートを教示及び提供することが意図される。

【００９５】

本明細書で使用されるとき、用語「微生物の」、「微生物（microbial organism）」、及び「微生物（microorganism）」は、古細菌、細菌又は真核生物（後者の真核生物には、酵母及び糸状菌、原虫、藻類、又は高等原生生物界（Protista）が含まれる）のドメイン内に含まれる顕微鏡的細胞として存在する任意の生物を含む。従って、この用語は、顕微鏡的サイズを有する原核又は真核細胞又は生物を包含することが意図され、全ての種の細菌、古細菌、及び真正細菌並びに真核微生物、例えば酵母及び真菌が含まれる。また、化学物質の作成のため培養することのできる任意の種の細胞培養物も含まれる。

【００９６】

本明細書に記載されるとおり、一部の実施形態では、本組換え微生物は原核微生物である。一部の実施形態では、原核微生物は細菌である。「細菌」、又は「真正細菌」は、原核生物のドメインを指す。細菌は以下のとおりの少なくとも１１の異なる分類を含む：（１）グラム陽性（グラム＋）細菌、これには２つの主要な細区分がある：（１）高Ｇ＋Ｃ群（放線菌類（Actinomycetes）、マイコバクテリア（Mycobacteria）、ミクロコッカス（Micrococcus）など）（２）低Ｇ＋Ｃ群（桿菌（Bacillus）、クロストリジウム類（Clostridia）、乳酸桿菌（Lactobacillus）、ブドウ球菌類（Staphylococci）、レンサ球菌類（Streptococci）、マイコプラズマ類（Mycoplasmas））；（２）プロテオバクテリア門（Proteobacteria）、例えば、紅色光合成細菌＋非光合成グラム陰性菌（最も「一般的な」グラム陰性菌を含む）；（３）シアノバクテリア（Cyanobacteria）、例えば酸素発生型光合成生物；（４）スピロヘータ類（Spirochetes）及び関連種；（５）プランクトミセス（Planctomyces）；（６）バクテロイデス（Bacteroides）、フラボバクテリア（Flavobacteria）；（７）クラミジア（Chlamydia）；（８）緑色硫黄細菌；（９）緑色非硫黄細菌（嫌気光合成生物も）；（１０）放射線耐性ミクロコッカス及び近縁類；（１１）サーモトガ属（Thermotoga）及びサーモサイホ属（Thermosipho）好熱菌類。

【００９７】

「グラム陰性菌」には、球菌、非腸内桿菌、及び腸内桿菌が含まれる。グラム陰性菌の属としては、例えば、ナイセリア属（Neisseria）、スピリルム属（Spirillum）、パスツレラ属（Pasteurella）、ブルセラ属（Brucella）、エルシニア属（Yersinia）、フランシセラ属（Francisella）、ヘモフィルス属（Haemophilus）、ボルデテラ属（Bordetella）、大腸菌属（Escherichia）、サルモネラ属（Salmonella）、赤痢菌属（Shigella）、クレブシエラ属（Klebsiella）、プロテウス属（Proteus）、ビブリオ属（Vibrio）

、シュードモナス属（Pseudomonas）、バクテロイデス属（Bacteroides）、アセトバクター属（Acetobacter）、アエロバクター属（Aerobacter）、アグロバクテリウム属（Agrobacterium）、アゾトバクター属（Azotobacter）、スピリルム属（Spirilla）、セラチア属（Serratia）、ビブリオ属（Vibrio）、リゾビウム属（Rhizobium）、クラミジア属（Chlamydia）、リケッチア属（Rickettsia）、トレポネーマ属（Treponema）、及びフゾバクテリウム属（Fusobacterium）が挙げられる。

【００９８】

「グラム陽性菌」には、球菌、非胞子形成桿菌、及び胞子形成桿菌が含まれる。グラム陽性菌の属としては、例えば、アクチノミセス属（Actinomyces）、バチルス属（Bacillus）、クロストリジウム属（Clostridium）、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）、エリシペロスリクス属（Erysipelothrix）、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、リステリア属（Listeria）、マイコバクテリウム属（Mycobacterium）、ミキソコッカス属（Myxococcus）、ノカルジア属（Nocardia）、スタフィロコッカス属（Staphylococcus）、ストレプトコッカス属（Streptococcus）、及びストレプトミセス属（Streptomyces）が挙げられる。

【００９９】

用語「組換え微生物」及び「組換え宿主細胞」は、本明細書では同義的に使用され、内因性酵素を発現又は過剰発現するか、ベクターに含まれる異種酵素など、組込みコンストラクト中の異種酵素を発現するように遺伝子修飾されている、又は内因性遺伝子の発現の変化を有する微生物を指す。「変化」とは、遺伝子の発現、又は１つ以上のポリペプチド又はポリペプチドサブユニットをコードするＲＮＡ分子又は等価なＲＮＡ分子のレベル、又は１つ以上のポリペプチド又はポリペプチドサブユニットの活性が上方制御又は下方制御されて、その変化がない場合に観察されるものと比べて発現、レベル、又は活性が高くなる又は低くなることを意味する。例えば、用語「変化させる」は「阻害する」を意味し得るが、この語句「変化する」の使用はこの定義に限定されない。用語「組換え微生物」及び「組換え宿主細胞」は、特定の組換え微生物を指すのみならず、かかる微生物の子孫又は潜在的な子孫も指すことが理解される。突然変異又は環境の影響のいずれかに起因して後続の世代である種の修飾が起こり得るため、かかる子孫は実際上は親細胞と同一でないこともあるが、それでもなお本明細書で使用されるとおりのこの用語の範囲内に含まれる。

【０１００】

遺伝子配列に関する用語「発現」は、遺伝子の転写を指し、及び適切な場合、得られたｍＲＮＡ転写物のタンパク質への翻訳を指す。従って、文脈から明らかであろうとおり、タンパク質の発現はオープンリーディングフレーム配列の転写及び翻訳によって生じる。宿主細胞における所望の産物の発現レベルは、細胞に存在する対応するｍＲＮＡの量、又は選択の配列によってコードされる所望の産物の量のいずれかに基づき決まり得る。例えば、選択の配列から転写されたｍＲＮＡは、ｑＲＴ－ＰＣＲによるか、又はノーザンハイブリダイゼーションによって定量化し得る（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)を参照されたい）。選択の配列によってコードされるタンパク質は、様々な方法、例えば、ＥＬＩＳＡによるか、タンパク質の生物学的活性をアッセイすることによるか、又はウエスタンブロッティング若しくはラジオイムノアッセイなど、かかる活性と独立した、タンパク質を認識して結合する抗体を用いるアッセイを利用することにより定量化し得る。Sambrook et al., 1989、前掲を参照されたい。

【０１０１】

用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書では用語「核酸」と同義的に使用され、限定はされないが、任意の長さの一本鎖又は二本鎖センス又はアンチセンスデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）及び適切な場合、ｓｉＲＮＡを含めた、任意の長さの一本鎖又は二本鎖センス又はアンチセンスリボ核酸（ＲＮＡ）を含め、ヌクレオチド、ヌクレオシド又はこれら類似体を含む２つ以上の単量体で構成された有機ポリマーを指す。用語「ヌクレオチド」は、

プリン又はピリミジン塩基及びリン酸基に結合したリボース又はデオキシリボース糖からなる幾つかの化合物のいずれかを指し、核酸の基本的な構造単位である。用語「ヌクレオシド」は、デオキシリボース又はリボースと組み合わさったプリン又はピリミジン塩基からなる（グアノシン又はアデノシンとしての）化合物を指し、特に核酸に見られる。用語「ヌクレオチド類似体」又は「ヌクレオシド類似体」は、１つ以上の個々の原子が異なる原子又は異なる官能基に置き換えられているそれぞれヌクレオチド又はヌクレオシドを指す。従って、用語のポリヌクレオチドには、任意の長さの核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、これらの類似体及び断片が含まれる。３ヌクレオチド以上のポリヌクレオチドはヌクレオチドオリゴマー又はオリゴヌクレオチドとも称される。

【０１０２】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドには「遺伝子」が含まれること、及び本明細書に記載される核酸分子には「ベクター」又は「プラスミド」が含まれることが理解される。従って、用語「遺伝子」は、「構造遺伝子」とも称され、１つ以上のタンパク質又は酵素の全て又は一部を含む特定のアミノ酸配列をコードする、且つ例えば遺伝子が発現する条件を決定するプロモーター配列などの調節（非転写）ＤＮＡ配列を含み得るポリヌクレオチドを指す。遺伝子の転写領域には、イントロン、５’－非翻訳領域（ＵＴＲ）、及び３’－ＵＴＲを含めた非翻訳領域、並びにコード配列が含まれ得る。

【０１０３】

用語「酵素」は、本明細書で使用されるとき、１つ以上の化学的又は生化学的反応を触媒又は促進する任意の物質を指し、これには、通常、全面的又は部分的に１つ又は複数のポリペプチドで構成された酵素が含まれるが、ポリヌクレオチドを含む異なる分子で構成された酵素が含まれてもよい。

【０１０４】

本明細書で使用されるとき、用語「天然に存在しない」は、本開示の微生物又は酵素活性に関連して使用されるとき、その微生物又は酵素が、言及される種の野生型株を含めた、言及される種の天然に存在する株には通常見られない少なくとも１つの遺伝子変化を有することを意味するように意図される。遺伝子変化には、例えば、代謝ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸欠失及び／又は微生物の遺伝物質の他の機能破壊が含まれる。かかる修飾は、例えば、言及される種の異種、相同、又は異種及び相同の両方のポリペプチドについてのコード領域及びその機能的断片を含む。更なる修飾は、例えば、修飾が遺伝子又はオペロンの発現を変化させる非コード調節領域を含む。例示的な天然に存在しない微生物又は酵素活性としては、上記に記載されるヒドロキシル化活性が挙げられる。

【０１０５】

用語「外因性」は、様々な分子、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、酵素等に関連して本明細書で使用されるとき、自然中の所与の酵母、細菌、生物、微生物、又は細胞に通常は又は天然では見られない及び／又はそれによって産生されない分子を指す。

【０１０６】

他方で、用語「内因性」又は「天然」は、様々な分子、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、酵素等に関連して本明細書で使用されるとき、自然中の所与の酵母、細菌、生物、微生物、又は細胞に通常又は天然で見られる及び／又はそれによって産生される分子を指す。

【０１０７】

[0162] 本明細書で使用されるとき、用語「飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源」は、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸が微生物内部で生成又は合成されるときなど、微生物内に由来する飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の供給源（内因性）、又は飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸が、フラスコ又は他の容器中の培地で微生物を培養する（culturing又はcultivating）過程で微生物に提供されるときなど、微生物の外部に由来する飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の供給源（外因性）を指す。

【０１０８】

用語「異種」は、本明細書において修飾された宿主細胞に関連して使用されるとき、以下の少なくとも１つが真である様々な分子、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、酵素等を指す：（ａ）その分子が宿主細胞にとって外来性（「外因性」）である（即ち、そこに天然では見られない）；（ｂ）その分子が所与の宿主微生物又は宿主細胞に天然で見られる（例えば、「それにとって内因性」である）が、細胞における非天然の位置又は非天然の量で産生される；及び／又は（ｃ）その分子は内因性ヌクレオチド又はアミノ酸配列とヌクレオチド又はアミノ酸配列が異なり、そのため内因的に見られるとおりの内因性ヌクレオチド又はアミノ酸とヌクレオチド又はアミノ酸配列が異なる分子が細胞において非天然の（例えば、天然で見られるよりも多い）量で産生される。

【０１０９】

[0164] 本明細書で使用されるとき、用語「相同配列」、「ホモログ（homolog）」、「ホモログ（homologs）」又は「オルソログ」は、基準配列に機能的に関連する関連配列（核酸又はアミノ酸）を指す。機能的な関係は、限定はされないが、（ａ）配列同一性の程度及び／又は（ｂ）同じ又は類似の生物学的機能を含むいくつかの方法のいずれか１つで示され得る。本開示における用語ホモログの使用は、（ａ）及び（ｂ）の両方が示される場合を指す。配列同一性の程度は、変化し得るが、一実施形態では、当該技術分野において公知の標準的な配列アラインメントプログラム（例えば、デフォルトパラメータを用いたClustal Omegaアラインメント）を用いた際、少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性である。相同性は、Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel et al.,eds.,1987)Supplement 30,section 7.718,Table 7.71に記載されるものなど、当該技術分野において容易に利用可能なソフトウェアプログラムを用いて決定され得る。いくつかのアラインメントプログラムは、MacVector(Oxford Molecular Ltd,Oxford,U.K.)及びALIGN Plus(Scientific and Educational Software,Pennsylvania)である。他の非限定的なアラインメントプログラムとしては、Sequencher(GeneCodes,Ann Arbor,Michigan)、AlignX及びVector NTI(Invitrogen,Carlsbad,CA)が挙げられる。従って、本開示におけるホモログへの言及は、上述されるように同じ又は類似の生物学的機能及び高度の配列同一性を有する関連配列を言及するものと理解されるであろう。

【０１１０】

用語「脂肪酸」は、本明細書で使用されるとき、構造Ｒ－ＣＯＯＨ（式中、ＲはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$飽和、不飽和、直鎖状、分枝状又は環状炭化水素であり、及びカルボキシル基は１位にある）の化合物を指す。詳細な実施形態では、ＲはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$飽和又は不飽和直鎖炭化水素であり、及びカルボキシル基は１位にある。

【０１１１】

用語「脂肪アルコール」は、本明細書で使用されるとき、式Ｒ－ＯＨ（式中、ＲはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$飽和、不飽和、直鎖状、分枝状又は環状炭化水素である）を有する脂肪族アルコールを指す。詳細な実施形態では、ＲはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$飽和又は不飽和直鎖炭化水素である。

【０１１２】

用語「脂肪アシル－ＣｏＡ」は、構造Ｒ－（ＣＯ）－Ｓ－Ｒ$_1$（式中、Ｒ$_1$は補酵素Ａである）を有する化合物を指し、及び用語「脂肪アシル－ＡＣＰ」は、構造Ｒ－（ＣＯ）－Ｓ－Ｒ$_1$（式中、Ｒ$_1$はアシルキャリアータンパク質ＡＣＰである）を有する化合物を指す。

【０１１３】

[0168] 用語「短鎖（short chain）」又は「短鎖（short-chain）」は、Ｃ１８以下の炭素鎖長を有するフェロモン、フレグランス、フレーバー及びポリマー中間体を含めた脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを指す。

【０１１４】
序論
本開示は、低コスト原料から高価値の生成物を費用効率良く生産する新規技術の必要性に対処するものである。具体的には、本発明者らは、合成昆虫フェロモン、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体を含めた広範囲に及ぶ不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートを低コスト原料から生成する能力を有する組換え微生物の開発によってこの必要性に対処した。従って、本開示の態様は、低コスト原料から高価値産物を生成するように組換え微生物を改変することができ、それにより高価値産物を生成するための従来の合成方法を回避し得るという本発明者らの発見に基づく。
【０１１５】
上記で考察したとおり、組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを合成するように改変することができる。本明細書に記載されるとおり合成した一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、対応するアルデヒド又はアセテートに更に変換することができる。従って、本開示の様々な実施形態を用いて、脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートから選択される種々の昆虫フェロモンを合成することができる。加えて、本明細書に記載される実施形態はまた、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体の合成にも用いることができる。
【０１１６】
［0172］ 微生物宿主の改変は、限定はされないが、１つ又は複数の脂肪アシルデサチュラーゼ及び脂肪アルコール形成又は脂肪アルデヒド形成レダクターゼから構成される非天然フェロモン生合成経路の発現を伴う。不飽和化反応によって生成される脂肪酸は、トリアシルグリセリドとして細胞内に保持されるか又はレダクターゼによって酵素的に還元されて、脂肪アルコール又はアルデヒドを形成し得る。不飽和脂肪酸を含有するトリアシルグリセリドは、抽出され、エステル化され、化学的に還元されて、不飽和脂肪アルコールを生成し得る。記載される経路によって生成される脂肪アルコールは、その後の化学的酸化及びエステル化方法によってそれぞれ脂肪アルデヒドフェロモン及び脂肪アセテートフェロモンに更に変換され得る。化学的酸化及びエステル化の方法は、当該技術分野において公知である。記載されるフェロモン生合成経路を介して生成される脂肪アルコールは、それぞれアルコールデヒドロゲナーゼ及びアセチルトランスフェラーゼなどの酵素的変換を用いて、脂肪アルデヒドフェロモン及び脂肪アセテートフェロモンにも更に変換され得る。同様に、フェロモン生合成経路において中間体として形成される脂肪アシル－ＣｏＡ又は脂肪アシル－ＡＣＰは、天然の又は異種由来のチオエステラーゼによって遊離脂肪酸として放出されて、メタセシスを用いたフェロモンの合成のための基質になり得る。
【０１１７】
フェロモン
上記に記載したとおり、本開示の実施形態は、組換え微生物を用いた１つ以上の昆虫フェロモンの合成を提供する。フェロモンは、種内における化学的コミュニケーション機能のため特定の昆虫によって分泌される揮発性の化学的化合物である。即ち、フェロモンは、同じ種のメンバーに社会的反応を惹起する、分泌又は排泄される化学的因子である。とりわけ、警報フェロモン、食物の道標フェロモン、性フェロモン、集合フェロモン、自己顕示フェロモン、解発フェロモン、起動フェロモン、及び縄張りフェロモンがあり、これらは行動又は生理に影響を及ぼす。
【０１１８】
本明細書に開示される組換え微生物及び方法を用いて合成することのできる昆虫フェロモンの非限定的な例としては、表１に掲載する直鎖アルコール、アルデヒド、及びアセテートが挙げられる。
【０１１９】

【表１－１】

表 1. C_6～C_{20} 直鎖フェロモン

名称	名称
(E)-2-デセン-1-オール	(E,E)-10,12-テトラデカジエン-1-オール
(E)-2-デセニルアセテート	(E,E)-10,12-テトラデカジエニルアセテート
(E)-2-デセナール	(E,E)-10,12-テトラデカジエナール
(Z)-2-デセン-1-オール	(E,Z)-10,12-テトラデカジエニルアセテート
(Z)-2-デセニルアセテート	(Z,E)-10,12-テトラデカジエニルアセテート
(Z)-2-デセナール	(Z,Z)-10,12-テトラデカジエン-1-オール
(E)-3-デセン-1-オール	(Z,Z)-10,12-テトラデカジエニルアセテート
(Z)-3-デセニルアセテート	(E,Z,Z)-3,8,11-テトラデカトリエニルアセテート
(Z)-3-デセン-1-オール	(E)-8-ペンタデセン-1-オール
(Z)-4-デセン-1-オール	(E)-8-ペンタデセニルアセテート

【表１－２】

名称	名称
(E)-4-デセニルアセテート	(Z)-8-ペンタデセン-1-オール
(Z)-4-デセニルアセテート	(Z)-8-ペンタデセニルアセテート
(Z)-4-デセナール	(Z)-9-ペンタデセニルアセテート
(E)-5-デセン-1-オール	(E)-9-ペンタデセニルアセテート
(E)-5-デセニルアセテート	(Z)-10-ペンタデセニルアセテート
(Z)-5-デセン-1-オール	(Z)-10-ペンタデセナール
(Z)-5-デセニルアセテート	(E)-12-ペンタデセニルアセテート
(Z)-5-デセナール	(Z)-12-ペンタデセニルアセテート
(E)-7-デセニルアセテート	(Z,Z)-6,9-ペンタデカジエン-1-オール
(Z)-7-デセニルアセテート	(Z,Z)-6,9-ペンタデカジエニルアセテート
(E)-8-デセン-1-オール	(Z,Z)-6,9-ペンタデカジエナール
(E,E)-2,4-デカジエナール	(E,E)-8,10-ペンタデカジエニルアセテート
(E,Z)-2,4-デカジエナール	(E,Z)-8,10-ペンタデカジエン-1-オール
(Z,Z)-2,4-デカジエナール	(E,Z)-8,10-ペンタデカジエニルアセテート
(E,E)-3,5-デカジエニルアセテート	(Z,E)-8,10-ペンタデカジエニルアセテート
(Z,E)-3,5-デカジエニルアセテート	(Z,Z)-8,10-ペンタデカジエニルアセテート
(Z,Z)-4,7-デカジエン-1-オール	(E,Z)-9,11-ペンタデカジエナール
(Z,Z)-4,7-デカジエニルアセテート	(Z,Z)-9,11-ペンタデカジエナール
(E)-2-ウンデセニルアセテート	(Z)-3-ヘキサデセニルアセテート
(E)-2-ウンデセナール	(E)-5-ヘキサデセン-1-オール
(Z)-5-ウンデセニルアセテート	(E)-5-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-7-ウンデセニルアセテート	(Z)-5-ヘキサデセン-1-オール
(Z)-8-ウンデセニルアセテート	(Z)-5-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-9-ウンデセニルアセテート	(E)-6-ヘキサデセニルアセテート
(E)-2-ドデセナール	(E)-7-ヘキサデセン-1-オール

【表１－３】

名称	名称
(Z)-3-ドデセン-1-オール	(E)-7-ヘキサデセニルアセテート
(E)-3-ドデセニルアセテート	(E)-7-ヘキサデセナール
(Z)-3-ドデセニルアセテート	(Z)-7-ヘキサデセン-1-オール
(E)-4-ドデセニルアセテート	(Z)-7-ヘキサデセニルアセテート
(E)-5-ドデセン-1-オール	(Z)-7-ヘキサデセナール
(E)-5-ドデセニルアセテート	(E)-8-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-5-ドデセン-1-オール	(E)-9-ヘキサデセン-1-オール
(Z)-5-ドデセニルアセテート	(E)-9-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-5-ドデセナール	(E)-9-ヘキサデセナール
(E)-6-ドデセン-1-オール	(Z)-9-ヘキサデセン-1-オール
(Z)-6-ドデセニルアセテート	(Z)-9-ヘキサデセニルアセテート
(E)-6-ドデセナール	(Z)-9-ヘキサデセナール
(E)-7-ドデセン-1-オール	(E)-10-ヘキサデセン-1-オール
(E)-7-ドデセニルアセテート	(E)-10-ヘキサデセナール
(E)-7-ドデセナール	(Z)-10-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-7-ドデセン-1-オール	(Z)-10-ヘキサデセナール
(Z)-7-ドデセニルアセテート	(E)-11-ヘキサデセン-1-オール
(Z)-7-ドデセナール	(E)-11-ヘキサデセニルアセテート
(E)-8-ドデセン-1-オール	(E)-11-ヘキサデセナール
(E)-8-ドデセニルアセテート	(Z)-11-ヘキサデセン-1-オール
(E)-8-ドデセナール	(Z)-11-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-8-ドデセン-1-オール	(Z)-11-ヘキサデセナール
(Z)-8-ドデセニルアセテート	(Z)-12-ヘキサデセニルアセテート
(E)-9-ドデセン-1-オール	(Z)-12-ヘキサデセナール
(E)-9-ドデセニルアセテート	(E)-14-ヘキサデセナール

【表１－４】

名称	名称
(E)-9-ドデセナール	(Z)-14-ヘキサデセニルアセテート
(Z)-9-ドデセン-1-オール	(E,E)-1,3-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z)-9-ドデセニルアセテート	(E,Z)-4,6-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z)-9-ドデセナール	(E,Z)-4,6-ヘキサデカジエニルアセテート
(E)-10-ドデセン-1-オール	(E,Z)-4,6-ヘキサデカジエナール
(E)-10-ドデセニルアセテート	(E,Z)-6,11-ヘキサデカジエニルアセテート
(E)-10-ドデセナール	(E,Z)-6,11-ヘキサデカジエナール
(Z)-10-ドデセン-1-オール	(Z,Z)-7,10-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z)-10-ドデセニルアセテート	(Z,Z)-7,10-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,Z)-3,5-ドデカジエニルアセテート	(Z,E)-7,11-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z,E)-3,5-ドデカジエニルアセテート	(Z,E)-7,11-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,Z)-3,6-ドデカジエン-1-オール	(Z,E)-7,11-ヘキサデカジエナール
(E,E)-4,10-ドデカジエニルアセテート	(Z,Z)-7,11-ヘキサデカジエン-1-オール
(E,E)-5,7-ドデカジエン-1-オール	(Z,Z)-7,11-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,E)-5,7-ドデカジエニルアセテート	(Z,Z)-7,11-ヘキサデカジエナール
(E,Z)-5,7-ドデカジエン-1-オール	(Z,Z)-8,10-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,Z)-5,7-ドデカジエニルアセテート	(E,Z)-8,11-ヘキサデカジエナール
(E,Z)-5,7-ドデカジエナール	(E,E)-9,11-ヘキサデカジエナール
(Z,E)-5,7-ドデカジエン-1-オール	(E,Z)-9,11-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,E)-5,7-ドデカジエニルアセテート	(E,Z)-9,11-ヘキサデカジエナール
(Z,E)-5,7-ドデカジエナール	(Z,E)-9,11-ヘキサデカジエナール
(Z,Z)-5,7-ドデカジエニルアセテート	(Z,Z)-9,11-ヘキサデカジエナール
(Z,Z)-5,7-ドデカジエナール	(E,E)-10,12-ヘキサデカジエン-1-オール
(E,E)-7,9-ドデカジエニルアセテート	(E,E)-10,12-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,Z)-7,9-ドデカジエン-1-オール	(E,E)-10,12-ヘキサデカジエナール

【表１－５】

名称	名称
(E,Z)-7,9-ドデカジエニルアセテート	(E,Z)-10,12-ヘキサデカジエン-1-オール
(E,Z)-7,9-ドデカジエナール	(E,Z)-10,12-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,E)-7,9-ドデカジエン-1-オール	(E,Z)-10,12-ヘキサデカジエナール
(Z,E)-7,9-ドデカジエニルアセテート	(Z,E)-10,12-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,Z)-7,9-ドデカジエン-1-オール	(Z,E)-10,12-ヘキサデカジエナール
(Z,Z)-7,9-ドデカジエニルアセテート	(Z,Z)-10,12-ヘキサデカジエナール
(E,E)-8,10-ドデカジエン-1-オール	(E,E)-11,13-ヘキサデカジエン-1-オール
(E,E)-8,10-ドデカジエニルアセテート	(E,E)-11,13-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,E)-8,10-ドデカジエナール	(E,E)-11,13-ヘキサデカジエナール
(E,Z)-8,10-ドデカジエン-1-オール	(E,Z)-11,13-ヘキサデカジエン-1-オール
(E,Z)-8,10-ドデカジエニルアセテート	(E,Z)-11,13-ヘキサデカジエニルアセテート
(E,Z)-8,10-ドデカジエナール	(E,Z)-11,13-ヘキサデカジエナール
(Z,E)-8,10-ドデカジエン-1-オール	(Z,E)-11,13-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z,E)-8,10-ドデカジエニルアセテート	(Z,E)-11,13-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,E)-8,10-ドデカジエナール	(Z,E)-11,13-ヘキサデカジエナール
(Z,Z)-8,10-ドデカジエン-1-オール	(Z,Z)-11,13-ヘキサデカジエン-1-オール
(Z,Z)-8,10-ドデカジエニルアセテート	(Z,Z)-11,13-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z,E,E)-3,6,8-ドデカトリエン-1-オール	(Z,Z)-11,13-ヘキサデカジエナール
(Z,Z,E)-3,6,8-ドデカトリエン-1-オール	(E,E)-10,14-ヘキサデカジエナール
(E)-2-トリデセニルアセテート	(Z,E)-11,14-ヘキサデカジエニルアセテート
(Z)-2-トリデセニルアセテート	(E,E,Z)-4,6,10-ヘキサデカトリエン-1-オール
(E)-3-トリデセニルアセテート	(E,E,Z)-4,6,10-ヘキサデカトリエニルアセテート
(E)-4-トリデセニルアセテート	(E,Z,Z)-4,6,10-ヘキサデカトリエン-1-オール
(Z)-4-トリデセニルアセテート	(E,Z,Z)-4,6,10-ヘキサデカトリエニルアセテート
(Z)-4-トリデセナール	(E,E,Z)-4,6,11-ヘキサデカトリエニルアセテート

【表１－６】

名称	名称
(E)-6-トリデセニルアセテート	(E,E,Z)-4,6,11-ヘキサデカトリエナール
(Z)-7-トリデセニルアセテート	(Z,Z,E)-7,11,13-ヘキサデカトリエナール
(E)-8-トリデセニルアセテート	(E,E,E)-10,12,14-ヘキサデカトリエニルアセテート
(Z)-8-トリデセニルアセテート	(E,E,E)-10,12,14-ヘキサデカトリエナール
(E)-9-トリデセニルアセテート	(E,E,Z)-10,12,14-ヘキサデカトリエニルアセテート
(Z)-9-トリデセニルアセテート	(E,E,Z)-10,12,14-ヘキサデカトリエナール
(Z)-10-トリデセニルアセテート	(E,E,Z,Z)-4,6,11,13-ヘキサデカテトラエナール
(E)-11-トリデセニルアセテート	(E)-2-ヘプタデセナール
(Z)-11-トリデセニルアセテート	(Z)-2-ヘプタデセナール
(E,Z)-4,7-トリデカジエニルアセテート	(E)-8-ヘプタデセン-1-オール
(Z,Z)-4,7-トリデカジエン-1-オール	(E)-8-ヘプタデセニルアセテート
(Z,Z)-4,7-トリデカジエニルアセテート	(Z)-8-ヘプタデセン-1-オール
(E,Z)-5,9-トリデカジエニルアセテート	(Z)-9-ヘプタデセナール
(Z,E)-5,9-トリデカジエニルアセテート	(E)-10-ヘプタデセニルアセテート
(Z,Z)-5,9-トリデカジエニルアセテート	(Z)-11-ヘプタデセン-1-オール
(Z,Z)-7,11-トリデカジエニルアセテート	(Z)-11-ヘプタデセニルアセテート
(E,Z,Z)-4,7,10-トリデカトリエニルアセテート	(E,E)-4,8-ヘプタデカジエニルアセテート
(E)-3-テトラデセン-1-オール	(Z,Z)-8,10-ヘプタデカジエン-1-オール
(E)-3-テトラデセニルアセテート	(Z,Z)-8,11-ヘプタデカジエニルアセテート
(Z)-3-テトラデセン-1-オール	(E)-2-オクタデセニルアセテート
(Z)-3-テトラデセニルアセテート	(E)-2-オクタデセナール
(E)-5-テトラデセン-1-オール	(Z)-2-オクタデセニルアセテート
(E)-5-テトラデセニルアセテート	(Z)-2-オクタデセナール
(E)-5-テトラデセナール	(E)-9-オクタデセン-1-オール

【表１－７】

名称	名称
(Z)-5-テトラデセン-1-オール	(E)-9-オクタデセニルアセテート
(Z)-5-テトラデセニルアセテート	(E)-9-オクタデセナール
(Z)-5-テトラデセナール	(Z)-9-オクタデセン-1-オール
(E)-6-テトラデセニルアセテート	(Z)-9-オクタデセニルアセテート
(Z)-6-テトラデセニルアセテート	(Z)-9-オクタデセナール
(E)-7-テトラデセン-1-オール	(E)-11-オクタデセン-1-オール
(E)-7-テトラデセニルアセテート	(E)-11-オクタデセナール
(Z)-7-テトラデセン-1-オール	(Z)-11-オクタデセン-1-オール
(Z)-7-テトラデセニルアセテート	(Z)-11-オクタデセニルアセテート
(Z)-7-テトラデセナール	(Z)-11-オクタデセナール
(E)-8-テトラデセニルアセテート	(E)-13-オクタデセニルアセテート
(Z)-8-テトラデセン-1-オール	(E)-13-オクタデセナール
(Z)-8-テトラデセニルアセテート	(Z)-13-オクタデセン-1-オール
(Z)-8-テトラデセナール	(Z)-13-オクタデセニルアセテート
(E)-9-テトラデセン-1-オール	(Z)-13-オクタデセナール
(E)-9-テトラデセニルアセテート	(E)-14-オクタデセナール
(Z)-9-テトラデセン-1-オール	(E,Z)-2,13-オクタデカジエン-1-オール
(Z)-9-テトラデセニルアセテート	(E,Z)-2,13-オクタデカジエニルアセテート
(Z)-9-テトラデセナール	(E,Z)-2,13-オクタデカジエナール
(E)-10-テトラデセニルアセテート	(Z,E)-2,13-オクタデカジエニルアセテート
(Z)-10-テトラデセニルアセテート	(Z,Z)-2,13-オクタデカジエン-1-オール
(E)-11-テトラデセン-1-オール	(Z,Z)-2,13-オクタデカジエニルアセテート
(E)-11-テトラデセニルアセテート	(E,E)-3,13-オクタデカジエニルアセテート
(E)-11-テトラデセナール	(E,Z)-3,13-オクタデカジエニルアセテート
(Z)-11-テトラデセン-1-オール	(E,Z)-3,13-オクタデカジエナール

【表１－８】

名称	名称
(Z)-11-テトラデセニルアセテート	(Z,E)-3,13-オクタデカジエニルアセテート
(Z)-11-テトラデセナール	(Z,Z)-3,13-オクタデカジエニルアセテート
(E)-12-テトラデセニルアセテート	(Z,Z)-3,13-オクタデカジエナール
(Z)-12-テトラデセニルアセテート	(E,E)-5,9-オクタデカジエン-1-オール
(E,E)-2,4-テトラデカジエナール	(E,E)-5,9-オクタデカジエニルアセテート
(E,E)-3,5-テトラデカジエニルアセテート	(E,E)-9,12-オクタデカジエン-1-オール
(E,Z)-3,5-テトラデカジエニルアセテート	(Z,Z)-9,12-オクタデカジエニルアセテート
(Z,E)-3,5-テトラデカジエニルアセテート	(Z,Z)-9,12-オクタデカジエナール
(E,Z)-3,7-テトラデカジエニルアセテート	(Z,Z)-11,13-オクタデカジエナール
(E,Z)-3,8-テトラデカジエニルアセテート	(E,E)-11,14-オクタデカジエナール
(E,Z)-4,9-テトラデカジエニルアセテート	(Z,Z)-13,15-オクタデカジエナール
(E,Z)-4,9-テトラデカジエナール	(Z,Z,Z)-3,6,9-オクタデカトリエニルアセテート
(E,Z)-4,10-テトラデカジエニルアセテート	(E,E,E)-9,12,15-オクタデカトリエン-1-オール
(E,E)-5,8-テトラデカジエナール	(Z,Z,Z)-9,12,15-オクタデカトリエニルアセテート
(Z,Z)-5,8-テトラデカジエン-1-オール	(Z,Z,Z)-9,12,15-オクタデカトリエナール
(Z,Z)-5,8-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,Z)-5,8-テトラデカジエナール	
(E,E)-8,10-テトラデカジエン-1-オール	
(E,E)-8,10-テトラデカジエニルアセテート	
(E,E)-8,10-テトラデカジエナール	
(E,Z)-8,10-テトラデカジエニルアセテート	
(E,Z)-8,10-テトラデカジエナール	
(Z,E)-8,10-テトラデカジエン-1-オール	
(Z,E)-8,10-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,Z)-8,10-テトラデカジエナール	

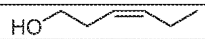
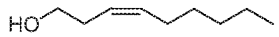
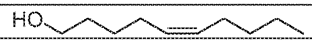
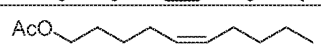
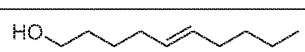
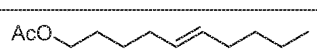
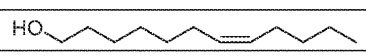
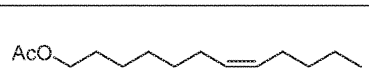
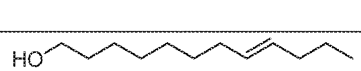
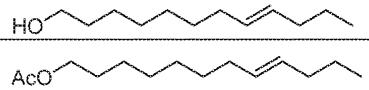
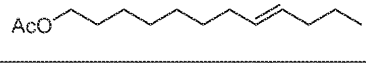
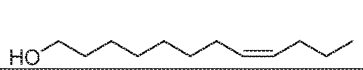
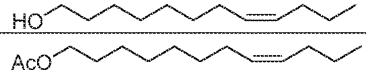
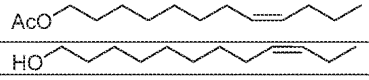
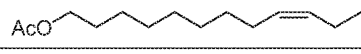
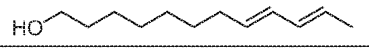
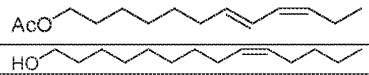
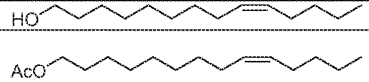
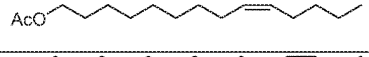
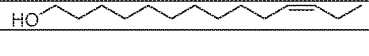
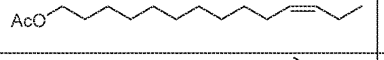
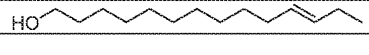
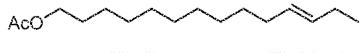
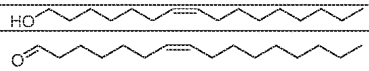
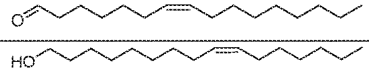
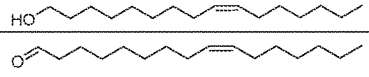
【表１－９】

名称	名称
(E,E)-9,11-テトラデカジエニルアセテート	
(E,Z)-9,11-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,E)-9,11-テトラデカジエン-1-オール	
(Z,E)-9,11-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,E)-9,11-テトラデカジエナール	
(Z,Z)-9,11-テトラデカジエン-1-オール	
(Z,Z)-9,11-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,Z)-9,11-テトラデカジエナール	
(E,E)-9,12-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,E)-9,12-テトラデカジエン-1-オール	
(Z,E)-9,12-テトラデカジエニルアセテート	
(Z,E)-9,12-テトラデカジエナール	
(Z,Z)-9,12-テトラデカジエン-1-オール	
(Z,Z)-9,12-テトラデカジエニルアセテート	

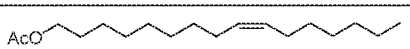
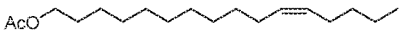
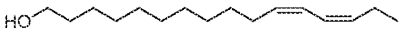
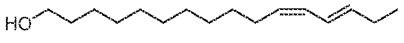
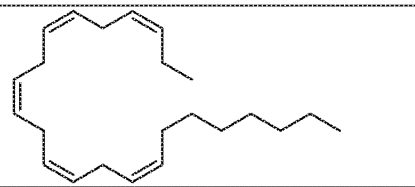
【０１２０】
一部の態様において、本開示に教示されるとおり合成されるフェロモンには、表２ａに掲載される昆虫の行動を調節する表２ａに掲載される少なくとも１つのフェロモンが含まれる。他の態様において、本明細書に開示される組換え微生物及び方法を用いて合成することのできる昆虫フェロモンの非限定的な例としては、表２ａに掲載されるアルコール、アルデヒド、及びアセテートが挙げられる。しかしながら、本明細書に記載される微生物は、表１及び表２ａに掲載されるＣ$_{6}$～Ｃ$_{20}$フェロモンの合成に限定されない。むしろ、本開示の微生物はまた、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体を含めた、様々なＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$一不飽和又は多価不飽和脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートの合成においても利用することができる。
【０１２１】

【表２－１】

表2a. 本開示に記載される方法により合成することのできる例示的フェロモン

名称	構造	生物学的 重要性の例
(Z)-3-ヘキセン-1-オール		Sugimoto et al. (2014)を参照
(Z)-3-ノネン-1-オール		ニシインドミバエ雄性フェロモン
(Z)-5-デセン-1-オール		
(Z)-5-デセニルアセテート		カブラヤガ*(Agrotis segetum)*性 フェロモン成分
(E)-5-デセン-1-オール		モモキバガ*(Anarsia lineatella)*性 フェロモン成分
(E)-5-デセニルアセテート		モモキバガ*(Anarsia lineatella)*性 フェロモン成分
(Z)-7-ドデセン-1-オール		
(Z)-7-ドデセニルアセテート		ダイズシャクトリムシ*(Pseudoplusia includens)*性フェロモン カブラヤガ*(Agrotis segetum)*性 フェロモン成分
(E)-8-ドデセン-1-オール		シトラスフルーツモス(Citrus Fruit Moth)性フェロモン
(E)-8-ドデセニルアセテート		ナシヒメシンクイ*(Grapholitha molesta)*、 エクジトロファ・アウランチアナ *(Ecdytolopha aurantiana)*性フェロモン成分
(Z)-8-ドデセン-1-オール		ナシヒメシンクイ*(Grapholitha molesta)*、 エクジトロファ・アウランチアナ *(Ecdytolopha aurantiana)*性フェロモン成分
(Z)-8-ドデセニルアセテート		ナシヒメシンクイ*(Grapholitha molesta)*性 フェロモン成分
(Z)-9-ドデセン-1-オール		
(Z)-9-ドデセニルアセテート		ブドウホソハマキ*(Eupoecilia ambiguella)*性 フェロモン
(E,E)-8,10-ドデカジエン-1- オール		コドリンガ*(Cydia pomonella)*
(7E,9Z)-ドデカジエニル アセテート		ホソバヒメハマキ*(Lobesia botrana)*
(Z)-9-テトラデセン-1-オール		
(Z)-9-テトラデセニル アセテート		パンデミス・ピルサナ*(Pandemis pyrusana)*、 フタオビコヤガ*(Naranga aenescens)*、 カブラヤガ*(Agrotis segetum)*性フェロモン成分
(Z)-11-テトラデセン-1-オール		
(Z)-11-テトラデセニル アセテート		パンデミス・ピルサナ*(Pandemis pyrusana)*、 ハスオビハマキ*(Choristoneura roseceana)*性 フェロモン成分
(E)-11-テトラデセン-1-オール		
(E)-11-テトラデセニル アセテート		ハスオビハマキ*(Choristoneura roseceana)*、 ケブカノメイガ*(Crocidolomia pavonana)*性 フェロモン成分
(Z)-7-ヘキサデセン-1-オール		
(Z)-7-ヘキサデセナール		ジアトラエ・コンシデラタ*(Diatraea considerata)*性 フェロモン成分
(Z)-9-ヘキサデセン-1-オール		
(Z)-9-ヘキサデセナール		アメリカタバコガ*(Helicoverpa zea)*、 オオタバコガ*(Helicoverpa armigera)*、

【表２－２】

名称	構造	生物学的 重要性の例
		ニセアメリカタバコガ(*Heliothis virescens*)性フェロモン成分
(Z)-9-ヘキサデセニル アセテート		フタオビコヤガ(*Naranga aenescens*)性 フェロモン成分
(Z)-11-ヘキサデセン-1-オール		
(Z)-11-ヘキサデセナール		ジュイダクチラ(*Platyptila carduidactyla*)、 ニセアメリカタバコガ(*Heliothis virescens*)性フェロモン アメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、オオ タバコガ(*Helicoverpa armigera*)、コナガ (*Plutella xylostella*)、ジアトラエア・コンシ デラテ(*Diatraea considerate*)、サウスウエ スタンコーンボーラー(*Diatraea grandiosella*)、 シュガーケーンボーラー(*Diatraea saccharalis*)、 リークモス(*Acrolepiopsis assectella*)性フェロモン成分
(Z)-11-ヘキサデセニル アセテート		タイリクウスイロヨトウ(*Discestra trifolii*)性 フェロモン　ニセアメリカタバコガ(*Heliothis virescens*)、コナガ(*Plutella xylostella*)、 リークモス(*Acrolepiopsis assectella*)、ケブカ ノメイガ(*Crocidolomia pavonana*)、フタオ ビコヤガ(*Naranga aenescens*)性フェロモン成分
(Z,Z)-11,13- ヘキサデカジエナール		クルミマダラメイガ(*Amyelosis transitella*)
(Z,Z)-11,13- ヘキサデカジエン-1-オール		クルミマダラメイガ(*Amyelosis transitella*)
(11Z,13E)- ヘキサデカジエン-1-オール		クルミマダラメイガ(*Amyelosis transitella*)
(9Z,11E)- ヘキサデカジエナール		
(Z)-13-オクタデセン-1-オール		
(Z)-13-オクタデセナール		ジアトラエア・コンシデラタ(*Diatraea considerata*)、 サウスウエスタンコーンボーラー(*Diatraea grandiosella*)性フェロモン成分
(Z,Z,Z,Z,Z)-3,6,9,12,15- トリコサペンタエン		クルミマダラメイガ(*Amyelosis transitella*)

【０１２２】

多くのフェロモンは、末端水素が官能基によって置換されている炭化水素骨格を含む（Ryan MF (2002). Insect Chemoreception. Fundamental and Applied. Kluwer Academic Publishers）。表２ｂは一部の一般的な官能基をその式、接頭辞及び接尾辞と共に示す。隣接炭素からの水素の喪失によって生じた１つ以上の二重結合の存在によって分子の不飽和度が決まると共に、炭化水素の呼称が－アン（-ane）（多重結合なし）から－エン（-ene）に変わる。２つ及び３つの二重結合の存在は、名称がそれぞれ－ジエン及び－トリエンで終わることにより示される。各二重結合の位置は、それが始まる炭素の位置に対応する数字によって表され、各炭素は、官能基に結合しているものから付番される。官能基が結合している炭素を－１－と呼ぶ。フェロモンは、限定はされないが、１０（デカ－）、１２（ドデカ－）、１４（テトラデカ－）、１６（ヘキサデカ－）、又は１８（オクタデカ－）炭素長を数える炭化水素鎖長を有し得る。二重結合の存在は別の効果を有する。二重結合は、分子を２つの可能な配置（各々、異なる分子である幾何異性体に相当する）の一方に固定することにより分子の回転を妨げる。これらは、炭素鎖が二重結合のそれぞれ反対側（トランス）又は同じ側（シス）で接続しているとき、Ｅ（ドイツ語のEntgegen、反対に由来）又はＺ（Zusammen、一緒）のいずれかで呼ばれる。

【０１２３】

【表２－３】

表2b. 一般的な官能基の接頭辞及び接尾辞

官能基	式	接頭辞	接尾辞
アルコール	-OH	ヒドロキシ-	-オール
アルデヒド	-CH=O	ホルミル-	-アール
アミン	$-NH_2$	アミノ-	-アミン
カルボン酸	-COOH	カルボキシ-	-酸
エステル	-COOR	R-オキシカルボニル-	-*R*-オエート
ケトン	>C=O	オキソ-	-オン

出典Howse, PE, Stevens, IDR and Jones, OT (1998).「昆虫フェロモン及び害虫管理におけるその使用(Insect pheromones and their use in pest management)」. London: Chapman and Hall.

【０１２４】

本明細書に記載されるフェロモンは、ＩＵＰＡＣ命名法又は当業者に公知の様々な略称若しくは変化形を用いて参照することができる。例えば、（１１Ｚ）－ヘキサデセン－１－アールはまた、Ｚ－１１－ヘキサデセン－１－アール、Ｚ－１１－ヘキサデセナール、又はＺ－ｘ－ｙ：Ａｌｄ（式中、ｘは二重結合の位置を表し、及びｙは炭化水素骨格中の炭素の数を表す）とも書くことができる。炭化水素骨格上の官能基を特定するために本明細書で用いられる及び当業者に公知の略称には、アルデヒドを示す「Ａｌｄ」、アルコールを示す「ＯＨ」、及びアセチルを示す「Ａｃ」が含まれる。また、鎖中の炭素数は、数詞を用いるよりむしろ、数字を用いて示すこともできる。従って、本明細書で使用されるとき、１６炭素で構成される不飽和炭素鎖は、ヘキサデセン又は１６と書くことができる。

【０１２５】

同様の略称及び派生語が、フェロモン前駆体を記載するため本明細書で用いられる。例えば、（１１Ｚ）－ヘキサデセン－１－アールの脂肪アシル－ＣｏＡ前駆体は、（１１Ｚ）－ヘキサデセニル－ＣｏＡ又はＺ－１１－１６：アシル－ＣｏＡとして特定することができる。

【０１２６】

本開示は、合成過程の１つ以上の段階についての基質の生成物への変換を触媒する１つ以上の異種酵素を含む組換え微生物を用いた一不飽和又は多価不飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、及びアセテートの合成に関する。

【０１２７】

デサチュラーゼ

本開示は、脂肪アシル基質を対応する不飽和脂肪アシル基質に不飽和化する酵素を記載する。

【０１２８】

一部の実施形態では、脂肪アシル－ＣｏＡ又はアシル－ＡＣＰの、対応する不飽和脂肪アシル－ＣｏＡ又はアシル－ＡＣＰへの変換を触媒するためデサチュラーゼが使用される。デサチュラーゼは、少なくとも２つの水素原子を取り除くことにより飽和脂肪酸又は脂肪酸誘導体、例えば、脂肪アシル－ＣｏＡ又は脂肪アシル－ＡＣＰ（本明細書ではまとめて「脂肪アシル」と称される）における炭素－炭素二重結合の形成を触媒して対応する不飽和脂肪酸／アシルを生成させる酵素である。デサチュラーゼは、脂肪酸／アシルのメチル末端に対する内部炭素又は脂肪酸／アシルのカルボニル末端に対する内部炭素でこの酵素が二重結合形成を選択的に触媒する能力に基づき分類される。オメガ（ω）デサチュラ

ーゼは、脂肪酸／アシルのメチル末端に対する固定的な内部炭素で炭素－炭素二重結合の形成を触媒する。例えば、ω^{3}デサチュラーゼは、脂肪酸／アシルのメチル末端から３番目の炭素と４番目の炭素との間で二重結合の形成を触媒する。デルタ（Δ）デサチュラーゼは、脂肪酸のカルボキシル基又は脂肪アシルＣｏＡのカルボニル基から特定の位置で炭素－炭素二重結合の形成を触媒する。例えば、Δ^{9}デサチュラーゼは、脂肪酸のカルボキシル末端又は脂肪アシルＣｏＡのカルボニル基から$Ｃ_{９}$～$Ｃ_{１０}$の炭素間で二重結合の形成を触媒する。

【０１２９】

本明細書で使用されるとき、デサチュラーゼは、そのデサチュラーゼが二重結合の形成を触媒する位置、及び結果として得られる不飽和炭化水素の幾何配置（即ち、Ｅ／Ｚ）に関連して記載することができる。従って、本明細書で使用されるとき、Ｚ９デサチュラーゼは、脂肪酸／アシルのカルボニル末端から$Ｃ_{９}$～$Ｃ_{１０}$の炭素間で二重結合の形成を触媒し、それにより２つの炭化水素をシス又はＺ配置で炭素－炭素二重結合の反対側に配向させるΔデサチュラーゼを指す。同様に、本明細書で使用されるとき、Ｚ１１デサチュラーゼは、脂肪酸／アシルのカルボニル末端から$Ｃ_{１１}$～$Ｃ_{１２}$の炭素間で二重結合の形成を触媒するΔデサチュラーゼを指す。

【０１３０】

デサチュラーゼは保存された構造モチーフを有する。膜貫通デサチュラーゼのこの配列モチーフは、［ＨＸ３－４ＨＸ７－４１（３個の非Ｈｉｓ）ＨＸ２－３（１個の非Ｈｉｓ）ＨＨＸ６１－１８９（４０個の非Ｈｉｓ）ＨＸ２－３（１個の非Ｈｉｓ）ＨＨ］によって特徴付けられる。可溶性デサチュラーゼの配列モチーフは、［Ｄ／ＥＥＸＸＨ］が２つ出現することによって特徴付けられる。

【０１３１】

一部の実施形態では、デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＣｏＡにおける二重結合の形成を触媒する脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼである。一部のかかる実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有する。従って、本組換え微生物に使用されるデサチュラーゼは、基質の鎖長に基づき選択することができる。

【０１３２】

一部の実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシルデサチュラーゼは、不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの末端ＣｏＡに対して所望の炭素で二重結合の形成を触媒する能力を有する。従って、一部の実施形態では、脂肪アシル－ＣｏＡのカルボニル基から３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、又は１３位で二重結合挿入を触媒するデサチュラーゼを本組換え微生物で使用するように選択することができる。

【０１３３】

一部の実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシルデサチュラーゼは、得られる不飽和脂肪アシル－ＣｏＡがシス又はトランス（即ちＺ又はＥ）幾何配置を有するように飽和脂肪アシル－ＣｏＡにおける二重結合の形成を触媒する能力を有する。

【０１３４】

一部の実施形態では、デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＡＣＰにおける二重結合の形成を触媒する脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼである。一部の実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有する。従って、本組換え微生物に使用されるデサチュラーゼは、基質の鎖長に基づき選択することができる。

【０１３５】

一部の実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは、不飽和脂肪アシル－ＡＣＰの末端カルボニルに対して所望の炭素で二重結合の形成を触媒す

る能力を有する。従って、一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰのカルボニル基から３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、又は１３位で二重結合挿入を触媒するデサチュラーゼを本組換え微生物で使用するように選択することができる。

【０１３６】

一部の実施形態では、本明細書に記載される脂肪アシルデサチュラーゼは、得られる不飽和脂肪アシル－ＡＣＰがシス又はトランス（即ちＺ又はＥ）幾何配置を有するように飽和脂肪アシル－ＣｏＡにおける二重結合の形成を触媒する能力を有する。

【０１３７】

一実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼはＺ１１デサチュラーゼである。一部の実施形態では、カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アカオビコハマキ（Argyrotaenia velutiana）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、又はタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）種の生物由来のＺ１１デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号９、１８、２４及び２６から選択される核酸配列を含む。

一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号４９に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１０及び１６から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５３に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号１１及び２３から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号５０及び５１から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号１２、１７及び３０から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。更なる実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号１３、１９、２５、２７及び３１から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イネヨトウ（S. inferens）由来の配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１及びＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、キメラポリペプチドを含む。一部の実施形態では、完全な又は部分的なＺ１１デサチュラーゼが別のポリペプチドに融合される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼのＮ末端天然リーダー配列が別の種由来のオレオシンリーダー配列に置換される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号１５、２８及び２９から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号６１、６２、６３、７８、７９及び８０から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１３８】

[0192] 一実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９デサチュラーゼである。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由

来の配列番号２０に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由来の配列番号５８に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号２１に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号５９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号２２に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号６０に示されるアミノ酸配列を含む。

【０１３９】

したがって、一部の実施形態において、本開示は、配列番号３９、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される配列のいずれかと、少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示すＺ１１又はＺ９デサチュラーゼを含む組換え微生物を教示する。

【０１４０】

したがって、一部の実施形態において、本開示は、Ｚ１１又はＺ９デサチュラーゼをコードする核酸分子を含む組換え微生物を教示し、ここで、該核酸分子は、配列番号９、１０、１１、１２、１３、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、６８、６９、７０、７１、９４、９６、９８、１００、１０２及び１０４からなる群から選択される配列のいずれか一つと、少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示す。

【０１４１】

一部の態様において、本開示は、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９，１０１，１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼと少なくとも、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼであって、飽和Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$脂肪アシルＣｏＡから対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$脂肪アシルＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む組換え微生物を教示する。

【０１４２】

脂肪アシルレダクターゼ

本開示は、脂肪アシル基質を対応する脂肪アルコール又はアルデヒドに還元する酵素を記載する。

【０１４３】

一部の実施形態では、脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する脂肪アルコールへの変換を触媒

するため脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼが使用される。一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルデヒドへの変換を触媒するため脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼが使用される。脂肪アシルレダクターゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する脂肪アルコールへの還元又は脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルデヒドへの還元を触媒する酵素である。脂肪アシル－ＣｏＡ及び脂肪アシル－ＡＣＰは、Ｒ－（ＣＯ）－Ｓ－$Ｒ_{1}$（式中、Ｒは$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$飽和、不飽和、直鎖状、分枝状又は環状炭化水素であり、及び$Ｒ_{1}$はＣｏＡ又はＡＣＰを表す）の構造を有する。詳細な実施形態では、Ｒは$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$飽和又は不飽和直鎖炭化水素である。「ＣｏＡ」は、脂肪酸の合成及び酸化に関わる非タンパク質アシルキャリアー群である。「ＡＣＰ」は、脂肪酸の合成に用いられる脂肪酸シンターゼのアシルキャリアータンパク質、即ちポリペプチド又はタンパク質サブユニットである。

【０１４４】

従って、一部の実施形態において、本開示は、脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する脂肪アルコールへの還元を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼを提供する。例えば、Ｒ－（ＣＯ）－Ｓ－ＣｏＡは、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈの２つの分子が酸化されてＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$になるとＲ－$ＣＨ_{2}$ＯＨ及びＣｏＡ－ＳＨに変換される。従って、一部のかかる実施形態において、本明細書に記載される組換え微生物は、脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する脂肪アルコールへの還元を触媒する異種脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼを含み得る。例示的実施形態では、本明細書に開示される組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。

【０１４５】

他の実施形態において、本開示は、脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルデヒドへの還元を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼを提供する。例えば、Ｒ－（ＣＯ）－Ｓ－ＡＣＰは、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈの１つの分子が酸化されてＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$になるとＲ－（ＣＯ）－Ｈ及びＡＣＰ－ＳＨに変換される。一部のかかる実施形態において、本明細書に記載される組換え微生物は、脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルデヒドへの還元を触媒する異種脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼを含み得る。例示的実施形態では、本明細書に開示される組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和$Ｃ_{6}$～$Ｃ_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。

【０１４６】

[0200] いくつかの昆虫種では、それぞれのアルコール形成脂肪アシルレダクターゼ（ＦＡＲ）酵素が部位特異的脱リン酸化によって活性化される（Jurenka,R.& Rafaeli,A. Regulatory Role of PBAN in Sex Pheromone Biosynthesis of Helipthine Moths. Front. Endocrinol.(Lausanne). 2:46(2011)；Gilbert,L. I. Insect Endocrinology. (Academic Press)）。いずれか１つの理論によって制限されるものではないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）などの酵母中の異種発現したＦＡＲ酵素のリン酸化が不活性化につながり得、低い脂肪アルコール力価をもたらす。一部の実施形態では、バイオインフォマティクス手法を用いて、ＦＡＲ内のリン酸化残基を予測することができる。セリン及びトレオニン残基のアラニン置換がリン酸化をなくすことが示された（Shi,S.,Chen,Y., Siewers,V.& Nielsen,J. Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1. mBio 5(2014)）。従って、セリン残基のリン酸化を防ぐためのアラニン置換の影響及び脂肪アルコール力価に対するその影響が試験され得る。アラニン置換に加えて、ＦＡＲ活性の改善は、他のアミノ酸置換によっても達成され得る。

【０１４７】

[0201] 一部の実施形態では、宿主微生物におけるその発現時のリン酸化感受性残基の

選択及び改変に基づいてＦＡＲの有益な突然変異を同定するための方法が提供される。好ましい実施形態では、宿主微生物は、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、サッカロマイセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、ハンゼヌラ属（Hansenula）及びクルイベロミセス属（Kluyveromyces）からなる群から選択される酵母である。

【０１４８】

［0202］タンパク質リン酸化部位についての他の参考文献としては、Blom,N.,Gammeltoft,S.& Brunak,S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1. J. Mol. Biol. 294,1351-1362(1999)；Ingrell,C. R.,Miller,M. L.,Jensen,O. N. & Blom,N. NetPhosYeast:prediction of protein phosphorylation sites in yeast. Bioinforma.23:895-897(2007)；Miller,W.T.Tyrosine kinase signaling and the emergence of multicellularity. Biochim. Biophys. Acta 1823,1053-1057(2012)が挙げられ、これらは、それぞれ全体が本明細書に援用される。

【０１４９】

［0203］一部の実施形態では、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）種の生物由来の脂肪アシルレダクターゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１に示されるヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号２に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、配列番号３、３２、４０、７２、７４、７６及び８１から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５５に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号５６に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の配列番号４１及び５７から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）由来の配列番号７３及び８２から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、ミドリムシ（Euglena gracilis）由来の配列番号７５に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）由来の配列番号７７に示されるアミノ酸配列を含む。

【０１５０】

［0204］一部の実施形態では、組換え微生物における不飽和脂肪アルコールの生成は、１つ以上の突然変異体ＦＡＲの発現を含む。特定の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされる野生型オオタバコガ（Helicoverpa amigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼの酵素活性と比べて増加した酵素活性を有する、オオタバコガ（Helicoverpa amigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＨａＦＡＲ）変異体が提供される。一部の実施形態では、増加した酵素活性は、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされるＨａＦＡＲの野生型酵素活性によって生成される脂肪アルコールの量と比べた、生成される脂肪アルコールの量の正味の活性増加である。一部の実施形態では、野生型ＨａＦＡＲは、配列番号９０に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされる野生型ＨａＦＡＲの変異体は、以下の位置：Ｓ６０Ｘ、Ｓ１９５Ｘ、Ｓ２９８Ｘ、Ｓ３７８Ｘ、Ｓ３９４Ｘ、Ｓ４１８Ｘ及びＳ４５３Ｘにおける点突然変異を含み、ここで、Ｘは、Ｆ、Ｌ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｐ、Ｔ、Ａ、Ｙ、Ｋ、Ｈ、Ｎ、Ｑ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、Ｃ、Ｗ及びＲから選択されるアミノ酸を含む。一部の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によっ

てコードされる野生型ＨａＦＡＲの変異体は、以下のアミノ酸位置：Ｓ６０Ｘ、Ｓ１９５Ｘ、Ｓ２９８Ｘ、Ｓ３７８Ｘ、Ｓ３９４Ｘ、Ｓ４１８Ｘ及びＳ４５３Ｘにおける突然変異から選択される点突然変異の組み合わせを含み、ここで、Ｘは、Ｆ、Ｌ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｐ、Ｔ、Ａ、Ｙ、Ｋ、Ｈ、Ｎ、Ｑ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、Ｃ、Ｗ及びＲから選択されるアミノ酸を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号４２～４８から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号８３～８９から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【０１５１】

したがって、一部の実施形態において、本開示は、配列番号４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、５５、５６、５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される配列のいずれかと、少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示す脂肪アシルレダクターゼを含む組換え微生物を教示する。

【０１５２】

したがって、一部の実施形態において、本開示は、脂肪アシルレダクターゼをコードする核酸分子を含む組換え微生物を教示し、ここで、該核酸分子は、配列番号１、２、３、３２、３７、４０、７２、７４、７６、８１、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９及び９０からなる群から選択される配列のいずれかと、少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示す。

【０１５３】

一部の態様において、本開示は、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アシルレダクターゼと少なくとも、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を有し、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$脂肪アシルＣｏＡかを対応する単不飽和又はポリ不飽和Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む組換え微生物を教示する。

【０１５４】

アシル－ＡＣＰシンテターゼ

本開示は、脂肪酸を対応する脂肪アシル－ＡＣＰに結合させる酵素を記載する。

【０１５５】

一部の実施形態では、脂肪酸の、対応する脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するためアシル－ＡＣＰシンテターゼが使用される。アシル－ＡＣＰシンテターゼは、脂肪酸をＡＣＰに結合させて脂肪酸アシル－ＡＣＰを生じさせる能力を有する酵素である。一部の実施形態では、脂肪酸の、対応する脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するためアシル－ＡＣＰシンテターゼが使用されてもよい。一部の実施形態では、アシル－ＡＣＰシンテターゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪酸を基質として利用す

る能力を有するシンテターゼである。１つのかかる実施形態では、本明細書に記載される組換え微生物は、脂肪酸の、対応する脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する異種アシル－ＡＣＰシンテターゼを含み得る。例示的実施形態では、本明細書に開示される組換え微生物は、飽和C_6～C_{24}脂肪酸の、対応する飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。

【０１５６】

脂肪酸シンターゼ複合体

本開示は、脂肪酸における炭素鎖の伸長を触媒する酵素を記載する。

【０１５７】

一部の実施形態では、脂肪酸における炭素鎖の開始及び伸長を触媒するため脂肪酸シンターゼ複合体が使用される。「脂肪酸シンターゼ複合体」は、脂肪酸上の炭素鎖の開始及び伸長を触媒する酵素群を指す。ＡＣＰが脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳ）経路の酵素と共に、生成される脂肪酸の長さ、飽和度、及び分枝形成を調節する。この経路のステップは、脂肪酸生合成（ｆａｂ）及びアセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ（ａｃｃ）遺伝子ファミリーの酵素によって触媒される。所望の生成物に応じて、これらの遺伝子の１つ以上を減弱させ、発現させ、又は過剰発現させることができる。例示的実施形態では、これらの遺伝子の１つ以上が過剰発現する。

【０１５８】

脂肪酸シンターゼの主要なクラスは２つある。Ｉ型（ＦＡＳ　Ｉ）系は単一の大きい多機能性ポリペプチドを利用し、哺乳類及び真菌類の両方に共通している（但しシンターゼの構造配列は真菌類と哺乳類とで異なる）。Ｉ型ＦＡＳ系はまた、ＣＭＮ細菌群（コリネバクテリウム、マイコバクテリア、及びノカルジア）にも見られる。ＩＩ型ＦＡＳ（ＦＡＳ　ＩＩ）は、脂肪酸合成に個別的な単機能酵素を使用することによって特徴付けられ、古細菌及び細菌に見られる。

【０１５９】

ＦＡＳ　Ｉ多酵素ポリペプチド及びＦＡＳ　ＩＩ酵素のドメインは大部分が保存されているため、ＦＡＳ　Ｉ及びＦＡＳ　ＩＩの伸長及び還元機構は実質的に同様である。

【０１６０】

脂肪酸は、一連の脱炭酸性クライゼン縮合反応によってアセチル－ＣｏＡ及びマロニル－ＣｏＡから合成される。この経路のステップは、脂肪酸生合成（ｆａｂ）及びアセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ（ａｃｃ）遺伝子ファミリーの酵素によって触媒される。この経路の説明については、例えば、Heath et al., Prog. Lipid Res. 40:467, 2001（全体として参照により本明細書に援用される）を参照されたい。理論によって制限されるものではないが、細菌では、アセチル－ＣｏＡがアセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ（Ａｃｃ、４つの別個の遺伝子ａｃｃＡＢＣＤによってコードされるマルチサブユニット酵素）によってカルボキシル化されてマロニル－ＣｏＡを形成する。酵母では、アセチル－ＣｏＡが、ＡＣＣ１及びＡＣＣ２によってコードされるアセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼの酵母等価物によってカルボキシル化される。細菌では、マロン酸基がマロニル－ＣｏＡ：ＡＣＰトランスアシラーゼ（ＦａｂＤ）によってＡＣＰに転移してマロニル－ＡＣＰが形成される。酵母では、マロニル－パルミチルトランスフェラーゼドメインがマロニル－ＣｏＡのマロニルをＦＡＳ複合体のＡＣＰドメインに付加する。次に縮合反応が起こり、ここでマロニル－ＡＣＰがアシル－ＣｏＡと合体してβ－ケトアシル－ＡＣＰが生じる。このようにして、炭化水素基質が２炭素伸長する。

【０１６１】

伸長後、β－ケト基がケトレダクターゼ（ＫＲ）、デヒドラターゼ（ＤＨ）、及びエノールレダクターゼ（ＥＲ）の連続作用によって完全飽和炭素鎖に還元される。伸長した脂肪酸鎖はＡＣＰのホスホパンテテイン補欠分子族に共有結合的に結合しつつこれらの活性部位の間を運ばれる。初めに、β－ケトアシル－ＡＣＰがＮＡＤＰＨによって還元されてβ－ヒドロキシアシル－ＡＣＰを形成する。細菌では、このステップはβ－ケトアシル－

ＡＣＰレダクターゼ（ＦａｂＧ）によって触媒される。等価な酵母反応がＦＡＳのケトレダクターゼ（ＫＲ）ドメインによって触媒される。次にβ－ヒドロキシアシル－ＡＣＰが脱水してトランス－２－エノイル－ＡＣＰを形成し、これは、細菌ではβ－ヒドロキシアシル－ＡＣＰデヒドラターゼ／イソメラーゼ（ＦａｂＡ）又はβ－ヒドロキシアシル－ＡＣＰデヒドラターゼ（ＦａｂＺ）のいずれか、又は酵母ではＦＡＳのデヒドラターゼ（ＤＨ）ドメインによって触媒される。細菌におけるＮＡＤＰＨ依存性トランス－２－エノイル－ＡＣＰレダクターゼＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ（それぞれＦａｂｌ、ＦａｂＫ、及びＦａｂＬ）及び酵母におけるＦＡＳのエノールレダクターゼ（ＥＲ）ドメインがトランス－２－エノイル－ＡＣＰを還元すると、アシル－ＡＣＰが形成される。続くサイクルは、β－ケトアシル－ＡＣＰシンターゼＩ又はβ－ケトアシル－ＡＣＰシンターゼＩＩ（細菌ではそれぞれＦａｂＢ及びＦａｂＦ、又は酵母ではβ－ケトアシルシンターゼ（ＫＳ）ドメイン）によるマロニル－ＡＣＰとアシル－ＡＣＰの縮合から開始される。

【０１６２】

一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰから基質と比べて２炭素の伸長を有する対応する脂肪アシル－ＡＣＰへの伸長を触媒するため脂肪酸シンターゼ複合体を使用することができる。

【０１６３】

デヒドロゲナーゼ

本開示は、脂肪アルデヒドの脂肪アルコールへの変換を触媒する酵素を記載する。一部の実施形態では、脂肪アルデヒドの脂肪アルコールへの変換を触媒するためアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ、表３及び表３ａ）が使用される。アルカン代謝活性型生物、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）ＮＲＲＬ　Ｂ－１２４４（Hou et al. 1983）、シュードモナス・ブタノボラ（Pseudomonas butanovora）ＡＴＣＣ　４３６５５（Vangnai and Arp 2001）、及びアシネトバクター属種（Acinetobacter sp.）株Ｍ－１（Tani et al. 2000）から同定された幾つものＡＤＨが、短鎖～中鎖アルキルアルコール（C_2～C_{14}）に対して活性があることを示す。加えて、Sigmaから市販されているＡＤＨ、ウマ肝臓ＡＤＨ及びパン酵母ＡＤＨが、長さC_{10}以上の基質に対する検出可能な活性を有する。より長鎖の脂肪アルコールに対する既報告の活性は、基質の難可溶化の影響を受け得る。Sigmaの酵母ＡＤＨは、C_{12}～C_{14}アルデヒドに対する活性がほとんど乃至全くないことが（Tani et al. 2000）によって観察され、しかしながら、C_{12}及びC_{16}ヒドロキシ－ω－脂肪酸に対する活性は観察されている（Lu et al. 2010）。最近になって、ＬａｄＡヒドロキシラーゼを用いてC_{15}～C_{36}アルカンを分解する生物であるゲオバチルス・サーモデニトリフィカンス（Geobacillus thermodenitrificans）ＮＧ８０－２から２つのＡＤＨが特徴付けられた。両方のＡＤＨにメタノールから１－トリアコンタノール（C_{30}）への活性が検出され、ＡＤＨ２については１－オクタノール及びＡＤＨ１についてはエタノールが好ましい基質であった（Liu et al. 2009）。

【０１６４】

全細胞生物変換におけるＡＤＨの使用は、主にケトンからのキラルアルコールの生成に焦点が置かれている（Ernst et al. 2005）（Schroer et al. 2007）。Schroer et al.は、ラクトバチルス・ブレビス（Lactobacillus brevis）由来のＡＤＨ及びイソプロパノールによる共役補因子再生を用いて、アセト酢酸メチルからの７９７ｇの（Ｒ）－メチル－３ヒドロキシブタノエートの生成（空時収率２９ｇ／Ｌ／ｈ）を報告した（Schroer et al. 2007）。全細胞形質転換における脂肪族アルコール酸化の例が、商業的に入手されたＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）で、ヘキサノールのヘキサナール（Presecki et al. 2012）への及び２－ヘプタノールの２－ヘプタノン（Cappaert and Larroche 2004）への変換について報告されている。

【０１６５】

【表３－１】

表 3. 例示的アルコールデヒドロゲナーゼ酵素

生物	遺伝子名	受託番号
バクトロセラ・オレアエ(Bactrocera oleae) (オリーブミバエ) (ダクス・オレアエ(Dacus oleae))	ADH	Q9NAR7
カプリアビダス・ネカトール(Cupriavidus necator) (アルカリゲネス・ユートロフス(Alcaligenes eutrophus)) (ラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha))	adh	P14940
ドロソフィラ・アディアストラ(Drosophila adiastola) (ミバエ) (イディオミイア・アディアストラ(Idiomyia adiastola))	Adh	Q00669
ドロソフィラ・アフィニディスジュンクタ(Drosophila affinidisjuncta) (ミバエ) (イディオミイア・アフィニディスジュンクタ(Idiomyia affinidisjuncta))	Adh	P21518
ドロソフィラ・アンビグア(Drosophila ambigua) (ミバエ)	Adh	P25139
ドロソフィラ・ボレアリス(Drosophila borealis) (ミバエ)	Adh	P48584
ドロソフィラ・ディフェレンス(Drosophila differens) (ミバエ)	Adh	P22245
ドロソフィラ・エキノキシアリス(Drosophila equinoxialis) (ミバエ)	Adh	Q9NG42
ドロソフィラ・フラボモンタナ(Drosophila flavomontana) (ミバエ)	Adh	P48585

【表３－２】

生物	遺伝子名	受託番号
ドロソフィラ・グアンチェ(Drosophila guanche) (ミバエ)	Adh	Q09009
ドロソフィラ・ハワイエンシス(Drosophila hawaiiensis) (ミバエ)	Adh	P51549
ドロソフィラ・ヘテロニューラ(Drosophila heteroneura) (ミバエ)	Adh	P21898
ドロソフィラ・イミグランス(Drosophila immigrans) (ミバエ)	Adh	Q07588
ドロソフィラ・インスラリス(Drosophila insularis) (ミバエ)	Adh	Q9NG40
ドロソフィラ・レバノネンシス(Drosophila lebanonensis) (ミバエ) (スカプトドロソフィラ・レバノネンシス(Scaptodrosophila lebanonensis))	Adh	P10807
ドロソフィラ・マウリチアナ(Drosophila mauritiana) (ミバエ)	Adh	P07162
ドロソフィラ・マデイレンシス(Drosophila madeirensis) (ミバエ)	Adh	Q09010
ドロソフィラ・ミミカ(Drosophila mimica) (ミバエ) (イディオミイア・ミミカ(Idiomyia mimica))	Adh	Q00671
ドロソフィラ・ニグラ(Drosophila nigra) (ミバエ) (イディオミイア・ニグラ(Idiomyia nigra))	Adh	Q00672
ドロソフィラ・オレナ(Drosophila orena) (ミバエ)	Adh	P07159
ドロソフィラ・シュードオブスクラ・ボゴタナ(Drosophila pseudoobscura bogotana) (ミバエ)	Adh	P84328
ドロソフィラ・ピクチコルニス(Drosophila picticornis) (ミバエ) (イディオミイア・ピクチコルニス(Idiomyia picticornis))	Adh	P23361
ドロソフィラ・プランチビア(Drosophila planitibia) (ミバエ)	Adh	P23277
ドロソフィラ・パウリストルム(Drosophila paulistorum) (ミバエ)	Adh	Q9U8S9
ドロソフィラ・シルベストリス(Drosophila silvestris) (ミバエ)	Adh	P23278
ドロソフィラ・スボブスクラ(Drosophila subobscura) (ミバエ)	Adh	Q03384
ドロソフィラ・テイシエリ(Drosophila teissieri) (ミバエ)	Adh	P28484
ドロソフィラ・ツアカシ(Drosophila tsacasi) (ミバエ)	Adh	P51550
フラガリア・アナナッサ(Fragaria ananassa) (イチゴ)	ADH	P17648
マルス・ドメスチカ(Malus domestica) (リンゴ) (ピルス・マルス(Pyrus malus))	ADH	P48977
スカプトミザ・アルボビッタタ(Scaptomyza albovittata) (ミバエ)	Adh	P25988

【表３－３】

生物	遺伝子名	受託番号
スカプトミザ・クラッシフェミュル(Scaptomyza crassifemur) (ミバエ) (ドロソフィラ・クラッシフェミュル(Drosophila crassifemur))	Adh	Q00670
スルホロブス種(Sulfolobus sp.) (株 RC3)	adh	P50381
ザプリオヌス・ツベルクラツス(Zaprionus tuberculatus) (スバエ)	Adh	P51552
ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(Geobacillus stearothermophilus) (バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus))	adh	P42327
ドロソフィラ・マヤグアナ(Drosophila mayaguana) (ミバエ)	Adh, Adh2	P25721
ドロソフィラ・メラノガステル(Drosophila melanogaster) (ミバエ)	Adh, CG3481	P00334
ドロソフィラ・シュードオブスクラ・シュードオブスクラ(Drosophila pseudoobscura pseudoobscura) (ミバエ)	Adh, GA17214	Q6LCE4
ドロソフィラ・シムランス(Drosophila simulans) (ミバエ)	Adh, GD23968	Q24641
ドロソフィラ・ヤクバ(Drosophila yakuba) (ミバエ)	Adh, GE19037	P26719
ドロソフィラ・アナナッセ(Drosophila ananassae) (ミバエ)	Adh, GF14888	Q50L96
ドロソフィラ・エレクタ(Drosophila erecta) (ミバエ)	Adh, GG25120	P28483
ドロソフィラ・グリムシャウイ(Drosophila grimshawi) (ミバエ) (イディオミイア・グリムシャウイ(Idiomyia grimshawi))	Adh, GH13025	P51551
ドロソフィラ・ウィリストニ(Drosophila willistoni) (ミバエ)	Adh, GK18290	Q05114
ドロソフィラ・ペルシミリス(Drosophila persimilis) (ミバエ)	Adh, GL25993	P37473
ドロソフィラ・セケリア(Drosophila sechellia) (ミバエ)	Adh, GM15656	Q9GN94
カプリアビダス・ネカトール(Cupriavidus necator) (株 ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337) (ラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha))	adh, H16_A0757	Q0KDL6
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 CDC 1551 / Oshkosh)	adh, MT1581	P9WQC2
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 MW2)	adh, MW0568	Q8NXU1
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 ATCC 25618 / H37Rv)	adh, Rv1530	P9WQC3

【表３－４】

生物	遺伝子名	受託番号
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 N315)	adh, SA0562	Q7A742
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株ウシ RF122 / ET3-1)	adh, SAB0557	Q2YSX0
スルホロブス・アシドカルダリウス(Sulfolobus acidocaldarius) (株 ATCC 33909 / DSM 639 / JCM 8929 / NBRC 15157 / NCIMB 11770)	adh, Saci_2057	Q4J781
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 COL)	adh, SACOL0660	Q5HI63
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 NCTC 8325)	adh, SAOUHSC_00608	Q2G0G1
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 MRSA252)	adh, SAR0613	Q6GJ63
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 MSSA476)	adh, SAS0573	Q6GBM4
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 USA300)	adh, SAUSA300_0594	Q2FJ31
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) (株 Mu50 / ATCC 700699)	adh, SAV0605	Q99W07
表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis) (株 ATCC 12228)	adh, SE_0375	Q8CQ56
表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis) (株 ATCC 35984 / RP62A)	adh, SERP0257	Q5HRD6
スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus) (株 ATCC 35092 / DSM 1617 / JCM 11322 / P2)	adh, SSO2536	P39462
スルホロブス・トコダイイ(Sulfolobus tokodaii) (株 DSM 16993 / JCM 10545 / NBRC 100140 / 7)	adh, STK_25770	Q96XE0
アナス・プラチリンコス(Anas platyrhynchos) (アヒル) (アナス・ボシャス(Anas boschas))	ADH1	P30350
アプテリクス・アウストラリス(Apteryx australis) (ブラウンキーウィ)	ADH1	P49645
セラチチス・カピタタ(Ceratitis capitata) (チチュウカイミバエ) (テフリチス・カピタタ(Tephritis capitata))	ADH1	P48814
セラチチス・コシラ(Ceratitis cosyra) (マンゴーミバエ) (トリペタ・コシラ(Trypeta cosyra))	ADH1	Q70UN9

【表３－５】

生物	遺伝子名	受託番号
ガルス(Gallus) (ニワトリ)	ADH1	P23991
コルンバ・リビア(Columba livia) (ドバト)	ADH1	P86883
コツルニクス・ジャポニカ(Coturnix japonica) (ウズラ) (コツルニクス・ジャポニカ(Coturnix japonica))	ADH1	P19631
ドロソフィラ・ヒデイ(Drosophila hydei) (ミバエ)	Adh1	P23236
ドロソフィラ・モンタナ(Drosophila montana) (ミバエ)	Adh1	P48586
ドロソフィラ・メットレリ(Drosophila mettleri) (ミバエ)	Adh1	P22246
ドロソフィラ・ミュレリ(Drosophila mulleri) (ミバエ)	Adh1	P07161
ドロソフィラ・ナボホア(Drosophila navojoa) (ミバエ)	Adh1	P12854
ゲオミス・アトワテリ(Geomys attwateri) (アトウォーターホリネズミ) (ゲオミス・ブルサリウス・アトワテリ(Geomys bursarius attwateri))	ADH1	Q9Z2M2
ゲオミス・ブルサリウス(Geomys bursarius) (プレーンズホリネズミ)	ADH1	Q64413
ゲオミス・ノックスジョネシ(Geomys knoxjonesi) (ノックス・ジョンホリネズミ)	ADH1	Q64415
ホルデウム・ブルガレ(Hordeum vulgare) (オオムギ)	ADH1	P05336
クルイベロミセス・マルクシアヌス(Kluyveromyces marxianus) (酵母) (カンジダ・ケフィール(Candida kefyr))	ADH1	Q07288
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)	ADH1	P00333
メソクリセタス・アウラタス(Mesocricetus auratus) (ゴールデンハムスター)	ADH1	P86885
ペニセタム・アメリカヌム(Pennisetum americanum) (トウジンビエ) (ペニセタム・グラウクム(Pennisetum glaucum))	ADH1	P14219
ペチュニア・ヒブリダ(Petunia hybrida) (ペチュニア)	ADH1	P25141
オリクトラグス・クニクルス(Oryctolagus cuniculus) (ウサギ)	ADH1	Q03505
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	ADH1	P14673
ストルチオ・カメルス(Struthio camelus) (ダチョウ)	ADH1	P80338

【表３－６】

生物	遺伝子名	受託番号
トリフォリウム・レペンス(Trifolium repens) (シロツメクサ)	ADH1	P13603
ゼア・ルクスリアンス(Zea luxurians) (グアテマラブタモロコシ) (ユークレナ・ルクスリアンス(Euchlaena luxurians))	ADH1	Q07264
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 ATCC 204508 / S288c) (パン酵母)	ADH1, ADC1, YOL086C, O0947	P00330
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	ADH1, ADH, At1g77120, F22K20.19	P06525
シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) (株 972 / ATCC 24843) (分裂酵母)	adh1, adh, SPCC13B11.01	P00332
ドロソフィラ・ラシコラ(Drosophila lacicola) (ミバエ)	Adh1, Adh-1	Q27404
ムス・ムスクルス(Mus musculus) (マウス)	Adh1, Adh-1	P00329
ペロミスカス・マニクラツス(Peromyscus maniculatus) (シカシロアシネズミ)	ADH1, ADH-1	P41680
ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus) (ラット)	Adh1, Adh-1	P06757
ドロソフィラ・ビリリス(Drosophila virilis) (ミバエ)	Adh1, Adh-1, GJ18208	B4M8Y0
シェフェルソミセス・スチピチス(Scheffersomyces stipitis) (株 ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) (酵母) (ピキア・スチピチス(Pichia stipitis))	ADH1, ADH2, PICST_68558	O00097
黄色コウジ菌(Aspergillus flavus) (株 ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167)	adh1, AFLA_048690	P41747
アカパンカビ(Neurospora crassa) (株 ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	adh-1, B17C10.210, NCU01754	Q9P6C8
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans) (酵母)	ADH1, CAD	P43067
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	ADH1, DUPR11.3, Os11g0210300, LOC_Os11g10480, OsJ_032001	Q2R8Z5

【表３－７】

生物	遺伝子名	受託番号
ドロソフィラ・モハベンシス(Drosophila mojavensis) (ミバエ)	Adh1, GI17644	P09370
クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis) (株 ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) (酵母) (カンジダ・スフェリカ(Candida sphaerica))	ADH1, KLLA0F21010g	P20369
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	ADH1, OsI_034290	Q75ZX4
ポンゴ・アベリイ(Pongo abelii) (スマトラオランウータン) (ポンゴ・ピグマエウス・アベリイ(Pongo pygmaeus abelii))	ADH1A	Q5RBP7
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH1A, ADH1	P07327
マカカ・ムラッタ(Macaca mulatta) (アカゲザル)	ADH1A, ADH1	P28469
パン・トログロディテス(Pan troglodytes) チンパンジー)	ADH1B	Q5R1W2
パピオ・ハマドリアス(Papio hamadryas) (マントヒヒ)	ADH1B	P14139
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH1B, ADH2	P00325
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH1C, ADH3	P00326
パピオ・ハマドリアス(Papio hamadryas) (マントヒヒ)	ADH1C, ADH3	O97959
セラチチス・カピタタ(Ceratitis capitata) (チチュウカイミバエ) (テフリチス・カピタタ(Tephritis capitata))	ADH2	P48815
セラチチス・コシラ(Ceratitis cosyra) (マンゴーミバエ) (トリペタ・コシラ(Trypeta cosyra))	ADH2	Q70UP5
セラチチス・ロサ(Ceratitis rosa) (ナタールミバエ) (プテランドルス・ロサ(Pterandrus rosa))	ADH2	Q70UP6
ドロソフィラ・アリゾナエ(Drosophila arizonae) (ミバエ)	Adh2	P27581
ドロソフィラ・ブッザチイ(Drosophila buzzatii) (ミバエ)	Adh2	P25720
ドロソフィラ・ヒデイ(Drosophila hydei) (ミバエ)	Adh2	P23237
ドロソフィラ・モンタナ(Drosophila montana) (ミバエ)	Adh2	P48587
ドロソフィラ・ミュレリ(Drosophila mulleri) (ミバエ)	Adh2	P07160

【表３－８】

生物	遺伝子名	受託番号
ドロソフィラ・ホイーレリ(Drosophila wheeleri) (ミバエ)	Adh2	P24267
エントアメーバ・ヒストリチカ(Entamoeba histolytica)	ADH2	Q24803
ホルデウム・ブルガレ(Hordeum vulgare) (オオムギ)	ADH2	P10847
クルイベロミセス・マルクシアヌス(Kluyveromyces marxianus) (酵母) (カンジダ・ケフィール(Candida kefyr))	ADH2	Q9P4C2
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)	ADH2	P04707
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	ADH2	Q4R1E8
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))	ADH2	P28032
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	ADH2	P14674
シェフェルソミセス・スチピチス(Scheffersomyces stipitis) (株 ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) (酵母) (ピキア・スチピチス(Pichia stipitis))	ADH2, ADH1, PICST_27980	O13309
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	ADH2, ADHIII, FDH1, At5g43940, MRH10.4	Q96533
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 ATCC 204508 / S288c) (パン酵母)	ADH2, ADR2, YMR303C, YM9952.05C	P00331
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans) (株 SC5314 / ATCC MYA-2876) (酵母)	ADH2, Ca41C10.04, CaO19.12579, CaO19.5113	O94038
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	ADH2, DUPR11.1, Os11g0210500, LOC_Os11g10510	Q0ITW7
ドロソフィラ・モハベンシス(Drosophila mojavensis) (ミバエ)	Adh2, GI17643	P09369
クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis) (株 ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) (酵母) (カンジダ・スフェリカ(Candida sphaerica))	ADH2, KLLA0F18260g	P49383

【表３－９】

生物	遺伝子名	受託番号
オリクトラグス・クニクルス(Oryctolagus cuniculus) (ウサギ)	ADH2-1	O46649
オリクトラグス・クニクルス(Oryctolagus cuniculus) (ウサギ)	ADH2-2	O46650
ホルデウム・ブルガレ(Hordeum vulgare) (オオムギ)	ADH3	P10848
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	ADH3	P14675
クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis) (株 ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) (酵母) (カンジダ・スフェリカ(Candida sphaerica))	ADH3, KLLA0B09064g	P49384
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 ATCC 204508 / S288c) (パン酵母)	ADH3, YMR083W, YM9582.08	P07246
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH4	P08319
ムス・ムスクルス(Mus musculus) (マウス)	Adh4	Q9QYY9
ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus) (ラット)	Adh4	Q64563
ストルチオ・カメルス(Struthio camelus) (ダチョウ)	ADH4	P80468
クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis) (株 ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) (酵母) (カンジダ・スフェリカ(Candida sphaerica))	ADH4, KLLA0F13530g	P49385
シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) (株 972 / ATCC 24843) (分裂酵母)	adh4, SPAC5H10.06c	Q09669
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 YJM789) (パン酵母)	ADH4, ZRG5, SCY_1818	A6ZTT5
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 ATCC 204508 / S288c) (パン酵母)	ADH4, ZRG5, YGL256W, NRC465	P10127
サッカロミセス・パストリアヌス(Saccharomyces pastorianus) (ラガー酵母) (サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) x サッカロミセス・ユーバヤヌス(Saccharomyces eubayanus))	ADH5	Q6XQ67
ボス・タウルス(Bos taurus) (ウシ)	ADH5	Q3ZC42

【表３－１０】

生物	遺伝子名	受託番号
エクウス・カバルス(Equus caballus) (ウマ)	ADH5	P19854
ムス・ムスクルス(Mus musculus) (マウス)	Adh5, Adh-2, Adh2	P28474
ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus) (ラット)	Adh5, Adh-2, Adh2	P12711
オリクトラグス・クニクルス(Oryctolagus cuniculus) (ウサギ)	ADH5, ADH3	O19053
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH5, ADHX, FDH	P11766
ディクチオステリウム・ディスコイデウム(Dictyostelium discoideum) (粘菌)	adh5, DDB_G0281865	Q54TC2
サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) (株 ATCC 204508 / S288c) (パン酵母)	ADH5, YBR145W, YBR1122	P38113
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH6	P28332
ペロミスカス・マニクラツス(Peromyscus maniculatus) (シカシロアシネズミ)	ADH6	P41681
ポンゴ・アベリイ(Pongo abelii) (スマトラオランウータン) (ポンゴ・ピグマエウス・アベリイ(Pongo pygmaeus abelii))	ADH6	Q5R7Z8
ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus) (ラット)	Adh6	Q5XI95
ホモ・サピエンス(Homo sapiens) (ヒト)	ADH7	P40394
ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus) (ラット)	Adh7	P41682
ムス・ムスクルス(Mus musculus) (マウス)	Adh7, Adh-3, Adh3	Q64437
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 CDC 1551 / Oshkosh)	adhA, MT1911	P9WQC0
リゾビウム・メリロティ(Rhizobium meliloti) (株 1021) (エンシフェル・メリロティ(Ensifer meliloti)) (シノリゾビウム・メリロティ (Sinorhizobium meliloti))	adhA, RA0704, SMa1296	O31186
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 ATCC 25618 / H37Rv)	adhA, Rv1862	P9WQC1
ザイモモナス・モビリス亜種モビリス(Zymomonas mobilis subsp. mobilis) (株 ATCC 31821 / ZM4 / CP4)	adhA, ZMO1236	P20368
ウシ型結核菌(Mycobacterium bovis) (株 ATCC BAA-935 / AF2122/97)	adhB, Mb0784c	Q7U1B9

【表３－１１】

生物	遺伝子名	受託番号
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 CDC 1551 / Oshkosh)	adhB, MT0786	P9WQC6
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 ATCC 25618 / H37Rv)	adhB, Rv0761c, MTCY369.06c	P9WQC7
ザイモモナス・モビリス亜種モビリス(Zymomonas mobilis subsp. mobilis) (株 ATCC 31821 / ZM4 / CP4)	adhB, ZMO1596	P0DJA2
ザイモモナス・モビリス亜種モビリス(Zymomonas mobilis subsp. mobilis) (株 ATCC 10988 / DSM 424 / LMG 404 / NCIMB 8938 / NRRL B-806 / ZM1)	adhB, Zmob_1541	F8DVL8
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 CDC 1551 / Oshkosh)	adhD, MT3171	P9WQB8
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 ATCC 25618 / H37Rv)	adhD, Rv3086	P9WQB9
クロストリジウム・アセトブチリカム(Clostridium acetobutylicum) (株 ATCC 824 / DSM 792 / JCM 1419 / LMG 5710 / VKM B-1787)	adhE, aad, CA_P0162	P33744
大腸菌(Escherichia coli) (株 K12)	adhE, ana, b1241, JW1228	P0A9Q7
大腸菌(Escherichia coli) O157:H7	adhE, Z2016, ECs1741	P0A9Q8
ロドバクター・スフェロイデス(Rhodobacter sphaeroides) (株 ATCC 17023 / 2.4.1 / NCIB 8253 / DSM 158)	adhI, RHOS4_11650, RSP_2576	P72324
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	ADHIII, OsI_009236	A2XAZ3
大腸菌(Escherichia coli) (株 K12)	adhP, yddN, b1478, JW1474	P39451
ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(Geobacillus stearothermophilus) (バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus))	adhT	P12311
エメリセラ・ニデュランス(Emericella nidulans) (株 FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (アスペルギルス・ニデュランス(Aspergillus nidulans))	alcA, AN8979	P08843

【表３－１２】

生物	遺伝子名	受託番号
エメリセラ・ニデュランス(Emericella nidulans) (株 FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (アスペルギルス・ニデュランス(Aspergillus nidulans))	alc, AN3741	P54202
エメリセラ・ニデュランス(Emericella nidulans) (株 FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (アスペルギルス・ニデュランス(Aspergillus nidulans))	alcC, adh3, AN2286	P07754
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At1g22430, F12K8.22	Q9SK86
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At1g22440, F12K8.21	Q9SK87
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At1g32780, F6N18.16	A1L4Y2
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At1g64710, F13O11.3	Q8VZ49
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At4g22110, F1N20.210	Q0V7W6
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At5g24760, T4C12_30	Q8LEB2
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	At5g42250, K5J14.5	Q9FH04
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)	FDH	P93629
ドロソフィラ・メラノガステル(Drosophila melanogaster) (ミバエ)	Fdh, gfd, ODH, CG6598	P46415
枯草菌(Bacillus subtilis) (株 168)	gbsB, BSU31050	P71017
カエノラブディティス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)	H24K24.3	Q17335
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ (Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	Os02g0815500, LOC_Os02g57040, OsJ_008550, P0643F09.4	Q0DWH1

【表３－１３】

生物	遺伝子名	受託番号
結核菌(Mycobacterium tuberculosis) (株 ATCC 25618 / H37Rv)	Rv1895	O07737
カエノラブディティス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)	sodh-1, K12G11.3	Q17334
カエノラブディティス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)	sodh-2, K12G11.4	O45687
シュードモナス属種(Pseudomonas sp.)	terPD	P33010
大腸菌(Escherichia coli) (株 K12)	yiaY, b3589, JW5648	P37686
モラクセラ属種(Moraxella sp.) (株 TAE123)		P81786
アリガトル・ミシシッピエンシス(Alligator mississippiensis) (アメリカアリゲーター)		P80222
カタランタス・ロゼウス(Catharanthus roseus) (ニチニチソウ) (ビンカ・ロゼア(Vinca rosea))		P85440
ガダス・モルア亜種カラリアス(Gadus morhua subsp. callarias) (タイセイヨウダラ) (ガダス・カラリアス(Gadus callarias))		P26325
ナジャ・ナジャ(Naja) (インドコブラ)		P80512
ピスム・サティブム(Pisum sativum) (エンドウ)		P12886
ペロフィラクス・ペレジ(Pelophylax perezi) (ペレスワライガエル) (ラナ・ペレジ(Rana perezi))		P22797
サアラ・ハードウイッキイ(Saara hardwickii) (インドトゲオアガマ) (ウロマスチクス・ハードウイッキイ(Uromastyx hardwickii))		P25405
サアラ・ハードウイッキイ(Saara hardwickii) (インドトゲオアガマ) (ウロマスチクス・ハードウイッキイ(Uromastyx hardwickii))		P25406
エクウス・カバルス(Equus caballus) (ウマ)		P00327
エクウス・カバルス(Equus caballus) (ウマ)		P00328
ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(Geobacillus stearothermophilus) (バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus))		P42328
ガダス・モルア(Gadus morhua) (タイセイヨウダラ)		P81600
ガダス・モルア(Gadus morhua) (タイセイヨウダラ)		P81601

【表３－１４】

生物	遺伝子名	受託番号
ミクシネ・グルチノサ(Myxine glutinosa) (メクラウナギ)		P80360
オクトプス・ブルガリス(Octopus vulgaris) (マダコ)		P81431
ピスム・サティブム(Pisum sativum) (エンドウ)		P80572
サアラ・ハードウイッキイ(Saara hardwickii) (インドトゲオアガマ) (ウロマスチクス・ハードウイッキイ(Uromastyx hardwickii))		P80467
スキリオリヌス・カニクラ(Scyliorhinus canicula) (ハナカケトラザメ) (スクアルス・カニクラ(Squalus canicula))		P86884
スパルス・アウラタ(Sparus aurata) (ヨーロッパヘダイ)		P79896

【０１６６】
【表３－１５】

表 3a. 更なる例示的アルコールデヒドロゲナーゼ酵素

生物	受託番号
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2K7
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2W6
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	AKD01723.1
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q4H2
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q1E8
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2K3
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q4H7
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2J9
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q0W0
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q0V0
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q1F1
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2X2
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q4I2
オオタバコガ(Helicoverpa armigera)	A0A0F6Q2X0

【表３－１６】

生物	受託番号
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2L9
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q4K1
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q4J7
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2Y5
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2Y1
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q1G6
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2Y9
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q0X5
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2M3
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2L1
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q1F9
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q0W6
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q1G9
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2L4
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q2X6

【０１６７】
【表３－１７】

生物	受託番号
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q1H3
タバコガ(Helicoverpa assulta)	A0A0F6Q0X1
カイコガ(Bombyx mori)	NP_001188510.1
ネッタイシマカ(Aedes aegypti)	XP_001655103.1
アノフェレス・ダルリンギ (Anopheles darlingi)	ETN64198.1
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	YALI0F09603g (FADH), YALI0D25630g (ADH1), YALI0E17787g (ADH2), YALI0A16379g (ADH3), YALI0E15818g (ADH4), YALI0D02167g (ADH5), YALI0A15147g (ADH6), YALI0E07766g (ADH7)

【０１６８】
一部の実施形態において、本開示は、ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０

２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群より選択される一つ以上の内在性（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異、及び又は低下を含む組換え微生物を教示する。

【０１６９】

したがって、一部の実施形態において、本開示の組換え微生物は、ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）及びＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）によってコードされるタンパク質と、少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子の欠失又は他の破壊を含む。

【０１７０】

したがって、一部の実施形態において、本開示の組換え微生物は、ｕｎｉｐｒｏｔデータベースＩＤ　Ｑ６Ｃ２９７（ＦＡＤＨ）、Ｑ６Ｃ７Ｔ０（ＡＤＨ１）、Ｆ２Ｚ６７８（ＡＤＨ２）、Ｑ６ＣＧＴ５（ＡＤＨ３）、Ｑ６Ｃ５Ｒ５（ＡＤＨ４）、Ｑ６ＣＡＴ５（ＡＤＨ５）、Ｑ６ＣＧＸ５（ＡＤＨ６）及びＱ６Ｃ７Ｋ３（ＡＤＨ７）と、少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失を含む。

【０１７１】

アルコールオキシダーゼ

本開示は、脂肪アルコールを脂肪アルデヒドに酸化する酵素を記載する。

【０１７２】

一部の実施形態では、脂肪アルコールの脂肪アルデヒドへの変換を触媒するためアルコールオキシダーゼ（ＡＯＸ）が使用される。アルコールオキシダーゼは、分子酸素の使用による副生成物としての過酸化水素の形成を介した電子移動により、アルコールの、対応するアルデヒド（又はケトン）への変換を触媒する。ＡＯＸ酵素はフラビンアデニンジヌクレオチド（ＦＡＤ）を必須補因子として利用し、反応媒体中の酸素を用いて再生する。カタラーゼ酵素をＡＯＸにカップリングすると、水及び酸素への触媒変換による過酸化水素の蓄積を回避し得る。

【０１７３】

ＡＯＸは、基質特異性に基づき４種類：（ａ）短鎖アルコールオキシダーゼ、（ｂ）長鎖アルコールオキシダーゼ、（ｃ）芳香族アルコールオキシダーゼ、及び（ｄ）第二級アルコールオキシダーゼに分類することができる（Goswami et al. 2013）。所望の基質の鎖長に応じて、これらの４種類のうちのあるメンバーが評価候補として他のメンバーより好適である。

【０１７４】

短鎖アルコールオキシダーゼ（限定はされないが、現在ＥＣ　１．１．３．１３に分類されているものを含む、表４）は、Ｃ１～Ｃ８炭素の範囲の低鎖長アルコール基質の酸化を触媒する（van der Klei et al. 1991）（Ozimek et al. 2005）。カンジダ・ボイジニ（Candida boidinii）及びコマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）（旧ピキア・パストリス（Pichia pastoris））などのメチロトローフ酵母由来の脂肪族アルコールオキシダーゼは、第一級アルカノールの、対応するアルデヒドへの酸化を触媒し、非分枝状短鎖脂肪族アルコーを選好する。最も広い基質特異性が、プロパルギルアルコール、２－クロロエタノール、２－シアノエタノールを含め、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）由来のアルコールオキシダーゼに認められる（Dienys et al. 2003）。アルコール酸化で直面する主な課題は、アルデヒド生成物の高い反応性である。２つの液相系（水／溶媒）を利用することにより、アルデヒド生成物が酸に更に変換される前に反応相からアルデヒド生成物をインサイチュで除去することができる。例えば、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）アルコールオキシダーゼをウシ肝臓カタラーゼと組み合わせ

て用いたヘキサノールからのヘキサナール生成が、水相中の安定アルコールオキシダーゼの存在を利用することにより二相系において達成された（Karra-Chaabouni et al. 2003）。例えば、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）由来のアルコールオキシダーゼは、二相性有機反応系を用いたとき、Ｃ６の脂肪族アルコールをＣ１１に酸化させることが可能であった（Murray and Duff 1990）。（Karra-Chaabouni et al. 2003）及び（Murray and Duff 1990）による二相系におけるアルコールオキシダーゼの使用方法は、全体として参照により援用される。

【０１７５】

長鎖アルコールオキシダーゼ（限定はされないが、現在ＥＣ　１．１．３．２０に分類されているものを含む；表５）には、炭素鎖長が６より大きいアルコール基質を酸化させる脂肪アルコールオキシダーゼ、長鎖脂肪酸オキシダーゼ、及び長鎖脂肪アルコールオキシダーゼが含まれる（Goswami et al. 2013）。Banthorpe et al.は、ヨモギギク（Tanacetum vulgare）の葉から精製された長鎖アルコールオキシダーゼを報告し、これはヘキサ－トランス－２－エン－１－オール及びオクタン－１－オールを含めた飽和及び不飽和長鎖アルコール基質を酸化させることが可能であった（Banthorpe 1976）（Cardemil 1978）。ホホバ（Simmondsia chinensis）（Moreau, R.A., Huang 1979）、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）（Cheng et al. 2004）、及びミヤコグサ（Lotus japonicas）（Zhao et al. 2008）を含めた他の植物種も長鎖アルコールオキシダーゼの供給源として報告されている。脂肪アルコールオキシダーゼは主に酵母種から報告されており（Hommel and Ratledge 1990）（Vanhanen et al. 2000）（Hommel et al. 1994）（Kemp et al. 1990）、これらの酵素は長鎖脂肪酸代謝において重要な役割を果たす（Cheng et al. 2005）。長鎖アルカン及び脂肪酸を分解し及びそこで成長する酵母種由来の脂肪アルコールオキシダーゼは、脂肪アルコールの酸化を触媒する。カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来の脂肪アルコールオキシダーゼがミクロソーム細胞画分として単離され、様々な基質について特徴付けられている（Eirich et al. 2004）（Kemp et al. 1988）（Kemp et al. 1991）（Mauersberger et al. 1992）。長さC_8～C_{16}の第一級アルコールについて有意な活性が観察され、報告されているK_Mは１０～５０μＭの範囲である（Eirich et al. 2004）。記載されるアルコールオキシダーゼは、例えば、全細胞カンジダ・ボイジニ（Candida boidinii）（Gabelman and Luzio 1997）、及びピキア・パストリス（Pichia pastoris）（Duff and Murray 1988）（Murray and Duff 1990）について記載されるとおり中鎖脂肪族アルコールのアルデヒドへの変換に使用し得る。炭化水素基質上で成長する間に糸状菌類由来の長鎖アルコールオキシダーゼが生成された（Kumar and Goswami 2006）（Savitha and Ratledge 1991）。ミヤコグサ（Lotus japonicas）由来の長鎖脂肪アルコールオキシダーゼ（ＬｊＦＡＯ１）が大腸菌（E. coli）で異種発現しており、１－ドデカノール及び１－ヘキサデカノールを含めたアルコール酸化に対する広い基質特異性を呈している（Zhao et al. 2008）。

【０１７６】

【表４－１】

表 4. 短鎖アルコール類を酸化させる能力を有するアルコールオキシダーゼ酵素 (EC 1.1.3.13)

生物	遺伝子名	受託番号
コマガタエラ・パストリス(Komagataella pastoris) (株 ATCC 76273 / CBS 7435 / CECT 11047 / NRRL Y-11430 / Wegner 21-1) (酵母) (ピキア・パストリス (Pichia pastoris))	AOX1 PP7435_Chr4-0130	F2QY27
コマガタエラ・パストリス(Komagataella pastoris) (株 GS115 / ATCC 20864) (酵母) (ピキア・パストリス (Pichia pastoris))	AOX1 PAS_chr4_0821	P04842
コマガタエラ・パストリス(Komagataella pastoris) (株 ATCC 76273 / CBS 7435 / CECT 11047 / NRRL Y-11430 / Wegner 21-1) (酵母) (ピキア・パストリス (Pichia pastoris))	AOX2 PP7435_Chr4-0863	F2R038
コマガタエラ・パストリス(Komagataella pastoris) (株 GS115 / ATCC 20864) (酵母) (ピキア・パストリス (Pichia pastoris))	AOX2 PAS_chr4_0152	C4R702

【表４－２】

生物	遺伝子名	受託番号
カンジダ・ボイジニ(Candida boidinii) (酵母)	AOD1	Q00922
ピキア・アングスタ(Pichia angusta) (酵母) (ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha))	MOX	P04841
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_10802	M5CC52
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	MOX BN14_12214	M5CF32
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_10691	M5CAV1
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_09479	M5C7F4
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_10803	M5CB66
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_09900	M5C9N9
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_08302	M5C2L8
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	MOX BN14_09408	M5C784
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	MOX BN14_09478	M5C8F8
タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris) (株 AG1-IB / 分離株 7/3/14) (レタスそ枯病菌) (リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))	AOD1 BN14_11356	M5CH40

【表４－３】

生物	遺伝子名	受託番号
オガタエア・ヘンリシイ(Ogataea henricii)	AOD1	A5LGF0
カンジダ・メタノソルボサ(Candida methanosorbosa)	AOD1	A5LGE5
カンジダ・メタノロベセンス(Candida methanolovescens)	AOD1	A5LGE4
カンジダ・スクシフィラ(Candida succiphila)	AOD1	A5LGE6
アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger) (株 CBS 513.88 / FGSC A1513)	An15g02200	A2R501
アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger) (株 CBS 513.88 / FGSC A1513)	An18g05480	A2RB46
モニリオフトラ・ペルニシオサ(Moniliophthora perniciosa) (てんぐ巣病菌) (マラスミウス・ペルニシオスス(Marasmius perniciosus))		I7CMK2
カンジダ・カリオシリグニコラ(Candida cariosilignicola)	AOD1	A5LGE3
カンジダ・ピグナリエ(Candida pignaliae)	AOD1	A5LGE1
カンジダ・ピグナリエ(Candida pignaliae)	AOD2	A5LGE2
カンジダ・ソノレンシス(Candida sonorensis)	AOD1	A5LGD9
カンジダ・ソノレンシス(Candida sonorensis)	AOD2	A5LGE0
ピキア・ナガニシイ(Pichia naganishii)	AOD1	A5LGF2
オガタエア・ミヌタ(Ogataea minuta)	AOD1	A5LGF1
オガタエア・フィロデンドラ(Ogataea philodendra)	AOD1	A5LGF3
オガタエア・ウィッケルハミイ(Ogataea wickerhamii)	AOD1	A5LGE8
クライシア・カプスラテ(Kuraishia capsulate)	AOD1	A5LGE7
タラロミセス・スチピタツス(Talaromyces stipitatus) (株 ATCC 10500 / CBS 375.48 / QM 6759 / NRRL 1006) (ペニシリウム・スチピタツム (Penicillium stipitatum))	TSTA_021940	B8MHF8
タラロミセス・スチピタツス(Talaromyces stipitatus) (株 ATCC 10500 / CBS 375.48 / QM 6759 / NRRL 1006) (ペニシリウム・スチピタツム (Penicillium stipitatum))	TSTA_065150	B8LTH7

【表４－４】

生物	遺伝子名	受託番号
タラロミセス・スチピタツス(Talaromyces stipitatus) (株 ATCC 10500 / CBS 375.48 / QM 6759 / NRRL 1006) (ペニシリウム・スチピタツム (Penicillium stipitatum))	TSTA_065150	B8LTH8
タラロミセス・スチピタツス(Talaromyces stipitatus) (株 ATCC 10500 / CBS 375.48 / QM 6759 / NRRL 1006) (ペニシリウム・スチピタツム (Penicillium stipitatum))	TSTA_000410	B8MSB1
オガタエア・グルコジマ(Ogataea glucozyma)	AOD1	A5LGE9
オガタエア・パラポリモルファ(Ogataea parapolymorpha) (株 DL-1 / ATCC 26012 / NRRL Y-7560) (酵母) (ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha))	HPODL_03886	W1QCJ3
グロエオフィラム・トラベウム(Gloeophyllum trabeum) (褐色腐敗病菌)	AOX	A8DPS4
ピキア・アングスタ(Pichia angusta) (酵母) (ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha))	mox1	A6PZG8
ピキア・トレハロフィラ(Pichia trehalophila)	AOD1	A5LGF4
ピキア・アングスタ(Pichia angusta) (酵母) (ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha))	mox1	A6PZG9
ピキア・アングスタ(Pichia angusta) (酵母) (ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha))	mox1	A6PZG7
イクソデス・スカプラリス(Ixodes scapularis) (クロアシマダニ) (シカダニ)	IscW_ISCW017898	B7PIZ7

【表４－５】

表 5. 脂肪アルコール類を含めた長鎖アルコール類を酸化させる能力を有するアルコールオキシダーゼ酵素(EC 1.1.3.20)

生物	遺伝子名	受託番号
ロツス・ジャポニクス(Lotus japonicus) (ロツス・コルニクラツス変種ジャポニクス(Lotus corniculatus var. japonicus))	FAO1	B5WWZ8
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	FAO1 At1g03990 F21M11.7	Q9ZWB9
ロツス・ジャポニクス(Lotus japonicus) (ロツス・コルニクラツス変種ジャポニクス(Lotus corniculatus var. japonicus))	FAO2	B5WWZ9

【表４－６】

生物	遺伝子名	受託番号
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	FAO3 At3g23410 MLM24.14 MLM24.23	Q9LW56
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	FAO4A At4g19380 T5K18.160	O65709
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)	FAO4B At4g28570 T5F17.20	Q94BP3
ミクロボトリウム・ビオラセウム(Microbotryum violaceum) (株 p1A1 Lamole) (葯黒穂病菌) (ウスチラゴ・ビオラセア(Ustilago violacea))	MVLG_06864	U5HIL4
アジェロミセス・デルマチチディス(Ajellomyces dermatitidis) ATCC 26199	BDFG_03507	T5BNQ0
ジベレラ・ゼアエ(Gibberella zeae) (株 PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 31084) (コムギ赤かび病菌) (フザリウム・グラミネアルム(Fusarium graminearum))	FG06918.1 FGSG_06918	I1RS14
ピキア・ソルビトフィラ(Pichia sorbitophila) (株 ATCC MYA-4447 / BCRC 22081 / CBS 7064 / NBRC 10061 / NRRL Y-12695) (雑種酵母)	Piso0_004410 GNLVRS01_PISO0K16268g GNLVRS01_PISO0L16269g	G8Y5E1
エメリセラ・ニデュランス(Emericella nidulans) (株 FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) (アスペルギルス・ニデュランス(Aspergillus nidulans))	AN0623.2 ANIA_00623	Q5BFQ7
ピレノフォラ・トリチシ-レペンチス(Pyrenophora tritici-repentis) (株 Pt-1C-BFP) (コムギ黄斑病菌) (ドレシュレラ・トリチシ-レペンチス (Drechslera tritici-repentis))	PTRG_10154	B2WJW5
パラコクシジオイデス・ルツィイ (Paracoccidioides lutzii) (株 ATCC MYA-826 / Pb01) (パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス(Paracoccidioides brasiliensis))	PAAG_09117	C1HEC6
カンジダ・パラプシローシス(Candida parapsilosis) (株 CDC 317 / ATCC MYA-4646) (酵母) (モニリア・パラプシローシス (Monilia parapsilosis))	CPAR2_204420	G8BG15

【表４－７】

生物	遺伝子名	受託番号
シュードジマ・ブラジリエンシス(Pseudozyma brasiliensis) (株 GHG001) (酵母)	PSEUBRA_SCAF2g03010	V5GPS6
カンジダ・パラプシローシス(Candida parapsilosis) (株 CDC 317 / ATCC MYA-4646) (酵母) (モニリア・パラプシローシス (Monilia parapsilosis))	CPAR2_204430	G8BG16
スクレロチニア・ボレアリス(Sclerotinia borealis) F-4157	SBOR_5750	W9CDE2
ソルダリア・マクロスポラ(Sordaria macrospora) (株 ATCC MYA-333 / DSM 997 / K(L3346) / K-hell)	SMAC_06361	F7W6K4
ソルダリア・マクロスポラ(Sordaria macrospora) (株 ATCC MYA-333 / DSM 997 / K(L3346) / K-hell)	SMAC_01933	F7VSA1
メイエロジマ・グイリエルモンディイ (Meyerozyma guilliermondii) (株 ATCC 6260 / CBS 566 / DSM 6381 / JCM 1539 / NBRC 10279 / NRRL Y-324) (酵母) (カンジダ・グイリエルモンディイ(Candida guilliermondii))	PGUG_03467	A5DJL6
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) CBS 202.88	H107_00669	A0A023ATC5
アルトロボトリス・オリゴスポラ(Arthrobotrys oligospora) (株 ATCC 24927 / CBS 115.81 / DSM 1491) (線虫捕捉菌) (ディディモゾオファガ・オリゴスポラ(Didymozoophaga oligospora))	AOL_s00097g516	G1XJI9
シェフェルソミセス・スチピチス (Scheffersomyces stipitis) (株 ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) (酵母) (ピキア・スチピチス(Pichia stipitis))	FAO1 PICST_90828	A3LYX9
シェフェルソミセス・スチピチス (Scheffersomyces stipitis) (株 ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) (酵母) (ピキア・スチピチス(Pichia stipitis))	FAO2 PICST_32359	A3LW61

【表４－８】

生物	遺伝子名	受託番号
アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae) (株 3.042) (黄麹菌)	Ao3042_09114	I8TL25
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) (株 Fo5176) (フザリウム萎凋病)	FOXB_17532	F9GFU8
リゾプス・デレマル(Rhizopus delemar) (株 RA 99-880 / ATCC MYA-4621 / FGSC 9543 / NRRL 43880) (ムコール症病原菌) (リゾプス・アルリズス変種デルマル(Rhizopus arrhizus var. delemar))	RO3G_08271	I1C536
リゾプス・デレマル(Rhizopus delemar) (株 RA 99-880 / ATCC MYA-4621 / FGSC 9543 / NRRL 43880) (ムコール症病原菌) (リゾプス・アルリズス変種デルマル(Rhizopus arrhizus var. delemar))	RO3G_00154	I1BGX0
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) (株 Fo5176) (フザリウム萎凋病)	FOXB_07532	F9FMA2
ペニシリウム・ロックフォルティ(Penicillium roqueforti)	PROQFM164_S02g001772	W6QPY1
アスペルギルス・クラバツス(Aspergillus clavatus) (株 ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1)	ACLA_018400	A1CNB5
アルトロデルマ・オタエ(Arthroderma otae) (株 ATCC MYA-4605 / CBS 113480) (ミクロスポラム・カニス(Microsporum canis))	MCYG_08732	C5G1B0
トリコフィトン・トンズランス(Trichophyton tonsurans) (株 CBS 112818) (頭皮白癬菌)	TESG_07214	F2S8I2
コレトトリクム・ヒギンシアヌム(Colletotrichum higginsianum) (株 IMI 349063) (アブラナ科炭疽病菌)	CH063_13441	H1VUE7
アジェロミセス・カプスラツス(Ajellomyces capsulatus) (株 H143) (ダーリング病菌) (ヒストプラズマ・カプスラツム(Histoplasma capsulatum))	HCDG_07658	C6HN77

【表４－９】

生物	遺伝子名	受託番号
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) (株 ATCC MYA-4607 / CBS 118892) (足白癬菌)	TERG_08235	F2T096
コクリオボルス・ヘテロストロフス(Cochliobolus heterostrophus) (株 C5 / ATCC 48332 / レース O) (トウモロコシ南方ごま葉枯病) (ビポラリス・マイディス(Bipolaris maydis))	COCHEDRAFT_1201414	M2UMT9
カンジダ・オルトプシローシス(Candida orthopsilosis) (株 90-125) (酵母)	CORT_0D04510	H8X643
カンジダ・オルトプシローシス(Candida orthopsilosis) (株 90-125) (酵母)	CORT_0D04520	H8X644
カンジダ・オルトプシローシス(Candida orthopsilosis) (株 90-125) (酵母)	CORT_0D04530	H8X645
シュードジマ・アプヒディス(Pseudozyma aphidis) DSM 70725	PaG_03027	W3VP49
コクシジオイデス・ポサダシ(Coccidioides posadasii) (株 C735) (渓谷熱菌)	CPC735_000380	C5P005
マグナポルテ・オリゼ(Magnaporthe oryzae) (株 P131) (イネいもち病菌) (ピリクラリア・オリゼ(Pyricularia oryzae))	OOW_P131scaffold01214g15	L7IZ92
ニューロスポラ・テトラスペルマ(Neurospora tetrasperma) (株 FGSC 2508 / ATCC MYA-4615 / P0657)	NEUTE1DRAFT_82541	F8MKD1
ヒポクレア・ビレンス(Hypocrea virens) (株 Gv29-8 / FGSC 10586) (グリオクラジウム・ビレンス(Gliocladium virens)) (トリコデルマ・ビレンス(Trichoderma virens))	TRIVIDRAFT_54537	G9MMY7
ヒポクレア・ビレンス(Hypocrea virens) (株 Gv29-8 / FGSC 10586) (グリオクラジウム・ビレンス(Gliocladium virens)) (トリコデルマ・ビレンス(Trichoderma virens))	TRIVIDRAFT_53801	G9MT89
アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger) (株 CBS 513.88 / FGSC A1513)	An01g09620	A2Q9Z3
バーティシリウム・ダリエ(Verticillium dahliae) (株 VdLs.17 / ATCC MYA-4575 / FGSC 10137) (バーティシリウム萎凋病)	VDAG_05780	G2X6J8

【表４－１０】

生物	遺伝子名	受託番号
ウスチラゴ・マイディス(Ustilago maydis) (株 521 / FGSC 9021) (トウモロコシ黒穂病菌)	UM02023.1	Q4PCZ0
フザリウム・オキシスポラム分化型リコペルシシ (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici) MN25	FOWG_13006	W9LNI9
フザリウム・オキシスポラム分化型リコペルシシ (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici) MN25	FOWG_02542	W9N9Z1
カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis) (酵母)	FAO1	Q6QIR6
マグナポルテ・オリゼ(Magnaporthe oryzae) (株 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) (イネいもち病菌) (ピリクラリア・オリゼ (Pyricularia oryzae))	MGG_11317	G4MVK1
カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis) (酵母)	faot	Q9P8D9
カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis) (酵母)	FAO2a	Q6QIR5
ファエオスファエリア・ノドラム(Phaeosphaeria nodorum) (株 SN15 / ATCC MYA-4574 / FGSC 10173) (ふ枯病菌) (スプトリア・ノドラム (Septoria nodorum))	SNOG_02371	Q0V0U3
カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis) (酵母)	FAO2b	Q6QIR4
ペスタロチオプシス・フィシ(Pestalotiopsis fici) W106-1	PFICI_11209	W3WU04
マグナポルテ・オリゼ(Magnaporthe oryzae) (株 Y34) (イネいもち病菌) (ピリクラリア・オリゼ (Pyricularia oryzae))	OOU_Y34scaffold00240g57	L7IFT5
シュードギムノアスクス・デストルクタンス (Pseudogymnoascus destructans) (株 ATCC MYA-4855 / 20631-21) (コウモリ白い鼻症候群菌) (ゲオミセス・デストルクタンス(Geomyces destructans))	GMDG_01756	L8G0G6
シュードギムノアスクス・デストルクタンス (Pseudogymnoascus destructans) (株 ATCC MYA-4855 / 20631-21) (コウモリ白い鼻症候群菌) (ゲオミセス・デストルクタンス(Geomyces destructans))	GMDG_04950	L8GCY2

【表４－１１】

生物	遺伝子名	受託番号
マイコスフェレラ・フィジエンシス (Mycosphaerella fijiensis) (株 CIRAD86) (黒シガトカ病菌) (シュードセルコスポラ・フィジエンシス(Pseudocercospora fijiensis))	MYCFIDRAFT_52380	M2Z831
ビポラリス・オリゼ(Bipolaris oryzae) ATCC 44560	COCMIDRAFT_84580	W7A0I8
クラドフィアロフォラ・プサモフィラ (Cladophialophora psammophila) CBS 110553	A1O5_08147	W9WTM9
フザリウム・オキシスポラム分化型メロニス (Fusarium oxysporum f. sp. melonis) 26406	FOMG_05173	X0AEE6
フザリウム・オキシスポラム分化型メロニス (Fusarium oxysporum f. sp. melonis) 26406	FOMG_17829	W9ZBB7
シフェロフォラ・ユーロパエア(Cyphellophora europaea) CBS 101466	HMPREF1541_02174	W2S2S5
アスペルギルス・カワチイ(Aspergillus kawachii) (株 NBRC 4308) (白麹菌) (アスペルギルス・アワモリ変種カワチ(Aspergillus awamori var. kawachi))	AKAW_00147	G7X626
アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus) (株 NIH 2624 / FGSC A1156)	ATEG_05086	Q0CMJ8
コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis) (株 RS) (渓谷熱菌)	CIMG_02987	J3KAI8
アジェロミセス・デルマチチディス(Ajellomyces dermatitidis) (株 ER-3 / ATCC MYA-2586) (ブラストミセス・デルマチチディス(Blastomyces dermatitidis))	BDCG_04701	C5GLS5
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) (株レース 1) (パナマ病菌)	FOC1_g10013865	N4U732
ロドトルラ・グルチニス(Rhodotorula glutinis) (株 ATCC 204091 / IIP 30 / MTCC 1151) (酵母)	RTG_00643	G0SVU8
アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger) (株 ATCC 1015 / CBS 113.46 / FGSC A1144 / LSHB Ac4 / NCTC 3858a / NRRL 328 / USDA 3528.7)	ASPNIDRAFT_35778	G3XTM6

【表４－１２】

生物	遺伝子名	受託番号
カンジダ・クロアカ(Candida cloacae)	fao1	Q9P8D8
カンジダ・クロアカ(Candida cloacae)	fao2	Q9P8D7
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) (株レース 1) (パナマ病菌)	FOC1_g10006358	N4TUH3
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans) (株 SC5314 / ATCC MYA-2876) (酵母)	FAO1 CaO19.13562 orf19.13562	Q59RS8
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans) (株 SC5314 / ATCC MYA-2876) (酵母)	FAO1 CaO19.6143 orf19.6143	Q59RP0
ケトミウム・サーモフィルム(Chaetomium thermophilum) (株 DSM 1495 / CBS 144.50 / IMI 039719)	CTHT_0018560	G0S2U9
ムコール・シルシネロイデス f. シルシネロイデス (Mucor circinelloides f. circinelloides) (株 1006PhL) (ムコール症病原菌) (カリプトロミセス・シルシネロイデス(Calyptromyces circinelloides))	HMPREF1544_05296	S2JDN0
ムコール・シルシネロイデス f. シルシネロイデス (Mucor circinelloides f. circinelloides) (株 1006PhL) (ムコール症病原菌) (カリプトロミセス・シルシネロイデス(Calyptromyces circinelloides))	HMPREF1544_05295	S2JYP5
ムコール・シルシネロイデス f. シルシネロイデス (Mucor circinelloides f. circinelloides) (株 1006PhL) (ムコール症病原菌) (カリプトロミセス・シルシネロイデス(Calyptromyces circinelloides))	HMPREF1544_06348	S2JVK9
ボトリオチニア・フッケリアナ(Botryotinia fuckeliana) (株 BcDW1) (貴腐菌) (ボトリチス・シネレア(Botrytis cinerea))	BcDW1_6807	M7UD26
ポドスポラ・アンセリナ(Podospora anserina) (株 S / ATCC MYA-4624 / DSM 980 / FGSC 10383) (プリューラゲ・アンセリナ(Pleurage anserina))	PODANS_5_13040	B2AFD8

【表４－１３】

生物	遺伝子名	受託番号
ネオサルトリア・フミガタ(Neosartorya fumigata) (株 ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) (アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus))	AFUA_1G17110	Q4WR91
フザリウム・オキシスポラム分化型バシンフェクツム(Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum) 25433	FOTG_00686	X0MEE6
フザリウム・オキシスポラム分化型バシンフェクツム(Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum) 25433	FOTG_12485	X0LE98
トリコフィトン・インテルディジタレ(Trichophyton interdigitale) H6	H101_06625	A0A022U717
ボーベリア・バッシアナ(Beauveria bassiana) (株 ARSEF 2860) (白きょう病菌) (トリチラキウム・シオタエ(Tritirachium shiotae))	BBA_04100	J4UNY3
フザリウム・オキシスポラム分化型ラディシス-リコペルシシ(Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici) 26381	FOCG_00843	X0GQ62
フザリウム・オキシスポラム分化型ラディシス-リコペルシシ(Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici) 26381	FOCG_15170	X0F4T1
ニューロスポラ・テトラスペルマ(Neurospora tetrasperma) (株 FGSC 2509 / P0656)	NEUTE2DRAFT_88670	G4UNN6
シュードジマ・フーペイエンシス(Pseudozyma hubeiensis) (株 SY62) (酵母)	PHSY_000086	R9NVU1
ロデロミセス・エロンギスポルス(Lodderomyces elongisporus) (株 ATCC 11503 / CBS 2605 / JCM 1781 / NBRC 1676 / NRRL YB-4239) (酵母) (サッカロミセス・エロンギスポルス(Saccharomyces elongisporus))	LELG_03289	A5E102
マラセジア・グロボサ(Malassezia globosa) (株 ATCC MYA-4612 / CBS 7966) (フケ症関連菌)	MGL_3855	A8QAY8
バイソクラミス・スペクタビリス(Byssochlamys spectabilis) (株 No. 5 / NBRC 109023) (ペシロミセス・バリオチイ(Paecilomyces variotii))	PVAR5_7014	V5GBL6

【表４－１４】

生物	遺伝子名	受託番号
アジェロミセス・カプスラツス(Ajellomyces capsulatus) (株 H88) (ダーリング病菌) (ヒストプラズマ・カプスラツム(Histoplasma capsulatum))	HCEG_03274	F0UF47
トリコスポロン・アサヒ変種アサヒ(Trichosporon asahii var. asahii) (株 ATCC 90039 / CBS 2479 / JCM 2466 / KCTC 7840 / NCYC 2677 / UAMH 7654) (酵母)	A1Q1_03669	J6FBP4
ペニシリウム・オキサリクム(Penicillium oxalicum) (株 114-2 / CGMCC 5302) (ペニシリウム・デクムベンス(Penicillium decumbens))	PDE_00027	S7Z8U8
フザリウム・オキシスポラム分化型コングルチナンス(Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans) レース 2 54008	FOPG_02304	X0IBE3
フザリウム・オキシスポラム分化型コングルチナンス(Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans) レース 2 54008	FOPG_13066	X0H540
フザリウム・オキシスポラム分化型ラファニ (Fusarium oxysporum f. sp. raphani) 54005	FOQG_00704	X0D1G8
フザリウム・オキシスポラム分化型ラファニ (Fusarium oxysporum f. sp. raphani) 54005	FOQG_10402	X0C482
メタリジウム・アクリドゥム(Metarhizium acridum) (株 CQMa 102)	MAC_03115	E9DZR7
アルトロデルマ・ベンハミエ(Arthroderma benhamiae) (株 ATCC MYA-4681 / CBS 112371) (トリコフィトン・メンタグロフィテス (Trichophyton mentagrophytes))	ARB_02250	D4B1C1
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) トロピカルレース 4 54006	FOIG_12161	X0JFI6
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) トロピカルレース 4 54006	FOIG_12751	X0JDU5
コクリオボルス・ヘテロストロフス(Cochliobolus heterostrophus) (株 C4 / ATCC 48331 / レース T) (トウモロコシ南方ごま葉枯病) (ビポラリス・マイディス(Bipolaris maydis))	COCC4DRAFT_52836	N4WZZ0
トリコスポロン・アサヒ変種アサヒ(Trichosporon asahii var. asahii) (株 CBS 8904) (酵母)	A1Q2_00631	K1VZW1

【表４－１５】

生物	遺伝子名	受託番号
マイコスフェレラ・グラミニコラ(Mycosphaerella graminicola) (株 CBS 115943 / IPO323) (斑点葉枯病(Speckled leaf blotch)菌) (セプトリア・トリチシ(Septoria tritici))	MYCGRDRAFT_37086	F9X375
ボトリオチニア・フッケリアナ(Botryotinia fuckeliana) (株 T4) (貴腐菌) (ボトリチス・シネレア(Botrytis cinerea))	BofuT4_P072020.1	G2XQ18
メタリジウム・アニソプリエ(Metarhizium anisopliae) (株 ARSEF 23 / ATCC MYA-3075)	MAA_05783	E9F0I4
クラドフィアロフォラ・カリオニイ (Cladophialophora carrionii) CBS 160.54	G647_05801	V9DAR1
コクシジオイデス・ポサダシ(Coccidioides posadasii) (株 RMSCC 757 / Silveira) (渓谷熱菌)	CPSG_09174	E9DH75
ロドスポリジウム・トルロイデス(Rhodosporidium toruloides) (株 NP11) (酵母) (ロドトルラ・グラシリス(Rhodotorula gracilis))	RHTO_06879	M7X159
プクキニア・グラミニス分化型トリチシ(Puccinia graminis f. sp. tritici) (株 CRL 75-36-700-3 / レース SCCL) (黒さび病菌)	PGTG_10521	E3KIL8
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) CBS 288.86	H103_00624	A0A022WG28
コレトトリクム・フィオリニエ(Colletotrichum fioriniae) PJ7	CFIO01_08202	A0A010RKZ4
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) CBS 289.86	H104_00611	A0A022XB46
クラドフィアロフォラ・イエグレシイ (Cladophialophora yegresii) CBS 114405	A1O7_02579	W9WC55
コレトトリクム・オルビクラレ(Colletotrichum orbiculare) (株 104-T / ATCC 96160 / CBS 514.97 / LARS 414 / MAFF 240422) (キュウリ炭疽病菌) (コレトトリクム・ラゲナリウム (Colletotrichum lagenarium))	Cob_10151	N4VFP3

【表４－１６】

生物	遺伝子名	受託番号
ドレシュラーレラ・ステノブロカ(Drechslerella stenobrocha) 248	DRE_03459	W7IDL6
ネオサルトリア・フミガタ(Neosartorya fumigata) (株 CEA10 / CBS 144.89 / FGSC A1163) (アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus))	AFUB_016500	B0XP90
チエラビア・テレストリス(Thielavia terrestris) (株 ATCC 38088 / NRRL 8126) (アクレモニウム・アラバメンセ(Acremonium alabamense))	THITE_2117674	G2R8H9
ジベレラ・フジクロイ(Gibberella fujikuroi) (株 CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) (馬鹿苗病及び根腐病菌) (フザリウム・フジクロイ(Fusarium fujikuroi))	FFUJ_02948	S0DZP7
ジベレラ・フジクロイ(Gibberella fujikuroi) (株 CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) (馬鹿苗病及び根腐病菌) (フザリウム・フジクロイ(Fusarium fujikuroi))	FFUJ_12030	S0EMC6
黄色コウジ菌(Aspergillus flavus) (株 ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRC 167)	AFLA_109870	B8N941
トグニニア・ミニマ(Togninia minima) (株 UCR-PA7) (エスカ病菌) (ファエオアクレモニウム・アレオフィルム(Phaeoacremonium aleophilum))	UCRPA7_1719	R8BTZ6
アジェロミセス・デルマチチディス(Ajellomyces dermatitidis) (株 ATCC 18188 / CBS 674.68) (ブラストミセス・デルマチチディス(Blastomyces dermatitidis))	BDDG_09783	F2TUC0
マクロフォミナ・ファセオリナ(Macrophomina phaseolina) (株 MS6) (炭腐病菌)	MPH_10582	K2RHA5
アカパンカビ(Neurospora crassa) (株 ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987)	NCU08977	Q7S2Z2
ネオサルトリア・フィシェリ(Neosartorya fischeri) (株 ATCC 1020 / DSM 3700 / FGSC A1164 / NRRL 181) (アスペルギルス・フィッシャーリアヌス(Aspergillus fischerianus))	NFIA_008260	A1D156

【表４－１７】

生物	遺伝子名	受託番号
フザリウム・シュードグラミネアルム(Fusarium pseudograminearum) (株 CS3096) (コムギ及びオオムギ菌核病菌)	FPSE_11742	K3U9J5
スパタスポラ・パッサリダルム(Spathaspora passalidarum) (株 NRRL Y-27907 / 11-Y1)	SPAPADRAFT_54193	G3AJP0
スパタスポラ・パッサリダルム(Spathaspora passalidarum) (株 NRRL Y-27907 / 11-Y1)	SPAPADRAFT_67198	G3ANX7
トリコフィトン・ベルコスム(Trichophyton verrucosum) (株 HKI 0517)	TRV_07960	D4DL86
アルトロデルマ・ギプセウム(Arthroderma gypseum) (株 ATCC MYA-4604 / CBS 118893) (ミクロスポルム・ギプセウム(Microsporum gypseum))	MGYG_07264	E4V2J0
ヒポクレア・ジェコリナ(Hypocrea jecorina) (株 QM6a) (トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei))	TRIREDRAFT_43893	G0R7P8
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) MR1448	H110_00629	A0A022Z1G4
アスペルギルス・ルベー(Aspergillus ruber) CBS 135680	EURHEDRAFT_512125	A0A017SPR0
グラレア・ロゾイエンシス(Glarea lozoyensis) (株 ATCC 20868 / MF5171)	GLAREA_04397	S3D6C1
セトスファエリア・ツルシカ(Setosphaeria turcica) (株 28A) (すす紋病菌) (エクセロヒルム・ツルシクム(Exserohilum turcicum))	SETTUDRAFT_20639	R0K6H8
パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス(Paracoccidioides brasiliensis) (株 Pb18)	PADG_06552	C1GH16
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) Fo47	FOZG_13577	W9JPG9
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) Fo47	FOZG_05344	W9KPH3
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) MR1459	H113_00628	A0A022ZY09
ペニシリウム・マルネフェイ(Penicillium marneffei) (株 ATCC 18224 / CBS 334.59 / QM 7333)	PMAA_075740	B6QBY3

【表４－１８】

生物	遺伝子名	受託番号
スフェルリナ・ムシバ(Sphaerulina musiva) (株 SO2202) (ポプラ枝枯病菌) (セプトリア・ムシバ (Septoria musiva))	SEPMUDRAFT_154026	M3DAK6
ジベレラ・モニリフォルミス(Gibberella moniliformis) (株 M3125 / FGSC 7600) (トウモロコシ穂腐病・茎腐病菌) (フザリウム・ベルチシリオイデス(Fusarium verticillioides))	FVEG_10526	W7N4P8
ジベレラ・モニリフォルミス(Gibberella moniliformis) (株 M3125 / FGSC 7600) (トウモロコシ穂腐病・茎腐病菌) (フザリウム・ベルチシリオイデス(Fusarium verticillioides))	FVEG_08281	W7MVR9
シュードジマ・アンタルクティカ(Pseudozyma antarctica) (株 T-34) (酵母) (カンジダ・アンタルクティカ(Candida antarctica))	PANT_22d00298	M9MGF2
パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス (Paracoccidioides brasiliensis) (株 Pb03)	PABG_07795	C0SJD4
リゾファグス・イレグラリス(Rhizophagus irregularis) (株 DAOM 181602 / DAOM 197198 / MUCL 43194) (アーバスキュラー菌根菌) (グロムス・イントララディセス(Glomus intraradices))	GLOINDRAFT_82554	U9TF61
ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum) (株 ATCC 28089 / DSM 1075 / Wisconsin 54-1255) (ペニシリウム・ノタツム(Penicillium notatum))	Pc21g23700 PCH_Pc21g23700	B6HJ58
ボードワニア・コンプニアセンシス(Baudoinia compniacensis) (株 UAMH 10762) (エンゼルズシェア菌(Angels' share fungus))	BAUCODRAFT_274597	M2M6Z5
ヒポクレア・アトロビリディス(Hypocrea atroviridis) (株 ATCC 20476 / IMI 206040) (トリコデルマ・アトロビリデ(Trichoderma atroviride))	TRIATDRAFT_280929	G9NJ32
コレトトリクム・グロエオスポリオイデス (Colletotrichum gloeosporioides) (株 Cg-14) (炭疽病菌) (グロメレラ・シングラタ(Glomerella cingulata))	CGLO_06642	T0LPH0

【表４－１９】

生物	遺伝子名	受託番号
コルディセプス・ミリタリス(Cordyceps militaris) (株 CM01) (冬虫夏草)	CCM_02665	G3JB34
ピロネマ・オンファロデス(Pyronema omphalodes) (株 CBS 100304) (ピロネマ・コンフルエンス(Pyronema confluens))	PCON_13062	U4LKE9
コレトトリクム・グラミニコラ(Colletotrichum graminicola) (株 M1.001 / M2 / FGSC 10212) (トウモロコシ炭疽病菌) (グロメレラ・グラミニコラ(Glomerella graminicola))	GLRG_08499	E3QR67
グラレア・ロゾイエンシス(Glarea lozoyensis) (株 ATCC 74030 / MF5533)	M7I_2117	H0EHX4
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) (株レース 4) (パナマ病菌)	FOC4_g10002493	N1S969
フザリウム・オキシスポラム分化型クベンセ (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) (株レース 4) (パナマ病菌)	FOC4_g10011461	N1RT80
コクリオボルス・サチブス(Cochliobolus sativus) (株 ND90Pr / ATCC 201652) (根腐病及び斑点病菌) (ビポラリス・ソロキニアナ (Bipolaris sorokiniana))	COCSADRAFT_295770	M2TBE4
ミキシア・オスムンデ(Mixia osmundae) (株 CBS 9802 / IAM 14324 / JCM 22182 / KY 12970)	Mo05571 E5Q_05571	G7E7S3
マイコスフェレラ・ピニ(Mycosphaerella pini) (株 NZE10 / CBS 128990) (赤班葉枯病菌) (ドチストロマ・セプトスポルム(Dothistroma septosporum))	DOTSEDRAFT_69651	N1PXR0
グロスマンニア・クラビゲラ(Grosmannia clavigera) (株 kw1407 / UAMH 11150) (青変病菌) (グラフィオクラディエラ・クラビゲラ (Graphiocladiella clavigera))	CMQ_1113	F0XC64

【表４－２０】

生物	遺伝子名	受託番号
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) FOSC 3-a	FOYG_03004	W9IUE5
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) FOSC 3-a	FOYG_16040	W9HNP0
フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum) FOSC 3-a	FOYG_17058	W9HB31
ネクトリア・ヘマトコッカ(Nectria haematococca) (株 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPVI) (フザリウム・ソラニ亜種ピシ (Fusarium solani subsp. pisi))	NECHADRAFT_37686	C7YQL1
ネクトリア・ヘマトコッカ(Nectria haematococca) (株 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPVI) (フザリウム・ソラニ亜種ピシ (Fusarium solani subsp. pisi))	NECHADRAFT_77262	C7ZJI0
チュベル・メラノスポルム(Tuber melanosporum) (株 Mel28) (ペリゴール黒トリュフ)	GSTUM_00010376001	D5GLS0
アジェロミセス・デルマチチディス(Ajellomyces dermatitidis) (株 SLH14081) (ブラストミセス・デルマチチディス(Blastomyces dermatitidis))	BDBG_07633	C5JYI9
ケトミウム・グロボスム(Chaetomium globosum) (株 ATCC 6205 / CBS 148.51 / DSM 1962 / NBRC 6347 / NRRL 1970) (土壌真菌)	CHGG_09885	Q2GQ69
カンジダ・テヌイス(Candida tenuis) (株 ATCC 10573 / BCRC 21748 / CBS 615 / JCM 9827 / NBRC 10315 / NRRL Y-1498 / VKM Y-70) (酵母)	CANTEDRAFT_108652	G3B9Z1
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) CBS 100081	H102_00622	A0A022VKY4
ピレノフォラ・テレス f. テレス(Pyrenophora teres f. teres) (株 0-1) (オオムギ網斑病菌) (ドレシュレラ・テレス f. テレス(Drechslera teres f. teres))	PTT_09421	E3RLZ3
コレトトリクム・グロエオスポリオイデス (Colletotrichum gloeosporioides) (株 Nara gc5) (炭疽病菌) (グロメレラ・シングラタ (Glomerella cingulata))	CGGC5_4608	L2GB29

【表４－２１】

生物	遺伝子名	受託番号
ジベレラ・ゼアエ(Gibberella zeae) (コムギ赤かび病菌) (フザリウム・グラミネアルム(Fusarium graminearum))	FG05_06918	A0A016PCS4
トリコフィトン・ソウダネンセ(Trichophyton soudanense) CBS 452.61	H105_00612	A0A022Y6A6
スクレロチニア・スクレロチオルム(Sclerotinia sclerotiorum) (株 ATCC 18683 / 1980 / Ss-1) (白かび) (ウェツェリニア・スクレロチオルム (Whetzelinia sclerotiorum))	SS1G_07437	A7EQ37
フザリウム・オキシスポラム分化型ピシ (Fusarium oxysporum f. sp. pisi) HDV247	FOVG_14401	W9NWU8
フザリウム・オキシスポラム分化型ピシ (Fusarium oxysporum f. sp. pisi) HDV247	FOVG_02874	W9Q5V3
ウスチラゴ・ホルデイ(Ustilago hordei) (株 Uh4875-4) (オオムギ堅黒穂病菌)	UHOR_03009	I2G1Z4
スポリソリウム・レイリアヌム(Sporisorium reilianum) (株 SRZ2) (トウモロコシ黒穂病菌)	sr12985	E6ZYF7
ビポラリス・ゼイコラ(Bipolaris zeicola) 26-R-13	COCCADRAFT_81154	W6YIP8
メランプソラ・ラリシ-ポピュリナ(Melampsora larici-populina) (株 98AG31 / pathotype 3-4-7) (ポプラ葉さび病菌)	MELLADRAFT_78490	F4RUZ8
フザリウム・オキシスポラム分化型リコペルシシ (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici) (株 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (トマトフザリウム萎凋病)	FOXG_01901	J9MG95
フザリウム・オキシスポラム分化型リコペルシシ (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici) (株 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (トマトフザリウム萎凋病)	FOXG_11941	J9N9S4
ビポラリス・ビクトリエ(Bipolaris victoriae) FI3	COCVIDRAFT_39053	W7EMJ8

【表４－２２】

生物	遺伝子名	受託番号
デバリオミセス・ハンセニイ(Debaryomyces hansenii) (株 ATCC 36239 / CBS 767 / JCM 1990 / NBRC 0083 / IGC 2968) (酵母) (トルラスポラ・ハンセニイ(Torulaspora hansenii))	DEHA2E04268g	Q6BQL4
クラビスポラ・ルシタニエ(Clavispora lusitaniae) (株 ATCC 42720) (酵母) (カンジダ・ルシタニエ(Candida lusitaniae))	CLUG_01505	C4XZX3
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans) (株 WO-1) (酵母)	CAWG_02023	C4YME4
トリコフィトン・ルブルム(Trichophyton rubrum) MR850	H100_00625	A0A022U0Q2
カンジダ・ダブリニエンシス(Candida dubliniensis) (株 CD36 / ATCC MYA-646 / CBS 7987 / NCPF 3949 / NRRL Y-17841) (酵母)	CD36_32890	B9WMC7
スタルメレラ・ボンビコラ(Starmerella bombicola)	AOX1	A0A024FB95
チエラビア・ヘテロタリカ(Thielavia heterothallica) (株 ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799) (ミセリオフトラ・サーモフィラ(Myceliophthora thermophila))	MYCTH_103590	G2QJL7
クラビセプス・プルプレア(Claviceps purpurea) (株 20.1) (麦角菌) (スファセリア・セゲツム(Sphacelia segetum))	CPUR_07614	M1WFI4
アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae) (株 ATCC 42149 / RIB 40) (黄麹菌)	AO090023000571	Q2UH61
ディクチオステリウム・ディスコイデウム(Dictyostelium discoideum) (粘菌)	DDB_0184181 DDB_G0292042	Q54DT6
トリチカム・ウラルツ(Triticum urartu) (ウラルツコムギ) (クリトディウム・ウラルツ(Crithodium urartu))	TRIUR3_22733	M7YME5
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	PGSC0003DMG400017211	M1BG07
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OSJNBb0044B19.5 LOC_Os10g33540	Q8W5P8

【表４－２３】

生物	遺伝子名	受託番号
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OJ1234_B11.20 Os02g0621800	Q6K9N5
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OSJNBa0001K12.5 LOC_Os10g33520	Q8W5P3
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)	ZEAMMB73_809149	C0P3J6
シトラス・クレメンティナ(Citrus clementina)	CICLE_v10011111mg	V4S9P4
シトラス・クレメンティナ(Citrus clementina)	CICLE_v10018992mg	V4U4C9
シトラス・クレメンティナ(Citrus clementina)	CICLE_v10004405mg	V4S9D3
シトラス・クレメンティナ(Citrus clementina)	CICLE_v10004403mg	V4RZZ6
モルス・ノタビリス(Morus notabilis)	L484_011703	W9RIK0
モルス・ノタビリス(Morus notabilis)	L484_005930	W9RET7
メディカゴ・トルンカツラ(Medicago truncatula) (タルウマゴヤシ) (メディカゴ・トリブロイデス (Medicago tribuloides))	MTR_1g075650	G7I4U3
アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana) (シロイヌナズナ)		Q8LDP0
メディカゴ・トルンカツラ(Medicago truncatula) (タルウマゴヤシ) (メディカゴ・トリブロイデス (Medicago tribuloides))	MTR_4g081080	G7JF07
シモンドシア・キネンシス(Simmondsia chinensis) (ホホバ) (ブクスス・キネンシス (Buxus chinensis))		L7VFV2
プルヌス・ペルシカ(Prunus persica) (モモ) (アミグダルス・ペルシカ(Amygdalus persica))	PRUPE_ppa018458mg	M5VXL1
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07411	W4GI89
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07412	W4GI44
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07411	W4GKE3
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07411	W4GK29
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07411	W4GJ79
アファノミセス・アスタシ(Aphanomyces astaci)	H257_07411	W4GI38

【表４－２４】

生物	遺伝子名	受託番号
フェオダクチラム・トリコルヌツム (Phaeodactylum tricornutum) (株 CCAP 1055/1)	PHATRDRAFT_48204	B7G6C1
ホルデウム・ブルガレ変種ディスチクム (Hordeum vulgare var. distichum) (二条オオムギ)		F2E4R4
ホルデウム・ブルガレ変種ディスチクム (Hordeum vulgare var. distichum) (二条オオムギ)		F2DZG1
ホルデウム・ブルガレ変種ディスチクム (Hordeum vulgare var. distichum) (二条オオムギ)		M0YPG7
ホルデウム・ブルガレ変種ディスチクム (Hordeum vulgare var. distichum) (二条オオムギ)		M0YPG6
ホルデウム・ブルガレ変種ディスチクム (Hordeum vulgare var. distichum) (二条オオムギ)		F2CUY4
リシヌス・コミュニス(Ricinus communis) (トウゴマ)	RCOM_0867830	B9S1S3
ブラシカ・ラパ亜種ペキネンシス(Brassica rapa subsp. pekinensis) (ハクサイ) (ブラシカ・ペキネンシス(Brassica pekinensis))	BRA014947	M4DEM5
リシヌス・コミュニス(Ricinus communis) (トウゴマ)	RCOM_0258730	B9SV13
ブラシカ・ラパ亜種ペキネンシス(Brassica rapa subsp. pekinensis) (ハクサイ) (ブラシカ・ペキネンシス(Brassica pekinensis))	BRA001912	M4CCI2
ブラシカ・ラパ亜種ペキネンシス(Brassica rapa subsp. pekinensis) (ハクサイ) (ブラシカ・ペキネンシス(Brassica pekinensis))	BRA012548	M4D7T8
ブラシカ・ラパ亜種ペキネンシス(Brassica rapa subsp. pekinensis) (ハクサイ) (ブラシカ・ペキネンシス(Brassica pekinensis))	BRA024190	M4E5Y6
ブラシカ・ラパ亜種ペキネンシス(Brassica rapa subsp. pekinensis) (ハクサイ) (ブラシカ・ペキネンシス(Brassica pekinensis))	BRA015283	M4DFL0
リシヌス・コミュニス(Ricinus communis) (トウゴマ)	RCOM_1168730	B9SS54
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)		C4J691

【表４－２５】

生物	遺伝子名	受託番号
オリザ・グラベリマ(Oryza glaberrima) (アフリカイネ)		I1P2B7
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)		B6SXM3
ゼア・マイス(Zea mays) (トウモロコシ)		C0HFU4
エギロプス・タウスキイ(Aegilops tauschii) (タルホコムギ) (エギロプス・スクアロサ(Aegilops squarrosa))	F775_19577	R7W4J3
ソラヌム・ハブロカイテス(Solanum habrochaites) (原種トマト) (リコペルシコン・ヒルスツム(Lycopersicon hirsutum))		R9R6T0
フィスコミトレラ・パテンス亜種パテンス(Physcomitrella patens subsp. patens) (コケ)	PHYPADRAFT_124285	A9S535
フィスコミトレラ・パテンス亜種パテンス(Physcomitrella patens subsp. patens) (コケ)	PHYPADRAFT_113581	A9RG13
フィスコミトレラ・パテンス亜種パテンス(Physcomitrella patens subsp. patens) (コケ)	PHYPADRAFT_182504	A9S9A5
ソラヌム・ペンネリイ(Solanum pennellii) (トマト) (リコペルシコン・ペンネリイ(Lycopersicon pennellii))		R9R6Q1
ビティス・ビニフェラ(Vitis vinifera) (ブドウ)	VIT_02s0087g00630	F6HJ27
ビティス・ビニフェラ(Vitis vinifera) (ブドウ)	VIT_07s0005g03780	F6HZM3
ビティス・ビニフェラ(Vitis vinifera) (ブドウ)	VIT_05s0049g01400	F6H8T4
ビティス・ビニフェラ(Vitis vinifera) (ブドウ)	VITISV_019349	A5AH38
カプセラ・ルベラ(Capsella rubella)	CARUB_v10013046mg	R0HIT3
カプセラ・ルベラ(Capsella rubella)	CARUB_v10004212mg	R0GUX4
カプセラ・ルベラ(Capsella rubella)	CARUB_v10004208mg	R0F3X6
カプセラ・ルベラ(Capsella rubella)	CARUB_v10012453mg	R0ILD0
カプセラ・ルベラ(Capsella rubella)	CARUB_v10004208mg	R0GUX1
ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum) (ソルトウォータークレス) (シシンブリウム・サルスギネウム(Sisymbrium salsugineum))	EUTSA_v10024496mg	V4MD54
ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum) (ソルトウォータークレス) (シシンブリウム・サルスギネウム(Sisymbrium salsugineum))	EUTSA_v10020141mg	V4NM59

【表４－２６】

生物	遺伝子名	受託番号
ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum) (ソルトウォータークレス) (シシンブリウム・サルスギネウム(Sisymbrium salsugineum))	EUTSA_v10024496mg	V4LUR9
ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum) (ソルトウォータークレス) (シシンブリウム・サルスギネウム(Sisymbrium salsugineum))	EUTSA_v10024528mg	V4P767
ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum) (ソルトウォータークレス) (シシンブリウム・サルスギネウム(Sisymbrium salsugineum))	EUTSA_v10006882mg	V4L2P6
セラギネラ・モエレンドルフィイ(Selaginella moellendorffii) (スパイクモス)	SELMODRAFT_87684	D8R6Z6
セラギネラ・モエレンドルフィイ(Selaginella moellendorffii) (スパイクモス)	SELMODRAFT_87621	D8R6Z5
セラギネラ・モエレンドルフィイ(Selaginella moellendorffii) (スパイクモス)	SELMODRAFT_74601	D8QN81
セラギネラ・モエレンドルフィイ(Selaginella moellendorffii) (スパイクモス)	SELMODRAFT_73531	D8QN82
ソルガム・ビコロール(Sorghum bicolor) (モロコシ) (ソルガム・ブルガレ(Sorghum vulgare))	Sb04g026390 SORBIDRAFT_04g026390	C5XXS4
ソルガム・ビコロール(Sorghum bicolor) (モロコシ) (ソルガム・ブルガレ(Sorghum vulgare))	Sb04g026370 SORBIDRAFT_04g026370	C5XXS1
ソルガム・ビコロール(Sorghum bicolor) (モロコシ) (ソルガム・ブルガレ(Sorghum vulgare))	Sb01g019470 SORBIDRAFT_01g019470	C5WYH6
ソルガム・ビコロール(Sorghum bicolor) (モロコシ) (ソルガム・ブルガレ(Sorghum vulgare))	Sb01g019480 SORBIDRAFT_01g019480	C5WYH7
ソルガム・ビコロール(Sorghum bicolor) (モロコシ) (ソルガム・ブルガレ(Sorghum vulgare))	Sb01g019460 SORBIDRAFT_01g019460	C5WYH5
ソラヌム・ピンピネリホリウム(Solanum pimpinellifolium) (現在のトマト) (リコペルシコン・ピンピネリホリウム(Lycopersicon pimpinellifolium))		R9R6J2
ファセオルス・ブルガリス(Phaseolus vulgaris) (インゲンマメ) (フレンチビーン)	PHAVU_007G124200g	V7BGM7

【表４－２７】

生物	遺伝子名	受託番号
ファセオルス・ブルガリス(Phaseolus vulgaris) (インゲンマメ) (フレンチビーン)	PHAVU_011G136600g	V7AI35
ファセオルス・ブルガリス(Phaseolus vulgaris) (インゲンマメ) (フレンチビーン)	PHAVU_001G162800g	V7D063
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	PGSC0003DMG400024294	M1C923
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	PGSC0003DMG400018458	M1BKV4
ソラヌム・ツベロスム(Solanum tuberosum) (ジャガイモ)	PGSC0003DMG400018458	M1BKV3
グリシン・マックス(Glycine max) (ダイズ) (グリシン・ヒスピダ(Glycine hispida))		K7LK61
グリシン・マックス(Glycine max) (ダイズ) (グリシン・ヒスピダ(Glycine hispida))		K7KXQ9
ポプルス・トリコカルパ(Populus trichocarpa) (ウエスタンバルサムポプラ) (ポプルス・バルサミフェラ亜種トリコカルパ(Populus balsamifera subsp. trichocarpa))	POPTR_0008s16920g	B9HKS3
ピケア・シッチェンシス(Picea sitchensis) (シトカトウヒ) (ピヌス・シッチェンシス(Pinus sitchensis))		B8LQ84
ポプルス・トリコカルパ(Populus trichocarpa) (ウエスタンバルサムポプラ) (ポプルス・バルサミフェラ亜種トリコカルパ(Populus balsamifera subsp. trichocarpa))	POPTR_0004s24310g	U5GKQ5
ポプルス・トリコカルパ(Populus trichocarpa) (ウエスタンバルサムポプラ) (ポプルス・バルサミフェラ亜種トリコカルパ(Populus balsamifera subsp. trichocarpa))	POPTR_0010s07980g	B9HSG9
グリシン・マックス(Glycine max) (ダイズ) (グリシン・ヒスピダ(Glycine hispida))		I1N9S7
グリシン・マックス(Glycine max) (ダイズ) (グリシン・ヒスピダ(Glycine hispida))		I1LSK5
セタリア・イタリカ(Setaria italica) (アワ) (パニクム・イタリクム(Panicum italicum))	Si034362m.g	K4A658
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))	Solyc09g072610.2	K4CUT7

【表４－２８】

生物	遺伝子名	受託番号
セタリア・イタリカ(Setaria italica) (アワ) (パニクム・イタリクム(Panicum italicum))	Si016380m.g	K3YQ38
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))		R9R6I9
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))	Solyc09g090350.2	K4CW61
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))	Solyc08g005630.2	K4CI54
ソラヌム・リコペルシクム(Solanum lycopersicum) (トマト) (リコペルシコン・エスクレンツム(Lycopersicon esculentum))	Solyc08g075240.2	K4CMP1
セタリア・イタリカ(Setaria italica) (アワ) (パニクム・イタリクム(Panicum italicum))	Si034359m.g	K4A655
セタリア・イタリカ(Setaria italica) (アワ) (パニクム・イタリクム(Panicum italicum))	Si034354m.g	K4A650
ミムラス・グッタツス(Mimulus guttatus) (スポッテドモンキーフラワー) (イエローモンキーフラワー)	MIMGU_mgv1a001896mg	A0A022PU07
ミムラス・グッタツス(Mimulus guttatus) (スポッテドモンキーフラワー) (イエローモンキーフラワー)	MIMGU_mgv1a022390mg	A0A022RAV4
ミムラス・グッタツス(Mimulus guttatus) (スポッテドモンキーフラワー) (イエローモンキーフラワー)	MIMGU_mgv1a001868mg	A0A022S2E6
ミムラス・グッタツス(Mimulus guttatus) (スポッテドモンキーフラワー) (イエローモンキーフラワー)	MIMGU_mgv1a001883mg	A0A022S275
ミムラス・グッタツス(Mimulus guttatus) (スポッテドモンキーフラワー) (イエローモンキーフラワー)	MIMGU_mgv1a001761mg	A0A022QNF0
ムサ・アクミナタ亜種マラクセンシス(Musa acuminata subsp. malaccensis) (原種バナナ) (ムサ・マラクセンシス(Musa malaccensis))		M0SNA8

【表４－２９】

生物	遺伝子名	受託番号
ムサ・アクミナタ亜種マラクセンシス(Musa acuminata subsp. malaccensis) (原種バナナ) (ムサ・マラクセンシス(Musa malaccensis))		M0RUT7
ムサ・アクミナタ亜種マラクセンシス(Musa acuminata subsp. malaccensis) (原種バナナ) (ムサ・マラクセンシス(Musa malaccensis))		M0RUK3
サプロレグニア・ディクリナ(Saprolegnia diclina) VS20	SDRG_10901	T0RG89
ブラキポディウム・ディスタキオン (Brachypodium distachyon) (ミナトカモジグサ) (トラキニア・ディスタキア(Trachynia distachya))	BRADI3G49085	I1IBP7
ブラキポディウム・ディスタキオン (Brachypodium distachyon) (ミナトカモジグサ) (トラキニア・ディスタキア(Trachynia distachya))	BRADI3G28677	I1I4N2
ブラキポディウム・ディスタキオン (Brachypodium distachyon) (ミナトカモジグサ) (トラキニア・ディスタキア(Trachynia distachya))	BRADI3G28657	I1I4N0
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	OsI_34012	B8BHG0
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	OsI_08118	B8AFT8
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	OsI_34008	A2Z8H1
オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica) (コメ)	OsI_34014	B8BHG1
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	LOC_Os10g33460	Q7XDG3
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	Os10g0474800	Q0IX12
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	Os10g0474966	C7J7R1
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OSJNBa0001K12.13	Q8W5N7
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OsJ_31873	B9G683

【表４－３０】

生物	遺伝子名	受託番号
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OsJ_31875	B9G684
オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica) (コメ)	OSJNBa0001K12.3	Q8W5P5
アラビドプシス・リラタ亜種リラタ(Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (ミヤマハタザオ)	ARALYDRAFT_470376	D7KDA3
アラビドプシス・リラタ亜種リラタ(Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (ミヤマハタザオ)	ARALYDRAFT_479855	D7L3B6
アラビドプシス・リラタ亜種リラタ(Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (ミヤマハタザオ)	ARALYDRAFT_491906	D7MDA9
アラビドプシス・リラタ亜種リラタ(Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (ミヤマハタザオ)	ARALYDRAFT_914728	D7MGS9

【０１７７】
一部の実施態様において、本開示は、一つ以上の内因性（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）の活性の、欠失、破壊、変異及び又は低下を含む組換え微生物を教示する。
【０１７８】
したがって、一部の実施形態において、本開示の組換え微生物は、（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）によってコードされるタンパク質と、少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子の欠失又は他の破壊を含む。
【０１７９】
したがって、一部の実施形態において、本開示の組換え微生物は、ｕｎｉｐｒｏｔデータベースＩＤ　Ｑ６ＣＥＰ８（ＦＡＯ１）、少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失を含む。
【０１８０】
アセチルトランスフェラーゼ
本開示は、アルコールを脂肪アセテートに変換する酵素を記載する。
【０１８１】
一部の実施形態では、脂肪アルコールの脂肪アセテートへの変換を触媒するためアセチルトランスフェラーゼが使用される。アセチルトランスフェラーゼは、アセチル基をアセチル－ＣｏＡからアルコールへと転移させることにより酢酸エステルを生成することが可能な酵素である。一部の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは２．３．１．８４のＥＣ番号を有し得る。
【０１８２】
アセチルトランスフェラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、限定はされないが、カンジダ・グラブラータ（Candida glabrata）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、オオカバマダラ（Danaus plexippus）、ニセアメリカタバコガ（Heliotis virescens）、カイコガ（Bombyx mori）、タマナヤガ（Agrotis ipsilon）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、ニシキギ（Euonymus alatus）、ヒト（Homo

sapiens）、ラカンセア・サーモトレランス（Lachancea thermotolerans）及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）種の生物を含め、様々な生物から単離することができる。例示的実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、GenBank受託番号ＡＹ２４２０６６、ＡＹ２４２０６５、ＡＹ２４２０６４、ＡＹ２４２０６３、ＡＹ２４２０６２、ＥＨＪ６５２０５、ＡＣＸ５３８１２、ＮＰ＿００１１８２３８１、ＥＨＪ６５９７７、ＥＨＪ６８５７３、ＫＪ５７９２２６、ＧＵ５９４０６１、ＫＴＡ９９１８４．１、ＡＩＮ３４６９３．１、ＡＹ６０５０５３、ＸＰ＿００２５５２７１２．１、ＸＰ＿５０３０２４．１、ＸＰ＿５０５５９５．１及びＸＰ＿５０５５１３．１．から選択される配列を含む。例示的アセチルトランスフェラーゼ酵素は、表５ｄに示す。更なる例示的アセチルトランスフェラーゼペプチドについては、米国特許出願公開第２０１０／０１９９５４８号（本明細書において参照により援用される）を参照し得る。

【０１８３】

【表５－１】

表 5d. 例示的アセチルトランスフェラーゼ酵素

生物	**酵素 ID**
カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata)	KTA99184.1
カブラヤガ(Agrotis segetum)	AIN34693.1
ヒト(Homo sapiens)	AY605053
ラカンセア・サーモトレランス (Lachancea thermotolerans)	XP_002552712.1
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	XP_503024.1
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	XP_505595.1
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	XP_505513.1

【０１８４】

脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ

アシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、アシル－ＡＣＰから、デノボ脂肪酸生合成により合成された遊離脂肪酸を放出する。この反応は脂肪酸生合成を終了させる。植物では、脂肪酸生合成はプラスチドで起こり、従ってプラスチド局在アシル－ＡＣＰチオエステラーゼが必要である。全ての植物の栄養組織においてアシル－ＡＣＰチオエステラーゼの主な生成物はオレイン酸塩（Ｃ１８：０）、及びそれより程度は少ないがパルミチン酸塩（Ｃ１６：０）である。放出された遊離脂肪酸はプラスチドエンベロープにおいて補酵素Ａと再エステル化され、プラスチドから運び出される。

【０１８５】

アシル－ＡＣＰチオエステラーゼには２つのアイソフォーム、ＦａｔＡ及びＦａｔＢがある。これらのアイソフォームの基質特異性が植物における飽和脂肪酸の鎖長及びレベルを決定する。ＦａｔＡの活性はＣ１８：１－ＡＣＰで最も高い。ＦａｔＡは、Ｃ１８：１－ＡＣＰと比較したときに他のアシル－ＡＣＰに対する活性が極めて低い。ＦａｔＢの活性はＣ１６：０－ＡＣＰで最も高い。また、Ｃ１８：１－ＡＣＰ、続いてＣ１８：０－ＡＣＰ及びＣ１６：１－ＡＣＰでも著しく高い活性を有する。ＦａｔＡ及びＦａｔＢの速度論的研究からは、種々のアシル－ＡＣＰとのそれらの基質特異性はＫｍよりむしろＫｃａｔ値から生じたことが示される。種々の基質とのこれらの２つのアイソフォームのＫｍ値はマイクロモル濃度程度で同様である。ＦａｔＡ及びＦａｔＢのドメイン交換は、アイソフォームのＮ末端がその基質特異性を決定することを示す（Salas JJ and Ohlrogge JB

(2002) Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. Arch Biochem Biophys 403(1): 25-34)）。種子に主に中鎖長飽和脂肪酸を蓄積する植物について、それらは特殊化したＦａｔＢ及び／又はＦａｔＡチオエステラーゼと共に進化した（Voelker T and Kinney AJ (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 335-361）。例えば、ラウリン酸塩（１２：０）は、ココナツの優勢な種子油である。対応して、ココナツ種子に中鎖特異的アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性が検出された。

【０１８６】

［0235］一部の実施形態では、本開示は、ＹＡＬＩ０Ｅ１６０１６ｇ（ＦＡＴ１）の活性の欠失、破壊、変異及び又は低下を含む組換え微生物を教示する。

【０１８７】

［0236］従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ１６０１６ｇ（ＦＡＴ１）によってコードされるタンパク質との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失又は他の破壊を含むであろう。

【０１８８】

［0237］従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、uniprotデータベースＩＤ　Ｑ６Ｃ５Ｑ８（ＦＡＯ１）との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失を含むであろう。

【０１８９】

アシル－ＣｏＡオキシダーゼ

［0238］アシル－ＣｏＡオキシダーゼ（ＡＣＯ）は、８～１８の鎖長を有する脂肪酸のＣｏＡ誘導体に作用する。それらは、サブユニット当たり１つの非共有的に結合されたＦＡＤを含有するフラビン酵素であり、ミトコンドリアアシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼと同じスーパーファミリーに属する。ミトコンドリア脂肪アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼと同様に、ペルオキシソームアシル－ＣｏＡオキシダーゼは、ペルオキシソーム脂肪酸β－酸化経路の初期の律速段階、すなわち還元的半反応においてトランス－２－エノイル－ＣｏＡを生じる、アシル－ＣｏＡのα，β－脱水素化を触媒する。ペルオキシソームアシル－ＣｏＡオキシダーゼの酸化的半反応において、還元されたＦＡＤは、分子酸素によって再度酸化されて、過酸化水素を生成する。

【０１９０】

［0239］アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、ホモ二量体であり、サブユニットのポリペプチド鎖は、Ｎ末端α－ドメイン、β－ドメイン及びＣ末端α－ドメインに折り畳まれる。ペルオキシソームアシル－ＣｏＡオキシダーゼ及びミトコンドリアアシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ間の機能差は、ＦＡＤ環境の構造差に起因する。

【０１９１】

［0240］一部の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための組換え微生物及び方法が提供される。特定の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートは、Ｃ１６以下の炭素鎖長を有する。一部の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートは、長鎖脂肪酸から生成される。短鎖フェロモンを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、フェロモン生合成経路における脂肪アシル－ＣｏＡを短縮する能力を有する所定の酵素がフェロモン生合成経路酵素と共発現される。好適な鎖短縮酵素の例としては、ＦＡＤ依存性アシル－ＣｏＡオキシダーゼが挙げられる。偶数の炭素を有する脂肪酸分子の場合、鎖短縮酵素は、アセチル－ＣｏＡの分子及び２つの炭素によって短縮される脂肪アシル－ＣｏＡを生成する。奇数の炭素を有する脂肪酸分子は、同様に酸化されて、鎖長が５つの炭素に減少されるまで毎回の酸化中にアセチル－ＣｏＡ分子を生成する。酸化の最後のサイクルにおいて、この５－炭素アシル－ＣｏＡは、酸化されて、アセチル－ＣｏＡ及びプロピオニル－ＣｏＡを生成する。

【０１９２】

［0241］ アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、異なる鎖長を有する基質に対する可変の特異性を示すことが知られている（図４０）。従って、脂肪アシル－ＣｏＡ切断の程度を制御することは、適切な酵素変異体の改変又は選択に依存する。この目的に好適なアシル－ＣｏＡオキシダーゼの例が表５ａに列挙される。

【０１９３】

［0242］ 更なる実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{4}$～Ｃ$_{22}$脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３、７８～８０並びにGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される。他の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される。更なる実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５

％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％、５０％又は５０％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びカンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）からなる群から選択される酵母である。

【０１９４】

[0243] 脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、所望の鎖長を超える所望の脂肪アシル－ＣｏＡの切断を除去又は低減するように欠失又は下方制御される。このような欠失又は下方制御標的としては、限定はされないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）が挙げられる。

【０１９５】

[0244] 一部の実施形態では、本開示は、ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼの活性の欠失、破壊、変異及び又は低下を含む組換え微生物を教示する。

【０１９６】

[0245] 従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）によってコードされるタンパク質との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失又は他の破壊を含むであろう。

【０１９７】

[0246] 従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、データベースＩＤＰＯＸ１（Ｏ７４９３４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（Ｏ７４９３５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（Ｏ７４９３６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（Ｆ２Ｚ６２７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（Ｆ２Ｚ６３０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（Ｑ６Ｃ６Ｔ０）との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失を含

むであろう。

【０１９８】

［0247］一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素と異なる。一部の実施形態では、本組換え微生物は、フェロモン生合成経路酵素を更に発現する。更なる実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートを含む。更に別の実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼを含む。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、表５ａから選択される。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を調節する。一部の実施形態では、欠失され、破壊され、変異され、又は下方制御される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）から選択される。他の実施形態では、欠失され、破壊され、変異され、又は下方制御される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を制御する。

【０１９９】

［0248］一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する方法が提供され、本方法は、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させ、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする１つ以上の遺伝子における欠失、挿入又は機能喪失突然変異を導入することを含み、導入又は発現されるアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、欠失又は下方制御されるアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする１つ以上の遺伝子と異なる。一部の実施形態では、本方法は、脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。更なる実施形態では、本方法は、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、表５ａから選択されるアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする。他の実施形態では、少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を調節するアシル－ＣｏＡオキシダーゼ

をコードする。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の遺伝子は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）から選択されるアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする。他の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の遺伝子は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を調節するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする。

【０２００】

【表５－２】

表 5a. 例示的アシル-CoA オキシダーゼ

受託番号	**供給源生物**
P07872	*ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)*
A0A178WDE4	*シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)*
P0CZ23	*シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)*
D7KG20	*ミヤマハタザオ(Arabidopsis lyrata)*
R0I9Z2	*ルベラナズナ(Capsella rubella)*
V4KEW0	*ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum)*
M4DG68	*ブラッシカ・ラパ(Brassica rapa)*
A0A078IZG1	*セイヨウアブラナ(Brassica napus)*
A0A087HLF0	*アラビス・アルピナ(Arabis alpina)*
A0A0D3C825	*ヤセイカンラン(Brassica oleracea)*
A0A078FAW4	*セイヨウアブラナ(Brassica napus)*
A0A178W833	*シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)*
Q9LMI7	*シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)*

【表５－３】

受託番号	供給源生物
D7KG21	*ミヤマハタザオ(Arabidopsis lyrata)*
A0A0D3C827	*ヤセイカンラン(Brassica oleracea)*
M4DG69	*ブラッシカ・ラパ(Brassica rapa)*
A0A078J4V6	*セイヨウアブラナ(Brassica napus)*
A0A078FAY6	*セイヨウアブラナ(Brassica napus)*
V4KY71	*ユートレマ・サルスギネウム(Eutrema salsugineum)*
A0A061E5C2	*カカオ(Theobroma cacao)*
A0A061E4K0	*カカオ(Theobroma cacao)*
M1APJ5	*ジャガイモ(Solanum tuberosum)*
J7KBI6	*モモ(Prunus persica)*
K4CXY8	*トマト(Solanum lycopersicum)*
V4W234	*クレメンタイン(Citrus clementina)*
G8XNW7	*セイヨウリンゴ(Malus domestica)*
F6H4X3	*ヨーロッパブドウ(Vitis vinifera)*
A0A068V5Q3	*ロブスタコーヒーノキ(Coffea canephora)*
M1APJ6	*ジャガイモ(Solanum tuberosum)*
A0A067KHP0	*ナンヨウアブラギリ(Jatropha curcas)*
A0A0D2PZG8	*ワタ(Gossypium raimondii)*
B9IQS0	*ブラックコットンウッド(Populus trichocarpa)*
W9RG01	*マルバグワ(Morus notabilis)*
A0A0S3SB10	*ヤブツルアズキ(Vigna angularis var. angularis)*
A0A0L9V573	*アズキ(Phaseolus angularis)*
A0A0B0PPT6	*キダチワタ(Gossypium arboreum)*
A0A0D2T164	*ワタ(Gossypium raimondii)*
I1KEV4	*ダイズ(Glycine max)*

【表５－４】

受託番号	供給源生物
I1LS94	*ダイズ(Glycine max)*
G7JUZ2	*タルウマゴヤシ(Medicago truncatula)*
U5FVP5	*ブラックコットンウッド(Populus trichocarpa)*
V7AGL5	*インゲンマメ(Phaseolus vulgaris)*
A0A059A0G8	*ユーカリプタス・グランディス(Eucalyptus grandis)*
A0A059A0N3	*ユーカリプタス・グランディス(Eucalyptus grandis)*
A0A166AUM6	*ニンジン(Daucus carota subsp. sativus)*
A0A061EB81	*カカオ(Theobroma cacao)*
A0A0A0LQY1	*キュウリ(Cucumis sativus)*
A0A022QRB0	*セイタカミゾホオズキ(Erythranthe guttata)*
A0A0S3SB01	*ヤブツルアズキ(Vigna angularis var. angularis)*
A0A0D2Q6S9	*ワタ(Gossypium raimondii)*
B9SGN6	*トウゴマ(Ricinus communis)*
A0A0B2PER8	*ツルマメ(Glycine soja)*
A0A0B0NGI2	*キダチワタ(Gossypium arboreum)*
A0A0D2SKF2	*ワタ(Gossypium raimondii)*
A0A0B0NRR7	*キダチワタ(Gossypium arboreum)*
A0A0J8EFZ4	*ビート(Beta vulgaris subsp. vulgaris)*
A0A0J8BLD2	*ビート(Beta vulgaris subsp. vulgaris)*
M4DG71	*ブラッシカ・ラパ(Brassica rapa)*
W1Q111	*アムボレラ・トリコポダ(Amborella trichopoda)*
M0S864	*マレーヤマバショウ(Musa acuminata)*
A0A166ABS1	*ニンジン(Daucus carota subsp. sativus)*
A0A1D6CA75	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
A0A0A9CN11	*ダンチク(Arundo donax)*

【表５－５】

受託番号	供給源生物
A0A1D6CKJ3	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
A0A164W703	*ニンジン(Daucus carota subsp. sativus)*
A0A1D1YDC5	*アンスリウム・アムニコラ(Anthurium amnicola)*
I1Q2B7	*オリザ・グラベリマ(Oryza glaberrima)*
A0A0D9WQH3	*リーシア・ペリエリ(Leersia perrieri)*
Q69XR7	*オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica)*
A0A1D6CA73	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
A0A0E0A9E1	*オリザ・グルメパチュラ(Oryza glumipatula)*
A0A199W504	*パイナップル(Ananas comosus)*
A0A0E0HQR9	*オリザ・ニバラ(Oryza nivara)*
M0T4I4	*マレーヤマバショウ亜種マラッカ(Musa acuminata subsp. malacc.)*
C0PTG5	*シトカトウヒ(Picea sitchensis)*
I1I3F1	*ミナトカモジグサ(Brachypodium distachyon)*
K3XV57	*アワ(Setaria italica)*
A0A0D3GGF4	*オリザ・バルシー(Oryza barthii)*
A2YCR4	*オリザ・サティバ亜種インディカ(Oryza sativa subsp. indica)*
A0A0K9RYF5	*ホウレンソウ(Spinacia oleracea)*
A0A0D3GGF3	*オリザ・バルシー(Oryza barthii)*
A0A0D3GGF2	*オリザ・バルシー(Oryza barthii)*
A0A0E0HQR8	*オリザ・ニバラ(Oryza nivara)*
A0A1D6CA72	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
A3BBK8	*オリザ・サティバ亜種ジャポニカ(Oryza sativa subsp. japonica)*
A0A199V6E4	*パイナップル(Ananas comosus)*
C5XPR4	*モロコシ(Sorghum bicolor)*
A0A0E0PXN1	*オリザ・ルフィポゴン(Oryza rufipogon)*

【表５－６】

受託番号	供給源生物
B6U7U8	*ゼア・マイス(Zea mays)*
A0A1D6N7A4	*ゼア・マイス(Zea mays)*
A0A0E0E1N7	*オリザ・メリディオナリス(Oryza meridionalis)*
A0A0K9NPK9	*アマモ(Zostera marina)*
A0A059Q1I9	*サトウキビ属(Saccharum)交配栽培品種 R570*
J3MDZ2	*オリザ・ブラキアンタ(Oryza brachyantha)*
A0A0K9RYH2	*ホウレンソウ(Spinacia oleracea)*
A0A103YIT3	*カルドン(Cynara cardunculus)*
A0A0E0PXN2	*オリザ・ルフィポゴン(Oryza rufipogon)*
A9RZ70	*ヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)*
D8TES8	*イヌカタヒバ(Selaginella moellendorffii)*
D8SQF1	*イヌカタヒバ(Selaginella moellendorffii)*
M5X7E6	*モモ(Prunus persica)*
A9T150	*ヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)*
A0A176WTU5	*ゼニゴケ(Marchantia polymorpha)*
A0A0D2QZ34	*ワタ(Gossypium raimondii)*
A0A1D6N7A2	*ゼア・マイス(Zea mays)*
A0A1D1Z3C0	*アンスリウム・アムニコラ(Anthurium amnicola)*
A0A067DSI1	*スイートオレンジ(Citrus sinensis)*
A0A1D6CA74	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
M8CMI0	*タルホコムギ(Aegilops tauschii)*
A0A0S3SB72	*ヤブツルアズキ(Vigna angularis var. angularis)*
M0UX36	*オオムギ(Hordeum vulgare subsp. vulgare)*
A0A1D6CA76	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
A0A151SDZ7	*キマメ(Cajanus cajan)*

【表５－７】

受託番号	供給源生物
Q9LNB8	*シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)*
A0A1D6CKJ4	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
F2EGJ0	*オオムギ(Hordeum vulgare subsp. vulgare)*
A0A0D2U3V1	*ワタ(Gossypium raimondii)*
M0UX35	*オオムギ(Hordeum vulgare subsp. vulgare)*
M2Y3U7	*ガルディエリア・スルフラリア(Galdieria sulphuraria)*
S8CGJ3	*ゲンリセア・アウレア(Genlisea aurea)*
A0A0E0HQS2	*オリザ・ニバラ(Oryza nivara)*
A0A199VU62	*パイナップル(Ananas comosus)*
M2WTY9	*ガルディエリア・スルフラリア(Galdieria sulphuraria)*
A0A1D6N7A3	*ゼア・マイス(Zea mays)*
A0A0E0HQS0	*オリザ・ニバラ(Oryza nivara)*
A0A1E5VL23	*ジカンテリウム・オリゴサンテス(Dichanthelium oligosanthes)*
R7Q711	*ヤハズツノマタ(Chondrus crispus)*
S0F2R6	*ヤハズツノマタ(Chondrus crispus)*
S0F2T2	*ヤハズツノマタ(Chondrus crispus)*
A0A0E0HQS1	*オリザ・ニバラ(Oryza nivara)*
D3BSZ9	*シロカビモドキ(Polysphondylium pallidum)*
A0A0D2WJ11	*カプサスポラ・ウルザザルザキ(Capsaspora owczarzaki)株*
R7QDC3	*ヤハズツノマタ(Chondrus crispus)*
M1VCW4	*シアニディオシゾン(Cyanidioschyzon merolae)株*
F1A2F0	*ディクトステリウム・パープレウム(Dictyostelium purpureum)*
F4PI57	*ディクトステリウム・ファスキクラツム(Dictyostelium fasciculatum)*
Q54II1	*キイロタマホコリカビ(Dictyostelium discoideum)*
A0A0E0LBG6	*オリザ・プンクタタ(Oryza punctata)*

【表５－８】

受託番号	供給源生物
A0A151ZKZ0	*ディクトステリウム・ラクテウム(Dictyostelium lacteum)*
M1BZ65	*ジャガイモ(Solanum tuberosum)*
H8MFT9	*コラロコッカス・コラロイデス(Corallococcus coralloides)株*
F8CEB4	*ミクソコッカス・フルブス(Myxococcus fulvus)*
A0A0H4WJP1	*ミクソコッカス・ハンスプス(Myxococcus hansupus)*
Q1CYG7	*ミクソコッカス・キサンツス(Myxococcus xanthus)*
F1A3A8	*ディクトステリウム・パープレウム(Dictyostelium purpureum)*
L7UK64	*ミクソコッカス・スティピタツス(Myxococcus stipitatus)*
A0A0F7BPX0	*ミクソコッカス・フルブス(Myxococcus fulvus)124B02*
A0A0G4J3N5	*ネコブカビ(Plasmodiophora brassicae)*
D5H9X3	*サリニバクター・ルバー(Salinibacter ruber)株 M8*
Q2S1W1	*サリニバクター・ルバー(Salinibacter ruber)株 D*
A0A085WN59	*ヒアランギウム・ミニツム(Hyalangium minutum)*
A0A0G2ZRH9	*アーカンギウム・ゲフィラ(Archangium gephyra)*
A0A0S8HAC5	*ジェマティモナス属種(Gemmatimonas sp.)SM23_52*
A0A177Q5I1	*ウェルコミクロビウム門(Verrucomicrobia)細菌 SC*
D8TVM2	*ボルボックス・カルテリ分化型ナガリエンシス (Volvox carteri f. nagariensis)*
A0A084SWJ9	*シストバクター・ビオラセウス(Cystobacter violaceus)Cb vi76*
Q096A6	*スチグマテラ・オーランチアカ(Stigmatella aurantiaca)株*
R7QMZ0	*ヤハズツノマタ(Chondrus crispus)*
A0A0G4J5Q9	*ネコブカビ(Plasmodiophora brassicae)*
A0A0Q9RNC6	*ノカルディオイデス属種(Nocardioides sp.)Soil797*
A0A010YG34	*クリプトスポランジウム・アルブム(Cryptosporangium arvum)DSM 4*
A0A098BJC6	*推定ロドコッカス・ルバー(Rhodococcus ruber)*
A0A059ML28	*ロドコッカス・アエセリボランス(Rhodococcus aetherivorans)*

【表５－９】

受託番号	供給源生物
N1M744	*ロドコッカス属種(Rhodococcus sp.)EsD8*
W3ZXB8	*ロドコッカス・ロドクラウス(Rhodococcus rhodochrous)ATCC*
A0A0A9CKJ6	*2 ダンチク(2 Arundo donax)*
F4PQH3	*ディクティオステリウム・ファスキクラツム(Dictyostelium fasciculatum)*
I0Z1P9	*コッコミクサ・サブエリプソイディア(Coccomyxa subellipsoidea)株*
A0A076ESS0	*ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus)*
D3BKV2	*シロカビモドキ(Polysphondylium pallidum)*
X0Q4M3	*推定ロドコッカス・ウラチスラビエンシス(Rhodococcus wratislaviensis)*
A0A1D6BHN7	*パンコムギ(Triticum aestivum)*
C1AZ37	*推定ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus)株B4*
M7ZG40	*ヒトツブコムギ(Triticum urartu)*
W8HEJ3	*ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus)PD630*
A0A135GJ74	*ロドコッカス属種(Rhodococcus sp.)SC4*
A0A149ZW75	*ロドコッカス属種(Rhodococcus sp.)LB1*
Q0SF32	*ロドコッカス・ジョスティ(Rhodococcus jostii)株R*
J2JJ09	*ロドコッカス属種(Rhodococcus sp.)JVH1*
K8XW36	*ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus)M213*
A0A152A546	*ディクトステリウム・ラクテウム(Dictyostelium lacteum)*
A0A0Q8ZY28	*フラボバクテリウム属種(Flavobacterium sp.)Root901*
L2TJT8	*ロドコッカス・ウラチスラビエンシス(Rhodococcus wratislaviensis)*
I0WB64	*ロドコッカス・イムテケンシス(Rhodococcus imtechensis)*
A0A1B1KC92	*ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus)*
I3C521	*ジョーステラ・マリナ(Joostella marina)DSM 19592*
A0A0F6W8X8	*サンダラシヌス・アミロリティクス(Sandaracinus amylolyticus)*
I3Z8X9	*ベリエラ・バルティカ(Belliella baltica)株DS*

【表５－１０】

受託番号	供給源生物
A0A0J6W3K0	マイコバクテリウム・オブエンス(*Mycobacterium obuense*)
A0A0Q7GA13	フラボバクテリウム属種(*Flavobacterium sp.*)Root420
D3BUR8	シロカビモドキ(*Polysphondylium pallidum*)
A0A098SD35	ファオダクティリバクター・キシアメネンシス(*Phaeodactylibacter xiamenensis*)
A0A0D1LF86	マイコバクテリウム・ラトゼレンセ(*Mycobacterium llatzerense*)
A0A0Q5QHB8	ウィラムジア属種(*Williamsia sp.*)Leaf354
A0A139VJG5	マイコバクテリウム・フレイ(*Mycobacterium phlei*)DSM 4323
F4PMW9	ディクトステリウム・ファスキクラツム(*Dictyostelium fasciculatum*)
A0A180ERQ3	レウィネラ属種(*Lewinella sp.*)4G2
Q8MMS1	キイロタマホコリカビ(*Dictyostelium discoideum*)
A0A101CR99	フラボバクテリウム科(*Flavobacteriaceae*)細菌
A0A0Q9TDE2	ノカルディオイデス属種(*Nocardioides sp.*)Soil805
A0A0Q9DX23	フラボバクテリウム属種(*Flavobacterium sp.*)Root935
A0A0C1XE41	ハッサリア・バイソイデア(*Hassallia byssoidea*)VB512170
A0A0J6W7K0	マイコバクテリウム・チュブエンス(*Mycobacterium chubuense*)
A0A0H4PGA5	シクロバクテリウム・アムルスキーエンス(*Cyclobacterium amurskyense*)
A0A1B1WLB8	マイコバクテリウム属種(*Mycobacterium sp.*)djl-10
A0A0Q8NET9	フラボバクテリウム属種(*Flavobacterium sp.*)Root186
A0A0J6ZGS8	マイコバクテリウム・クロロフェノリカム(*Mycobacterium chlorophenolicum*)
A0A085ZIW1	フラボバクテリウム・レイチェンバッキー(*Flavobacterium reichenbachii*)
J3BZ97	フラボバクテリウム属種(*Flavobacterium sp.*)株C
A0A066WRY7	フラボバクテリウム・セオウレンス(*Flavobacterium seoulense*)
K2PYQ1	ガルビバクター・マリヌス(*Galbibacter marinus*)
A0A0G4IN41	ネコブカビ(*Plasmodiophora brassicae*)
A0A1B5ZW29	アレニバクター属種(*Arenibacter sp.*)C-21

【表５－１１】

受託番号	供給源生物
A0A1B9DW83	*フラボバクテリウム・ピスシス(Flavobacterium piscis)*
A0A099CMP1	*マイコバクテリウム・ルフム(Mycobacterium rufum)*
A0A1B2U6C7	*フラボバクテリウム・ジョンソニエ(Flavobacterium johnsoniae)*
A0A0M8YPK7	*サッカロスリックス属種(Saccharothrix sp.)NRRL B-16348*
A0A0T1WAX5	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)Root135*
K0VAQ4	*マイコバクテリウム・バッカエ(Mycobacterium vaccae)*
A0A0Q9JG60	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)Soil538*
A0A0M0TLE5	*フラボバクテリウム属種(Flavobacterium sp.)VMW*
A0A151ZK81	*ディクトステリウム・ラクテウム(Dictyostelium lacteum)*
K6WMK4	*推定ゴルドニア・リゾスフェラ(Gordonia rhizosphera)NBRC 16*
L8GZJ4	*アカントアメーバ(Acanthamoeba castellanii)*
I4BLB8	*マイコバクテリウム・チュブエンス(Mycobacterium chubuense)*
H0RLL0	*推定ゴルドニア・ポリソプレニボランス(Gordonia polyisoprenivorans)*
A0A0C1LEQ5	*プラウセレラ属種(Prauserella sp.)Am3*
A0A1E4NXS4	*シュードノカルディア属種(Pseudonocardia sp.)SCN 73-27*
A0A1A1YGK6	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)ACS4331*
A0A0G3ILT8	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)EPa45*
G7GR35	*推定ゴルドニア・アマラエ(Gordonia amarae)NBRC 15530*
A0A1A2LUF7	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)E136*
A0A1A3GTN2	*マイコバクテリウム・ムコゲニカム(Mycobacterium mucogenicum)*
A0A1A0RZ49	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)852002-519*
A0A101AHK0	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)IS-1496*
A0A126YBZ9	*ストレプトマイセス・アルブス(Streptomyces albus)*
A0A0X3WJ69	*ストレプトマイセス・グリセウス亜種(Streptomyces griseus subsp.)*
A0A1C4KUQ6	*ストレプトマイセス属種(Streptomyces sp.)BvitLS-983*

【表５－１２】

受託番号	供給源生物
A0A1C4T5K2	*ストレプトマイセス属種(Streptomyces sp.)OspMP-M43*
A0A1A3C0V1	*マイコバクテリウム属種(Mycobacterium sp.)E740*
A0A0G4IKE4	*ネコブカビ(Plasmodiophora brassicae)*
K1VUE5	*ストレプトマイセス属種(Streptomyces sp.)SM8*
D6B5U8	*ストレプトマイセス・アルブス(Streptomyces albus)J1074*
A0A1C4NBH5	*ストレプトマイセス属種(Streptomyces sp.)ScaeMP-6W*
A0A1C4Q3W7	*ストレプトマイセス属種(Streptomyces sp.)IgraMP-1*
R7WSQ4	*ロドコッカス・ロドニ(Rhodococcus rhodnii)LMG 5362*
A0A0K2YP95	*ロドコッカス属種(Rhodococcus sp.)RD6.2*
XP_011566937	*コナガ(Plutella xylostella)*ペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 1 様
XP_011568279	*コナガ(Plutella xylostella)* 可能なペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 1
XP_011568389.1	*コナガ(Plutella xylostella)* 可能なペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 1
XP_011554180.1	*コナガ(Plutella xylostella)* 可能なペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 1
XP_011549583.1	*コナガ(Plutella xylostella)* 可能なペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 3
XP_011548846.1	*コナガ(Plutella xylostella)* 可能なペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 3
AAP37772	*A. thaliana_acyl-CoA oxidase – 3 (ACX3)*
XP_011548846.1	*plutella_xylostella_dbmfjv1x1_core_32_85_1__protein__XP_011548846.1* 予測されるペルオキシソームアシル-補酵素 A オキシダーゼ 3

【０２０１】

アシルトランスフェラーゼ

［0249］一部の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための組換え微生物及び方法が提供される。特定の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートは、Ｃ１８以下の炭素鎖長を有する。短鎖フェロモンを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する所定の酵素が１つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼと共発現される。このような好適なアシルトランスフェラーゼ酵素は、異種又は改変グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及び／又はジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）によって例示される。この目的に好適なアシルトランスフェラーゼの例が表５ｂに列挙される。

【０２０２】

[0250] 脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及び／又はジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）をコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する１つ以上のＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ又はＤＧＡＴで置換される。このような欠失又は下方制御標的としては、限定はされないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ、カンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９が挙げられる。他の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、ＡＸＰ酸細胞外プロテアーゼ遺伝子座（ＹＡＬＩ０Ｂ０５６５４ｇ）において挿入される。

【０２０３】

[0251] 従って、一部の実施形態では、本開示は、９２からなる群から選択される配列番号のいずれか１つとの少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示すアシルトランスフェラーゼを含む組換え微生物を教示する。

【０２０４】

[0252] 従って、一部の実施形態では、本開示は、アシルトランスフェラーゼをコードする核酸分子を含む組換え微生物を教示し、前記核酸分子は、９１からなる群から選択される配列番号のいずれか１つとの少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を示す。

【０２０５】

[0253] 一部の実施形態では、本開示は、配列番号９２からなる群から選択されるアシルトランスフェラーゼに対する少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８

４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、７５％、７４％、７３％、７２％、７１％、７０％、６９％、６８％、６７％、６６％、６５％、６４％、６３％、６２％、６１％、６０％、５９％、５８％、５７％、５６％、５５％、５４％、５３％、５２％、５１％又は５０％の配列同一性を有するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む組換え微生物を教示する。

【０２０６】

[0254] 一部の実施形態では、本開示は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及び／又はＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のアシルトランスフェラーゼの活性の欠失、破壊、変異及び又は低下を含む組換え微生物を教示する。

【０２０７】

[0255] 従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）によってコードされるタンパク質との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失又は他の破壊を含むであろう。

【０２０８】

[0256] 従って、一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、uniprotデータベースＩＤ　Ｑ６Ｃ３Ｒ１（ＤＧＡ１）及び／又はＱ６Ｃ９Ｖ５（ＤＧＡ２）との少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％又は９０％の配列同一性を示すタンパク質をコードする内因性遺伝子における欠失を含むであろう。

【０２０９】

グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）

[0257] 本開示は、以下のように示されるグリセロール－３－リン酸のｓｎ－１位におけるアシル化反応を触媒する酵素を記載する：

[0258] 長鎖アシル－ＣｏＡ＋ｓｎ－グリセロール－３－リン酸→１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸＋補酵素Ａ。

【０２１０】

[0259] グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）は、グリセロール－３－リン酸のｓｎ－１位におけるアシル化反応を触媒する。植物細胞は、葉緑体、ミトコンドリア及び細胞質中に位置する３つのタイプのＧＰＡＴを含有する。葉緑体中の酵素は、可溶性であり、アシル供与体としてアシル－（アシル－キャリアータンパク質）を使用する一方、ミトコンドリア及び細胞質中の酵素は、膜に結合され、アシル供与体としてアシル－ＣｏＡを使用する（Nishida I et al.(1993)The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol.21(2):267-77；Murata N and Tasaka Y (1997)Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. Biochim Biophys Acta. 1348(1-2):10-16）。

【０２１１】

[0260] ８つのＧＰＡＴ遺伝子は、シロイヌナズナ属（Arabidopsis）において同定された（Zheng Z et al.(2003)Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. Plant Cell 15(8):1872-87）。ＧＰＡＴ１は、ミトコンドリア酵素をコードすることが示された（Zheng et al. 2003）。ＧＰＡＴ４、ＧＰＡＴ５及びＧＰＡＴ８は、クチン生合成に不可欠であることが示された（Beisson F et al.(2007)The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. Plant Cell 19(1):351-368；Li,Y et al.(2007)Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers.Proc Natl Acad Sci USA 104(46):18339-18344）。ＧＰＡＴ２、ＧＰＡＴ３、ＧＰＡＴ６及びＧＰＡＴ７は、依然

として特徴付けられていない。

【０２１２】

［0261］細胞質ＧＰＡＴは、トリアシルグリセロール及び非葉緑体膜リン脂質の合成に関与している。それは、パルミテート（Ｃ１６：０）及びオレエート（Ｃ１８：１）に対して基質選択性を有することが予測され、なぜなら、これらの２つの脂肪酸は、植物トリアシルグリセロールのｓｎ－１位置において見られる最も一般的なものであるためである。細胞質ＧＰＡＴは、アボカドから部分的に精製された（Eccleston VS and Harwood JL(1995)Solubilisation, partial purification and properties of acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado(Persea americana)fruit mesocarp. Biochim Biophys Acta 1257(1):1-10）。

【０２１３】

［0262］大腸菌（E. coli）由来の膜結合グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＰｌｓＢ）は、リン脂質生合成における第１の関与段階を触媒し、後続の酵素１－アシルグリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＰｌｓＣ）に近接して機能するものと考えられる（Kessels JM et al.(1983)Facilitated utilization of endogenously synthesized lysophosphatidic acid by 1-acylglycerophosphate acyltransferase from Escherichia coli. Biochim Biophys Acta 753(2):227-235）。それは、ｓｎ－グリセロール－３－リン酸の位置１におけるアシル化に特有であり、アシル供与体として脂肪アシル－アシルキャリアータンパク質（アシル－ＡＣＰ）又は脂肪アシル－補酵素Ａ（アシル－ＣｏＡ）チオエステルのいずれかを用いて、１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸を形成し得る。内因的に合成された脂肪酸は、ＡＣＰに結合され、外部から加えられた脂肪酸は、ＣｏＡに結合される。大腸菌（E. coli）リン脂質において、ｓｎ　１位置は、主に、パルミテート又はシス－バクセネートのいずれかによって占められ、ｓｎ　２位置は、主に、パルミトレエート又はシス－バクセネートである。これは、ＰｌｓＢ及びＰｌｓＣ酵素の基質選択性に起因するものと考えられる。

【０２１４】

［0263］ｐｌｓＢ遺伝子は、ＲＮＡポリメラーゼ、シグマ２４（シグマＥ）因子及びｐｐＧｐｐなどのストレス反応調節因子によって調節されることが示されている（Wahl A et al.(2011)Antagonistic regulation of dgkA and plsB genes of phospholipid synthesis by multiple stress responses in Escherichia coli. Mol Microbiol 80(5):1260-75）。ＰｌｓＢは、リン脂質合成のタンパク質ネットワークの一部であり、ホロ－［アシル－キャリアータンパク質］（ＡＣＰ）、エステラーゼ／チオエステラーゼ（ＹｂｇＣ）及びホスファチジルセリンシンターゼ（ＰｓｓＡ）と相互作用して、内膜の細胞質側において複合体を形成する。

【０２１５】

［0264］ｐｌｓＢは、成長に不可欠である（Baba T et al.(2006)Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2:2006-2008；Yoshimura M et al.(2007)Involvement of the YneS/YgiH and PlsX proteins in phospholipid biosynthesis in both Bacillus subtilis and Escherichia coli. BMC Microbiol 7:69）。

【０２１６】

［0265］部位特異的突然変異誘発及び化学修飾研究は、触媒反応に不可欠な不変ヒスチジン残基を含む、ＰｌｓＢにおける触媒上重要なアミノ酸残基を実証した（Lewin TM et al.(1999)Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. Biochemistry 38(18):5764-5771）。遺伝学的研究は、多剤耐性休眠細胞（persister cell）の形成に関与するｐｌｓＢ遺伝子座を同定した。

【０２１７】

［0266］大腸菌（E. coli）Ｂ酵素の特性は、過去の研究において研究された（Kito M et al.(1972)Inhibition of L-glycerol 3-phosphate acyltransferase from Escheri

chia coli by cis-9, 10-methylenehexadecanoic acid. J Biochem 71(1):99-105；Okuyama H and Wakil SJ(1973)Positional specificities of acyl coenzyme A: glycerophosphate and acyl coenzyme A: monoacylglycerophosphate acyltransferases in Escherichia coli.J Biol Chem 248(14):5197-5205；Kito M et al.(1978) Function of phospholipids on the regulatory properties of solubilized and membrane-bound sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase of Escherichia coli.Biochim Biophys Acta 529(2):237-249）。

【０２１８】

［0267］グリセロール－３－リン酸／ジヒドロキシアセトンリン酸二重基質特異的ｓｎ－１アシルトランスフェラーゼは、脂質粒子及び小胞体中に位置し、脂質生合成におけるグリセロール－３－リン酸及びジヒドロキシアセトンの段階的アシル化に関与している。最も保存的なモチーフ及び機能的に関連する残基が小胞体内腔に対して配向される。

【０２１９】

［0268］二重グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ（ＤＨＡＴ）をコードする遺伝子（ＳＣＴ１）は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）から同定され、クローニングされ、生化学的に特徴付けられる。非常に低いＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性を示す酵母Δｇｐｔ１突然変異体において、プラスミドベクターを介したＳＣＴ１の過剰発現は、グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼとしての提示された分子機能の根底にある増加したＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性を示した。アシル供与体に対するＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性は、パルミトレオイル－ＣｏＡで最も高く、続いてパルミトイル－ＣｏＡ、オレオイル－ＣｏＡ及びステアロイル－ＣｏＡである。ＳＣＴ１ｐは、サイトゾル中の膜、おそらく小胞体に限局されていた。Δｓｃｔ１突然変異体のインビボ研究は、全ての４つのリン脂質に対する影響を示したが、ホスファチジルエタノールアミンクラスにおける１６：０脂肪酸の観察された減少は、他の脂肪酸、特に１８：０分子種の増加によって相殺された。ＳＣＴ１及びＧＰＴ２のヌル突然変異体は、酵母において合成致死性であった（Zheng Z and Zou J(2001)The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 276(45):417104-41716）。

【０２２０】

［0269］サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）からの二重グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ（ＤＨＡＴ）をコードする遺伝子（ＧＰＴ２）を同定し、クローニングし、生化学的に特徴付けた。ＧＰＴ２は、ＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性を有さないΔｐｌｓＢバックグラウンド中の大腸菌（E. coli）において組換え的に発現され、増加したＧＡＴ活性を示したが、おそらく膜中へのＧＰＴ２の不適切な埋め込みのため、突然変異体をレスキューすることはできなかった。非常に低いＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性を示す酵母Δｇｐｔ１突然変異体において、プラスミドベクターからのＧＰＴ２の過剰発現は、グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼとしての提示された分子機能の根底にある増加したＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性を示した。アシル供与体に対するＧＡＴ／ＤＨＡＴ活性は、オレオイル－ＣｏＡで最も高く、続いてパルミトレオイル－ＣｏＡ、パルミトイル－ＣｏＡ及びステアロイル－ＣｏＡであった。

【０２２１】

［0270］ＧＰＴ２ｐは、サイトゾル中の膜に限局されていた。Δｇｐｔ２突然変異体のインビボ研究は、全脂肪酸プロファイルに対する有意な影響を示さなかったが、ホスファチジルエタノールアミンクラスにおける１６：１脂肪酸の減少が観察され、これは、１６：０及び１８：１分子種の増加によって相殺された。ＧＡＴ活性が欠損した公知の酵母突然変異体ＴＴＡ１の分析は、ＴＴＡ１　ＧＰＴ２遺伝子がアシルトランスフェラーゼのた

めの保存モチーフＩＩＩにおける１つのヌクレオチド変化によるミスセンス突然変異を有していたことを示した。ＳＣＴ１及びＧＰＴ２のヌル突然変異体は、酵母において合成致死性であった（Zheng and Zou 2001）。

【０２２２】

［0271］一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）（Ａｔ１ｇ０２３９０）由来のＧＰＡＴである。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、大腸菌（E. coli）（遺伝子ＩＤ　ＥＧ１０７４０）由来のＰｌｓＢである。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）（ＹＢＬ０１１ｗ）由来の二重グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ（ＤＨＡＴ）ＳＣＴ１である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇである。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＩ５０３＿０２５７７である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０２６３０である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）（ＹＫＲ０６７ｗ）由来の二重グリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）／ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ（ＤＨＡＴ）ＧＰＴ２である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．５８１５である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．１３２３７である。一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０２６３０である。

【０２２３】

リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）

［0272］本開示は、トリアシルグリセロールのｓｎ－２位置のアシル化を触媒する酵素を記載する。

【０２２４】

［0273］遺伝子ｐｌｓＣによってコードされる膜結合１－アシルグリセロール－３－リン酸Ｏ－アシルトランスフェラーゼは、リン脂質生合成における第２の段階を触媒し、遺伝子ｐｌｓＢによってコードされる先行する酵素グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼに近接して機能するものと考えられる（Kessels JM et al. 1983）。それは、１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸のｓｎ－２位置におけるアシル化に特有であり、脂肪アシル供与体としてアシル－アシルキャリアータンパク質（アシル－ＡＣＰ）又はアシル－補酵素Ａ（アシル－ＣｏＡ）を用いて、１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸（ホスファチデート、ホスファチジン酸）を形成し得る。内因的に合成される脂肪酸は、ＡＣＰに結合され、外部から加えられた脂肪酸は、ＣｏＡに結合される（Greenway DL and Silbert DF(1983)Altered acyltransferase activity in Escherichia coli associated with mutations in acyl coenzyme A synthetase. J Biol Chem 258(21):13034-13042）。大腸菌（E. coli）リン脂質において、ｓｎ　１位置は、主に、パルミテート又はシス－バクセネートのいずれかによって占められる一方、ｓｎ　２位置は、主に、パルミトレエート又はシス－バクセネートである。これは、ＰｌｓＢ及びＰｌｓＣ酵素の基質選択性に起因するものと考えられる（Rock CO et al.(1981)Phospholipid synthesis in Escherichia coli. Characteristics of fatty acid transfer from acyl-acyl carrier protein to sn-glycerol 3-phosphate.J Biol Chem 256(2):736-742；Goelz SE及びCronan JE(1980)The positional distribution of fatty acids in Escherichia coli phospholipids is not regulated by sn-glycerol 3-pho

sphate levels. J Bacteriol 144(1):462-464）。

【０２２５】

［0274］部位特異的突然変異誘発研究は、トレオニン－１２２をアラニン又はロイシンに変更することがアシル－ＣｏＡ基質特異性の変化をもたらしたことを示した（Morand LZ et al.(1998)Alteration of the fatty acid substrate specificity of lysophosphatidate acyltransferase by site-directed mutagenesis. Biochem Biophys Res Commun 244(1):79-84）。

【０２２６】

［0275］大腸菌（E. coli）の改変された株において、ＰｌｓＣ及びＧａｌＵの過剰発現は、グリセロ糖脂質の増加した生成をもたらした（Mora-Buye N et al.(2012).An engineered E. coli strain for the production of glycoglycerolipids. Metab Eng 14(5):551-559）。

【０２２７】

［0276］肺炎レンサ球菌（Streptococcus pneumoniae）のｐｌｓＣ遺伝子は、大腸菌（E. coli）酵素に相同な１－アシルグリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼをコードする。この遺伝子をクローニングし、大腸菌（E. coli）において発現させ、それを発現する膜が、予測される機能を触媒することが示された（Lu YJ et al.(2006)Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. Mol Cell 23(5):765-772）。

【０２２８】

［0277］植物リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）は、トリアシルグリセロールのｓｎ－２位置のアシル化を触媒する。所与の植物種におけるＬＰＡＡＴの基質特異性は、一般に、いずれの脂肪酸種がｓｎ－２位置において組み込まれるかを決定する。ＬＰＡＡＴがトウモロコシ及びメドウフォームからクローニングされた。メドウフォームには２つのＬＰＡＡＴ遺伝子がある一方、トウモロコシには１つのみである。メドウフォームにおけるＬＡＴ１及びＬＡＴ２の両方の酵素活性がインビトロアッセイによって確認された。更に、ＬＡＴ２は、大腸菌（E. coli）ＬＰＡＡＴ欠損株を機能的に補完することが示された（Brown AP et al.(2002)Limnanthes douglasii lysophosphatidic acid acyltransferases: immunological quantification, acyl selectivity and functional replacement of the Escherichia coli plsC gene.Biochem J 364(Pt 3):795-805）。

【０２２９】

［0278］ＬＡＴ１は、基質として１８：１－ＣｏＡのみを使用する高度に選択的なアシルトランスフェラーゼである。ＬＡＴ２は、あまり選択的でない。最も高い活性が２２：１－ＣｏＡに対して示され、続いて１６：０－及び１８：１－ＣｏＡである。ＬＡＴ１及びＬＡＴ２の基質特異性は、膜脂質生合成におけるＬＡＴ１及び貯蔵脂質生合成におけるＬＡＴ２についての、それらの提示される役割と一致している。植物細胞膜は、主に、Ｃ１６及びＣ１８不飽和脂肪酸を含有する一方、貯蔵脂質は、飽和脂肪酸及び非常に長鎖の不飽和脂肪酸を含む広範囲の脂肪酸を含有する。様々な植物組織におけるＬＡＴ１及びＬＡＴ２のタンパク質レベルが抗体によって検出された。ＬＡＴ１は、葉及び成長中の種子の両方に存在する一方、ＬＡＴ２は、成長中の種子のみに検出される。これも、それらの提示される役割と一致している。トリアシルグリセロール生合成におけるＬＡＴ２の役割は、ｓｎ－２位置において２２：１－ＣｏＡを通常含まない菜種におけるＬＡＴ２の形質転換によって更に示された。メドウフォームＬＡＴ２の形質転換は、ｓｎ－２位置において２２：１－ＣｏＡを挿入した（Lassner MW et al.(1995)Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil.Plant Physiol 109(4):1389-1394）。

【０２３０】

［0279］スフィンゴ脂質生合成を欠いた生存突然変異体サッカロミセス・セレビシエ（

Saccharomyces cerevisiae）株を用いて、遺伝子ＳＬＣ１が単離され、アシル－ＣｏＡ：リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼをコードすることが実証された。１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼとして分類される大腸菌（E. coli）のＰＬＳＣタンパク質との配列相同性が同様の機能を示した。ＳＬＣ１ｐのこの推定分子機能は、大腸菌（E. coli）のΔｐｌｓＣ突然変異体をレスキューする能力によって裏付けられた。位置１３１においてＬ－グルタミンをＬ－ロイシンに変更する単一のヌクレオチド改変は、Ｃ１６及びＣ１８脂肪酸からＣ２６脂肪酸に基質選択性を変換したことが示され、これは、突然変異体（ＳＬＣ１－１）に対する野生型（ＳＬＣ１）の対応する脂肪酸組成においてインビボで反映された（Nagiec MM et al.(1993)A suppressor gene that enables Saccharomyces cerevisiae to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase.J Biol Chem 268(29):22156-22163）。

【０２３１】

［0280］ 大腸菌（E. coli）において組換え的に発現され、精製されたＳＬＣ１ｐを用いたインビトロアッセイは、リゾホスファチジン酸及びオレオイル－ＣｏＡに対する基質選択性を示したが、１－パルミトイルグリセロール３－リン酸及び１－ステアロイル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸も受容した。Δｓｌｃ１、Δｓｌｃ４（別の可能なアシル－ＣｏＡ：ホスファチジルアシルトランスフェラーゼ）などの突然変異体及び２．ΔＳＬＣ１（又は２．ΔＳＬＣ４）と呼ばれるＳＬＣ１又はＳＬＣ４遺伝子のいずれかを有するプラスミドを保有するΔｓｌｃ１Δｓｌｃ４の二重突然変異体のインビボ研究は、ＳＬＣ１がホスファチデート及び更にホスファチジルイノシトール及びジアシルグリセロールの生合成を促進したことを示した。ＳＬＣ１は、インビボでグリセロリン脂質上の脂肪酸を変更することによるリン脂質リモデリングに関与していることが示唆された（Benghezal M et al.(2007)SLC1 and SLC4 encode partially redundant acyl-coenzyme A 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases of budding yeast.J Biol Chem 282(42):30845-30855）。

【０２３２】

［0281］ 公知のアシルトランスフェラーゼ酵素の候補オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を用いた酵母ゲノムをスクリーニングし、関連する欠失株を試験して、アシル－ＣｏＡ依存性リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＡＬＥ１）をコードする遺伝子を同定した。Δａｌｅ１株において、リゾホスファチジルエタノールアミンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＥＡＴ）活性の劇的な減少が観察されたが、ＡＬＥ１ｐは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）中の主なＬＰＡＡＴ、すなわちＳＬＣ１ｐが存在しないか又は不活性にされるとき、過剰なリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）活性を提供し得ることも実証され得る。ＡＬＥ１ｐは、好ましくは、可変長さの不飽和アシル鎖をリゾリン脂質のｓｎ－２位置に結合する。酵素は、高純度の細胞分画を用いてミクロソーム及びミトコンドリア膜の両方に限局された。ＡＬＥ１は、酵母における外因性リゾ脂質代謝（ＥＬＭ）経路における主なＬＰＥＡＴであり得るが、それは、内因性Kennedy経路の効率的な機能にも必要とされることが示された（Riekhof WR et al.(2007)Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 282(39):28344-28352）。

【０２３３】

［0282］ 同時研究において、ＬＰＴ１（ＡＬＥ１と同義）は、合成遺伝子アレイ解析を適用することによって同定され、リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有することが示された。この研究において、ＬＰＴ１（＝ＡＬＥ１）のための最良の基質は、リゾホスファチジルコリンであり、それによりリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）として作用し、以前に報告されたＬＰＡＡＴとしての残りの活性も、単一のΔｌｐｔ１及び二重Δｓｃｌ１Δｌｐｔ１突然変異体を用いて実証されており、後者は生存不可能である。ホスファチジルコリン中にオレエートを組み込む比率は、デノ

ボ合成に向けて７０％及びリモデリングに向けて３０％として決定された（Jain S et al.(2007)Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 282(42):30562-30569）。

【０２３４】

[0283] リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）としてのＡＬＥ１（ＬＣＡ１又はＳＬＣ４とも呼ばれる）の分子機能は、ホスファチジルコリン（ＰＣ）中への放射性標識したリゾホスファチジルコリン及び／又はパルミトイル－ＣｏＡの組み込みをモニターする別の同時研究において裏付けられた。この研究は、ＡＬＥ１ｐ（この試験では＝ＬＣＡ１ｐ）が様々なアシル供与体を受け入れることを確認したが、リゾホスファチジルコリン種のアシル鎖にかかわらずＬＰＣＡＴとして最も高い活性を示した（１６：０又は１８：１）。更に、Ｚｎ２＋に対する高い感度が観察されたが、これは、０．１ｍＭを超える濃度で抑制性であり、より低い濃度（１０～２５μＭ）で活性化する。ＡＬＥ１ｐ（＝ＬＣＡ１ｐ）について測定された高いＰＣターンオーバー率は、主な触媒としての酵素がＰＣの再アシル化に関与していたことを強調した（Chen Q et al.(2007)The yeast acylglycerol acyltransferase LCA1 is a key component of Lands cycle for phosphatidylcholine turnover.” FEBS Lett 581(28):5511-5516）。

【０２３５】

[0284] サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）における脂肪滴（ＬＤ）の形成の異常を引き起こす遺伝子の探求により、アシル－ＣｏＡ依存性リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子ＬＯＡ１（以前はＶＰＳ６６）が同定された。ＬＯＡ１ｐのインビボ分子機能は、野生型及びΔｌｏａ１酵母株のリピドームの比較を用いて決定された。分析は、ＬＯＡ１欠損突然変異体（Δｌｏａ１）において、オレエート含有ホスファチデート分子種のパーセンテージがかなり低下され、トリアシルグリセロール（ＴＧＡ）の含量が２０パーセント低下されたことを示した。タンパク質は、大腸菌（E. coli）において組換え的に発現され、高度に濃縮された脂肪滴画分を得ることにより、且つマトリックスビーズに依然として結合されているＬＯＡ１ｐによるアフィニティークロマトグラフィーにより部分的に精製された。精製されたＬＯＡ１ｐは、インビトロアッセイにおいて特徴付けられ、これは、ＬＯＡ１ｐがリゾホスファチジン酸及びオレオイル－ＣｏＡに特異的であり、従って、酵母においてオレオイル－ＣｏＡ：リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼとして作用することを実証する。この結果に基づいて、ＬＯＡ１ｐは、ＴＡＧ生合成への過剰なオレエート含有ホスファチデート種の組み込み及び脂肪滴（ＬＤ）の適切な発生にかなり関与することが提示された。ゲノムタグ付けコンストラクト、細胞下分画、免疫組織化学及び蛍光顕微鏡検査法を用いて、ＬＯＡ１は、小胞体（ＥＲ）及び脂肪滴（ＬＤ）の両方に限局された（Ayciriex S et al.(2012)YPR139c/LOA1 encodes a novel lysophosphatidic acid acyltransferase associated with lipid droplets and involved in TAG homeostasis. Mol Biol Cell 23(2):233-246）。

【０２３６】

[0285] 一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、大腸菌（E. coli）（MetaCyc受託ＩＤ　ＥＧ１１３７７）由来のｐｌｓＣである。他の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、肺炎レンサ球菌（S. pneumoniae）（MetaCyc受託ＩＤ　Ｇ－１０７６３）由来のｐｌｓＣである。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、リムナンテス・ダグラシー（Limnanthes douglasii）由来のＬＡＴ１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、リムナンテス・ダグラシー（Limnanthes douglasii）（MetaCyc受託ＩＤ　Ｇ－９３９８）由来のＬＡＴ２である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（ＹＤＬ０５２ｃ）由来のＳＬＣ１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇである。一部の実施形態では、

リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．２５０である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．７８８１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０２４３７である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（ＹＯＲ１７５Ｃ）由来のＡＬＥ１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇである。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．１８８１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．９４３７である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０１６８７である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（ＹＰＲ１３９Ｃ）由来のＬＯＡ１である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇである。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．１０４３である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．８６４５である。一部の実施形態では、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０４７５０である。

【０２３７】

グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）

［0286］本開示は、以下の反応を触媒する酵素を記載する：

［0287］１－アルキル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン＋２－アシル－１－アルキル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン⇔Ｏ－１－アルキル－２－アシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン＋１－アルキル－２－リゾ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン。

【０２３８】

［0288］ＧＰＬＡＴ酵素は、無傷のコリン－又はエタノールアミン含有グリセロールリン脂質からリゾグリセロールリン脂質のｓｎ－２位置への脂肪酸の移動を触媒する。供与体又は受容体分子のｓｎ－１上のオルガニル基は、アルキル、アシル又はアルク－１－エニルであり得る。用語「ラジル（radyl）」は、このような置換基を指すのにときに使用されている。酵素は、補酵素Ａを必要とし、多価不飽和アシル基を移動するのに有利に機能しない。

【０２３９】

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）

［0289］本開示は、アシル基をジアシルグリセロール（ＤＡＧ）のｓｎ－３位置に付加して、トリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を形成する酵素を記載する。

【０２４０】

［0290］ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）は、トリアシルグリセロール生合成において固有の反応のみを触媒する。以下に示されるように、それは、アシル基をジアシルグリセロール（ＤＡＧ）のｓｎ－３位置に付加し、トリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を形成する：

［0291］アシル－ＣｏＡ＋１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロール→トリアシル－ｓｎ－グリセロール＋補酵素Ａ。

【０２４１】

［0292］ＤＧＡＴは、シロイヌナズナ属（Arabidopsis）ＤＧＡＴについて実証されているように、Ｃ１８：１、Ｃ１８：２及びＣ２０：１アシル－ＣｏＡを含む広範囲のアシル－ＣｏＡをアシル供与体として受容する（Jako C et al.(2001)Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight.Plant Physiol 126(2):861-874）。昆虫細胞培養物及び酵母中でＤＧＡＴのシロイヌナズナ属（Arabidopsis）ｃＤＮＡを発現させること並びに野生型シロイヌナズナ属（Arabidopsis）においてｃＤＮＡを過剰発現させることは、ＤＡＧのｓｎ－３位置にアシル基を移動させる際のＤＧＡＴ活性を実証した（Hobbs DH et al.(1999)Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis thaliana and its functional expression. FEBS Lett 452(3):145-149；Zou Ｊ et al.(1999)The Arabidopsis thaliana TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene.Plant Ｊ 19(6):645-653）。野生型シロイヌナズナ属（Arabidopsis）におけるシロイヌナズナ属（Arabidopsis）ｃＤＮＡの過剰発現は、種子における油の堆積を増加させ、この増加は、ＤＧＡＴの増加したｍＲＮＡ発現レベルに相関している。これは、ＤＧＡＴがトリアシルグリセロール生合成経路の調節点であることを示す。

【０２４２】

［0293］二機能性アシル－ＣｏＡ：アシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）をコードする遺伝子は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）において、トリアシルグリセロール生合成の主要な寄与因子として同定された（Sandager L et al.(2002)Storage lipid synthesis is non-essential in yeast.J Biol Chem 277(8):6478-6482）。遺伝子（ＤＧＡ１）は、メンバーがアシル－ＣｏＡ依存性アシルトランスフェラーゼとして特徴付けられるＤＧＡＴ２ファミリーに属する（Lardizabal KD et al.(2001)DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from Mortierella ramanniana with diacylglycerol acyltransferase activity.”Ｊ Biol Chem 276(42):38862-38869）。ＤＧＡ１ｐは、酵母ゲノムにおけるジアシルグリセロール（ＤＡＧ）からトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）へのエステル化を触媒する唯一のアシル－ＣｏＡ依存性アシルトランスフェラーゼであることが実証された。これは、ＤＧＡ１（Δｄｇａ１）の欠失突然変異体中において、且つ酵母において重要な他のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、すなわちリン脂質アシル供与体（Δｌｒｏ１）を用いてＤＡＧをエステル化するＬＲＯ１と組み合わせて示される。Δｄｇａ１Δｌｒｏ１二重突然変異体において、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼのほぼ全てが喪失され、ＴＡＧ合成がなくされた。ＤＧＡ１遺伝子を保有するプラスミドは、突然変異体におけるＴＡＧ合成欠損をレスキューすることができ、これは、インビボＤＧＡ１がＴＡＧ生合成経路に深く関与していたことを示す（Sorger D,Daum G(2002).Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Ｊ Bacteriol 184(2):519-524；Oelkers P et al.(2002)The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. Ｊ Biol Chem 277(11):8877-8881）。インビトロで、オレオイル－ＣｏＡ及びパルミトイル－ＣｏＡに対するＤＧＡ１ｐの選好性が観察され、これは、リン脂質依存性アシルトランスフェラーゼＬＲＯ１ｐについては逆であった（Oelkers et al.2002）。

【０２４３】

［0294］更に、アシル－ＣｏＡ依存性モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＭＧＡＴ）としてのＤＧＡ１ｐの機能は、Δｄｇａ１突然変異体をインビボで用いることにより、６０％超のＭＧＡＴ活性が喪失されたことを実証した。ＤＧＡ１のインビトロＭＧＡＴ活性は、プロセスにおいて１，２－ジオレオイルグリセロールを生じる２－オレオイルグリセロールのオレオイル－ＣｏＡ依存性エステル化によって示された（Heier C

et al.(2010)Identification of Yju3p as functional orthologue of mammalian monoglyceride lipase in the yeast Saccharomyces cerevisiae.Biochim Biophys Acta 1801(9):1063-1071）。

【０２４４】

［0295］ ＤＧＡ１ｐの一次配列における配列モチーフの機能的重要性及びトポロジー的配向の更なる洞察は、インシリコ分析、シグネチャーモチーフの部位特異的突然変異誘発並びにＣ末端及びＮ末端の欠失突然変異によって得られた。他のＤＧＡＴ２ファミリーメンバーにおいて見られるシグネチャーモチーフに加えて、サッカロミセス属（Saccharomyces）は、酵素活性を有意に調節することが示されている固有の親水性区間を有することが実証され得る。また、４つの決定された膜貫通ドメインの２つ目におけるヒスチジン残基１９５が酵素活性に不可欠であることが分かった。ＤＧＡ１のトポロジーは、Ｃ末端及びＮ末端の両方が細胞質に面し、Ｃ末端がＮ末端よりＤＧＡ１活性にとって重要であったことを示した（Liu Q et al.(2011)Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2, an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis.J Biol Chem 286(15):13115-13126）。

【０２４５】

［0296］ 高度に精製された細胞断片及び免疫ブロット法を用いて、Sorger et al.(2002)及びLiu et al.(2011)は、ＤＧＡ１が脂肪滴及びミクロソーム膜、おそらく小胞体に限局されていたことを実証した。

【０２４６】

［0297］ アシネトバクター属種（Acinetobacter sp.）ＡＤＰ１は、ワックスエステルシンターゼ（ＷＳ）及びアシル－ｃｏＡ：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）活性の両方を示す二機能性酵素を発現する（Kalscheuer R and Steinbuchel A(2003)A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in Acinetobacter calcoaceticus ADP1.J Biol Chem 278(10):8075-8082）。このホモ二量体は、ＴＡＧ及びＷＥ生合成における最終段階を触媒する（Stoveken T et al.(2005)The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from Acinetobacter sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase. J Bacteriol 187(4):1369-1376）。それは、オキソエステル及びチオエステル結合形成の両方を媒介し、広い基質範囲を有し、中鎖脂肪アルコール及びアシル－ＣｏＡエステル並びにモノアシルグリセロール（ＭＡＧ）を受容する（Uthoff S et al.(2005)Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase of Acinetobacter sp. strain ADP1. Appl Environ Microbiol 71(2):790-796）。

【０２４７】

［0298］ 一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）（遺伝子ＩＤ ＡＴ２Ｇ１９４５０）由来のＴＡＧ１である。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）（ＹＯＲ２４５ｃ）由来のＤＧＡ１である。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、アシネトバクター属種（Acinetobacter sp.）ＡＤＰ１（MetaCyc受託ＩＤ ＡＣＩＡＤ０８３２）由来のａｔｆＡである。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇである。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．６９４１である。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．１４２０３である。一部の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０６２０９である。

【０２４８】
［0299］リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＰＤＡＴ）は、以下の反応を触媒する：ホスファチジルコリン＋１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロール→トリアシル－ｓｎ－グリセロール＋１－アシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン。
【０２４９】
［0300］シロイヌナズナ属（Arabidopsis）ＰＤＡＴは、いずれかのｓｎ－位置における１０～２２炭素鎖長のアシル基を有するアシル供与体として様々なリン脂質を使用し得る（Stahl U et al.(2004)Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. Plant Physiol 135(3):1324-1335）。しかしながら、ホスファチジルコリンのｓｎ－２位置におけるアシル基は、ｓｎ－１位置におけるより３倍多く使用される。最も高い活性は、複数の二重結合を有するアシル基、エポキシ又はヒドロキシ基で得られる。試験される中で、酵素活性は、リシノレオイルで最も高かった。１８：０－及び２２：１－アシル基が最も低い酵素活性を示した。様々なリン脂質種の中で、最も高い活性は、ホスファチデート又はホスファチジルコリンよりホスファチジルエタノールアミンで得られる。
【０２５０】
［0301］ＰＤＡＴ活性がトウゴマ種子ミクロソーム画分で検出された。放射性標識リシノレオイル及びベルノロイル基がホスファチジルコリンからＤＡＧに有効に移動されて、トリアシルグリセロールを形成する（Dahlqvist A et al.(2000)Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. Proc Natl Acad Sci USA 97(12):6487-6492）。
【０２５１】
［0302］他の実施形態では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＰＤＡＴ）である。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）（遺伝子ＩＤ　ＡＴ５Ｇ１３６４０）由来である。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、トウゴマ（Ricinus communis）由来である。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（ＹＮＲ００８ｗ）由来のＬＲＯ１である。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇである。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）由来のＣａＯ１９．１３４３９である。一部の実施形態では、ＰＤＡＴは、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）由来のＣＴＲＧ＿０４３９０である。
【０２５２】
［0303］一部の実施形態では、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素と異なる。一部の実施形態では、１つ以上の内因性又は外因性アシルトランスフェラーゼ酵素は、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及び／又はジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）を含む。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、表５ｂから選択される。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素は、Ｙ．

リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ、カンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９から選択される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、フェロモン生合成経路酵素を更に発現する。更なる実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートを含む。更に別の実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼを含む。

【０２５３】

［0304］ 一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する方法が提供され、本方法は、アシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させ、アシルトランスフェラーゼをコードする１つ以上の遺伝子における欠失、挿入又は機能喪失突然変異を導入することを含み、導入又は発現されるアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、欠失又は下方制御されるアシルトランスフェラーゼをコードする１つ以上の遺伝子と異なる。一部の実施形態では、導入又は発現されるアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子又は欠失又は下方制御されるアシルトランスフェラーゼをコードする１つ以上の遺伝子は、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及び／又はジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好するアシルトランスフェラーゼをコードする。一部の実施形態では、少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、表５ｂから選択されるアシルトランスフェラーゼをコードする。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ、カンジダ属（Candida）Ｉ５０３

＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９から選択される。一部の実施形態では、本方法は、脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。更なる実施形態では、本方法は、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。

【０２５４】

【表５－１３】

表 5b. 例示的アシルトランスフェラーゼ

受託番号	**供給源生物**
AAL49962.1	*ボス・タウルス(Bos taurus)*
BAC43739.1	*ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)*
AAH89846.1	*ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)*
F6TMU0	*エクウス・カバルス(Equus caballus)*
F6PXX7	*エクウス・カバルス(Equus caballus)*

【表５－１４】

受託番号	供給源生物
F7B020	*エクウス・カバルス(Equus caballus)*
ALT83519.1	*マカダミア・テトラフィラ(Macadamia tetraphylla)*
ANN46862.1	*クフェア・アビゲラ(Cuphea avigera)*
ANN46863.1	*クフェア・アビゲラ(Cuphea avigera)*
ANN46864.1	*クフェア・アビゲラ(Cuphea avigera)*
ANN46865.1	*クフェア・アビゲラ(Cuphea avigera)*
AAC49119.1	*ココヤシ(Cocos nucifera)*
JAT48335.1	*アンスリウム・アムニコラ(Anthurium amnicola)*
XP_008793203.1	*ナツメヤシ(Phoenix dactylifera)*
XP_008806896.1	*ナツメヤシ(Phoenix dactylifera)*
XP_008806740.1	*ナツメヤシ(Phoenix dactylifera)*
XP_010908895.1	*ギニアアブラヤシ(Elaeis guineensis)*
XP_010908896.1	*ギニアアブラヤシ(Elaeis guineensis)*
Q96UY2	*クサレケカビ(Umbelopsis ramanniana)*
A0A077WEU5	*リクテイミア・ラモサ(Lichtheimia ramosa)*
A0A068SDP4	*リクテイミア・コリムビフェラ(Lichtheimia corymbifera)JMRC*
A0A068RXA2	*リクテイミア・コリムビフェラ(Lichtheimia corymbifera)JMRC*
A0A197JCE2	*モルティエレラ・エロンガタ(Mortierella elongata)AG-77*
A0A1C7N060	*コウガイケカビ(Choanephora cucurbitarum)*
I1BLC3	*リゾープス・デレマ(Rhizopus delemar)*
A0A1C7NC56	*コウガイケカビ(Choanephora cucurbitarum)*
A0A077X3B5	*リクテイミア・ラモサ(Lichtheimia ramosa)*
Q96UY1	*クサレケカビ(Umbelopsis ramanniana)*
A0A077WVD4	*リクテイミア・ラモサ(Lichtheimia ramosa)*
A0A163K8G3	*アブシディア・グラウカ(Absidia glauca)*

【表５－１５】

受託番号	供給源生物
S2J8P3	*ムコール・シルシネロイデス(Mucor circinelloides)*
A0A168J818	*ムコール・シルシネロイデス(Mucor circinelloides)*
A0A0C9MR10	*ムコール・アンビグス(Mucor ambiguus)*
A0A162PN39	*ヒゲカビ(Phycomyces blakesleeanus)*
A0A167QXD0	*ヒゲカビ(Phycomyces blakesleeanus)*
A0A0C9M4C3	*ムコール・アンビグス(Mucor ambiguus)*
A0A0B7NDT1	*パラシテラ・パラシティカ(Parasitella parasitica)*
A0A015LM78	*リゾファグス・イレギュラリス(Rhizophagus irregularis)*
A0A0B7NHQ3	*パラシテラ・パラシティカ(Parasitella parasitica)*
A0A0A1NVK5	*リゾープス・ミクロスポルス(Rhizopus microsporus)*
A0A0A1P436	*リゾープス・ミクロスポルス(Rhizopus microsporus)*
A0A0D7BI48	*シリンドロバシジウム・トレンディ(Cylindrobasidium torrendii)*
A0A1B9HZT8	*クウォニエラ・ピニ(Kwoniella pini)*
A0A1D1XN50	*アンスリウム・アムニコラ(Anthurium amnicola)*
A0A1B9ILF0	*クウォニエラ・マングロビエンシス(Kwoniella mangroviensis)*
S2JU94	*ムコール・シルシネロイデス(Mucor circinelloides)*
A0A1B9GCB0	*クウォニエラ・ベスチオラエ(Kwoniella bestiolae)CBS 10118*
A0A068RKT0	*リクテイミア・コリムビフェラ(Lichtheimia corymbifera)*
Q5KFU4	*クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)*
Q55QC2	*クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)*
U5GY58	*ミクロボトリウム・リクニディス(Microbotryum lychnidis)*
A0A197KA94	*モルティエレラ・エロンガタ(Mortierella elongata)AG-77*
A0A088FR92	*ロドトルラ・ジオボバタ(Rhodotorula diobovata)*
A0A194SBY3	*ロドトルラ・グラミニス(Rhodotorula graminis)*
E6R8N8	*クリプトコッカス・ガッティ(Cryptococcus gattii)*

【表５－１６】

受託番号	供給源生物
M7WKS9	*ロドスポリジウム・トルロイデス(Rhodosporidium toruloides)*
A0A191UMW0	*ロドスポリジウム・トルロイデス(Rhodosporidium toruloides)*
C6KZS6	*ロドスポリジウム・トルロイデス(Rhodosporidium toruloides)*
J9VS50	*クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)*
A0A109FM23	*ロドトルラ属種(Rhodotorula sp.)JG-1b*
I4YE91	*ワレミア・メリコラ(Wallemia mellicola)*
A0A066WAJ3	*チレチアリア・アノマラ(Tilletiaria anomala)UBC 951*
A0A151VHJ4	*ブナシメジ(Hypsizygus marmoreus)*
A0A168LDJ3	*アブシディア・グラウカ(Absidia glauca)*
A0A0A1ULK8	*リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani)AG-3 Rhs1AP*
A0A074RWU7	*リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani)123E*
A0A0K6FWT6	*リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani)*
R9AL76	*ワレミア・イチチオファガ(Wallemia ichthyophaga)*
E6ZMU5	*スポリソリウム・レイリアヌム(Sporisorium reilianum)*
A0A0K3CJX4	*ロドスポリジウム・トルロイデス(Rhodosporidium toruloides)*
A0A162Y103	*ヒゲカビ(Phycomyces blakesleeanus)*
A0A0B7FYU9	*タナテフォルス・ククメリス(Thanatephorus cucumeris)*
A0A1A5ZUI2	*クウォニエラ・デジェクチコラ(Kwoniella dejecticola)*
A0A1B9GXE9	*クウォニエラ・ヘベアネンシス (Kwoniella heveanensis)BCC8398*
V5EIP7	*カルマノザイマ・ブラシリエンシス(Kalmanozyma brasiliensis)*
A0A127ZHG0	*スポリソリウム・シタミネウム(Sporisorium scitamineum)*
M5FTN9	*ダクリオピナクス・プリモゲニツス(Dacryopinax primogenitus)*
A0A166HX72	*シストトレマストルム・スエシクム(Sistotremastrum suecicum)*
A0A067QH80	*ジャアピア・アルジラセア(Jaapia argillacea)MUCL 33604*
A0A165PFB6	*ネオレンチヌス・レピデウス(Neolentinus lepideus)*

【表５－１７】

受託番号	供給源生物
G7DXE4	*ミクシア・オスムンダエ(Mixia osmundae)*
A0A165KJK5	*ヒメキクラゲ(Exidia glandulosa)HHB12029*
A0A0F7TLQ7	*ペニシリウム・ブラシリアナム(Penicillium brasilianum)*
S8FI87	*ツガサルノコシカケ(Fomitopsis pinicola)*
S7ZL04	*ペニシリウム・オキサリカム(Penicillium oxalicum)*
I2FMX3	*ウスチラゴ・ホルディ(Ustilago hordei)*
F8P370	*ナミダタケ(Serpula lacrymans)*
V2WTH2	*モニリオフソラ・ロレイ(Moniliophthora roreri)*
S7Q9H4	*キチリメンタケ(Gloeophyllum trabeum)*
W3VTZ4	*ツリガネニンジン(Pseudozyma aphidis)*
B8M0V7	*タラロマイセス・スティピタツス(Talaromyces stipitatus)*
A0A0D7B6H5	*シリンドロバシジウム・トレンディ(Cylindrobasidium torrendii)*
R7SCW4	*コガネニカワタケ(Tremella mesenterica)*
A0A093UWD0	*タラロマイセス・マルネッフェイ(Talaromyces marneffei)PM1*
B6Q8Q9	*タラロマイセス・マルネッフェイ(Talaromyces marneffei)*
A0A093VC12	*タラロマイセス・マルネッフェイ(Talaromyces marneffei)PM1*
A0A167SF58	*ニカワホウキタケ(Calocera viscosa)TUFC12733*
A0A180GQ68	*コムギ赤サビ病菌(Puccinia triticina)*
E3KWZ5	*プッシニア・グラミニス分化型(Puccinia graminis f. sp.)*
F4S978	*メランプソラ・ラリシ-ポプリナ(Melampsora larici-populina)*
A0A0U5GN87	*アスペルギルス・カリドウスツス(Aspergillus calidoustus)*
W9WBT1	*クラドフィアロフォラ・イエグレシ(Cladophialophora yegresii)*
A0A0D2A9G0	*ベルコニス・ガロパバ(Verruconis gallopava)*
S3DKQ1	*グラレア・ロゾエンシス(Glarea lozoyensis)*
A0A167S691	*ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum)*

【表５－１８】

受託番号	供給源生物
A0A0C3G1P8	*ピロデルマ・クロケウム(Piloderma croceum)F 1598*
A0A117NM34	*ペニシリウム・フレイ(Penicillium freii)*
A0A0M8NPT1	*ペニシリウム・ノルディカム(Penicillium nordicum)*
M2R3J5	*セリポリオシス・サブバーミスポラ (Ceriporiopsis subvermispora)*
A0A1E3JS60	*クリプトコッカス・デパウペラツス(Cryptococcus depauperatus)*
V9DJY4	*クラドフィアロフォラ・カリオニー(Cladophialophora carrionii)*
A0A1C1D128	*クラドフィアロフォラ・カリオニー(Cladophialophora carrionii)*
A0A194XRZ1	*フィアロセファラ・スコピフォルミス(Phialocephala scopiformis)*
A0A135LQY4	*ペニシリウム・パツルム(Penicillium patulum)*
F2S034	*トリコフィトン・トンズランス(Trichophyton tonsurans)*
A0A059J710	*トリコフィトン・インテルディジタレ(Trichophyton interdigitale)*
R7YTC1	*コニオスポリウム・アポリニス(Coniosporium apollinis)*
A0A0G4PR11	*ペニシリウム・カメンベルティ(Penicillium camemberti)FM 013*
F2SHG6	*紅色白癬菌(Trichophyton rubrum)*
A0A022VWY8	*紅色白癬菌(Trichophyton rubrum)CBS 288.86*
A0A178F1Q9	*紅色白癬菌(Trichophyton rubrum)*
A0A022XM67	*トリコフィトン・ソウダネンセ (Trichophyton soudanense)*
F2PHM1	*トリコフィトン・エクイヌム(Trichophyton equinum)*
A0A178FDV0	*トリコフィトン・ビオラセウム(Trichophyton violaceum)*
A0A0F8UUV5	*アスペルギルス・オクラセオロセウス (Aspergillus ochraceoroseus)*
A0A0F8XD12	*アスペルギルス・ランベリー(Aspergillus rambellii)*
D8Q1Z6	*スエヒロタケ(Schizophyllum commune)*
A0A0L0VQ99	*プッシニア・ストリイホルミス(Puccinia striiformis)*
W6QE33	*ペニシリウム・ロックフォルティ(Penicillium roqueforti)*
A0A0J0XU39	*クタネオトリコスポロン(Cutaneotrichosporon)*

【表５－１９】

受託番号	供給源生物
K2RIY7	*マクロフォミナ・ファゼオリナ(Macrophomina phaseolina)*
A0A1B9HIE8	*クウォニエラ・ヘベアネンシス(Kwoniella heveanensis)CBS 569*
A0A0A2KLE4	*ペニシリウム・イタリクム(Penicillium italicum)*
A0A177FP94	*ホンセカエア・モノフォラ(Fonsecaea monophora)*
Q0CU51	*アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus)*
A0A0D2C195	*エキソフィアラ・スピニフェラ(Exophiala spinifera)*
K9GS70	*ミドリカビ病菌(Penicillium digitatum)*
K9H4T7	*ミドリカビ病菌(Penicillium digitatum)*
A0A0A2IRX2	*ペニシリウム・エクスパンサム(Penicillium expansum)*
A0A165XA55	*フィブロリゾクトニア属種(Fibulorhizoctonia sp.)*
A0A1E3HS30	*クリプトコッカス・デパウペラツス(Cryptococcus depauperatus)*
R0JHT6	*セトスファエリア・ツルシカ(Setosphaeria turcica)*
W6XT38	*ビポラリス・ゼイコラ(Bipolaris zeicola)26-R-13*
K1WNS8	*マルソニナ・ブルンネア分化型(Marssonina brunnea f. sp.)*
A0A077R6Q5	*メラノピシウム・ペンシルバニクム (Melanopsichium pennsylvanicum)*
A0A0G2F2K4	*ファエオモニエラ・クラミドスポラ (Phaeomoniella chlamydospora)*
M2UB23	*トウモロコシごま葉枯病菌(Cochliobolus heterostrophus)*
N4WZB4	*トウモロコシごま葉枯病菌(Cochliobolus heterostrophus)*
A0A0D2ECJ4	*カプロニア・セミ-イメルサ (Capronia semi-immersa)*
K5ULK6	*ファネロカエテ・カルノサ(Phanerochaete carnosa)*
A0A081CNS6	*シュードザイマ・アンタクティカ(Pseudozyma antarctica)*
W7E3D1	*ビポラリス・ビクトリアエ (Bipolaris victoriae)FI3*
A0A0D1YAT0	*エキソフィアラ・シデリス(Exophiala sideris)*
V5FVB4	*ビソクラミス・スペクタビリス(Byssochlamys spectabilis)*
A0A150V2J4	*アシドマイセス・リッチモンデンシス (Acidomyces richmondensis)BFW*

【表５－２０】

受託番号	供給源生物
A0A0D2P224	*クリタケ(Hypholoma sublateritium)*
C5FY83	*アルスロデルマ・オタエ(Arthroderma otae)*
A0A0E9NND3	*サイトエラ・コンプリカタ(Saitoella complicata)*
A0A163JYI7	*アブシディア・グラウカ(Absidia glauca)*
M2SYN8	*コチオボルス・サチブス(Cochliobolus sativus)*
A0A0D2A9Y8	*エキソフィアラ・オリゴスペルマ(Exophiala oligosperma)*
B2WFQ5	*ピレノフォラ・トリチシ(Pyrenophora tritici)*
A0A178Z686	*フォンセカエア・エレクタ(Fonsecaea erecta)*
R1GYF1	*ボトリオスファエリア・パルバ(Botryosphaeria parva)*
A0A0D2AM77	*クラドフィアロフォラ・イムンダ(Cladophialophora immunda)*
A0A067TPJ7	*ヒメアジロガサ(Galerina marginata)CBS 339.88*
A0A0G2DT71	*ジプロディア・セリアタ(Diplodia seriata)*
A0A0S6XG57	真菌種(fungal *sp.*)*No.11243*
A1CD57	*アスペルギルス・クラバツス(Aspergillus clavatus)株*
W6ZE59	*イネごま葉枯病菌(Bipolaris oryzae)ATCC 44560*
W9X299	*クラドフィアロフォラ・プサモフィラ (Cladophialophora psammophila)*
A0A0L1HS74	*ステムフィリウム・リコペルシイシイ(Stemphylium lycopersici)*
E3RYE6	*ピレノフォラ・テレス(Pyrenophora teres)*
A0A178C491	*フォンセカエア・マルチモルフォサ(Fonsecaea multimorphosa)*
A0A0D2JW30	*フォンセカエア・マルチモルフォサ(Fonsecaea multimorphosa)*
A0A100ISZ7	*アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)*
G7XRR4	*アスペルギルス・カワチ(Aspergillus kawachii)*
E4ZGH1	*レプトスファエリア・マクランス(Leptosphaeria maculans)*
A0A0C3AU69	*セレンディピタ・ベルミフェラ(Serendipita vermifera)*
A0A0U1M481	*タラロマイセス・イスランディクス(Talaromyces islandicus)*

【表５－２１】

受託番号	供給源生物
A0A179UDB8	*アジェロマイセス・デルマティティディス (Ajellomyces dermatitidis)*
A0A177DML0	*アルテルナリア・アルテルナータ(Alternaria alternata)*
A0A074XTA2	*アウレオバシジウム・ナミビアエ(Aureobasidium namibiae)*
R8BK00	*トグニニア・ミニマ(Togninia minima)*
A0A178E1M9	*ピレノカエタ属種(Pyrenochaeta sp.)DS3sAY3a*
A0A074XCF2	*アウレオバシジウム・プルランス(Aureobasidium pullulans)*
A0A178CVL7	*フォンセカエア・ヌビカ(Fonsecaea nubica)*
J4H349	*フィブロポリア・ラディキュロサ(Fibroporia radiculosa)*
F2T2H3	*アジェロマイセス・デルマティティディス (Ajellomyces dermatitidis)*
T5C9R0	*ブラストマイセス・デルマティティディス (Blastomyces dermatitidis)*
C5GGF5	*アジェロマイセス・デルマティティディス (Ajellomyces dermatitidis)*
F8Q4F5	*ナミダタケ(Serpula lacrymans)*
A0A074YHW3	*アウレオバシジウム・スブグラシアレ (Aureobasidium subglaciale)*
A0A0D2E953	*エキソフィアラ・キセノビオティカ(Exophiala xenobiotica)*
A0A0D2ETM7	*エキソフィアラ・キセノビオティカ(Exophiala xenobiotica)*
A0A163ADJ9	*ディディメラ・ラビエイ(Didymella rabiei)*
U7PLY5	*スポロトリックス・シェンキイ(Sporothrix schenckii)*
A0A0F2MF45	*スポロトリックス・シェンキイ(Sporothrix schenckii)1099-18*
A0A0C2J820	*スポロトリックス・ブラシリエンシス (Sporothrix brasiliensis)5110*
A0A1E3B843	*アスペルギルス・クリスタツス(Aspergillus cristatus)*
A0A0L6WTD3	*テルミトマイセス属種(Termitomyces sp.)J132*
G2YTS7	*ボトリオチニア・フッケリアナ(Botryotinia fuckeliana)*
W9XGA9	*カプロニア・エピマイセス(Capronia epimyces)CBS 606.96*
A0A0F4YS69	*ラサムソニア・エメルソニイ(Rasamsonia emersonii)*
M9LWR9	*シュードザイマ・アンタクティカ(Pseudozyma antarctica)*

【表５－２２】

受託番号	供給源生物
A0A074WDM7	*アウレオバシジウム・メラノゲヌム (Aureobasidium melanogenum)*
M3CBZ0	*スファエルリナ・ムシバ(Sphaerulina musiva)*
A0A0C7C2J7	*リゾープス・ミクロスポルス(Rhizopus microsporus)*
W9YU83	*カプロニア・コロナタ(Capronia coronata)CBS 617.96*
I8IUH8	*ニホンコウジカビ(Aspergillus oryzae)*
A0A139HZI0	*シュードセルコスポラ・ムサエ(Pseudocercospora musae)*
E9DGY4	*コクシジオイデス・ポサダシ(Coccidioides posadasii)*
A0A0J6F9P8	*コクシジオイデス・ポサダシ(Coccidioides posadasii)*
H6BM52	*エキソフィアラ・デルマチチディス(Exophiala dermatitidis)*
Q2UDX3	*ニホンコウジカビ(Aspergillus oryzae)*
M3ASJ4	*シュードセルコスポラ・フィジエンシス (Pseudocercospora fijiensis)*
A0A177BZU0	*パラファエオスファエリア・スポルロサ (Paraphaeosphaeria sporulosa)*
A0A017S910	*アスペルギルス・ルバー(Aspergillus ruber)CBS 135680*
A0A175VVF2	*マズレラ・ミセトマチス(Madurella mycetomatis)*
A0A0J8UWI6	*コクシジオイデス・イミティス(Coccidioides immitis)*
A0A0J6YFS7	*コクシジオイデス・イミティス(Coccidioides immitis)RMSCC*
J3K3F7	*コクシジオイデス・イミティス(Coccidioides immitis)*
A0A0D2FX82	*リノクラディエラ・マッケンジエイ(Rhinocladiella mackenziei)*
A0A072PSS5	*エキソフィラ・アクアマリナ(Exophiala aquamarina)*
A0A0A1MWE2	*リゾープス・ミクロスポルス(Rhizopus microsporus)*
W2RSU8	*シフェロフォラ・エウロパエア(Cyphellophora europaea)*
C0S1D5	*パラコクシジオイデス・ブラシリエンシエンシス (Paracoccidioides brasiliensiensis)*
C1G9R2	*パラコクシジオイデス・ブラシリエンシエンシス (Paracoccidioides brasiliensiensis)*
A0A1D2JGH6	*パラコクシジオイデス・ブラシリエンシス (Paracoccidioides brasiliensis)*
A0A166PXN0	*コルディセプス・ブロンニアティ(Cordyceps brongniartii)*

【表５－２３】

受託番号	供給源生物
Q54GC1	*キイロタマホコリカビ(Dictyostelium discoideum)*
A0A0H1B9A9	*エモンシア・パルバ(Emmonsia parva)UAMH 139*
R4XEF3	*タフリナ・デフォルマンス(Taphrina deformans)*
D3B2U8	*シロカビモドキ(Polysphondylium pallidum)*
U1HHT8	*ミドリゴケ(Endocarpon pusillum)*
A0A1E3JYY5	*ツチヤエア・ウィングフィエルディ(Tsuchiyaea wingfieldii)*
A0A0C3JN41	*コツブタケ(Pisolithus tinctorius)Marx 270*
B6HF05	*ペニシリウム・ルーベンス(Penicillium rubens)*
A0A060S368	*シュタケ(Pycnoporus cinnabarinus)*
K5W449	*マッシュルーム(Agaricus bisporus)*
B0CTA0	*オオキツネタケ(Laccaria bicolor)*
F0XD96	*グロスマンニア・クラビゲラ(Grosmannia clavigera)*
A0A165EP91	*ツノフノリタケ(Calocera cornea)HHB12733*

【０２５５】

アシルグリセロールリパーゼ及びステロールエステラーゼ

［0305］一部の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための組換え微生物及び方法が提供される。特定の実施形態では、短鎖脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートは、Ｃ１８以下の炭素鎖長を有する。短鎖フェロモンを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、長鎖アシルグリセロールのエステル結合を加水分解することを選好する所定の酵素が１つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼと共発現される。このような好適な酵素は、異種又は改変アシルグリセロールリパーゼによって例示される。この目的に好適なアシルグリセロールリパーゼの例が表５ｃに列挙される。

【０２５６】

［0306］脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成するための方法の一部の好ましい実施形態では、アシルグリセロールリパーゼ（モノ－、ジ－又はトリアシルグリセロールリパーゼ）及びステロールエステルエステラーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、長鎖アシルグリセロール基質を選好する１つ以上のアシルグリセロールリパーゼで置換される。このような欠失又は下方制御標的としては、限定はされないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、

カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０が挙げられる。

【０２５７】

［0307］ カルボン酸エステルヒドロラーゼ（ＥＣ　３．１．１）は、エステル結合の加水分解又は合成を触媒する酵素の大きい種類である。それらは、全ての生物ドメイン（life domain）、原核生物及び真核生物において記載されている。それらのほとんどは、α／β－ヒドロラーゼスーパーファミリーに属し、高度に保存されたＧＸＳＸＧ配列で配置されるＨｉｓ、酸性アミノ酸及びＳｅｒ残基によって形成される保存された「触媒三残基」を有する。加水分解中、触媒Ｓｅｒは、空間的に近接した三残基からの他の２つの残基によって補助される基質の求核的攻撃を開始するであろう。これらは、キモトリプシン様セリンプロテアーゼのものと類似した機構によってエステルの加水分解を促進することが推定される。別の特徴的な特徴は、配列が触媒三残基のものほど保存されていないアミノ酸性領域である、オキシアニオンホールの存在であり、これは、触媒反応中に生じる遷移状態を安定させる役割を果たす。更に、これらの酵素は、一般に、補因子を必要としない。アシルグリセロールリパーゼ及びステロールエステラーゼは、カルボン酸エステルヒドロラーゼファミリーに属する。

【０２５８】

［0308］ アシルグリセロールリパーゼ酵素は、水分子を用いて長鎖脂肪酸のグリセロールモノエステルを破壊する化学反応を触媒する。この酵素クラスの系統名は、グリセロール－エステルアシルヒドロラーゼである。一般的に使用される他の名称としては、モノアシルグリセロールリパーゼ、アシルグリセロリパーゼ、モノグリセリドリパーゼ、モノグリセリドヒドロラーゼ、脂肪アシルモノエステルリパーゼ、モノアシルグリセロールヒドロラーゼ、モノグリセリジルリパーゼ及びモノグリセリダーゼが挙げられる。この酵素は、グリセロ脂質代謝に関与する。

【０２５９】

［0309］ ステロールエステラーゼ酵素は、以下の化学反応を触媒する：

［0310］ ステリルエステル＋Ｈ２Ｏ⇔ステロール＋脂肪酸。

【０２６０】

［0311］ 従って、この酵素の２つの基質は、ステリルエステル及びＨ２Ｏであるが、その２つの生成物は、ステロール及び脂肪酸である。

【０２６１】

［0312］ この酵素クラスの系統名は、ステリル－エステルアシルヒドロラーゼである。一般的に使用される他の名称としては、コレステロールエステラーゼ、コレステリルエステルシンターゼ、トリテルペノールエステラーゼ、コレステリルエステラーゼ、コレステリルエステルヒドロラーゼ、ステロールエステルヒドロラーゼ、コレステロールエステルヒドロラーゼ、コレステラーゼ及びアシルコレステロールリパーゼが挙げられる。この酵素は、胆汁酸生合成に関与する。ステロールエステラーゼは、自然界に広く存在し、膵臓、腸粘膜、肝臓、胎盤、大動脈及び脳などの哺乳動物の組織から、糸状菌、酵母及び細菌に至るまで確認されている。

【０２６２】

［0313］ 基質特異性に関して、多くのステロールエステラーゼは、アシルグリセロール、アリールエステル及び場合によりアルコールエステル、シンナミルエステル、キサントフィルエステル又は合成ポリマーなど、エステル結合を含む比較的広範囲の他の基質の加水分解又は合成を触媒することができる。

【０２６３】

［0314］ 一部の実施形態では、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロー

ルエステルエステラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素と異なる。一部の実施形態では、発現される１つ以上の内因性又は外因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、長鎖アシルグリセロールのエステル結合を加水分解することを選好する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、表５ｃから選択される。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０から選択される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、フェロモン生合成経路酵素を更に発現する。更なる実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートを含む。更に別の実施形態では、フェロモン生合成経路酵素は、１つ以上の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼを含む。

【０２６４】

［0315］ 一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する方法が提供され、本方法は、アシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させ、アシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする１つ以上の遺伝子における欠失、挿入又は機能喪失突然変異を導入することを含み、導入又は発現されるアシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、欠失又は下方制御されるアシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする１つ以上の遺伝子と異なる。一部の実施形態では、導入又は発現されるアシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、長鎖アシルグリセロールのエステル結合を加水分解することを選好する。一部の実施形態では、導入又は発現されるアシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子は、表５ｃから選択される。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の遺伝子は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ

．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０から選択されるアシルグリセロールリパーゼ又はステロールエステルエステラーゼをコードする。一部の実施形態では、本方法は、脂肪アシルデサチュラーゼ及び／又は脂肪アシルコンジュゲートをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。更なる実施形態では、本方法は、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換え微生物中に導入するか又は組換え微生物中で発現させることを更に含む。

【０２６５】

【表５－２４】

表 5c. 例示的アシルグリセロールリパーゼ

受託番号	供給源生物
EAY76846.1	*オリザ・サティバ(Oryza sativa)*
OEL29276.1	*ジカンテリウム・オリゴサンテス(Dichanthelium oligosanthes)*
ONM35522.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
AFW56472.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
AFW60230.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
ACG33769.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
ACG30143.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
ACG39100.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
ACG48810.1	*ゼア・マイス(Zea mays)*
KQK11040.1	*ミナトカモジグサ(Brachypodium distachyon)*
CAA64004.1	*サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)*
CAA81640.1	*サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)*
CAG78037.1	*ヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)*
EEF47288.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF45491.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF52390.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF38788.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF38789.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF28563.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF46013.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
AFQ93681.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*

【表５－２５】

受託番号	供給源生物
EEF45592.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF43592.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF50924.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*
EEF33440.1	*トウゴマ(Ricinus communis)*

【０２６６】

毒性タンパク質又はポリペプチドの発現

本開示は、組換え微生物によってコードされる毒性タンパク質、ペプチド、又は小分子を記載する。一部の実施形態では、毒性タンパク質、ペプチド、又は小分子は昆虫フェロモンと共に生合成的に生成される。

【０２６７】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、昆虫にとって毒性のあるタンパク質又はポリペプチドをコードする１つ以上の核酸分子を発現する。一部の実施形態では、毒性タンパク質又はポリペプチドは昆虫病原生物由来である。一部の実施形態では、昆虫病原生物は、バチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）、及びセラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）から選択される。詳細な実施形態では、核酸分子はバチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）毒素をコードする。

【０２６８】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、発現時に昆虫にとって毒性のある小分子を生

成する代謝経路を発現するように改変される。
【０２６９】
例示的実施形態では、本明細書に記載される組換え微生物によって生成される昆虫フェロモンを使用することにより、害虫を誘引し、続いて本明細書に記載される組換え微生物によって同時生成された毒性タンパク質、ペプチド、又は小分子などの毒性物質でその害虫を根絶し得る。
【０２７０】
組換え微生物を使用したフェロモンの生合成
上記で考察したとおり、第１の態様において、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物に関する。第１の態様の例示的な実施形態を図１に示す。青色の線は、不飽和脂肪アシルＣｏＡ変換の基質としての役割を果たす飽和アシル－ＣｏＡの生成に用いられる生化学的経路を示す。基質の不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの変換は、宿主の内因性又は外因性酵素によって実施されてもよい。緑色の線は、酵素をコードする外因性核酸分子によって触媒される変換を示す。従って、一部の実施形態では、飽和脂肪アシル－ＣｏＡの一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの変換は、外因性核酸分子によってコードされる少なくとも１つのデサチュラーゼによって触媒される。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの一不飽和又は多価不飽和脂肪アルコールへの変換は、外因性核酸分子によってコードされる少なくとも１つのレダクターゼによって触媒される。灰色の破線は、アルコールオキシダーゼ又は酸化剤を用いた一不飽和又は多価不飽和脂肪アルデヒドの生成、及びアセチルトランスフェラーゼ又はアセチルクロリドなどの化学物質を用いた一不飽和又は多価不飽和脂肪アセテートの生成など、フェロモン、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体の合成の下流ステップを示す。赤色のバツ印は宿主にとって天然の経路の欠失又は下方制御を示し、これは改変経路へのフラックスを増加させる。
【０２７１】
従って、一実施形態では、本組換え微生物は、（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。一部の実施形態では、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡは宿主微生物の内因性酵素を用いて生成されてもよい。他の実施形態では、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡは宿主微生物の１つ以上の外因性酵素を用いて生成されてもよい。
【０２７２】
上記に記載したとおり、脂肪アシルデサチュラーゼは、例えば飽和脂肪アシル－ＣｏＡ分子上の炭化水素鎖の不飽和化を触媒して、対応する不飽和脂肪アシルＣｏＡ分子を生じさせる。一部の実施形態では、外因性脂肪アシルデサチュラーゼは、炭化水素鎖に６～２４個の炭素を有する脂肪アシル－ＣｏＡ分子において少なくとも１つの二重結合の形成を触媒するように選択し、組換え微生物で発現させることができる。従って、一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有するデサチュラーゼである。
【０２７３】
本明細書に記載される外因性脂肪アシルデサチュラーゼは、炭化水素鎖上の所望の位置で不飽和化を触媒するように選択することができる。従って、一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、脂肪酸又は例えば脂肪酸ＣｏＡエステルなどのその誘導体のＣ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１、Ｃ１２、又はＣ１３位に二重結合を生じさせる能力を有する。

【０２７４】
宿主において１つ又は２つ以上の脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼを発現させて、炭化水素鎖上の複数の位置で不飽和化を触媒することができる。一部の実施形態では、脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼは宿主微生物にとって異種である。従って、様々な実施形態が、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む組換え微生物を提供する。
【０２７５】
一例示的実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼはＺ１１デサチュラーゼである。Ｚ１１脂肪アシルデサチュラーゼは、基質のカルボニル基から１１番目の炭素と１２番目の炭素との間の二重結合形成を触媒する。本明細書に記載される様々な実施形態において、Ｚ１１デサチュラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アカオビコハマキ（Argyrotaenia velutiana）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、又はタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）種の生物から単離することができる。更なるＺ１１－デサチュラーゼ、又はそれらをコードする核酸配列は、カイコガ（Bombyx mori）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、サウスウエスタンコーンボーラー（Diatraea grandiosella）、ミスジアオリンガ（Earias insulana）、クサオビリンガ（Earias vittella）、コナガ（Plutella xylostella）、カイコガ（Bombyx mori）又はアメリカウリノメイガ（Diaphania nitidalis）から単離することができる。例示的実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＪＸ６７９２０９、ＪＸ９６４７７４、ＡＦ４１６７３８、ＡＦ５４５４８１、ＥＵ１５２３３５、ＡＡＤ０３７７５、ＡＡＦ８１７８７、及びＡＹ４９３４３８から選択される配列を含む。一部の実施形態では、カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アカオビコハマキ（Argyrotaenia velutiana）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、又はタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）種の生物由来のＺ１１デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号９、１８、２４及び２６から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来の配列番号４９のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１０及び１６から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５３のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号１１及び２３から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の配列番号５０及び５１から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号１２、１７及び３０から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）由来の配列番号５２のアミノ酸配列を含む。更なる実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号１３、１９、２５、２７及び３１から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、イネヨトウ（S. inferens）由来の配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４

３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼはキメラポリペプチドを含む。一部の実施形態では、完全な又は部分的なＺ１１デサチュラーゼが別のポリペプチドに融合される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼのＮ末端天然リーダー配列が別の種由来のオレオシンリーダー配列に置換される。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号１５、２８及び２９から選択される配列を含む。特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、配列番号６１、６２、６３、７８、７９及び８０から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０２７６】

特定の実施形態では、Ｚ１１デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、Ｚ１１－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－７，１１－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１５：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－６，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－７，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－８，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－１１，１４－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｚ）－４，６，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｅ）－７，１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｚ，Ｚ）－４，６，１１，１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１７：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－８，１１－１７：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－１１，１４－１８：アシル－ＣｏＡ、又はこれらの組み合わせから選択される一不飽和又は多価不飽和生成物への変換を触媒する。

【０２７７】

別の例示的実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼはＺ９デサチュラーゼである。Ｚ９脂肪アシルデサチュラーゼは、基質のカルボニル基から９番目の炭素と１０番目の炭素との間の二重結合形成を触媒する。本明細書に記載される様々な実施形態において、Ｚ９デサチュラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nobilalis）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、タバコガ（Helicoverpa assulta）、又はアメリカタバコガ（Helicoverpa zea）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、GenBank受託番号ＡＹ０５７８６２、ＡＦ２４３０４７、ＡＦ５１８０１７、ＥＵ１５２３３２、ＡＦ４８２９０６、及びＡＡＦ８１７８８から選択される配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由来の配列番号２０に示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）由来の配列番号５８に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号２１に示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）由来の配列番号５９に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea

）由来の配列番号２２に示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）由来の配列番号６０に示されるアミノ酸配列を含む。

【０２７８】

特定の実施形態では、Ｚ９デサチュラーゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、Ｚ９－１１：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－７，９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－５，９－１３：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－４，９－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１５：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－６，９－１５：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｅ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１７：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－５，９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ）－９，１２－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ）－９，１２－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｚ）－３，６，９－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｅ，Ｅ，Ｅ）－９，１２，１５－１８：アシル－ＣｏＡ、（Ｚ，Ｚ，Ｚ）－９，１２，１５－１８：アシル－ＣｏＡ、又はこれらの組み合わせから選択される一不飽和又は多価不飽和生成物への変換を触媒する。

【０２７９】

飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの不飽和化は、複数の反応を通じて進めることにより多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡを生成し得る。一部の実施形態では、本組換え微生物は、少なくとも２つの二重結合の形成を触媒する能力を有する二機能性デサチュラーゼを発現し得る。一部の実施形態では、本組換え微生物は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する２つ以上の脂肪アシルデサチュラーゼをコードする２つ以上の外因性核酸分子を発現し得る。例えば、本組換え微生物は、Ｚ１１デサチュラーゼをコードする外因性核酸分子とＺ９デサチュラーゼをコードする別の外因性核酸分子とを発現し得る。従って、得られる多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡは、９番目の炭素と１０番目の炭素との間に二重結合を有し、且つ１１番目の炭素と１２番目の炭素との間に別の二重結合を有し得る。

【０２８０】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、独立に又は脂肪アシルデサチュラーゼと共に飽和又は一不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの共役多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するように作用する脂肪アシルコンジュガーゼを発現し得る。

【０２８１】

一実施形態において、本開示は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。

【０２８２】
別の実施形態では、本組換え微生物は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子を発現する。
【０２８３】
更なる実施形態において、本開示は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの内因性又は外因性供給源から多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子及び脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を発現する。
【０２８４】
別の実施形態では、本組換え微生物は、飽和又は一不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子及び脂肪アシルコンジュガーゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子を発現する。
【０２８５】
更に別の実施形態では、脂肪アシルコンジュガーゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪アシル－ＣｏＡを基質として利用する能力を有するコンジュガーゼである。
【０２８６】
特定の実施形態では、コンジュガーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、コドリンガ（Cydia pomonella）、エンドウシンクイ（Cydia nigricana）、ホソバヒメハマキ（Lobesia botrana）、ゴママダラメイガ（Myelois cribrella）、ノシメマダラメイガ（Plodia interpunctella）、マッソンマツカレハ（Dendrolimus punctatus）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、カイコガ（Bombyx mori）、キンセンカ（Calendula officinalis）、キカラスウリ（Trichosanthes kirilowii）、ザクロ（Punica granatum）、ツルレイシ（Momordica charantia）、ホウセンカ（Impatiens balsamina）、及びリンゴウスチャイロハマキ（Epiphyas postvittana）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、コンジュガーゼは、GenBank受託番号又はUniprotデータベース：Ａ０Ａ０５９ＴＢＦ５、Ａ０Ａ０Ｍ３Ｌ９Ｅ８、Ａ０Ａ０Ｍ３Ｌ９Ｓ４、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＨ８、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＳ８、Ａ０Ａ０Ｍ３ＬＡＨ８、Ｂ６ＣＢＳ４、ＸＰ＿０１３１８３６５６．１、ＸＰ＿００４９２３５６８．２、ＡＬＡ６５４２５．１、ＮＰ＿００１２９６４９４．１、ＮＰ＿００１２７４３３０．１、Ｑ４Ａ１８１、Ｑ７５ＰＬ７、Ｑ９ＦＰＰ８、ＡＹ１７８４４４、ＡＹ１７８４４６、ＡＦ１８２５２１、ＡＦ１８２５２０、Ｑ９５ＵＪ３から選択される配列を含む。
【０２８７】
上記に記載したとおり、脂肪アシルレダクターゼは、例えば不飽和脂肪アシル－ＣｏＡ分子上のカルボニル基の還元を触媒して対応する不飽和脂肪酸分子を生じさせる。一部の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルＣｏＡレダクターゼはその微生物にとって異種である。従って、様々な実施形態は、不飽和脂肪アシル－ＣｏＡ分子上のカルボニル基の還元を触媒して対応する不飽和脂肪酸分子を生じさせる脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む組換え微生物を提供する。

【０２８８】
［0339］一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）種の生物由来である。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼをコードする核酸配列がコドン最適化される。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号１に示される配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５５に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号２に示される配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号５６に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、配列番号３、３２、４０、７２、７４、７６及び８１から選択される配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）由来の配列番号５５に示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）由来の配列番号５６に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の配列番号４１及び５７から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）由来の配列番号７３及び８２から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、ミドリムシ（Euglena gracilis）由来の配列番号７５に示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）由来の配列番号７７に示されるアミノ酸配列を含む。

【０２８９】
［0340］一部の実施形態では、組換え微生物における不飽和脂肪アルコールの生成は、１つ以上の突然変異体ＦＡＲの発現を含む。特定の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされる野生型オオタバコガ（Helicoverpa amigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼと比較して、生成される脂肪アルコールの正味の増加を示す、オオタバコガ（Helicoverpa amigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＨａＦＡＲ）変異体が提供される。一部の実施形態では、増加した酵素活性は、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされるＨａＦＡＲの野生型酵素活性によって生成される脂肪アルコールの量と比べた、生成される脂肪アルコールの量の正味の活性増加である。一部の実施形態では、野生型ＨａＦＡＲは、配列番号９０に示されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされる野生型ＨａＦＡＲの変異体は、以下の位置：Ｓ６０Ｘ、Ｓ１９５Ｘ、Ｓ２９８Ｘ、Ｓ３７８Ｘ、Ｓ３９４Ｘ、Ｓ４１８Ｘ及びＳ４５３Ｘにおける点突然変異を含み、ここで、Ｘは、アミノ酸Ｆ、Ｌ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｐ、Ｔ、Ａ、Ｙ、Ｋ、Ｈ、Ｎ、Ｑ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、Ｃ、Ｗ、Ｒを含む。一部の実施形態では、配列番号４１に示されるアミノ酸配列によってコードされる野生型ＨａＦＡＲの変異体は、以下のアミノ酸位置：Ｓ６０Ｘ、Ｓ１９５Ｘ、Ｓ２９８Ｘ、Ｓ３７８Ｘ、Ｓ３９４Ｘ、Ｓ４１８Ｘ及びＳ４５３Ｘにおける突然変異から選択される点突然変異の組み合わせを含み、ここで、Ｘは、アミノ酸Ｆ、Ｌ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｐ、Ｔ、Ａ、Ｙ、Ｋ、Ｈ、Ｎ、Ｑ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、Ｃ、Ｗ、Ｒを含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号４２～４８から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、突然変異脂肪アシルレダクターゼであり、配列番号８３～８９から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【０２９０】
例示的実施形態では、脂肪アシルレダクターゼは、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの、（Ｚ）－３－ヘキセノール、（Ｚ）－３－ノネノール、（Ｚ）－５－デセノ

ール、（Ｅ）－５－デセノール、（Ｚ）－７－ドデセノール、（Ｅ）－８－ドデセノール、（Ｚ）－８－ドデセノール、（Ｚ）－９－ドデセノール、（Ｚ）－９－テトラデセノール、（Ｚ）－９－ヘキサデセノール、（Ｚ）－１１－テトラデセノール、（Ｚ）－７－ヘキサデセノール、（Ｚ）－１１－ヘキサデセノール、（Ｅ）－１１－テトラデセノール、又は（Ｚ，Ｚ）－１１，１３－ヘキサデカジエノール、（１１Ｚ，１３Ｅ）－ヘキサデカジエノール、（Ｅ，Ｅ）－８，１０－ドデカジエノール、（Ｅ，Ｚ）－７，９－ドデカジエノール、（Ｚ）－１３－オクタデセノール、又はこれらの組み合わせから選択される脂肪アルコール生成物への変換を触媒する。

【０２９１】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組換え微生物は複数の脂肪アシルレダクターゼを含み得る。従って、かかる実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも２つの外因性核酸分子を発現する。

【０２９２】

[0343] 更なる実施形態では、本開示は、飽和C_6～C_{24}脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦C_{18}脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物を提供し、この組換え微生物は、（ａ）飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦C_{18}脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和C_4～C_{22}脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦C_{18}脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦C_{18}脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を含む。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される。一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３、７８～８０並びにGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する９５％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される。他の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される。更なる実施形態では、脂

肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びカンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）からなる群から選択される酵母である。

【０２９３】

[0344] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、好ましくは、≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及びジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、表５ｂから選択される。

【０２９４】

[0345] 一部の実施形態では、ワックスエステラーゼの共発現は、１：１の比率での脂肪アルコール及び脂肪酸の貯蔵を可能にし得る。後に様々な生成物流れに使用され得るＴＡＧ及び脂肪アルコールの興味深い比率をもたらし得るＴＡＧ貯蔵と組み合わせたものである。ワックスエステルシンターゼの例：ホモ・サピエンス（Homo sapiens）ＡＷＡＴ２（ＸＭ＿０１１５３０８７６．２）、ムス・ムスクルス（Mus musculus）（ＡＡＴ６８７６６．１）ミドリムシ（Euglena gracilis）ＷＳ（ＡＤＩ６００５８．１）、ミドリムシ（Euglena gracilis）ＷＳＤ２（ＢＡＶ８２９７５．１）、ミドリムシ（Euglena gracilis）ＷＳＤ５（ＢＡＶ８２９７８．１）。

【０２９５】

[0346] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アシルグリセロールリパーゼは、表５ｃから選択される。

【０２９６】

[0347] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。更なる実施形態では、本組換え微生物は、（ｉ）１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）１つ以上のアシルトランスフェラーゼ；（ｉｉｉ）１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ；（ｉｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールオキシダーゼ；及び（ｖｉ）１つ以上のシトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０２９７】

[0348] 一部の好ましい実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、所望の鎖長を超える所望の脂肪アシル－ＣｏＡの切断を除去又は低減するように欠失又は下方制御される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；

カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０２９８】

［0349］一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素と異なる。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの鎖長を調節する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素は、表５ａから選択される。

【０２９９】

［0350］一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ並びにカンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０３００】

［0351］一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の好ましい実施形態では、ＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ及び／又はＤＧＡＴをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する１つ以上のＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ又はＤＧＡＴで置換される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルトランスフェラ

ーゼ酵素と異なる。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルトランスフェラーゼ酵素は、表５ｂから選択される。

【０３０１】

[0352] 一部の好ましい実施形態では、アシルグリセロールリパーゼ（モノ－、ジ－又はトリアシルグリセロールリパーゼ）及びステロールエステルエステラーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、長鎖アシルグリセロール基質を選好する１つ以上のアシルグリセロールリパーゼで置換される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４W、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２W及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ並びにカンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）W５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０３０２】

[0353] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０３０３】

[0354] 一部の実施形態では、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する組換え微生物が提供され、この組換え微生物は、１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素を発現し、この組換え微生物は、１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、欠失又は下方制御される１つ以

上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素と異なる。一部の実施形態では、発現される１つ以上の内因性又は外因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、長鎖アシルグリセロールのエステル結合を加水分解することを選好する。他の実施形態では、発現される１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、表５ｃから選択される。

【０３０４】

［0355］一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｅ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ８－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１０－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１２－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１４－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１０：アシル－ｃｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ６Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ８Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１０Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１２Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３Ｅ１６－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３Ｚ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【０３０５】

［0356］一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、アルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ｃ４ＨＮ７８、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｎ９ＤＡ８５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｒ８ＸＷ２４、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ａ０ＧＧＭ５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１１７Ｎ１５８及びノストック・プンクチフォルメ（Nostoc punctiforme）ＹＰ＿００１８６５３２４からなる群から選択される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３０６】

[0357] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ１８脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される。一部の好ましい実施形態では、≦Ｃ１８脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ及びＺ１１－１６：Ａｃからなる群から選択される。

【０３０７】

[0358] 一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ１８脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼから選択される酵素をコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ１８脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の好ましい実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルデヒド及び≦Ｃ１８脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３０８】

[0359] 更なる実施形態では、本開示は、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールを生成する能力を有する組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を提供し、この組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、（ａ）飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む。

【０３０９】

[0360] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。一部の好ましい実施形態では、組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（

ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。他の好ましい実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の欠失を含む。

【０３１０】

[0361] 一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１１－１６：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への飽和脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。他の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【０３１１】

[0362] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、表３ａから選択される。一部の実施形態では、C_6～C_{24}脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３１２】

[0363] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～

Ｃ２４脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される。一部の実施形態では、Ｃ６～Ｃ２４脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ及びＺ１３－１８：Ａｃからなる群から選択される。

【０３１３】

[0364] 一部の実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの、対応するＣ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの、対応するＣ６～Ｃ２４脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒド及びＣ６～Ｃ２４脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３１４】

[0365] 一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号６４、６５、６６及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。他の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カブラヤガ（Agrotis segetum）又はイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来のデサチュラーゼから選択される脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。

【０３１５】

[0366] 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールを生成する能力を有するヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物に改変する方法であって、以下：（ａ）飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1 Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である。

【０３１６】

[0367] 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で本明細書に記載される組換え微生物を培養することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、脂肪アルデ

ヒド又は脂肪アセテートを回収するステップを更に含む。更なる実施形態では、回収するステップは、蒸留を含む。更に別の実施形態では、回収するステップは、膜に基づく分離を含む。

【０３１７】

［0368］一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_2$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートにエステル化する。

【０３１８】

上記で考察したとおり、第２の態様において、本願は、Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物に関する。第２の態様の例示的実施形態を図２に示す。青色の線は、宿主にとって内因性の生化学的経路、例えば、ｎ－アルカン、脂肪アルコール、又は脂肪アルデヒドを脂肪酸に変換する経路、又は脂肪酸の脂肪アシル－ＣｏＡ、アセチル－ＣｏＡ、又はジカルボン酸への変換を示す。基質からの不飽和脂肪酸への変換は、宿主の内因性又は外因性酵素によって実施され得る。黄色の線は、酵素をコードする外因性核酸分子によって触媒される変換を示す。従って、一部の実施形態では、飽和脂肪酸の飽和脂肪アシル－ＡＣＰへの変換は少なくとも１つの飽和脂肪アシル－ＡＣＰシンテターゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アシル－ＡＣＰシンテターゼは外因性核酸分子によってコードされる。更なる実施形態では、飽和脂肪アシル－ＡＣＰの一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰへの変換は少なくとも１つの脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは外因性核酸分子によってコードされる。更に別の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰは、脂肪酸シンターゼ複合体及び炭素源、例えばマロニル－ＡＣＰを用いて相対的に少なくとも２炭素伸長させることができる。１つのかかる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する２炭素伸長一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰへの変換は少なくとも１つの脂肪酸シンターゼ複合体によって触媒されることができ、ここで脂肪酸シンターゼ複合体は１つ以上の外因性核酸分子によってコードされる。更に別の実施形態では、伸長した一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰの一不飽和又は多価不飽和脂肪アルデヒドへの変換が脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼは外因性核酸分子によってコードされる。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アルデヒドは対応する一不飽和又は多価不飽和脂肪アルコールに変換されることができ、ここで基質の生成物への変換はデヒドロゲナーゼによって触媒され、デヒドロゲナーゼは内因性又は外因性核酸分子によってコードされる。破線は、アセチルトランスフェラーゼ又はメタセシス、又は続く化学転換を利用した機能化フェロモンの生成など、本開示の下流ステップを示す。赤色のバツ印は宿主にとって天然の経路の欠失又は下方制御を示し、これは改変経路へのフラックスを増加させる。

【０３１９】

一実施形態では、本組換え微生物は、（ａ）：Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の、対応する飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｃ）（ｂ）

からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＡＣＰの、（ｂ）の生成物と比べて２炭素の伸長を有する対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒する脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の内因性又は外因性核酸分子；（ｄ）：（ｃ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドへの変換を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｅ）（ｄ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドＣ６～Ｃ２４の、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールへの変換を触媒するデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を発現する。一部の実施形態では、Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸は宿主微生物の内因性酵素を用いて生成され得る。他の実施形態では、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸は宿主微生物の１つ以上の外因性酵素によって生成され得る。

【０３２０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される組換え微生物は、Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の、対応する飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＡＣＰへの変換を触媒するアシル－ＡＣＰシンテターゼを含む。一部の実施形態においてアシル－ＡＣＰシンテターゼは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４炭素原子の鎖長を有する脂肪酸を基質として利用する能力を有するシンテターゼである。例示的実施形態では、本組換え微生物は、ビブリオ・ハーベイ（Vibrio harveyi）、ロドトルラ・グルチニス（Rhodotorula glutinis）、又はヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）種の生物由来の異種アシル－ＡＣＰシンテターゼを含み得る。

【０３２１】

一部の実施形態では、本組換え微生物は脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼを含む。一部の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは可溶性デサチュラーゼである。他の実施形態では、脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは、ハナテンジクアオイ（Pelargonium hortorum）、オオトウワタ（Asclepias syriaca）、又はキャッツクロー（Uncaria tomentosa）種の生物由来である。

【０３２２】

一部の実施形態では、本組換え微生物は脂肪酸シンターゼ複合体を含む。一部の実施形態では、脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の核酸分子は内因性核酸分子である。他の実施形態では、脂肪酸シンターゼ複合体をコードする１つ以上の核酸分子は外因性核酸分子である。

【０３２３】

一部の実施形態では、本明細書に開示される組換え微生物は、Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＡＣＰの、対応するＣ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドへの変換を触媒する脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼを含む。例示的実施形態では、脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼは、ハナテンジクアオイ（Pelargonium hortorum）、オオトウワタ（Asclepias syriaca）、及びキャッツクロー（Uncaria tomentosa）種の生物由来である。一部の実施形態では、本組換え微生物は、不飽和脂肪アルデヒドを対応する不飽和脂肪アルコールに変換するデヒドロゲナーゼを含む。一部の実施形態では、デヒドロゲナーゼをコードする核酸分子は組換え微生物にとって内因性である。他の実施形態では、デヒドロゲナーゼをコードする核酸分子は組換え微生物にとって外因性である。例示的実施形態では、デヒドロゲナーゼをコードする内因性又は外因性核酸分子は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、大腸菌（Escherichia coli）、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、又はカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）種の生物から単離される。

【０３２４】

上記で考察したとおり、第３の態様において、本願は、Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物

に関する。第２の態様の例示的実施形態を図３に示す。青色の線は、宿主にとって内因性の生化学的経路、例えば、ｎ－アルカン、脂肪アルコール、又は脂肪アルデヒドを脂肪酸に変換する経路、又は脂肪酸の脂肪アシル－ＣｏＡ、アセチル－ＣｏＡ、又はジカルボン酸への変換を示す。基質の不飽和脂肪酸への変換は、宿主の内因性又は外因性酵素によって実施され得る。黄色の線は、酵素をコードする外因性核酸分子によって触媒される変換を示す。従って、一部の実施形態では、飽和脂肪酸の飽和脂肪アシル－ＡＣＰへの変換は少なくとも１つの飽和脂肪アシル－ＡＣＰシンターゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アシル－ＡＣＰシンターゼは外因性核酸分子によってコードされる。非天然飽和脂肪アシル－ＡＣＰチオエステルは、不飽和化に好適であり、且つβ酸化又は脂肪酸伸長に用いられるＣｏＡ－チオエステルとは異なる基質を作り出す。更なる実施形態では、飽和脂肪アシル－ＡＣＰの一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰへの変換は少なくとも１つの脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼは外因性核酸分子によってコードされる。更に別の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＡＣＰは脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼによって対応する一不飽和又は多価不飽和脂肪酸に変換されることができる。詳細な実施形態では、可溶性脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを使用して遊離脂肪酸を放出させ、ＣｏＡチオエステルに再活性化させることができる。Ｑ４１６３５、Ｑ３９４７３、Ｐ０５５２１．２、ＡＥＭ７２５１９、ＡＥＭ７２５２０、ＡＥＭ７２５２１、ＡＥＭ７２５２３、ＡＡＣ４９７８４、ＣＡＢ６０８３０、ＥＥＲ８７８２４、ＥＥＲ９６２５２、ＡＢＮ５４２６８、ＡＡＯ７７１８２、ＣＡＨ０９２３６、ＡＣＬ０８３７６、及びこれらのホモログを含めた脂肪アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを使用し得る。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡは、エロンガーゼ及び炭素源、例えばマロニル－ＡＣＰを用いて相対的に少なくとも２炭素伸長させることができる。更に別の実施形態では、伸長した一不飽和又は多価不飽和脂肪アシル－ＣｏＡの一不飽和又は多価不飽和脂肪アルコールへの変換が脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼによって触媒されることができ、ここで脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは外因性核酸分子によってコードされる。破線は、アセチルトランスフェラーゼ又はメタセシス、又は続く化学転換を利用した機能化フェロモンの生成など、本開示の下流ステップを示す。赤色のバツ印は宿主にとって天然の経路の欠失又は下方制御を示し、これは改変経路へのフラックスを増加させる。

【０３２５】

本明細書に教示されるとおり生成される脂肪アルコールを更に変換して、昆虫フェロモン、フレグランス、フレーバー、及びポリマー中間体などの下流生成物を生成することができ、これにはアルデヒド又はアセテート官能基が利用される。従って、一部の実施形態では、本組換え微生物は、アルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、このアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼは、C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する。他の実施形態では、本組換え微生物は、C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み得る。特定の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼ、又はそれをコードする核酸配列は、カンジダ・グラブラータ（Candida glabrata）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、オオカバマダラ（Danaus plexippus）、ニセアメリカタバコガ（Heliotis virescens）、カイコガ（Bombyx mori）、タマナヤガ（Agrotis ipsilon）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、ニシキギ（Euonymus alatus）ヒト（Homo sapiens）、ラカンセア・サーモトレランス（Lachancea thermotolerans）及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）種の生物から単離することができる。例示的実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、GenBank受託番号ＡＹ２４２０６６、ＡＹ２４２０６５、ＡＹ２４２０６４、ＡＹ２４２０６３、ＡＹ２４２０６２、ＥＨＪ６５２０５、ＡＣＸ５３８１２、ＮＰ＿００１１８２

３８１、ＥＨＪ６５９７７、ＥＨＪ６８５７３、ＫＪ５７９２２６、ＧＵ５９４０６１、ＫＴＡ９９１８４．１、ＡＩＮ３４６９３．１、ＡＹ６０５０５３、ＸＰ＿００２５５２７１２．１、ＸＰ＿５０３０２４．１及びＸＰ＿５０５５９５．１から選択される配列を含む。

【０３２６】

組換え微生物

本開示は、様々な外因性酵素を発現するように改変することのできる微生物を提供する。

【０３２７】

本明細書に記載される様々な実施形態において、組換え微生物は真核微生物である。一部の実施形態では、真核微生物は酵母である。例示的実施形態では、酵母は、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、サッカロミセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、ハンゼヌラ属（Hansenula）、クルイベロミセス属（Kluyveromyces）、イサチェンキア属（Issatchenkia）、ザイゴサッカロミセス属（Zygosaccharomyces）、デバリオミセス属（Debaryomyces）、シゾサッカロミセス属（Schizosaccharomyces）、パキソレン属（Pachysolen）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、トリコスポロン属（Trichosporon）、ロドトルラ属（Rhodotorula）、及びミクソザイマ属（Myxozyma）からなる群から選択される属のメンバーである。

【０３２８】

本発明者らは、カンジダ属（Candida）及びヤロウイア属（Yarrowia）などの油産生酵母が、意外にも、Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール基質及び生成物に対して高い耐性を有することを発見した。従って、かかる一例示的実施形態では、本発明の組換え微生物は油産生酵母である。更なる実施形態では、油産生酵母は、ヤロウイア属（Yarrowia）、カンジダ属（Candida）、ロドトルラ属（Rhodotorula）、ロドスポリジウム属（Rhodosporidium）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、トリコスポロン属（Trichosporon）、及びリポミセス属（Lipomyces）からなる群から選択される属のメンバーである。更に別の実施形態では、油産生酵母は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、ロドスポリジウム・トルロイデス（Rhodosporidium toruloides）、リポミセス・スタルケイ（Lipomyces starkey）、Ｌ．リポフェルス（L. lipoferus）、Ｃ．レブカウフィ（C. revkaufi）、Ｃ．プルケリマ（C. pulcherrima）、Ｃ．ウチリス（C. utilis）、ロドトルラ・ミヌタ（Rhodotorula minuta）、トリコスポロン・プルランス（Trichosporon pullans）、Ｔ．クタネウム（T. cutaneum）、クリプトコッカス・カルバツス（Cryptococcus curvatus）、Ｒ．グルチニス（R. glutinis）、及びＲ．グラミニス（R. graminis）から選択される種のメンバーである。

【０３２９】

一部の実施形態では、本組換え微生物は原核微生物である。例示的実施形態では、原核微生物は、大腸菌属（Escherichia）、クロストリジウム属（Clostridium）、ザイモモナス属（Zymomonas）、サルモネラ属（Salmonella）、ロドコッカス属（Rhodococcus）、シュードモナス属（Pseudomonas）、バチルス属（Bacillus）、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、エンテロコッカス属（Enterococcus）、アルカリゲネス属（Alcaligenes）、クレブシエラ属（Klebsiella）、パエニバチルス属（Paenibacillus）、アルスロバクター属（Arthrobacter）、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）、及びブレビバクテリウム属（Brevibacterium）からなる群から選択される属のメンバーである。

【０３３０】

一部の実施形態では、本組換え微生物を使用して、本明細書に開示される一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートが生成される。

【０３３１】

従って、別の態様において、本発明は、本明細書に記載される組換え微生物を使用して一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成

する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートが生成されるまで、炭素源を供給する原料が入った培養培地で組換え微生物を培養することを含む。一部の実施形態では、この方法は、一不飽和又は多価不飽和のＣ１８以下の脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料が入った培養培地で、本明細書に記載の組換え微生物を培養することを含む。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和のＣ１８以下の脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートは回収される。回収は、蒸留、膜に基づく分離、ガスストリッピング、溶媒抽出、及び拡張吸着流動床など、当該技術分野において公知の方法によることができる。

【０３３２】

一部の実施形態では、原料は炭素源を含む。本明細書に記載される様々な実施形態において、炭素源は、糖、グリセロール、アルコール、有機酸、アルカン、脂肪酸、リグノセルロース、タンパク質、二酸化炭素、及び一酸化炭素から選択され得る。更なる実施形態では、糖は、グルコース、フルクトース、及びスクロースからなる群から選択される。

【０３３３】

［0384］一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートを生成する能力を有する微生物に改変する方法。

【０３３４】

［0385］一態様において、本開示は、飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールを生成する能力を有する微生物に改変する方法であって、以下：（ａ）飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ４～Ｃ２２脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子を微生物中に導入することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1 Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である。

【０３３５】

［0386］一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される。一部の好ましい実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３、７８～８０並びにGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１及びＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９

Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する９５％の配列同一性を有する。更なる実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される。更に別の実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される。更なる実施形態では、脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９０％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、本組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びカンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）からなる群から選択される酵母である。

【０３３６】

［0387］一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｅ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ８－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１０－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１２－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１４－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１０：アシル－ｃｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ６Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ８Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１０Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１２Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３Ｅ１６－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３Ｚ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。更なる実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【０３３７】

［0388］一部の実施形態では、本方法は、好ましくは、≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及びジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、表５ｂから選択される。

【０３３８】

[0389] 一部の実施形態では、本方法は、好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、アシルグリセロールリパーゼは、表５ｃから選択される。

【０３３９】

[0390] 一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む。更なる実施形態では、本組換え微生物は、（ｉ）１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）１つ以上のアシルトランスフェラーゼ；（ｉｉｉ）１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ；（ｉｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールオキシダーゼ；及び（ｖｉ）１つ以上のシトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０３４０】

[0391] 一部の実施形態では、本方法は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む。

【０３４１】

[0392] 一部の実施形態では、本方法は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ並びにカンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に

含む。

【０３４２】

[0393] 一部の実施形態では、本方法は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ並びにカンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む。

【０３４３】

[0394] 一部の実施形態では、本方法は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む。

【０３４４】

[0395] 一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の好ましい実施形態では、アルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ｃ４ＨＮ７８、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｎ９ＤＡ８５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｒ８ＸＷ２４、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ａ０ＧＧＭ５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１１７Ｎ１５８及びノストック・プンクチフォルメ（Nostoc punctiforme）ＹＰ＿００１８６５３２４からなる群から選択される。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{1}$

$_{8}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の好ましい実施形態では、≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３４５】

［0396］ 一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される。一部の好ましい実施形態では、≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ及びＺ１１－１６：Ａｃからなる群から選択される。

【０３４６】

［0397］ 一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼから選択される酵素をコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む。一部の好ましい実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒド及び≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３４７】

［0398］ 一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で本明細書に記載される組換え微生物を培養することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを回収するステップを更に含む。更なる実施形態では、回収するステップは、蒸留を含む。更に別の実施形態では、回収するステップは、膜に基づく分離を含む。

【０３４８】

［0399］ 一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_{2}$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートにエステル化する。

【０３４９】

［0400］ 別の態様では、本開示は、飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源

から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有するヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物に改変する方法を提供し、この組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、（ａ）飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子を含む。

【０３５０】

［0401］一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む。一部の好ましい実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。他の好ましい実施形態では、本組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１

３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の欠失を含む。

【０３５１】

［0402］一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１１－１６：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への飽和脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する。他の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される。

【０３５２】

［0403］一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、表３ａから選択される。一部の実施形態では、C_6～C_{24}脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３５３】

［0404］一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される。一部の実施形態では、C_6～C_{24}脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ及びＺ１３－１８：Ａｃからなる群から選択される。

【０３５４】

［0405］一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルデヒド及びC_6～C_{24}脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される。

【０３５５】

［0406］一部の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号６４、６５、６

６及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。他の実施形態では、脂肪アシルデサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カブラヤガ（Agrotis segetum）又はイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来のデサチュラーゼから選択される脂肪アシルデサチュラーゼを含まない。

【０３５６】

［0407］一部の実施形態では、本開示は、飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で本明細書に記載される組換え微生物を培養することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド又は脂肪アセテートを回収するステップを更に含む。更なる実施形態では、回収するステップは、蒸留を含む。更に別の実施形態では、回収するステップは、膜に基づく分離を含む。

【０３５７】

［0408］一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_2$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される。一部の実施形態では、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートに変換される。更なる実施形態では、化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートにエステル化する。

【０３５８】

酵素改変

組換え微生物の酵素は、基質の生成物への変換の１つ以上の側面が向上するように改変することができる。本開示の方法での使用向けに更に改変し得る酵素の非限定的な例としては、デサチュラーゼ（例えば、脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼ又は脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼ）、脂肪アルコールを形成する脂肪アシルレダクターゼ、アシル－ＡＣＰシンテターゼ、脂肪酸シンテターゼ、脂肪酸シンターゼ複合体、アセチルトランスフェラーゼ、デヒドロゲナーゼ、及びアルコールオキシダーゼ、及びこれらの組み合わせが挙げられる。これらの酵素は、触媒活性の向上、選択性の向上、安定性の向上、様々な発酵条件（温度、ｐＨ等）に対する耐性の向上、又は様々な代謝基質、生成物、副生成物、中間体等に対する耐性の向上のため改変することができる。

【０３５９】

デサチュラーゼ酵素は、不飽和基質の不飽和化における触媒活性の向上、炭化水素選択性の向上、Ｅ型生成物と比べたＺ型生成物、又はＺ型生成物と比べたＥ型生成物の選択性の向上のため改変することができる。例えば、Ｚ９脂肪アシルデサチュラーゼは、飽和脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの基質の生成物への変換における収率が向上するように、及びそれに加えて又は代えて、対応するＺ－９脂肪アシル－ＣｏＡの生成のための９位における不飽和化の選択性が向上するように改変することができる。更なる非限定的な例において、脂肪アシル－ＡＣＰシンテターゼはＡＣＰライゲーション活性の向上のため改変することができ；脂肪酸シンターゼ複合体酵素は、脂肪酸基質の伸長の触媒活性の向上のため改変することができ；脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する脂肪アルコールへの還元における触媒活性の向上のため改変することができ；脂肪アルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼは、脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルデヒドへの還元における触媒活性の向上のため改

変することができ；デヒドロゲナーゼは、脂肪アシル－ＡＣＰの、対応する脂肪アルコールへの変換における触媒活性の向上のため改変することができ；アルコールオキシダーゼは、脂肪アルコールの、対応する脂肪アルデヒドへの変換における触媒活性の向上のため改変することができ；及びアセチルトランスフェラーゼは、脂肪アルコールの、対応する脂肪アセテートへの変換における触媒活性の向上のため改変することができる。

【０３６０】

用語「触媒活性の向上」は、特定の酵素活性に関連して本明細書で使用されるとき、非改変デサチュラーゼ（例えば脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼ又は脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼ）、脂肪アルコール又はアルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼ、アシル－ＡＣＰシンテターゼ、脂肪酸シンテターゼ、脂肪酸シンターゼ複合体、アシルトランスフェラーゼ、デヒドロゲナーゼ、又はアルコールオキシダーゼ酵素など、同等の非改変酵素と比べて計測したレベルよりも高いレベルの酵素活性を指す。例えば、特異的酵素の過剰発現は、その酵素に関する細胞の活性レベルの増加につながり得る。デサチュラーゼ（例えば脂肪アシル－ＣｏＡデサチュラーゼ又は脂肪アシル－ＡＣＰデサチュラーゼ）、脂肪アルコール又はアルデヒド形成脂肪アシルレダクターゼ、アシル－ＡＣＰシンテターゼ、脂肪酸シンテターゼ、脂肪酸シンターゼ複合体、アシルトランスフェラーゼ、デヒドロゲナーゼ、又はアルコールオキシダーゼ酵素に突然変異を導入して、触媒活性が向上した改変酵素を得ることができる。酵素活性を増加させる方法は当業者に公知である。かかる技法には、プラスミドコピー数を増加させること及び／又はより強力なプロモーターの使用及び／又は活性化リボスイッチの使用によって酵素の発現を増加させること、突然変異の導入によって酵素の負の調節を軽減すること、特異的突然変異の導入によって比活性を増加させ及び／又は基質に対するK_Mを低下させることによるか、又は定向進化によることが含まれ得る。例えば、Methods in Molecular Biology (vol. 231), ed. Arnold and Georgiou, Humana Press (2003)を参照されたい。

【０３６１】

代謝改変－経路フラックスを増加させるための酵素過剰発現及び遺伝子欠失／下方制御

本明細書に記載される様々な実施形態において、本明細書に記載される生合成経路に関与する組換え微生物の外因性及び内因性酵素は過剰発現させてもよい。

【０３６２】

用語「過剰発現した」又は「過剰発現」は、基礎レベルのｍＲＮＡを発現する又は基礎レベルのタンパク質を有する同様の対応する非修飾細胞と比較したときの、タンパク質をコードするｍＲＮＡのレベルの上昇（例えば異常レベル）、及び／又は細胞中のタンパク質のレベルの上昇を指す。詳細な実施形態では、ｍＲＮＡ又はタンパク質は、遺伝子ｍＲＮＡ、タンパク質、及び／又は活性の増加を呈するように改変された微生物において少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、８倍、１０倍、１２倍、１５倍又はそれ以上過剰発現し得る。

【０３６３】

一部の実施形態では、本開示の組換え微生物は、基質脂肪酸を合成する酵素的能力を含む宿主から作成される。この具体的な実施形態では、脂肪酸の合成又は蓄積を増加させることにより、例えば、改変された脂肪アルコール生成経路に利用可能な脂肪酸の量を増加させることが有用であり得る。

【０３６４】

一部の実施形態では、脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテート生成経路に関与する内因性又は外因性酵素の発現を増加させて脂肪酸から脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートへのフラックスを増加させ、それにより脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートの合成又は蓄積の増加を生じさせることが有用であり得る。

【０３６５】

一部の実施形態では、内因性又は外因性酵素の発現を増加させて補酵素の細胞内レベルを増加させることが有用であり得る。一実施形態では、補酵素はＮＡＤＨである。別の実施形態では、補酵素はＮＡＤＰＨである。一実施形態では、ペントースリン酸経路におけ

るタンパク質の発現が増加することによりＮＡＤＰＨの細胞内レベルが増加する。ペントースリン酸経路は、還元当量の供給に重要な異化経路であり、且つ生合成反応に重要な同化経路である。一実施形態では、グルコース－６－ホスフェートを６－ホスホＤ－グルコノ－１，５－ラクトンに変換するグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼは酵母由来のＺＷＦ１である。別の実施形態では、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＺＷＦ１（ＹＮＬ２４１Ｃ）である。一実施形態では、Ｄ－グルコピラノース－６－ホスフェートを６－ホスホＤ－グルコノ－１，５－ラクトンに変換するグルコース－６－リン酸－１－デヒドロゲナーゼを過剰発現させる。別の実施形態では、グルコース－６－リン酸－１－デヒドロゲナーゼは細菌由来のｚｗｆである。特定の実施形態では、グルコース－６－リン酸－１－デヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｚｗｆ（ＮＰ＿４１６３６６）である。一実施形態では、６－ホスホＤ－グルコノ－１，５－ラクトンをＤ－グルコン酸６－ホスフェートに変換する６－ホスホグルコノラクトナーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼは酵母のＳＯＬ３である。特定の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＳＯＬ３（ＮＰ＿０１２０３３）である。一部の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼは酵母のＳＯＬ４である。特定の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＳＯＬ４（ＮＰ＿０１１７６４）である。一部の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼは細菌のｐｇｌである。特定の実施形態では、６－ホスホグルコノラクトナーゼは大腸菌（E. coli）のｐｇｌ（ＮＰ＿４１５２８８）である。一実施形態では、Ｄ－グルコン酸６－ホスフェートをＤ－リブロース５－ホスフェートに変換する６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは酵母由来のＧＮＤ１である。特定の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＧＮＤ１（ＹＨＲ１８３Ｗ）である。一部の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは酵母由来のＧＮＤ２である。特定の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＧＮＤ２（ＹＧＲ２５６Ｗ）である。一部の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは細菌由来のｇｎｄである。特定の実施形態では、６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｇｎｄ（ＮＰ＿４１６５３３）である。一実施形態では、Ｄ－グリセルアルデヒド３－ホスフェート及びＤ－セドヘプツロース７－ホスフェートをβ－Ｄ－フルクトフラノース６－ホスフェート及びＤ－エリトロース４－ホスフェートに相互変換するトランスアルドラーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、トランスアルドラーゼは酵母のＴＡＬ１である。特定の実施形態では、トランスアルドラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＴＡＬ１（ＮＰ＿０１３４５８）である。一部の実施形態では、トランスアルドラーゼは酵母のＮＱＭ１である。特定の実施形態では、トランスアルドラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＮＱＭ１（ＮＰ＿０１１５５７）である。一部の実施形態では、トランスアルドラーゼは細菌のｔａｌである。特定の実施形態では、トランスアルドラーゼは大腸菌（E. coli）のｔａｌＢ（ＮＰ＿４１４５４９）である。特定の実施形態では、トランスアルドラーゼは大腸菌（E. coli）のｔａｌＡ（ＮＰ＿４１６９５９）である。一実施形態では、Ｄ－エリトロース４－ホスフェート及びＤ－キシルロース５－ホスフェートをβ－Ｄ－フルクトフラノース６－ホスフェート及びＤ－グリセルアルデヒド３－ホスフェートに相互変換する及び／又はＤ－セドヘプツロース７－ホスフェート及びＤ－グリセルアルデヒド３－ホスフェートをＤ－リボース５－ホスフェート及びＤ－キシルロース５－ホスフェートに相互変換するトランスケトラーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、トランスケトラーゼは酵母のＴＫＬ１である。特定の実施形態では、トランスケトラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＴＫＬ１（ＮＰ＿０１５３９９）であ

る。一部の実施形態では、トランスケトラーゼは酵母のＴＫＬ２である。一部の実施形態では、トランスケトラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＴＫＬ２（ＮＰ＿００９６７５）である。一部の実施形態では、トランスケトラーゼは細菌のｔｋｔである。特定の実施形態では、トランスケトラーゼは大腸菌（E. coli）のｔｋｔＡ（ＹＰ＿０２６１８８）である。特定の実施形態では、トランスケトラーゼは大腸菌（E. coli）のｔｋｔＢ（ＮＰ＿４１６９６０）である。一実施形態では、Ｄ－リボース５－ホスフェート及びＤ－リブロース５－ホスフェートを相互変換するリボース－５－リン酸ケトールイソメラーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、リボース－５－リン酸ケトールイソメラーゼは酵母のＲＫＩ１である。特定の実施形態では、リボース－５－リン酸ケトールイソメラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＲＫＩ１（ＮＰ＿０１４７３８）である。一部の実施形態では、リボース－５－リン酸イソメラーゼは細菌のｒｐｉである。特定の実施形態では、リボース－５－リン酸イソメラーゼは大腸菌（E. coli）のｒｐｉＡ（ＮＰ＿４１７３８９）である。特定の実施形態では、リボース－５－リン酸イソメラーゼは大腸菌（E. coli）のｒｐｉＢ（ＮＰ＿４１８５１４）である。一実施形態では、Ｄ－リブロース５－ホスフェート及びＤ－キシルロース５－ホスフェートを相互変換するＤ－リブロース－５－リン酸３－エピメラーゼを過剰発現させる。一部の実施形態では、Ｄ－リブロース－５－リン酸３－エピメラーゼは酵母のＲＰＥ１である。特定の実施形態では、Ｄ－リブロース－５－リン酸３－エピメラーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）のＲＰＥ１（ＮＰ＿０１２４１４）である。一部の実施形態では、Ｄ－リブロース－５－リン酸３－エピメラーゼは細菌のｒｐｅである。特定の実施形態では、Ｄ－リブロース－５－リン酸３－エピメラーゼは大腸菌（E. coli）のｒｐｅ（ＮＰ＿４１７８４５）である。

【０３６６】

一実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現を増加させて補酵素の細胞内レベルを増加させる。一実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼはＤ－トレオ－イソシトレートを２－オキソグルタレートに酸化させると同時にＮＡＤＰＨを生じる。別の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼはＤ－トレオ－イソシトレートを２－オキサロスクシネートに酸化すると同時にＮＡＤＰＨを生じる。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼは酵母由来のＩＤＰである。特定の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＩＤＰ２（ＹＬＲ１７４Ｗ）である。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼは細菌由来のｉｃｄである。特定の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｉｃｄ（ＮＰ＿４１５６５４）である。

【０３６７】

一部の実施形態では、マレートをピルベートに脱炭酸すると同時にＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨを生じるリンゴ酸酵素の発現を増加させて補酵素の細胞内レベルを増加させる。一実施形態では、リンゴ酸酵素はＮＡＤ＋依存性である。別の実施形態では、リンゴ酸酵素はＮＡＤＰ＋依存性である。一実施形態では、リンゴ酸酵素は細菌由来のＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｍａｅＡ（ＮＰ＿４１５９９６）である。一部の実施形態では、ＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼはカセイ菌（Lactobacillus casei）由来のｍａｅＥ（ＣＡＱ６８１１９）である。別の実施形態では、リンゴ酸酵素は酵母由来のミトコンドリアＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼはＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）由来のＭＡＥ１（ＹＫＬ０２９Ｃ）である。別の実施形態では、リンゴ酸酵素は寄生線虫由来のミトコンドリアＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼはブタ回虫（Ascaris suum）由来のＭ８１０５５である。一実施形態では、リンゴ酸酵素は細菌由来のＮＡＤＰ＋依存性リンゴ酸デ

ヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｍａｅＢ（ＮＰ＿４１６９５８）である。一実施形態では、リンゴ酸酵素はトウモロコシ由来のＮＡＤＰ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼはトウモロコシ（Zea mays）由来のｍｅ１である。

【０３６８】

一部の実施形態では、アルデヒドをカルボン酸に酸化させると同時にＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨを生じるアルデヒドデヒドロゲナーゼの発現を増加させて補酵素の細胞内レベルを増加させる。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼはＮＡＤ＋依存性である。別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼはＮＡＤＰ＋依存性である。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは細菌由来のＮＡＤ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のａｌｄＡ（ＮＰ＿４１５９３３）である。別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは酵母由来の細胞質ＮＡＤＰ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼはＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）由来のＡＬＤ６（ＹＰＬ０６１Ｗ）である。別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは細菌由来の細胞質ＮＡＤＰ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ＮＡＤＰ＋依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のａｌｄＢ（ＮＰ＿４１８０４５）である。

【０３６９】

一実施形態では、補酵素の細胞内レベルを増加させるための酵素の過剰発現には、補基質の補充と酵素の過剰発現との併用が含まれる。一実施形態では、酵素の過剰発現をそのの補基質の補充と併用すると、生化学的経路を通じたフラックスが増加する。一実施形態では、ＮＡＤ＋又はＮＡＤＰ＋依存性アルコールデヒドロゲナーゼを補基質と共に発現させる。特定の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼをイソプロパノール補基質と共に発現させる。一実施形態では、ＮＡＤ＋又はＮＡＤＰ＋依存性グルコースデヒドロゲナーゼを補基質と共に発現させる。特定の実施形態では、グルコースデヒドロゲナーゼをグルコース補基質と共に発現させる。

【０３７０】

一実施形態では、トランスヒドロゲナーゼの発現を増加させてＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨを相互変換する。一部の実施形態では、トランスヒドロゲナーゼはピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼである。一部の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼは細菌由来である。特定の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼは大腸菌（E. coli）由来のｐｎｔＡＢ（βサブユニット：ＮＰ＿４１６１１９；αサブユニット：ＮＰ＿４１６１２０）である。一部の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼはヒト由来である。特定の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼはヒト（Homo sapiens）由来のＮＮＴ（ＮＰ＿０３６４７５）である。特定の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼはジャガイモ（Solanum tuberosum）由来である。特定の実施形態では、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼはホウレンソウ（Spinacea oleracea）由来である。

【０３７１】

一部の実施形態では、内因性又は外因性タンパク質の発現を増加させて小胞体（ＥＲ）膜増殖を誘導することが有用であり得る。一部の実施形態では、小胞体膜増殖を誘導して脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートの生成を向上させることができる。一実施形態では、ＥＲに面する１つ以上のループを含有する不活性化ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ（ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡレダクターゼ）の発現を増加させる。特定の実施形態では、１つ以上のループは不活性化ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼの膜貫通ドメイン６～７の間にある。一部の実施形態では、不活性化ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ０４８０７ｐの最初の５００アミノ酸又は最初の５００アミノ酸の部分配列をコードする不活性化タンパク質又はキ

メラを含む。他の実施形態では、不活性化ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＨＭＧ１（ＮＰ＿０１３６３６．１）の最初の５２２アミノ酸又は最初の５２２アミノ酸の部分配列をコードする不活性化タンパク質又はキメラを含む。他の実施形態では、不活性化ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＨＭＧ２（ＮＰ＿０１３５５５．１）の最初の５２２アミノ酸又は最初の５２２アミノ酸の部分配列をコードする不活性化タンパク質又はキメラを含む。一部の実施形態では、１つ以上の調節タンパク質の発現を増加させて、脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートの生成を向上させる。特定の実施形態では、調節タンパク質はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）由来のＨＡＣ１転写因子（ＮＰ＿１１６６２２．１）を含む。特定の実施形態では、調節タンパク質はヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来のＨＡＣ１転写因子（ＹＡＬＩ０Ｂ１２７１６ｐ）を含む。

【０３７２】

合成又は蓄積の増加は、例えば、上述の脂肪アルコール経路酵素の１つ以上をコードする核酸を過剰発現させることによって達成し得る。１つ又は複数の脂肪アルコール経路酵素の過剰発現は、例えば、１つ又は複数の内因性遺伝子の発現増加によるか、又は１つ又は複数の外来遺伝子の発現、又はその発現の増加によって生じさせることができる。従って、天然に存在する生物は、脂肪アルコール生合成経路酵素をコードする１つ以上の核酸分子の過剰発現によって非天然の脂肪アルコール生成微生物が生じるように容易に修飾することができる。加えて、脂肪アルコール生合成経路中の酵素の活性の増加をもたらす内因性遺伝子の突然変異誘発により、天然に存在しない生物を生じさせることができる。

【０３７３】

本開示を携えた当業者であれば、上記に例示したとおりの当該技術分野において周知の方法を用いて脂肪アルコール経路酵素をコードする少なくとも１つの核酸を脂肪アルコールの生成に十分な量で外因的に発現するように本開示の組換え微生物を構築することができ、本明細書に記載される組換え微生物を容易に構築することが可能であろう。

【０３７４】

天然に存在しない脂肪アルコール生成宿主を構築し、及びその発現レベルを試験する方法は、例えば、当該技術分野において周知の組換え及び検出方法によって実施することができる。かかる方法については、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)；Ausubo et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1999)を参照することができる。

【０３７５】

当該技術分野において公知の種々の機構を用いて外因性又は内因性遺伝子を発現、又は過剰発現させることができる。例えば、宿主生物で機能性の発現制御配列に作動可能に連結された、本明細書に例示されるとおりの１つ以上の脂肪アルコール生合成経路酵素コード核酸を有する１つ又は複数の発現ベクターを構築することができる。本発明の微生物宿主生物における使用に適用可能な発現ベクターとしては、宿主染色体への安定組込みのため操作可能なベクター及び選択配列又はマーカーを含め、例えば、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム及び人工染色体が挙げられる。

【０３７６】

例えば、抗生物質又は毒素耐性を提供し、栄養要求欠損を補完し、又は培養培地にない必須栄養素を供給する選択可能なマーカー遺伝子も含まれ得る。一部の実施形態では、本開示は、ｂｌａ（細菌ａｍｐＲ耐性マーカー）の使用を教示する。一部の実施形態において、本開示は、ＵＲＡ３マーカーの使用を教示する。いくつかの態様において、本開示は、スクロース培地中での発酵を可能にするＳＵＣ２遺伝子を含む微生物を教示する。

【０３７７】

発現制御配列には、構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどが含まれてもよく、これらはその技術分野において周知である。２つ以上の外

因性コード核酸を共発現させる場合、両方の核酸を例えば単一の発現ベクターに挿入しても、又は別個の発現ベクターに挿入してもよい。単一ベクター発現については、コード核酸を１つの共通の発現制御配列に作動可能に連結してもよく、又は１つの誘導性プロモーター及び１つの構成的プロモーターなど、異なる発現制御配列に連結してもよい。代謝又は合成経路に関与する外来性核酸配列の形質転換は、当該技術分野において周知の方法を用いて確認することができる。

【０３７８】

発現制御配列は当該技術分野において公知であり、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写ターミネーター、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）など、宿主細胞におけるポリヌクレオチド配列の発現をもたらすものが含まれる。発現制御配列は、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する（Maniatis et al., Science, 236: 1237-1245 (1987)）。例示的発現制御配列については、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。

【０３７９】

様々な実施形態において、発現制御配列はポリヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。「作動可能に連結された」とは、適切な分子（例えば転写活性化因子タンパク質）がその発現制御配列に結合したときに遺伝子発現を可能にするような方法でポリヌクレオチド配列と発現制御配列とが結び付いていることが意味される。作動可能に連結されたプロモーターは、転写及び翻訳の向きに見て選択のポリヌクレオチド配列の上流に位置する。作動可能に連結されたエンハンサーは選択のポリヌクレオチドの上流、その範囲内、又はその下流に位置し得る。

【０３８０】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを生成する生合成経路と競合する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。

【０３８１】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪酸のω－ヒドロキシ脂肪酸への変換を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部のかかる実施形態では、脂肪酸のω－ヒドロキシ脂肪酸への変換を触媒する酵素は、ＸＰ＿５０４４０６、ＸＰ＿５０４８５７、ＸＰ＿５０４３１１、ＸＰ＿５００８５５、ＸＰ＿５００８５６、ＸＰ＿５００４０２、ＸＰ＿５０００９７、ＸＰ＿５０１７４８、ＸＰ＿５００５６０、ＸＰ＿５０１１４８、ＸＰ＿５０１６６７、ＸＰ＿５００２７３、ＢＡＡ０２０４１、ＣＡＡ３９３６６、ＣＡＡ３９３６７、ＢＡＡ０２２１０、ＢＡＡ０２２１１、ＢＡＡ０２２１２、ＢＡＡ０２２１３、ＢＡＡ０２２１４、ＡＡＯ７３９５２、ＡＡＯ７３９５３、ＡＡＯ７３９５４、ＡＡＯ７３９５５、ＡＡＯ７３９５６、ＡＡＯ７３９５８、ＡＡＯ７３９５９、ＡＡＯ７３９６０、ＡＡＯ７３９６１、ＡＡＯ７３９５７、ＸＰ＿００２５４６２７８、ＢＡＭ４９６４９、ＡＡＢ８０８６７、ＡＡＢ１７４６２、ＡＤＬ２７５３４、ＡＡＵ２４３５２、ＡＡＡ８７６０２、ＣＡＡ３４６１２、ＡＢＭ１７７０１、ＡＡＡ２５７６０、ＣＡＢ５１０４７、ＡＡＣ８２９６７、ＷＰ＿０１１０２７３４８、又はこれらのホモログからなる群から選択される。

【０３８２】

一部の実施形態では、組換え微生物を操作して、ヤロウイア・リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ　（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬ

Ｋ９）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ　ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性を欠失、破壊、変異、及び／又は減少させる。

【０３８３】

他の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部のかかる実施形態では、脂肪アシル－ＣｏＡのα，β－エノイル－ＣｏＡへの変換を触媒する酵素は、ＣＡＡ０４６５９、ＣＡＡ０４６６０、ＣＡＡ０４６６１、ＣＡＡ０４６６２、ＣＡＡ０４６６３、ＣＡＧ７９２１４、ＡＡＡ３４３２２、ＡＡＡ３４３６１、ＡＡＡ３４３６３、ＣＡＡ２９９０１、ＢＡＡ０４７６１、ＡＡＡ３４８９１、ＡＡＢ０８６４３、ＣＡＢ１５２７１、ＢＡＮ５５７４９、ＣＡＣ４４５１６、ＡＤＫ１６９６８、ＡＥＩ３７６３４、ＷＰ＿０００９７３０４７、ＷＰ＿０２５４３３４２２、ＷＰ＿０３５１８４１０７、ＷＰ＿０２６４８４８４２、ＣＥＬ８０９２０、ＷＰ＿０２６８１８６５７、ＷＰ＿００５２９３７０７、ＷＰ＿００５８８３９６０、又はこれらのホモログからなる群から選択される。

【０３８４】

[0435] 一部の実施形態では、アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子は、所望の鎖長を超える所望の脂肪アシル－ＣｏＡの切断を除去又は低減するように欠失又は下方制御される。このような欠失又は下方制御標的としては、限定はされないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）が挙げられる。

【０３８５】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、ペルオキシソームバイオジェネシスに関与する１つ以上のタンパク質の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。かかる実施形態では、ペルオキシソームバイオジェネシスに関与する１つ以上のタンパク質は、ＸＰ＿５０５７５４、ＸＰ＿５０１９８６、ＸＰ＿５０１３１１、ＸＰ＿５０４８４５、ＸＰ＿５０３３２６、ＸＰ＿５０４０２９、ＸＰ＿００２５４９８６８、ＸＰ＿００２５４７１５６、ＸＰ＿００２５４５２２７、ＸＰ＿００２５４７３５０、ＸＰ＿００２５４６９９０、ＥＩＷ１１５３９、ＥＩＷ０８０９４、ＥＩＷ１１４７２、ＥＩＷ０９７４３、ＥＩＷ０８２８、又はこれらのホモログからなる群から選択される。

【０３８６】

一部の実施形態では、本組換え微生物は、１つ以上の不飽和脂肪アシル－ＣｏＡ中間体の生合成経路と競合する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ及びＣＴＲＧ＿０６２０９、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内

因性酵素は１つ以上のグリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ及びＣＴＧ＿０４３９０、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のグリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のアシル－ＣｏＡ／ステロールアシルトランスフェラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｆ０６５７８ｇ、ＣＴＲＧ＿０１７６４及びＣＴＲＧ＿０１７６５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡ／ステロールアシルトランスフェラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【０３８７】

[0438] 一部の実施形態では、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及び／又はジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）をコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、短鎖脂肪アシル－ＣｏＡを保持することを選好する１つ以上のＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＧＰＬＡＴ又はＤＧＡＴで置換される。このような欠失又は下方制御標的としては、限定はされないが、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ、カンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９が挙げられる。

【０３８８】

[0439] 一部の好ましい実施形態では、アシルグリセロールリパーゼ（モノ－、ジ－又はトリアシルグリセロールリパーゼ）及びステロールエステルエステラーゼをコードする微生物宿主の１つ以上の遺伝子が欠失又は下方制御され、長鎖アシルグリセロール基質を選好する１つ以上のアシルグリセロールリパーゼで置換される。一部の実施形態では、欠失又は下方制御される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ

０２０Ｃ、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０から選択される。

【０３８９】

別の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アルデヒド中間体を酸化する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ａ１７８７５ｇ、ＹＡＬＩ０Ｅ１５４００ｇ、ＹＡＬＩ０Ｂ０１２９８ｇ、ＹＡＬＩ０Ｆ２３７９３ｇ、ＣＴＲＧ＿０５０１０及びＣＴＲＧ＿０４４７１、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【０３９０】

別の実施形態では、本組換え微生物は、脂肪アセテート生成物を消費する経路内の反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のステロールエステラーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、ＣＴＲＧ＿０１１３８、ＣＴＲＧ＿０１６８３及びＣＴＲＧ＿０４６３０、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のステロールエステラーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のトリアシルグリセロールリパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、ＣＴＲＧ＿０００５７及びＣＴＲＧ＿０６１８５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のトリアシルグリセロールリパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上のモノアシルグリセロールリパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ、ＣＴＲＧ＿０３３６０及びＣＴＲＧ＿０５０４９、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上のモノアシルグリセロールリパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。別の実施形態では、１つ以上の内因性酵素は１つ以上の細胞外リパーゼを含む。組換え酵母微生物に関連して、組換え酵母微生物は、ＹＡＬＩ０Ａ２０３５０ｇ、ＹＡＬＩ０Ｄ１９１８４ｇ、ＹＡＬＩ０Ｂ０９３６１ｇ、ＣＴＲＧ＿０５９３０、ＣＴＲＧ＿０４１８８、ＣＴＲＧ＿０２７９９、ＣＴＲＧ＿０３０５２及びＣＴＲＧ＿０３８８５、又はこれらのホモログからなる群から選択される１つ以上の細胞外リパーゼの活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように改変される。

【０３９１】

［0442］ 一部の実施形態では、本組換え微生物は、（１）β－酸化の過程で脂肪酸を分解し、及び／又は（２）ω－酸化の過程でω－ヒドロキシ脂肪酸を脂肪酸アルデヒド又はジルボン酸に酸化する１つ以上の内因性酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。一部の実施形態では、本組換え微生物は、（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ

０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ；（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の内因性（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；及び（ｉｉｉ）内因性（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む。

【０３９２】

[0443] 一部の実施形態では、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための生合成経路が導入されるＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）微生物は、H222 ΔP ΔA ΔF ΔURA3である。ΔＰは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）におけるアシル－ＣｏＡオキシダーゼ遺伝子（ＰＯＸ　１－６）の欠失を示す。ΔＡは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）における（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ＦＡＤＨ、ＡＤＨ　１－７）の欠失を示す。ΔＦは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）における（脂肪）アルコールオキシダーゼ遺伝子（ＦＡＯ１）の欠失を示す。ΔＵＲＡ３は、酵母をウラシル栄養要求株にする、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）におけるＵＲＡ３遺伝子の欠失を示す。一部の実施形態では、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための生合成経路が導入されるＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）微生物は、H222 ΔP ΔA ΔFである。一部の実施形態では、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、脂肪アルデヒド及び／又は脂肪アセテートの生成のための生合成経路が導入されるＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1 Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である。

【０３９３】

[0444] 酵母Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）、好ましくは、株Ｈ２２２の野生型分離株は、本開示に従って株の構築のための出発株として使用され得る。株Ｈ２２２は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約（the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure）に従って番号ＤＳＭ　２７１８５でDSMZ(Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH,D-38142 Braunschweig)において２９．０４．２０１３で受託された。選択マーカーが更なる遺伝子プロセシングのための株の使用に必要とされる。この選択マーカーは、例えばウラシル栄養要求株の形態で、それ自体公知の方法で株に導入され得る。代わりに、既知のウラシル栄養要求株、好ましくは、株Ｈ２２２－Ｓ４が使用され得る（Mauersberger S,Wang HJ,Gaillard in C, Barth G & Nicaud JM(2001)J Bacterial 183:5102-5109）。それぞれの欠失カセット（例えばＰＯＸ　１－６、ＦＡＤＨ、ＡＤＨ　１－７、ＦＡＯ１）は、ＰＣＲ又は制限によって得られ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｈ２２２－Ｓ４に変換され、これは、Barth及びGaillardin（Barth G & Gaillardin C(1996)Yarrowia lipolytica. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York）に従って、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｈ２２２から生成され得る（Mauers-berger et al.(2001)）。H222 ΔP ΔA ΔF ΔURA3の生成は、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１５／０８６６８４号に記載されている。Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）株H222 ΔP ΔA ΔF ΔURA3が本開示においてデサチュラーゼ及びレダクターゼの導入のための出発微生物として使用される（例えば、実施例７、９及び１０を参照されたい）。

【０３９４】

別の実施形態では、本組換え微生物は、不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコール、アルデヒド、又はアセテートを妨げる、即ち、経路基質又は生成物の、望ましくない副生成物への変

換を触媒する１つ以上の内因性レダクターゼ又はデサチュラーゼ酵素の活性を欠失し、破壊し、変異させ、及び／又は低下させるように操作される。

【０３９５】

微生物合成からの生成物の化学変換

本開示は、組換え微生物によって合成された生成物を下流生成物に変換するために用いることのできる化学変換を記載する。

【０３９６】

一部の実施形態では、微生物によって生成された不飽和脂肪アルコール、アルデヒド、アセテート、又はカルボン酸が続く化学変換を受けることにより、フェロモン、フレグランス、フレーバー、ポリマー、又はポリマー中間体を生成することができる。化学転換の非限定的な例としては、エステル化、メタセシス、及び重合が挙げられる。

【０３９７】

不飽和脂肪カルボン酸は、当該技術分野において公知の方法によってエステル化することができる。例えば、フィッシャーエステル化反応を用いて脂肪カルボン酸を対応する脂肪酸エステルに変換することができる。例えば、Komura, K. et al., Synthesis 2008. 3407-3410を参照されたい。

【０３９８】

炭素鎖の伸長は、不飽和脂肪アルコールをその伸長型誘導体に変換する公知の方法によって実施することができる。オレフィンメタセシス触媒を実施して脂肪炭素鎖上の炭素の数を増加させ、対応する不飽和生成物にＺ型又はＥ型立体化学を付与することができる。

【０３９９】

[0450] 一部の実施形態では、メタセシス触媒は、タングステンメタセシス触媒、モリブデンメタセシス触媒又はルテニウムメタセシス触媒である。特定の実施形態では、メタセシス触媒は、タングステン触媒又はモリブデン触媒である。本発明に用いられる触媒は、一般に、特定の所望の化学反応を媒介し得る金属を用いる。一般に、任意の遷移金属（例えば、ｄ電子を有する）が触媒を形成するのに使用され得、例えば、周期表の第３～１２族又はランタニド系列の１つから選択される金属である。一部の実施形態では、金属は、第３～８族又は場合により第４～７族から選択される。一部の実施形態では、属は、第６族から選択される。用語「第６族」は、クロム、モリブデン及びタングステンを含む遷移金属族を指す。更に、本発明は、これらの元素の形態を含む不均一触媒の形成も含み得る（例えば、金属錯体を不溶性基質、例えば、シリカ上に固定することによって）。

【０４００】

一般に、反応条件下で安定であり、且つ脂肪基質上の官能基（例えば、アルコール、エステル、カルボン酸、アルデヒド、又はアセテート）と非反応性の任意のメタセシス触媒を本開示で用いることができる。かかる触媒は、例えば、Grubbs（Grubbs, R.H., “Synthesis of large and small molecules using olefin metathesis catalysts.” PMSE Prepr., 2012）（本明細書において全体として参照により援用される）によって記載されるものである。シス選択的など、オレフィンの所望の異性体に応じたメタセシス触媒、例えば、Shahane et al.（Shahane, S., et al. ChemCatChem, 2013. 5(12): p. 3436-3459）（本明細書において全体として参照により援用される）によって記載されるものの１つを使用し得る。シス選択性を呈する触媒については以前記載されている（Khan, R. K., et al. J. Am. Chem. Soc., 2013. 135(28): p. 10258-61；Hartung, J. et al. J. Am. Chem. Soc., 2013. 135(28): p. 10183-5.；Rosebrugh, L.E., et al. J. Am. Chem. Soc., 2013. 135(4): p. 1276-9.；Marx, V.M., et al. J. Am. Chem. Soc., 2013. 135(1): p. 94-7.；Herbert, M.B., et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2013. 52(1): p. 310-4；Keitz, B.K., et al. J. Am. Chem. Soc., 2012. 134(4): p. 2040-3.；Keitz, B.K., et al. J. Am. Chem. Soc., 2012. 134(1): p. 693-9.；Endo, K. et al. J. Am. Chem. Soc., 2011. 133(22): p. 8525-7）。

【０４０１】

更なるＺ選択的触媒が（Cannon and Grubbs 2013；Bronner et al. 2014；Hartu

ng et al. 2014；Pribisko et al. 2014；Quigley and Grubbs 2014）に記載されており、これらは本明細書において全体として参照により援用される。その優れた安定性及び官能基耐性のため、一部の実施形態においてメタセシス触媒は、限定はされないが、式上＋２酸化状態である金属中心を持ち、１６の電子数を有し、ペンタ配位した、及び一般式ＬＬ’ＡＡ’Ｍ＝ＣＲｂＲｃ又はＬＬ’ＡＡ’Ｍ＝（Ｃ＝）ｎＣＲｂＲｃ；（式中、
Ｍはルテニウム又はオスミウムであり；
Ｌ及びＬ’は、各々独立して、任意の中性電子供与体リガンドであり、ホスフィン、スルホン化ホスフィン、ホスフィト、ホスフィニト、ホスホニト、アルシン、スチブナイト、エーテル、アミン、アミド、イミン、スルホキシド、カルボキシル、ニトロシル、ピリジン、チオエーテル、又は複素環式カルベンから選択され；及び
Ａ及びＡ’は、ハロゲン、水素、Ｃ1～Ｃ２０アルキル、アリール、Ｃ１～Ｃ２０アルコキシド、アリールオキシド、Ｃ２～Ｃ２０アルコキシカルボニル、アリールカルボキシレート、Ｃ１～Ｃ２０カルボキシレート、アリールスルホニル、Ｃ１～Ｃ２０アルキルスルホニル、Ｃ１～Ｃ２０アルキルスルフィニルから独立して選択されるアニオン性リガンドであり；各リガンドは、任意選択でＣ１～Ｃ５アルキル、ハロゲン、Ｃ１～Ｃ５アルコキシで置換されているか；又はハロゲン、Ｃ１～Ｃ５アルキル、又はＣ１～Ｃ５アルコキシによって任意選択で置換されているフェニル基で置換されており；及びＡ及びＡ’は一緒になって任意選択で二座リガンドを含んでもよく；及び
Ｒｂ及びＲｃは、水素、Ｃ１～Ｃ２０アルキル、アリール、Ｃ１～Ｃ２０カルボキシレート、Ｃ１～Ｃ２０アルコキシ、アリールオキシ、Ｃ１～Ｃ２０アルコキシカルボニル、Ｃ１～Ｃ２０アルキルチオ、Ｃ１～Ｃ２０アルキルスルホニル及びＣ１～Ｃ２０アルキルスルフィニルから独立して選択され、Ｒｂ及びＲｃの各々は、任意選択でＣ１～Ｃ５アルキル、ハロゲン、Ｃ１～Ｃ５アルコキシで置換されているか、又はハロゲン、Ｃ１～Ｃ５アルキル、又はＣ１～Ｃ５アルコキシによって任意選択で置換されているフェニル基で置換されている）の中性ルテニウム又はオスミウム金属カルベン錯体を含む（Pederson and Grubbs 2002）。

【０４０２】

「十分に定義付けられた触媒（well defined catalysts）」などの他のメタセシス触媒も使用することができる。かかる触媒としては、限定はされないが、Grubbs et al.（Tetrahedron 1998, 54: 4413-4450）によって記載されるシュロック（Schrock）のモリブデンメタセシス触媒、２，６－ジイソプロピルフェニルイミドネオフィリデンモリブデン（ＶＩ）ビス（ヘキサフルオロ－ｔ－ブトキシド）、及びCouturier, J. L. et al.（Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31: 628）によって記載されるバセット（Basset）のタングステンメタセシス触媒が挙げられる。

【０４０３】

本開示の方法において有用な触媒としてはまた、米国特許番号第９，７７６，１７９号、Peryshkov, et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133: 20754-20757；Wang, et al. Angewandte Chemie, 2013, 52: 1939-1943；Yu, et al. J. Am. Chem. Soc., 2012, 134: 2788-2799；Halford. Chem. Eng. News, 2011, 89 (45): 11；Yu, et al. Nature, 2011, 479: 88-93；Lee. Nature, 2011, 471: 452-453；Meek, et al. Nature, 2011: 471, 461-466；Flook, et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133: 1784-1786；Zhao, et al. Org Lett., 2011, 13(4): 784-787；Ondi, et al. “High activity, stabilized formulations, efficient synthesis and industrial use of Mo- and W-based metathesis catalysts” XiMo Technology Updates, 2015: http://www.ximo-inc.com/files/ximo/uploads/ download/Summary _3.11.15.pdf；Schrock, et al. Macromolecules, 2010: 43, 7515-7522；Peryshkov, et al. Organometallics 2013: 32, 5256-5259；Gerber, et al. Organometallics 2013: 32, 5573-5580；Marinescu, et al. Organometallics 2012: 31, 6336-6343；Wang, et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2013: 52, 1939 - 1943；Wang, et al. Chem. Eur. J. 2013: 19, 2726-2740；及びTownsend et al. J. Am. Chem. Soc. 2012: 134, 11334-113

37によって記載されるものも挙げられる。

【０４０４】

本開示の方法において有用な触媒としてはまた、国際公開第２０１４／１５５１８５号；国際公開第２０１４／１７２５３４号；米国特許出願公開第２０１４／０３３００１８号；国際公開第２０１５／００３８１５号；及び国際公開第２０１５／００３８１４号に記載されるものも挙げられる。

【０４０５】

本開示の方法において有用な触媒としてはまた、米国特許第４，２３１，９４７号；米国特許第４，２４５，１３１号；米国特許第４，４２７，５９５号；米国特許第４，６８１，９５６号；米国特許第４，７２７，２１５号；国際公開第１９９１／００９８２５号；米国特許第５，０８７，１０号；米国特許第５，１４２，０７３号；米国特許第５，１４６，０３３号；国際公開第１９９２／０１９６３１号；米国特許第６，１２１，４７３号；米国特許第６，３４６，６５２号；米国特許第８，９８７，５３１号；米国特許出願公開第２００８／０１１９６７８号；国際公開第２００８／０６６７５４号；国際公開第２００９／０９４２０１号；米国特許出願公開第２０１１／００１５４３０号；米国特許出願公開第２０１１／００６５９１５号；米国特許出願公開第２０１１／００７７４２１号；国際公開第２０１１／０４０９６３号；国際公開第２０１１／０９７６４２号；米国特許出願公開第２０１１／０２３７８１５号；米国特許出願公開第２０１２／０３０２７１０号；国際公開第２０１２／１６７１７１号；米国特許出願公開第２０１２／０３２３０００号；米国特許出願公開第２０１３／０１１６４３４号；国際公開第２０１３／０７０７２５号；米国特許出願公開第２０１３／０２７４４８２号；米国特許出願公開第２０１３／０２８１７０６号；国際公開第２０１４／１３９６７９号；国際公開第２０１４／１６９０１４号；米国特許出願公開第２０１４／０３３００１８号；及び米国特許出願公開第２０１４／０３７８６３７号に記載されるものも挙げられる。

【０４０６】

本開示の方法において有用な触媒としてはまた、国際公開第２００７／０７５４２７号；米国特許出願公開第２００７／０２８２１４８号；国際公開第２００９／１２６８３１号；国際公開第２０１１／０６９１３４号；米国特許出願公開第２０１２／０１２３１３３号；米国特許出願公開第２０１３／０２６１３１２号；米国特許出願公開第２０１３／０２９６５１１号；国際公開第２０１４／１３４３３３号；及び米国特許出願公開第２０１５／００１８５５７号に記載されるものも挙げられる。

【０４０７】

本開示の方法において有用な触媒としてはまた、米国特許出願公開第２００８／０００９５９８号；米国特許出願公開第２００８／０２０７９１１号；米国特許出願公開第２００８／０２７５２４７号；米国特許出願公開第２０１１／００４００９９号；米国特許出願公開第２０１１／０２８２０６８号；及び米国特許出願公開第２０１５／００３８７２３号に記載されるものも挙げられる。

【０４０８】

本開示の方法において有用な触媒としては、国際公開第２００７／１４０９５４号；米国特許出願公開第２００８／０２２１３４５号；国際公開第２０１０／０３７５５０号；米国特許出願公開第２０１０／００８７６４４号；米国特許出願公開第２０１０／０１１３７９５号；米国特許出願公開第２０１０／０１７４０６８号；国際公開第２０１１／０９１９８０号；国際公開第２０１２／１６８１８３号；米国特許出願公開第２０１３／００７９５１５号；米国特許出願公開第２０１３／０１４４０６０号；米国特許出願公開第２０１３／０２１１０９６号；国際公開第２０１３／１３５７７６号；国際公開第２０１４／００１２９１号；国際公開第２０１４／０６７７６７号；米国特許出願公開第２０１４／０１７１６０７号；及び米国特許出願公開第２０１５／００４５５５８号に記載されるものが挙げられる。

【０４０９】

触媒は、典型的には反応混合物中に準化学量論的量（例えば触媒量）で提供される。特

定の実施形態では、この量は、どの試薬が化学量論的に過剰であるかに応じて、化学反応の限定試薬を基準として約０．００１～約５０ｍｏｌ％の範囲である。一部の実施形態では、触媒は限定試薬に対して約４０ｍｏｌ％以下で存在する。一部の実施形態では、触媒は限定試薬に対して約３０ｍｏｌ％以下で存在する。一部の実施形態では、触媒は、限定試薬に対して約２０ｍｏｌ％未満、約１０ｍｏｌ％未満、約５ｍｏｌ％未満、約２．５ｍｏｌ％未満、約１ｍｏｌ％未満、約０．５ｍｏｌ％未満、約０．１ｍｏｌ％未満、約０．０１５ｍｏｌ％未満、約０．００１５ｍｏｌ％未満、又はそれ以下で存在する。一部の実施形態では、触媒は、限定試薬に対して約２．５ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％の範囲で存在する。一部の実施形態では、反応混合物は約０．５ｍｏｌ％の触媒を含有する。触媒錯体の分子式が２つ以上の金属を含む場合、反応に使用されるその触媒錯体の量はそれに従い調整され得る。

【０４１０】

ある場合には、本明細書に記載される方法は溶媒の非存在下（例えばニート）で実施することができる。ある場合には、本方法は１つ以上の溶媒の使用を含み得る。本開示における使用に好適であり得る溶媒の例としては、限定はされないが、ベンゼン、ｐ－クレゾール、トルエン、キシレン、ジエチルエーテル、グリコール、ジエチルエーテル、石油エーテル、ヘキサン、シクロヘキサン、ペンタン、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、ジオキサン、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミド、酢酸エチル、ピリジン、トリエチルアミン、ピコリンなど、並びにこれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、溶媒は、ベンゼン、トルエン、ペンタン、塩化メチレン、及びＴＨＦから選択される。特定の実施形態では、溶媒はベンゼンである。

【０４１１】

一部の実施形態では、本方法は減圧下で実施される。これは、メタセシス反応の間にエチレンなどの揮発性副生成物が生成され得る場合に有利であり得る。例えば、反応槽からエチレン副生成物を除去すると、有利には、メタセシス反応の平衡が所望の生成物の形成の方にシフトし得る。一部の実施形態では、本方法は約７６０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約７００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約６５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約６００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約５５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約５００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約４５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約４００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約３５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約３００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約２５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約２００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約１５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約１００トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約９０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約８０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約７０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約６０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約５０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約４０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約３０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約２０トル未満の圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約２０トルの圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約１０トルの圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は約１トルの圧力で実施される。一部の実施形態では、本方法は、約１トル未満の圧力で実施される。

【０４１２】

一部の実施形態では、２つのメタセシス反応物は等モル量で存在する。一部の実施形態では、２つのメタセシス反応物は等モル量では存在しない。特定の実施形態では、２つの

反応物は約２０：１、１９：１、１８：１、１７：１、１６：１、１５：１、１４：１、１３：１、１２：１、１１：１、１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、又は１：２０のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約１０：１のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約７：１のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約５：１のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約２：１のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約１：１０のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約１：７のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約１：５のモル比で存在する。特定の実施形態では、２つの反応物は約１：２のモル比で存在する。

【０４１３】

一般に、本明細書に開示されるメタセシス触媒の多くとの反応が、１５％より良い、５０％より良い、７５％より良い、又は９０％より良い収率をもたらす。加えて、反応物及び生成物は、沸点の少なくとも５℃の差、２０℃より大きい差、又は４０℃より大きい差をもたらすように選択される。加えて、メタセシス触媒の使用により、副生成物よりもはるかに速い生成物形成が可能となり、これらの反応を実際上可能な限り迅速に行うためにこれは望ましい。詳細には、反応は約２４時間未満、１２時間未満、８時間未満、又は４時間未満で実施される。

【０４１４】

当業者は、時間、温度及び溶媒が互いに依存し得ること、及び１つを変更すると、本開示の方法によるピレスロイド生成物及び中間体の調製に他も変更する必要があり得ることを理解するであろう。メタセシスステップは種々の温度及び時間で進行させ得る。一般に、本開示の方法における反応は数分～数日の反応時間を用いて行われる。例えば、約１２時間～約７日の反応時間を用いることができる。一部の実施形態では、１～５日の反応時間を用いることができる。一部の実施形態では、約１０分～約１０時間の反応時間を用いることができる。一般に、本開示の方法における反応は約０℃～約２００℃の温度で行われる。例えば、反応は１５～１００℃で行うことができる。一部の実施形態では、反応は２０～８０℃で行うことができる。一部の実施形態では、反応は１００～１５０℃で行うことができる。

【０４１５】

不飽和脂肪エステルは、エステルを対応するアルデヒド又はアルコールに選択的に還元するが、二重結合は還元しない好適な還元剤を用いて還元することができる。不飽和脂肪エステルは、ハロゲン化ジイソブチルアルミニウム（ＤＩＢＡＬ）又はVitride（登録商標）を使用して対応する不飽和脂肪アルデヒドに還元することができる。不飽和脂肪アルデヒドは、例えばＤＩＢＡＬ又はVitride（登録商標）で対応する脂肪アルコールに還元することができる。一部の実施形態では、不飽和脂肪エステルは、AlH_3又は９－ボラビシクロ（３．３．１）ノナン（９－ＢＢＮ）を使用して対応する脂肪アルコールに還元することができる。（Galatis, P. Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. 2001. New York: John Wiley & Sons；及びCarey & Sunderburg. Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, 5th edition. 2007. New York. Springer Sciencesを参照されたい）。

【０４１６】

フェロモン組成物及びその使用

上記に記載したとおり、本明細書に記載される方法によって作られる生成物はフェロモンである。本発明の方法により調製されるフェロモンは、昆虫防除組成物としての使用向けに製剤化することができる。フェロモン組成物は担体を含んでもよく、及び／又はディスペンサーに入っていてもよい。担体は、限定はされないが、不活性な液体又は固体であり得る。

【０４１７】
固体担体の例としては、限定はされないが、充填剤、例えば、カオリン、ベントナイト、ドロマイト、炭酸カルシウム、タルク、粉末マグネシア、フラー土、ワックス、セッコウ、珪藻土、ゴム、プラスチック、チャイナクレー、ミネラル土類、例えば、シリカ、シリカゲル、シリケート、アタクレー（attaclay）、石灰石、チョーク、黄土、クレー、ドロマイト、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、酸化マグネシウム、粉砕合成材料、肥料、例えば、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、チオ尿素及び尿素、植物由来の生成物、例えば、穀物ミール、樹皮ミール、木材ミール及び堅果殻ミール、セルロース粉末、アタパルジャイト、モンモリロナイト、雲母、バーミキュライト、合成シリカ及び合成ケイ酸カルシウム、又はこれらの組成物が挙げられる。
【０４１８】
液体担体の例としては、限定はされないが、水；アルコール、例えば、エタノール、ブタノール又はグリコール、並びにこれらのエーテル又はエステル、例えば、酢酸メチルグリコール；ケトン、例えば、アセトン、シクロヘキサノン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、又はイソホロン；アルカン、例えば、ヘキサン、ペンタン、又はヘプタン；芳香族炭化水素、例えば、キシレン又はアルキルナフタレン；鉱物油又は植物油；脂肪族塩素化炭化水素、例えば、トリクロロエタン又は塩化メチレン；芳香族塩素化炭化水素、例えば、クロロベンゼン；水溶性又は強極性溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、又はＮ－メチルピロリドン；液化ガス；蝋、例えば、蜜蝋、ラノリン、セラック蝋、カルナウバ蝋、果実蝋（シロヤマモモ蝋又はサトウキビ蝋など）、カンデリラ蝋、他の蝋、例えば、マイクロクリスタリン、オゾケライト、セレシン、又はモンタン；塩、例えば、モノエタノールアミン塩、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、硫酸水素アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、シュウ酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、チオ硫酸アンモニウム、二リン酸水素アンモニウム、一リン酸二水素アンモニウム、リン酸水素アンモニウムナトリウム、チオシアン酸アンモニウム、スルファミン酸アンモニウム又はカルバミン酸アンモニウム、これらの混合物が挙げられる。餌又は摂食刺激物質も担体に加えることができる。
【０４１９】
相乗剤
一部の実施形態では、本フェロモン組成物を活性化学剤と組み合わせて相乗効果を生じさせる。本教示の方法によって得られる相乗効果はコルビー（Colby）の式（即ち（Ｅ）＝Ｘ＋Ｙ－（Ｘ×Ｙ／１００）に従い定量化することができる。Colby, R. S., “Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations”, 1967 Weeds, vol. 15, pp. 20-22（全体として参照により本明細書に援用される）を参照されたい。従って、「相乗的」とは、その存在のおかげで所望の効果を相加的な量より多く増加させる成分が意図される。本方法のフェロモン組成物及び補助剤は、農業用活性化合物及びまた農業用補助化合物の有効性を相乗的に高めることができる。
【０４２０】
従って、一部の実施形態では、フェロモン組成物は相乗剤と共に製剤化することができる。用語、「相乗剤」は、本明細書で使用されるとき、フェロモン用量を減量するため、又は少なくとも１つの昆虫種を誘引するフェロモンの有効性を増進するため、フェロモンと共に使用することのできる物質を指す。相乗剤は、フェロモンの非存在下で独立した昆虫誘引剤であっても、又はそうでなくてもよい。
【０４２１】
一部の実施形態では、相乗剤は、鱗翅目（Lepidoptera）の少なくとも１つの種を誘引する揮発性植物化学物質である。用語、「植物化学物質」は、本明細書で使用されるとき、植物種に天然に存在する化合物を意味する。詳細な実施形態では、相乗剤は、β－カリオフィレン、イソカリオフィレン、α－フムレン、イナロール、Ｚ３－ヘキセノール／ヘキセニルアセテート、β－ファルネセン、ベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド

、及びこれらの組み合わせを含む群から選択される。
【０４２２】
フェロモン組成物はフェロモン及び相乗剤を混合形態又は他の組み合わせ形態で含有することができ、又はそれはフェロモン及び相乗剤を非混合形態で独立して含有してもよい。
【０４２３】
殺虫剤
フェロモン組成物は１つ以上の殺虫剤を含み得る。一実施形態では、殺虫剤は当業者に公知の化学的殺虫剤である。化学的殺虫剤の例としては、限定はされないが、シフルトリン、ペルメトリン、シペルメトリン、ビフェントリン、フェンバレレート、フルシトリネート、アジンホスメチル、メチルパラチオン、ブプロフェジン、ピリプロキシフェン、フロニカミド、アセタミプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、アセフェート、マラチオン、キナルホス、クロルピリホス、プロフェノホス、ベンダイオカルブ、ビフェントリン、クロルピリホス、シフルトリン、ダイアジノン、除虫菊、フェンプロパトリン、キノプレン、殺虫ソープ又はオイル、ネオニコチノイド、ジアミド、アベルメクチン及び誘導体、スピノサド及び誘導体、アザジラクチン、ピリダリル、及びこれらの混合物を含めたピレスロイド系又は有機リン系殺虫剤の１つ以上が挙げられる。
【０４２４】
別の実施形態では、殺虫剤は、当業者に公知の１つ以上の生物学的殺虫剤である。生物学的殺虫剤の例としては、限定はされないが、アザジラクチン（ニーム油）、天然ピレトリン由来の毒素、バチルス・チューリンゲンシス（Bacillus thuringiencis）及びビューベリア・バシアナ（Beauveria bassiana）、ウイルス（例えば、CYD-X（商標）、CYD-X HP（商標）、Germstar（商標）、Madex HP（商標）及びSpod-X（商標））、ペプチド（Spear-T（商標）、Spear-P（商標）、及びSpear-C（商標））が挙げられる。
【０４２５】
別の実施形態では、殺虫剤は、神経及び筋肉を標的とする殺虫剤である。例としては、アセチルコリンエステラーゼ（ＡＣｈＥ）阻害薬、例えば、カーバメイト系（例えば、メトミル及びチオジカルブ）及び有機リン系（例えば、クロルピリホス）、ＧＡＢＡ作動性クロライドチャネル拮抗薬、例えば、シクロジエン有機塩素系（例えば、エンドスルファン）及びフェニルピラゾール系（例えば、フィプロニル）、ナトリウムチャネル修飾薬、例えばピレトリン系及びピレスロイド系（例えば、シペルメトリン及びλ－シハロトリン）、ニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）作動薬、例えば、ネオニコチノイド系（例えば、アセタミプリド、チアクロプリド、チアメトキサム）、ニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）アロステリック修飾薬、例えば、スピノシン系（例えば、スピノーズ（spinose）及びスピネトラム）、クロライドチャネル活性化薬、例えば、アベルメクチン系及びミルベマイシン系（例えば、アバメクチン、エマメクチン安息香酸塩）、ニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）遮断薬、例えば、ベンスルタップ及びカルタップ、電位依存性ナトリウムチャネル遮断薬、例えば、インドキサカルブ及びメタフルミゾン、リアノジン受容体修飾薬、例えば、ジアミド系（例えばクロラントラニリプロール及びフルベンジアミド）が挙げられる。別の実施形態では、殺虫剤は、呼吸を標的とする殺虫剤である。例としては、プロトン勾配の破壊によって酸化的リン酸化を脱共役させる化学物質、例えばクロルフェナピル、及びミトコンドリア複合体Ｉ電子伝達阻害薬が挙げられる。
【０４２６】
別の実施形態では、殺虫剤は、中腸を標的とする殺虫剤である。例としては、昆虫中腸膜を破壊する微生物、例えば、バチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）及びバチルス・スフェリカス（Bacillus sphaericus）が挙げられる。
【０４２７】
別の実施形態では、殺虫剤は、成長及び発生を標的とする殺虫剤である。例としては、幼若ホルモン模倣体、例えば、幼若ホルモン類似体（例えばフェノキシカルブ）、キチン生合成阻害薬、タイプ０、例えばベンゾイル尿素（例えば、フルフェノクスロン、ルフェ

ヌロン、及びノバルロン）、及びエクジソン受容体作動薬、例えばジアシルヒドラジン系（例えば、メトキシフェノジド及びテブフェノジド）が挙げられる。

【０４２８】

安定剤

本開示の別の実施形態によれば、本フェロモン組成物は、組成物の安定性を増進する１つ以上の添加剤を含み得る。添加剤の例としては、限定はされないが、脂肪酸及び植物油、例えば、オリーブ油、ダイズ油、トウモロコシ油、ベニバナ油、キャノーラ油、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０４２９】

充填剤

本開示の別の実施形態によれば、本フェロモン組成物は１つ以上の充填剤を含み得る。充填剤の例としては、限定はされないが、１つ以上の鉱物クレー（例えばアタパルジャイト）が挙げられる。一部の実施形態では、誘引剤組成物は１つ以上の有機増粘剤を含み得る。かかる増粘剤の例としては、限定はされないが、メチルセルロース、エチルセルロース、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０４３０】

溶媒

別の実施形態によれば、本開示のフェロモン組成物は１つ以上の溶媒を含み得る。溶媒を含有する組成物は、ハケ塗り、浸漬、ロール塗り、吹き付け、又はその他の方法で、使用者がフェロモンコーティングを付与しようとする被塗物（例えばルアー）に液体組成物を適用することによって適用され得る液体組成物を使用者が利用する場合に望ましい。一部の実施形態では、使用する溶媒は、フェロモン組成物の１つ以上の成分を可溶化、又は実質的に可溶化するように選択される。溶媒の例としては、限定はされないが、水、水性溶媒（例えば、水とエタノールの混合物）、エタノール、メタノール、塩素化炭化水素、石油溶媒、テルペンチン、キシレン、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０４３１】

一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物は有機溶媒を含む。有機溶媒は主に乳化性濃縮物の製剤、ＵＬＶ製剤に使用され、及びそれより程度は少ないが、顆粒状製剤に使用される。時に溶媒の混合物が使用される。一部の実施形態において、本開示は、ケロシン又は精製パラフィンなどの脂肪族パラフィン系オイルを含めた溶媒の使用を教示する。他の実施形態において、本開示は、キシレン並びにＣ９及びＣ１０芳香族溶媒の高分子量画分など、芳香族溶媒の使用を教示する。一部の実施形態では、製剤を水中に乳化させたときの結晶化を防ぐ共溶媒として塩素化炭化水素が有用である。アルコールは時に、溶解力を増加させる共溶媒として使用される。

【０４３２】

可溶化剤

一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物は可溶化剤を含む。可溶化剤はサーファクタントであり、限界ミセル濃度を上回る濃度では水中でミセルを形成し得る。このとき、ミセルは、ミセルの疎水性部分の内部に水不溶性材料を溶解させ又は可溶化することが可能である。可溶化に通常用いられるサーファクタントのタイプは、非イオン剤：モノオレイン酸ソルビタン；モノオレイン酸ソルビタンエトキシレート；及びオレイン酸メチルエステルである。

【０４３３】

結合剤

本開示の別の実施形態によれば、本フェロモン組成物は１つ以上の結合剤を含み得る。結合剤は、前記組成物を塗布する材料の表面へのフェロモン組成物の結合を促進するために使用し得る。一部の実施形態では、結合剤は、フェロモン組成物及び／又は材料の表面への別の添加剤（例えば、殺虫剤、昆虫成長調整物質など）の結合を促進するために使用し得る。例えば、結合剤は、ペンキ及びコーティングに典型的に用いられる合成又は天然樹脂を含み得る。これらは、塗布表面が、コーティングの構造的完全性はなおも維持しつ

つ、昆虫に組成物の成分（例えば、殺虫剤、昆虫成長調整物質など）をかじり取らせ摂食させるのに十分な脆さとなるように修飾されてもよい。

【０４３４】

結合剤の非限定的な例としては、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、部分的に加水分解されたポリ酢酸ビニル、カルボキシメチルセルロース、デンプン、ビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体及びポリ酢酸ビニル、又はこれらの組成物；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、タルク又はポリエチレングリコール、又はこれらの組成物などの滑沢剤；シリコーンエマルション、長鎖アルコール、リン酸エステル、アセチレンジオール、脂肪酸又は有機フッ素化合物などの消泡剤、及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）塩、トリニトリロ三酢酸塩又はポリリン酸塩、又はこれらの組成物などの錯化剤が挙げられる。

【０４３５】

一部の実施形態では、結合剤はまた充填剤及び／又は増粘剤としても役割も果たす。かかる結合剤の例としては、限定はされないが、セラック、アクリル、エポキシ、アルキド、ポリウレタン、亜麻仁油、キリ油、及びこれらの任意の組み合わせの１つ以上が挙げられる。

【０４３６】

界面活性剤

一部の実施形態では、本フェロモン組成物は界面活性剤を含む。一部の実施形態では、界面活性剤は液体農業用組成物に添加される。他の実施形態では、界面活性剤は固形製剤、特に適用前に担体で希釈するように設計された固形製剤に添加される。従って、一部の実施形態では、本フェロモン組成物はサーファクタントを含む。サーファクタントは時に、噴霧タンク混合物に対する補助剤として単独で、或いは鉱物油若しくは植物油などの他の添加剤と共に使用され、標的に対するフェロモンの生物学的性能を向上させる。界面活性剤はアニオン性、カチオン性、又は非イオン性の性質であってもよく、乳化剤、湿潤剤、懸濁剤として、又は他の目的で用いることができる。一部の実施形態では、サーファクタントは、アルキルエトキシレート、直鎖脂肪族アルコールエトキシレート、及び脂肪族アミンエトキシレートなど、非イオン剤である。製剤の技術分野で従来用いられている且つ本製剤にも使用し得るサーファクタントは、McCutcheon’s Detergents and Emulsifiers Annual, MC Publishing Corp., Ridgewood, N.J.,1998、及びEncyclopedia of Surfactants, Vol. I-III, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81に記載されている。一部の実施形態において、本開示は、芳香族スルホン酸、例えば、リグノスルホン酸、フェノールスルホン酸、ナフタレンスルホン酸及びジブチルナフタレンスルホン酸の、及びアリールスルホン酸塩の脂肪酸の、アルキルエーテルの、ラウリルエーテルの、脂肪アルコール硫酸塩の及び脂肪アルコールグリコールエーテル硫酸塩のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩又はアンモニウム塩、スルホン化ナフタレン及びその誘導体とホルムアルデヒドとの縮合物、ナフタレン又はナフタレンスルホン酸とフェノール及びホルムアルデヒドとの縮合物、フェノール又はフェノールスルホン酸とホルムアルデヒドとの縮合物、フェノールとホルムアルデヒド及び亜硫酸ナトリウムとの縮合物、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、エトキシ化イソオクチルフェノール、オクチルフェノール又はノニルフェノール、トリブチルフェニルポリグリコールエーテル、アルキルアリールポリエーテルアルコール、イソトリデシルアルコール、エトキシ化ヒマシ油、エトキシ化トリアリールフェノール、リン酸化トリアリールフェノールエトキシレートの塩、ラウリルアルコールポリグリコールエーテルアセテート、ソルビトールエステル、亜硫酸リグニン廃液又はメチルセルロース、又はこれらの組成物を含めたサーファクタントの使用を教示する。

【０４３７】

一部の実施形態において、本開示は、ジエタノールアンモニウムラウリル硫酸塩などのアルキル硫酸塩；カルシウムドデシルベンゼンスルホン酸塩などのアルキルアリールスルホン酸塩；ノニルフェノール－Ｃ１８エトキシレートなどのアルキルフェノール－アルキ

レンオキシド付加生成物；トリデシルアルコール－Ｃ１６エトキシレートなどのアルコール－アルキレンオキシド付加生成物；ステアリン酸ナトリウムなどのセッケン；ナトリウムジブチルナフタレンスルホン酸塩などのアルキルナフタレンスルホン酸塩；スルホコハク酸ナトリウムジ（２－エチルヘキシル）などのスルホコハク酸塩のジアルキルエステル；オレイン酸ソルビトールなどのソルビトールエステル；塩化ラウリルトリメチルアンモニウムなどの第４級アミン；ステアリン酸ポリエチレングリコールなど、脂肪酸のポリエチレングリコールエステル；エチレンオキシドと酸化プロピレンとのブロック共重合体；モノアルキル及びジアルキルリン酸エステルの塩；ダイズ油、菜種／キャノーラ油、オリーブ油、ヒマシ油、ヒマワリ種油、ヤシ油、トウモロコシ油、綿実油、亜麻仁油、パーム油、ピーナッツ油、ベニバナ油、ゴマ油、キリ油などの植物油；及び上記の植物油のエステル、特にメチルエステルを含めた他の好適な界面活性剤を教示する。

【０４３８】

湿潤剤

一部の実施形態では、本フェロモン組成物は湿潤剤を含む。湿潤剤は、液体に加えたときに液体とそれが展着する表面との間の界面張力を低減することによってその液体の展着力又は浸透力を増加させる物質である。湿潤剤は、農薬製剤中に２つの主な機能：加工及び製造中に可溶性液体濃縮物又は懸濁濃縮物を作製するための粉末の水に対する濡れ速度を高めるため；及び噴霧タンク又は他のベッセル内で生成物を水と混合するときに濡れ性粉末の濡れ時間を短縮し、及び水分散性顆粒への水の浸透を向上させるために使用される。一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物に使用される湿潤剤の例は、濡れ性粉末、懸濁濃縮物、及び水分散性顆粒製剤を含め、ラウリル硫酸ナトリウム；ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム；アルキルフェノールエトキシレート；及び脂肪族アルコールエトキシレートである。

【０４３９】

分散剤

一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物は分散剤を含む。分散剤は、粒子の表面上に吸着して粒子が分散した状態を保つことを促進し、その再集合を防ぐ物質である。一部の実施形態では、分散剤は、製造中の分散及び懸濁を促進し、及び噴霧タンク内で粒子が水中に再び分散することを確実にするため、本開示のフェロモン組成物に添加される。一部の実施形態では、分散剤は、濡れ性粉末、懸濁濃縮物、及び水分散性顆粒に使用される。分散剤として使用されるサーファクタントは粒子表面上に強力に吸着する能力を有し、粒子の再集合に対する電荷的又は立体的バリアを提供する。一部の実施形態では、最も一般的に用いられるサーファクタントは、アニオン性、非イオン性、又はこれらの２つのタイプの混合物である。

【０４４０】

一部の実施形態では、濡れ性粉末製剤について、最も一般的な分散剤はリグノスルホン酸ナトリウムである。一部の実施形態では、ナフタレンスルホン酸ナトリウムホルムアルデヒド縮合物などの高分子電解質を用いると、懸濁濃縮物が極めて良好な吸着及び安定化をもたらす。一部の実施形態では、エトキシ化トリスチリルフェノールリン酸エステルも使用される。一部の実施形態では、アルキルアリールエチレンオキシド縮合物及びＥＯ－ＰＯブロック共重合体などが、時に懸濁濃縮物の分散剤としてアニオン剤と組み合わされる。

【０４４１】

ポリマーサーファクタント

一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物はポリマーサーファクタントを含む。一部の実施形態では、ポリマーサーファクタントは、非常に長い疎水性「骨格」と、「」サーファクタントの「歯」を形成する多数のエチレンオキシド鎖とを有する。一部の実施形態では、これらの高分子量ポリマーは、疎水性骨格が粒子表面上へのアンカリング点を多く有するため、懸濁濃縮物に極めて良好な長期安定性を付与することができる。一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物に使用される分散剤の例は、リグノスルホン

酸ナトリウム；ナフタレンスルホン酸ナトリウムホルムアルデヒド縮合物；トリスチリルフェノールエトキシレートリン酸エステル；脂肪族アルコールエトキシレート；アルキルエトキシレート；ＥＯ－ＰＯブロック共重合体；及びグラフト共重合体である。

【０４４２】

乳化剤

一部の実施形態では、本開示のフェロモン組成物は乳化剤を含む。乳化剤は、ある液相の液滴の別の液相中における懸濁液を安定化させる物質である。乳化剤がなければ、これらの２つの液体は２つの不混和性液相に分離し得る。一部の実施形態において、最も一般的に用いられる乳化剤ブレンドには、１２個以上のエチレンオキシド単位を有するアルキルフェノール又は脂肪族アルコールと、ドデシルベンゼンスルホン酸の油溶性カルシウム塩とが含まれる。８～１８の範囲の親水性－親油性バランス（「ＨＬＢ」）値が、通常、良好な安定エマルションをもたらす。一部の実施形態において、時に少量のＥＯ－ＰＯブロック共重合体サーファクタントを加えることによりエマルション安定性を向上させることができる。

【０４４３】

ゲル化剤

一部の実施形態では、本フェロモン組成物はゲル化剤を含む。増粘剤又はゲル化剤は主に懸濁濃縮物、エマルション、及びサスポエマルションの製剤中に、液体のレオロジー又は流れ特性を改良し、且つ分散した粒子又は液滴の分離及び沈降を防ぐために使用される。増粘剤、ゲル化剤、及び沈降防止剤は、概して２種類、即ち水不溶性微粒子と水溶性ポリマーとに分けられる。クレー及びシリカを用いて懸濁濃縮物製剤を作製することが可能である。一部の実施形態では、本フェロモン組成物は、限定はされないが、モンモリロナイト、例えばベントナイト；ケイ酸アルミウニムマグネシウム；及びアタパルジャイトを含めた１つ以上の増粘剤を含む。一部の実施形態において、本開示は、増粘剤としての多糖類の使用を教示する。最も一般的に用いられる多糖類のタイプは、種子及び海藻の天然抽出物又はセルロースの合成誘導体である。一部の実施形態はキサンタンを利用し、一部の実施形態はセルロースを利用する。一部の実施形態において、本開示は、限定はされないが、グアーガム；ローカストビーンガム；カラギーナン；アルギン酸塩；メチルセルロース；カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＳＣＭＣ）；ヒドロキシエチルセルロース（ＨＥＣ）を含めた増粘剤の使用を教示する。一部の実施形態において、本開示は、加工デンプン、ポリアクリレート、ポリビニルアルコール、及びポリエチレンオキシドなど、他のタイプの沈降防止剤の使用を教示する。別の良好な沈降防止剤はキサンタンガムである。

【０４４４】

消泡剤

一部の実施形態では、界面張力を低下させるサーファクタントの存在により、製造時の混合操作中及び噴霧タンクを用いた適用時に水性製剤に泡立ちが生じ得る。従って、一部の実施形態では、起泡傾向を抑えるため、製造段階で、又は瓶／噴霧タンクへの充填前に、多くの場合に消泡剤が添加される。概して、２つのタイプの消泡剤、即ちシリコーン系と非シリコーン系とがある。シリコーン系は、通常ジメチルポリシロキサンの水性エマルションであり、一方、非シリコーン系消泡剤はオクタノール及びノナノールなどの水不溶性油、又はシリカである。いずれの場合にも、消泡剤の機能は、気水界面からサーファクタントを排除することである。

【０４４５】

保存剤

一部の実施形態では、本フェロモン組成物は保存剤を含む。

【０４４６】

追加的な活性薬剤

本開示の別の実施形態によれば、本フェロモン組成物は１つ以上の昆虫摂食刺激物質を含み得る。昆虫摂食刺激物質の例としては、限定はされないが、粗綿実油、フィトールの

脂肪酸エステル、ゲラニルゲラニオールの脂肪酸エステル、他の植物アルコールの脂肪酸エステル、植物抽出物、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０４４７】

本開示の別の実施形態によれば、本フェロモン組成物は１つ以上の昆虫成長調整物質（「ＩＧＲ」）を含み得る。ＩＧＲは、昆虫の成長を変えて奇形の昆虫を作り出すために用いられ得る。昆虫成長調整物質の例としては、例えばジミリンが挙げられる。

【０４４８】

本開示の別の実施形態によれば、誘引剤組成物は、捕獲した昆虫を不妊化し又は他の形でその生殖能力を遮断して、それにより以降の世代の集団を減少させる１つ以上の昆虫不妊化剤を含み得る。場合により、不妊化昆虫を生存させて非捕獲昆虫と交尾に関して競合させることが、直に殺虫するより有効である。

【０４４９】

噴霧可能組成物

一部の実施形態では、本明細書に開示されるフェロモン組成物は、噴霧可能組成物（即ち、噴霧可能なフェロモン組成物）として製剤化することができる。噴霧可能組成物には、水性溶媒、例えば、水、又は水とアルコール、グリコール、ケトン、又は他の水混和性溶媒との混合物を使用することができる。一部の実施形態では、かかる混合物の含水量は、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、又は少なくとも約９０％である。一部の実施形態では、噴霧可能組成物は濃縮物、即ち、フェロモンと水性溶媒中の他の添加剤（例えば、蝋様物質、安定剤など）との濃縮懸濁液であり、溶媒（例えば水）を加えることにより最終使用濃度に希釈され得る。

【０４５０】

一部の実施形態では、噴霧可能組成物中におけるフェロモン及びその位置異性体の担体として蝋様物質を使用することができる。蝋様物質は、例えば、生分解性蝋、例えば蜜蝋、カルナウバ蝋など、カンデリラ蝋（炭化水素蝋）、モンタン蝋、セラック及び同様の蝋、飽和又は不飽和脂肪酸、例えば、ラウリン酸、パルミチン酸、オレイン酸又はステアリン酸、脂肪酸アミド及びエステル、ヒドロキシ脂肪酸エステル、例えばヒドロキシエチル又はヒドロキシプロピル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、及び低分子量ポリエステル、例えばポリアルキレンスクシネートであってもよい。

【０４５１】

一部の実施形態では、噴霧可能なフェロモン組成物と共に安定剤を使用することができる。安定剤は、濃縮物の粒径を調節し、及び／又はフェロモン組成物の安定懸濁液の調製を可能にするために用いられ得る。一部の実施形態では、安定剤はヒドロキシルポリマー及び／又はエトキシ化ポリマーから選択される。例としては、エチレンオキシド・酸化プロピレン共重合体、多価アルコール、例えば、デンプン、マルトデキストリン及び他の可溶性炭水化物又はこれらのエーテル若しくはエステル、セルロースエーテル、ゼラチン、ポリアクリル酸並びにこれらの塩及び部分エステルなどが挙げられる。他の実施形態では、安定剤としては、ポリビニルアルコール及びその共重合体、例えば部分的に加水分解されたポリ酢酸ビニルを挙げることができる。安定剤は、粒径の調節及び／又は安定懸濁液の調製に十分なレベル、例えば水溶液の０．１％～１５％で使用し得る。

【０４５２】

一部の実施形態では、噴霧可能なフェロモン組成物と共に結合剤を使用することができる。一部の実施形態では、結合剤は分散液を更に安定化させ、及び／又は標的場所（例えば、トラップ、ルアー、植物など）への噴霧された分散液の接着性を向上させる役割を果たし得る。結合剤は、多糖、例えば、アルギン酸塩、セルロース誘導体（アセテート、アルキル、カルボキシメチル、ヒドロキシアルキル）、デンプン又はデンプン誘導体、デキストリン、ガム（アラビア、グアー、ローカストビーン、トラガカント、カラギーナンなど）、スクロースなどであってもよい。結合剤はまた、ポリビニルピロリドンなどの非炭水化物水溶性ポリマー、又は酸及び／又は塩形態のポリアクリル酸又はポリメタクリル酸

などの酸性ポリマー、又はかかるポリマーの混合物であってもよい。

【０４５３】

マイクロカプセル化フェロモン

一部の実施形態では、本明細書に開示されるフェロモン組成物は、Ill’lchev, AL et al., J. Econ. Entomol. 2006;99(6):2048-54；及びStelinki, LL et al., J. Econ. Entomol. 2007;100(4):1360-9に開示されるようなマイクロカプセル化フェロモンとして製剤化することができる。マイクロカプセル化フェロモン（ＭＥＣ）は、ポリマーカプセル内に封入されたフェロモンの小液滴である。このカプセルは周囲環境へのフェロモンの放出速度を制御し、十分に小さいため、噴霧殺虫剤に用いられるのと同じ方法で適用される。マイクロカプセル化フェロモン製剤の野外有効寿命は、とりわけ、気候条件、カプセルサイズ及び化学的特性に依存して、数日～１週間を僅かに超える範囲であり得る。

【０４５４】

徐放製剤

フェロモン組成物は、大気中への徐放をもたらすように、及び／又は放出後の分解から保護されるように製剤化することができる。例えば、フェロモン組成物は、マイクロカプセル、生分解性フレーク及びパラフィン蝋ベースのマトリックスなどの担体に含まれてもよい。或いは、フェロモン組成物は、徐放噴霧可能なものとして製剤化することができる。

【０４５５】

特定の実施形態では、本フェロモン組成物は、当業者に公知の１つ以上のポリマー剤を含み得る。ポリマー剤は、環境への組成物の放出速度を制御し得る。一部の実施形態では、ポリマー誘引剤組成物は環境条件の影響を受け難い。ポリマー剤はまた、環境への組成物の持続的な放出を可能にする持続放出剤であってもよい。

【０４５６】

ポリマー剤の例としては、限定はされないが、セルロース、カゼインなどのタンパク質、フッ化炭素系ポリマー、水素化ロジン、リグニン、メラミン、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル（ＰＶＡＣ）などのビニルポリマー、ポリカーボネート、ポリビニリデンジニトリル、ポリアミド、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリアミド－アルデヒド、ポリビニルアルデヒド、ポリエステル、ポリ塩化ビニル（ＰＶＣ）、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリビニリデン、シリコーン、及びこれらの組み合わせが挙げられる。セルロースの例としては、限定はされないが、メチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース、酪酸酢酸セルロース、プロピオン酸酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０４５７】

徐放製剤又は持続放出製剤に用いることのできる他の薬剤としては、脂肪酸エステル（セバシン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸又はアラキジン酸エステルなど）又は脂肪アルコール（ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、トリデセノール、テトラデカノール、テトラデセノール、テトラデカジエノール、ペンタデカノール、ペンタデセノール、ヘキサデカノール、ヘキサデセノール、ヘキサデカジエノール、オクタデセノール及びオクタデカジエノールなど）が挙げられる。

【０４５８】

本発明の方法により調製されるフェロモン、並びにそのようなフェロモンを含有する組成物は、様々な環境下の昆虫の行動及び／又は成長を制御するために使用することができる。このフェロモンを使用して、例えば、雄又は雌昆虫を特定の標的範囲に誘引し、又はそこから忌避させることができる。このフェロモンを使用して昆虫を誘引して、被害を受け易い作物範囲から引き離すことができる。また、このフェロモンを使用して、例えば、昆虫モニタリング、大量捕獲、ルアー／誘引殺虫又は交信撹乱戦略の一環として昆虫を誘引することができる。

【０４５９】

ルアー

本開示のフェロモン組成物はルアーに塗布又は噴霧されてもよく、又はその他の方法で

ルアーにフェロモン組成物を含浸させてもよい。
【０４６０】
トラップ
本開示のフェロモン組成物は、任意の昆虫種、例えば鱗翅目（Lepidoptera）の昆虫を誘引するために一般的に用いられるものなど、トラップにおいて使用し得る。かかるトラップは当業者に周知であり、多くの州及び国で昆虫根絶計画において一般的に用いられている。一実施形態では、トラップは、フェロモン組成物を保持するための１つ以上の隔壁、容器、又は貯蔵用の入れ物を備える。従って、一部の実施形態において、本開示は、少なくとも１つのフェロモン組成物が充填されたトラップを提供する。従って、本開示のフェロモン組成物は、例えばトラップに毒性物質を組み込んで捕獲した昆虫を殺虫することによる、昆虫モニタリング、大量捕獲、交信撹乱、又はルアー／誘引殺虫戦略の一環として例えば昆虫を誘引するため、トラップにおいて使用することができる。
【０４６１】
大量捕獲は、保護しようとする作物に高密度のトラップを置き、作物が被害を受ける前に大部分の昆虫を除去することを含む。ルアー／誘引殺虫技法も同様であるが、但し昆虫はルアーに誘引された後、致死剤に曝される。致死剤が殺虫剤である場合、ディスペンサーにまた、有効量の殺虫剤を摂食するよう昆虫を誘き寄せる餌又は摂食刺激物質が入っていてもよい。殺虫剤は当業者に公知の殺虫剤であってよい。殺虫剤は誘引剤組成物と混合されてもよく、又はトラップ内に別々に存在してもよい。混合物は昆虫の誘引と殺虫との二重の機能を果たし得る。
【０４６２】
かかるトラップは任意の好適な形態をとることができ、殺虫トラップは必ずしも毒性物質を組み込んでいる必要はなく、任意選択で昆虫は、溺死又は感電死など、他の手段によって殺虫してもよい。或いは、トラップが昆虫を真菌又はウイルスに感染させ、それが後に昆虫を殺虫してもよい。昆虫が殺虫されない場合であっても、トラップは雌の昆虫がいる場所から雄の昆虫を取り除いて繁殖を防ぐ役割を果たし得る。
【０４６３】
当業者は、種々の異なるトラップが可能であることを理解するであろう。かかるトラップの好適な例としては、ウォータートラップ、粘着トラップ、及びワンウェイトラップが挙げられる。粘着トラップは多くの種類が出ている。粘着トラップの一例は、三角形又は楔形断面のボール紙製の構造物で、内表面が不乾性粘着物質で被覆されているものである。昆虫が粘着面に接触して、捕虫される。ウォータートラップは水及びデタージェントの受け皿を備え、それを用いて昆虫が捕獲される。デタージェントによって水の表面張力を失わせることにより、受け皿に誘引された昆虫を水に溺れさせる。ワンウェイトラップでは昆虫はトラップに入ることはできるが、出ることはできない。本開示のトラップは、昆虫が一層誘引されるように鮮やかな色に着色されてもよい。
【０４６４】
一部の実施形態では、本組成物を含むフェロモントラップが他の種類の捕虫機構と組み合わされてもよい。例えば、フェロモン組成物に加え、トラップは、蛾を誘引するため１つ以上の蛍光灯、１つ以上の粘着性基材及び／又は１つ以上の着色表面を含んでもよい。他の実施形態では、本組成物を含むフェロモントラップは、他の種類の捕虫機構を有しなくてもよい。
【０４６５】
トラップは野外に１年のうちいつでも設置することができる。当業者は、特定のトラップに使用する適切な組成物量を容易に決定することができ、及びまた、保護しようとする作物畑の１エーカー当たりのトラップの適切な密度も決定することができる。
【０４６６】
トラップは、昆虫の被害を受ける（又は潜在的に被害を受ける可能性のある）範囲に位置決めすることができる。概して、トラップは樹木又は植物上に又はその近くに置かれる。フェロモンの芳香が昆虫をトラップに誘引する。次に昆虫はトラップ内に捕らわれ、動

けなくなり、及び／又は例えばトラップに存在する致死剤によって殺虫され得る。
【０４６７】
トラップはまた、単純に雄が雌の位置を特定できないよう雌が放つフェロモンを圧倒するように果樹園内に置かれてもよい。これに関連して、トラップとしては、単純な器具、例えばフェロモンを分注する保護された吸液芯（wickable）以上のものは何も必要ない。
【０４６８】
本開示のトラップは完成品形態で提供されてもよく、ここでは本開示の化合物は既に適用されている。かかる例では、化合物の半減期に応じて化合物は露出していてもよく、又は他のアロマディスペンサーで標準的なものなど、従来方法で密封されていてもよく、この密封はトラップが所定位置に置かれた後に限り取り除かれる。
【０４６９】
或いは、トラップは別個に販売されてもよく、トラップが所定位置に置かれた後に捕獲のための所定量を適用し得るように、本開示の化合物が分注可能な様式で提供されてもよい。従って、本開示は、化合物をサシェ又は他のディスペンサーに提供し得る。
【０４７０】
ディスペンサー
フェロモン組成物は、特定の環境において組成物を放出するためのディスペンサーと併せて使用することができる。当該技術分野において公知の任意の好適なディスペンサーを使用し得る。かかるディスペンサーの例としては、限定はされないが、エアロゾル放出器、手作業で適用するディスペンサー、フェロモンがゆっくりと放出される透過性バリアを有するリザーバを含むバブルキャップ、フェロモン組成物を含浸させたゴム、プラスチック、革、綿、脱脂綿、木材又は木材産物でできたパッド、ビーズ、チューブ、ロッド、スパイラル又はボールが挙げられる。例えば、フェロモン組成物が蒸発するポリ塩化ビニルラミネート、ペレット、顆粒、ロープ又はスパイラル、又はゴムセプタム。当業者は、所望の適用、貯蔵、輸送又は取扱い方法に好適な担体及び／又はディスペンサーを選択することが可能であろう。
【０４７１】
別の実施形態では、フェロモン物質それ自体を含有する粉末によって雄の昆虫を汚染させる装置が用いられ得る。汚染された雄は次に飛び去り、大気にフェロモン物質を充満させることによるか、又は本物の雌よりむしろ汚染された雄に他の雄を誘引することにより、交信撹乱源を供給する。
【０４７２】
行動修正
本明細書に開示される方法により調製したフェロモン組成物を使用して、昆虫の行動を制御又は調節し得る。一部の実施形態では、標的の昆虫の行動は、特に、昆虫が特定の場所に誘引されるが前記場所と接触はしないように、又はかかる昆虫が実際に前記場所に接触するように、組成物中のフェロモンと位置異性体との比率を変えることによって調整可能な方法で調節し得る。従って、一部の実施形態では、フェロモンを使用して昆虫を誘引して、被害を受け易い作物範囲から引き離すことができる。従って、本開示はまた、ある場所に昆虫を誘引する方法も提供する。この方法は、ある場所に有効量のフェロモン組成物を投与することを含む。
【０４７３】
交信撹乱方法は、捕獲された昆虫の総数又は総量を定期的にモニタリングすることを含み得る。モニタリングは、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、３ヵ月に１回、又は監視者によって選択された任意の他の時間など、所定期間中に捕獲された昆虫の数をカウントすることにより実施し得る。捕獲された昆虫のかかるモニタリングは、その特定の期間についての昆虫個体数を推定することを促進し、それにより総合的害虫管理システムにおける害虫防除の詳細なタイプ及び／又は投薬量を決定することを促進し得る。例えば、昆虫個体数が多いことが見出されると、必然的に昆虫の駆除方法の使用が必要となる。新しい生息場所における被害の早期警告は、その集団が手に負えなくなる前に対策を取ることを可

能にし得る。逆に、昆虫個体数が少ないことが見出されると、その集団のモニタリングを継続することで十分であるという判断につながり得る。昆虫集団は、昆虫が特定の閾値に達したときにのみ、それらの昆虫が防除するように定期的にモニタされ得る。これにより、費用効率の高い昆虫防除がもたらされ、殺虫剤使用の環境影響が低減される。

【０４７４】

交信撹乱

本開示の方法により調製されるフェロモンはまた、交尾の阻害にも使用することができる。交信撹乱は、昆虫を混乱させて交尾場所の特定及び／又は求愛を阻害し、それにより交尾を防ぎ、生殖周期を遮断する人工刺激（例えば、本明細書に開示されるとおりのフェロモン組成物）を導入することによって害虫を防除するように設計された害虫管理法である。

【０４７５】

鱗翅目（Lepidoptera）の種など、農業上関心がもたれる多くの昆虫種では、雌がその種の性フェロモンを成す特定の化学的ブレンドのトレイルを空中に放つ。この空中のトレイルはフェロモンプルームと称される。その種の雄はフェロモンプルームに含まれる情報を用いて放出元の雌（「コーリング」雌として知られる）の居場所を特定する。交信撹乱は、雌の昆虫が産生する性フェロモンを模倣するように設計された合成フェロモンを昆虫の生息場所に導入することにより、雄の昆虫がプルームを辿る自然な反応を利用する。従って、一部の実施形態では、交信撹乱に利用される合成フェロモンは、標的の昆虫によって産生されない、性フェロモンの化学構造を有するフェロモン及びその位置異性体を含む合成的に誘導されたフェロモン組成物である。

【０４７６】

交信撹乱の一般的な効果は、天然のフェロモンプルームをマスクすることにより雄の昆虫を混乱させて、交尾相手を探し出そうとするのを利用して雄に「偽のフェロモンのトレイル」を辿らせ、雄が「コーリング」雌に反応する能力に影響を及ぼすことである。結果的に、雄集団が雌の居場所を特定して交尾に成功する可能性が低くなり、これが最終的には繁殖の中止及び昆虫被害の縮小につながる。

【０４７７】

交信撹乱戦略には、混乱、トレイルのマスキング及び偽のトレイルの追随が含まれる。昆虫を高濃度のフェロモンに絶えず曝露させると、雌の昆虫が放出する正常なレベルのフェロモンに雄の昆虫が反応できなくなり得る。トレイルのマスキングはフェロモンを用いて雌が放出するフェロモンのトレイルを破壊する。偽のトレイルの追随は、高濃度のフェロモンのスポットを多数配置して雄に辿るべき多くの偽のトレイルを提示することにより行われる。十分に多量に放出されると、雄の昆虫は天然の性フェロモン源（雌の昆虫）を探し出すことができず、交尾が起こり得なくなる。

【０４７８】

一部の実施形態では、吸液芯又はトラップが少なくとも小昆虫の繁殖期に等しい期間にわたってフェロモンを放出し、ひいては交信撹乱を引き起こすように適合され得る。小昆虫が長い繁殖期を有する場合、又は繁殖期を繰り返す場合、本開示は、フェロモンをある期間、特に約２週間、及び一般的には約１～４週間及び最長６週間にわたって放出することが可能な吸液芯又はトラップを提供し、これは続く同様のトラップと交替又は交換され得る。フェロモン組成物を含有する複数のトラップが、例えば作物畑に隣接する場所に置かれてもよい。トラップの位置、及び地面からのトラップの高さは、当業者に公知の方法に従い選択し得る。

【０４７９】

或いは、本フェロモン組成物は、害虫の交尾の阻害に一般的に用いられるような、マイクロカプセル又はツイストタイ（twist-ties）などの製剤から分注されてもよい。

【０４８０】

誘引殺虫

誘引殺虫方法は、性フェロモンなどの誘引剤を利用して殺虫性の化学物質、表面、装置

等に標的種の昆虫を誘き寄せ、大量死滅させて、最終的には個体数を抑制するものであり、大量捕獲と同じ効果があり得る。例えば、合成雌性フェロモンを用いて雄の害虫、例えば蛾を誘き寄せる場合、誘引殺虫戦略では、多数の雄の蛾を長期間にわたって死滅させることにより交尾及び繁殖を低下させ、最終的に害虫の個体数を抑制しなければならない。誘引殺虫手法は、トラップの手入れ又は他の頻繁な保守が不要であるため、大量捕獲の有利な代替法であり得る。本明細書に記載される様々な実施形態では、組換え微生物が、（ｉ）昆虫フェロモンの生成経路、及び（ｉｉ）昆虫にとって毒性のタンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、又は小分子を共発現し得る。このようにして、組換え微生物は、誘引殺虫手法における使用に好適な物質を同時生成することができる。

【０４８１】

当業者には明らかなとおり、特定の適用に使用されるフェロモン又はフェロモン組成物の量は、被害のタイプ及びレベル；使用する組成物のタイプ；活性成分の濃度；どのように組成物を提供するか、例えば、使用するディスペンサーのタイプ；取り扱う場所のタイプ；本方法が用いられる時間の長さ；並びに温度、風速及び風向、雨量及び湿度などの環境因子など、幾つかの要因に応じて変わり得る。当業者は、所与の適用に使用するフェロモン又はフェロモン組成物の有効量を決定することができるであろう。

【０４８２】

本明細書で使用されるとき、「有効量」は、所望の結果に影響を及ぼすのに十分な本開示のフェロモン組成物の量を意味する。有効量は１回以上の投与で投与することができる。例えば、有効量の組成物とは、所与の昆虫を所与の場所に誘引するのに十分なフェロモン組成物の量を指し得る。更に、有効量の組成物とは、所与の場所における目的とする特定の昆虫集団の交尾を阻害するのに十分なフェロモン組成物の量を指し得る。

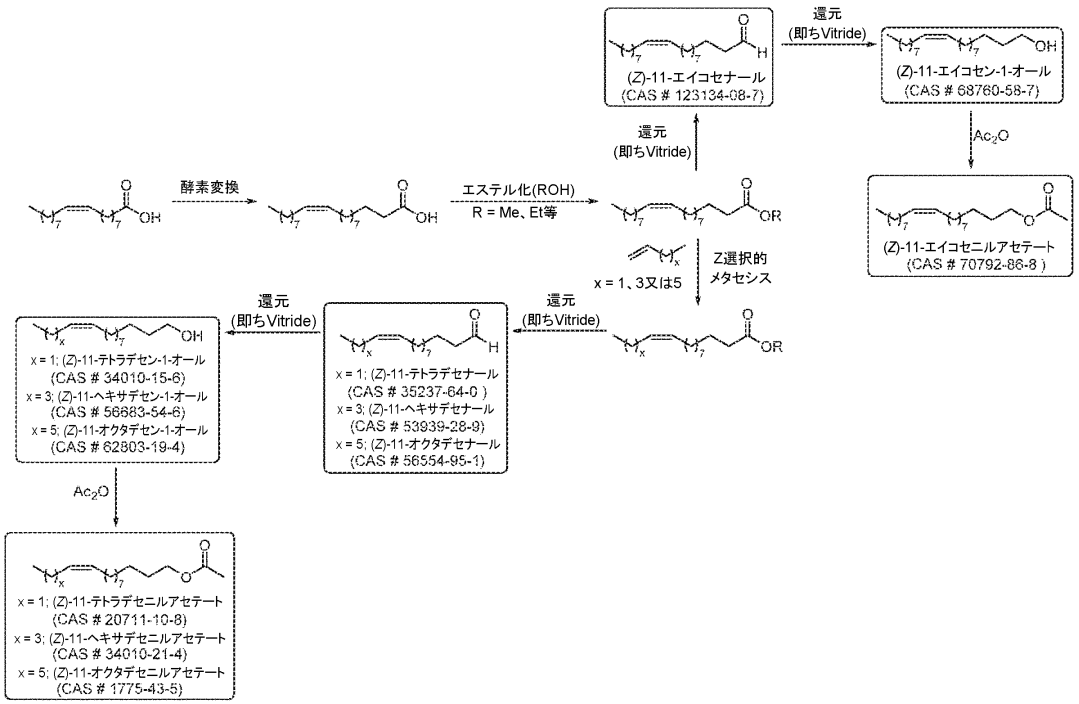
【実施例】

【０４８３】

実施例１．メタセシス及び化学変換による酵素的に誘導されたゴンド酸からのフェロモン生成物の生成

この実施例は、種々の脂肪酸をフェロモン又はフェロモン前駆体の生合成生成の出発物質として使用し得ることを示す。本明細書に開示される生合成プロセスから得られる生成物を更なる化学変換に供して種々の生成物を生じさせることができる。

【化１】



【０４８４】
酵素によるオレイン酸の２炭素伸長により、ゴンド酸が得られる。エステル化後、次にゴンド酸脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）をＺ選択的オレフィンメタセシスによってＣ１１不飽和を含むＣ１６及びＣ１８　ＦＡＭＥ生成物に変換することができる。エステルを還元すると、アルデヒド及び脂肪アルコールフェロモン材料が生成され得る。脂肪アルコール生成物のアセチル化により、対応する脂肪アセテートフェロモンを生じさせることができる。加えて、ゴンド酸は、酵素的に修飾されたオレイン酸に同じ化学転換を適用することにより、Ｃ２０脂肪アルデヒド、アルコール及びアセテートフェロモンに直接変換することができる。
【０４８５】
仮想例２：個別調整された合成ブレンド
この仮想例は、本明細書に開示される組換え微生物を使用して昆虫フェロモンの合成ブレンドを作成し得ることを示す。
【０４８６】
図５４に記載のスキームに示されるとおり、テトラデシル－ＡＣＰ（１４：ＡＣＰ）を使用して、組換え微生物でＥ－及びＺ－テトラデセニルアセテート（Ｅ１１－１４：ＯＡｃ及びＺ１１－１４：ＯＡＣ）フェロモンのブレンドを生成することができる。このブレンドは種々の昆虫、例えば、ハスオビハマキ（Choristoneura roseceana）（ハマキガ科（Tortricidae）の蛾）によって生成される。
【０４８７】
同様に、ヘキサデシル－ＡＣＰ（１６：ＡＣＰ）を使用して、組換え微生物でＺ－及びＥ－ヘキサデセニルアセテートフェロモン（Ｅ１１－１６：ＯＡｃ及びＺ１１－１６：ＯＡｃ）のブレンドを生成することができる。
【０４８８】
微生物を異なるデサチュラーゼ、又はレダクターゼ等の他の酵素で改変して、フェロモンの所望のブレンドを生成することができる。本発明の組換え微生物及び方法を用いて生成可能な特に関連性のある１つのブレンドは、９７：３比の（Ｚ）－１１－ヘキサデセナール（Ｚ１１－１６：Ａｌｄ）及び（Ｚ）－９－ヘキサデセナール（Ｚ９－１６：Ａｌｄ）である。
【０４８９】
実施例３：Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における膜貫通アルコール形成レダクターゼの発現
背景及び理論的根拠
微生物による脂肪酸からの昆虫脂肪アルコールの生成の改変は、合成経路の機能発現を必要とする。１つのかかる経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの、及び続く脂肪アルコールへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼ、及びアルコール形成レダクターゼを含む。これらの酵素をコードする幾つもの遺伝子がある種の昆虫（並びに脂肪アルコールレダクターゼの場合にはある種の微細藻類）に見られ、好ましい生成宿主である酵母における合成経路の構築に使用することができる。幾つもの膜貫通デサチュラーゼ及びアルコール形成レダクターゼ変異体をスクリーニングして、単一の昆虫脂肪アルコール又は脂肪アルコールのブレンドの高レベル合成を可能にする集団を同定し得る。加えて、これらの酵素を複数の宿主（サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica））にわたってスクリーニングすることにより、これらの膜貫通タンパク質の最適発現に好適な宿主を見つけ出すための検索を最適化し得る。
【０４９０】
手法の概要
昆虫由来の３つのアルコール形成レダクターゼを選択した。
【０４９１】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における発現にコドン最適化して、レダクターゼをコードする核酸を合成した（シントン）。

【０４９２】

所与のレダクターゼをコードする各核酸をＧａｌ１プロモーター下のエピソーム発現カセットにサブクローニングした。

【０４９３】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）野生型及びβ酸化欠失突然変異体を発現コンストラクトで形質転換した。

【０４９４】

異種タンパク質をガラクトースによって誘導し、及びレダクターゼの機能発現をインビボでＺ１１－ヘキサデセン酸のＺ１１－ヘキサデセノールへの生物変換によって評価した。

【０４９５】

ＧＣ－ＭＳ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０４９６】

結果

アルコール形成レダクターゼ変異体をＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）Ｗ３０３（野生型）及びＢＹ４７４２　ΔＰＯＸ１（β酸化欠失突然変異体）における活性に関してスクリーニングした。酵素活性の評価には、Ｚ１１－ヘキサデセン酸を基質として選択した。インビボ生物変換アッセイから、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）、及びカブラヤガ（Agrotis segetum）に由来する酵素変異体（Ding, B-J., Loefstedt, C. Analysis of the Agrotis segetum pheromone gland transcriptome in the light of sex pheromone biosynthesis. BMC Genomics 16:711 (2015)）をＷ３０３Ａで発現させるとＺ１１－ヘキサデセノール生成がもたらされ、タンパク質誘導から４８時間以内にそれぞれ約３７μＭ（８ｍｇ／Ｌ）、約７０μＭ（約１６ｍｇ／Ｌ）、及び１１μＭ（約３ｍｇ／Ｌ）にまで達したことが示された（図５及び図６）。生物学的に生成されたＺ１１－ヘキサデセノールは、ＧＣ－ＭＳによって決定するとき、Ｚ１１－ヘキサデセノール標準物質（Bedoukian）と一致した（図７）。ＢＹ４７４２　ΔＰＯＸ１はまた、重要なβ酸化経路酵素の欠失がＺ１１－ヘキサデセン酸の分解を制限し得たため、発現宿主としても調べた。しかしながら、β酸化欠失突然変異体におけるレダクターゼ変異体の発現は、野生型宿主における発現と比較したときに生成物力価を低下させた（図５）。ＢＹ４７４２　ΔＰＯＸ１を宿主として使用したときの力価低下の１つの寄与因子は、Ｗ３０３と比較したときのバイオマスの減少であった（図８）。

【０４９７】

従って、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における少なくとも２つのアルコール形成レダクターゼの機能発現が、Ｚ１１－ヘキサデセン酸のＺ１１－ヘキサデセノールへの生物変換をもたらした。

【０４９８】

結論

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における昆虫膜貫通アルコール形成レダクターゼの機能発現が実証された。試験したレダクターゼの中で、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）に由来する変異体がＺ１１－ヘキサデセン酸に対して最も高活性である。

【０４９９】

他の脂肪酸基質の生物変換を調べて酵素の可塑性を評価することができる。

【０５００】

材料及び方法

株の樹立及び機能発現アッセイ

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）Ｗ３０３（MATA ura3-1 trp1-1 leu2-3_112 his3-11_15 ade2-1 can1-100）及びＢＹ４７４２（MATa POX1::kanMX his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0）を発現宿主として使用した。脂肪アルコールレダクターゼ変異体

をコードするＤＮＡ配列をＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）における発現が最適化されるように再設計した（配列番号１～３）。生じたシントン（Genscript）をｐＥＳＣ－ＵＲＡベクターにＢａｍＨＩ－ＸｈｏＩ部位を使用してクローニングして、Ｇａｌ１プロモーターを利用したタンパク質発現を促進した。得られたプラスミドコンストラクトを使用してＷ３０３を形質転換し、ＣＭ寒天培地（２％グルコース含有、及びウラシル不含）（Teknova）で陽性形質転換体を選択した。機能発現を評価するため、ＣＭ寒天培地（２％グルコース含有、及びウラシル不含）にパッチした２つの陽性形質転換クローンを使用して、２４ディープウェルプレートフォーマットを用いてＣＭ液体培地を播種した。タンパク質発現を誘導するため、次に、２８℃で成長させておいた一晩培養物にガラクトース、ラフィノース、及びＹＮＢをそれぞれ２％、１％、及び６．７ｇ／Ｌの最終濃度となるように補足した。タンパク質誘導の２４時間後、生物変換基質Ｚ１１－ヘキサデセン酸（エタノール中）又はヘプタデカン酸（エタノール中）を３００ｍｇ／Ｌの最終濃度となるように加えた。生物変換アッセイを２８℃で４８時間進めた後、ＧＣ－ＭＳ分析を行った。

【０５０１】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

Hagstroem et al.（Hagstroem, A. K., Lienard, M. A., Groot, A. T., Hedenstroem, E. & Loefstedt, C. Semi-Selective Fatty Acyl Reductases from Four Heliothine Moths Influence the Specific Pheromone Composition. PLoS One 7: e37230 (2012)）の変法により脂質を抽出した。１．５ｍＬ細胞培養物を１５ｍＬファルコンチューブに移した。この細胞懸濁液を１ｍＬ　５Ｎ　ＨＣｌで酸性化した。５μＬテトラデカン二酸（エタノール中１０ｍＭ）を内部標準として加えた。１．５ｍＬヘキサンを加えることによりこの混合物を抽出し、次に３７℃、２５０ｒｐｍで１時間振盪した。相分離を促進するため、試料を２０００ｇで１０分間遠心した。次に１ｍＬの有機ヘキサン相を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この試料を９０℃で３０分間加熱することにより溶媒を除去した。試料を蒸発乾固させた後、５０μＬのＢＳＴＦＡ（１％のトリメチルクロロシランを含有するＮ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセタミド）を加えた。１．５ｍＬプラスチックチューブを１０秒間にわたり２回激しく振盪した。ガラスインサートが入ったスクリューキャップＧＣガラスバイアルに移す前に、試料を１分間（１３０００ｒｐｍ）遠心した。バイアルをキャップし、９０℃で３０分間加熱した。この方法によって生じたトリメチルシリルエステルを続いてＧＣ－ＭＳ分析によって分析した。ＧＣ－ＭＳパラメータを表６に指定する。ＳＩＭモード（特徴的生成物及びＩＳイオン）を使用すると、バックグラウンドノイズの低下により検出感度が高まり、２．４μＭ（０．６ｍｇ／Ｌ）もの低量の生成物の検出が可能となる。スプリット比を更に低下させると、今後の適用向けに更なる感度上昇の可能性がもたらされる。図９に示すＺ１１－ヘキサデセノール検量線を使用して、酵母から生成されたＺ１１－ヘキサデセノールを定量化した。容易に区別されるヘプタデカノール生成物が成功したＧＣ－ＭＳランのベンチマークに用いられた可能性があるため、ヘプタデカン酸の生物変換も試験した。しかしながら、試験したレダクターゼのいずれも、ヘプタデカン酸に対して何ら活性を示さなかった。

【０５０２】

【表６】

表6. GC-MSパラメータ

システム	Agilent 6890 N GC, ChemStation G1701EA E.02.01.1177
カラム	Rtx-5 30m x 320 µm x 25 µm 圧力 = 11.74 psi; 流量 = 7.1 mL/min
入口	ヒータ = 250°C; 圧力 = 11.74 psi; 全流量{He} = 19.5 mL/min
キャリア	He @ 147 cm/sec, 11.74 psi
シグナル	データ転送速度 = 2 Hz/0.1 min
オーブン	150℃で1分間 12℃/minで220℃まで昇温、3分間保持 35℃/minで300℃まで昇温、4分間保持
注入	スプリット, 250°C スプリット比 – 20:1
検出器	HP 5973 MSD SIMモード(m/z: 297.3及び387.3), 100 msecドウェル、EMVモード: ゲイン係数1, 3 min溶媒遅延、8.33サイクル/sec
試料	注入量 = 1 uL

【０５０３】

実施例４：Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における膜貫通デサチュラーゼの発現

背景及び理論的根拠

微生物による脂肪酸からの昆虫脂肪アルコールの生成の改変には、合成経路の機能発現が必要である。１つのかかる経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの、及び続く脂肪アルコールへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼ、及びアルコール形成レダクターゼを含む。これらの酵素をコードする幾つもの遺伝子が、ある種の昆虫並びにある種の微細藻類に見られる。幾つもの膜貫通デサチュラーゼ及びアルコール形成レダクターゼ変異体をスクリーニングして、単一の昆虫脂肪アルコール又は脂肪アルコールのブレンドの高レベル合成を可能にする集団を同定し得る。加えて、これらの酵素を複数の宿主（サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica））にわたってスクリーニングすることにより、これらの膜貫通タンパク質の最適発現に好適な宿主を見つけ出すための検索を最適化し得る。

【０５０４】

手法の概要

デサチュラーゼ（昆虫由来：カブラヤガ（Agrotis segetum）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、及び海洋性珪藻：タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana））の小さい組をテストケースとして選択して、機能発現アッセイ、代謝産物抽出方法、及び分析化学を調査し及び確立した。

【０５０５】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）におけるデサチュラーゼの発現用合成カセットを構築した。このカセットは、ＯＬＥ１プロモーター領域、ＯＬＥ１　Ｎ末端リーダー配列、及びＶＳＰ１３ターミネーターからなる。

【０５０６】

この発現カセットをＧＦＰ変異体の発現によって機能性に関して試験した。このカセットがバリデートされたことにより、昆虫デサチュラーゼの発現の調査へのその利用が可能

であった。

【０５０７】

異種デサチュラーゼを含有する発現コンストラクトでＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１を形質転換した。デサチュラーゼの機能性を、不飽和脂肪酸（ＵＦＡ）を外因的に補充しない場合のΔＯＬＥ１の成長をレスキューする能力によって評価した。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼ（ＯＬＥ１）を補完成功の陽性対照として使用した。

【０５０８】

ヘキサデカン酸（パルミチン酸）の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸（パルミトバクセン酸）へのインビボ生物変換によってデサチュラーゼの機能性をバリデートした。

【０５０９】

ＧＣ－ＭＳ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０５１０】

結果

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）において膜貫通デサチュラーゼ変異体をスクリーニングした。当初３つの変異体を試験して、機能発現アッセイ、代謝産物抽出方法、及び分析化学を調査及び確立した。これらのデサチュラーゼをＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）において機能発現させるため、ｐＯＬＥ１カセットと呼ばれるエピソーム合成発現カセット（図１０）を構築し、これは、ＯＬＥ１プロモーター領域、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１の最初の２７アミノ酸をコードするＮ末端リーダー配列、及びＶＰＳ１３（原生胞子の膜形成に関与するタンパク質、これのターミネーターは、ＲＮＡ半減期を延長させることにより潜在的に異種タンパク質発現を増加させることが既に特徴付けられている）のターミネーター領域からなった。ｐＯＬＥ１カセットの機能性をそのＧＦＰ発現能力によってバリデートした（図１１Ａ～図１１Ｅ）。続いて、昆虫デサチュラーゼシントン、及び酵母ＯＬＥ１シントンをｐＯＬＥ１カセットにクローニングし、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１株で発現させた。ＯＬＥ１対立遺伝子（これはパルミトイル：ＣｏＡ／ステアロイル：ＣｏＡ（ｚ）－９－デサチュラーゼをコードする）を欠失させると、それを機能性昆虫デサチュラーゼのスクリーニングツールとして利用することが可能になるため、この株を選択した。具体的には、活性デサチュラーゼであれば、ＵＦＡを外因的に補充する必要なしに成長を補完することが可能になり得る。ｐＯＬＥ１カセットを使用してＯＬＥ１を発現させると、ＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長の成長が補完された（図１１Ａ～図１１Ｅ）；従って、これは補完アッセイの陽性対照としての役割を果たす。昆虫デサチュラーゼを発現させたとき、本発明者らは、それらがＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長を様々な程度でレスキューしたことを観察した。富栄養培地（ＹＰＤ）寒天プレート上では、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１の発現は最も高いレベルの成長をもたらし、それにイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼが続いた（図１２Ａ）。後者は、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼによる不飽和脂肪アシル：ＣｏＡの生成がΔＯＬＥ１における欠損した（Ｚ）－９－ヘキサデセノイル：ＣｏＡ生合成のサロゲートとしての役割を果たし得ることを示した。Ｔ．シュードナナ（T. pesudonana）及びカブラヤガ（A. segetum）デサチュラーゼの発現はＹＰＤ上での成長をそれほど良好にはレスキューしないように見えた（図１２Ａ）。最少培地（ＣＭ－Ｕｒａグルコース）寒天プレート上にパッチしたとき、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１及びイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼの発現のみが、外因性ＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長をレスキューした（図１２Ｂ）。Ｔ．シュードナナ（T. pseudonana）及びカブラヤガ（A. segetum）デサチュラーゼの発現は最少培地寒天上でのΔＯＬＥ１の成長をもたらさなかったことから、ＵＦＡの生成におけるそれらの活性が限られていることが示唆される（結果は図示せず）。カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）においてデサチュラーゼライブラリをスクリーニングすると、クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼの機能発現が同定された。これらのデサチュラーゼをΔＯＬＥ１で発現させたとき、それらはＹＰＤ培地及びＣＭ－Ｕｒａグルコース

培地の両方でイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼの発現と同程度にＵＦＡなしでの成長をもたらした（図１２Ｂ）。

【０５１１】

パルミチン酸の昆虫特異的ＵＦＡへのインビボ生物変換によって異種デサチュラーゼの機能発現を更に特徴付けた。パルミチン酸を含有する最少培地で約９６時間培養した後、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼを発現するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の全脂肪酸分析から、天然酵母ＯＬＥ１デサチュラーゼを発現する対照株に存在しない新規脂肪酸種（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の生成が明らかになった（図１３Ａ～図１３Ｂ）。カブラヤガ（A. segetum）、又はＴ．シュードナナ（T. pseudonana）デサチュラーゼを発現する株には、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸は検出されない（結果は図示せず）。イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼを発現するΔＯＬＥ１株には、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸に加え、（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸も検出された（図１３Ａ～図１３Ｂ）。この培養条件下で、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼを発現するΔＯＬＥ１のＣ１６脂肪酸は、約８４．７％のヘキサデカン酸、５．６％の（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸及び９．８％の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸で構成される。比較すると、ＯＬＥ１デサチュラーゼを発現するΔＯＬＥ１のＣ１６脂肪酸画分は、約６８．６％のヘキサデカン酸及び３１．４％の（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸で構成される。イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼを発現するΔＯＬＥ１における（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸生合成は約１．５ｍｇ／Ｌを占める。全脂肪酸及びこの混合物中の各脂肪酸の量は定量化することができる。生物学的に生成された（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸はまた、ＧＣ－ＭＳによって決定するとき、標準物質（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸（Larodan）の保持時間及びフラグメンテーションパターンとも一致する（図１４Ａ～図１４Ｂ）。従って、生物学的に生成された（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の位置異性体及び立体異性体が確認された。クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼのインビボでの特徴付けも行うことができる。

【０５１２】

要約すれば、ＵＦＡ、即ち（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸（パルミトレイン酸）を外因的に補充しない場合のＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の成長のレスキュー能力を有する少なくとも３つの昆虫デサチュラーゼが同定された。

【０５１３】

発現コンストラクトを担持するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の富栄養培地（ＹＰＤ）上での成長の程度は以下のデサチュラーゼ含量の順序であった：ＯＬＥ１、イラクサギンウワバ（T. ni）、Ｔ．シュードナナ（T. pseudonana）、及びカブラヤガ（A. segetum）。

【０５１４】

発現コンストラクトを担持するＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の最少培地（ＣＭグルコース、ウラシル不含）上での成長の程度は以下のデサチュラーゼ含量の順序であった：ＯＬＥ１、イラクサギンウワバ（T. ni）。

【０５１５】

クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼを使用した補完アッセイも行ったところ、インビボ生物変換アッセイによって示されたカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）における機能発現が実証された。これらのデサチュラーゼはまた、並びにイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼも、少なくとも富栄養及び最少培地上でのＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１成長を補完した。

【０５１６】

Ｔ．シュードナナ（T. pseudonana）及びカブラヤガ（A. segetum）デサチュラーゼの発現は、インキュベーション時間を１４日にまで延長した後であっても、ＵＦＡを含まない最少培地上でのＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の成長をもたらさなかった。Ｔ．シュードナナ（T. pseudonana）又はカブラヤガ（A. segetum）デサチュラー

ゼを担持する株には、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸は観察されなかった。
【０５１７】
結論
Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における昆虫由来の膜貫通デサチュラーゼの機能発現が達成された。
【０５１８】
所与の異種デサチュラーゼの活性は、外因性パルミトレイン酸補充なしでのＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１の成長を補完するその能力、及びパルミチン酸を昆虫フェロモン前駆体（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸に変換するその能力から評価することができる。
【０５１９】
Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における昆虫デサチュラーゼの機能発現及び／又は活性は、配列の起源に応じて幅広く異なる。上記の基準によって測定したとき、イラクサギンウワバ（T. ni）に由来する変異体が、カブラヤガ（A. segetum）及びＴ．シュードナナ（T. pseudonana）と比較して最良の活性を呈した。
【０５２０】
クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）に由来するデサチュラーゼは、並びにイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼも、ΔＯＬＥ１を補完した。これらのデサチュラーゼを使用した生物変換アッセイを行うことができる。
【０５２１】
他の脂肪酸基質の生物変換を調べて酵素の可塑性を評価することができる。
【０５２２】
材料及び方法
株の樹立及び機能発現アッセイ
Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１（MATA OLE1::LEU2 ura3-52 his4）を発現宿主として使用した。ＯＬＥ１プロモーター領域（配列番号５及び６）、２７Ｎ末端アミノ酸のＯＬＥ１リーダー配列をコードするヌクレオチド（配列番号７）、及びＶＰＳ１３ターミネーター配列（配列番号８）を含むｐＯＬＥ１と呼ばれる合成発現カセット（図１０、配列番号４）を作成し、ｐＥＳＣ－ＵＲＡベクターのＳａｃＩ部位とＥｃｏＲＩ部位との間にクローニングした。ｐＯＬＥ１カセットの機能性を試験するため、ＳｐｅＩ部位と及びＮｏｔＩ部位との間にDasher GFPシントンを挿入してｐＯＬＥ１－ＧＦＰプラスミドを作成した。コンピテントΔＯＬＥ１をｐＯＬＥ１－ＧＦＰで形質転換し、ＵＦＡを含有するＣＭ－Ｕｒａグルコース寒天プレート（Teknova）に置いた（２０ｍｍ ＣＭ－ＵＲＡグルコース寒天プレートに、１％テルジトール（tergitol）及び３μＬパルミトレイン酸を含有する１００μＬ ＣＭ－Ｕｒａグルコース培地を塗布した）。３０℃で５日間インキュベートした後、ΔＯＬＥ１形質転換体の緑色の呈色によって示されるとおり、Dasher GFP発現が見えた。この結果から、ｐＯＬＥ１カセットが異種タンパク質発現をドライブする能力を有したことが示された。ＯＬＥ１活性を回復させることにより、ΔＯＬＥ１補完性の検証を実施した。具体的には、リーダー配列を欠くｐＯＬＥ１カセットに天然Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１シントンを挿入してｐＯＬＥ１－ＯＬＥ１プラスミドを作成した。ΔＯＬＥ１の形質転換、及びＵＦＡを含有するＣＭ－Ｕｒａグルコース寒天での選択後、ＵＦＡを含まないＹＰＤ及びＣＭ－Ｕｒａグルコースにシングルコロニーをパッチした。３０℃で５日間インキュベートした後、成長を観察した（図１１Ａ～図１１Ｅ）。予想どおり、Dasher GFP発現はＵＦＡなしでのΔＯＬＥ１成長を補完できなかった（図１１Ａ～図１１Ｅ）。デサチュラーゼ変異体をコードするＤＮＡ配列を合成し（クローニング目的で用いられる制限部位を除去するヌクレオチド変化を含めた）、ＳｐｅＩ－ＮｏｔＩ部位を用いてｐＯＬＥ１にクローニングした（Genscript、配列番号９～１３）。昆虫デサチュラーゼによるΔＯＬＥ１の補完アッセイをＯＬＥ１デサチュラーゼと同様に実施した。
【０５２３】

機能発現を評価するため、ＵＦＡを含有するＣＭ－Ｕｒａグルコース寒天培地にパッチしておいた２つの陽性形質転換クローンを１．５ｍＬのパルミチン酸（エタノール中）含有ＣＭ－Ｕｒａグルコース液体培地に３００ｍｇ／Ｌの最終濃度で、及び６．７ｇ／ＬでＹＮＢに接種した。（ｚ）－１１－ヘキサデセン酸異性体を確認するため、２０ｍＬの培養物を作成した。生物変換アッセイを２８℃で９６時間進行させた後、ＧＣ－ＭＳ分析を行った。

【０５２４】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

全脂質組成並びに（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸定量化は、Moss et al. (1982)（Moss, C. W., Shinoda, T. & Samuels, J. W. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 16: 1073-1079 (1982)）及びYousuf et al (2010)（Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V. & Pirozzi, D. Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production. J. Agric. Food Chem. 58: 8630-8635 (2010)）による変法に基づいた。通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット状細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウム含有メタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬスクリューキャップＧＣ－バイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸を含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相を新しい１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。水相を２回目に５００μＬクロロホルムで、今回はヘプタデカン酸なしに抽出した。合わせた有機相を９０℃で蒸発させた。室温に冷却した後、残留する脂肪酸メチルエステル及び遊離脂肪酸を溶解し、０．２Ｍ　ＴＭＳＨ（水酸化トリメチルスルホニウム）を含有するメタノール中で誘導体化した。

【０５２５】

ジメチルジスルフィド（ＤＭＤＳ）誘導体のフラグメンテーションパターンを標準物質のＤＭＤＳ誘導体と比較することにより、生物学的に生成された（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の位置選択性を決定した。酵母培養物を１２のアリコートに分けた（開発した手順におけるいかなるパラメータも変更しないようにした）。細胞をペレット化すると、これにより平均６３ｍｇの細胞（ｃｃｗ）（１８ｍＬの培養物から７５５ｍｇ）が得られた。このペレットを上記に記載したとおり塩基性メタノリシスに供した。しかしながら、酸性化後、これらの試料を５０ｍＬファルコンチューブに合わせた。合わせた試料を１０ｍＬクロロホルムで２回抽出した。この混合物を３０００ｒｐｍで１０分間遠心すると、より良好な相分離が実現した。合わせた有機相、これらは新しい５０ｍＬ　Falconに合わせ、１０ｍＬのブライン及び１０ｍＬの水で連続的に洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、真空濃縮した。濃縮した油を１．５ｍＬクロロホルム中に溶解させて、１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。クロロホルムを９０℃で蒸発させた。残りの試料は５０μＬのメチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル（ＭＴＢＥ）中に溶解させた。５０μＬを１、５、１０及び２０μＬに分け、インサートのないＧＣ－バイアルに移した。各バイアルに２００μＬ　ＤＭＤＳ（ジメチルジスルフィド）及び５０μＬ　ＭＴＢＥ（６０ｍｇ／ｍＬヨウ素含有）を加えた。この混合物を５０℃で４８時間加熱した後、１００μＬ飽和チオ硫酸ナトリウム溶液を加えることにより過剰なヨウ素を除去した。試料をプラスチックバイアルに移し、５００μＬジクロロメタンで数回抽出した。合わせた有機相を新しい１．５ｍＬプラスチックバイアルに移し、９０℃で蒸発させた。試料を５０μＬ　ＤＣＭに取り、ＧＣ－バイアルに移した。この試料をHagstroem et al. (2013)の方法（Hagstroem, A. K. et al. A moth pheromone brewery: production of (Z)-11-hexadecenol by heterologous co-expression of two biosynthetic genes from a noctuid moth in a yeast cell factory. Microb. Cell Fact. 12: 125 (2013)）を用いてＧＣ－ＭＳ

によって分析した（表７）。

【０５２６】

【表７】

表7. DMDS誘導体のGC-MS分析に使用した分析パラメータ

システム	Agilent 6890 N GC, ChemStation G1701EA E.02.01.1177
カラム	Rtx-5 30m x 320 µm x 25 µm 圧力 = 11.74 psi; 流量 = 7.1 mL/min
入口	ヒータ = 250°C; 圧力 = 11.74 psi; 全流量{He} = 19.5 mL/min
キャリア	He @ 147 cm/sec, 11.74 psi
シグナル	データ転送速度 = 2 Hz/0.1 min
オーブン	80℃で2分間 10℃/minで180℃まで昇温 3℃/minで260℃まで昇温 20℃/minで280℃まで昇温、10分間保持
注入	スプリット, 250°C スプリット比 −1:1
検出器	HP 5973 MSD SCANモード(質量範囲: 41〜550 amu) 100 msecドウェル、EMVモード: ゲイン係数1, 3 min溶媒遅延、8.33サイクル/sec
試料	注入量 = 1 uL

【０５２７】

実施例５：昆虫脂肪アルコール合成用の生成プラットフォームとしてのＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）

背景及び理論的根拠

微生物による脂肪酸からの昆虫脂肪アルコールの生成の改変には、合成経路の機能発現が必要である。１つのかかる経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの、及び続く脂肪アルコールへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼ、及びアルコール形成レダクターゼを含む。これらの酵素をコードする幾つもの遺伝子が、ある種の昆虫並びにある種の微細藻類に見られる。幾つもの遺伝子変異体をスクリーニングすることにより、単一の昆虫脂肪アルコール又はそのブレンドの高レベル合成能を有する経路の作成を可能にする酵素活性を同定した。加えて、これらの膜貫通タンパク質の最適発現に好適な宿主を見つけ出すため、これらの酵素を複数の宿主（サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica））にわたってスクリーニングした。

【０５２８】

手法の概要

パルミチン酸からの（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の合成を可能にするため選択の機能性膜貫通デサチュラーゼ変異体を発現するようにＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）を予め改変した。これにより、変異体を同定して、それらの生物変換性能に基づき順位付けすることが可能であった（実施例４を参照されたい）。

【０５２９】

（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸からの（Ｚ）－１１－ヘキサデセノール（Ｚ１１－１６ＯＨ）の合成を可能にするため選択の機能性膜貫通レダクターゼ変異体を発現するように

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）を予め改変した。これにより、変異体を同定して、それらの生物変換性能に基づき順位付けすることが可能であった（実施例３を参照されたい）。

【０５３０】

これまでのスクリーニングで同定された最も高活性の変異体デサチュラーゼ及びレダクターゼを含む幾つかの脂肪アルコール経路をアセンブルした。

【０５３１】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）Ｗ３０３Ａ及びΔＯＬＥ１を経路コンストラクトで形質転換した。組換え酵母がパルミチン酸からＺ１１－１６ＯＨを合成する能力によって経路の機能性を評価した。

【０５３２】

ＧＣ－ＭＳ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０５３３】

結果

目標は、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）の１つ以上の昆虫脂肪アルコール生合成経路を改変することであった。これまでに、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における昆虫由来の幾つかの膜貫通デサチュラーゼの機能発現が実証された（実施例４を参照されたい）。簡潔に言えば、ＯＬＥ１プロモーター領域、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１の最初の２７アミノ酸をコードするＮ末端リーダー配列、及びＶＰＳ１３のターミネーター領域からなる発現カセットを設計することにより、異種デサチュラーゼ発現が可能であった。活性デサチュラーゼのスクリーニングは、２つの手法を用いることにより行った。第一に、不飽和脂肪酸（ＵＦＡ）を外因的に加えない場合のΔＯＬＥ１成長をレスキューするその能力に関して活性デサチュラーゼをスクリーニングし、第二に、パルミチン酸の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸への生物変換に関するインビボスクリーニングによって活性デサチュラーゼをスクリーニングした。これらのスクリーニング戦略により、幾つかの活性変異体を同定し、それらの相対活性を順位付けすることが可能になった。これらのスクリーニング結果に基づき、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）（ＴＮ＿ｄｅｓａｔ）及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）（ＳＣ＿ｄｅｓａｔ）由来のデサチュラーゼを脂肪アルコール経路におけるコンビナトリアル発現用に選択した。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼはパルミトレイン酸及びオレイン酸を形成することが知られている。

【０５３４】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）における昆虫由来の幾つかの膜貫通アルコール形成レダクターゼの機能発現が既に実証済みであった（実施例３を参照されたい）。ＧＡＬ１プロモーター及びＣＹＣターミネーターを含む発現カセットを使用して、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）におけるレダクターゼの機能発現を可能にした。（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸のＺ１１－１６ＯＨへのインビボ生物変換によって幾つかのレダクターゼをスクリーニングすることにより、活性変異体を同定し、それらの相対活性を順位付けすることが可能になった。このスクリーニングに基づき、オオタバコガ（Helicoverpa armigera）（ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ）、及びエジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）（ＳＬ＿ｒｅｄｕｃ）由来のレダクターゼを脂肪アルコール経路のアセンブリ用に選択した。

【０５３５】

コンビナトリアルアセンブリにより、４つの脂肪アルコール経路、即ち、ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ、ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＳＬ＿ｒｅｄｕｃ、ＳＣ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ、及びＳＣ＿ｄｅｓａｔ－ＳＬ＿ｒｅｄｕｃが作成された。ＳＣ＿ｄｅｓａｔを含む経路を昆虫Ｚ１１－１６ＯＨ合成の陰性対照として供した。これらの経路を有するコンストラクトでＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１及びＷ３０３Ａを形質転換し、パルミトレイン酸を塗布した２％グルコース含有ＣＭ－Ｕｒａ上で成長した形質転換体を単離した。脂肪アルコール生成に関して試験するため、２％グルコース、１％ラフィノース、２％ガラクトースを含有するＣＭ－Ｕｒａ培地に個々のクローンを接種した。３００ｍｇ／Ｌパルミチン酸、及び３６０ｍｇ／Ｌパルミトレイン酸を生物変換基質と

して加えた。パルミトレイン酸なしにパルミチン酸を用いた生物変換も試験した。パルミチン酸及びパルミトレイン酸の存在下で約９６時間培養した後、培養ブロス分析により、それぞれＳＣ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ、及びＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃを有するΔＯＬＥ１株の培養物中に主要なＣ１６アルコール生成物として約０．２ｍｇ／Ｌ、及び約０．３ｍｇ／ＬのＺ１１－９ＯＨが合成されたことが明らかになった（図１５、図１６）。イラクサギンウワバ（T. ni）又はＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼ、及びオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを含む経路にも微量のＺ１１－１６ＯＨが検出された。概して、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸はイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼから生合成されなければならないが、パルミトレイン酸を外因的に加えると、Ｚ９－１６ＯＨの合成用の基質がより容易に利用可能となるため、パルミチン酸及びパルミトレイン酸の存在下では、Ｚ９－１６ＯＨ合成がＺ１１－１６ＯＨ合成よりも有利であったことが予想された。脂肪酸分析も実施した。この結果によれば、昆虫デサチュラーゼを含む経路では、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼを発現する経路と比べて（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸（図１７）の蓄積がより高いことが示された。微量とはいえ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼを有する経路からのＺ１１－１６ＯＨ、及び（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の検出（これは予想外であった）から、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）デサチュラーゼによる小規模なΔ１１不飽和化活性の可能性が開かれる。Ｚ１１－１６ＣＯＯＨ脂肪酸部分の低レベルの合成もＺ９－１４ＣＯＯＨ脂肪アシル中間体の伸長から誘導することができる。図１５に示されるデータはまた、オオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを含む経路と比較して、エジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼを含めると、Ｚ９－１６ＯＨ力価が（最大約３０倍）低下したことも示した。エジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼを用いる経路には、Ｚ１１－１６ＯＨは検出することができなかった。これらの結果は、エジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼと比較してオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを用いた（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の優れた生物変換を示したレダクターゼスクリーニングアッセイと一致する。

【０５３６】

ＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＨＡ＿ｒｅｄｕｃ及びＴＮ＿ｄｅｓａｔ－ＳＬ＿ｒｅｄｕｃを発現するΔＯＬＥ１株により、パルミチン酸の生物変換を単独でも（パルミトレイン酸を外因的に加えることなく）試験した（図１８）。培養ブロス分析から、優勢な不飽和Ｃ１６脂肪酸生成物としてのＺ１１－１６ＯＨの合成が決定された（図１６）。このアッセイでは、それぞれオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ及びエジプトヨトウ（S. littoralis）レダクターゼを有する経路により、最大０．２２ｍｇ／Ｌ、及び０．０５ｍｇ／ＬのＺ１１－１６ＯＨが合成された。生物学的に生成されたＺ１１－１６ＯＨはまた、ＧＣ－ＭＳ（ＳＩＭ）によって決定するときに保持時間も一致し、標準物質Ｚ１１－１６ＯＨと同様の特徴的な２９７．３ｍ／ｚピークを呈した。従って、生物学的に生成されたＺ１１－１６ＯＨの位置異性体及び立体異性体が確認された（図１９）。更に、Ｚ９－１６ＯＨ（０．０１ｍｇ／Ｌ）はまた、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼ及びオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを共発現する株の培養物にも観察された。このことから、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼもΔ９不飽和化活性を有し得ることが示唆された。

【０５３７】

ＯＬＥ１欠失は成長を損なう。従って、インタクトなＯＬＥ１対立遺伝子を有する宿主であるＷ３０３Ａにおいても経路発現を調べた。しかしながら、成長の改善にも関わらず、この宿主における経路発現はＺ１１－１６ＯＨ力価の２倍を超える低下をもたらした。この結果は、ＯＬＥ１の産物である内因性不飽和脂肪アシル：ＣｏＡによるＯＬＥ１プロモーター（これが異種デサチュラーゼ発現をドライブした）の抑制に起因するものと思われた。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＯＬＥ１プロモーターは、従来、飽和及び不飽和脂肪酸によってそれぞれ正及び負の調節を受けることが分かっている構造領域によって特徴付けられている（Choi, J-Y. et al. Regulatory Elements That Control Transcrip

tion Activation and Unsaturated Fatty Acid-mediated Repression of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 Gene. J. Biol. Chem. 271: 3581-3589 (1996)）。シス転写調節に加え、不飽和脂肪酸はまた、ＯＬＥ１プロモーターエレメントとも相互作用してｍＲＮＡ安定性を調節する（Gonzales, C. I. et al. Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the Saccharomyces OLE1 transcript. J. Biol. Chem. 271: 25801-25809 (1996)）。ＯＬＥ１プロモーターのこの固有の複雑さに起因して、Ｓ．クルイベリ（S.kluyveri）由来のＯＬＥ１プロモーターなど（Kajiwara, S. Molecular cloning and characterization of the v9 fatty acid desaturase gene and its promoter region from Saccharomyces kluyveri. FEMS Yeast. Res. 2: 333-339 (2002）、調節されない直交性プロモーターを利用した昆虫デサチュラーゼ発現のドライブについて、脂肪アルコール生成の増進のため調べることができる。

【０５３８】

要約すれば、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１において合成フェロモン経路変異体が機能的に発現すると、パーム油脂肪酸（パルミチン酸及びパルミトレイン酸）からの、それぞれ最大約０．２ｍｇ／Ｌ及び０．３ｍｇ／ＬのＺ１１－１６ＯＨ及びＺ９－１６ＯＨの合成が生じた。

【０５３９】

最も高い脂肪アルコールをもたらした改変経路は、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼ及びオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを含む。

【０５４０】

Ｚ１１－１６ＯＨを生成した株において、この経路の中間体である（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の蓄積も観察された。

【０５４１】

Ｚ１１－１６ＯＨは生成されず、陰性対照株（ベクターのみを含む）において僅かに痕跡量のＺ９－１６ＯＨが検出されたに過ぎなかった。

【０５４２】

保持時間及びフラグメンテーションパターンを標準物質化合物とＧＣ－ＭＳによって比較することにより、生物学的に生成されたＺ１１－１６ＯＨの位置化学及び立体化学が確認された。

【０５４３】

結論

昆虫フェロモンの脂肪アルコール前駆体であるＺ１１－１６ＯＨ及びＺ９－１６ＯＨの合成のためのパン酵母の改変が実証された。

【０５４４】

脂肪アルコール生成はデサチュラーゼ及びレダクターゼ変異体の選択に応じて様々である。

【０５４５】

（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の蓄積から、アルコール形成レダクターゼの性能を高めることによる更なる脂肪アルコール改良の可能性が示唆された。しかしながら、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の検出は、それがリン脂質として小胞体膜以外の任意の膜（ミトコンドリア膜、ペルオキシソーム、核膜など）に取り込まれ、従って、そのＣｏＡチオエステル部分における（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸をその基質として利用しなければならないアルコール形成レダクターゼ（恐らくは小胞体内へと移行した）に到達できないことに起因した可能性もある。

【０５４６】

脂肪アルコール力価を増加させる培養条件を調べることができる。イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼは、経路において、高活性を示し且つΔＯＬＥ１成長をイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼよりも速くレスキューした別の変異体であるクルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼに置き換えることができる。この合成経路

は、パルミチン酸及びパルミトレイン酸などの疎水性基質に対して高い接着特性を有する酵母であるカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）に取り込むことができる。微生物による生成プラットフォームへの基質の接近容易性を高めることにより、生成物力価及び収率を改善し得ると予測できる。

【０５４７】

材料及び方法

株の樹立及び機能発現アッセイ

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１（MATA OLE1::LEU2 ura3-52 his4)、及びＷ３０３Ａ（MATA ura3-1 trp1-1 leu2-3_112 his3-11_15 ade2-1 can1-100）を発現宿主として使用した。分子設計により、ＢａｍＨＩ及びＸｈｏＩを利用してレダクターゼシントンを切り出すコンビナトリアル経路アセンブリ（実施例３を参照されたい）及びｐＯＬＥ１－デサチュラーゼコンストラクトを含有するプラスミドへのサブクローニング（実施例４を参照されたい）が可能である。コンピテント酵母を経路コンストラクトで形質転換し、ＣＭ－Ｕｒａグルコース寒天プレート（Teknova）にプレーティングした。ΔＯＬＥ１形質転換の場合、コロニーのプレーティングには、１％テルジトール（tergitol）及び３μＬパルミトレイン酸を含有する１００μＬ　ＣＭ－Ｕｒａグルコース培地を塗布した２０ｍＭ　ＣＭ－Ｕｒａグルコース寒天プレートを利用した。

【０５４８】

機能発現を評価するため、６．７ｇ／ＬのＹＮＢ、２％グルコース、１％ラフィノース、及び２％ガラクトースを含有する約２０ｍＬ　ＣＭ－Ｕｒａ液体培地に形質転換体を接種した。脂肪酸基質、即ちパルミチン酸（エタノール中）を３００ｍｇ／Ｌの最終濃度で加えた。パルミトレイン酸を３６０ｍｇ／Ｌの最終濃度で加えた。生物変換アッセイを２８℃で９６時間進行させた後、ＧＣ－ＭＳ分析を行った。

【０５４９】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

脂肪酸分析は実施例４に記載されるとおりであり、但し試料は２回抽出するのでなく、試料は１ｍＭヘプタデカン酸メチル（Ｃ１７：０Ｍｅ）を含有するクロロホルムで１回抽出したのみであった。脂肪アルコール分析は実施例３に記載されるとおりであり、但しヘキサン（テトラデカン二酸を含有する）でなく、クロロホルム（１ｍＭヘプタデカン酸メチルを含有する）を使用した。抽出時間は１時間から２０秒間に短縮した。その後、試料は１．５ｍＬプラスチックチューブでなく、１．８ｍＬ　ＧＣバイアルに収集した。質量分析計はＳＩＭモード（ｍ／ｚ　２０８、２９７．３及び３８７．３）で使用した。

【０５５０】

実施例６：カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）における膜貫通デサチュラーゼの発現

背景及び理論的根拠

微生物による脂肪酸からの昆虫脂肪アルコールの生成の改変には、合成経路の機能発現が必要である。１つのかかる経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの、及び続く脂肪アルコールへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼ、及びアルコール形成レダクターゼを含む。これらの酵素をコードする幾つもの遺伝子が、ある種の昆虫並びにある種の微細藻類に見られる。幾つもの遺伝子変異体をスクリーニングすることにより、単一の昆虫脂肪アルコール又はそのブレンドの高レベル合成能を有する経路の作成を可能にする酵素活性を同定した。加えて、これらの酵素を複数の宿主（サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica））にわたってスクリーニングすることにより、これらの膜貫通タンパク質の最適発現に好適な宿主を見つけ出すための検索を最適化し得る。

【０５５１】

手法の概要

デサチュラーゼ（昆虫由来：カブラヤガ（Agrotis segetum）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、アワノメイガ（Ostrinia furnacalis）、及びカラントシュートボーラー（Lampronia capitella）及び海洋性珪藻：タラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana））の小さい組をテストケースとして選択して、機能発現アッセイ、代謝産物抽出方法、及び分析化学を調査し及び確立した。

【０５５２】

ＳＰＶ０５３におけるｐＸＩＣＬ発現カセットからのｍＣｈｅｒｒｙ対照の組込み及び機能発現の成功が確認された。

【０５５３】

ＳＰＶ０５３バックグラウンドで同じｐＸＩＣＬベクターを使用する組換えデサチュラーゼライブラリを組み込んだ（図２０）。１つの変異体、カブラヤガ（Agrotis segetum）のＺ１１デサチュラーゼもクローニングして、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）Ｏｌｅ１ｐの最初の２７アミノ酸が昆虫デサチュラーゼのＮ末端に融合したタンパク質生成物を作製した（配列番号１５）。

【０５５４】

ヘキサデカン酸（パルミチン酸）の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸（パルミトバクセン酸）へのインビボ生物変換によってデサチュラーゼの機能性をバリデートした。

【０５５５】

ＧＣ－ＦＩＤ及びＧＣ－ＭＳ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０５５６】

結果

ライブラリ構築

この試験は、Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）（ＳＰＶ０５３）における膜貫通デサチュラーゼ変異体のスクリーニングに焦点を置いた。スクリーニングには、パルミトイル－ＣｏＡ（Ｃ１６：０）に対して既報告のＺ１１デサチュラーゼ活性を有する５つの昆虫デサチュラーゼ（配列番号１６～１９、２３）及び既報告のＺ９デサチュラーゼ活性を有する３つの昆虫デサチュラーゼ（配列番号２０～２２）を含めた。１つの変異体、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）ＯＬＥ１　Ｎ末端の２７アミノ酸が昆虫配列の上流に融合したカブラヤガ（A. segetum）由来のＺ１１デサチュラーゼ（配列番号１６）もサブクローニングした（図２０、配列番号１５）。構築時点では、カブラヤガ（A. segetum）Ｚ１１デサチュラーゼは陽性対照であると考えられ、及びＣ．アルビカンス（C. albicans）ＯＬＥ１融合物は、カンジダ属（Candida）リーダー配列を含めると機能発現が向上し得るかどうかを試験するために構築した。このコンストラクトは、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）デサチュラーゼスクリーニングで使用されるものを模倣するように設計した（実施例４を参照されたい）。最後に、組込み及び発現に関する陽性対照及び組換えデサチュラーゼ活性に関する陰性対照としての役割を果たすように、ｍＣｈｅｒｒｙ赤色蛍光タンパク質（配列番号１４）を発現する対照コンストラクトを含めた（図２１Ａ～図２１Ｄ）。

【０５５７】

ＳＰＶ０５３への線状化プラスミドの形質転換効率はコンストラクト間で大幅に異なった。低効率であるものの、各変異体につき少なくとも３つのクローン分離株が同定された（表８及び表９）。ゼオシン選択下ではゼオシン耐性マーカーの存在が成長速度を増加させるはずであるため、形質転換プレート上の大型コロニーが陽性組込み体である可能性がより高いという仮定がなされていた。スクリーニング結果の分析から、大型コロニーの数は形質転換効率と相関しないことが示唆された。代わりに、総コロニー（小及び大）の数が、観察された効率と最良に相関した（図２２）。加えて、ある場合には、小コロニー中に陽性クローンが認められた。低いプレーティング密度では、成長速度が組込みイベントと相関し得る（即ち陽性組込み体はより速く成長する）可能性がある。コロニーをＹＰＤ＋ゼオシンにパッチし直す二次スクリーニングが、陽性組込み体のエンリッチメントに有

効であることが分かった。パッチの速い成長は、形質転換プレート上のコロニーの一般的な集団と比べて陽性組込み体である可能性が高かった。

【０５５８】

【表８】

表8: SPV053におけるデサチュラーゼ形質転換。形質転換効率はゼオシン選択下において比較的高度なバックグラウンドを伴いコンストラクト間で異なった。

特異性	供給源種	pXIC1 プラスミド	DNA ug	大型コロニー (対照プレート)	総コロニー (対照プレート)
対照	mCherry_C1	pPV0137	1.1	60 (30)	2,000 (500)
Z11	カブラヤガ(Agrotis segetum)-OLE1_Ca	pPV0138	1.2	120 (78)	>10,000 (320)
	カブラヤガ(Agrotis segetum)	pPV0139	1.3	115 (78)	8,000 (320)
	クルミマダラメイガ(Amyelois transitella)	pPV0140	1.1	220 (78)	5,000 (320)
	イラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)	pPV0141	1.1	100 (78)	>10,000 (320)
	アメリカタバコガ(Helicoverpa zea)	pPV0142	1.0	350 (78)	5,000 (320)
	タラシオシラ・シュードナナ(Thalassiosira pseudonana)	pPV0146	1.1	140 (78)	1,500 (320)
Z9	アワノメイガ(Ostrinia furnacalis)	pPV0143	0.9	220 (78)	6,000 (320)
	カラントシュートボーラー(Lampronia capitella)	pPV0144	1.2	230 (78)	5,000 (320)
	アメリカタバコガ(Helicoverpa zea)	pPV0145	1.2	72 (78)	2,000 (320)

【０５５９】

【表９】

表9: デサチュラーゼSPV053ライブラリ構築。推定Z11不飽和化活性を有する5つの昆虫デサチュラーゼ及び推定Z9不飽和化活性を有する3つの昆虫デサチュラーゼをpXICLベクターを使用してSPV053バックグラウンドに組み込んだ。加えて、mCherryを発現する対照株を同じベクターで構築した。

特異性	供給源種	pXICL プラスミド	陽性合計	スクリーニング合計	陽性率
対照	mCherry_Ct	pPV0134	16	16	1.00
Z11	カブラヤガ (Agrotis segetum)-OLE1_Ca	pPV0138	7	12	0.58
	カブラヤガ (Agrotis segetum)	pPV0139	12	12	1.00
	クルミマダラメイガ (Amyelois transitella)	pPV0140	5	60	0.08
	イラクサギンウワバ (Trichoplusia ni)	pPV0141	6	12	0.50
	アメリカタバコガ (Helicoverpa zea)	pPV0142	5	120	0.04
	タラシオシラ・シュードナナ (Thalassiosira pseudonana)	pPV0146	3	96	0.03
Z9	アワノメイガ (Ostrinia furnacalis)	pPV0143	3	57	0.05
	カラントシュートボーラー (Lampronia capitella)	pPV0144	3	58	0.05
	アメリカタバコガ (Helicoverpa zea)	pPV0145	3	94	0.03

【０５６０】

機能発現アッセイ

一連のインビボ生物変換実験によって異種デサチュラーゼの機能発現を特徴付けた。エタノール（誘導のため）及び飽和酸基質（パルミチン酸、パルミチン酸メチル、ミリスチン酸メチル）を補足した富栄養（ＹＰＤ）培地又は限定（ＣＭグルコース）培地において、昆虫デサチュラーゼを発現するＣ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３由来の株を培養した。小規模（２ｍｌ）培養物は２４ディープウェルプレートで合計７２時間、最初の２４時間が経った後に基質を追加して培養した。

【０５６１】

初回のスクリーニングでは、パルミチン酸基質を補足した複数の生物変換培地を調べた。細胞脂質含量の脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）分析により、２つの機能性パルミトイル－ＣｏＡ（Ｚ）－１１デサチュラーゼが同定された。クルミマダラメイガ（A. transitella）又はアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼを発現する株（ＳＰＶ０３０５－ＳＰＶ０３１０）は、（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸標準で溶出した、ｍＣｈｅｒｒｙ対照株（ＳＰＶ０３０２－ＳＰＶ０３０４）では観察されない脂肪酸種を生成した（図２３）。試験した他の株は非天然脂肪酸種を生成しなかった（データは示さず）。Ｃ１６画分の近似脂肪酸組成を表１０に掲載する。天然パルミトイル－ＣｏＡ（Ｚ）－９デサチュラーゼがなおもＳＰＶ０５３バックグラウンドに存在し、これは、デサチュラーゼの（Ｚ）－９／（Ｚ）－１１特異性を厳密には決定できないことを意味する。培地中にパルミチン酸を補足すると、アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ発現株について（Ｚ）－１１／（Ｚ）－９ヘキサデセン酸比が０．６から１．４に上昇した。（Ｚ）－１１

－ヘキサデセン酸力価は、クルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼを発現する株について約５．６２ｍｇ／Ｌであり、及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼを発現する株について５．９６ｍｇ／Ｌであることが観察された。パルミチン酸メチル補足でも同様の性能が観察された（データは示さず）。

【０５６２】

【表１０】

表10: 種々のデサチュラーゼを発現する種々のC.トロピカリス*(C.tropicalis)*
SPV053におけるC16脂肪酸画分の組成。*NS = 基質(ヘキサデカン酸)の添加なし。

	C16:0 [%]	Z9-C16:1 [%]	Z11-C16:1 [%]	Z11/Z9 比
mCherry	72.9	27.1	0.0	0.0
Hzea-YPD_NS	50.0	30.9	19.1	0.6
Hzea-YPD	58.1	17.5	24.4	1.4
AT-YPD	55.5	14.5	30.0	2.1

【０５６３】

推定（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸種の更なる特徴付けに十分なバイオマスを作成するため、生物変換アッセイを振盪フラスコ内の２０ｍｌにスケールアップした。観察された種は（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸標準と共に及び（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸標準とは独立して溶出したが、異なる脂肪酸異性体（例えば（Ｅ）－９－ヘキサデセン酸）が（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸と同様の保持時間を有し得た可能性があった。異なる立体異性体がＤＢ－２３上で別様に溶出することに伴い、（Ｅ）－１１－ヘキサデセン酸の発生を除外することができた。（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸生成の最終的な確認は、ＤＭＤＳ誘導体化脂肪酸の質量分析検出を用いて１１－位置選択性を確認することにより完了した。この誘導体化技法を用いると、（Ｚ）－１１及び（Ｅ）－１１異性体も原則的に解くことができた。実験試料のフラグメンテーションパターンは（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸標準に一致させることができた（図２４Ａ～図２４Ｅ）。この技法を用いて、クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ発現株の両方の特定の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸位置異性体及び立体異性体の生成が確認された。

【０５６４】

最後に、ミリスチン酸メチル（Ｃ１４：０）を基質としてデサチュラーゼライブラリ全体に関して試験した。クルミマダラメイガ（A. transitella）又はアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼのいずれかを発現する株において、ミリスチン酸塩（Ｃ１４：０）と（Ｚ）－９－テトラデセン酸（Ｚ９－Ｃ１４：１）との間に溶出する非天然脂肪酸種が観察された（図２５Ａ）。この非天然種は（Ｚ）－１１－テトラデセン酸であることが仮定され、このことは標準物質で確認することができる。加えて、カブラヤガ（A. segetum）Ｚ１１デサチュラーゼ、アワノメイガ（O. furnacalis）Ｚ９デサチュラーゼ、及びアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ９デサチュラーゼが全て、ミリスチン酸塩（Ｃ１４：０）ピークのすぐ後に溶出した肩ピークを生じた（図２５Ｂ）。全ての株において他のＣ１４由来種（例えばテトラデカン二酸）が観察された。これらの結果は、クルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼがミリストイル－ＣｏＡに対して何らかの活性を有することを示唆する。インビボでのデサチュラーゼ基質特異性に関して更なる結論を導き出すには、未知の種の確認及び定量化が必要である。

【０５６５】

要約すれば、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）（ＡＡＦ８１７８７）及びクルミマダラメイガ（Amyelois transitella）（ＪＸ９６４７７４）由来の２つのデサチュラー

ゼをＳＰＶ０５３で発現させて、内因的に産生されるか又は補足されるかのいずれかのパルミチン酸からの（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の合成をもたらした。

【０５６６】

Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３におけるアメリカタバコガ（H. Zea）及びクルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼの機能発現が富栄養（ＹＰＤ）培地及び限定（ＣＭグルコース）培地の両方におけるインビボ生物変換アッセイを用いて確認された。活性デサチュラーゼが細胞内（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸を生じさせ、これはｍＣｈｅｒｒｙ発現対照株では観察されなかった。アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼを発現するＳＰＶ０５３のＣ１６脂肪酸組成は、約５０．０％ヘキサデカン酸、３０．９１％（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸及び１９．１％（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸である。パルミチン酸を補足すると、組成物は５８．１％ヘキサデカン酸、１７．５％（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸及び２４．４％（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸である。クルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼを発現するＳＰＶ０５３のＣ１６脂肪酸組成は、５５．５％ヘキサデカン酸、１４．５％（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸及び３０．０％（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸である。比較すると、ｍＣｈｅｒｒｙを発現するＳＰＶ０５３は、約７２．９％ヘキサデカン酸、２７．１％（Ｚ）－９－ヘキサデセン酸及び（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸無しのＣ１６脂肪酸組成を生じた。（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸は、機能性Ｚ１１デサチュラーゼを発現する両方の株において約５．５ｍｇ／Ｌで生成された。

【０５６７】

イラクサギンウワバ（T. ni）、Ｔ．シュードナナ（T. pseudonana）、又はカブラヤガ（A. segetum）デサチュラーゼを含む株では（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸は観察されなかった。

【０５６８】

アメリカタバコガ（H. Zea）、アワノメイガ（O. furnacalis）、又はカラントシュートボーラー（L. capitella）由来のＺ９昆虫デサチュラーゼを発現する株について、脂肪酸組成の違いは観察されなかった。

【０５６９】

ＤＭＤＳ誘導体化後のＧＣ－ＭＳによって標準物質化合物の保持時間及びフラグメンテーションパターンと比較することにより、生物学的に生成された（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の位置異性体及び立体異性体が確認された。

【０５７０】

ミリスチン酸メチルを補足したクルミマダラメイガ（A. transitella）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼを発現するＳＰＶ０５３の生物変換では、ｍＣｈｅｒｒｙ発現陰性対照株に観察されない未同定の代謝産物が生成された。この代謝産物のＧＣ保持時間は、ミリスチン酸塩（Ｃ１４：０）と（Ｚ）－９－テトラデセン酸との間であることが認められる。

【０５７１】

結論

Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３における昆虫由来の膜貫通デサチュラーゼの機能発現が達成された。

【０５７２】

Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）におけるスクリーニングによって同定された活性デサチュラーゼはまた、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ΔＯＬＥ１で発現させたときにＯＬＥ１機能も補完した（実施例４を参照されたい）。

【０５７３】

インビボアッセイを用いて非天然脂肪酸異性体（例えば（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸）に関するＣ．トロピカリス（C. tropicalis）におけるデサチュラーゼ活性をアッセイすることができる。パルミチン酸又はミリスチン酸メチルなどの飽和酸基質を補足することにより、向上した比の非天然脂肪酸を生成することができる。

【０５７４】
昆虫デサチュラーゼの機能発現及び／又は活性は、Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）ＳＰＶ０５３では配列起源に応じて幅広く異なる。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）スクリーニングで観察された結果と同様に（実施例４を参照されたい）、カブラヤガ（A. segetum）及びＴ．シュードナナ（T. pseudonana）変異体は検出可能な（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸を生成しなかった。興味深いことに、イラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼも、アッセイ条件下で検出可能な（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸を生成することができなかった。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）アッセイと異なり、イラクサギンウワバ（T. ni）発現コンストラクトはキメラＯＬＥ１リーダー配列を含まなかった。
【０５７５】
機能性アメリカタバコガ（H. Zea）変異体及び非機能性イラクサギンウワバ（T. ni）変異体に対するＣ．アルビカンス（C. albicans）ＯＬＥ１リーダー配列の包含を試験することができる。
【０５７６】
Ｃ１４特異的デサチュラーゼを同定するため更なるデサチュラーゼ変異体の機能発現を調べることができる。
【０５７７】
機能性デサチュラーゼをレダクターゼ変異体と共に発現させて、続いて不飽和脂肪アルコール生成に関するスクリーニングを実施することができる。
【０５７８】
材料及び方法
株の樹立
遺伝子の記録には従来手法を用いた。ＣＴＧロイシンコドンをＴＴＡに置き換えたことを除き、天然配列は変化させなかった。GenscriptによるＮｃｏＩ及びＮｏｔＩ制限部位を使用して、全ての遺伝子をｐＰＶ００５３にクローニングした。大腸菌（E. coli）ＮＥＢ１０βへの形質転換後、Zyppyプラスミドミニプレップキット（Zymo Research、Irvine, CA）を用いてプラスミドをミニプレップした。ＢｓｉＷＩ（New England Biolabs、Ipswich, MA）で消化することによりプラスミドを線状化した後、ＳＰＶ０５３に形質転換した。消化後、Clean and Concentrator Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を使用してＤＮＡを単離した。約１μｇのＤＮＡを電気穿孔によって形質転換した。ＴＥ＋１００ｍＭ酢酸リチウム＋ＤＴＴとインキュベートする代わりに、細胞はＴＥ＋１００ｍＭ酢酸リチウムのみで２時間インキュベートした。陽性組込み体は部位特異的であることが分かり、チェックＰＣＲにより遺伝子タイピングを行った。低効率転換の更なるスクリーニングに二段階手法を取った。約６０コロニーをＹＰＤ＋３００μｇ／ｍｌゼオシンに再パッチし、一晩成長させた。急速に成長した（２４時間以内の高密度増殖）一部のパッチをコロニーＰＣＲによってスクリーニングした。急速に成長するパッチの圧倒的多数が陽性組込み体として同定された。
【０５７９】
機能発現アッセイ
ＹＰＤ及びＣＭグルコースにおけるパルミチン酸補足
陽性分離株をＹＰＤ＋３００μｇ／ｍｌゼオシンに再パッチし、一晩成長させて、次に４℃で保存した。株をパッチプレートから２４ディープウェルプレート（四角形ウェル、ピラミッド形底）内の２ｍｌのＹＰＤに接種した。各デサチュラーゼ変異体及びｍＣｈｅｒｒｙ発現対照株につき３つの陽性クローンを接種した。ディープウェルプレートを３０℃、１０００ｒｐｍ、及び８０％湿度でInfors HT Multitron Proプレートシェーカーにおいて２４時間インキュベートした。２４時間インキュベートした後、培養物を１ｍｌの等量に分けて２組の同一プレートを作製した。両組のプレートとも５００×ｇで遠心することによりペレット化した。一方の組のプレートは２ｍｌのＹＰＤ＋０．３％（ｖ／ｖ）エタノールに再懸濁し、第２の組は２ｍｌのＣＭグルコース＋０．３％エタノールに再懸濁した。この段階でエタノールを加えて、ＩＣＬプロモーターからの組換え酵素発現を誘

導した。培養物を同じ条件下で更に２４時間インキュベートした後、エタノール中９０ｇ／Ｌストック溶液からの培養物に３００ｍｇ／Ｌパルミチン酸を加えた。この結果は、新鮮０．３％エタノールをパルミチン酸と併せて加えることであった。一部の株はまた、パルミチン酸を加えることなく培養した。これらの培養物は代わりに０．３％エタノールを加えた。全ての培養物を更に２４時間インキュベートした後、最後に０．３％エタノールを加えた。更に２４時間インキュベートした後、１．５ｍｌの各培養物を１．７ｍｌ微量遠心管に回収し、ペレット化した。上清は新鮮なチューブに保管し、ペレットは以下に記載するとおり処理した。一部の上清試料はまた抽出して、細胞外培地中の遊離酸を調べた。

【０５８０】

代替基質による反復スクリーニング

パルミチン酸及びパルミチン酸メチルの両方を基質として使用してｍＣｈｅｒｒｙ対照及び確認された陽性変異体を再スクリーニングした。培養は、エタノールストック溶液（パルミチン酸メチル９４ｇ／Ｌストック、３１３ｍｇ／Ｌ最終濃度）から等モル量（１．１７ｍＭ）の基質を加えて上記に記載したとおり行った。株の完全なパネルでも、８４ｇ／Ｌストックのミリスチン酸メチル（Ｃ１４：０）を使用して同じプロトコルを繰り返した。基質の最終濃度は再び１．１７ｍＭであった。

【０５８１】

（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸異性体の確認

（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸合成を確認するためインビボ生物変換アッセイをスケールアップした。株ＳＰＶ０３０２、ＳＰＶ０３０３、及びＳＰＶ０３０４（ｍＣｈｅｒｒｙ）、ＳＰＶ０３０４、ＳＰＶ０３０５、及びＳＰＶ０３０６（クルミマダラメイガ（A. transitella）Ｚ１１デサチュラーゼ）、並びにＳＰＶ０３０７、ＳＰＶ０３０８、及びＳＰＶ０３０９（アメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ）の２ｍｌ　ＹＰＤシード培養物をInfors HT Multitronプレートシェーカーにおいて３０℃、１０００ｒｐｍ、８０％湿度で一晩成長させた。３つのクローン分離株の各々からの２００μｌの一晩培養物をプールし、２０ｍｌ　ＹＰＤが入った単一の１２５ｍｌバッフル付きフラスコに接種した。得られた３つのフラスコを３０℃及び２５０ｒｐｍ（Inforsフラスコシェーカー）で２４時間成長させた。培養物を５００×ｇで遠心することによりペレット化し、２０ｍｌのＹＰＤ＋０．３％（ｖ／ｖ）エタノールに再懸濁し、１２５ｍｌバッフル付き振盪フラスコに戻した。培養物を更に２４時間インキュベートした後、エタノール中９０ｇ／Ｌストックの３００ｍｇ／Ｌパルミチン酸（１フラスコ当たり２２１μｌ）を加えた。２４時間インキュベートした後、誘導を持続させるため各フラスコに更なる０．３％（ｖ／ｖ）エタノール（２２１μｌ）を加えた。フラスコを更に２４時間インキュベートした後、ＦＡＭＥ分析及びＤＭＤＳ誘導体化のため細胞を回収した。

【０５８２】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

全脂質組成並びに（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸定量化は、Moss et al. (1982)及びYousuf et al (2010)による変法に基づいた。通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット化した細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を、５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウムを含有するメタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬスクリューキャップＧＣ－バイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸を含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相を新しい１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。水相を２回目に５００μＬクロロホルムで、今回はヘプタデカン酸なしに抽出した。合わせた有機相を９０℃で蒸発させた。室温に冷却した後、残留する脂肪酸メチルエステル及び遊離脂肪酸を溶解し、０．２Ｍ　ＴＭＳＨ（水酸化トリメチルスルホニウム）を含有するメタノール中で誘導体化した。

【０５８３】

ジメチルジスルフィド（ＤＭＤＳ）誘導体のフラグメンテーションパターンを標準物質のＤＭＤＳ誘導体と比較することにより、生物学的に生成された（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸の位置選択性を決定した。酵母培養物を１２のアリコートに分けた（開発した手順におけるいかなるパラメータも変更しないようにした）。細胞をペレット化すると、これにより平均６３ｍｇの細胞（ｃｃｗ）（１８ｍＬの培養物から７５５ｍｇ）が得られた。このペレットを上記に記載したとおり塩基性メタノリシスに供した。しかしながら、酸性化後、これらの試料を５０ｍＬファルコンチューブに合わせた。合わせた試料を１０ｍＬクロロホルムで２回抽出した。この混合物を３０００ｒｐｍで１０分間遠心すると、より良好な相分離が実現した。合わせた有機相を新しい５０ｍＬファルコンに合わせ、１０ｍＬのブライン及び１０ｍＬの水で連続的に洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、真空濃縮した。濃縮した油を１．５ｍＬクロロホルム中に溶解させて、１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。クロロホルムを９０℃で蒸発させた。残りの試料は５０μＬのメチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル（ＭＴＢＥ）中に溶解させた。５０μＬを１、５、１０及び２０μＬに分け、インサートのないＧＣ－バイアルに移した。各バイアルに２００μＬ　ＤＭＤＳ（ジメチルジスルフィド）及び５０μＬ　ＭＴＢＥ（６０ｍｇ／ｍＬヨウ素含有）を加えた。この混合物を５０℃で４８時間加熱した後、１００μＬ飽和チオ硫酸ナトリウム溶液を加えることにより過剰なヨウ素を除去した；しかしながら、カンジダ属（Candida）株からのデタージェントの過剰形成に起因して、層が十分に混合されなかった。従って試料を１５ｍＬファルコンチューブ内で希釈して、２００μＬ、３．５５ｍＬＭＴＢＥ（ヨウ素及び分析物を含有する）、５００μＬジクロロメタン、１．５ｍＬ水及び１ｍＬエタノールの最終試料組成とした。有機相を１．８ｍＬガラスバイアルにおいて８５℃で段階的に蒸発させた。試料を５００μＬジクロロメタンに取り、試料を実施例４にあるとおりHagstroem et al. (2013)の方法を用いたＧＣ－ＭＳによって分析した。

【０５８４】

実施例７：ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）における膜貫通デサチュラーゼの発現

背景及び理論的根拠

微生物による脂肪酸からの昆虫脂肪アルコールの生成の改変には、合成経路の機能発現が必要である。１つのかかる経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの、及び続く脂肪アルコールへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼ、及びアルコール形成レダクターゼを含む。これらの酵素をコードする幾つもの遺伝子が、ある種の昆虫並びにある種の微細藻類に見られる。或いは、位置特異的及び立体特異的デサチュラーゼを使用して、脂肪酸前駆体リッチな微生物油を生成することができる。次に微生物油は誘導体化し、活性成分に還元することができる。幾つもの遺伝子変異体をスクリーニングすることにより、単一の昆虫脂肪酸及びアルコール又はそのブレンドの高レベル合成能を有する経路の作成を可能にする酵素活性を同定した。加えて、これらの酵素を複数の宿主（サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・ビスワナチイ（トロピカリス）（Candida viswanathii (tropicalis)）、及びヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica））にわたってスクリーニングすることにより、これらの膜貫通タンパク質の最適発現に好適な宿主を見つけ出すための検索を最適化し得る。

【０５８５】

Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）及びＣ．ビスワナチイ（トロピカリス）（C. viswanathii (tropicalis)）におけるデサチュラーゼの初期スクリーニングにより、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、及びイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）から３つの活性Ｚ１１－Ｃ１６：１デサチュラーゼ変異体が同定された。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）スクリーニングは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）Ｏｌｅ１ｐ　Ｚ９デサチュラーゼのＮ末端リーダー配列が完全長昆虫Ｚ１１デサチュラーゼ配列に融合したコード配列を使用した。この戦略はこれまでに科学文献においてＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）で真核生物デサチュラーゼを発現させる

ために用いられている。上記のデサチュラーゼの３つ全てが、ＯＬＥ１欠失バックグラウンドで発現させたとき、Ｏｌｅ１ｐリーダー融合を伴うＺ１１デサチュラーゼ活性を示した。Ｃ．アルビカンス（C. albicans）Ｏｌｅ１ｐリーダー配列を伴う同様の設計をアメリカタバコガ（H. Zea）由来のＺ１１デサチュラーゼで用いた。このＯｌｅ１ｐ－アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ融合物は、活性であるものの、Ｚ１１－ヘキサデセン酸力価を有意に増加させることはなかった。加えて、従来どおり最適化したクルミマダラメイガ（A. transitella）Ｚ１１デサチュラーゼは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）及びＣ．ビスワナチイ（C. viswanathii）の両方で活性であった。以下の研究は、２つの異なるＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）株、ＳＰＶ１４０及びＳＰＶ３００におけるアメリカタバコガ（H. Zea）、イラクサギンウワバ（T. ni）、及びクルミマダラメイガ（A. transitella）Ｚ１１デサチュラーゼの機能発現を試験することに焦点を置いた。アメリカタバコガ（H. Zea）及びイラクサギンウワバ（T. ni）デサチュラーゼには天然配列及びヒト（Homo sapiens）コドン最適化した配列の両方を使用した一方、クルミマダラメイガ（A. transitella）には天然配列のみを使用した。最後に、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｏｌｅ１ｐ　Ｚ９ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼのＮ末端は、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）又はＣ．アルビカンス（C. albicans）のいずれに由来するＯｌｅ１ｐのＮ末端よりも昆虫デサチュラーゼと一層緊密にアラインメントする。このアラインメントに基づき、２つの更なるデサチュラーゼバージョンを作成した。推定リーダー配列をＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｏｌｅ１ｐからイラクサギンウワバ（T. ni）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼに交換した。

【０５８６】

手法の概要

Ｚ１１デサチュラーゼ（昆虫由来：クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni））の焦点を絞ったライブラリ（これらはＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）又はＣ．ビスワナチイ（C. viswanathii）のいずれかにおいて活性が観察された）を、ＵＲＡ３選択マーカーを有するＸＰＲ２遺伝子座を標的とするダブルクロスオーバーカセットにクローニングした。タンパク質コード配列は、天然昆虫配列（配列番号２４、２５）、ヒト（Homo sapiens）最適化コード配列（配列番号２６、２７）、又はＮ末端８４塩基（アメリカタバコガ（H. Zea）、配列番号２９）又は８１塩基（イラクサギンウワバ（T. ni）、配列番号２８）がＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１（ＹＡＬＩ０Ｃ０５９５１）遺伝子のＮ末端９６塩基と交換されているヒト（Homo sapiens）最適化配列のいずれかを使用する。Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）及びＣ．ビスワナチイ（C. viswanathii）スクリーニングと異なり、リーダー配列キメラは、宿主リーダー配列が完全長デサチュラーゼコード配列のＮ末端に連結されているのではなく、リーダー配列の直接的な交換を試験する。クルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼについては、天然コード配列のみを使用した（配列番号３０）。

【０５８７】

これらの７つのデサチュラーゼコンストラクトの各々をＳＰＶ１４０（ＰＯ１ｆ）及びＳＰＶ３００（Ｈ２２２　ΔＰ　ΔＡ　ΔＦ　ΔＵＲＡ３）に形質転換し、部位特異的組込みが確認された。

【０５８８】

デサチュラーゼ活性は、ＹＰＤ培地におけるヘキサデカン酸（パルミチン酸）の（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸（パルミトバクセン酸）へのインビボ生物変換によって試験した。

【０５８９】

ＧＣ－ＦＩＤ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０５９０】

結果

株の樹立

ＸＰＲ２遺伝子座への組込みを標的とするＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）発現カセ

ットを含むｐＰＶ１０１ベクターにデサチュラーゼ変異体をクローニングした。

【０５９１】

天然昆虫配列（配列番号２４、２５）、ヒト（Homo sapiens）にコドン最適化した完全長昆虫配列（配列番号２６、２７）、又は推定リーダー配列がＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１デサチュラーゼ由来のリーダー配列に置換されているもの（配列番号２８、２９）でイラクサギンウワバ（T. ni）及びアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼを各々合成した。天然昆虫コード配列を用いてクルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼも合成した（配列番号３０）。７つ全てのデサチュラーゼ変異体をＳＰＶ１４０に形質転換した。以前の活性結果に基づき、アメリカタバコガ（H. Zea）及びクルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼ変異体のみをＳＰＶ３００に形質転換した。

【０５９２】

機能発現アッセイ

Ｃ．ビスワナチイ（C. viswanathii）ＳＰＶ０５３における膜貫通デサチュラーゼ発現に使用したプロトコルの変法によって機能的活性を評価した（実施例６を参照されたい）。簡潔に言えば、昆虫デサチュラーゼを発現するＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＳＰＶ１４０及びＳＰＶ３００由来の株を富栄養（ＹＰＤ）培地で培養してバイオマスを生じさせた。ＹＰＤで生じたバイオマスを使用して、小規模（２ｍｌ）培養物をパルミチン酸と共に２４ディープウェルプレートにおいて合計４８時間培養した（詳細については材料及び方法を参照されたい）。

【０５９３】

イラクサギンウワバ（T. ni）、アメリカタバコガ（H. Zea）、及びクルミマダラメイガ（A. transitella）変異体の初期スクリーニングでは、ヒト（Homo sapiens）にコドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ変異体のみが検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を生成した（図２６）。天然アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼの発現は１００±５ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－ヘキサデセン酸の生成をもたらし、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１リーダー配列を含むバージョンは８３±１１ｍｇ／Ｌを生成した。図２６に見られるとおり、他の主要な脂肪酸種の分布は機能性デサチュラーゼ発現の影響を比較的受けなかった。活性株では、Ｚ１１－ヘキサデセン酸が脂肪酸種の１０％（ｇ／ｇ）を占めた（細胞外表面に吸着し得るパルミチン酸基質を含む）。

【０５９４】

ＳＰＶ１４０バックグラウンドにおける活性変異体をＳＰＶ３００由来デサチュラーゼ株と比較してフォローアップ実験を行った。ｈｒＧＦＰを発現する親ＳＰＶ３００及びＳＰＶ１４０を陰性対照として使用した。同じ生物変換アッセイプロトコルを使用した。ＳＰＶ１４０にあるとおり、ヒト（H. sapiens）最適化変異体のみが検出可能な活性を生じた（図２７）。ＳＰＶ３００株はより高い最終細胞密度に成長した（ＳＰＶ３００　ＯＤ６００＝２６～２８、ＳＰＶ１４０　ＯＤ６００＝１９～２２）（図２８）。ヒト（H. sapiens）コドン最適化した天然アメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１－デサチュラーゼを発現する株（ｐＰＶ１９９）について、最も高い力価が観察された。再度試験したＳＰＶ１４０株は１１３±１ｍｇ／Ｌ（５．５±０．２ｍｇ／Ｌ／ＯＤ）のＺ１１－ヘキサデセン酸を生じたが、これは最初の実験で観察された力価よりも１３％高い（図２９）。同じデサチュラーゼを発現するＳＰＶ３００株は、より広範囲の生成能力を生じた。平均してそれらは８９±１８ｍｇ／Ｌ（３．３±１．２ｍｇ／Ｌ／ＯＤ）のＺ１１－ヘキサデセン酸を生成したが、１つのクローンは１２４ｍｇ／Ｌ（４．６ｍｇ／Ｌ／ＯＤ）のＺ１１－ヘキサデセン酸を生成した。

【０５９５】

要約すれば、ヒト（Homo sapiens）コドン最適化したアメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ変異体のみが検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を生成した。現在のアッセイ条件下では、ＳＰＶ３００と比べてＳＰＶ１４０バックグラウンドで僅かに高い力価が観察された。表１１にＺ１１－ヘキサデセン酸力価を要約する。

【０５９６】
【表１１】

表11: ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)における例示的デサチュラーゼの発現から得られたZ11-ヘキサデセン酸力価

デサチュラーゼ	コドン最適化	親株	Z11-ヘキサデセン酸力価(mg/L)
Z11 イラクサギンウワバ(*T. ni*)	天然	SPV140	ND(検出なし)
Z11 イラクサギンウワバ(*T. ni*)	ヒト(*Homo sapiens*)	SPV140	ND
YlOLE1-Z11 イラクサギンウワバ(*T. ni*)	ヒト(*Homo sapiens*)	SPV140	ND
Z11 アメリカタバコガ(*H. Zea*)	天然	SPV140	ND
		SPV300	ND
Z11 アメリカタバコガ(*H. Zea*)	ヒト(*Homo sapiens*)	SPV140	100 ± 5
		SPV300	87 ± 18
YlOLE1-Z11 アメリカタバコガ(*H. Zea*)	ヒト(*Homo sapiens*)	SPV140	83 ± 11
		SPV300	55 ± 1
Z11 クルミマダラメイガ(*A. transitella*)	天然	SPV140	ND
		SPV300	ND

【０５９７】
ＳＰＶ３００では、ｐＰＶ２００（ヒト（Homo sapiens）コドン最適化したＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＯＬＥ１－アメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼ）の１つの非部位特異的組込み体を試験した。この組込み体は検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を生成しなかったが、これらの２つの部位特異的組込み体は５５±１ｍｇ／Ｌを生成した。
【０５９８】
ＳＰＶ１４０又はＳＰＶ３００由来株のペレットからは主要なヒドロキシ又は二酸ピークは観察されず、現在のアッセイ条件下で（比較的低い基質濃度、富栄養培地）、ＳＰＶ３００におけるβ－酸化／ω－酸化遺伝子の欠失によってＺ１１－ヘキサデセン酸蓄積は増加しなかった。
【０５９９】
結論
アメリカタバコガ（H. Zea）Ｚ１１デサチュラーゼは活性であり、約５００ｍｇ／Ｌパルミチン酸基質から約１００ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－ヘキサデセン酸の生成をもたらす。３つの陽性組込み体及び２４ウェルプレートアッセイにおけるレプリケート実験にわたって機能発現が実証された。
【０６００】
アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）における活性にコドン最適化（ヒト（Homo sapiens）又は潜在的にＹ．リポリティカ（Y. lipolytica））が必要であった。
【０６０１】
イラクサギンウワバ（T. ni）Ｚ１１デサチュラーゼは、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）で活性であるものの、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）では検出可能なＺ１１－ヘキサデセン酸を生成しない。
【０６０２】
Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）株のアッセイの再現性はグリセロールストックから出発して確認することができる。
【０６０３】
クルミマダラメイガ（A. transitella）デサチュラーゼは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）における発現にコドン最適化することができる。

【０６０４】
Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）は候補生成宿主であるため、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）に活性デサチュラーゼの更なるコピーを組み込むことができ、生物変換を向上させる培養条件を同定することができ、及び基質変換を定量化することができる。
【０６０５】
材料及び方法
株の樹立
全てのデサチュラーゼ遺伝子を合成した（Genscript）。天然配列又はヒト（Homo sapiens）コドン最適化のいずれかを使用した。合成した遺伝子はｐＰＶ１０１にサブクローニングした。プラスミドを形質転換し、Zyppyプラスミドミニプレップキット（Zymo Research、Irvine, CA）を使用して大腸菌（E. coli）ＥＰＩ４００からプレップした。Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を使用して約１～２μｇの線状化ＤＮＡを形質転換した。形質転換混合物全体をＣＭグルコース－ｕｒａ寒天プレートにプレーティングした。陽性組込み体は部位特異的であることが分かり、チェックＰＣＲにより遺伝子タイピングを行った。
【０６０６】
機能発現アッセイ
ＹＰＤにおけるパルミチン酸補足
陽性分離株をＹＰＤに再パッチし、一晩成長させ、次に４℃で保存した。株をパッチプレートから２４ディープウェルプレート（四角形ウェル、ピラミッド形底）内の２ｍｌのＹＰＤに接種した。各デサチュラーゼ変異体につき３つの陽性クローンを接種した。ＳＰＶ１４０及び親ＳＰＶ３００におけるｐＰＶ１０１の３つの分離株を陰性対照として使用した。ディープウェルプレートを２８℃及び２５０ｒｐｍでInfors Multitron冷却フラスコシェーカーにおいて２４時間インキュベートした。２４時間インキュベートした後、１ｍｌ容積の各培養物を５００×ｇで遠心することによりペレット化した。各ペレットを２ｍｌのＹＰＤに再懸濁した。エタノール中９０ｇ／Ｌストック溶液からの培養物に５００ｍｇ／Ｌパルミチン酸を加えた。この結果、０．５％エタノールをパルミチン酸基質と共に加えることになった。培養物は全て、４８時間インキュベートした後にエンドポイント試料を採取した。最終細胞密度はTecan Infinite 200proプレートリーダーで測定した。０．７５又は０．８ｍｌの各培養物を１．７ｍｌ微量遠心管に回収し、ペレット化した。上清を除去し、ペレットを以下に記載するとおり処理した。
【０６０７】
代謝産物抽出及びＧＣ－ＦＩＤ分析
全脂質組成並びに（Ｚ）－１１－ヘキサデセン酸定量化は、Moss et al. (1982)及びYousuf et al (2010)による変法に基づいた。通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット化した細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を、５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウムを含有するメタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬクリンプバイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸メチルを含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相をＧＣバイアルに移した。脂質の分析及び脂肪酸の定量化のため、５０μＬの０．２Ｍ　ＴＭＳＨ（メタノール中水酸化トリメチルスルホニウム）を加え、試料をＧＣ－ＦＩＤによって分析した。
【０６０８】
実施例８：昆虫脂肪アルコール合成用の生成プラットフォームとしてのカンジダ・ビスワナチイ（トロピカリス）（Candida viswanathii（tropicalis））
背景及び理論的根拠
昆虫膜貫通デサチュラーゼ及びレダクターゼの変異体を予めスクリーニングし、カンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）又はサッカロミセス・セレビシエ（Sacchar

omyces cerevisiae）のいずれかにおけるそれらの機能発現に基づき順位付けした（実施例３、４及び６を参照されたい）。アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）デサチュラーゼ及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）レダクターゼを選択してＣ．ビスワナチイ（C. viswanathii）における合成昆虫脂肪アルコール経路をアセンブルした。カンジダ属（Candida）イソクエン酸リアーゼ（ＩＣＬ）プロモーター下にあるコドン最適化アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼと、カンジダ属（Candida）転写伸長因子（ＴＥＦ）プロモーター下にあるコドン最適化オオタバコガ（H. armigera）レダクターゼとの同時発現を完全脂肪アルコール経路のゲノム組込みによって達成した。組換え株（ＳＰＶ０４９０）の培養物において単純炭素源及びパルミチン酸を使用してＺ１１－１６ＯＨの蓄積を達成した。

【０６０９】

手法の概要

推定構成的Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）プロモーター（ｐＴＥＦ）によってドライブされるオオタバコガ（Helicoverpa armigera）レダクターゼと対にした機能性アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）デサチュラーゼ（実施例６を参照されたい）を含む組込みプラスミドを設計した。

【０６１０】

ヘキサデカン酸（パルミチン酸）のＺ１１－１６ＯＨへのインビボ生物変換によって完全経路の機能性を評価した。

【０６１１】

ＧＣ－ＦＩＤ及びＧＣ－ＭＳ分析を用いて代謝産物を同定及び定量化した。

【０６１２】

結果

ＩＣＬプロモーター下にあるアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＴＥＦプロモーター下にあるオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼを発現するように改変されたカンジダ属（Candida）の培養物にＺ１１－１６ＯＨの蓄積が検出された（表１２及び図３０）。

【０６１３】

【表１２】

表 12. カンジダ･ビスワナチイ(*Candida viswanathii*)生物変換アッセイからの Z11-16OH 力価の一覧表。SPV088 は、mCherry を発現するように改変した C.ビスワナチイ(*C. viswanathii*)である(陰性対照)。SPV0490 は、昆虫脂肪アルコール経路を発現するように改変した C.ビスワナチイ(*C. viswanathii*)である。

Z11-16OH 力価 (mg/L)		
	SPV0488 (陰性対照)	SPV0490
試料 1	0.08	1.03
試料 2	0.07	0.93
試料 3	0.06	0.88
平均値	**0.07**	**0.95**
StDev	0.01	0.06

【０６１４】

材料及び方法

株の樹立

２つの発現カセットを含む組込みプラスミド（ｐｐＶ０２２８）を設計した。第一のカセットは、Ｃ．ビスワナチイ（C. viswanathii）ＩＣＬプロモーター（配列番号３３）によってドライブされるアメリカタバコガ（H. Zea）コドン最適化デサチュラーゼ（配列番号３１）を含む。第２のカセットは、Ｃ．トロピカリス（C. tropicalis）ＴＥＦプロモーター（配列番号３４）によってドライブされるコドン最適化オオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ（配列番号３２）を含む。ＩＣＬプロモーターカセットの遺伝子発現はＩＣＬターミネーター配列（配列番号３５）によって終結する。ＴＥＦプロモーターカセットの遺伝子発現はＴＥＦターミネーター配列（配列番号３６）によって終結する。遺伝子の記録には従来手法を用いた。天然遺伝子ＣＴＧロイシンコドンをＴＴＡに置き換えたことを除き、配列は変化させなかった。大腸菌（E. coli）ＮＥＢ１０βへの形質転換後、Zyppyプラスミドミニプレップキット（Zymo Research、Irvine, CA）を用いてプラスミドをミニプレップした。ＢｓｉＷＩ（New England Biolabs、Ipswich, MA）で消化することによりプラスミドを線状化した後、ＳＰＶ０５３に形質転換した。消化後、Clean and Concentrator Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を使用してＤＮＡを単離した。約３～５μｇのＤＮＡを電気穿孔によって形質転換した。陽性組込み体は部位特異的であることが分かり、チェックＰＣＲにより遺伝子タイピングを行った。低効率転換の更なるスクリーニングに二段階手法を取った。約１００コロニーをＹＰＤ＋２５０μｇ／ｍｌゼオシンに再パッチし、一晩成長させた。急速に成長した（２４時間以内の高密度増殖）一部のパッチをコロニーＰＣＲによってスクリーニングした。

【０６１５】

機能発現アッセイ

ＹＰＤにおけるパルミチン酸補足

陽性分離株をＹＰＤ＋３００μｇ／ｍｌゼオシンに再パッチし、一晩成長させ、次に４℃で保存した。株をパッチプレートから２４ディープウェルプレート（四角形ウェル、ピ

ラミッド形底）内の２ｍｌのＹＰＤに接種した。各デサチュラーゼ及びレダクターゼ変異体につき４つの陽性クローンを接種し、及び各デサチュラーゼ及びｍＣｈｅｒｒｙ発現対照株につき３つの陽性クローンを接種した。ディープウェルプレートを３０℃、１０００ｒｐｍ、及び８０％湿度でInfors HT Multitron Proプレートシェーカーにおいて２４時間インキュベートした。２４時間インキュベートした後、１ｍｌ容積の各培養物を５００×ｇで遠心することによりペレット化した。各ペレットは２ｍｌのＹＰＤ＋０．３％（ｖ／ｖ）エタノールに再懸濁した。この段階でエタノールを加えて、ＩＣＬプロモーターからの組換え酵素発現を誘導した。培養物を同じ条件下で更に２４時間インキュベートした後、エタノール中９０ｇ／Ｌストック溶液からの培養物に３００ｍｇ／Ｌパルミチン酸を加えた。この結果は、新鮮０．３％エタノールをパルミチン酸と併せて加えることであった。全ての培養物を更に２４時間インキュベートした後、最後に０．３％エタノールを加えた。更に２４時間インキュベートした後、１．５ｍｌの各培養物を１．７ｍｌ微量遠心管に回収し、ペレット化した。上清を除去し、ペレットを以下に記載するとおり処理した。

【０６１６】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット化した細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を、５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウムを含有するメタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬクリンプバイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００μＬ　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸メチルを含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相をＧＣバイアルに移した。有機相を９０℃のヒートブロックにおいて３０分間蒸発させた。１％トリメチルクロロシランを含有する５０μＬ　Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセタミドに残渣を溶解した。ガラスインサートに移す前に、この混合物を９０℃で５分加熱した。この試料をＧＣ－ＭＳによって分析した（表１３）。

【０６１７】

【表１３】

表 13. 代謝産物の GC-MS 分析に使用した分析パラメータ

システム	Agilent 6890 N GC, ChemStation G1701EA E.02.01.1177
カラム	DB23 30 m x 25 μm x 25 μm 圧力 = 11.60 psi; 流量 = 0.6 mL/min
入口	ヒータ = 250℃; 圧力 = 11.74 psi; 全流量 {He} = 111 mL/min
キャリア	He @ 29 cm/sec, 11.60 psi
シグナル	データ転送速度 = 2 Hz/0.1 min
オーブン	150℃で 1 分間 12℃/min で 220℃まで昇温、3 分間保持 35℃/min で 300℃まで昇温、4 分間保持
注入	スプリットレス, 250℃
検出器	HP 5973 MSD SIM モード(m/z: 208.0, 297.3 及び 387.3), 100 msec ドゥエル, EMV モード: ゲイン係数 1, 2.4 min 溶媒遅延、3.09 サイクル/sec
試料	注入量 = 1 μL

【０６１８】

実施例９：ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）由来の昆虫脂肪アルコール生成

背景及び理論的根拠

パルミチン酸からの昆虫脂肪アルコール（Ｚ１１－１６ＯＨ及びＺ９－１６ＯＨ）合成の生成プラットフォームとしてヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）を改変した。

【０６１９】

Ｚ１１デサチュラーゼ（実施例７）及び脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＦＡＲ）の機能発現を個々に確認した後、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）において完全Ｚ１１－１６ＯＨ及びＺ９－１６ＯＨ経路（Ｂｄｒ）を改変した。脂肪アルコール力価を改善する目的で、成長促進用に設計した培養物と比べた脂質貯蔵の誘発用に設計した培養物も調べた。成長条件は高いバイオマス生成に有利であるが、改変経路によって用いられる脂肪アシル－ＣｏＡプールサイズを制限し、脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を膜合成に向ける。逆に、脂質貯蔵条件は脂肪アシル－ＣｏＡの生成の強力な落ち込みを生じさせ、これは望ましい。しかしながら、脂肪体への脂肪アシル－ＣｏＡ輸送はＦＡＲ活性に関して強い競合を生じる。この第２のシナリオ下では、細胞にＺ１１－１６Ａｃｉｄ又はＺ９－１６Ａｃｉ

ｄが蓄積するとしても、その大部分はＦＡＲにとって到達できない。他方で、脂質貯蔵条件下では脂質再動員の連続的なフラックスがあってもよく、これはＦＡＲに利用可能なＺ１１－１６ＣｏＡ又はＺ９－１６ＣｏＡの持続的なプールにつながる。

【０６２０】

手法の概要

２つの生物不飽和化－還元（Ｂｄｒ）経路変異体をＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ（ＳＰＶ３００）バックグラウンドで試験した。第１は、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）Ｚ１１デサチュラーゼをオオタバコガ（Helicoverpa armigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＦＡＲ　配列番号４１のアミノ酸配列）と対にした組換え発現を組み合わせてＺ１１－１６ＯＨ合成経路を作り出した。第２は、天然Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｚ９デサチュラーゼ活性をオオタバコガ（H. armigera）脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＦＡＲ）発現と組み合わせてＺ９－１６ＯＨ経路を作り出した。

【０６２１】

アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現する２つの組込みプラスミドを構築した。デサチュラーゼ発現にはＴＥＦプロモーターを使用し、レダクターゼ発現にはＥＸＰ１（エクスポートタンパク質）又はＴＡＬ１（トランスアルドラーゼ）プロモーターを使用した。

【０６２２】

Ｈ２２２　ΔＰΔＡΔＦ（ＳＰＶ３００）バックグラウンドへのＺ１１－１６ＯＨ経路カセットの組込みの成功はコロニーＰＣＲによって確認した。

【０６２３】

１６Ａｃｉｄ（パルミチン酸）のＺ１１－１６ＯＨ（Ｚ－１１－ヘキサデセノール）へのインビボ生物変換によって完全Ｚ１１－１６ＯＨ経路の機能性を評価した。

【０６２４】

ＴＥＦプロモーターによってドライブされるオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現する予め構築したＳＰＶ４７１（Ｈ２２２　ΔＰΔＡΔＦ由来）を使用した１６Ａｃｉｄ（パルミチン酸）のインビボ生物変換によって完全Ｚ９－１６ＯＨ経路の機能性を評価した。

【０６２５】

ＧＣ－ＭＳ分析を用いてＺ９－１６ＯＨ及びＺ１１－１６ＯＨを同定及び定量化した。ＧＣ－ＦＩＤ分析を用いて脂肪酸を同定及び定量化した。

【０６２６】

概要

アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ（ｐＴＥＦ）及びオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ（ｐＥＸＰ１）を発現する１０個の分離株をスクリーニングした。インビボ生物変換アッセイにより、全ての分離株からのＺ１１－１６ＯＨ生成が確認された。

【０６２７】

１０ｇ／Ｌパルミチン酸メチルを補足したＹＰＤ培地において、比較的低い、検出可能なＺ１１－１６ＯＨ力価（０．２６±０．０９ｍｇ／Ｌ）が観察された。Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ前駆体は２２０±１１ｍｇ／Ｌで測定された（クローン２、４、９、１７、２３間）。

【０６２８】

Ｃ：Ｎ比が約８０の半限定培地において、より高いＺ１１－１６ＯＨ力価が観察された。１０個全ての分離株にわたってＺ１１－１６ＯＨは２．６５±０．３６ｍｇ／Ｌで生成された。Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ前駆体力価は９００±３０ｍｇ／Ｌであった。１つの分離株（ＳＰＶ５７８）は３．６８±０．３１ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－１６ＯＨ（Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ　８４０±１４ｍｇ／Ｌ）を生成した。

【０６２９】

アメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ（ｐＴＥＦ）及びオオタバコガ（H. armigera）レダクターゼ（ｐＴＡＬ１）を発現する９個の分離株をスクリーニングした。イン

ビボ生物変換アッセイにより、全ての分離株からのＺ１１－１６ＯＨ生成が確認された。

【０６３０】

１つの分離株（ＳＰＶ６０３）は半限定培地（Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ　１．３６ｇ／Ｌ）で６．８２±１．１１ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－１６ＯＨを生成した。

【０６３１】

先に試験したレダクターゼ株、ＳＰＶ４７１（オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）は、半限定培地（約８０のＣ：Ｎ比）を用いると４．３０±２．３３ｍｇ／Ｌ　Ｚ９－１６ＯＨ及び４５０±８０ｍｇ／Ｌ　Ｚ９－１６Ａｃｉｄを生成した。

【０６３２】

【表１４】

表14: インビボ生物変換アッセイにおけるB_{dr}経路株からのZ11/Z9-16OH力価をまとめた表

株	培地	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)
pTEF-アメリカタバコガ(*H. Zea*) Z11デサチュラーゼ pEXP-オオタバコガ(*H. armigera*) FAR クローン17(SPV578)	半限定 C:N=80	3.99 ± 0.37 (n=4)	0.22 ± 0.03 (n=4)
pTEF-アメリカタバコガ(*H. Zea*) Z11デサチュラーゼ pTAL-オオタバコガ(*H. armigera*) FAR クローン9 (SPV603)	半限定 C:N=80	6.82 ± 1.11 (n=2)	0.22 ± 0.01 (n=2)
pOLE1-Y.リポリティカ(*Y. lipolytica*) OLE1(天然) pTEF-オオタバコガ(*H. armigera*) FAR (SPV471)	半限定 C:N=80	0.22 ± 0.03 (n=2)	4.30 ± 2.23 (n=2)

【０６３３】

結果

株の樹立

文献のエビデンスから、昆虫デサチュラーゼ及びＦＡＲは両方とも、活性部位が細胞質に向かって配向した小胞体の膜に局在することが示唆される。機能変異体のうち、アメリカタバコガ（H. Zea）由来のＺ１１デサチュラーゼ及びオオタバコガ（H. armigera）由来のＦＡＲ（ＦＡＲ　配列番号４１のアミノ酸配列）を選択し、１つ仮説は、同じ属（ヘリコベルパ属（Helicoverpa））由来の酵素であれば、ＥＲ膜に起こり得るタンパク質間相互作用をより良好に保つことができるであろうというものであった。

【０６３４】

２つの新規コンストラクトをGenscriptから注文し、先にアセンブルしたアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼプラスミド、ｐＰＶ０１９９にクローニングした。Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）由来のＥＸＰ１又はＴＡＬ１のいずれかのプロモーターを有する２つのＦＡＲシントンをこの発現カセットにクローニングした。

【０６３５】

１つのデュアル発現プラスミド（ＥＸＰ１プロモーターを含む）を親株ＳＰＶ３００（Ｈ２２２　Δｐｏｘ１　Δｐｏｘ２　Δｐｏｘ３　Δｐｏｘ４　Δｐｏｘ５　Δｐｏｘ６　Δａｄｈ１　Δａｄｈ２　Δａｄｈ３　Δａｄｈ４　Δａｄｈ５　Δａｄｈ６　Δａｄｈ７　Δｆａｏ１　Δｕｒａ３）に形質転換した。同じ親株の２つの異なるコンピテント細胞調製物を形質転換して、コンピテント細胞調製物によって生じる株性能のばらつきを研究した。約２５％のＵＲＡ＋　クローンが、ＸＰＲ２遺伝子座における標的組込み体であることが確認された（調製物１について２０％、調製物２について３３％）。Ｃｏｍｐ．細胞調製物１からの２つのクローン及びＣｏｍｐ．細胞調製物２からの８つ全ての標的クローンを機能発現アッセイにおけるスクリーニングに選択した。

【０６３６】

第２のデュアル発現プラスミド（ＴＡＬ１プロモーターを含む）を同じ親株（ＳＰＶ３００）に組み込んだ。２３個のコロニーをチェックＰＣＲによってスクリーニングし、及

び１１個が標的組込み体であることが分かった（４８％）。９個の組込み体を機能発現アッセイにおけるスクリーニングに選択した。

【０６３７】

ＳＰＶ４７１（オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現するＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ）の構築は先述のとおりであった。

【０６３８】

Ｚ１１－１６ＯＨ機能発現アッセイ

インビボ２４ウェルプレートアッセイを用いてＺ１１－１６ＯＨの生成を判定した。このアッセイは、スクリーニングデサチュラーゼ及びレダクターゼ変異体に用いられる設計、並びに脂肪酸蓄積を増加させるために用いられる条件に基づいた。１０ｇ／Ｌパルミチン酸メチルを生物変換基質として補足した富栄養培地（ＹＰＤ）及び半限定培地を使用した。半限定培地は約８０のＣ：Ｎ比を有し、５ｇ／Ｌグリセロール及び６０ｇ／Ｌグルコースを含んだ（更なる詳細については材料及び方法を参照されたい）。

【０６３９】

ＴＥＦプロモーターによってドライブされるアメリカタバコガ（H. Zea）デサチュラーゼ及びＥＸＰ１プロモーターによってドライブされるオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ（ＦＡＲ　配列番号４１のアミノ酸配列）を有する株の初期スクリーニングから、Ｚ１１－１６ＯＨの生成にＦＡＲの存在が必要であることが確認された。いかなる条件下においても、親及びデサチュラーゼ単独対照株の両方からヘキサデセノールは観察されなかった。両方の培地条件下で、完全デサチュラーゼ－レダクターゼ経路を発現するクローンからＺ１１－１６ＯＨ及び程度は少ないがＺ９－１６ＯＨが検出された。富栄養培地で変換を完了させたとき、０．２６±０．０９ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－１６ＯＨ及び０．０６±０．０１ｍｇ／Ｌ　Ｚ９－１６ＯＨが生成された（図３２Ａ）。半限定培地を使用したとき、Ｚ１１－１６ＯＨ力価の１０倍の増加及びＺ９－１６ＯＨ力価の３倍の増加が観察された（図３２Ｂ）。全経路クローンでは、２．６５±０．２９ｍｇ／Ｌ　Ｚ１１－１６ＯＨ及び０．１８±０．０２ｍｇ／Ｌ　Ｚ９－１６ＯＨが生成された。Ｚ９－１６ＯＨと比べたＺ１１－１６ＯＨのエンリッチメントが、位置特異的Ｂｄｒ経路を改変し得る可能性を裏付けている。テクニカルレプリケート間の一貫性は、半限定培地条件下ではクローン間で異なった。クローン２、４、６、９、及び１７の力価はＣＶ＜２０と一致した。クローン１、７、及び２３はＣＶ＞４０％を有した。クローン１７について最も高い一貫したＺ１１－１６ＯＨ力価、３．６８±３１ｍｇ／Ｌが観察された（表１５）。

【０６４０】

【表１５】

表15. pEXP1クローンのZ11/Z9-16OH力価をまとめた表。2つの独立したコンピテント細胞調製物からpTEFによってドライブされるアメリカタバコガ*(H. zea)*デサチュラーゼ及びpEXP1によってドライブされるオオタバコガ(H. armigera)レダクターゼを発現する10個の単離物の集団をZ11-16OH及びZ9-16OH産生に関して2つの異なる培地条件下でアッセイした。全単離物にわたる選択のクローンからのアルコール産生を示す。

pTEF-Hz_desat pEXP-Ha_FAR クローン	培地	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)	Z11-16OH 増加倍数 (対YPD)	Z9-16OH 増加倍数 (対YPD)
全てのクローン	YPD	0.26 ± 0.09	0.06 ± 0.01	-	-
全てのクローン	半限定	2.65 ± 0.29	0.18 ± 0.02	10	3
クローン2 (SPV574)	YPD	0.18 ± 0.09	0.05 ± 0.03	-	-
クローン2 (SPV574)	半限定	2.08 ± 0.26	0.14 ± 0.04	12	3
クローン4 (SPV575)	YPD	0.28 ± 0.01	0.11 ± 0.01	-	-
クローン4 (SPV575)	半限定	3.24 ± 0.28	0.21 ± 0.03	12	2
クローン9 (SPV576)	YPD	1.03 ± 0.84	0.05 ± 0.01	-	-
クローン9 (SPV576)	半限定	1.56 ± 0.28	0.11 ± 0.02	1.5	2
クローン23 (SPV577)	YPD	0.16 ± 0.14	0.05 ± 0.05	-	-
クローン23 (SPV577)	半限定	3.35 ± 1.85	0.26 ± 0.15	21	5
クローン17 (SPV578)	YPD	0.19 ± 0.01	0.06 ± 0.01	-	-
クローン17 (SPV578)	半限定	3.68 ± 0.31	0.26 ± 0.02	14	4

【０６４１】

完全経路クローンの脂質プロファイルも定量化した。簡単にするため、図３３Ａ～図３３Ｂでは、選択のクローンについて１６炭素脂肪酸種をプロットする。一般に、完全Ｂｄｒ経路クローンはデサチュラーゼ単独対照よりも少ないＺ１１－１６Ａｃｉｄを蓄積した（ＹＰＤにおいて０．２５＜０．５ｇ／Ｌ、半限定において０．８～１．０＜１．５ｇ／Ｌ）。完全Ｂｄｒ経路クローンにおいてＺ１１－１６Ａｃｉｄ力価が低いのは、デュアル発現カセットにおけるデサチュラーゼ発現の低下、又は潜在的にＦＡＲ及び続く副生成物経路によるＺ１１－１６Ａｃｉｄ消費に起因し得る。ＹＰＤでは１６Ａｃｉｄ力価に傾向は観察されなかったが、半限定培地では、デサチュラーゼ単独株及び完全経路株について１６Ａｃｉｄ力価は同様であった。

【０６４２】

ｐＥＸＰクローンの判定に用いる同じ半限定培地条件下で、第２のデュアル発現カセット（ｐＴＡＬ－Ｈａ＿ＦＡＲ）を使用した株をアッセイした。９個のｐＴＡＬクローンをＳＰＶ３００（親）、ＳＰＶ５７５（ｐＥＸＰ－Ｈａ＿ＦＡＲクローン４）、及びＳＰＶ５７８（ｐＥＸＰ－Ｈａ＿ＦＡＲクローン１７）対照に対してアッセイした。予想どおり、陰性対照からはアルコール生成物は観察されなかった。ｐＥＸＰ陽性対照株からのアルコール力価は、ｐＥＸＰクローンの初期アッセイで観察された結果を再現した（図３４、表１６）。１つの外れ値のクローン、クローン９を除き、ｐＴＡＬクローン（４．１９±０．１６ｍｇ／Ｌ）及びｐＥＸＰクローン（４．１０±０．２２ｍｇ／Ｌ）からのＺ１１－１６ＯＨ力価は同等であった。クローン９は６．８２±１．１１ｍｇ／ＬのＺ１１－１６ＯＨを生成した。ｐＥＸＰクローンでの最初のアッセイのとおり、Ｚ９－１６ＯＨの低いが検出可能な力価が観察された（図３４、表１６）。

【０６４３】

【表１６】

表16. pTAL1クローンのZ11/Z9-16OH力価をまとめた表。TEFプロモーター下のアメリカタバコガ*(H. Zea)*デサチュラーゼ及びTALプロモーター下のオオタバコガ*(H. armigera)*レダクターゼを発現する9個の単離物の集団をZ11-16OH及びZ9-16OH産生に関して半限定培地条件下でアッセイした。クローンは、TEFプロモーター下のアメリカタバコガ*(H. Zea)*デサチュラーゼ及びEXPプロモーター下のオオタバコガ*(H. armigera)*レダクターゼを発現する陽性対照と比較した。全単離物にわたる選択のクローンからのアルコール産生を示す。

pTEF-Hz_desat pEXP-Ha_FAR クローン	培地	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)
EXPクローン4 (SPV575)	半限定	3.91 ± 0.44	0.15 ± 0.01
EXPクローン17 (SPV578)	半限定	4.30 ± 0.16	0.17 ± 0.02
クローン9を除くpTALクローン	半限定	4.19 ± 0.16	0.18 ± 0.01
pTALクローン9 (SPV603)	半限定	6.82 ± 1.11	0.22 ± 0.01

【０６４４】

第２の（ｐＴＡＬ）完全経路スクリーニングにおける全ての株の脂質プロファイルも定量化した。簡単にするため、図３５には１６炭素脂肪酸種をプロットする。予想どおり、デサチュラーゼを発現する株についてのみＺ１１－１６Ａｃｉｄが存在する。完全脂質プロファイルは先に観察されたものと同様であった（図３６）。Ｚ９－１８Ａｃｉｄ（オレイン酸）は、Ｚ１１－１６Ａｃｉｄに次いで２番目に最も豊富な脂肪酸種であった

【０６４５】

Ｚ９－１６ＯＨ機能発現アッセイ

インビボフラスコ規模アッセイを用いてＺ９－１６ＯＨ生成を試験した。親対照株のＨ２２２　ΔＰΔＡΔＦ（ＳＰＶ３００）を、オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲを発現する株（Ｚ９－１６ＣｏＡ前駆体（ＳＰＶ４７１）の合成を天然Ｚ９デサチュラーゼ活性に頼る）と比較した。プレートアッセイを模倣するＹＰＤシード培養によってバイオマスを作成した。生物変換フラスコをＺ１１－１６ＯＨプレートアッセイにおいて用いた同じ半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地に初期ＯＤ６００＝１又はＯＤ６００＝４で接種した（詳細については材料及び方法を参照されたい）。予想どおり、対照フラスコは検出可能なＺ９－１６ＯＨを生成しなかったが、ＳＰＶ４７１フラスコは２４時間のインキュベーション後に最大４．３０±２．２３ｍｇ／Ｌを生成した（図３７Ａ～図３７Ｂ）。レプリケート間には大きいばらつきがあったが、全てのＳＰＶ４７１（オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ）レプリケートが１ｍｇ／Ｌ力価を超えた。播種密度を増加させてもＺ９－１６Ａｃｉｄ又はＺ９－１６ＯＨ力価は増加しなかった。２４時間における前駆体Ｚ９－１６Ａｃｉｄ力価は、Ｚ１１－１６ＯＨの生成に用いられるデュアル発現カセット株について観察されたＺ１１－１６Ａｃｉｄ前駆体よりも著しく低かった（＜０．５ｇ／Ｌ）。他の脂肪酸種の相対的存在量も、先に観察されたプロファイルと同様であり、次に最も豊富な種としてＺ９－１８Ａｃｉｄがあった（図３８）。４８時間の経過中に脂質試料及びアルコール試料の両方を採取して、Ｚ９－１６ＯＨ力価及び脂質力価の時間変化を作成した。Ｚ９－１６ＯＨ力価は２４時間でピークとなり、その後２日目にわたって低下した（図３９Ａ）。Ｚ９－１６Ａｃｉｄは最初の２４時間で急速に増加し、その後次の２４時間にわたって安定化し、又はゆっくりと増加した（図３９Ｂ）。用いた分析的方法は細胞ペレットのみを利用するため、Ｚ９－１６ＯＨ力価の低下は、アルコール生成物が下流で消費又は分泌されるという仮説を裏付けている。アルコール生成物は酸化されるか（ω－酸化）、遊離アルコールとして分泌されるか、又は誘導体化されてエステルとして分泌され得る。ＦＩＤ及びＭＳ　ＳＣＡＮ検出を用いた上清試料の分析から、検出可能なＺ９－１６ＯＨ又は

Ｚ９－１６ＯＨ誘導体がないことが明らかになり、酸化経路を通じた消費の仮説を裏付けている。

【０６４６】

結論

ヘリコベルパ属（Helicoverpa）Ｚ１１デサチュラーゼと脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼとの組み合わせ発現は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）Ｈ２２２　ΔＰΔＡΔＦ（ＳＰＶ３００）における力価＞１ｍｇ／ＬでのＺ１１－１６ＯＨの生成につながった。

【０６４７】

高いＣ：Ｎ比条件が、富栄養培地条件と比べてＺ１１－１６ＯＨ力価を改善した。

【０６４８】

脂質蓄積条件下では、天然Ｚ９デサチュラーゼ及びオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ活性の組み合わせが、＞１ｍｇ／Ｌ　Ｚ９－１６ＯＨの合成に十分である。

【０６４９】

力価は、例えば、脂肪アルコール生成物及び／又は脂肪酸前駆体を消費する経路を欠失させるか；オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲよりも高い代謝回転率を呈するＦＡＲ変異体を同定するか；及び／又は経路コピー数を増加させることにより増加する。

【０６５０】

望ましくない主要な副生成物を同定する。

【０６５１】

１つ以上の内因性アセチルトランスフェラーゼの活性によって脂肪アルコール生成物の一部が脂肪アセテートに変換される可能性を調べる。

【０６５２】

改良された宿主株を改変することにより、ω－酸化経路及び脂質貯蔵経路の成分を除去する。

【０６５３】

材料及び方法

株の樹立

全てのデサチュラーゼ及びレダクターゼ遺伝子はGenscriptから注文した。ヒト（Homo sapiens）コドン最適化を用いた（Genscriptアルゴリズム）。新しく合成した発現カセットをGenscriptによってＳａｐＩ制限部位を用いてｐＰＶ１９９にサブクローニングした。プラスミドを形質転換し、大腸菌（E. coli）ＥＰＩ４００からZyppy Plamsid Miniprep Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を用いてプレップした。プラスミドをＰｍｅＩ（New England Biolabs、Ipswich, MA）で消化し、Zymoclean Gel DNA recovery Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を用いたゲル抽出によって精製した。Clean and Concentrator Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を用いてＤＮＡを更に濃縮した。Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit（Zymo Research、Irvine, CA）を用いて約１～２μｇのＤＮＡを形質転換した。製造者のプロトコルを以下のとおり変更した：２ｍｌ　ＹＰＤシード培養物はコンピテント細胞調製前日の午前９時に接種した。シードは８時間（午後５時まで）成長させて、その後２５０ｍｌバッフル付き振盪フラスコに入った４０ｍｌのＹＰＤ（又は１２５ｍｌバッフル付きフラスコ内の２０ｍｌ）を０．０００５の初期ＯＤ６００になるように接種した。培養物は２８℃及び２５０ｒｐｍで約２４時間インキュベートした。ＯＤ６００＝０．５～１で細胞を回収した。製造者の指示にあるとおり１０ｍｌの培養物を１ｍｌの溶液２に再懸濁する（ＯＤ６００約１０）代わりに、１０ｍｌのＳＰＶ１４０培養物を０．５ｍｌに再懸濁した（ＯＤ６００約２０～３０）。溶液２アリコートは全て、チューブを密閉されたスタイロフォームボックスに置いた後－８０℃のフリーザーに入れることによりゆっくりと－８０℃に凍結した。１．７ｍｌエッペンドルフ試験管内のコンピテント細胞の５０μｌアリコートを氷上で解凍し、水中に溶出したＤＮＡを直接細胞に加え、及び５００μｌの溶液３を用いて穏やかにピペッティングしながら細胞を懸濁した。チューブを２８℃で３時間、３０分毎に穏やかにボルテックスしながらインキュベートした。形質転換混合物全体をＣＭグルコース　－ｕｒａ寒天プレ

ートにプレーティングした。陽性組込み体は部位特異的であることが分かり、チェックＰＣＲにより遺伝子タイピングを行った。

【０６５４】

Ｚ１１－１６ＯＨ機能発現アッセイ

陽性分離株をＹＰＤに再パッチし、一晩成長させ、次に４℃で保存した。株をパッチプレートから２４ディープウェルプレート（四角形ウェル、ピラミッド形底）内の２ｍｌのＹＰＤに接種した。各パッチからレプリケート接種を行った。陰性対照株はグリセロールストックからＹＰＤにストリーク（struck out）し、個々のコロニーを使用して接種した。ディープウェルプレートを２８℃及び２５０ｒｐｍでInfors Multitron冷却フラスコシェーカーにおいて２４時間インキュベートした。２４時間インキュベートした後、０．８５ｍｌ容積の各培養物を８００×ｇで遠心することによりペレット化した。各ペレットは２ｍｌのＹＰＤ又は半限定培地のいずれかに再懸濁した（以下の表１７に記載する）。培養物に１０ｇ／Ｌパルミチン酸メチル（約５０℃に予熱した）を加えた。培養物は全て、４８時間インキュベートした後にエンドポイント試料を採取した。最終細胞密度はTecan Infinite 200proプレートリーダーで測定した。１．５ｍｌ（アルコール分析）又は５００μｌ（脂質分析）を１．７ｍｌ微量遠心管に移し、ペレット化した。上清を清浄なチューブに移し、試料を以下に記載するとおり処理した。

【０６５５】

【表１７】

表17. 半限定(C:N=80)培地組成。

脂質貯蔵の誘導に使用した半限定基本培地の組成を示す。

培地構成	濃度	単位
酵母エキス	2	g/L
ペプトン	1	g/L
リン酸カリウム緩衝液pH7	0.1	M
アミノ酸・NH4不含YNB	1.7	g/L
グルコース	60	g/L
グリセロール	5	g/l

【０６５６】

Ｚ９－１６ＯＨ機能発現アッセイ

ＳＰＶ３００（陰性対照）及びＳＰＶ４７１をＹＰＤ寒天プレートにストリーク（struck out）し、一晩成長させ、次に４℃で保存した。株をコロニーから２ｍｌのＹＰＤに接種し、１４ｍｌ丸底培養管において２８℃及び２５０ｒｐｍで約８時間インキュベートした。インキュベーション後、２ｍｌの培養物を使用して１２５ｍｌバッフル付き振盪フラスコ内の２０ｍｌのＹＰＤを接種した。振盪フラスコを２８℃及び２５０ｒｐｍで２４時間インキュベートした。インキュベーション後、Tecan Infinite 200proプレートリーダーを使用して振盪フラスコ内の細胞密度を測定した。適切な容積の培養物をペレット化することにより、細胞を２５ｍｌの半限定Ｃ：Ｎ＝８０培地（上記表１７を参照されたい）に初期ＯＤ６００＝１（約１ｇＤＣＷ／Ｌ）又は４（約４ｇＤＣＷ／Ｌ）で再懸濁した。この再懸濁培養物を２５０ｍｌバッフル付き振盪フラスコに加えた。５０℃に予熱した後にニートなパルミチン酸メチルを１０ｇ／Ｌの最終濃度で加えた。基質を加えた後、フラスコを２８℃及び２５０ｒｐｍで２日間インキュベートした。１２、１８、２４、３６、４２、及び４８時間目に５００μｌ（脂質分析）及び１．５ｍｌ（アルコール分析）の試料を１．７ｍｌ微量遠心管に採取した。試料をペレット化し、上清を清浄な微量遠心管に移した。

【０６５７】

代謝産物抽出及びＧＣ－ＭＳ検出

アルコール分析

通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット化した細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を、５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウムを含有するメタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬクリンプバイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００μＬ　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸メチルを含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相をＧＣバイアルに移した。有機相を９０℃のヒートブロックにおいて３０分間蒸発させた。１％トリメチルクロロシランを含有する５０μＬ　Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセタミドに残渣を溶解した。ガラスインサートに移す前に、この混合物を９０℃で５分加熱した。この試料をＧＣ－ＭＳによって分析した（表１８）。

【０６５８】

【表１８】

表18. GC-MSパラメータ

システム	Agilent 6890 N GC, ChemStation G1701EA E.02.01.1177
カラム	DB23 30 m x 25 μm x 25 μm 圧力 = 11.60 psi; 流量 = 0.6 mL/min
入口	ヒータ = 250°C; 圧力 = 11.74 psi; 全流量{He} = 111 mL/min
キャリア	He @ 29 cm/sec, 11.60 psi
シグナル	データ転送速度 = 2 Hz/0.1 min
オーブン	150℃で1分間 12℃/minで220℃まで昇温、3分間保持 35℃/minで300℃まで昇温、4分間保持
注入	スプリットレス , 250°C
検出器	初期株スクリーニング及び1回目のテクニカルトリプリケート: HP 5973 MSD SIMモード(m/z: 208.0、297.3及び387.3), SPV488/SPV490アルコール定量化: HP 5973 MSD SIM モード(m/z: 284.0及び297.3), 100 msecドウェル、EMVモード: ゲイン係数1, 2.4 min溶媒遅延、3.09サイクル/sec
試料	注入量 = 1 uL

【０６５９】

脂質分析

全脂質組成は、Moss et al. (1982)及びYousuf et al (2010)による変法に基づいた。通常約１０ｍｇ～８０ｍｇのペレット化した細胞（１．５ｍＬプラスチックチューブ内）を、５％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウムを含有するメタノール中に再懸濁した。アルカリ性細胞懸濁液を１．８ｍＬガラスクリンプＧＣ－バイアルに移した。この混合物を９０℃のヒートブロックで１時間加熱した。４００μＬ　２．５Ｎ　ＨＣｌで酸性化する前に、バイアルを放冷して室温に戻した。１ｍＭヘプタデカン酸メチルを含有する５００μＬクロロホルムを加え、この混合物を激しく振盪し、次に水相及び有機相の両方を１．５ｍＬプラスチックチューブに移した。この混合物を１３，０００ｒｐｍで遠心した後、４５０μＬの有機相を新しい１．８ｍＬガラススクリューキャップＧＣ－バイアルに移した。室温に冷却した後、残留する脂肪酸メチルエステル及び遊離脂肪酸を溶解し、０．２Ｍ　ＴＭＳＨ（水酸化トリメチルスルホニウム）を含有するメタノール中で誘導体化した（表１９）。

【０６６０】

【表１９】

表19. GC-MSパラメータ

システム	Agilent 6890 GC, ChemStation Rev. B.03.02 (341)
カラム	J&W DB-23 30 m x 25 mm x 25 µm 圧力 = 16 psi; 流量 = 0.9 mL/min; ランタイム = 14.4 min
入口	ヒータ = 240℃; 圧力 = 16 psi; 全流量{He} = 31.4 mL/min
キャリア	H_2 @ 1 mL/min, 9 psi, 35 cm/sec
シグナル	データ転送速度 = 2 Hz/0.1 min
オーブン	150℃で1分間 12℃/minで220℃まで昇温、3分間保持 35℃/minで240℃まで昇温、6分間保持 平衡化時間:2分
注入	スプリット , 240℃ スプリット比 – 30:1; 29.1 mL/min
検出器	FID, 240℃ H_2 @ 35.0 mL/min, 空気@ 350 mL/min;; エレクトロメータ{点火オフセット} @ 2.0 pA
試料	注入量 = 1 uL

【０６６１】

実施例１０：ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）中でのＺ１１－１４Ａｃｉｄの生成

［0771］ 背景及び理論的根拠

［0772］ ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）を、標的鱗翅目（Lepidoptera）フェロモンＺ１１－１４Ａｃの前駆体であるＺ１１－１４Ａｃｉｄを生成するように改変した。

【０６６２】

［0773］ ７３のデサチュラーゼのライブラリを、Ｚ１１－１４Ａｃ、Ｚ７－１２Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４Ａｃ、Ｅ８Ｅ１０－Ｃ１２ＯＨ及びＺ９Ｅ１１－１４Ａｃを含む可能なフェロモンを標的にするように選択した。全てのデサチュラーゼをH222 ΔPΔAΔF（ＳＰＶ３００）バックグラウンドにおいて試験した。

【０６６３】

［0774］ Δ１１活性を有する１１のデサチュラーゼを文献から同定した（ＤＳＴ００１－ＤＳＴ００９、ＤＳＴ０３０及びＤＳＴ０３９、表２０）。全てのデサチュラーゼを、基質としてパルミチン酸メチル（Ｃ１６）、ミリスチン酸メチル（Ｃ１４）又はラウリン酸メチル（Ｃ１２）のいずれかを供給することによってスクリーニングし、全生成物プロファイルをＧＣ分析によって決定した。

【０６６４】

［0775］ 推定Δ１１デサチュラーゼライブラリ及びΔ１１化合物、特にＺ１１－１４Ａｃｉｄを生成することが示された他のデサチュラーゼの得られた活性が記載される。

【０６６５】

【表２０】

表 20. 実施例 10 において説明されるデサチュラーゼ

酵素コード	由来生物	GenBank 受託番号
DST001	*アカアシハタケ* *(Argyrotaenia velutinana)*	AF416738
DST002	*ハスモンヨトウ* *(Spodoptera litura)*	AGH12217.1
DST003	*イネヨトウ* *(Sesamia inferens)*	AII21943.1
DST004	*タバコスズメガ* *(Manduca sexta)*	CAJ43430.2
DST005	*ヨーロッパアワノメイガ* *(Ostrinia nubilalis)*	AF441221
DST006	*アメリカタバコガ* *(Helicoverpa zea)*	AAF81787.1
DST007	*ハスオビハマキ* *(Choristoneura rosaceana)*	AF545481
DST008	*ショウジョウバエ* *(Drosophila melanogaster)*	AJ271414
DST009	*エジプトヨトウ* *(Spodoptera littoralis)*	AY362879
DST030	*カラントシュートボーラー* *(Lampronia capitella)*	ABX71630.1
DST039	*クルミマダラメイガ* *(Amyelois transitella)*	NP001299594.1

【０６６６】

［0776］ 結果

［0777］ 最大で６９ｍｇ／ＬのＺ１１－１４Ａｃｉｄ生成が、２ｇ／Ｌのミリスチン酸メチルをデサチュラーゼライブラリに供給した場合に観察された（図４１）。現在の最良のデサチュラーゼ、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）（Ｈｚ）ＤＳＴ（ＳＰＶ４５９、配列番号５４によってコードされる）は、デサチュラーゼＤＳＴ００１～ＤＳＴ００７、ＤＳＴ０３０及びＤＳＴ０３９に加えて、１６ｍｇ／Ｌ～６９ｍｇ／Ｌの範囲のある程度の量のＺ１１－１４Ａｃｉｄを生成する。ＤＳＴ００１（Ａ．ベルチナナ（A. velutinana））、ＤＳＴ００４（タバコスズメガ（M. sexta））及びＤＳＴ０３９（クルミマダラメイガ（A. transitella））は、Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ生成よりＺ１１－１４Ａｃｉｄ生成に対してより特異的であるが、これらのデサチュラーゼは、約２０ｍｇ／ＬのＺ１１－１４Ａｃｉｄを生成する。より高いＺ１１－１４Ａｃｉｄ力価を生成する株は、２０～３０ｍｇ／Ｌのミリスチン酸メチル基質からＺ９－１４Ａｃｉｄも生成し、これは、陰性対照ＳＰＶ２９８と比較して減少された。ＳＰＶ２９８と比較したＨｚ　ＤＳＴ（ＳＰＶ４５９）のＣ１４～Ｃ１８生成物プロファイルが図４２に示される。

【０６６７】

［0778］ Ｚ１１－１４Ａｃｉｄ合成の概念実証が示される。アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）ＤＳＴを上回る改善されたＺ１１－１６Ａｃｉｄ力価又は生成物特異性を有していた酵素を同定することが試みられた（１．０５ｇ／ＬのＺ１１－１６Ａｃｉｄ；６９ｍｇ／ＬのＺ１１－１４Ａｃｉｄ）。Ｈｚ　ＤＳＴ（ＳＰＶ４５９）より高い生成を有するデサチュラーゼはなかった一方、ＤＳＴ００３（配列番号３９）は、ＨｚＤｅｓａｔ

株と類似の生成表現型を有しており、ＤＳＴ００２及びＤＳＴ００５は、減少したＺ１１－１４Ａｃｉｄと共に類似のＺ１１－１６Ａｃｉｄ生成を有していた。ＤＳＴ００６中のデサチュラーゼは、ＳＰＶ４５９において発現されるアメリカタバコガ（H. zea）デサチュラーゼと遺伝子学的に同等であり、ライブラリ対照として用いられる。ＤＳＴ００６は、パルミチン酸メチルを供給したときに同等のレベルのＺ１１－１６Ａｃｉｄを生成したが；この株は、ミリスチン酸メチルにおけるＺ１１－１４Ａｃｉｄのより低い力価を生じた。株バックグラウンドの遺伝的差異は、観察される差異を説明し得る。

【０６６８】

[0779] ＤＳＴ０３９（クルミマダラメイガ（A. transitella））は、様々な条件下で既にスクリーニングされた。富栄養培地において、天然のクルミマダラメイガ（A. transitella）コード配列を用いたＺ１１－１６Ａｃｉｄ生成は観察されなかった。Ｈ．サピエンス（H. sapiens）最適化配列を試験し、富栄養培地条件で依然として活性は観察されなかった。このスクリーンにおいて、ＤＳＴ０３９を、Ｈｓ最適化配列を用いて窒素制限条件において試験し、関連する基質におけるＺ１１－１６Ａｃｉｄの２３５ｍｇ／Ｌの生成及び２１ｍｇ／ＬのＺ１１－１４Ａｃｉｄを得た。

【０６６９】

[0780] ＳＰＶ３００バックグラウンドにおけるＤＳＴ００８（キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster））又はＤＳＴ００９（エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis））からのΔ１１生成物は観察されなかった。

【０６７０】

[0781] 概要

[0782] Ｚ１１－１４Ａｃｉｄ生成が１６ｍｇ／Ｌ～６９ｍｇ／Ｌの範囲の力価で１０のデサチュラーゼにおいて観察された（２ｇ／Ｌのミリスチン酸メチル供給）。

【０６７１】

[0783] アメリカタバコガ（H. zea）ＤＳＴ（配列番号５４）は、依然として最良のＺ１１－１６Ａｃｉｄ生成体であった（パルミチン酸メチルを供給した場合、＞１ｇ／Ｌ）。

【０６７２】

[0784] ＤＳＴ００３（イネヨトウ（S. inferens）、配列番号３９）は、アメリカタバコガ（H. zea）ＤＳＴと最も類似する表現型を有する。

【０６７３】

[0785] ＤＳＴ００２（ハスモンヨトウ（S. litura））及びＤＳＴ００５（ヨーロッパアワノメイガ（O. nubialis））は、Ｚ１１－１６Ａｃｉｄ生成についてアメリカタバコガ（H. zea）ＤＳＴより特異的である（減少したＺ１１－１４Ａｃｉｄ生成）。

【０６７４】

[0786] ＤＳＴ００１（Ａ．ベルチナナ（A. velutinana））、ＤＳＴ００４（タバコスズメガ（M. sexta））及びＤＳＴ０３９（クルミマダラメイガ（A. transitella））は、Ｚ１１－１４Ａｃｉｄ生成についてアメリカタバコガ（H. zea）ＤＳＴより特異的である。

【０６７５】

[0787] 結論

[0788] Ｚ１１－１４Ａｃｉｄは、ミリスチン酸メチルを供給した場合、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）における特定のデサチュラーゼの異種発現を伴って生成され得る。

【０６７６】

[0789] デサチュラーゼ（同一の配列又は配列の組み合わせ）の複数のコピーは、増加したＺ１１－１４Ａｃｉｄ力価、生成物特異性及び遺伝的安定性について改善された株バックグラウンドにおいて統合される。

【０６７７】

[0790] 材料及び方法

[0791] ライブラリ作製

［0792］ＰａｃＩ／ＳａｐＩ制限消化を用いたｐＰＶ２６６（ＴＥＦプロモーター及びターミネーターを含むＸＰＲ２遺伝子座統合ベクター）へのコドン最適化（ホモ・サピエンス（Homo sapiens）発現生物）クローニングのために、デサチュラーゼ配列をGenscriptに提供した。凍結乾燥されたＤＮＡ並びにＥＰＩ４００寒天スタブを提供した。デサチュラーゼコンストラクトが表２１に列挙される。

【０６７８】

［0793］コンストラクトを、ＰｍｅＩ制限酵素を用いて線状にし、宿主株ＳＰＶ３００に直接形質転換した。形質転換を、ＸＰＲ２統合接合部の外部及びｐＴＥＦプロモーター内のプライマーを用いて、チェックＰＣＲによって確認した。

【０６７９】

【表２１】

表 21. デサチュラーゼコンストラクト

酵素コード	*種*	GenBank 受託番号	大腸菌 (E. coli) SPV	プラスミド pPV
DST001	*アカアシハタケ (Argyrotaenia velutinana)*	AF416738	SPV0609	pPV0300
DST002	*ハスモンヨトウ (Spodoptera litura)*	AGH12217.1	SPV0610	pPV0301
DST003	*イネヨトウ (Sesamia inferens)*	AII21943.1	SPV0611	pPV0302
DST004	*タバコスズメガ (Manduca sexta)*	CAJ43430.2	SPV0612	pPV0303
DST005	*ヨーロッパアワノメイガ (Ostrinia nubilalis)*	AF441221	SPV0613	pPV0304
DST006	*アメリカタバコガ (Helicoverpa zea)*	AAF81787.1	SPV0614	pPV0305
DST007	*ハスオビハマキ (Choristoneura rosaceana)*	AF545481	SPV0615	pPV0306
DST008	*ショウジョウバエ (Drosophila melanogaster)*	AJ271414	SPV0616	pPV0307
DST009	*エジプトヨトウ (Spodoptera littoralis)*	AY362879	SPV0617	pPV0308
DST030	*カラントシュートボーラー (Lampronia capitella)*	ABX71630.1	SPV0638	pPV0329
DST039	*クルミマダラメイガ (Amyelois transitella)*	NP_001299594.1	SPV0647	pPV0338

【０６８０】

［0794］プラスミド消化

［0795］約１０μｇの凍結乾燥されたＤＮＡをGenscriptから注文した。ＤＮＡを約２００ｎｇ／μＬの最終濃度になるまで５０μＬの水中で再懸濁した。１０μＬのＤＮＡを１．２５μＬの１０倍CutSmartバッファー及び１．２５μＬのＰｍｅＩ制限酵素と混合した（１２．５μＬの反応体積）。反応物をＰＣＲ機械中において３７℃で１．５時間インキュベートし、６５℃で３０分間にわたって熱で不活性化した。

【０６８１】

［0796］形質転換

［0797］バッフル付きフラスコ中で０．００１ＯＤのＹＰＤ培養物を接種し、０．５～

１．００Ｄになるまで成長させることにより、ＳＰＶ３００コンピテント細胞を成長させた。細胞を８００×ｇで採取し、Zymo Frozen-EZ Transformation II Kit for Yeastからの０．２５倍体積の溶液１で洗浄した。細胞を元の培養物体積の１０００倍濃度の溶液２に再懸濁し、発泡スチレン容器中で断熱しながら－８０℃でゆっくりと凍結させた（凍結細胞は、新鮮細胞より良好な形質転換効率を有し得る）。５０μＬの細胞をまず１２．５μＬの消化反応物（清浄化の必要はない）、次に５００μＬの溶液３と混合した。形質転換を、振盪せずに２８℃で３時間インキュベートし、その後、全形質転換混合物を適切な選択的寒天培地にプレーティングした。ペトリ皿をコロニーの出現前に３～４日間インキュベートした。

【０６８２】

［0798］ チェックＰＣＲ

［0799］ 形質転換コロニーをＰＣＲプレートにおいて７μＬの水中に採取した。５μＬの細胞をマルチチャネルにより選択的オムニトレイにパッチし、一晩成長させた。残りの２μＬの細胞を２分間にわたってマイクロ波にかけてから、１５μＬのＰＣＲマスターミックスを加えた。

【０６８３】

【化２】

PCR マスターミックス	1×反応
2×Phusion マスターミックス(HF 緩衝液)	7.5 μL
100μM の oPV204 (XPR2 遺伝子座 F)	0.1 μL
100μM の oPV195 (pTEF R)	0.1 μL
水	7.3 μL

【０６８４】

【化３】

PCR サイクル:

温度	時間	サイクル
98°C	2 分	1x
98°C	15 秒	30x
64°C	30 秒	
72°C	60 秒	
72°C	5 分	1x
4°C	∞	1x

【０６８５】

［0800］ コロニーパッチング

［0801］ 陽性クローンを、アッセイ対照を含む２４ウェルフォーマットにおいてＹＰＤオムニトレイに再パッチした。オムニトレイを２８℃で一晩成長させ、これを用いて、バイオアッセイ培養物を接種した。

【０６８６】

［0802］ バイオアッセイ

［0803］ 陽性形質転換細胞（コンストラクト当たりＮ＝４クローン）を２４ウェル培養プレート内の１ｍＬのＹＰＤに接種し、１０００ｒｐｍで振盪しながら２８℃でInfors HT Mulitron Proにおいて２４時間インキュベートした。細胞を８００×ｇでペレット化し、５μＬの基質（約２ｇ／Ｌの濃度）を含むＳ２培地に再懸濁した。２５０μＬの培養物を４８時間の生物変換後にクリンプトップガラスバイアル中に採取した。

【０６８７】

［0804］ Ｓ２培地
［0805］ ２ｇ／Ｌの酵母エキス、１ｇ／Ｌのペプトン、０．１Ｍのリン酸緩衝液、１．７ｇ／ＬのＹＮＢ ｗ／ｏ ａａ、ＮＨ４、６０ｇ／Ｌのグルコース、５ｇ／Ｌのグリセロール
【０６８８】
［0806］ ＧＣ試料処理
［0807］ 前部入口／検出器：
システム：6890 GC、ChemStation Rev. B.03.02(341)
カラム：J&W DB-23 ３０ｍ×２５ｍｍ×２５ｕｍ
実行時間＝１４．４ｍｉｎ
入口：ヒータ＝２４０℃；圧力＝９．０ｐｓｉ；全流量｛Ｈ２｝＝３６．２ｍＬ／ｍｉｎ
キャリアー：Ｈ２@１．０ｍＬ／ｍｉｎ、９．０ｐｓｉ、３５ｃｍ／ｓｅｃ
シグナル：データ転送速度＝２Ｈｚ／０．１ｍｉｎ
オーブン：１５０℃で１分間
１２℃／ｍｉｎで２２０℃まで昇温、３分間保持
３５℃／ｍｉｎで２４０℃まで昇温、４分間保持
平衡時間：２ｍｉｎ
注入：スプリット、２４０℃
スプリット比－３０：１；２９．１ｍＬ／ｍｉｎ
検出器：ＦＩＤ、２４０℃
Ｈ２@３５．０ｍＬ／ｍｉｎ、Ａｉｒ@３５０ｍＬ／ｍｉｎ
電位計｛Ｌｉｔオフセット｝@２．０ｐＡ
試料：注入量＝１μＬ
【０６８９】
［0808］ 後部入口／検出器：
システム：6890 GC、ChemStation Rev. B.03.02(341)
カラム：J&W DB-23 ３０ｍ×２５ｍｍ×２５ｕｍ
実行時間＝１４．４ｍｉｎ
入口：ヒータ＝２４０℃；圧力＝９．８ｐｓｉ；全流量｛Ｈ２｝＝４０．１ｍＬ／ｍｉｎ
キャリアー：Ｈ２@１．１ｍＬ／ｍｉｎ、９．８ｐｓｉ、３８ｃｍ／ｓｅｃ
シグナル：データ転送速度＝２Ｈｚ／０．１ｍｉｎ
オーブン：１５０℃で１分間
１２℃／ｍｉｎで２２０℃まで昇温、３分間保持
３５℃／ｍｉｎで２４０℃まで昇温、４分間保持
平衡時間：２ｍｉｎ
注入：スプリット、２４０℃
スプリット比－３０：１；３２．３ｍＬ／ｍｉｎ
検出器：ＦＩＤ、２４０℃
Ｈ２@３５．０ｍＬ／ｍｉｎ、Ａｉｒ@３５０ｍＬ／ｍｉｎ
電位計｛Ｌｉｔオフセット｝@２．０ｐＡ
試料：注入量＝１μＬ
【０６９０】
［0809］ ＴＭＳＨ：トリメチルスルホニウムヒドロキシド（メタノール中０．２ｍｏｌ／Ｌ）－ＶＷＲ ＴＣＴ１５７６－０２５ＭＬ
【０６９１】
実施例１１：増加したコピー数の又は改変された変異体脂肪アルコール形成脂アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＦＡＲ）を用いた、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）におけるＺ１１－１６ＯＨの生成
［0810］ 背景及び理論的根拠
［0811］ 不飽和昆虫脂肪アルコールの微生物生成の改変は、合成経路の機能発現を必要

とする。１つのこのような経路は、脂肪アシル－ＣｏＡの、位置特異的及び立体特異的な不飽和脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を媒介する膜貫通デサチュラーゼを含む。アルコール形成レダクターゼ（ＦＡＲ）は、それぞれの脂肪アルコールを生成するように合成経路を補完する。

【０６９２】

［0812］ いくつかの昆虫種では、それぞれのＦＡＲ酵素が部位特異的脱リン酸化によって活性化される（Jurenka,R.& Rafaeli,A. Regulatory Role of PBAN in Sex Pheromone Biosynthesis of Helipthine Moths. Front. Endocrinol.(Lausanne). 2,46(2011)；Gilbert,L. I. Insect Endocrinology.(Academic Press)）。Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）中の異種発現したＦＡＲ酵素のリン酸化が不活性化につながり得、低い脂肪アルコール力価をもたらす。バイオインフォマティクス手法を用いて、ＨａＦＡＲ内のリン酸化残基を予測した。

【０６９３】

［0813］ セリン及びトレオニン残基のアラニン置換がリン酸化をなくすことが示された（Shi,S.,Chen,Y.,Siewers,V.& Nielsen,J. Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1. mBio 5,(2014)）。従って、ＦＡＲ遺伝子コピー数を増加させることに加えて、Ｚ１１－１６ＯＨ力価に対するＨａＦＡＲ酵素（配列番号４１に示されるＨａＦＡＲアミノ酸配列及び配列番号９０に示されるＨａＦＡＲヌクレオチド配列）のいくつかのセリン残基のアラニン置換の影響を試験した。

【０６９４】

［0814］ 手法

［0815］ ヒトコドン最適化されたオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ遺伝子（ＨａＦＡＲ）の第２のコピーをＺ１１－１６ＯＨ生成親株の染色体に導入した。並行して、Ｚ１１－１６ＯＨ生成の改善に対する突然変異オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ遺伝子変異体のコピーを導入することの影響も調べた。７つの突然変異された変異体を、脱リン酸化（一部の昆虫種において観察される）の必要条件を潜在的に緩和することによってＦＡＲ活性を増加させるためにデザインした。このために、オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲのアミノ酸配列内のいくつかの可能なリン酸化部位を同定し、アラニンで置換した。

【０６９５】

［0816］ 結果

［0817］ ＨａＦＡＲにおけるリン酸化部位の決定

［0818］ サーバは、ワールドワイドウェブアドレス：cbs.dtu.dk/services/NetPhos/()において、１７のキナーゼ：ＡＴＭ、ＣＫＩ、ＣＫＩＩ、ＣａＭＩＩ、ＤＮＡＰＫ、ＥＧＦＲ、ＧＳＫ３、ＩＮＳＲ、ＰＫＡ、ＰＫＢ、ＰＫＣ、ＲＳＫ、ＳＲＣ、ｃｄｃ２、ｃｄｋ５及びｐ３８ＭＡＰＫに基づいて実験的に確認されたリンタンパク質のデータベース（ワールドワイドウェブアドレス：phospho.elm.eu.org/about.htmL）に基づいて、可能なリン酸化部位を予測する。

【０６９６】

［0819］ ソフトウェアプログラムは、オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲにおける可能なリン酸化部位として２２セリン、１１トレオニン及び１０チロシンを予測した（図４３）。

【０６９７】

［0820］ 次に、酵母における発現時のオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲのリン酸化部位を決定するように調整された予測プログラムを適用した（ワールドワイドウェブアドレス：cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/；Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1.J. Mol. Biol. 294,1351-1362(1999)）。酵母中でチロシンキナーゼが依然として同定されなかったため（Ingrell, C. R., Miller, M. L., Jensen, O. N. & Blom, N. NetPhosYeast: prediction of protein phosphorylation sites in yeast. Bioi

nforma. 23, 895-897 (2007))、酵母特異的ソフトウェアのみがセリン及びトレオニンを可能なリン酸化部位と見なす。両方のプログラムが、同じ１１セリン残基がリン酸化されることを予測したことは際立っていた。対照的に、酵母特異的分析ツールは、リン酸化トレオニン残基を予測しなかった（図４４）。

【０６９８】

［0821］第１の実験において、７つのＳｅｒからＡｌａの点突然変異体からなる小さいライブラリを試験した（表２２）。３つの予測されるリン酸化部位は、突然変異誘発のために考慮されなかった（位置Ｓｅｒ３０１、Ｓｅｒ３８６、Ｓｅｒ４１６は、閾値を辛うじて上回るスコアであった）。残りの７つのセリン残基については、アラニン置換を導入した。

【０６９９】

【表２２】

表 22: アラニン突然変異体ライブラリに対するセリン

親株	*追加の酵素*	*株番号*
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR	SPV916
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S60A	SPV909
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S195A	SPV910
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S298A	SPV911
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S378A	SPV912
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S394A	SPV913
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S418A	SPV914
Y. リポリティカ(Y. lipolytica)H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S453A	SPV915

【０７００】

［0822］ＨａＦＡＲライブラリを特別に合成し、ＡＸＰ遺伝子座において、ＴＥＦプロモーター及びＸＰＲ２ターミネーター下での発現のためにプラスミドｐＰＶ２３４にサブクローニングした。線状化コンストラクトを、オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ（配列番号４１）と組み合わされたアメリカタバコガ（H. zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（配列番号５４）を発現する株Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）H222ΔPΔAΔF SPV603に形質転換した。この手法は、個々の点突然変異の影響に加えて、第２のコピー、例えばタンパク質発現の影響を決定した。

【０７０１】

［0823］陽性組込み体の４つの個々のクローンを試験した。培養を２４ウェルプレート

において行った。簡潔に述べると、２ｍＬのＹＰＤを個々のクローンのパッチから接種し、２８℃、１０００ｒｐｍで２４時間インキュベートした。２４時間後、ＯＤ６００を測定し、細胞を１０００ｒｐｍで遠心分離した（表２３）。細胞ペレットを１ｍＬのＳ２培地に再懸濁し、１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。細胞を２８℃、１０００ｒｐｍで１８時間インキュベートした。培養物を分析されるまで－２０℃で貯蔵した。抽出及び分析を、ＧＣ－ＦＩＤを用いて、既に確立された標準的なプロトコルに従って行った。

【０７０２】

【表２３】

表 23. 24 ウェルプレート培養の OD600 測定(2 つのプレートを並行して培養した)。各個々のウェルを、YPD 中での 24 時間の培養後に 1:10 の希釈でデュプリケートとして測定した。計算された OD600 値が示される。

	HaFAR-GFP	HaFAR-GFP	HaFAR-GFP	HaFAR S60A	HaFAR S195A クローン 2	HaFAR S195A クローン 2	HaFAR S195A クローン 3	HaFAR S195A クローン 3	HaFAR S298A	HaFAR S298A	SPV603	SPV603	
OD600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	15.392	16.16	17.376	17.976	17.56	18.272	14.188	14.774	14.774	15.708	17.14	17.24	プレート 2
B	16.62	17.172	18.632	18.596	18.894	18.088	16.082	15.38	16.04	16.03	16.572	16.584	プレート 2
C	16.978	16.952	18.154	18.224	18.678	19.384	16.062	14.858	15.498	15.58	18.14	17.528	プレート 2
D	16.596	17.23	17.668	18.842	18.39	18.792	20.678	16.566	16.094	15.904	1.262	1.152	プレート 2
E	17.53	17.156	16.78	15.776	17.398	16.736	16.154	15.514	16.748	16.792	18.26	17.322	プレート 1
F	18.336	17.928	16.392	15.33	20.018	19.37	15.06	14.266	17.522	17.076	16.724	16.522	プレート 1
G	17.16	17.224	15.984	16.194	17.878	17.626	15.372	15.15	16.688	17.022	17.742	16.942	プレート 1
H	16.258	16.12	16.134	16.236	16.808	16.176	15.382	14.51	15.456	15.394	7.664	7.956	プレート 1

	HaFAR S378A	HaFAR S378A	HaFAR S394A	HaFAR S394A	HaFAR S418A	HaFAR S418A	HaFAR S453A	HaFAR S453A	HaFAR	HaFAR	SPV603	SPV603	
OD600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	15.842	15.97	15.31	16.278	16.088	16.302	16.074	15.502	15.34	15.742	16.89	16.062	プレート 2
B	16.3	17.306	16.064	16.5	16.64	16.344	15.69	15.598	15.434	15.248	16.674	16.476	プレート 2
C	17.088	17.146	15.966	15.472	16.508	16.548	15.82	15.216	15.796	16.098	16.81	17.246	プレート 2
D	17.512	17.198	15.15	14.168	16.094	13.93	15.642	15.078	16.77	16.242	0.9	0.864	プレート 2
E	16.446	17.014	15.762	16.536	17.188	17.372	16.164	15.892	15.8	16.422	17.998	17.814	プレート 1
F	16.982	11.196	16.098	13.148	16.1	12.348	16.688	10.232	15.596	13.068	18.456	16.098	プレート 1
G	15.4	15.568	15.236	16.348	15.504	15.824	14.922	15.622	15.11	15.576	17.142	17.672	プレート 1
H	17.088	16.63	0.968	1.006	13.82	12.49	15.826	15.27	17.132	16.166	1.082	0.932	プレート 1

【０７０３】

[0824] 図４５に示されるように、点突然変異をコードする第２のＨａＦＡＲコピー、ＨａＦＡＲ－ＧＦＰ又はＨａＦＡＲ＊（ここで、＊は、親株の既存のコピーに加えて、親ＨａＦＡＲ酵素の第２のコピーを示す）を発現する株である。コピーは、親株（ＳＰＶ６０３）と比較して脂肪アルコール力価を増加させた。ＨａＦＡＲ（Ｓ６０Ａ）、ＨａＦＡＲ（Ｓ２９８Ａ）、ＨａＦＡＲ（３９４Ａ）、ＨａＦＡＲ（Ｓ４５３Ａ）の導入は、中性であるか、又はＨａＦＡＲ二重コピー株と比較した際にわずかな増加を示した。対照的に、ＨａＦＡＲ（Ｓ４１８Ａ）及びＨａＦＡＲ（Ｓ１９５Ａ）の発現は、Ｚ１１－１６ＯＨ力価のはっきりとした増加をもたらした。

【０７０４】

[0825] 全体的に、これらの結果は、残基１９５及び４１８が、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）におけるＨａＦＡＲ活性を増加させるのに重要であることを示唆している。アラニンへのそれらの置換は、リン酸化を阻害することができ；従って、脱リン酸化機構は、それらの活性の向上に必要とされなかった。他の説明の中でも特に、セリンからアラニンへの突然変異の活性化効果は、改善されたタンパク質折り畳み、増加した安定性又はより高いタンパク質発現に起因し得る。

【０７０５】

[0826] 更に、増加したＺ１１－１６ＯＨ生成がＺ１１－１６Ａｃｉｄ欠失をもたらしたかどうかを決定するために、いくつかの脂肪酸種を定量化した。いくつかの試料についての標準偏差は非常に高かった（図４６）。全ての試料において、飽和及びＺ１１－１６Ａｃｉｄを検出した。それぞれの生成物中間体Ｚ１１－１６Ａｃｉｄの定量化は、ＨａＦ

ＡＲ　Ｓ１９５Ａ及びＨａＦＡＲ　Ｓ４１８Ａを発現する突然変異体株ＳＰＶ９１０及びＳＰＶ９１４についての消費を増加させた。

【０７０６】

［0827］親株への追加のＨａＦＡＲの染色体統合は、振盪フラスコ実験においてＺ１１－１６ＯＨ力価を約２０ｍｇ／Ｌから４０ｍｇ／Ｌに増加させた。

【０７０７】

［0828］ＨａＦＡＲ（Ｓｅｒ１９５Ａｌａ）又はＨａＦＡＲ（Ｓｅｒ４１８Ａｌａ）を導入した場合、Ｚ１１－１６ＯＨ力価は、それぞれ振盪フラスコ実験において約４０ｍｇ／Ｌから約１２０ｍｇ／Ｌ又は約８０ｍｇ／Ｌに増加した。

【０７０８】

［0829］ＨａＦＡＲ（Ｓｅｒ１９５Ａｌａ）を有する突然変異体株ＳＰＶ９１０及びＨａＦＡＲ（Ｓｅｒ４１８Ａｌａ）を有するＳＰＶ９１４についての経路中間体Ｚ１１－１６Ａｃｉｄは、親株ＳＰＶ６０３より少ない約１００ｍｇ／Ｌで蓄積された。

【０７０９】

［0830］結論

［0831］Ｚ１１－１６ＯＨ生成株への別のオオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ遺伝子の追加は、力価をわずかに増加させた。しかしながら、突然変異ＦＡＲの導入は、Ｚ１１－１６ＯＨを最大で約７倍、有意に改善した。これは、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）がＦＡＲ酵素をリン酸化すること及びＦＡＲ脱リン酸化がその全活性の障壁であることを示唆している。ＨａＦＡＲにおけるデザインされた突然変異は、Ｚ１１－１６ＡｃｉｄをＺ１１－１６ＯＨに変換する脱リン酸化のためのその必要条件を緩和し得る。デザインされた突然変異が脱リン酸化依存性機構によってＦＡＲ活性を改善したことも可能である。振盪フラスコ実験は、バイオマス、時間及び脂肪アルコール力価の間の直接の相関を示唆している。

【０７１０】

［0832］第二世代株は、例えば、脂質貯蔵経路（例えばジアシルグリセロールアセチルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）遺伝子欠失）をなくし、及び／又は副生成物（ヒドロキシ酸、二酸）経路をなくすことにより、Ｚ１１－１６ＯＨの更なる改良のために生成される。

【０７１１】

［0833］材料及び方法

［0834］ＳＰＶ６０３のマーカーレスキュー

［0835］３０ｍＬのＣＭ－ウラシルに、２５０ｍＬのバッフル付き振盪フラスコにおいてＳＰＶ６０３を接種した。培養物を卓上シェーカーにおいて２５０～３００ｒｐｍ及び２８℃でインキュベートした。翌朝、培養物のＯＤ６００を測定した。細胞をＯＤ６００：０．６で採取した。細胞をファルコンチューブ（８００×ｇ、５ｍｉｎ）においてペレット化した。上清を除去し、１／２の体積（１５ｍＬ）の、Zymoキットからの溶液１で洗浄した。細胞を再度ペレット化し（８００×ｇ、５ｍｉｎ）、２００μｌの溶液２に再懸濁した。５０μｌのアリコートを１．７ｍＬのエッペンドルフ試験管中で直接使用した。残りのアリコートを－８０℃で貯蔵した。１０μｌのＤＮＡ（１～２μｇ）を加え、細胞と穏やかに混合した。５００μｌの溶液３を加え、穏やかに混合した。形質転換混合物を２８℃のプレートインキュベータにおいて３時間以下にわたってインキュベートし、それをその後２ｍＬの脱イオン水で洗浄した（オートクレーブ）。回収を２８℃で２ｍＬのＹＰＤにおいて一晩行った。形質転換混合物を選択プレートにおいて直接プレーティングした。クローンを採取し、ＵＲＡ－ＦＯＡ０．１％及びＹＰＤプレート上で再パッチした。ＵＲＡ除去を、標準的なＰＣＲプロトコルを用いて確認した。

【０７１２】

［0836］ＨａＦＡＲ統合カセットの構築

［0837］ＨａＦＡＲライブラリを、ヒトコドン（Genscript）を用いて特別に合成し、ＡＸＰ遺伝子座においてＴＥＦプロモーター及びＸＰＲ２ターミネーター下での発現のた

めに制限部位ＳｐｅＩ及びＮｏｔＩを用いて、プラスミドｐＰＶ２３４にサブクローニングした。線状化コンストラクトを、オオタバコガ（H. armigera）ＦＡＲ（配列番号４１）と組み合わされたアメリカタバコガ（H. zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（配列番号５４）を発現する株Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）H222ΔPΔAΔF SPV603に形質転換した。変異体ＦＡＲのアミノ酸配列が配列番号４２～４８に示される。変異体ＦＡＲのヌクレオチド配列が配列番号８３～８９に示される。

【０７１３】

［0838］ ２４ウェルプレート中でのＨａＦＡＲ突然変異体ライブラリの培養

［0839］ 第１の段階において、各形質転換からの４つの個々の分離株を試験した。培養を２４ウェルプレートにおいて行った。２ｍＬのＹＰＤを個々のクローンのパッチから接種し、２８℃、１０００ｒｐｍで２４時間インキュベートした。２４時間後、ＯＤ６００を測定し、細胞を１０００ｒｐｍで遠心分離した。細胞ペレットを１ｍＬのＳ２培地に再懸濁し、１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。細胞を２８℃、１０００ｒｐｍで２４時間インキュベートした。培養物を分析されるまで－２０℃で貯蔵した。次に、最良の性能の陽性組込み体の４つのクローンを試験した。培養を２４ウェルプレートにおいて行った。２ｍＬのＹＰＤを個々のクローンのパッチから接種し、２８℃、１０００ｒｐｍで約２８時間インキュベートした。２８時間後、ＯＤ６００を測定し、細胞を１０００ｒｐｍで遠心分離した。細胞ペレットを１ｍＬのＳ２培地に再懸濁し、１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。細胞を２８℃、１０００ｒｐｍで１８時間インキュベートした。培養物を分析されるまで－２０℃で貯蔵した。

【０７１４】

［0840］ 振盪フラスコにおけるＨａＦＡＲ突然変異体ライブラリの培養

［0841］ 振盪フラスコ実験１：振盪フラスコ培養中の脂肪アルコール及び脂肪酸力価の時間経過分析

［0842］ 第１の段階において、それぞれの株の振盪フラスコ実験を、経時的な脂肪アルコール及び脂肪酸形成を分析するために行った。ＨａＦＡＲ、ＨａＦＡＲ　Ｓ１９５Ａ及びＨａＦＡＲ　Ｓ４１８Ａを発現する株の最良の性能のクローンを試験した。１０ｍＬのＹＰＤを個々のクローンのパッチから接種し、１２５ｍＬの振盪フラスコにおいて、２８℃、２５０ｒｐｍで２４時間インキュベートした。次に、２５ｍＬのＹＰＤに、５００ｍＬの振盪フラスコにおいて５ｍＬの出発培養物を接種し、２８℃、２５０ｒｐｍで２４時間インキュベートした。細胞を採取し、ペレットを１５ｍＬのＳ２培地に再懸濁し、１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。ＯＤ６００を測定し、その後、パルミチン酸メチルを加えた。細胞を２８℃、１０００ｒｐｍで７２時間インキュベートした。４×０．５ｍＬの試料を２４時間ごとに取り、既に確立された標準的なプロトコルに従って、分析されるまで－２０℃で貯蔵した（図４７及び図４８）。試料採取を改善し、標準偏差を減少させるために、試料をＧＣクリンプバイアルに直接移し、分析されるまで貯蔵した。

【０７１５】

［0843］ 株のＯＤ６００は、ＳＰＶ９１０－１０．２、ＳＰＶ９１４－１１．５及びＳＰＶ９１６－１２．３であった。

【０７１６】

［0844］ 振盪フラスコ実験２：生物変換に対する増加したバイオマスの影響

［0845］ 時間経過実験は、経時的な脂肪アルコールの減少を示した。従って、試料採取を２０時間に減少させた。以前の２４ウェルプレート生物変換実験において、測定されたバイオマスは、振盪フラスコ実験と比較して約２倍高かった。次に、それぞれの株の振盪フラスコ実験を、脂肪アルコール力価に対するバイオマスの影響を分析するために行った。全インキュベーション時間が減少され、バイオマスが生物変換段階中に増加された。ＨａＦＡＲ　Ｓ１９５Ａ及びＨａＦＡＲ　Ｓ４１８Ａを発現する株の最良の性能のクローンを試験した。２０ｍＬのＹＰＤを個々のクローンのパッチから接種し、５００ｍＬの振盪フラスコにおいて２８℃、２５０ｒｐｍで２８時間インキュベートした。細胞を採取し、ペレットを１０ｍＬのＳ２培地に再懸濁し、且つ１０ｇ／Ｌ、ＯＤ６００を測定し、その後

、パルミチン酸メチルを加えた。細胞を２８℃、１０００ｒｐｍで２０時間インキュベートした。４×０．５ｍＬの試料を取り、既に確立された標準的なプロトコルに従って分析した（図４９）。

【０７１７】

［0846］株のＯＤ６００は、ＳＰＶ９１０－２４．９及びＳＰＶ９１４－２４．７であった。

【０７１８】

［0847］代謝産物抽出

［0848］細胞ペレットを５００μＬの５％のＮａＯＨ（メタノール中）で再懸濁し、８５℃で１時間加熱した。試料を冷却し、次に、４００μＬの５ＮのＨＣｌを加えることによって酸性化した。次に、５００μＬのクロロホルム（１ｍＭのＣ１７：０ヘプタデカノエート内部標準を含有する）を試料に加えた。試料を激しく混合し、次に、卓上遠心分離機を用いて１３，０００ＲＰＭで２分間にわたって沈降させた。４５０μＬのクロロホルムを新しいバイアルに移し、次に、８５℃で約１５分間蒸発させた。次に、試料を５０μＬのＢＳＴＦＡに再懸濁した（この時点でＧＣ分析の準備が整った）。脂肪アルコールの分析の後、試料を約１：１０に希釈し、ＧＣ上で再度泳動させて、脂肪酸ピークのピーク分離を改善した。

【０７１９】

［0849］定量化

［0850］全ての定量化を内部標準の濃度に基づいて行った。内部標準Ｃ１７Ｍの濃度は、１ｍＭである。脂肪アルコール並びに脂肪酸の最終濃度を、内部標準と比較した有効炭素数に基づいて計算した。

【０７２０】

実施例１２：脂質貯蔵経路をなくすように改変された第二世代株を用いた、又は追加の変異体脂肪アルコール形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼ（ＦＡＲ）を用いた、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）における脂肪アルコール及び脂肪酸の生成

［0851］ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される内因性ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ欠失の影響を試験した。各ｄｇａ遺伝子が株ＳＰＶ７３５において個々に欠失していた（ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）。続いて、標準的な手順に従って、各欠失株ＳＰＶ９５７（Δdga1、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）及びＳＰＶ９５９（Δdga2ΔURA、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）における個々の選択マーカーを行った。得られた株ＳＰＶ１０５３（Δdga1 ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）及びＳＰＶ１０５４（Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）を用いて、ＨａＦＡＲ及びＨａＦＡＲＳ１９５Ａを形質転換した。株ＳＰＶ６０３と比較した脂肪アルコールの形成を振盪フラスコにおいて試験した（図５０及び図５１）。経時的な振盪フラスコにおける結果は、各個々のｄｇａ遺伝子の欠失が脂肪アルコール形成を改善し、脂肪酸貯蔵を減少させることを示唆している。

【０７２１】

［0852］振盪フラスコ培養中の脂肪アルコール及び脂肪酸力価の時間経過分析

［0853］酵素ＨＡＦＡＲ（配列番号４１）又はＨａＳ１９５Ａ（配列番号４３）のコピーを株ＳＰＶ１０５３（Δdga1 ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）及びＳＰＶ１０５４（Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入し、これらは、それぞれアメリカタバコガ（H. zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（配列番号５４）を発現し、ＤＧＡ１又はＤＧＡ２ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼのいずれかを欠失している。

【０７２２】

［0854］培養を振盪フラスコ中での生物学的なトリプリケートとして行った。各株の出発培養物を２５０ｒｐｍ、２８℃で２８時間にわたって２５０ｍＬの振盪フラスコにおい

て５０ｍＬのＹＰＤ中で成長させた。細胞を室温で５分間にわたる８００ｇにおける遠心分離によって採取し、３０ｍＬのＳ２培地に再懸濁した。細胞懸濁液をＯＤ６００：約８に対して正規化した。各出発培養物を３つの個々の１２５ｍＬの振盪フラスコに分割した。１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。培養物を７２時間インキュベートした。試料採取を２４時間ごとに行い、各振盪フラスコのＯＤ６００を測定した。図５０及び図５１は、それぞれ時間経過実験についての脂肪アルコール力価及び脂肪酸力価を示す。

【０７２３】

[0855] 培養試料の抽出。０．５ｍＬの各試料を直接クリンプバイアル中に採取した。クリンプバイアルを８００ｇで５分間遠心分離した。上清を除去し、試料を密閉し、分析されるまで－２０℃で貯蔵した。試料を、５％のＫＯＨを含有する５００μＬのメタノールに再懸濁し、６５℃～８５℃で６０分間インキュベートした。冷却工程の後、２００μＬの５ＮのＨＣＬを各クリンプバイアルに加えた。１ｍＭのＣ１７Ｍｅを含有する６００μＬのクロロホルムを加え、再度密閉した。試料を混合し、遠心分離した。５００ｕＬのクロロホルムを新しいＧＣバイアルに移し、８５℃で３０分間にわたって完全に乾燥させた。試料を１００ｕＬのＢＳＴＦＡに再懸濁し、室温で１時間インキュベートした。試料を、ガスクロマトグラフィーを用いて、標準的なプロトコルに従って分析した。

【０７２４】

[0856] ２４ウェルプレート中での新たな株の脂肪アルコール形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼライブラリスクリーニング

[0857] 表２４からの各それぞれのＦＡＲ酵素の単一のコピーを、アメリカタバコガ（H. zea）Ｚ１１デサチュラーゼ（配列番号５４）を発現し、且つＤＧＡ２ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼを欠失した株ＳＰＶ１０５４（Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP）中に導入した。

【０７２５】

[0858] 培養を２４ウェルプレート中での生物学的なクアドルプリケートとして行った。２ｍＬのＹＰＤを各個々の形質転換細胞のパッチから接種した。２４ウェルプレートを２５０ｒｐｍ、２８℃で２８時間インキュベートした。細胞を室温で５分間にわたる８００ｇにおける遠心分離によって採取した。細胞を１ｍＬのＳ２＋６０ｇ／Ｌのグリセロールに再懸濁し、１０ｇ／Ｌのパルミチン酸メチルを加えた。細胞を１０００ｒｐｍ、２８℃で９６時間インキュベートした。図５２及び図５３は、それぞれ２４ウェルプレートスクリーニング実験についての脂肪アルコール力価及び脂肪酸力価を示す。

【０７２６】

[0859] 培養試料の抽出。０．５ｍＬの各試料を直接クリンプバイアル中に採取した。クリンプバイアルを８００ｇで５分間遠心分離した。上清を除去し、試料を密閉し、分析されるまで－２０℃で貯蔵した。試料を、５％のＫＯＨを含有する５００μＬのメタノールに再懸濁し、６５℃～８５℃で６０分間インキュベートした。冷却工程の後、２００μＬの５ＮのＨＣＬを各クリンプバイアルに加えた。１ｍＭのＣ１７Ｍｅを含有する６００μＬのクロロホルムを加え、再度密閉した。試料を混合し、遠心分離した。５００ｕＬのクロロホルムを新しいＧＣバイアルに移し、８５℃で３０分間にわたって完全に乾燥させた。試料を１００ｕＬのＢＳＴＦＡに再懸濁し、室温で１時間インキュベートした。試料を、ガスクロマトグラフィーを用いて、標準的なプロトコルに従って分析した。

【０７２７】

【表２４】

表 24. 新たなFAR 酵素ライブラリ

生物	酵素 ID	Gen ID
カブラヤガ(Agrotis segetum)	FAR027	AID66655.1
ミドリムシ(Euglena gracilis)	FAR028	GU733919
ユウグモノメイガ(Ostrinia palustralis)	FAR029	M1QSS3
ウスジロキノメイガ(Ostrinia latipennis)	FAR030	M1RG73
ヨーロッパアワノメイガ(Ostrinia nubilalis)	FAR031	FJ807735
ヨーロッパアワノメイガ(Ostrinia nubilalis)	FAR032	FJ807736
オストリニア・ジアリス(Ostrinia zealis)	FAR033	M1QSS9
サクラスガ(Yponomeuta evonymellus)	FAR034	GQ907232
イポノメウタ・パデルス(Yponomeuta padellus)	FAR035	GQ907235
イポノメウタ・ロレルス(Yponomeuta rorrellus)	FAR036	GQ907234
メンフクロウ(Tyto alba)	FAR037	JN638549
アズキノメイガ(Ostrinia scapulalis)	FAR038	EU817405
シロイチモジヨトウ(Spodoptera exigua)	FAR039	KR781121.1
エジプトヨトウ(Spodoptera littoralis)	FAR040	KR781120
ニセアメリカタバコガ(H. virescens)	FAR041	EZ407233
H. サブフレクサ(H. subflexa)	FAR042	AFD04726.1
オオタバコガ(H. amigera)	FAR043	AKD01773.1
H. アサウルタ(H. assaulta)	FAR044	AFD04727.1

【０７２８】

［0860］ 追加のＦＡＲ変異体及び追加の細菌ＦＡＲ酵素がそれぞれ表２５及び表２６に列挙される。これらのＦＡＲ酵素は、脂肪アルコール及び脂肪酸生成について上述されるように試験される。

【０７２９】

【表２５】

表 25. リン酸化点突然変異体を含む新たな FAR 酵素ライブラリ

アミノ酸突然変異	酵素ID
HaFAR S12A	pFAR055
SlFAR S10A	pFAR056
SlFAR S13A	pFAR057
SlFAR S61A	pFAR058
SlFAR S104A	pFAR059
SlFAR S310A	pFAR060
SlFAR S314A	pFAR061
SlFAR S419A	pFAR062

【０７３０】
【表２６】

表 26. 追加の細菌 FAR 酵素ライブラリ

生物	Gen ID
スポンギバクター・トロピクス (Spongiibacter tropicus)	WP_022959477.1
オレイフィラス属(Oleiphilus sp.)HI0086	KZY30886.1
マリノバクター・リポリティクス (Marinobacter lipolyticus)	WP_012138772.1
マリノバクター・アンタークティクス (Marinobacter antarcticus)	WP_072799080.1

【０７３１】
配列表

【表２７－１】

配列番号１	Agrotis segetum FAR_*S. cerevisiae* コドン最適化 ATGCCAGTTTTGACTTCTAGAGAAGATGAAAAGTTGTCAGTTCCAGAATTTTACGCTGGTA AATCTATCTTCGTTACAGGTGGTACTGGTTTCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTT GTACTGTTGTCCAGATATTGATAAAATCTATATGTTAATTAGAGAAAAGAAAAATTTGTCT ATTGATGAAAGAATGTCAAAGTTCTTGGATGATCCATTATTTTCTAGATTGAAGGAAGAAA GACCTGGTGACTTGGAAAAGATTGTTTTGATTCCAGGTGACATTACAGCTCCAAATTTGGG TTTATCAGCAGAAAACGAAAGAATTTTGTTAGAAAAAGTTTCTGTTATTATTAATTCAGCT GCAACTGTTAAGTTTAATGAACCATTGCCAATCGCTTGGAAGATTAATGTTGAAGGTACAA GAATGTTGTTGGCATTGTCTAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTTTATTCATATTTCTAC TGCTTACTCAAATGCATCTTCAGATAGAATCGTTGTTGATGAAATCTTGTATCCAGCTCCA GCAGATATGGATCAAGTTTACCAATTGGTTAAAGATGGTGTTACAGAAGAAGAAACTGAAA GATTGTTGAACGGTTTGCCAAACACTTACACTTTTACTAAGGCTTTGACAGAACATTTGGT TGCAGAACATCAAACATACGTTCCAACTATCATCATCAGACCATCTGTTGTTGCTTCAATT AAAGATGAACCAATCAGAGGTTGGTTATGTAATTGGTTTGGTGCTACAGGTATCTCTGTTT TTACTGCAAAGGGTTTGAACAGAGTTTTGTTGGGTAAAGCTTCAAACATCGTTGATGTTAT CCCAGTTGATTACGTTGCAAATTTGGTTATTGTTGCTGGTGCAAAATCTGGTGGTCAAAAA TCAGATGAATTAAAGATCTATAACTGTTGTTCTTCAGATTGTAACCCAGTTACTTTGAAGA AAATTATTAAAGAGTTTACTGAAGATACTATTAAAAATAAGTCTCATATTATGCCATTGCC AGGTTGGTTCGTTTTTACTAAGTACAAGTGGTTGTTGACATTGTTAACTATTATTTTTCAA ATGTTACCAATGTATTTGGCTGATGTTTACAGAGTTTTGACAGGTAAAATCCCAAGATACA TGAAGTTGCATCATTTGGTTATTCAAACAAGATTGGGTATCGATTTCTTTACTTCTCATTC ATGGGTTATGAAGACAGATAGAGTTAGAGAATTATTCGGTTCTTTGTCATTGGCAGAAAAG CATATGTTTCCATGTGATCCATCTTCAATCGATTGGACAGATTATTTGCAATCATACTGTT ACGGTGTTAGAAGATTTTTGGAAAAGAAGAAATAA
配列番号２	Spodoptera littoralis FAR1_*S. cerevisiae* コドン最適化 ATGGTTGTTTTGACTTCAAAGGAAAAATCAAACATGTCTGTTGCTGATTTCTACGCTGGTA AATCTGTTTTTATTACAGGTGGTACTGGTTTCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTT GTACTCATGTCCAGATATTGATAAAATCTATATGTTGATCAGAGAAAAGAAAGGTCAATCT ATCAGAGAAAGATTAACTAAAATTGTTGATGATCCATTGTTTAATAGATTGAAGGATAAGA GACCAGATGATTTGGGTAAAATCGTTTTGATCCCAGGTGACATCACAGTTCCAGGTTTGGG TATTTCTGAAGAAAACGAAACAATCTTGACTGAAAAAGTTTCAGTTGTTATTCATTCTGCT GCAACTGTTAAGTTTAATGAACCATTGGCTACTGCATGGAACGTTAACGTTGAAGGTACAA GAATGATCATGGCATTATCAAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTTTATTCATATTTCTAC TGCTTACACTAACACAAACAGAGCAGTTATTGATGAAGTTTTGTATCCACCACCAGCTGAT ATCAACGATGTTCATCAACATGTTAAAAATGGTGTTACAGAAGAAGAAACTGAAAAGATTT TGAACGGTAGACCAAACACTTACACTTTTACTAAGGCTTTGACTGAACATTTGGTTGCAGA AAACCAATCATACATGCCAACAATCATTGTTAGACCATCTATTGTTGGTGCTATTAAAGAT GATCCAATTAGAGGTTGGTTGGCTAATTGGTATGGTGCAACAGGTTTGTCAGTTTTTACTG CAAAGGGTTTGAACAGAGTTATATATGGTCATTCTAACCATGTTGTTGATTTGATTCCAGT TGATTACGTTGCTAATTTGGTTATTGTTGCTGGTGCAAAGACATACCATTCAAACGAAGTT ACTATCTATAACTCTTGTTCTTCATCTTGTAACCCAATCACTATGAAGAGATTGGTTGGTT TGTTTATTGATTACACAGTTAAGCATAAGTCATACGTTATGCCATTGCCAGGTTGGTATGT TTACTCTAACTACAAGTGGTTGGTTTTCTTGGTTACTGTTATTTTCCAAGTTATTCCAGCT TACTTAGGTGACATTGGTAGAAGATTGTTAGGTAAAAATCCAAGATACTACAAGTTGCAAA ATTTGGTTGCTCAAACACAAGAAGCAGTTCATTTCTTTACATCACATACTTGGGAAATTAA ATCAAAGAGAACTTCTGAATTGTTTTCATCTTTGTCTTTGACAGATCAAAGAATGTTTCCA TGTGATGCTAACAGAATCGATTGGACAGATTACATCACTGATTACTGTTCTGGTGTTAGAC AATTTTTGGAAAAGATTAAATAA

【表２７－２】

配列番号 3	Helicoverpa armigera FAR3_*S. cerevisiae* コドン最適化 ATGGTTGTTTTGACTTCAAAGGAAACAAAGCCATCTGTTGCTGAATTTTACGCTGGTAAAT CAGTTTTTATTACAGGTGTACTGGTTTCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTTGTAC TCTTGTCCAGATATTGAAAATATCTATATGTTGATCAGAGAAAAGAAAGGTTTGTCAGTTT CTGAAAGAATTAAACAATTTTTAGATGATCCATTGTTTACAAGATTGAAGGATAAGAGACC AGCTGATTTGGAAAAGATTGTTTTGATCCCAGGTGACATCACTGCACCAGATTTGGGTATT AATTCTGAAAACGAAAAGATGTTGATTGAAAAAGTTTCAGTTATTATTCATTCTGCTGCAA CTGTTAAGTTTAATGAACCATTACCAACAGCTTGGAAGATTAATGTTGAAGGTACTAGAAT GATGTTGGCATTGTCAAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTTTATTCATATTTCTACAGCT TACACTAACACAAACAGAGAAGTTGTTGATGAAATCTTGTATCCAGCTCCAGCAGATATCG ATCAAGTTCATCAATACGTTAAGGATGGTATCTCAGAAGAAGATACTGAAAAGATTTTGAA CGGTAGACCAAACACTTACACTTTTACTAAGGCTTTGACAGAACATTTGGTTGCTGAAAAT CAAGCATACGTTCCAACTATTATTGTTAGACCATCTGTTGTTGCTGCAATTAAAGATGAAC CATTGAAAGGTTGGTTGGGTAATTGGTTTGGTGCTACAGGTTTGACTGTTTTTACAGCAAA GGGTTTGAACAGAGTTATATATGGTCATTCTTCATACATCGTTGATTTGATCCCAGTTGAT TACGTTGCTAATTTGGTTATTGCTGCAGGTGCAAAATCTTCAAAGTCAACAGAATTGAAGG TTTACAACTGTTGTTCTTCATCTTGTAACCCAGTTACTATCGGTACATTGATGTCAATGTT CGCTGATGATGCAATTAAACAAAAATCTTACGCTATGCCATTGCCAGGTTGGTACATTTTT ACAAAGTACAAGTGGTTGGTTTTGTTGTTGACATTTTTGTTCCAAGTTATTCCAGCATACG TTACTGATTTGTCAAGACATTTGATCGGTAAATCTCCAAGATACATCAAGTTGCAATCATT GGTTAACCAAACTAGATCATCTATCGATTTCTTTACAAACCATTCTTGGGTTATGAAAGCT GATAGAGTTAGAGAATTGTACGCTTCATTGTCTCCAGCTGATAAGTACTTATTCCCATGTG ATCCAACTGATATCAACTGGACACATTACATCCAAGATTACTGTTGGGGTGTTAGACATTT CTTGGAAAAGAAATCTTACGAATAA
配列番号 4	pOLE1 カセット CTTGCTGAAAAGATGATGTTCTGAGGTATTCGTATCGCTAGCTTGATACGCTTTTAACAAA AGTAAGCTTTTCGTTTGCAGGTTTGGTTACTTTTCTGTACGAGATGATATCGCTAAGTTTA TAGTCATCTGTGAAATTTCTCAAAAACCTCATGGTTTCTCCATCACCCATTTTTCATTTCA TTTGCCGGGCGGAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATGACACATGGAAA TAAGTCAAGGATTAGCGGATATGTAGTTCCAGTCCGGGTTATACCATCACGTGATAATAAA TCCAAATGAGAATGAGGGTGTCATATCTAATCATTATGCACGTCAAGATTCTCCGTGACTA TGGCTCTTTTCTGAAGCATTTTTCGGGCGCCCGGTGGCCAAAAACTAACTCCGAGCCCGGG CATGTCCCGGGGTTAGCGGGCCCAACAAAGGCGCTTATCTGGTGGGCTTCCGTAGAAGAAA AAAAGCTGTTGAGCGAGCTATTTCGGGTATCCCAGCCTTCTCTGCAGACCGCCCCAGTTGG CTTGGCTCTGGTGCTGTTCGTTAGCATCACATCGCCTGTGACAGGCAGAGGTAATAACGGC TTAAGGTTCTCTTCGCATAGTCGGCAGCTTTCTTTCGGACGTTGAACACTCAACAAACCTT ATCTAGTGCCCAACCAGGTGTGCTTCTACGAGTCTTGCTCACTCAGACACACCTATCCCTA TTGTTACGGCTATGGGGATGGCACACAAAGGTGGAAATAATAGTAGTTAACAATATATGCA GCAAATCATCGGCTCCTGGCTCATCGAGTCTTGCAAATCAGCATATACATATATATATGGG GGCAGATCTTGATTCATTTATTGTTCTATTTCCATCTTTCCTACTTCTGTTTCCGTTTATA TTTTGTATTACGTAGAATAGAACATCATAGTAATAGATAGTTGTGGTGATCATATTATAAA CAGCACTAAAACATTACAACAAAGAATGCCAACTTCTGGAACTACTATTGAATTGATTGAC GACCAATTTCCAAAGGATGACTCTGCCAGCAGTGGCATTGTCGACACTAGTGCGGCCGCTC ACATATGAAAGTATATACCCGCTTTTGTACACTATGTAGCTATAATTCAATCGTATTATTG TAGCTCCGCACGACCATGCCTTAGAAATATCCGCAGCGCG

【表２７－３】

配列番号 5	拡張 OLE1 プロモーター領域 CTTGCTGAAAAGATGATGTTCTGAGGTATTCGTATCGCTAGCTTGATACGCTTTTAACAAA AGTAAGCTTTTCGTTTGCAGGTTTGGTTACTTTTCTGTACGAGATGATATCGCTAAGTTTA TAGTCATCTGTGAAATTTCTCAAAAACCTCATGGTTTCTCCATCACCCATTTTTCATTTCA TTTGCCGGGCGGAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATGACACATGGAAA TAAGTCAAGGATTAGCGGATATGTAGTTCCAGTCCGGGTTATACCATCACGTGATAATAAA TCCAAATGAGAATGAGGGTGTCATATCTAATCATTATGCACGTCAAGATTCTCCGTGACTA TGGCTCTTTTCTGAAGCATTTTTCGGGCGCCCGGTGGCCAAAAACTAACTCCGAGCCCGGG CATGTCCCGGGGTTAGCGGGCCCAACAAAGGCGCTTATCTGGTGGGCTTCCGTAGAAGAAA AAAAGCTGTTGAGCGAGCTATTTCGGGTATCCCAGCCTTCTCTGCAGACCGCCCCAGTTGG CTTGGCTCTGGTGCTGTTCGTTAGCATCACATCGCCTGTGACAGGCAGAGGTAATAACGGC TTAAGGTTCTCTTCGCATAGTCGGCAGCTTTCTTTCGGACGTTGA
配列番号 6	OLE1 プロモーター領域 ACACTCAACAAACCTTATCTAGTGCCCAACCAGGTGTGCTTCTACGAGTCTTGCTCACTCA GACACACCTATCCCTATTGTTACGGCTATGGGGATGGCACACAAAGGTGGAAATAATAGTA GTTAACAATATATGCAGCAAATCATCGGCTCCTGGCTCATCGAGTCTTGCAAATCAGCATA TACATATATATATGGGGGCAGATCTTGATTCATTTATTGTTCTATTTCCATCTTTCCTACT TCTGTTTCCGTTTATATTTTGTATTACGTAGAATAGAACATCATAGTAATAGATAGTTGTG GTGATCATATTATAAACAGCACTAAAACATTACAACAAAGA
配列番号 7	OLE1 27aa リーダー ATGCCAACTTCTGGAACTACTATTGAATTGATTGACGACCAATTTCCAAAGGATGACTCTG CCAGCAGTGGCATTGTCGAC
配列番号 8	Vsp13 ターミネーター領域 TCACATATGAAAGTATATACCCGCTTTTGTACACTATGTAGCTATAATTCAATCGTATTAT TGTAGCTCCGCACGACCATGCCTTAGAAATATCCGCAGCGCG
配列番号 9	*T. ni* デサチュラーゼ ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTGTTGGAAGAGGAAGCTCGCA CAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAGACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTT TCTTACATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTGTGCTTCACCTCT GCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGTACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCA CCGCAGGGGCTCACCGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGGAAAT TGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACACGGCTATTACATGGGCTAGAGAA CATCGGCTACATCACAAATACAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGT TCTTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCGATGTCCTGAAATATGG AAAAACTATAGACATGTCGGATGTATACAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTAC GCAGTACCCTTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTGCCAACTTTGATTCCAGTCTACTGTT GGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCCTTATTTCGATACATATTCAATCTTAA CGTGACTTTCCTAGTCAACAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAGC ATCTTGCCCGCTCAAAACCTGCTGGTTTCCTTCCTAGCAAGTGGAGAAGGCTTCCATAATT ACCATCACGTCTTTCCATGGGATTACCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCCTGAATTT GACGACGCTGTTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTA TCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAACGAACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTT GGGGATGGGACGACAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATTTTTTATGC TAAAAAGGAATGA

【表２７－４】

配列番号 10	*A. segetum* デサチュラーゼ ATGGCTCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGAGGAGCCGTCATTGACTTTCG TGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGTATCAAATCGTGTACCCAAACCTTATCACATTTGGGTA CTGGCATATAGCTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTACTTCGGCAAAATGGCAAACA ATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGCAGAGTTGGGAATAACAGCCGGCGCTCACA GGTTATGGGCCCACAAAACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTACAAATTATCCTGATGATACT GAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGGTGAGGGACCACCGTCTCCATCAT AAGTACAGTGACACTGATGCAGACCCTCACAATGCTACTCGTGGTTTCTTCTATTCTCATG TTGGATGGTTGCTCGTAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAGACGTGGAAAGGAACTTGACAT GTCTGATATTTACAACAATCCAGTGCTGAGATTTCAAAAGAAGTATGCTATACCCTTCATC GGGGCAATGTGCTTCGGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTACTTCTGGGGAGAAACCTGGA GTAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGGTACATCCTCAACCTAAACATTACTTTCCTGGT CAACAGTGCTGCTCATATCTGGGGATACAAACCTTATGACATCAAAATATTGCCTGCCCAA AATATAGCAGTTTCCATAGTAACCGGCGGCGAAGTTTCCATAACTACCACCACGTTTTTTC CTTGGGATTATCGTGCAGCAGAATTGGGGAACAATTATCTTAATTTGACGACTAAGTTCAT AGATTTCTTCGCTTGGATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGACGGTGTCCAGTGATGTTATA AAAAGTAAGGCGGAAAGAACTGGTGATGGGACGAATCTTTGGGGTTTAGAAGACAAAGGTG AAG AAGATTTTTTGAAAATCTGGAAAGACAATTAA
配列番号 11	*T. pseudonana* デサチュラーゼ ACTAGTATGGACTTTCTCTCCGGCGATCCTTTCCGGACACTCGTCCTTGCAGCACTTGTTG TCATCGGATTTGCTGCGGCGTGGCAATGCTTCTACCCGCCGAGCATCGTCGGCAAGCCTCG TACATTAAGCAATGGTAAACTCAATACCAGAATCCATGGCAAATTGTACGACCTCTCATCG TTTCAGCATCCAGGAGGCCCCGTGGCTCTTTCTCTTGTTCAAGGTCGCGACGGAACAGCTC TATTTGAGTCACACCATCCCTTCATACCTCGAAAGAATCTACTTCAGATCCTCTCCAAGTA CGAGGTTCCGTCGACTGAAGACTCTGTTTCCTTCATCGCCACCCTAGACGAACTCAATGGT GAATCTCCGTACGATTGGAAGGACATTGAAAATGATGATTTCGTATCTGACCTACGAGCTC TCGTAATTGAGCACTTTTCTCCTCTCGCCAAGGAAAGGGGAGTTTCACTCGTTGAGTCGTC GAAGGCAACACCTCAGCGGTGGATGGTGGTTCTACTGCTCCTTGCGTCGTTCTTCCTCAGC ATCCCATTATATTTGAGTGGTTCGTGGACTTTCGTTGTCGTCACTCCCATCCTCGCTTGGC TGGCGGTTGTCAATTACTGGCACGATGCTACTCACTTTGCATTGAGCAGCAACTGGATTTT GAATGCTGCGCTCCCATATCTCCTCCCTCTCCTATCGAGTCCGTCAATGTGGTATCATCAT CACGTCATTGGACATCACGCATACACCAACATTTCCAAAAGAGATCCAGATCTTGCTCACG CTCCACAACTCATGAGAGAACACAAGAGTATCAAATGGAGACCATCTCACTTAAATCAAAC ACAGCTTCCGCGGATTCTCTTCATCTGGTCGATTGCAGTCGGTATTGGGTTGAACTTACTG AACGACGTGAGAGCACTAACCAAGCTTTCATACAACAACGTTGTTCGGGTGGAGAAGATGT CATCGTCGCGAACATTACTCCATTTCCTTGGACGTATGTTGCACATCTTTGTGACTACACT TTGGCCCTTTTTGGCGTTTCCGGTGTGGAAGGCCATCGTTTGGGCGACTGTACCGAATGCC ATACTGAGTTTGTGCTTCATGCTGAATACGCAAATCAATCACCTCATCAACACGTGTGCAC ATGCTTCCGATAACAACTTTTACAAGCATCAAGTTGTAACTGCTCAGAACTTTGGCCGATC AAGTGCCTTTTGCTTCATCTTCTCGGGAGGTCTCAACTACCAAATTGAACATCATTTGTTG CCGACGGTGAACCATTGCCATTTGCCAGCTTTGGCCCCGGGTGTAGAGCGTTTGTGTAAGA AACACGGGGTGACATACAACTCTGTTGAAGGATACAGAGAGGCCATCATTGCACACTTTGC ACATACCAAAGATATGTCGACGAAGCCTACTGATTGA

【表２７－５】

配列番号 12	*A. transitella* デサチュラーゼ ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATTCTGAGCCCCAGTTCACTA AACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCCGAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCAC ATTCGGCTATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTACTTGTGCGAAA TGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACGTGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTG GCGCTCATAGGCTATGGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTTGTT ACTCATAATGAACTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCACCTGGGCTCGTGATCACCGC CTTCATCACAAATATTCGGATACTGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCT ATTCACATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAAGCAAGAGGAAAATA CTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATCCATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATT CTAGTTATAGGCACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCTGGGGCG AGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGCGATACGTCATGAATCTTAACATGAC TTTCTTAGTTAACAGTGCAGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGCC TCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAAGGATTCCATAATTACCATC ACACTTACCCCTGGGATTATCGTGCGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTAC TGCTTTCATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTGCCACAA GAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACTGGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAA GATAA
配列番号 13	*H. zea* デサチュラーゼ ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAGAAAGAACTAACACTGCAAC ATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCAGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTT TGGTTACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTTCTGCTAAATGG GCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTGTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCG CTCACAGACTCTGGGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTCTTAAT GGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTGACTGGGTGAGGGACCACCGACTC CACCATAAGTATAGCGATACAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATT CCCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAAAAAGCGAGGGAAAGAACT CAATATGTCCGATATTTACAACAATCCTGTCCTGCGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCC TTCATTGGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTTCTGGGGAGAAA CCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTT TTTGGTAAACAGCGCTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATTACCT GCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGAAGGTTTCCATAATTACCACCATG TCTTCCCCTGGGATTATCGAGCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATCTGACGACTAA ATTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATCTGAAGACGGTTTCGGAGGAT ATGATAAAACAAAGGATTAAACGCACTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAA ACTGTGATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA

【表２７－６】

配列番号 14	mCherry *C. tropicalis* 最適化 ATGGTTTCTAAGGGTGAAGAAGACAACATGGCAATCATCAAGGAATTTATGCGTTTTAAGG TCCATATGGAAGGCTCCGTTAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGAGAAGGTGAGGGTAG ACCATACGAAGGTACTCAAACCGCCAAGTTGAAAGTTACAAAGGGTGGTCCATTGCCATTT GCTTGGGATATCTTGTCCCCACAATTTATGTACGGATCAAAGGCATATGTCAAGCATCCTG CCGACATCCCAGATTACTTGAAGTTATCCTTTCCAGAAGGTTTTAAGTGGGAGAGAGTTAT GAACTTTGAAGATGGCGGAGTTGTTACTGTTACTCAGGACTCTTCCTTGCAAGATGGTGAA TTTATCTATAAAGTGAAATTGAGAGGTACTAACTTTCCATCCGACGGTCCAGTCATGCAAA AGAAGACAATGGGTTGGGAGGCTTCTTCCGAAAGAATGTACCCAGAAGACGGTGCATTGAA AGGTGAAATCAAGCAACGTTTAAAGTTGAAGGACGGTGGTCACTACGATGCCGAGGTCAAG ACCACTTATAAGGCTAAGAAGCCAGTCCAATTGCCAGGTGCTTATAACGTTAACATCAAGT TAGATATTACTTCACACAACGAAGACTACACAATCGTTGAACAATATGAAAGAGCCGAAGG TAGACATTCTACCGGCGGCATGGACGAGTTATATAAGTAG
配列番号 15	CaOLE1-*A. segetum* Z11 デサチュラーゼ ATGACTACAGTTGAACAACTTGAAACTGTTGATATCACTAAATTGAATGCCATTGCTGCTG GTACTAATAAGAAGGTGCCAATGGCTCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGA AGAGCCGTCATTGACTTTCGTGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGTATCAAATCGTGTACCCA AACCTTATCACATTTGGGTACTGGCATATAGCTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTA CTTCGGCAAAATGGCAAACAATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGCAGAGTTGGG AATAACAGCCGGCGCTCACAGGTTATGGGCCCACAAAACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTA CAAATTATCTTAATGATATTAAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGGTGA GGGACCACCGTCTCCATCATAAGTACAGTGACACTGATGCAGACCCTCACAATGCTACTCG TGGTTTCTTCTATTCTCATGTTGGATGGTTGCTCGTAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAGA CGTGGAAAGGAACTTGACATGTCTGATATTTACAACAATCCAGTGTTAAGATTTCAAAAGA AGTATGCTATACCCTTCATCGGGGCAATGTGCTTCGGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTA CTTCTGGGGAGAAACCTGGAGTAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGGTACATCCTCAAC CTAAACATTACTTTCTTAGTCAACAGTGCTGCTCATATCTGGGGATACAAACCTTATGACA TCAAAATATTGCCTGCCCAAAATATAGCAGTTTCCATAGTAACCGGCGGCGAAGTTTCCAT AACTACCACCACGTTTTTTCCTTGGGATTATCGTGCAGCAGAATTGGGGAACAATTATCTT AATTTGACGACTAAGTTCATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGA CGGTGTCCAGTGATGTTATAAAAAGTAAGGCGGAAAGAACTGGTGATGGGACGAATCTTTG GGGTTTAGAAGACAAAGGTGAAGAAGATTTTTTGAAAATCTGGAAAGACAATTAA

【表２７－７】

配列番号 16	*A. segetum* Z11 デサチュラーゼ ATGGCTCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGAAGAGCCGTCATTGACTTTCG TGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGTATCAAATCGTGTACCCAAACCTTATCACATTTGGGTA CTGGCATATAGCTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTACTTCGGCAAAATGGCAAACA ATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGCAGAGTTGGGAATAACAGCCGGCGCTCACA GGTTATGGGCCCACAAAACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTACAAATTATCTTAATGATATT AAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGGTGAGGGACCACCGTCTCCATCAT AAGTACAGTGACACT GATGCAGACCCTCACAATGCTACTCGTGGTTTCTTCTATTCTCATGTTGGATGGTTGCTCG TAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAGACGTGGAAAGGAACTTGACATGTCTGATATTTACAA CAATCCAGTGTTAAGATTTCAAAAGAAGTATGCTATACCCTTCATCGGGGCAATGTGCTTC GGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTACTTCTGGGGAGAAACCTGGAGTAATGCTTGGCATA TCACCATGCTTCGGTACATCCTCAACCTAAACATTACTTTCTTAGTCAACAGTGCTGCTCA TATCTGGGGATACAAACCTTATGACATCAAAATATTGCCTGCCCAAAATATAGCAGTTTCC ATAGTAACCGGCGGCGAAGTTTCCATAACTACCACCACGTTTTTTCCTTGGGATTATCGTG CAGCAGAATTGGGGAACAATTATCTTAATTTGACGACTAAGTTCATAGATTTCTTCGCTTG GATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGACGGTGTCCAGTGATGTTATAAAAAGTAAGGCGGAA AGAACTGGTGATGGGACGAATCTTTGGGGTTTAGAAGACAAAGGTGAAGAAGATTTTTTGA AAATCTGGAAAGACAATTAA
配列番号 17	*A. transitella* Z11 デサチュラーゼ ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATTCTGAGCCCCAGTTCACTA AACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCCGAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCAC ATTCGGCTATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTACTTGTGCGAAA TGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACGTGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTG GCGCTCATAGGCTATGGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTTGTT ACTCATAATGAATTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCACCTGGGCTCGAGATCACCGC CTTCATCACAAATATTCGGATACTGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCT ATTCACATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAAGCAAGAGGAAAATA CTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATCCATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATT CTAGTTATAGGCACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCTGGGGCG AGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGCGATACGTCATGAATCTTAACATGAC TTTCTTAGTTAACAGTGCAGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGCC TCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAAGGATTCCATAATTACCATC ACACTTACCCCTGGGATTATCGTGCGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTAC TGCTTTCATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTGCCACAA GAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACTGGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAA GATAA

【表２７－８】

配列番号 18	*T. ni* Z11 デサチュラーゼ ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTGTTGGAAGAGGAAGCTCGCA CAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAGACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTT TCTTACATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTGTGCTTCACCTCT GCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGTACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCA CCGCAGGGGCTCACCGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGGAAAT TGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACACGGCTATTACATGGGCTAGAGAA CATCGGCTACATCACAAATACAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGT TCTTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCGATGTCTTAAAATATGG AAAAACTATAGACATGTCGGATGTATACAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTAC GCAGTACCCTTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTTCCAACTTTGATTCCAGTCTACTGTT GGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCCTTATTTCGATACATATTCAATCTTAA CGTGACTTTCCTAGTCAACAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAGC ATCTTGCCCGCTCAAAACTTATTAGTTTCCTTCCTAGCAAGTGGAGAAGGCTTCCATAATT ACCATCACGTCTTTCCATGGGATTACCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCTTAAATTT GACGACGTTATTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTA TCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAACGAACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTT GGGGATGGGACGACAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATTTTTTATGC TAAAAAGGAATGA
配列番号 19	*H. zea* Z11 デサチュラーゼ ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAGAAAGAACTAACATTACAAC ATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCAGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTT TGGTTACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTTCTGCTAAATGG GCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTGTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCG CTCACAGACTCTGGGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTCTTAAT GGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTGACTGGGTGAGGGACCACCGACTC CACCATAAGTATAGCGATACAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATT CCCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAAAAAGCGAGGGAAAGAACT CAATATGTCCGATATTTACAACAATCCTGTCTTACGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCC TTCATTGGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTTCTGGGGAGAAA CCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTT TTTGGTAAACAGCGCTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATTACCT GCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGAAGGTTTCCATAATTACCACCATG TCTTCCCCTGGGATTATCGAGCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATTTAACGACTAA ATTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATTTAAAGACGGTTTCGGAGGAT ATGATAAAACAAAGGATTAAACGCACTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAA ACTGTGATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA

【表２７－９】

配列番号 20	*O. furnacalis* Z9 デサチュラーゼ ATGGCTCCTAATATTAAGGACGGAGCTGATTTGAACGGAGTTTTATTTGAAGATGACGCTA GCACCCCCGATTATGCCCTTGCCACGGCCCCAGTCCAGAAAGCAGACAACTATCCCAGAAA ACTAGTGTGGAGAAACATCATACTCTTTGCATACCTTCACCTTGCCGCTGTGTATGGAGCA TACCTATTCTTATTTTCAGCGAAATGGCAGACAGATATTTTTGCCTACATTCTTTACGTGA TCTCAGGACTCGGCATCACAGCGGGAGCCCACCGCCTTTGGGCGCACAAGTCATACAAGGC TAAGTGGCCACTTAGACTCATTCTTATTATCTTCAACACTGTATCATTCCAGGACTCTGCT CTCGACTGGTCACGTGACCACCGCATGCACCACAAATACTCGGAGACCGACGCCGACCCGC ACAACGCGACTCGAGGGTTCTTCTTCTCTCATATCGGCTGGTTATTAGTCCGCAAGCACCC GGAATTAAAGAGAAAGGGCAAGGGATTAGACTTAAGCGACTTGTATGCTGATCCCATCCTC CGTTTCCAGAAGAAGTACTATTTACTATTAATGCCTCTTGGCTGCTTCATCATGCCGACGG TGGTCCCGGTGTACTTCTGGGGTGAGACTTGGACTAACGCTTTCTTCGTCGCCGCGCTCTT CCGATACACCTTCATCCTCAATGTCACCTGGTTGGTCAACTCCGCCGCGCACAAGTGGGGC CACAAGCCCTATGACAGCAGCATCAAGCCTTCCGAGAACCTCTCAGTCTCCTTATTCGCGT TGGGCGAAGGATTCCACAACTACCACCACACATTCCCCTGGGACTACAAAACTGCCGAGCT CGGCAACAACAGACTCAATTTCACAACAAACTTCATCAACTTCTTCGCTAAAATCGGATGG GCTTACGACTTGAAAACGGTCTCCGACGAGATTATTCAGAATAGAGTCAAGCGCACAGGAG ATGGCTCCCACCACTTATGGGGTTGGGGCGACAAGGATCAACCTAAAGAGGAGGTAAACGC AGCCATTAGAATTAATCCTAAAGACGAGTAA
配列番号 21	*L. capitella* Z9 デサチュラーゼ ATGCCGCCGAACGTGACAGAGGCGAACGGAGTGTTATTTGAGAATGACGTGCAGACTCCTG ACATGGGGCTAGAAGTGGCCCCTGTGCAGAAGGCTGACGAGCGTAAGATCCAGCTCGTTTG GAGGAACATCATCGCTTTTGCATGTCTTCATTTAGCAGCTGTGTATGGAGCTTATTTATTC TTCACCTCGGCTATATGGCAGACAGACATATTTGCATACATCCTTTACGTTATGTCTGGAT TAGGAATCACGGCGGGAGCGCACAGATTATGGGCTCATAAGTCATACAAGGCGAAGTGGCC GTTAAGATTAATCCTCGTCGCATTCAACACTTTGGCATTCCAGGATTCGGCAATCGACTGG GCGCGCGACCACCGCATGCACCACAAGTACTCGGAGACGGATGCGGACCCACATAACGCCA CTCGCGGCTTCTTCTTTTCGCACATTGGTTGGTTACTCTGCCGAAAACACCCGGAGCTAAA GCGCAAGGGCCAGGGCCTCGACTTAAGTGACCTCTACGCAGATCCTATTATTCGCTTCCAA AAGAAGTACTACTTATTGTTAATGCCGTTAGCCTGCTTTGTTCTTCCCACCATAATTCCGG TCTACCTCTGGGGCGAGTCCTGGAAAAACGCGTTCTTCGTAGCTGCAATGTTCCGTTACAC GTTCATCCTCAACGTAACATGGCTCGTCAACTCCGCCGCCCACAAATGGGGAGGCAAGCCC TATGATAAGAACATCCAGCCCGCTCAGAACATCTCTGTAGCTATCTTCGCATTAGGCGAGG GCTTCCACAACTACCACCACACGTTCCCCTGGGACTACAAGACCGCTGAATTAGGAAACAA CAGGTTAAATTTCACAACTTCGTTTATCAATTTCTTCGCAAGCTTCGGATGGGCCTACGAC TTAAAGACCGTGTCGGACGAGATTATACAACAGCGCGTTAAGAGGACGGGAGATGGGAGCC ATCACTTACGGGGCTGGGGCGACCAGGACATACCGGCCGAAGAAGCTCAAGCTGCTTTACG CATTAACCGTAAAGATGATTAG

【表２７－１０】

配列番号 22	*H. zea* Z9 デサチュラーゼ ATGGCTCCAAATATATCGGAGGATGTGAACGGGGTGCTCTTCGAGAGTGATGCAGCGACGC CGGACTTAGCGTTATCCACGCCGCCTGTGCAGAAGGCTGACAACAGGCCCAAGCAATTAGT GTGGAGGAACATACTATTATTCGCGTATCTTCACTTAGCGGCTCTTTACGGAGGTTATTTA TTCCTCTTCTCAGCTAAATGGCAGACAGACATATTTGCCTACATCTTATATGTGATCTCCG GGCTTGGTATCACGGCTGGAGCACATCGCTTATGGGCCCACAAGTCCTACAAAGCTAAATG GCCTCTCCGAGTTATCTTAGTCATCTTTAACACAGTGGCATTCCAGGATGCCGCTATGGAC TGGGCGCGCGACCACCGCATGCATCACAAGTACTCGGAAACCGATGCTGATCCTCATAATG CGACCCGAGGATTCTTCTTCTCTCACATTGGCTGGTTACTTGTCAGGAAACATCCCGACCT TAAGGAGAAGGGCAAGGGACTCGACATGAGCGACTTACTTGCTGACCCCATTCTCAGGTTC CAGAAAAAATACTACTTAATCTTAATGCCCTTGGCTTGCTTCGTGATGCCTACCGTGATTC CTGTGTACTTCTGGGGTGAAACCTGGACCAACGCATTCTTTGTGGCGGCCATGTTCCGCTA CGCGTTCATCCTAAATGTGACGTGGCTCGTCAACTCTGCCGCTCACAAGTGGGGAGACAAG CCCTACGACAAAAGCATTAAGCCTTCCGAAAACTTGTCGGTCGCCATGTTCGCTCTCGGAG AAGGATTCCACAACTACCACCACACTTTCCCTTGGGACTACAAAACTGCTGAGTTAGGCAA CAACAAACTCAACTTCACTACCACCTTTATTAACTTCTTCGCTAAAATTGGCTGGGCTTAC GACTTAAAGACAGTGTCTGATGATATCGTCAAGAACAGGGTGAAGCGCACTGGTGACGGCT CCCACCACTTATGGGGCTGGGGAGACGAAAATCAATCCAAAGAAGAAATTGATGCCGCTAT CAGAATCAATCCTAAGGACGATTAA
配列番号 23	*T. pseudonana* Z11 デサチュラーゼ ATGGACTTTCTCTCCGGCGATCCTTTCCGGACACTCGTCCTTGCAGCACTTGTTGTCATCG GATTTGCTGCGGCGTGGCAATGCTTCTACCCGCCGAGCATCGTCGGCAAGCCTCGTACATT AAGCAATGGTAAACTCAATACCAGAATCCATGGCAAATTGTACGACCTCTCATCGTTTCAG CATCCAGGAGGCCCCGTGGCTCTTTCTCTTGTTCAAGGTCGCGACGGAACAGCTCTATTTG AGTCACACCATCCCTTCATACCTCGAAAGAATCTACTTCAGATCCTCTCCAAGTACGAGGT TCCGTCGACTGAAGACTCTGTTTCCTTCATCGCCACCCTAGACGAACTCAATGGTGAATCT CCGTACGATTGGAAGGACATTGAAAATGATGATTTCGTATCTGACCTACGAGCTCTCGTAA TTGAGCACTTTTCTCCTCTCGCCAAGGAAAGGGGAGTTTCACTCGTTGAGTCGTCGAAGGC AACACCTCAGCGGTGGATGGTGGTTCTATTACTCCTTGCGTCGTTCTTCCTCAGCATCCCA TTATATTTGAGTGGTTCGTGGACTTTCGTTGTCGTCACTCCCATCCTCGCTTGGTTAGCGG TTGTCAATTACTGGCACGATGCTACTCACTTTGCATTGAGCAGCAACTGGATTTTGAATGC TGCGCTCCCATATCTCCTCCCTCTCCTATCGAGTCCGTCAATGTGGTATCATCATCACGTC ATTGGACATCACGCATACACCAACATTTCCAAAAGAGATCCAGATCTTGCTCACGCTCCAC AACTCATGAGAGAACACAAGAGTATCAAATGGAGACCATCTCACTTAAATCAAACACAGCT TCCGCGGATTCTCTTCATCTGGTCGATTGCAGTCGGTATTGGGTTGAACTTATTAAACGAC GTGAGAGCACTAACCAAGCTTTCATACAACAACGTTGTTCGGGTGGAGAAGATGTCATCGT CGCGAACATTACTCCATTTCCTTGGACGTATGTTGCACATCTTTGTGACTACACTTTGGCC CTTTTTGGCGTTTCCGGTGTGGAAGGCCATCGTTTGGGCGACTGTACCGAATGCCATATTA AGTTTGTGCTTCATGTTAAATACGCAAATCAATCACCTCATCAACACGTGTGCACATGCTT CCGATAACAACTTTTACAAGCATCAAGTTGTAACTGCTCAGAACTTTGGCCGATCAAGTGC CTTTTGCTTCATCTTCTCGGGAGGTCTCAACTACCAAATTGAACATCATTTGTTGCCGACG GTGAACCATTGCCATTTGCCAGCTTTGGCCCCGGGTGTAGAGCGTTTGTGTAAGAAACACG GGGTGACATACAACTCTGTTGAAGGATACAGAGAGGCCATCATTGCACACTTTGCACATAC CAAAGATATGTCGACGAAGCCTACTGATTGA

【表２７－１１】

配列番号 24	Native *T. ni* Z11 デサチュラーゼ ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTGTTGGAAGAGGAAGCTCGCA CAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAGACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTT TCTTACATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTGTGCTTCACCTCT GCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGTACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCA CCGCAGGGGCTCACCGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGGAAAT TGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACACGGCTATTACATGGGCTAGAGAA CATCGGCTACATCACAAATACAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGT TCTTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCGATGTCCTGAAATATGG AAAAACTATAGACATGTCGGATGTATACAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTAC GCAGTACCCTTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTGCCAACTTTGATTCCAGTCTACTGTT GGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCCTTATTTCGATACATATTCAATCTTAA CGTGACTTTCCTAGTCAACAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAGC ATCTTGCCCGCTCAAAACCTGCTGGTTTCCTTCCTAGCAAGTGGAGAAGGCTTCCATAATT ACCATCACGTCTTTCCATGGGATTACCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCCTGAATTT GACGACGCTGTTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTA TCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAACGAACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTT GGGGATGGGACGACAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATTTTTTATGC TAAAAAGGAATGA
配列番号 25	*H. zea* Z11 デサチュラーゼ ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAGAAAGAACTAACACTGCAAC ATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCAGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTT TGGTTACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTTCTGCTAAATGG GCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTGTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCG CTCACAGACTCTGGGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTCTTAAT GGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTGACTGGGTGAGGGACCACCGACTC CACCATAAGTATAGCGATACAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATT CCCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAAAAAGCGAGGGAAAGAACT CAATATGTCCGATATTTACAACAATCCTGTCCTGCGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCC TTCATTGGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTTCTGGGGAGAAA CCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTT TTTGGTAAACAGCGCTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATTACCT GCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGAAGGTTTCCATAATTACCACCATG TCTTCCCCTGGGATTATCGAGCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATCTGACGACTAA ATTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATCTGAAGACGGTTTCGGAGGAT ATGATAAAACAAAGGATTAAACGCACTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAA ACTGTGATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA

【表２７－１２】

配列番号 26	T. ni Z11 デサチュラーゼ *Homo sapiens* 最適化 ATGGCCGTGATGGCCCAGACCGTGCAGGAGACCGCAACAGTGCTGGAGGAGGAGGCAAGGA CCGTGACACTGGTGGCACCCAAGACCACACCTAGAAAGTACAAGTATATCTACACCAACTT CCTGACCTTCAGCTACGCACACCTGGCCGCCCTGTATGGACTGTACCTGTGCTTTACCTCC GCCAAGTGGGAGACACTGCTGTTCTCTTTTGTGCTGTTCCACATGAGCAATATCGGAATCA CCGCAGGAGCACACAGGCTGTGGACCCACAAGACATTCAAGGCCAAGCTGCCTCTGGAGAT CGTGCTGATGATCTTCAACTCTCTGGCCTTTCAGAATACCGCCATCACATGGGCCCGGGAG CACAGACTGCACCACAAGTATAGCGACACCGATGCAGACCCACACAACGCAAGCAGGGGCT TCTTTTACTCCCACGTGGGCTGGCTGCTGGTGAAGAAGCACCCCGACGTGCTGAAGTATGG CAAGACAATCGACATGTCCGACGTGTACAACAATCCCGTGCTGAAGTTTCAGAAGAAGTAT GCCGTGCCTCTGATCGGCACCGTGTGCTTCGCCCTGCCAACACTGATCCCCGTGTATTGTT GGGGCGAGTCTTGGAACAATGCCTGGCACATCGCCCTGTTCCGGTACATCTTTAACCTGAA TGTGACCTTTCTGGTGAACTCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCTTACGACAAGTCT ATCCTGCCAGCCCAGAACCTGCTGGTGTCCTTCCTGGCCTCTGGCGAGGGCTTTCACAATT ATCACCACGTGTTCCCATGGGACTACAGGACCGCAGAGCTGGGCAACAATTTTCTGAACCT GACCACACTGTTCATCGATTTTTGTGCCTGGTTCGGCTGGGCCTATGACCTGAAGTCTGTG AGCGAGGATATCATCAAGCAGAGGGCAAAGAGGACAGGCGATGGCAGCTCCGGCGTGATCT GGGGATGGGACGATAAGGATATGGACAGAGATATCAAGAGCAAGGCCAATATCTTCTACGC CAAGAAGGAGTGA
配列番号 27	H. zea Z11 デサチュラーゼ *Homo sapiens* 最適化 ATGGCACAGTCATATCAGAGCACTACCGTCCTGAGCGAAGAGAAGGAACTGACACTGCAGC ACCTGGTCCCACAGGCATCACCTAGAAAGTACCAGATCGTGTATCCAAACCTGATCACCTT CGGCTACTGGCACATCGCCGGCCTGTACGGCCTGTATCTGTGCTTTACCTCCGCCAAGTGG GCCACAATCCTGTTCTCTTACATCCTGTTTGTGCTGGCAGAGATCGGAATCACCGCAGGAG CACACAGACTGTGGGCACACAAGACATATAAGGCCAAGCTGCCCCTGGAGATCCTGCTGAT GGTGTTCAACAGCATCGCCTTTCAGAATTCCGCCATCGATTGGGTGCGGGACCACAGACTG CACCACAAGTACTCCGACACCGATGCCGACCCCCACAACGCCTCTAGGGGCTTCTTTTATA GCCACGTGGGATGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCTGAGGTGAAGAAGAGAGGCAAGGAGCT GAATATGTCTGATATCTACAACAATCCTGTGCTGCGCTTCCAGAAGAAGTATGCCATCCCA TTCATCGGCGCCGTGTGCTTTGCCCTGCCCACCATGATCCCCGTGTACTTTTGGGGCGAGA CATGGAGCAACGCCTGGCACATCACAATGCTGCGGTATATCATGAACCTGAATGTGACATT CCTGGTGAACTCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCATACGACGCCAAGATCCTGCCC GCCCAGAACGTGGCCGTGAGCGTGGCAACCGGAGGAGAGGGCTTCCACAATTACCACCACG TGTTTCCTTGGGATTATCGGGCCGCCGAGCTGGGCAACAATTCTCTGAATCTGACCACAAA GTTCATCGACCTGTTTGCCGCCATCGGCTGGGCCTATGATCTGAAGACAGTGAGCGAGGAC ATGATCAAGCAGAGGATCAAGCGCACCGGCGATGGCACAGACCTGTGGGGGCACGAGCAGA ACTGTGATGAAGTGTGGGATGTGAAAGACAAGTCCTCCTAA

【表２７－１３】

配列番号 28	*Y. lipolytica* OLE1 リーダー - *T. ni* Z11 デサチュラーゼ *Homo sapiens* 最適化 ATGGTGAAGAACGTGGACCAGGTGGATCTGTCTCAGGTGGACACCATCGCAAGCGGAAGGG ATGTGAATTATAAGGTGAAGTACACATCTGGCGTGAAGACCACACCAAGAAAGTACAAGTA TATCTACACCAACTTCCTGACATTTTCTTACGCCCACCTGGCCGCCCTGTATGGCCTGTAC CTGTGCTTTACCAGCGCCAAGTGGGAGACACTGCTGTTCTCCTTTGTGCTGTTCCACATGT CTAATATCGGAATCACCGCAGGAGCACACAGGCTGTGGACCCACAAGACATTCAAGGCCAA GCTGCCCCTGGAGATCGTGCTGATGATCTTCAACTCCCTGGCCTTTCAGAATACCGCCATC ACATGGGCCCGGGAGCACAGACTGCACCACAAGTATTCTGACACCGATGCAGACCCACACA ACGCAAGCAGGGGCTTCTTTTACTCCCACGTGGGCTGGCTGCTGGTGAAGAAGCACCCTGA CGTGCTGAAGTATGGCAAGACAATCGACATGAGCGACGTGTACAACAATCCTGTGCTGAAG TTTCAGAAGAAGTATGCCGTGCCACTGATCGGCACCGTGTGCTTCGCCCTGCCCACACTGA TCCCCGTGTACTGTTGGGGCGAGTCCTGGAACAATGCCTGGCACATCGCCCTGTTCCGGTA CATCTTTAACCTGAATGTGACCTTTCTGGTGAACAGCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAG CCATACGACAAGTCCATCCTGCCCGCCCAGAACCTGCTGGTGTCCTTCCTGGCCTCTGGCG AGGGCTTTCACAATTATCACCACGTGTTCCCTTGGGACTACAGGACCGCAGAGCTGGGCAA CAATTTTCTGAACCTGACCACACTGTTCATCGATTTTTGTGCCTGGTTCGGCTGGGCCTAT GACCTGAAGTCTGTGAGCGAGGATATCATCAAGCAGAGGGCAAAGAGGACAGGCGATGGCA GCTCCGGCGTGATCTGGGGATGGGACGATAAGGATATGGACAGAGATATCAAGTCCAAGGC CAATATCTTCTACGCCAAGAAGGAGTGA
配列番号 29	*Y. lipolytica* OLE1 リーダー - *H. zea* Z11 デサチュラーゼ *Homo sapiens* 最適化 ATGGTGAAAAACGTGGACCAAGTGGATCTCTCGCAGGTCGACACCATTGCCTCCGGCCGAG ATGTCAACTACAAGGTCAAGTACACCTCCGGCGTTCGCAAGTATCAGATCGTGTATCCTAA CCTGATCACCTTCGGCTACTGGCATATCGCTGGACTGTACGGACTGTATCTGTGCTTCACT TCCGCCAAGTGGGCCACCATCCTGTTCTCTTACATCCTGTTTGTGCTGGCAGAGATCGGAA TCACCGCAGGAGCACACAGACTGTGGGCACACAAGACATATAAGGCCAAGCTGCCACTGGA GATCCTGCTGATGGTGTTCAACAGCATCGCCTTTCAGAATTCCGCCATCGATTGGGTGCGG GACCACAGACTGCACCACAAGTACTCCGACACAGATGCCGACCCCCACAACGCCTCTAGGG GCTTCTTTTATAGCCACGTGGGATGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCTGAGGTGAAGAAGAG AGGCAAGGAGCTGAATATGTCTGATATCTACAACAATCCTGTGCTGCGCTTCCAGAAGAAG TATGCCATCCCATTCATCGGCGCCGTGTGCTTTGCCCTGCCCACCATGATCCCCGTGTACT TTTGGGGCGAGACATGGAGCAACGCCTGGCACATCACAATGCTGCGGTATATCATGAACCT GAATGTGACATTCCTGGTGAACTCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCATACGACGCC AAGATCCTGCCCGCCCAGAACGTGGCCGTGAGCGTGGCAACCGGAGGAGAGGGCTTCCACA ATTACCACCACGTGTTTCCATGGGATTATAGGGCAGCAGAGCTGGGAAACAATTCTCTGAA TCTGACCACAAAGTTCATCGACCTGTTTGCCGCCATCGGCTGGGCCTATGATCTGAAGACA GTGAGCGAGGACATGATCAAGCAGAGGATCAAGCGCACCGGCGATGGCACAGACCTGTGGG GGCACGAGCAGAATTGTGATGAAGTGTGGGATGTGAAGGATAAAAGCAGTTGA

【表２７－１４】

配列番号 30	天然 *A. transitella* Z11 デサチュラーゼ ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATTCTGAGCCCCAGTTCACTA AACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCCGAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCAC ATTCGGCTATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTACTTGTGCGAAA TGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACGTGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTG GCGCTCATAGGCTATGGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTTGTT ACTCATAATGAATTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCACCTGGGCTCGAGATCACCGC CTTCATCACAAATATTCGGATACTGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCT ATTCACATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAAGCAAGAGGAAAATA CTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATCCATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATT CTAGTTATAGGCACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCTGGGGCG AGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGCGATACGTCATGAATCTTAACATGAC TTTCTTAGTTAACAGTGCAGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGCC TCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAAGGATTCCATAATTACCATC ACACTTACCCCTGGGATTATCGTGCGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTAC TGCTTTCATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAGTCTGTGCCACAA GAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACTGGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAA GATAA
配列番号 31	pPV0228_-_Z11_Helicoverpa zea_デサチュラーゼ ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAGAAAGAACTAACATTACAAC ATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCAGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTT TGGTTACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTTCTGCTAAATGG GCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTGTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCG CTCACAGACTCTGGGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTCTTAAT GGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTGACTGGGTGAGGGACCACCGACTC CACCATAAGTATAGCGATACAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATT CCCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAAAAAGCGAGGGAAAGAACT CAATATGTCCGATATTTACAACAATCCTGTCTTACGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCC TTCATTGGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTTCTGGGGAGAAA CCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTT TTTGGTAAACAGCGCTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATTACCT GCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGAAGGTTTCCATAATTACCACCATG TCTTCCCCTGGGATTATCGAGCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATTTAACGACTAA ATTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATTTAAAGACGGTTTCGGAGGAT ATGATAAAACAAAGGATTAAACGCACTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAA ACTGTGATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA

【表２７－１５】

配列番号 32	pPV0228_-_Helicoverpa armigera レダクターゼ コドン最適化 ATGGTCGTTTTAACTTCTAAAGAGACAAAACCTTCAGTAGCTGAGTTTTATGCGGGAAAAT CTGTTTTTATTACGGGTGGCACTGGATTCCTTGGAAAGGTATTCATAGAGAAACTTTTATA TAGCTGTCCAGATATCGAGAATATCTACATGCTCATACGAGAGAAGAAAGGTCTTTCTGTT AGCGAAAGAATAAAACAGTTCCTTGATGACCCGCTCTTTACCAGACTAAAAGACAAAAGAC CAGCTGACTTAGAGAAGATTGTATTAATACCAGGAGATATTACTGCTCCTGACTTAGGCAT TAATTCTGAAAACGAGAAGATGCTTATAGAGAAGGTATCGGTGATTATTCATTCGGCTGCT ACGGTGAAGTTTAATGAGCCTCTCCCTACGGCTTGGAAGATCAACGTGGAAGGAACCAGAA TGATGTTAGCTTTGAGTCGAAGAATGAAGCGGATTGAGGTTTTCATTCACATATCGACAGC ATACACGAACACAAACAGGGAAGTGGTTGACGAGATCTTATACCCAGCTCCTGCTGATATC GACCAAGTTCATCAGTATGTCAAAGATGGAATCTCTGAGGAAGACACTGAGAAAATATTAA ATGGTCGTCCAAATACGTACACGTTTACGAAAGCGTTAACTGAGCATTTAGTTGCTGAGAA CCAAGCCTACGTACCCACTATTATCGTCAGGCCGTCAGTCGTGGCAGCAATAAAAGATGAG CCATTAAAAGGTTGGTTAGGCAACTGGTTTGGAGCGACTGGTCTCACCGTGTTCACCGCTA AGGGTCTCAACCGAGTCATCTACGGTCATTCTAGCTACATCGTAGACTTAATTCCTGTGGA TTATGTCGCTAATTTAGTGATTGCTGCTGGGGCTAAGAGTAGCAAGTCAACTGAGTTGAAG GTATACAACTGCTGCAGCAGCTCCTGCAATCCCGTCACTATTGGCACGTTAATGAGCATGT TTGCTGACGATGCCATCAAACAGAAGTCGTATGCTATGCCGCTACCGGGGTGGTACATATT CACGAAATATAAGTGGTTAGTTCTTCTTTTAACATTTCTCTTCCAAGTTATACCGGCGTAT GTCACAGATCTCTCCAGGCACTTGATTGGGAAGAGTCCACGGTACATAAAACTCCAATCAC TAGTAAATCAAACGCGCTCTTCAATCGACTTCTTCACGAATCACTCCTGGGTGATGAAGGC AGACAGAGTGAGAGAGTTATATGCGTCTCTTTCCCCCGCAGACAAGTACTTATTTCCCTGT GATCCTACGGACATTAACTGGACACATTACATACAAGACTACTGTTGGGGAGTCCGACATT TTTTGGAGAAAAAAAGCTACGAATAA

【表２７－１６】

配列番号 33	pPV0228_-_ICL_プロモーター TATTAGGCGAAGAGGCATCTAGTAGTAGTGGCAGTGGTGAGAACGTGGGCGCTGCTATAGT GAACAATCTCCAGTCGATGGTTAAGAAGAAGAGTGACAAACCAGCAGTGAATGACTTGTCT GGGTCCGTGAGGAAAAGAAAGAAGCCCGACACAAAGGACAGTAACGTCAAGAAACCCAAGA AATAGGGGGGACCTGTTTAGATGTATAGGAATAAAAACTCCGAGATGATCTCAATGTGTAA TGGAGTTGTAATATTGCAAAGGGGGAAAATCAAGACTCAAACGTGTGTATGAGTGAGCGTA CGTATATCTCCGAGAGTAGTATGACATAATGATGACTGTGAATCATCGTAATCTCACACAA AAACCCCATTGTCGGCCATATACCACACCAAGCAACACCACATATCCCCCGGAAAAAAAAA CGTGAAAAAAAGAAACAATCAAAACTACAACCTACTCCTTGATCACACAGTCATTGATCAA GTTACAGTTCCTGCTAGGGAATGACCAAGGTACAAATCAGCACCTTAATGGTTAGCACGCT CTCTTACTCTCTCTCACAGTCTTCCGGCCCCTATTCAAAATTCTGCACTTCCATTTGACCC CAGGGTTGGGAAACAGGGCCACAAAAGAAAAACCCGACGTGAATGAAAAAACTAAGAAAAG AAAAAAAATTATCACACCAGAAATTTACCTAATTGGGTAATTCCCATCGGTGTTTTTCCTG GATTGTCGCACGCACGCATGCTGAAAAAAGTGTTCGAGTTTTGCTTTTGCCTCGGAGTTTC ACGCAAGTTTTTCGATCTCGGAACCGGAGGGCGGTCGCCTTGTTGTTTGTGATGTCGTGCT TTGGGTGTTCTAATGTGCTGTTATTGTGCTCTTTTTTTTTCTTCTTTTTTTGGTGATCATA TGATATTGCTCGGTAGATTACTTTCGTGTGTAGGTATTCTTTTAGACGTTTGGTTATTGGG TAGATATGAGAGAGAGAGAGTGGGTGGGGGAGGAGTTGGTTGTAGGAGGGACCCCTGGGAG GAAGTGTAGTTGAGTTTTCCCTGACGAATGAAAATACGTTTTTGAGAAGATAATACAGGAA AGGTGTGTCGGTGAATTTCCATCTATCCGAGGATATGAGTGGAGGAGAGTCGTGTGCGTGT GGTTAATTTAGGATCAGTGGAACACACAAAGTAACTAAGACAGAGAGACAGAGAGAAAAAT CTGGGGAAGAGACAAAGAGTCAGAGTGTGTGAGTTATTCTGTATTGTGAAATTTTTTTGCC CAACTACATAATATTGCTGAAACTAATTTTACTTAAAAAGAAAAGCCAACAACGTCCCCAG TAAAACTTTTCTATAAATATCAGCAGTTTTCCCTTTCCTCCATTCCTCTTCTTGTCTTTTT TCTTACTTTCCCTTTTTTATACCTTTTCATTATCATCCTTTATAATTGTCTAACCAACAAC TATATATCTATCAA
配列番号 34	pPV0228_-_TEF_Candida tropicalis_プロモーター領域 AGGAAGACAACCAAAAGAAAGATCAAATTGACTAAATGTTGAACAGACCAAAAAAAAAGAA CAACAAATAGATAAATTACAACATATTAATCTTTTGATATGTTGTTGAATATTCTAGTAAA TCTAATGATCTCAATAGTGGTTATCATTCACTCTCTTCGTCCTCCTCTCTCCCCTCCTCCT CTTGCAGTATATTAAAAGCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAATCTGCCAACACACACAA AAAAAACTTACATAGTCGTGTACCAGTGTCAATATTTCACCAGCGCAGAGAAAAGAAGATG AACAGAAAAATTTTCTCTTTGGTTTTGTCTTTGGTTTTGTATTAATCTCATTGAAAAATTT TTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACTCACACACTCACTCGCATTTCGTTTGGGTTACA GCAGAAGTCAGACAGAAAAAAAAAATCGTATATAACTCTCATCAAATGCCCTAGAGAAAAA TTTTTCTTCTATCCTTTTTTTTTTCTTCTTCTTCTTCTTTTCCTTTTTTCTTTTAGAAGAT CTTTTTGAATTCATCAAAGATATATATTTAATCAATC
配列番号 35	pPV0228_-_ICL_ターミネーター AAGAAAAAAGAAAAGGTAAAGAACTTCATTTGAGATGAACTTTTGTATATGACTTTTAGTT TCTACTTTTTTTTTTATTTATTGCTTAATTTTCTTTATTTCAATCCCCCATAGTTTGTGTA GAATATATTTATTCATTCTGGTAACTCAAACACGTAGCAAGCTCGTTGCATCTCGCCTCGT CACGGGTACAGCTCTGGAACCAAAGACAAAAAAAAAAGTTGATCCGAACCCTCTCGCTATT CCTTGCTATGCTATCCACGAGATGGGGTTTATCAGCCCAGGCAAGTCACTAAA

【表２７－１７】

配列番号 36	pPV0228_-_TEF_ターミネーター GCTGATTAATGAATAATTAATAAGTATTGTTTTTTTTGTTTTTAATATATATATATCTTGA AATTAGTATAAAAAAAATCTTTTTTTTTTCTTTTTTATTTATTTTATCAATAGTTTATATA TATATATATATAAACTTGTAAGAGATTAGGTATATCTAACAGTGATACTACTAATAGTGCT TAATATCTTTGTTAAACAAGAAAATAAAATAAAC
配列番号 37	SapI-tLIP2-pEXP1-HA_FAR-SapI（pPV199 に挿入して pPV247 を作成） GCCTGAAGAGCGCTATTTATCACTCTTTACAACTTCTACCTCAACTATCTACTTTAATAAA TGAATATCGTTTATTCTCTATGATTACTGTATATGCGTTCCTCCATGGGAGTTTGGCGCCC GTTTTTTCGAGCCCCACACGTTTCGGTGAGTATGAGCGGCGGCAGATTCGAGCGTTTCCGG TTTCCGCGGCTGGACGAGAGCCCATGATGGGGGCTCCCACCACCAGCAATCAGGGCCCTGA TTACACACCCACCTGTAATGTCATGCTGTTCATCGTGGTTAATGCTGCTGTGTGCTGTGTG TGTGTGTTGTTTGGCGCTCATTGTTGCGTTATGCAGCGTACACCACAATATTGGAAGCTTA TTAGCCTTTCTATTTTTTCGTTTGCAAGGCTTAACAACATTGCTGTGGAGAGGGATGGGGA TATGGAGGCCGCTGGAGGGAGTCGGAGAGGCGTTTTGGAGCGGCTTGGCCTGGCGCCCAGC TCGCGAAACGCACCTAGGACCCTTTGGCACGCCGAAATGTGCCACTTTTCAGTCTAGTAAC GCCTTACCTACGTCATTCCATGCATGCATGTTTGCGCCTTTTTTCCCTTGCCCTTGATCGC CACACAGTACAGTGCACTGTACAGTGGAGGTTTTGGGGGGGTCTTAGATGGGAGCTAAAAG CGGCCTAGCGGTACACTAGTGGGATTGTATGGAGTGGCATGGAGCCTAGGTGGAGCCTGAC AGGACGCACGACCGGCTAGCCCGTGACAGACGATGGGTGGCTCCTGTTGTCCACCGCGTAC AAATGTTTGGGCCAAAGTCTTGTCAGCCTTGCTTGCGAACCTAATTCCCAATTTTGTCACT TCGCACCCCCATTGATCGAGCCCTAACCCCTGCCCATCAGGCAATCCAATTAAGCTCGCAT TGTCTGCCTTGTTTAGTTTGGCTCCTGCCCGTTTCGGCGTCCACTTGCACAAACACAAACA AGCATTATATATAAGGCTCGTCTCTCCCTCCCAACCACACTCACTTTTTTGCCCGTCTTCC CTTGCTAACACAAAAGTCAAGAACACAAACAACCACCCCAACCCCCTTACACACAAGACAT ATCTACAGCAATGGTGGTGCTGACCAGCAAGGAGACAAAGCCTTCCGTGGCCGAGTTCTAC GCCGGCAAGTCCGTGTTTATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGA AGCTGCTGTACTCTTGCCCAGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGG CCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACACGGCTGAAG GACAAGAGACCTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAG ATCTGGGCATCAACTCCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGTCCGTGATCATCCA CTCTGCCGCCACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAG GGCACCAGGATGATGCTGGCCCTGAGCCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACA TCTCCACAGCCTACACCAACACAAATCGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCC CGCCGACATCGATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAG AAGATCCTGAACGGCCGGCCAAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGG TGGCCGAGAACCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCAT CAAGGATGAGCCCCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTG TTTACAGCCAAGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGA TCCCCGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCTAC CGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCTGTGACCATCGGCACACTG ATGTCCATGTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCTTACGCCATGCCTCTGCCAGGCT GGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCAT CCCAGCCTACGTGACCGATCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCCCGCTATATCAAG CTGCAGTCTCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACAGCTGGG TCATGAAGGCCGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCCTCTCTGAGCCCTGCCGACAAGTATCT GTTCCCCTGCGACCCTACCGATATCAATTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGC GTGCGCCACTTCCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGAGCCTGAAGAGC

【表２７－１８】

配列番号 38	NcoI-pTAL-AleI （pPV247 に挿入して pPV248 を作成） CCATGGGTAAGCAGGTGGCTCCGTTTGTGTCTTTGTGTTTTTCCCCTCCTTTTTGGACCAT TTGTCAGCATGTTGCGTAGGTCTGGGTGTTTGACTGTTCAGGTGGTGGATGACGGATGCAT CATCTGACGGCAGAGTGGGTACCTGGCAGTGGCAGGCTCGCAGACGAGGTAGAGAGATTCT GAAAGGAGCCATTGACAGATGGAGAATTGGATACTCCTGGTATGTCCTCCGTTTCCACTTT TGACGTTGGTGACGTGCTCTGGAACGACTTTTTTCTTTTTCTTTAAAACAAAAAAAAGAAA GAAAAAAAAAACATTTACTACTACCAGTAGTACACCTCAACATTGGGTCCAGAACGTCCCA ACTGCATGAGTCACTGGAGTCATGCCGAGGTCGCTAAGGTGCTGTAAAATACAACGTCAAT TGAGAGAGACACAGGCGCAGCGCGCCGAGGGAGAAACGAGGCATTTATCTTCTGACCCTCC TTTTTACTCGTAATCTGTATCCCGGAACCGCGTCGCATCCATGTTAATTAAATCAACACTT ACACTTGCTTGCTTCGTATGATGAAGATTTCTGACTGGCAACCCAGTCAGCAGCAGATTGG GGCAGATGTAGTAATGAAAAACACTGCAAGGTGTGACGTTTGAGACACTCCAATTGGTTAG AAAGCGACAAAGAAGACGTCGGAAAAATACCGGAAAAATCGAGTCTTTTTCTTTCTGCGTA TTGGGCCCTTCTGCCTCCTTTGCCGCCCTTTCCACGCTCTTTCCACACCCTCACACTCCCT GAGCACTATGATCTCATTGCGCAATAAGATATACATGCACGTGCATTTGGTGAGCACGCAG AACCTTGTTGGGGGAAGATGCCCTAACCCTAAGGGCGTTCCATACGGTTCGACAGAGTAAC CTTGCTGTCGATTATAACGCATATATAGCCCCCCCCTTCGGACCCTCCTTCTGATTTCTGT TTCTGTATCAACATTACACACAAACACACAATGGTG
配列番号 39	pDST003_Sesamia inferens デサチュラーゼ MLSQEEPTDTSLVPRAAPRKYQIVYPNLITFGYWHLAGLYGLYLCFTSAKWTTILFSFILC VIAEIGVTAGAHRLWAHKTYKANLPLQILLMVMNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDAD PHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPEVKKRGKELDMSDIYSNPVLRFQKQYAIPFIGAVCFILP TVIPVYCWGETWTNAWHITMLRYITNLNVTFLVNSAAHIWGYKPYDENILPAQNIAVSIAT CGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNNLNLTTKFIDFFAWLGWAYDLKTVSSDMIKLRAKRTG DGTNLWGEHNDELKEGKED

【表２７－１９】

配列番号 40	配列番号 37 からの H. armigera FAR ATGGTGGTGCTGACCAGCAAGGAGACAAAGCCTTCCGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGT CCGTGTTTATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CTCTTGCCCAGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACACGGCTGAAGGACAAGAGAC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACTCCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGTCCGTGATCATCCACTCTGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGAGCCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCTCCACAGC CTACACCAACACAAATCGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCCGGCCAAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCCCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCCGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCTACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCTGTGACCATCGGCACACTGATGTCCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCTTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCAGCCTAC GTGACCGATCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCCCGCTATATCAAGCTGCAGTCTC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACAGCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCCTCTCTGAGCCCTGCCGACAAGTATCTGTTCCCCTGC GACCCTACCGATATCAATTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TCCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA
配列番号 41	H. armigera アルコール形成レダクターゼ (HaFAR) MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLS VSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHS AATVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAP ADIDQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAA IKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSK STELKVYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLF QVIPAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPA DKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE
配列番号 42	HaFAR S60A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLAV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE

【表２７－２０】

配列番号 43	HaFAR S195A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGIAEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE
配列番号 44	HaFAR S298A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKASKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE
配列番号 45	HaFAR S378A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKAPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE
配列番号 46	HaFAR S394A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSAIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE
配列番号 47	HaFAR S418A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLAPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE

【表２７－２１】

配列番号 48	HaFAR S453A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKAYE
配列番号 49	Trichoplusia ni デサチュラーゼ MAVMAQTVQETATVLEEEARTVTLVAPKTTPRKYKYIYTNFLTFSYAHLAALYGLYLCFTS AKWETLLFSFVLFHMSNIGITAGAHRLWTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAITWARE HRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSDVYNNPVLKFQKKY AVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHIALFRYIFNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDKS ILPAQNLLVSFLASGEGFHNYHHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAYDLKSV SEDIIKQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYAKKE
配列番号 50	配列番号 11 によってコードされる T. pseudonana デサチュラーゼ TSMDFLSGDPFRTLVLAALVVIGFAAAWQCFYPPSIVGKPRTLSNGKLNTRIHGKLYDLSS FQHPGGPVALSLVQGRDGTALFESHHPFIPRKNLLQILSKYEVPSTEDSVSFIATLDELNG ESPYDWKDIENDDFVSDLRALVIEHFSPLAKERGVSLVESSKATPQRWMVVLLLLASFFLS IPLYLSGSWTFVVVTPILAWLAVVNYWHDATHFALSSNWILNAALPYLLPLLSSPSMWYHH HVIGHHAYTNISKRDPDLAHAPQLMREHKSIKWRPSHLNQTQLPRILFIWSIAVGIGLNLL NDVRALTKLSYNNVVRVEKMSSSRTLLHFLGRMLHIFVTTLWPFLAFPVWKAIVWATVPNA ILSLCFMLNTQINHLINTCAHASDNNFYKHQVVTAQNFGRSSAFCFIFSGGLNYQIEHHLL PTVNHCHLPALAPGVERLCKKHGVTYNSVEGYREAIIAHFAHTKDMSTKPTD
配列番号 51	配列番号 23 によってコードされる T. pseudonana Z11 デサチュラーゼ MDFLSGDPFRTLVLAALVVIGFAAAWQCFYPPSIVGKPRTLSNGKLNTRIHGKLYDLSSFQ HPGGPVALSLVQGRDGTALFESHHPFIPRKNLLQILSKYEVPSTEDSVSFIATLDELNGES PYDWKDIENDDFVSDLRALVIEHFSPLAKERGVSLVESSKATPQRWMVVLLLLASFFLSIP LYLSGSWTFVVVTPILAWLAVVNYWHDATHFALSSNWILNAALPYLLPLLSSPSMWYHHHV IGHHAYTNISKRDPDLAHAPQLMREHKSIKWRPSHLNQTQLPRILFIWSIAVGIGLNLLND VRALTKLSYNNVVRVEKMSSSRTLLHFLGRMLHIFVTTLWPFLAFPVWKAIVWATVPNAIL SLCFMLNTQINHLINTCAHASDNNFYKHQVVTAQNFGRSSAFCFIFSGGLNYQIEHHLLPT VNHCHLPALAPGVERLCKKHGVTYNSVEGYREAIIAHFAHTKDMSTKPTD
配列番号 52	Amyelois transitella デサチュラーゼ MVPNKGSSDVLSEHSEPQFTKLIAPQAGPRKYKIVYRNLLTFGYWHLSAVYGLYLCFTCAK WATILFAFFLYVIAEIGITGGAHRLWAHRTYKAKLPLEILLLIMNSIAFQDTAFTWARDHR LHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVKKHPEVKARGKYLSLDDLKNNPLLKFQKKYAI LVIGTLCFLMPTFVPVYFWGEGISTAWNINLLRYVMNLNMTFLVNSAAHIFGNKPYDKSIA SVQNISVSLATFGEGFHNYHHTYPWDYRAAELGNNRLNMTTAFIDFFAWIGWAYDLKSVPQ EAIAKRCAKTGDGTDMWGRKR

【表２７－２２】

配列番号 53	Agrotis segetum デサチュラーゼ MAQGVQTTTILREEEPSLTFVVPQEPRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWQT ILFSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLQIILMILNSIAFQNSAIDWVRDHRLHH KYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKRRGKELDMSDIYNNPVLRFQKKYAIPFI GAMCFGLPTFIPVYFWGETWSNAWHITMLRYILNLNITFLVNSAAHIWGYKPYDIKILPAQ NIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRAAELGNNYLNLTTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSSDVI KSKAERTGDGTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
配列番号 54	Helicoverpa zea デサチュラーゼ MAQSYQSTTVLSEEKELTLQHLVPQASPRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKW ATILFSYILFVLAEIGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLEILLMVFNSIAFQNSAIDWVRDHRL HHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKKRGKELNMSDIYNNPVLRFQKKYAIP FIGAVCFALPTMIPVYFWGETWSNAWHITMLRYIMNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDAKILP AQNVAVSVATGGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNSLNLTTKFIDLFAAIGWAYDLKTVSED MIKQRIKRTGDGTDLWGHEQNCDEVWDVKDKSS
配列番号 55	配列番号 1 によってコードされる Agrotis segetum FAR MPVLTSREDEKLSVPEFYAGKSIFVTGGTGFLGKVFIEKLLYCCPDIDKIYMLIREKKNLS IDERMSKFLDDPLFSRLKEERPGDLEKIVLIPGDITAPNLGLSAENERILLEKVSVIINSA ATVKFNEPLPIAWKINVEGTRMLLALSRRMKRIEVFIHISTAYSNASSDRIVVDEILYPAP ADMDQVYQLVKDGVTEEETERLLNGLPNTYTFTKALTEHLVAEHQTYVPTIIIRPSVVASI KDEPIRGWLCNWFGATGISVFTAKGLNRVLLGKASNIVDVIPVDYVANLVIVAGAKSGGQK SDELKIYNCCSSDCNPVTLKKIIKEFTEDTIKNKSHIMPLPGWFVFTKYKWLLTLLTIIFQ MLPMYLADVYRVLTGKIPRYMKLHHLVIQTRLGIDFFTSHSWVMKTDRVRELFGSLSLAEK HMFPCDPSSIDWTDYLQSYCYGVRRFLEKKK
配列番号 56	配列番号 2 によってコードされる Spodoptera littoralis FAR MVVLTSKEKSNMSVADFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIDKIYMLIREKKGQS IRERLTKIVDDPLFNRLKDKRPDDLGKIVLIPGDITVPGLGISEENETILTEKVSVVIHSA ATVKFNEPLATAWNVNVEGTRMIMALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNRAVIDEVLYPPPAD INDVHQHVKNGVTEEETEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQSYMPTIIVRPSIVGAIKD DPIRGWLANWYGATGLSVFTAKGLNRVIYGHSNHVVDLIPVDYVANLVIVAGAKTYHSNEV TIYNSCSSSCNPITMKRLVGLFIDYTVKHKSYVMPLPGWYVYSNYKWLVFLVTVIFQVIPA YLGDIGRRLLGKNPRYYKLQNLVAQTQEAVHFFTSHTWEIKSKRTSELFSSLSLTDQRMFP CDANRIDWTDYITDYCSGVRQFLEKIK
配列番号 57	配列番号 3 または 32 によってコードされる Helicoverpa armigera FAR MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIENIYMLIREKKGLSV SERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAA TVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADI DQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYVPTIIVRPSVVAAIKDE PLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELK VYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVIPAY VTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKADRVRELYASLSPADKYLFPC DPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE

【表２７－２３】

配列番号 58	配列番号 20 によってコードされる Ostrinia furnacalis Z9 デサチュラーゼ MAPNIKDGADLNGVLFEDDASTPDYALATAPVQKADNYPRKLVWRNIILFAYLHLAAVYGA YLFLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLILIIFNTVSFQDSA LDWSRDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKRKGKGLDLSDLYADPIL RFQKKYYLLLMPLGCFIMPTVVPVYFWGETWTNAFFVAALFRYTFILNVTWLVNSAAHKWG HKPYDSSIKPSENLSVSLFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNRLNFTTNFINFFAKIGW AYDLKTVSDEIIQNRVKRTGDGSHHLWGWGDKDQPKEEVNAAIRINPKDE
配列番号 59	配列番号 21 によってコードされる Lampronia capitella Z9 デサチュラーゼ MPPNVTEANGVLFENDVQTPDMGLEVAPVQKADERKIQLVWRNIIAFACLHLAAVYGAYLF FTSAIWQTDIFAYILYVMSGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLILVAFNTLAFQDSAIDW ARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLCRKHPELKRKGQGLDLSDLYADPIIRFQ KKYYLLLMPLACFVLPTIIPVYLWGESWKNAFFVAAMFRYTFILNVTWLVNSAAHKWGGKP YDKNIQPAQNISVAIFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNRLNFTTSFINFFASFGWAYD LKTVSDEIIQQRVKRTGDGSHHLRGWGDQDIPAEEAQAALRINRKDD
配列番号 60	配列番号 22 によってコードされる Helicoverpa zea Z9 デサチュラーゼ MAPNISEDVNGVLFESDAATPDLALSTPPVQKADNRPKQLVWRNILLFAYLHLAALYGGYL FLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRVILVIFNTVAFQDAAMD WARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLLADPILRF QKKYYLILMPLACFVMPTVIPVYFWGETWTNAFFVAAMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDK PYDKSIKPSENLSVAMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKIGWAY DLKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDENQSKEEIDAAIRINPKDD
配列番号 61	配列番号 28 によってコードされる Yarrowia lipolytica OLE1 リーダー配列を伴う Trichoplusia ni デサチュラーゼ MVKNVDQVDLSQVDTIASGRDVNYKVKYTSGVKTTPRKYKYIYTNFLTFSYAHLAALYGLY LCFTSAKWETLLFSFVLFHMSNIGITAGAHRLWTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAI TWAREHRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSDVYNNPVLK FQKKYAVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHIALFRYIFNLNVTFLVNSAAHIWGNK PYDKSILPAQNLLVSFLASGEGFHNYHHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAY DLKSVSEDIIKQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYAKKE
配列番号 62	配列番号 29 によってコードされる Yarrowia lipolytica OLE1 リーダー配列を伴う Helicoverpa zea デサチュラーゼ MVKNVDQVDLSQVDTIASGRDVNYKVKYTSGVRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFT SAKWATILFSYILFVLAEIGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLEILLMVFNSIAFQNSAIDWVR DHRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKKRGKELNMSDIYNNPVLRFQKK YAIPFIGAVCFALPTMIPVYFWGETWSNAWHITMLRYIMNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDA KILPAQNVAVSVATGGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNSLNLTTKFIDLFAAIGWAYDLKT VSEDMIKQRIKRTGDGTDLWGHEQNCDEVWDVKDKSS

【表２７－２４】

配列番号 63	配列番号 15 によってコードされる Candida albicans OLE1 リーダー配列を伴う Agrotis segetum デサチュラーゼ MTTVEQLETVDITKLNAIAAGTNKKVPMAQGVQTTTILREEEPSLTFVVPQEPRKYQIVYP NLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWQTILFSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYKAKLPL QIILMILNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKR RGKELDMSDIYNNPVLRFQKKYAIPFIGAMCFGLPTFIPVYFWGETWSNAWHITMLRYILN LNITFLVNSAAHIWGYKPYDIKILPAQNIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRAAELGNNYL NLTTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSSDVIKSKAERTGDGTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
配列番号 64	DTU WO 2016/207339_配列番号 2 からの Amyelois transitella デサチュラーゼ MVPNKGSSDVLSEHSEPQFTKLIAPQAGPRKYKIVYRNLLTFGYWHLSAVYGLYLCFTCAK WATILFAFFLYVIAEIGITGGAHRLWAHRTYKAKLPLEILLLIMNSIAFQDTAFTWARDHR LHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVKKHPEVKARGKYLSLDDLKNNPLLKFQKKYAI LVIGTLCFLMPTFVPVYFWGEGISTAWNINLLRYVMNLNMTFLVNSAAHIFGNKPYDKSIA SVQNISVSLATFGEGFHNYHHTYPWDYRAAELGNNRLNMTTAFIDFFAWIGWAYDLKSVPQ EAIAKRCAKTGDGTDMWGRKR
配列番号 65	DTU WO 2016/207339_配列番号 41 からの Spodoptera littoralis デサチュラーゼ MAQCVQTTTILEQKEEKTVTLLVPQAGKRKFEIVYFNIITFAYWHIAGLYGLYLCFTSTKW ATVLFSFFLFVVAEVGVTAGSHRLWSHKTYKAKLPLQILLMVMNSLAFQNTVIDWVRDHRL HHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVRKHPDVKKRGKEIDISDIYNNPVLRFQKKYAIP FIGAVCFVLPTLIPVYGWGETWTNAWHVAMLRYIMNLNVTFLVNSAAHIYGKRPYDKKILP SQNIAVSIATFGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNSLNFPTKFIDFFAWIGWAYDLK TVSKEMIKQRSKRTGDGTNLWGLEDVDTPEDLKNTKGE
配列番号 66	DTU WO 2016/207339_配列番号 43 からの Agrotis segetum デサチュラーゼ MAQGVQTTTILREEEPSLTFVVPQEPRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWQT ILFSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLQIILMILNSIAFQNSAIDWVRDHRLHH KYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKRRGKELDMSDIYNNPVLRFQKKYAIPFI GAMCFGLPTFIPVYFWGETWSNAWHITMLRYILNLNITFLVNSAAHIWGYKPYDIKILPAQ NIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRAAELGNNYLNLTTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSSDVI KSKAERTGDGTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
配列番号 67	DTU WO 2016/207339_配列番号 45 からの Trichoplusia ni デサチュラーゼ MAVMAQTVQETATVLEEEARTVTLVAPKTTPRKYKYIYTNFLTFSYAHLAALYGLYLCFTS AKWETLLFSFVLFHMSNIGITAGAHRLWTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAITWARE HRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSDVYNNPVLKFQKKY AVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHIALFRYIFNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDKS ILPAQNLLVSFLASGEGFHNYHHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAYDLKSV SEDIIKQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYAKKE

【表２７－２５】

配列番号 68	DTU WO 2016/207339_配列番号 1 からの Amyelois transitella デサチュラーゼ atggttccaaacaagggttcctctgatgttttgtctgaacattctgaaccacaattcacca agttgattgctccacaagctggtccaagaaagtacaaaatcgtttacagaaacttgttgac cttcggttactggcatttgtctgctgtttatggtttgtacttgtgtttcacttgtgctaag tgggctactattttgttcgctttcttcttgtacgttatcgccgaaattggtattactggtg gtgctcatagattatgggctcatagaacttacaaagccaagttgccattggaaatcttgtt gttgatcatgaactccattgccttccaagatactgcttttacttgggctagagatcataga ttgcatcacaagtactctgatactgatgctgatccacataatgctactagaggtttcttct actctcatgttggttggttgttggttaagaaacacccagaagttaaggctagaggtaagta cttgtctttggatgacttgaagaacaacccttttgttgaagttccaaaagaagtacgccatt ttggtcattggtactttgtgctttttgatgccaactttcgttccagtttacttttggggtg aaggtatttctactgcctggaacattaacttgttaagatacgtcatgaacttgaacatgac ctttttggttaactccgctgctcatatttttggtaacaagccatacgataagtctatcgcc tctgttcaaaacatctctgtttctttggctactttcggtgaaggtttccataactaccatc atacttatccatgggattacagagctgctgaattgggtaacaatagattgaatatgaccac cgccttcattgatttctttgcttggattggttgggcctacgatttgaaatctgttccacaa gaagctattgctaagagatgtgctaaaactggtgatggtactgatatgtggggtagaaaga gatga
配列番号 69	DTU WO 2016/207339_配列番号 40 からの Spodoptera littoralis デサチュラーゼ ggacactgacatggactgaaggagtagagaatcggcccgtggagttggccttcattttcag tcttatctctcggtgttatggtagtcacttatatcggtattaaaataagtgaataaggctt gtaaaaatggcgcaatgtgtacaaacaacaacgattttggaacaaaaagaagagaaaacag taactttgctggtacctcaagcgggaaagaggaagtttgaaattgtgtattttaatatcat caccttcgcttactggcatatagctggactatatggcctttatttgtgcttcacttcaaca aaatgggcgacagttttattctcattctttctattcgtcgtagcagaagtaggggtcacgg ctggctcccacagactttggtcgcataaaacttacaaagcaaaactacctttacaaattct gctaatggtgatgaattcccttgcatttcaaaacacagtcattgattgggtgagagaccat cgactccatcataagtatagcgacactgatgccgatccccataatgcctcccgaggatttt tctattcgcacgtcggttggctgcttgtgagaaaacaccctgatgtcaagaaacgaggaaa ggaaattgatatatctgatatttacaacaatccggtactgaggttccagaagaagtacgca attcctttcatcggggcagtttgtttcgtcttaccaacattgataccggtttacggttggg gagaaacctggactaatgcctggcacgtcgccatgctgcggtacattatgaaccttaacgt caccttcctggtcaacagcgctgctcatatatatggaaagagaccttatgacaagaagatc ctaccatctcaaaacatagctgtgtccattgcaacctttggggaaggtttccataattatc atcatgtatttccatgggattatcgcgcagctgaacttggaaataacagtttgaatttccc tacgaaatttattgatttctttgcgtggatcggatgggcgtatgacctaaagactgtttcg aaagaaatgataaaacaaaggtcaaaaagaactggtgatggaactaatctatgggggttag aagatgtggataccccggaggatttaaaaaatacaaaaggcgaataggcaaacccttaaac tcaaacagtgaggtttaatgtgatatttagaattagaattaatttatttgaaattaaatga aggttttggataactgtttttaataataaaaatagtttttcgattaaattccttagattat tttaaaggaaatgtataaggtactcgcgtggttagcaacccagcagtccctgtttatctgt ttttatgaatttattctatgaatgtagatgtcgcatgaaattttaaaatgttgcatttgta taattttacttatgaataaataaatttatttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaa

【表２７－２６】

配列番号 70	DTU WO 2016/207339_配列番号 42 からの Agrotis segetum デサチュラーゼ atggctcaaggtgtccaaacaactacgatattgagggaggaagagccgtcattgactttcg tggtacctcaagaaccgagaaagtatcaaatcgtgtacccaaaccttatcacatttgggta ctggcatatagctggtttatacgggctatatttgtgctttacttcggcaaaatggcaaaca attttattcagtttcatgctcgttgtgttagcagagttgggaataacagccggcgctcaca ggttatgggcccacaaaacatataaagcgaagcttcccttacaaattatcctgatgatact gaactccattgccttccaaaattccgccattgattgggtgagggaccaccgtctccatcat aagtacagtgacactgatgcagaccctcacaatgctactcgtggtttcttctattctcatg ttggatggttgctcgtaagaaaacatccagaagtcaagagacgtggaaaggaacttgacat gtctgatatttacaacaatccagtgctgagatttcaaaagaagtatgctatacccttcatc ggggcaatgtgcttcggattaccaacttttatccctgtttacttctggggagaaacctgga gtaatgcttggcatatcaccatgcttcggtacatcctcaacctaaacattactttcctggt caacagtgctgctcatatctggggatacaaaccttatgacatcaaaatattgcctgcccaa aatatagcagtttccatagtaaccggcggcgaagtttccataactaccaccacgtttttc cttgggattatcgtgcagcagaattggggaacaattatcttaatttgacgactaagttcat agatttcttcgcttggatcggatgggcttacgatcttaagacggtgtccagtgatgttata aaaagtaaggcggaaagaactggtgatgggacgaatctttggggtttagaagacaaaggtg aagaagatttttgaaaatctggaaagacaattaa
配列番号 71	DTU WO 2016/207339_配列番号 44 からの Trichoplusia ni デサチュラーゼ atggctgtgatggctcaaacagtacaagaaacggctacagtgttggaagaggaagctcgca cagtgactcttgtggctccaaagacaacgccaaggaaatataaatatatatacaccaactt tcttacattttcatatgcgcatttagctgcattatacggactttatttgtgcttcacctct gcgaaatgggaaacattgctattctctttcgtactcttccacatgtcaaatataggcatca ccgcaggggctcaccgactctggactcacaagactttcaaagccaaattgcctttggaaat tgtcctcatgatattcaactctttagcctttcaaaacacggctattacatgggctagagaa catcggctacatcacaaatacagcgatactgatgctgatccccacaatgcgtcaagagggt tcttctactcgcatgttggctggctattagtaaaaaaacatcccgatgtcctgaaatatgg aaaaactatagacatgtcggatgtatacaataatcctgtgttaaaatttcagaaaaagtac gcagtacccttaattggaacagtttgttttgctcttccaactttgattccagtctactgtt ggggcgaatcgtggaacaacgcttggcacatagccttatttcgatacatattcaatcttaa cgtgactttcctagtcaacagtgctgcgcatatctgggggaataagccttatgataaaagc atcttgcccgctcaaaacctgctggtttccttcctagcaagtggagaaggcttccataatt accatcacgtctttccatgggattaccgcacagcagaattagggaataacttcctgaattt gacgacgctgttcattgatttttgtgcctggtttggatgggcttatgacttgaagtctgta tcagaggatattataaaacagagagctaaacgaacaggtgacggttcttcaggggtcattt ggggatgggacgacaaagacatggaccgcgatataaaatctaaagctaacatttttatgc taaaaaggaatga

【表２７－２７】

配列番号 72	Spodoptera exigua FAR-様タンパク質 VIII 核酸配列 (Genbank ID KR781121.1,コドン最適化) ATGGTGGTGCTGACCAGCAAGGAGAAGTCCAACATGTCTGTGGCCGACTTCTACGCCGGCA AGTCCGTGTTTATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCT GTACTCTTGCCCAGACATCGATAAGATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCAGAGC ATCAGGGAGCGCCTGACCAAGATCGTGGACGATCCCCTGTTCAATAGGCTGAAGGAGAAGC GCCCTGGCGACCTGGATAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGATGTGACAGTGCCCGGCCTGGG CATCTCCGACGAGAACGAGGCCATCCTGATCGATAAGGTGTCTGTGGTCATCCACAGCGCC GCCACAGTGAAGTTCAATGAGCCCCTGGAGACCGCCTGGAACGTGAATGTGGAGGGCACAA GGATGATCATGGCCCTGTCTCGGAAGATGAAGAGAATCGAGATCTTTATCCACATCAGCAC CGCCTACACCAACACAAATAGGGCAGTGGTGGACGAGGTGCTGTACCCACCTCCAGCCGAC ATCAACGAGGTGCACCAGTATGTGAAGAATGGCATCACAGAGGAGGAGACCGAGAAGATCC TGAACGGCAGGCCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACCGAGCACCTGGTGGCAGA GAACCAGGCCTATATGCCTACAATCATCGTGCGGCCATCCATCGTGGGCGCCATCAAGGAC GATCCTATCAGAGGCTGGCTGGCAAACTGGTACGGAGCAACAGGACTGAGCGTGTTCACCG CCAAGGGCCTGAATCGCGTGATCTACGGCCAGAGCAGCCACGTGGTGGACCTGATCCCTGT GGATTATGTGGCAAACCTGGTCATCGTGGCAGGAGCAAAGACATACCGGTCCAACGAGGTG ACCATCTATAATTCTTGCTCTAGCTCCTGTAATCCAATCACAATGGAGCGGCTGGTGGGCC TGTTCATCGACGATACAGTGAAGCACAACAGCTACGTGATGCCCCTGCCTGGCTGGTACGT GTATTCCAATTACCGGTGGCTGGTGTATCTGGTGACCATCATCTTTCAGATGATCCCAGCC TATCTGGCAGACATCGGCCGGAGACTGCTGGGCAAGAATCCCAGATACTATAAGCTGCAGT CCCTGGTGGCACAGACCCAGGAGGCAGTGCACTTCTTTACATCTCACACCTGGGAGATCAA GAGCAAGAGGACCTCCGAGCTGTTCGCCTCTCTGAGCCACACAGACCAGCGCATCTTTCCT TGCGATGCCAAGAAGATCGACTGGACAGATTACATCACCGATTATTGTAGCGGCGTGCGGC AGTTCCTGGAGAAGAAGAAGTGA
配列番号 73	Spodoptera exigua FAR-様タンパク質 VIII アミノ酸配列 (Genbank ID ALJ94061.1) MVVLTSKEKSNMSVADFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDIDKIYMLIREKKGQS IRERLTKIVDDPLFNRLKEKRPGDLDKIVLIPGDVTVPGLGISDENEAILIDKVSVVIHSA ATVKFNEPLETAWNVNVEGTRMIMALSRKMKRIEIFIHISTAYTNTNRAVVDEVLYPPPAD INEVHQYVKNGITEEETEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYMPTIIVRPSIVGAIKD DPIRGWLANWYGATGLSVFTAKGLNRVIYGQSSHVVDLIPVDYVANLVIVAGAKTYRSNEV TIYNSCSSSCNPITMERLVGLFIDDTVKHNSYVMPLPGWYVYSNYRWLVYLVTIIFQMIPA YLADIGRRLLGKNPRYYKLQSLVAQTQEAVHFFTSHTWEIKSKRTSELFASLSHTDQRIFP CDAKKIDWTDYITDYCSGVRQFLEKKK

【表２７－２８】

配列番号 74	Euglena gracilis 脂肪酸アシルコエンザイムＡ レダクターゼ 核酸配列、コドン最適化 ATGAACGACTTCTACGCCGGCAAGGGCGTGTTTCTGACAGGCGTGACCGGCTTCGTGGGCA AGATGGTGGTGGAGAAGATCCTGCGGTCTCTGCCAACCGTGGGCAGGCTGTATGTGCTGGT GCGCCCAAAGGCAGGCACAGATCCTCACCAGAGACTGCACAGCGAAGTGTGGAGCAGCGCC GGATTTGACGTGGTGAGGGAGAAAGTGGGAGGACCTGCAGCCTTCGATGCACTGATCCGCG AGAAGGTGGTGCCTGTGCCAGGCGACATGGTGAAGGATAGGTTTGGCCTGGACGATGCAGC ATACCGCTCCCTGGCAGCCAACGTGAATGTGATCATCCACATGGCCGCCACAATCGACTTC ACCGAGAGGCTGGATGTGGCCGTGTCTCTGAACGTGCTGGGCACAGTGCGGGTGCTGACCC TGGCAAGGAGAGCCAGAGAGCTGGGCGCCCTGCACAGCGTGGTGCACGTGTCCACCTGCTA CGTGAACTCCAATCAGCCCCCTGGCGCCCGGCTGAGAGAGCAGCTGTATCCCCTGCCTTTT GACCCACGGGAGATGTGCACAAGAATCCTGGACATGAGCCCTCGGGAGATCGATCTGTTCG GCCCACAGCTGCTGAAGCAGTACGGCTTCCCCAATACCTATACCTTCACCAAGTGCATGGC AGAGCAGCTGGGCGCCCAGATCGCACACGACCTGCCATTCGCCATCTTTAGACCAGCAATC ATCGGAGCCGCCCTGTCCGAGCCATTTCCCGGCTGGTGCGATTCTGCCAGCGCCTGTGGAG CCGTGTTCCTGGCAGTGGGACTGGGCGTGCTGCAGGAGCTGCAGGGAAACGCCTCTAGCGT GTGCGACCTGATCCCTGTGGATCACGTGGTGAATATGCTGCTGGTGACAGCAGCATATACC GCATCTGCCCCACCAGCCGACCCTAGCCCATCCTCTCTGGCCCTGTCCCCTCCACAGCTGC CACTGGCCACACTGCCCCCTGGCACCGTGGCAGATGTGCCAATCTACCACTGTGGCACCTC TGCCGGCCCTAACGCCGTGAATTGGGGCAGGATCAAGGTGAGCCTGGTGGAGTATTGGAAC GCACACCCAATCGCAAAGACCAAGGCAGCAATCGCCCTGCTGCCCGTGTGGAGGTTCGAGC TGAGCTTTCTGCTGAAGAGGCGCCTGCCTGCAACAGCCCTGTCCCTGGTGGCCTCTCTGCC AGGCGCATCCGCCGCCGTGCGGAGACAGGCAGAGCAGACAGAGCGGCTGGTGGGCAAGATG AGAAAGCTGGTGGACACCTTTCAGTCCTTCGTGTTTTGGGCCTGGTACTTCCAGACAGAGA GCAGCGCCAGGCTGCTGGCCTCTCTGTGCCCAGAGGACCGCGAGACCTTTAACTGGGACCC CAGGAGGATCGGATGGAGGGCCTGGGTGGAGAATTACTGTTATGGCCTGGTGCGGTATGTG CTGAAGCAGCCAATCGGCGATAGACCACCAGTGGCAGCAGAGGAGCTGGCAAGCAATAGGT TCCTGCGCGCCATGCTGTGA
配列番号 75	Euglena gracilis 脂肪酸アシルコエンザイムＡレダクターゼ アミノ酸配列 (ADI60057.1) MNDFYAGKGVFLTGVTGFVGKMVVEKILRSLPTVGRLYVLVRPKAGTDPHQRLHSEVWSSA GFDVVREKVGGPAAFDALIREKVVPVPGDMVKDRFGLDDAAYRSLAANVNVIIHMAATIDF TERLDVAVSLNVLGTVRVLTLARRARELGALHSVVHVSTCYVNSNQPPGARLREQLYPLPF DPREMCTRILDMSPREIDLFGPQLLKQYGFPNTYTFTKCMAEQLGAQIAHDLPFAIFRPAI IGAALSEPFPGWCDSASACGAVFLAVGLGVLQELQGNASSVCDLIPVDHVVNMLLVTAAYT ASAPPADPSPSSLALSPPQLPLATLPPGTVADVPIYHCGTSAGPNAVNWGRIKVSLVEYWN AHPIAKTKAAIALLPVWRFELSFLLKRRLPATALSLVASLPGASAAVRRQAEQTERLVGKM RKLVDTFQSFVFWAWYFQTESSARLLASLCPEDRETFNWDPRRIGWRAWVENYCYGLVRYV LKQPIGDRPPVAAEELASNRFLRAML

【表２７－２９】

配列番号 76	Yponomeuta evonymellus 脂肪酸アシル CoA レダクターゼ II 核酸配列、コドン最適化 ATGGTGCAGCTGAAGGAGGACTCCGTGGCCGCCTTTTACGCCGAGAAGTCTATCTTCATCA CAGGCGGCACCGGCTTTCTGGGCAAGGTGCTGATCGAGAAGCTGCTGTACTCCTGCAAGGC CGTGGACCAGATCTATGTGCTGATCCGGAAGAAGAAGGATCAGACACCTTCTGAGCGCATC GCCCAGCTGCTGGAGTCTGAGCTGTTCAGCCGGCTGAGAAAGGACGATCCAAGCGCCCTGA AGAAGGTGGTGCCCGTGGTGGGCGACCTGACCATGCCTAACCTGGGACTGAGCGCCGCAGT GCAGGATCTGATCGTGACAAAGGTGTCCATCATCTTCCACGTGGCCGCCACCGTGAAGTTT AACGAGAGGATGAAGAATGCCCTGGCCAACAATGTGGAGGCCACCAGAGAAGTGATCAACC TGTGCCACCGCCTGGAGAAGGTGGACGCCTTCATCCACGTGTCCACAGCCTATTCTAATAC CGATCAGAAGGTGGTGGAGGAGCGCGTGTACCCACCTCCAGCACCTCTGAGCGAGGTGTAT GCCTTTGTGACCAACAATGGCGACGATATGGACATCATCCAGAACCTGCTGAATGGCCGGC CAAATACCTACACATATACCAAGGCCCTGGCCGAGGACATCGTGCTGAAGGAGCACGGCGG CATCCCTACAGCCATCATCAGACCAAGCATCGTGCTGTCCGTGCTGAAGGAGCCCATCCCT GGCTGGCTGGACAACTGGAATGGACCAACCGGACTGCTGCACGCCAGCTCCCAGGGAGTGC ACTGCTCCATGCTGGGCTCTGGCAGCAACGTGGCCGACCTGATCCCTGTGGACATCGTGAC AAATCTGATGATCGTGGTGGCCTCTCGGTGCAAGAAGAGCAACGGCCTGAAGGTGTACAAT TCCTGTTCTGGCACCACAAACCCAATCGCCTATCAGGCCTTCACCAAGATGTTTCTGGATA GCTGTATCTCCAGGGGCTGGAACAAGGTGCCATTCCCCATGCTGCTGTTTGTGAAGTGGGC CTTCCTGAATCGCGTGCTGAAGTTCTTCCTGGTCATCGTGCCATTCTTTCTGATCGACGTG TACCTGCGGTTCTTTGGCAAGCCCAATTACATGAGAATGATCACATATACCAAGAAGGCCG AGGATCTGATGACATTCTTTACCTCTCACGAGTGGCAGTTCAAGGACGGCAACGTGCGGGA TCTGATCAATATGATGAGCCCCGAGGATAGAAAGATCTTTTACTGCGACCCCGATGAGATC CACTGGAAGCCTTACTTCGACGATTATTGCGTGGGCGTGTTTAAGTATCTGCTGAAGAGGA AGGTGTGA
配列番号 77	Yponomeuta evonymellus 脂肪酸アシル CoA レダクターゼ II アミノ酸配列(ADD62439.1) MVQLKEDSVAAFYAEKSIFITGGTGFLGKVLIEKLLYSCKAVDQIYVLIRKKKDQTPSERI AQLLESELFSRLRKDDPSALKKVVPVVGDLTMPNLGLSAAVQDLIVTKVSIIFHVAATVKF NERMKNALANNVEATREVINLCHRLEKVDAFIHVSTAYSNTDQKVVEERVYPPPAPLSEVY AFVTNNGDDMDIIQNLLNGRPNTYTYTKALAEDIVLKEHGGIPTAIIRPSIVLSVLKEPIP GWLDNWNGPTGLLHASSQGVHCSMLGSGSNVADLIPVDIVTNLMIVVASRCKKSNGLKVYN SCSGTTNPIAYQAFTKMFLDSCISRGWNKVPFPMLLFVKWAFLNRVLKFFLVIVPFFLIDV YLRFFGKPNYMRMITYTKKAEDLMTFFTSHEWQFKDGNVRDLINMMSPEDRKIFYCDPDEI HWKPYFDDYCVGVFKYLLKRKV
配列番号 78	Drosophila melanogaster 脂肪酸デサチュラーゼ (Q9N9Z8) mapysriyhqdkssretgvlfeddaqtvdsdlttdrfqlkraekrrlplvwrniilfalvh laalyglhsiftraklattlfaaglyiigmlgvtagahrlwahrtykakwplrlllvifnt iafqdavyhwardhrvhhkysetdadphnatrgfffshvgwllckkhpdikekgrgldlsd lradpilmfqrkhyyilmplacfvlptvipmvywnetlasswfvatmfrwcfqlnmtwlvn saahkfgnrpydktmnptqnafvsaftfgegwhnyhhafpwdyktaewgcyslnittafid lfakigwaydlktvapdviqrrvlrtgdgshelwgwgdkdltaedarnvllvdksr
配列番号 79	Lampronia capitella アシル CoA-デルタ 11-デサチュラーゼ (ABX71630.1) mppypeevdtnhifeedisheeskpalkplvapqadnrkpeivplnlitfgyghlaaiygi ylcftsakwativfafvlyicaelgitagahrlwshrsykaklplrlilllfntlafqnta idwvrdhrmhhkysdtdadphnatrgfffshvgwlltrkhpevkrrgkdidmmdiyndsll kfqkkyaipfvglvcfviptlmpmyfwnetlnnswhiatmlryivnlnmtflvnsaahiwg ykpydksikpvqnitvsililgegfhnyhhvfpwdyrtselgndflnfttlfinlfakigw aydlktasdkvvaarrkrtgdgtnlwgwedkslneeerqaatvlypnkylnlkd

【表２７－３０】

配列番号 80	Cydia pomonella デサチュラーゼ (AIM40221.1) mapnvtdvngvlfesdaatpdlalanapvqqaddspriyvwrniilfaylhiaalyggylf lvsakwqtdifayflyvasglgitagahrlwahksykakwplrlilvifntiafqdsaidw ardhrmhhkysetdadphnatrgfffshigwllvrkhpelkrkgkgldlsdlyadpilrfq kkyylilmplacfvlptvipvylwnetwtnaffvaalfryafilnvtwlvnsaahkwgdkp ydksikpsenisvslfafgegfhnyhhtfpwdyktaelssnrlnfttkfinffakigwayd mktvsdeiiqkrvnrtgdgshhlwgwgdkdhskeevnaavrinpkdd
配列番号 81	Spodoptera exigua FAR-様タンパク質 VII 核酸配列(KF805977.1), コドン最適化 ATGACGTATAGACAAATAAATGAATTTGATGCTGAAAAGTTTACGGCAGCTACAGTACCGA CAAGCTACGTATCAGTACCAGATTTTTATGCGGGCAAGACAATTTTTATCACTGGTGGAAC TGGATTTCTTGGAAAGGTGTTTCTAGAGAAACTTCTTTACAGTTGTAAAGATGTTGAAACC GTATACATTTTGATCAGAGAGAAAAAAGGCAAAACACCTCAGCAAAGAGTTGAAGATCTTT TTAACAAACCGATTTTCTCAAGATTGAAACAGAAGGACTCTCAGTGTATGAAGAAAGTCAC TGCAATAATTGGTGACCTTAGTGAACCTGGTCTTGGCATATCAAAAGATGATGAAGAACTA CTTTTGCAAAAGGTATCTGTAGTATTCCATGTCGCAGCCAATGTTCAGTTTTACAAGGAAT TCAAAGAGATTATAAATACGAATGTTGGTGGGACAAAATACGTACTCCAATTGTGTCAGCG AATAAAAGATATTAAGGCATTTGTCCATATTTCCACAGCCTACTGTCACACAGACCAAAAG GTATTAGAAGAGAGAATATACCCCCCTCCAGCAGAACTCAGTGAAGTCCTGAAGTTCCTTC AGCAGCCACAGCATGACAAGAAACAGATTAAGGAATTATTTAAGAAACAACCAAACAGTTA CACCTTTGCCAAGGCTTTAGCAGAAACCTACATTGCTGAGAACTGCGGACGCGTCCCCACA ATTATCATCAGACCTTCTATTATATCAGCATCACTGAAAGAGCCGCTACCAGGATGGGTGG ATTCATGGAACGGAGCCACAGGCCTCATCACAGCTAGCTACAACGGCGCCAACAGAGTGCT TCTCGGCGAAGGCAGCAACTTCCTCGACCTGATCCCAGTTGACTTTGTTGCTAACCTGGCA ATTGTAGCTGCTGCTAAATGTACTAGCTCTTTGAAAGTTTACAATTGCTGCTCAAGCGGAT GTAACCCTTTAACATTGAAACAATTGGTCAGCCACATGAATAATGTCGGATTTGATAAAAA CGTCTCCATAATATTCACCAATAACAAAGCCTCGCTTTCCACATTGACATTTTTCCTTCAA ACAACGCCATCTTTCACCGCTGATATGTTTCTGAGAGTCACGGGAAAGTCACCAAGGTACA TGAAAATCCAGTCAAAACTGACCATCGCTCGGAATGCCTTAAATTTTTTCACCTGTCATTC CTGGGTCATGAAGGCTGATAATTCTAGAAGACTGTATGCTTCCTTGTCATTACACGACCGA CATACGTTCCCTTGTGATCCTACAGACATAGACTGGAAGAAGTACATAAATATATACATAG AAGGAATTAATCAGTTCTTAATGAAGAAACGTAGTTAA
配列番号 82	Spodoptera exigua FAR-様タンパク質 VII アミノ酸配列(AIS85928.1) MTYRQINEFDAEKFTAATVPTSYVSVPDFYAGKTIFITGGTGFLGKVFLEKLLYSCKDVET VYILIREKKGKTPQQRVEDLFNKPIFSRLKQKDSQCMKKVTAIIGDLSEPGLGISKDDEEL LLQKVSVVFHVAANVQFYKEFKEIINTNVGGTKYVLQLCQRIKDIKAFVHISTAYCHTDQK VLEERIYPPPAELSEVLKFLQQPQHDKKQIKELFKKQPNSYTFAKALAETYIAENCGRVPT IIIRPSIISASLKEPLPGWVDSWNGATGLITASYNGANRVLLGEGSNFLDLIPVDFVANLA IVAAAKCTSSLKVYNCCSSGCNPLTLKQLVSHMNNVGFDKNVSIIFTNNKASLSTLTFFLQ TTPSFTADMFLRVTGKSPRYMKIQSKLTIARNALNFFTCHSWVMKADNSRRLYASLSLHDR HTFPCDPTDIDWKKYINIYIEGINQFLMKKRS

【表２７－３１】

配列番号 83	HaFAR S60A FAR2 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGGCCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA
配列番号 84	HaFAR S195A FAR3 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCGCCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA

【表２７－３２】

配列番号 85	HaFAR S298A FAR4 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGGCCAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA
配列番号 86	HaFAR S378A FAR5 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGGCCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA

【表２７－３３】

配列番号 87	HaFAR S394A FAR6 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCGCCATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA
配列番号 88	HaFAR S418A FAR7 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGGCCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA

【表２７－３４】

配列番号 89	HaFAR S453A FAR8 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGGCCTATGAGTGA
配列番号 90	コドン最適化野生型 HaFAR （FAR9; SPV916 株） ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCCGAGTTCTACGCCGGCAAGA GCGTGTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTA CAGCTGCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGTG TCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCC CTGCCGATCTGGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCAT CAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCC ACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGA TGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATCAGCACAGC CTACACCAACACAAATAGGGAGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATC GATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCCTGA ACGGCAGACCCAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAA CCAGGCCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAG CCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCA AGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCAGTGGA TTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAG GTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTACATCTT TACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTAC GTGACCGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCAAGCTGCAGAGCC TGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGC CGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCCCTTGC GACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACT TTCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGA

【表２７－３５】

配列番号 91	**PdDGAT1A** (*Phoenix dactylifera* DGAT1A) ATGGCCATCCCATCCGATAGAGAGACCCTGGAGAGGGCACCAGAGCCTTCTCCAGCAAGCG ACCTGCAGAGCTCCCTGCGGAGAAGGCTGCACTCTACCGTGGCAGCAGTGGTGGTGCCAGA TTCTAGCTCCAAGACATCTAGCCCCAGCGCCGAGAACCTGACCACAGACAGCGGAGAGGAT TCCAGGGGCGACACCTCCTCTGACGCCGATACAAGGGATAGGGTGGTGGACGGAGTGGATA GGGAGGAGGAGAACAAGACCGTGAGCGTGCTGAATGGCAGACAGTACGAGGACGGAGGCGG CAGGGGACAGGGACAGGGCACAGGCGGCGGCGTGCCCGCCAAGTTTCTGTATAGGGCATCT GCCCCTGCACACAGGAAGGTGAAGGAGAGCCCACTGAGCTCCGATGCCATCTTCAAGCAGA GCCACGCCGGCCTGCTGAACCTGTGCATCGTGGTGCTGATCGCCGTGAACTCCAGGCTGAT CATCGAGAATCTGATGAAGTACGGCCTGCTGATCCGCGCCGGCTATTGGTTTTCTAGCAAG TCCCTGCGGGACTGGCCTCTGCTGATGTGCTGTCTGACCCTGCCAGCATTTCCTCTGGGAG CCTTCATGGTGGAGAAGCTGGCCCAGCACAATTTCATCTCCGAGTCTGTGGTCATCAGCCT GCACGTGATCATCACCACAGCCGAGCTGCTGTACCCAGTGATCGTGATCCTGAGATGCGAT TCTGCCGTGCTGAGCGGCATCACACTGATGCTGTTTGCCAGCGTGGTGTGGCTGAAGCTGG TGTCCTACGCCCACACCAACTATGACATGAGGACACTGAGCAAGTCCATCGACAAGGAGGA TATGTACTCCAAGTGTCCAGAGATCGATAATCTGAAGGGCGACTCCTTTAAGTCTCTGGTG TATTTCATGGTGGCCCCCACCCTGTGCTACCAGCCAAGCTATCCAAGGACCACCTGCATCA GGAAGGGATGGGTCATCCGCCAGGTGGTGAAGCTGGTCATCTTCACCGGCCTGATGGGCTT CATCATCGAGCAGTACATCAACCCCATCGTGCAGAATTCCCAGCACCCTCTGAAGGGCAAC TTTCTGAATGCCATCGAGCGGGTGCTGAAGCTGTCTGTGCCCACCCTGTACGTGTGGCTGT GCATGTTCTATTGTTTCTTTCACCTGTGGCTGAACATCCTGGCCGAGCTGCTGTGCTTTGG CGATAGAGAGTTCTACAAGGACTGGTGGAACGCCAAGACAATCGAGGAGTATTGGAGGATG TGGAATATGCCTGTGCACCGCTGGATGATCCGGCACATCTACTTCCCTTGTCTGAGAAATG GCCTGCCAAGGGCCGTGGCCATCCTGATCTCCTTTCTGGTGTCTGCCATCTTCCACGAGAT CTGCATCGCCGTGCCCTGTCACATCTTTAAGTTCTGGGCCTTTATCGGCATCATGTTCCAG ATCCCCCTGGTCATCCTGACCAAGTATCTGCAGCACAAGTTTACAAACTCCATGGTGGGCA ATATGATCTTCTGGTTCTTTTTCTCTATCCTGGGCCAGCCTATGTGCGTGCTGCTGTACTA TCACGACGTGATGAATAGAAAGGTGAGGACCGAGTGA
配列番号 92	**PdDGAT1A** (*Phoenix dactylifera* DGAT1A)配列番号 91 によってコードされるタンパク質 MAIPSDRETLERAPEPSPASDLQSSLRRRLHSTVAAVVVPDSSSKTSSPSAENLTTDSGED SRGDTSSDADTRDRVVDGVDREEENKTVSVLNGRQYEDGGGRGQGQGTGGGVPAKFLYRAS APAHRKVKESPLSSDAIFKQSHAGLLNLCIVVLIAVNSRLIIENLMKYGLLIRAGYWFSSK SLRDWPLLMCCLTLPAFPLGAFMVEKLAQHNFISESVVISLHVIITTAELLYPVIVILRCD SAVLSGITLMLFASVVWLKLVSYAHTNYDMRTLSKSIDKEDMYSKCPEIDNLKGDSFKSLV YFMVAPTLCYQPSYPRTTCIRKGWVIRQVVKLVIFTGLMGFIIEQYINPIVQNSQHPLKGN FLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLWLNILAELLCFGDREFYKDWWNAKTIEEYWRM WNMPVHRWMIRHIYFPCLRNGLPRAVAILISFLVSAIFHEICIAVPCHIFKFWAFIGIMFQ IPLVILTKYLQHKFTNSMVGNMIFWFFFSILGQPMCVLLYYHDVMNRKVRTE
配列番号 93	酵素発現のための **TEF プロモーター** GAGACCGGGTTGGCGGCGCATTTGTGTCCCAAAAAACAGCCCCAATTGCCCCAATTGACCC CAAATTGACCCAGTAGCGGGCCCAACCCCGGCGAGAGCCCCCTTCTCCCCACATATCAAAC CTCCCCCGGTTCCCACACTTGCCGTTAAGGGCGTAGGGTACTGCAGTCTGGAATCTACGCT TGTTCAGACTTTGTACTAGTTTCTTTGTCTGGCCATCCGGGTAACCCATGCCGGACGCAAA ATAGACTACTGAAAATTTTTTTGCTTTGTGGTTGGGACTTTAGCCAAGGGTATAAAAGACC ACCGTCCCCGAATTACCTTTCCTCTTCTTTTCTCTCTCTCCTTGTCAACTCACACCCGAAA TCGTTAAGCATTTCCTTCTGAGTATAAGAATCATTCAAA

【表２７－３６】

配列番号 94	**DST076**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGCACATCGAGTCTGAGAACTGCCCCGGCAGGTTTAAGGAGGTGAACATGGCCCCTAATG CCACCGATGCCAATGGCGTGCTGTTCGAGACCGATGCCGCCACACCTGACCTGGCCCTGCC ACACGCACCTGTGCAGCAGGCCGACAACTACCCAAAGAAGTACGTGTGGCGCAATATCATC CTGTTTGCCTACCTGCACATCGCCGCCCTGTACGGCGGCTATCTGTTTCTGTTCCACGCCA AGTGGCAGACCGATATCTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCTGGACTGGGAATCACAGC AGGAGCACACAGGCTGTGGGCCCACAAGAGCTACAAGGCCAAGTGGCCTCTGAGACTGATC CTGGTCATCTTCAACACACTGGCCTTTCAGGACTCTGCCATCGATTGGAGCAGGGACCACC GCATGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCGATCCCCACAATGCCACACGGGGCTTCTT TTTCTCTCACATCGGCTGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCTGAGCTGAAGAGAAAGGGCAAG GGCCTGGACCTGTCCGATCTGTATGCCGACCCAATCCTGAGATTTCAGAAGAAGTACTATC TGATCCTGATGCCCCTGACCTGTTTCGTGCTGCCAACAGTGATCCCCGTGTACTATTGGGG CGAGACCTGGACAAACGCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTAGGTACGCCTTCATCCTGAAC GTGACCTGGCTGGTGAATAGCGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAGCCTTATGACCGCAACA TCAAGCCATCCGAGAATATCAGCGTGTCCATGTTTGCCCTGGGCGAGGGCTTCCACAACTA CCACCACACCTTCCCATGGGATTATAAGACAGCCGAGCTGGGCAACAATATGCTGAACTTC ACCACAAACTTCATCAACTTCTTCGCCAAGATCGGCTGGGCCTACGATCTGAAGACCGTGT CCGACGAGATCGTGCGGTCTAGAGCAAAGAGGACAGGCGACGGAAGCCACCACCTGTGGGG ATGGGGCGACAAGGATCACTCCAGGGAGGAGATGGCTGCCGCCATCCGCATCCACCCCAAG GACGATTGA
配列番号 95	**DST076**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ （配列番号 94 によってコードされる） MHIESENCPGRFKEVNMAPNATDANGVLFETDAATPDLALPHAPVQQADNYPKKYVWRNII LFAYLHIAALYGGYLFLFHAKWQTDIFAYILYVMSGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLI LVIFNTLAFQDSAIDWSRDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKRKGK GLDLSDLYADPILRFQKKYYLILMPLTCFVLPTVIPVYYWGETWTNAFFVAALFRYAFILN VTWLVNSAAHKWGDKPYDRNIKPSENISVSMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNMLNF TTNFINFFAKIGWAYDLKTVSDEIVRSRAKRTGDGSHHLWGWGDKDHSREEMAAAIRIHPK DD
配列番号 96	**DST180**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGGCCCCAAACATCTCTGACGATGTGAATGGCGTGCTGTTTGAGAGCGATGCAGCAACAC CAGACCTGGCCCTGGCAAGCCCCCCTGTGCAGAAGGCCGATAACCGGCCCAAGCAGTACGT GTGGAGAAATATCCTGCTGTTCGCATATCTGCACGCCGCCGCCCTGTACGGCGGCTATCTG TTTCTGACAAGCGCCAAGTGGCAGACCGACGTGTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCCG GACTGGGAATCACAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCACACAAGTCTTACAAGGCCAAGTG GCCCCTGAAAGTGATCCTGATCATCTTTAACACCATCGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGAT TGGGCAAGGGACCACAGAATGCACCACAAGTATAGCGAGACAGACGCCGATCCTCACAATG CCACCAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTGGTGCGCAAGCACCCAGATCT GAAGGAGAAGGGCAAGGGCCTGGACATGAGCGATCTGCAGGCCGACCCCATCCTGCGGTTT CAGAAGAAGTACTATCTGCTGCTGATGCCTCTGGCCTGCTTTGTGATGCCAACAGTGATCC CCGTGTACTTCTGGGGCGAGACCTGGAACAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTAGATA TGCCTTCATCCTGAACGTGACCTGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAG CCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACATGAGCGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCG AGGGCTTCCACAATTACCACCACACATTCCCCTGGGATTATAAGACCGCCGAGCTGGGCAA CAATAAGCTGAACTTTACCACAACCTTCATCAACTTCTTCGCCAAGCTGGGCTGGGCCTAC GACATGAAGACAGTGTCCGACGATATCGTGAAGAACAGGGTGAAGCGCACCGGCGATGGAT CTCACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGAACCAGAGCAAGGAGGAGATCGCCTCCGCCAT CCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA

【表２７－３７】

配列番号 97	**DST180**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ （配列番号 96 によってコードされる） MAPNISDDVNGVLFESDAATPDLALASPPVQKADNRPKQYVWRNILLFAYLHAAALYGGYL FLTSAKWQTDVFAYILYVMSGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLKVILIIFNTIAFQDAAMD WARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLQADPILRF QKKYYLLLMPLACFVMPTVIPVYFWGETWNNAFFVAAMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDK PYDKSIKPSENMSVAMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKLGWAY DMKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDKNQSKEEIASAIRINPKDD
配列番号 98	**DST181**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGGCCCCAAACATCTCTGAGGATGCCAATGGCGTGCTGTTTGAGAGCGATGCAGCAACAC CAGACCTGGCCCTGGCAAGCCCACCTGTGCAGAAGGCAGACAACAGGCCCAAGCAGTACGT GTGGAGAAATATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACCTGGCCGCCCTGTACGGCGGCTATCTG TTTCTGTTCAGCGCCAAGTGGCAGACAGACGTGTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCCG GACTGGGAATCACCGCAGGAGCACACAGACTGTGGGCACACAAGTCTTACAAGGCCAAGTG GCCCCTGAAAGTGATCCTGATCATCTTTAACACCATCGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGAT TGGGCAAGGGACCACAGAATGCACCACAAGTATAGCGAGACAGACGCCGATCCTCACAATG CCACCAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTGGTGCGCAAGCACCCAGACCT GAAGAAGAAGGGCAAGGGCCTGGACATGAGCGATCTGCTGAACGACCCCATCCTGAAGTTT CAGAAGAAGTACTATCTGCTGCTGATGCCTCTGGCCTGCTTCGTGATGCCAACAATGATCC CCGTGTACCTGTGGGGCGAGACATGGACCAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTCGGTA TGCCTTCATCCTGAACGTGACCTGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAG CCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACCTGTCTGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCG AGGGCTTCCACAATTACCACCACACATTCCCCTGGGATTATAAGACCGCCGAGCTGGGCAA CCAGAAGCTGAACTTCACCACAACCTTCATCAACTTTTTCGCCAAGCTGGGCTGGGCCTAC GACATGAAGACAGTGTCCGACGATATCGTGAAGAATAGGGTGAAGCGCACCGGCGATGGAT CTCACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGAACCAGAGCAAGGAGGAGATCGCCTCCGCCAT CCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA
配列番号 99	**DST181**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ（配列番号 98 によってコードされる） MAPNISEDANGVLFESDAATPDLALASPPVQKADNRPKQYVWRNIILFAYLHLAALYGGYL FLFSAKWQTDVFAYILYVMSGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLKVILIIFNTIAFQDAAMD WARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKKKGKGLDMSDLLNDPILKF QKKYYLLLMPLACFVMPTMIPVYLWGETWTNAFFVAAMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDK PYDKSIKPSENLSVAMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNQKLNFTTTFINFFAKLGWAY DMKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDKNQSKEEIASAIRINPKDD

【表２７－３８】

配列番号 100	**DST183**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGGCCCCAAACATCAGCGAGGATGTGAATGGCGTGCTGTTCGAGTCCGATGCCGCCACAC CAGACCTGGCCCTGTCTACCCCACCTGTGCAGAAGGCAGACAACAGGCCCAAGCAGCTGGT GTGGAGAAATATCCTGCTGTTTGCATACCTGCACCTGGCAGCACAGTACGGAGGCTATCTG TTTCTGTTCTCTGCCAAGTGGCAGACAGATATCTTCGCCTACATCCTGTATGTGATCAGCG GACTGGGAATCACCGCAGGAGCACACCGGCTGTGGGCCCACAAGTCCTACAAGGCCAAGTG GCCTCTGAGAGTGATCCTGGTCATCTTCAACACCGTGGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGAT TGGGCAAGGGACCACAGAATGCACCACAAGTATTCTGAGACAGACGCCGATCCTCACAATG CCACCAGGGGCTTCTTTTTCAGCCACATCGGCTGGCTGCTGGTGCGCAAGCACCCAGATCT GAAGGAGAAGGGCAAGGGCCTGGACATGAGCGATCTGCTGGCCGACCCCATCCTGAGGTTT CAGAAGAAGTACTATCTGATCCTGATGCCTCTGGCCTGCTTTGTGATGCCAACAGTGATCC CCGTGTACTTCTGGGGCGAGACATGGACCAACGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTCGCTA TGCCTTCATCCTGAACGTGACCTGGCTGGTGAATTCTGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAG CCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACCTGTCTGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCG AGGGCTTCCACAATTACCACCACACATTCCCCTGGGACTATAAGACCGCCGAGCTGGGCAA CAATAAGCTGAACTTTACCACAACCTTCATCAACTTCTTCGCCAAGATCGGCTGGGCCTAT GATCTGAAGACAGTGTCCGACGATATCGTGAAGAATAGGGTGAAGAGGACCGGCGACGGAA GCCACCACCTGTGGGGCTGGGGCGATGAGAACCAGTCCAAGGAGGAGATCGACGCCGCCAT CCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA
配列番号 101	**DST183**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ（配列番号 100 によってコードされる） MAPNISEDVNGVLFESDAATPDLALSTPPVQKADNRPKQLVWRNILLFAYLHLAAQYGGYL FLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRVILVIFNTVAFQDAAMD WARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLLADPILRF QKKYYLILMPLACFVMPTVIPVYFWGETWTNAFFVAAMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDK PYDKSIKPSENLSVAMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKIGWAY DLKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDENQSKEEIDAAIRINPKDD
配列番号 102	**DST189**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGGCCCCTAACGTGACCGAGGAGAATGGCGTGCTGTTCGAGTCTGATGCAGCAACACCTG ACCTGGCCCTGGCAAGAGAGCCAGTGCAGCAGGCAGATAGCTCCCCACGGGTGTACGTGTG GAGAAACATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACATCGCCGCCGTGTACGGCGGCTATCTGTTT CTGTTCTCCGCCAAGTGGCAGACCGACATCTTCGCCTACCTGCTGTATGTGGCCTCTGGAC TGGGAATCACAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCCCACAAGAGCTACAAGGCCAAGTGGCC CCTGAGACTGATCCTGACCATCTTTAACACCACAGCCTTTCAGGACAGCGCCATCGATTGG GCCCGGGACCACAGAATGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCGATCCCCACAATGCCA CAAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTGGTGAGGAAGCACCCTGAGCTGAA GCGCAAGGGCAAGGGCCTGGACCTGTCTGATCTGTACGCCGATCCTATCCTGCGCTTTCAG AAGAAGTACTATCTGATCCTGATGCCACTGGCCTGCTTCATCCTGCCCACCGTGATCCCCG TGTACCTGTGGAACGAGACATGGAGCAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTCGGTATAC CTTCATCCTGAACGTGACATGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAGCCA TACGACAAGTCCATCAAGCCCTCTGAGAACCTGTCTGTGAGCCTGTTTGCCTTCGGCGAGG GCTTTCACAATTACCACCACACCTTCCCATGGGATTATAAGACAGCCGAGCTGGGCAACCA CCGGCTGAACTTCACCACAAAGTTCATCAACTTTTTCGCCAAGATCGGCTGGGCCTATGAT ATGAAGACCGTGTCTCACGAGATCGTGCAGCAGAGGGTGAAGAGGACAGGCGACGGAAGCC ACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGGATCACGCACAGGAGGAGATCGACGCCGCCATCAG AATCAATCCCAAGGACGATTGA

【表２７－３９】

配列番号 103	**DST189**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ （配列番号 102 によってコードされる） MAPNVTEENGVLFESDAATPDLALAREPVQQADSSPRVYVWRNIILFAYLHIAAVYGGYLF LFSAKWQTDIFAYLLYVASGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLILTIFNTTAFQDSAIDW ARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKRKGKGLDLSDLYADPILRFQ KKYYLILMPLACFILPTVIPVYLWNETWSNAFFVAALFRYTFILNVTWLVNSAAHKWGDKP YDKSIKPSENLSVSLFAFGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNHRLNFTTKFINFFAKIGWAYD MKTVSHEIVQQRVKRTGDGSHHLWGWGDKDHAQEEIDAAIRINPKDD
配列番号 104	**DST192**_コード配列 Z9 デサチュラーゼ ATGGATTTTCTGAACGAGATCGACAATTGCCCCGAGCGGCTGAGAAAGCCAGAGAAGATGG CCCCCAACGTGACCGAGGAGAATGGCGTGCTGTTCGAGTCCGATGCAGCAACCCCAGACCT GGCCCTGGCAAGGACACCTGTGGAGCAGGCCGACGATTCTCCAAGGATCTACGTGTGGCGC AACATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACCTGGCCGCCATCTACGGCGGCTATCTGTTTCTGT TCTCCGCCAAGTGGCAGACCGATATCTTCGCCTACCTGCTGTATGTGGCATCTGGACTGGG AATCACAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCACACAAGAGCTACAAGGCCAAGTGGCCTCTG CGCCTGATCCTGACCATCTTTAACACAATCGCCTTTCAGGACAGCGCCATCGATTGGGCCA GGGACCACCGCATGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCGATCCACACAATGCCACACG GGGCTTCTTTTTCTCTCACATCGGATGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCAGAGCTGAAGAGA AAGGGCAAGGGCCTGGACCTGTCTGATCTGTACAGCGATCCCATCCTGAGATTTCAGAAGA AGTACTATATGATCCTGATGCCTCTGGCCTGTTTCATCCTGCCCACCGTGATCCCCGTGTA TATGTGGAACGAGACATGGAGCAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTAGGTATACCTTC ATCCTGAACGTGACATGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGGCGATAAGCCTTACG ACAAGTCCATCAAGCCATCTGAGAACATGAGCGTGTCCCTGTTTGCCTTCGGCGAGGGCTT TCACAATTACCACCACACCTTCCCTTGGGACTATAAGACAGCCGAGCTGGGCAACCACCGG CTGAACTTCACCACAAAGTTCATCAACTTCTTCGCCAAGATCGGCTGGGCCTATGATATGA AGACCGTGTCTCAGGAGATCGTGCAGCAGCGGGTGAAGAGAACAGGCGACGGAAGCCACCA CCTGTGGGGATGGGGCGACAAGGATCACGCACAGGAGGAGATCAACGCCGCCATCCGCATC AATCCAAAGGACGATTGA
配列番号 105	**DST192**_アミノ酸 Z9 デサチュラーゼ （配列番号 104 によってコードされる） MDFLNEIDNCPERLRKPEKMAPNVTEENGVLFESDAATPDLALARTPVEQADDSPRIYVWR NIILFAYLHLAAIYGGYLFLFSAKWQTDIFAYLLYVASGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPL RLILTIFNTIAFQDSAIDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKR KGKGLDLSDLYSDPILRFQKKYYMILMPLACFILPTVIPVYMWNETWSNAFFVAALFRYTF ILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENMSVSLFAFGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNHR LNFTTKFINFFAKIGWAYDMKTVSQEIVQQRVKRTGDGSHHLWGWGDKDHAQEEINAAIRI NPKDD

【０７３２】

前述の詳細な説明は理解を明解にするために提供されるに過ぎず、当業者には変更形態が自明であろうとおり、そこから不必要な限定が理解されてはならない。

【０７３３】

本開示はその具体的な実施形態に関連して説明されているが、更なる変更形態が可能であることが理解されるであろうと共に、本願は、一般に本開示の原理に従い、且つ本開示が関係する技術分野内で公知の又は慣習的な実践の範囲内にあるとおりの、並びに以上に示される及び以下の添付の特許請求の範囲にあるとおりの本質的な特徴に適用され得るとおりの本開示からのかかる逸脱を含む、本開示の任意の変形形態、使用、又は適合形態を包含することが意図される。

【０７３４】

参照による援用

[0863] 本明細書に引用されるあらゆる参考文献、論文、刊行物、特許、特許公報及び特許出願は、あらゆる目的のために、全体が参照により援用される。本願は、以下のそれ

ぞれの参照によりその全体を本明細書に援用する：２０１５年１１月１８日に出願された米国仮特許出願第６２／２５７，０５４号、２０１６年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／３５１，６０５号及び２０１６年１１月１８日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第Ｓ２０１６／０６２８５２号。

【０７３５】

[0864] しかしながら、本明細書に引用されるあらゆる参考文献、論文、刊行物、特許、特許公報及び特許出願の言及は、それらが有効な先行技術を構成するか又は世界のいずれの国でも共通の一般知識の一部を成すという承認又は何らかの形態の示唆ではなく、そのように解釈されるべきではない。

【０７３６】

本発明の更なる実施形態

[0865] 本開示によって考えられる他の主題は、以下の番号付けられた実施形態に記載されている。

【０７３７】

１．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物であって、

（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び

（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子

を含む、組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７３８】

２．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態１に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７３９】

３．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：

（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；

（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；

（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；

（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬ

ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び
（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態１又は２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４０】

４．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：
（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；
（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；
（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；
（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び
（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の欠失を含む、実施形態１又は２に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４１】

５．脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１１－１６：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への飽和脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する、実施形態１～４のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４２】

６．一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態１～５のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４３】

７．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態１～６のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４４】

８．アルコールデヒドロゲナーゼは、表３ａから選択される、実施形態７に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。

【０７４５】
９．C_6～C_{24}脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態７又は８に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７４６】
１０．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７４７】
１１．アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される、実施形態１０に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７４８】
１２．C_6～C_{24}脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ及びＺ１３－１８：Ａｃからなる群から選択される、実施形態１０又は１１に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７４９】
１３．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、
一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び
一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルコールの、対応するC_6～C_{24}脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子
を更に含む、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７５０】
１４．一不飽和又は多価不飽和C_6～C_{24}脂肪アルデヒド及びC_6～C_{24}脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態１３に記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７５１】
１５．脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号６４、６５、６６及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む脂肪アシルデサチュラーゼを含まない、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７５２】
１６．脂肪アシルデサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カブラヤガ（Agrotis segetum）又はイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来のデサチュラーゼから選択される脂肪アシルデサチュラーゼを含まない、実施形態１～１５のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物。
【０７５３】
１７．飽和C_6～C_{24}脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ

６～Ｃ２４脂肪アルコールを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を培養することを含む方法。

【０７５４】

１８．一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態１７に記載の方法。

【０７５５】

１９．組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、以下：

（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；

（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；

（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；

（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び

（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態１７又は１８に記載の方法。

【０７５６】

２０．一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルコールを回収するステップを更に含む、実施形態１７又は１８に記載の方法。

【０７５７】

２１．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態２０に記載の方法。

【０７５８】

２２．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態２０に記載の方法。

【０７５９】

２３．飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を培養することを含む方法。

【０７６０】

２４．Ｃ６～Ｃ２４脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態２３に記載の方法。

【０７６１】
２５．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドを回収するステップを更に含む、実施形態２３又は２４に記載の方法。
【０７６２】
２６．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態２５に記載の方法。
【０７６３】
２７．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態２５に記載の方法。
【０７６４】
２８．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を培養することを含む方法。
【０７６５】
２９．Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ及びＺ１３－１８：Ａｃからなる群から選択される、実施形態２８に記載の方法。
【０７６６】
３０．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートを回収するステップを更に含む、実施形態２８に記載の方法。
【０７６７】
３１．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態２８に記載の方法。
【０７６８】
３２．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態２８に記載の方法。
【０７６９】
３３．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒド及びＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒド及びＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物を培養することを含む方法。
【０７７０】
３４．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒド及びＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態３３に記載の方法。
【０７７１】
３５．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを生成する能力を有するヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物に改変する方法であって、以下：
（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する、配列番号３９、５４、６０、６２、７８、７９、８０、９５、９７、９９、１０１、１０３及び１０５からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの核酸分子；及び
（ｂ）（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールへの変換を触媒する、配列番号４１～４８、５７、７３、７５及び７７からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪ア

シルレダクターゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの核酸分子
をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを含む方法。

【０７７２】

３６．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む、実施形態３５に記載の方法。

【０７７３】

３７．ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である、実施形態３５又は３６に記載の方法。

【０７７４】

３８．以下：

（ｉ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ（ＰＯＸ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ（ＰＯＸ２）、ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ（ＰＯＸ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ（ＰＯＸ４）、ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ（ＰＯＸ５）、ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ（ＰＯＸ６）からなる群から選択される１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；

（ｉｉ）ＹＡＬＩ０Ｆ０９６０３ｇ（ＦＡＤＨ）、ＹＡＬＩ０Ｄ２５６３０ｇ（ＡＤＨ１）、ＹＡＬＩ０Ｅ１７７８７ｇ（ＡＤＨ２）、ＹＡＬＩ０Ａ１６３７９ｇ（ＡＤＨ３）、ＹＡＬＩ０Ｅ１５８１８ｇ（ＡＤＨ４）、ＹＡＬＩ０Ｄ０２１６７ｇ（ＡＤＨ５）、ＹＡＬＩ０Ａ１５１４７ｇ（ＡＤＨ６）、ＹＡＬＩ０Ｅ０７７６６ｇ（ＡＤＨ７）からなる群から選択される１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；

（ｉｉｉ）（脂肪）アルコールオキシダーゼＹＡＬＩ０Ｂ１４０１４ｇ（ＦＡＯ１）；

（ｉｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、（ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（Ａｌｋ１２）からなる群から選択される１つ以上のシトクロムＰ４５０酵素；及び

（ｖ）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７９１ｇ（ＤＧＡ１）及びＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ（ＤＧＡ２）からなる群から選択される１つ以上のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼから選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾をヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入することを更に含む、実施形態３５～３７のいずれか１つに記載の方法。

【０７７５】

３９．脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１１－１６：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する、実施形態３５～３８のいずれか１つに記載の方法。

【０７７６】

４０．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態３５～３９のいずれか１つに記載の方法。

【０７７７】

４１．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応するＣ$_6$～Ｃ$_{24}$脂

肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入するか又は組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中で発現させることを更に含む、実施形態３５～４０のいずれか１つに記載の方法。

【０７７８】

４２．アルコールデヒドロゲナーゼは、表３ａから選択される、実施形態４１に記載の方法。

【０７７９】

４３．Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態４１に記載の方法。

【０７８０】

４４．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入するか又は組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中で発現させることを更に含む、実施形態３５～４３のいずれか１つに記載の方法。

【０７８１】

４５．アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される、実施形態４４に記載の方法。

【０７８２】

４６．Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ及びＺ１３－１８：Ａｃからなる群から選択される、実施形態４４に記載の方法。

【０７８３】

４７．

一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び

一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールの、対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子

を組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中に導入するか又は組換えヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）微生物中で発現させることを更に含む、実施形態３５～４６のいずれか１つに記載の方法。

【０７８４】

４８．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒド及びＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートは、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｃ、Ｚ１３－１８：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｌｄ、Ｚ１１－１４：Ａｌｄ、Ｅ１１－１４：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態３５～４７のいずれか１つに記載の方法。

【０７８５】

４９．脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号６４、６５、６６及び６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む脂肪アシルデサチュラーゼを含まない、実施形態３５～４８のいずれか１つに記載の方法。

【０７８６】

５０．脂肪アシルデサチュラーゼは、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カブラヤガ（Agrotis segetum）又はイラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）由来のデサチュラーゼから選択される脂肪アシルデサチュラーゼを含まない、実施形態３５～４９のいずれか１つに記載の方法。

【０７８７】

５１．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルデヒドに変換される、実施形態１７～２２のいずれか１つに記載の方法。

【０７８８】

５３．一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートに変換される、実施形態１７～２２のいずれか１つに記載の方法。

【０７８９】

５４．化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アルコールを対応するＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アセテートにエステル化する、実施形態５３に記載の方法。

【０７９０】

５５．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを生成する能力を有する組換え微生物であって、

（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；

（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{4}$～Ｃ$_{22}$脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び

（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子

を含む組換え微生物。

【０７９１】

５６．組換え微生物は、好ましくは、≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態５５に記載の組換え微生物。

【０７９２】

５７．組換え微生物は、好ましくは、≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、アシルトランスフェラーゼは、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及びジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）からなる群から選択される、実施形態５５～５６のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９３】

５８．組換え微生物は、好ましくは、≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、

アシルトランスフェラーゼは、表５ｂから選択される、実施形態５５～５７のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９４】

５９．組換え微生物は、好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態５５～５８のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９５】

６０．組換え微生物は、好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含み、アシルグリセロールリパーゼは、表５ｃから選択される、実施形態５５～５９のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９６】

６１．組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦C_{18}脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６０のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９７】

６２．組換え微生物は、

（ｉ）１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；

（ｉｉ）１つ以上のアシルトランスフェラーゼ；

（ｉｉｉ）１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ；

（ｉｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；

（ｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールオキシダーゼ；及び

（ｖｉ）１つ以上のシトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼ

から選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６１のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９８】

６３．組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６２のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０７９９】

６４．組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）Ｙ

ＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ並びにカンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６３のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８００】

６５．組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ並びにカンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６４のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０１】

６６．組換え微生物は、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む、実施形態５５～６５のいずれか１つに記載の方法。

【０８０２】

６７．脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される、実施形態５５～６６のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０３】

６８．脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３、７８～８０並びにGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する、実施形態５５～６７のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０４】

６９．アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される、実施形態５５～６８のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０５】

７０．脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される、実施形態５５～６９のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０６】

７１．脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する、実施形態５５～７０のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０７】

７２．脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｅ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ８－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１０－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１２－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１４－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１０：アシル－ｃｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ６Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ８Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１０Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１２Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３Ｅ１６－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３Ｚ５－１０：アシル－ＣｏＡ、

Ｚ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する、実施形態５５～７１のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０８】

７３．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態５５～７２のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８０９】

７４．組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態５５～７３のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８１０】

７５．アルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ｃ４ＨＮ７８、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｎ９ＤＡ８５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｒ８ＸＷ２４、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ａ０ＧＧＭ５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１１７Ｎ１５８及びノストック・プンクチフォルメ（Nostoc punctiforme）ＹＰ＿００１８６５３２４からなる群から選択される、実施形態７４に記載の組換え微生物。

【０８１１】

７６．組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態５５～７５のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８１２】

７７．≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態５５～７６のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８１３】

７８．組換え微生物は、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を更に含む、実施形態５５～７７のいずれか１つに記載の組換え微生物。

【０８１４】

７９．アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される、実施形態７８に記載の組換え微生物。

【０８１５】

８０．≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ及びＺ１１－１６：Ａｃからなる群から選択される、実施形態７８に記載の組換え微生物。

【０８１６】

８１．組換え微生物は、

一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼから選択される酵素をコードする少

なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び
一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子
を更に含む、実施形態５５～８０のいずれか１つに記載の組換え微生物。
【０８１７】
８２．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒド及び≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態８１に記載の組換え微生物。
【０８１８】
８３．組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）及びカンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）からなる群から選択される酵母である、実施形態５５～８２のいずれか１つに記載の組換え微生物。
【０８１９】
８４．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態５５～８３のいずれか１つに記載の組換え微生物を培養することを含む方法。
【０８２０】
８５．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態８４に記載の方法。
【０８２１】
８６．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを回収するステップを更に含む、実施形態８４～８５のいずれか１つに記載の方法。
【０８２２】
８７．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態８６に記載の方法。
【０８２３】
８８．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態８６に記載の方法。
【０８２４】
８９．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを生成する能力を有する微生物に改変する方法であって、以下：
（ａ）飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒する脂肪アシルデサチュラーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子；
（ｂ）アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性の１つ以上の連続サイクル後、（ａ）からの一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡの、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡへの変換を触媒するアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子であって、所与のサイクルは、そのサイクルにおける出発一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪アシル－ＣｏＡ基質と比べて２つの炭素切断を有する一不飽和又は多価不飽和Ｃ$_{4}$～Ｃ$_{22}$脂肪アシル－ＣｏＡ中間体を生成する、少なくとも１つの外因性核酸分子；及び
（ｃ）（ｂ）からの一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アシル－ＣｏＡの、対応する

一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールへの変換を触媒する脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼをコードする少なくとも１つの外因性核酸分子
を微生物中に導入することを含む方法。
【０８２５】
９０．微生物は、MATA ura3-302::SUC2 Δpox1 Δpox2 Δpox3 Δpox4 Δpox5 Δpox6 Δfadh Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5 Δadh6 Δadh7 Δfao1::URA3である、実施形態８９に記載の方法。
【０８２６】
９１．好ましくは、≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９０のいずれか１つに記載の方法。
【０８２７】
９２．好ましくは、≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含み、アシルトランスフェラーゼは、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、グリセロールリン脂質アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＬＡＴ）及びジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ）からなる群から選択される、実施形態８９～９１のいずれか１つに記載の方法。
【０８２８】
９３．好ましくは、≦Ｃ１８脂肪アシル－ＣｏＡを保持するアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含み、アシルトランスフェラーゼは、表５ｂから選択される、実施形態８９～９２のいずれか１つに記載の方法。
【０８２９】
９４．好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９３のいずれか１つに記載の方法。
【０８３０】
９５．好ましくは、＞Ｃ１６、＞Ｃ１４、＞Ｃ１２又は＞Ｃ１０アシルグリセロール基質のエステル結合を加水分解するアシルグリセロールリパーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含み、アシルグリセロールリパーゼは、表５ｃから選択される、実施形態８９～９４のいずれか１つに記載の方法。
【０８３１】
９６．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ１８脂肪アルコールの生成のための生合成経路と競合する経路における反応を触媒する１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９５のいずれか１つに記載の方法。
【０８３２】
９７．
（ｉ）１つ以上のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ；
（ｉｉ）１つ以上のアシルトランスフェラーゼ；
（ｉｉｉ）１つ以上のアシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ；
（ｉｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールデヒドロゲナーゼ；
（ｖ）１つ以上の（脂肪）アルコールオキシダーゼ；及び
（ｖｉ）１つ以上のシトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼ
から選択される１つ以上の内因性酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９６のいずれか１つ

に記載の方法。
【０８３３】
９８．Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ１（ＹＡＬＩ０Ｅ３２８３５ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ２（ＹＡＬＩ０Ｆ１０８５７ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ３（ＹＡＬＩ０Ｄ２４７５０ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ４（ＹＡＬＩ０Ｅ２７６５４ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ５（ＹＡＬＩ０Ｃ２３８５９ｇ）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＰＯＸ６（ＹＡＬＩ０Ｅ０６５６７ｇ）；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＰＯＸ１（ＹＧＬ２０５Ｗ）；カンジダ属（Candida）ＰＯＸ２（ＣａＯ１９．１６５５、ＣａＯ１９．９２２４、ＣＴＲＧ＿０２３７４、Ｍ１８２５９）、カンジダ属（Candida）ＰＯＸ４（ＣａＯ１９．１６５２、ＣａＯ１９．９２２１、ＣＴＲＧ＿０２３７７、Ｍ１２１６０）及びカンジダ属（Candida）ＰＯＸ５（ＣａＯ１９．５７２３、ＣａＯ１９．１３１４６、ＣＴＲＧ＿０２７２１、Ｍ１２１６１）からなる群から選択される１つ以上の内因性アシル－ＣｏＡオキシダーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９７のいずれか１つに記載の方法。
【０８３４】
９９．Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ００２０９ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１８９６４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１９５１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４０１４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ１６７９７ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２７６９ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ０７９８６ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＢＬ０１１ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＤＬ０５２ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ１７５Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＰＲ１３９Ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＮＲ００８ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ２４５ｃ並びにカンジダ属（Candida）Ｉ５０３＿０２５７７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２６３０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．７８８１、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０２４３７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４３７、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１０４３、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．８６４５、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４７５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３４３９、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４３９０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６９４１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１４２０３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０６２０９からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルトランスフェラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９８のいずれか１つに記載の方法。
【０８３５】
１００．Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ３２０３５ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｄ１７５３４ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ１００１０ｇ、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１４５２０ｇ及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ００５２８ｇ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ１４０ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＭＲ３１３ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＲ０８９ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＯＲ０８１ｃ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＫＬ０９４Ｗ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＬ０１２Ｗ及びＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）ＹＬＲ０２０Ｃ並びにカンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．２０５０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９５９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１１３８、カンジダ属（Candida）Ｗ５Ｑ＿０３３９８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０００５７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．５４２６、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２８８１、カンジダ属（Ca

ndida）ＣＴＲＧ＿０６１８５、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．４８６４、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１２３２８、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０３３６０、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．６５０１、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１３８５４、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０５０４９、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．１８８７、カンジダ属（Candida）ＣａＯ１９．９４４３、カンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０１６８３及びカンジダ属（Candida）ＣＴＲＧ＿０４６３０からなる群から選択される１つ以上の内因性アシルグリセロールリパーゼ及び／又はステロールエステルエステラーゼ酵素の活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～９９のいずれか１つに記載の方法。

【０８３６】

１０１．Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２５９８２ｇ（ＡＬＫ１）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｆ０１３２０ｇ（ＡＬＫ２）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｅ２３４７４ｇ（ＡＬＫ３）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８１６ｇ（ＡＬＫ４）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ１３８３８ｇ（ＡＬＫ５）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０１８４８ｇ（ＡＬＫ６）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ１５４８８ｇ（ＡＬＫ７）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１２１２２ｇ（ＡＬＫ８）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ０６２４８ｇ（ＡＬＫ９）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｂ２０７０２ｇ（ＡＬＫ１０）、Ｙ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ｃ１００５４ｇ（ＡＬＫ１１）及びＹ．リポリティカ（Y. lipolytica）ＹＡＬＩ０Ａ２０１３０ｇ（ＡＬＫ１２）からなる群から選択される１つ以上の内因性シトクロムＰ４５０モノオキシゲナーゼの活性の欠失、破壊、変異及び／又は低下を含む１つ以上の修飾を更に含む、実施形態８９～１００のいずれか１つに記載の方法。

【０８３７】

１０２．脂肪アシルデサチュラーゼは、アルギロタエニア・ベルチナナ（Argyrotaenia velutinana）、ハスモンヨトウ（Spodoptera litura）、イネヨトウ（Sesamia inferens）、タバコスズメガ（Manduca sexta）、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）、ハスオビハマキ（Choristoneura rosaceana）、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）、エジプトヨトウ（Spodoptera littoralis）、カラントシュートボーラー（Lampronia capitella）、クルミマダラメイガ（Amyelois transitella）、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）、カブラヤガ（Agrotis segetum）、アワノメイガ（Ostrinia furnicalis）及びタラシオシラ・シュードナナ（Thalassiosira pseudonana）由来の脂肪アシルデサチュラーゼから選択される、実施形態８９～１０１のいずれか１つに記載の方法。

【０８３８】

１０３．脂肪アシルデサチュラーゼは、配列番号３９、４９～５４、５８～６３並びにGenBank受託番号ＡＦ４１６７３８、ＡＧＨ１２２１７．１、ＡＩＩ２１９４３．１、ＣＡＪ４３４３０．２、ＡＦ４４１２２１、ＡＡＦ８１７８７．１、ＡＦ５４５４８１、ＡＪ２７１４１４、ＡＹ３６２８７９、ＡＢＸ７１６３０．１、ＮＰ００１２９９５９４．１、Ｑ９Ｎ９Ｚ８、ＡＢＸ７１６３０．１及びＡＩＭ４０２２１．１からなる群から選択される脂肪アシルデサチュラーゼに対する少なくとも９５％の配列同一性を有する、実施形態８９～１０２のいずれか１つに記載の方法。

【０８３９】

１０４．アシル－ＣｏＡオキシダーゼは、表５ａから選択される、実施形態８９～１０３のいずれか１つに記載の方法。

【０８４０】

１０５．脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、カブラヤガ（Agrotis segetum）、シロイチモジヨトウ（Spodoptera exigua）、エジプトヨトウ（Spodoptera litt

oralis）、ミドリムシ（Euglena gracilis）、サクラスガ（Yponomeuta evonymellus）及びオオタバコガ（Helicoverpa armigera）由来の脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼから選択される、実施形態８９～１０４のいずれか１つに記載の方法。

【０８４１】

１０６．脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼは、配列番号１～３、３２、４１～４８、５５～５７、７３、７５、７７及び８２からなる群から選択される脂肪アルコール形成脂肪アシルレダクターゼに対する少なくとも９０％の配列同一性を有する、実施形態８９～１０５のいずれか１つに記載の方法。

【０８４２】

１０７．脂肪アシルデサチュラーゼは、Ｅ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ８－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１０－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１２－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１４－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１０：アシル－ｃｏＡ、Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ７Ｚ９－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ９Ｚ１１－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｅ６Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｅ８Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１０Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｅ１２Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｅ８－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｅ１０－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｅ１２－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｅ１４－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１３Ｅ１６－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１－１８：アシル－ＣｏＡ、Ｚ３Ｚ５－１０：アシル－ＣｏＡ、Ｚ５Ｚ７－１２：アシル－ＣｏＡ、Ｚ７Ｚ９－１４：アシル－ＣｏＡ、Ｚ９Ｚ１１－１６：アシル－ＣｏＡ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：アシル－ＣｏＡ及びＺ１３Ｚ１５－１８：アシル－ＣｏＡから選択される一不飽和又は多価不飽和中間体への脂肪アシル－ＣｏＡの変換を触媒する、実施形態８９～１０６のいずれか１つに記載の方法。

【０８４３】

１０８．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、Ｅ５－１０：ＯＨ、Ｚ８－１２：ＯＨ、Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１－１４：ＯＨ、Ｚ１１－１６：ＯＨ、Ｅ１１－１４：ＯＨ、Ｅ８Ｅ１０－１２：ＯＨ、Ｅ７Ｚ９－１２：ＯＨ、Ｚ１１Ｚ１３－１６ＯＨ、Ｚ９－１４：ＯＨ、Ｚ９－１６：ＯＨ及びＺ１３－１８：ＯＨからなる群から選択される、実施形態８９～１０７のいずれか１つに記載の方法。

【０８４４】

１０９．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～１０８のいずれか１つに記載の方法。

【０８４５】

１１０．アルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ｃ４ＨＮ７８、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｎ９ＤＡ８５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ｒ８ＸＷ２４、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１Ａ０ＧＧＭ５、Ａ．カルコアセティカス（A. calcoaceticus）Ａ０Ａ１１７Ｎ１５８及びノストック・プンクチフォルメ（Nostoc punctiforme）ＹＰ＿００１８６５３２４からなる群から選択される、実施形態１０９に記載の方法。

【０８４６】

１１１．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有するアルコールオキシダーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～１１０のいずれか１つに記載の方法。

【０８４７】

１１２．≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態１０９～１１１のいずれか１つに記載の方法。

【０８４８】

１１３．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～１１２のいずれか１つに記載の方法。

【０８４９】

１１４．アセチルトランスフェラーゼは、表５ｄから選択される、実施形態１１３に記載の方法。

【０８５０】

１１５．≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ及びＺ１１－１６：Ａｃからなる群から選択される、実施形態１１３～１１４のいずれか１つに記載の方法。

【０８５１】

１１６．

一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドへの変換を触媒する能力を有する、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒド形成脂肪アシル－ＣｏＡレダクターゼから選択される酵素をコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子；及び

一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールの、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートへの変換を触媒する能力を有するアセチルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの内因性又は外因性核酸分子

を微生物中に導入することを更に含む、実施形態８９～１１５のいずれか１つに記載の方法。

【０８５２】

１１７．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒド及び≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ９－１６：Ａｃ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態１１６に記載の方法。

【０８５３】

１１８．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態７４～７６のいずれか１つに記載の組換え微生物を培養することを含む方法。

【０８５４】

１１９．≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドは、Ｚ９－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１－１６：Ａｌｄ、Ｚ１１Ｚ１３－１６：Ａｌｄ及びＺ１３－１８：Ａｌｄからなる群から選択される、実施形態１１８に記載の方法。

【０８５５】

１２０．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドを回収するステップを更に含む、実施形態１１８～１１９のいずれか１つに記載の方法。

【０８５６】

１２１．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態１２０に記載の方法。

【０８５７】

１２２．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態１２０に記載の方法。

【０８５８】

１２３．飽和Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{24}$脂肪酸の内因性又は外因性供給源から一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートを生成する方法であって、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートの生成に適正な炭素源を供給する原料を含む培養培地で実施形態７８～８０のいずれか１つに記載の組換え微生物を培養することを含む方法。

【０８５９】

１２４．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートは、Ｅ５－１０：Ａｃ、Ｚ７－１２：Ａｃ、Ｚ８－１２：Ａｃ、Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｅ７Ｚ９－１２：Ａｃ、Ｚ９－１４：Ａｃ、Ｚ９Ｅ１２－１４：Ａｃ、Ｚ１１－１４：Ａｃ、Ｅ１１－１４：Ａｃ、Ｚ９－１６：Ａｃ及びＺ１１－１６：Ａｃからなる群から選択される、実施形態１２３に記載の方法。

【０８６０】

１２５．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートを回収するステップを更に含む、実施形態１２３～１２４のいずれか１つに記載の方法。

【０８６１】

１２６．前記回収するステップは、蒸留を含む、実施形態１２５に記載の方法。

【０８６２】

１２７．前記回収するステップは、膜に基づく分離を含む、実施形態１２５に記載の方法。

【０８６３】

１２８．組換え微生物は、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・ビスワナチイ（Candida viswanathii）及びカンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）からなる群から選択される酵母である、実施形態８９～１１５のいずれか１つに記載の方法。

【０８６４】

１２９．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アルデヒドに変換される、実施形態８９～１１５のいずれか１つに記載の方法。

【０８６５】

１３０．化学的方法は、ＴＥＭＰＯ－ブリーチ、ＴＥＭＰＯ－銅－空気、ＴＥＭＰＯ－ＰｈＩ（ＯＡｃ）$_{2}$、スワーン酸化及び貴金属－空気から選択される、実施形態１２９に記載の方法。

【０８６６】

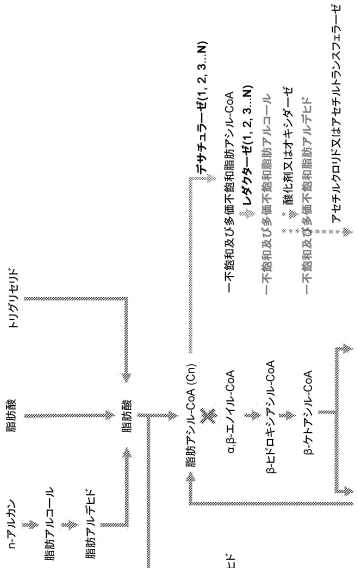
１３１．一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールは、化学的方法を用いて対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートに変換される、実施形態８９～１１５のいずれか１つに記載の方法。

【０８６７】

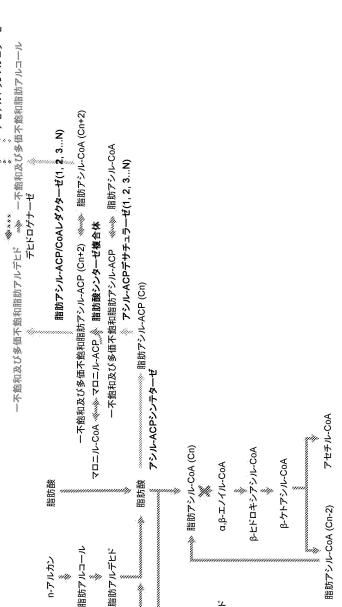
１３２．化学的方法は、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）又は酢酸ナトリウムの存在下において、塩化アセチル、無水酢酸、塩化ブチリル、無水酪酸、塩化プロパノイル及びプロピオン酸無水物からなる群から選択される化学剤を利用して、一不飽和又は多価不飽和≦Ｃ$_{18}$脂肪アルコールを、対応する≦Ｃ$_{18}$脂肪アセテートにエステル化する、実施形態１３１に記載の方法。

【図面】

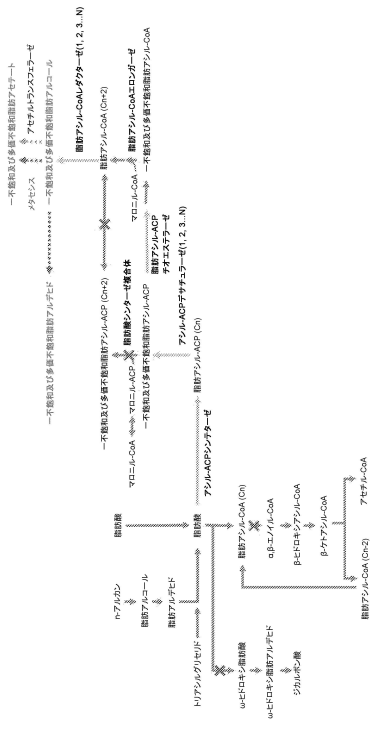
【図１】


n-アルカン
脂肪酸
トリグリセリド
脂肪アルコール
脂肪アルデヒド
脂肪酸
脂肪アシル-CoA (Cn)
デサチュラーゼ(1, 2, 3...N)
α,β-エノイル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アシル-CoA
レダクターゼ(1, 2, 3...N)
β-ヒドロキシアシル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルコール
酸化酵又はオキシターゼ
β-ケトアシル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルデヒド
アセチルクロリド又はアセチルトランスフェラーゼ
ω-ヒドロキシ脂肪酸
ω-ヒドロキシ脂肪アルデヒド
ジカルボン酸
脂肪アシル-CoA (Cn-2)
アセチル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アセテート

【図２】


—不飽和及び多価不飽和脂肪アセテート
メタモシス
アセチルトランスフェラーゼ
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルデヒド
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルコール
デヒドロゲナーゼ
脂肪アシル-ACP/CoAレダクターゼ(1, 2, 3...N)
脂肪アシル-CoA (Cn+2)
—不飽和及び多価不飽和脂肪アシル-ACP (Cn+2)
マロニル-CoA
マロニル-ACP
脂肪酸シンターゼ複合体
脂肪アシル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アシル-ACP
アシル-ACPデサチュラーゼ(1, 2, 3...N)
脂肪酸
脂肪アシル-ACP (Cn)
n-アルカン
アシル-ACPシンターゼ
脂肪アルコール
脂肪アルデヒド
トリアシルグリセリド
脂肪酸
脂肪アシル-CoA (Cn)
ω-ヒドロキシ脂肪酸
α,β-エノイル-CoA
ω-ヒドロキシ脂肪アルデヒド
β-ヒドロキシアシル-CoA
ジカルボン酸
β-ケトアシル-CoA
脂肪アシル-CoA (Cn-2)
アセチル-CoA

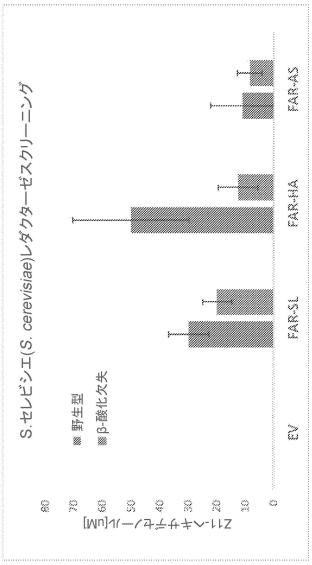
【図３】


—不飽和及び多価不飽和脂肪アセテート
メタモシス
アセチルトランスフェラーゼ
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルデヒド
—不飽和及び多価不飽和脂肪アルコール
デヒドロゲナーゼ
脂肪アシル-CoA/CoAレダクターゼ(1, 2, 3...N)
脂肪アシル-CoA (Cn+2)
—不飽和及び多価不飽和脂肪アシル-CoA (Cn+2)
マロニル-CoA
マロニル-ACP
脂肪酸シンターゼ複合体
脂肪アシル-CoA
—不飽和及び多価不飽和脂肪アシル-ACP
アシル-ACPデサチュラーゼ(1, 2, 3...N)
脂肪酸
脂肪アシル-ACP (Cn)
n-アルカン
アシル-ACPシンターゼ
脂肪アルコール
脂肪アルデヒド
トリアシルグリセリド
脂肪酸
脂肪アシル-CoA (Cn)
ω-ヒドロキシ脂肪酸
α,β-エノイル-CoA
ω-ヒドロキシ脂肪アルデヒド
β-ヒドロキシアシル-CoA
ジカルボン酸
β-ケトアシル-CoA
脂肪アシル-CoA (Cn-2)
アセチル-CoA

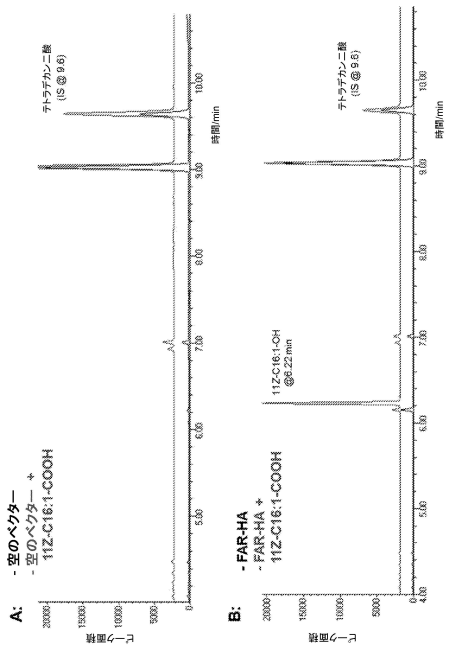
【図４】

脂肪酸(Cn)
多価不飽和脂肪酸(Cn)
デルタポキシターゼ/
デヒドロゲナーゼ
エポキシターゼ
多価不飽和脂肪アシル-ACP/CoA (Cn+2)
エポキシン
多価不飽和脂肪アシル-CoA (Cn+1)
多価不飽和脂肪アシル-CoA (Cn+1)
レダクターゼ(1, 2, 3...N)
多価不飽和脂肪アルコール(Cn+1)
多価不飽和二ポキシ脂肪アルコール(Cn+1)
酸化酵又はオキシターゼ
多価不飽和脂肪アルデヒド(Cn+1)
多価不飽和二ポキシ脂肪アルデヒド(Cn+1)
アセチルクロリド又はアセチルトランスフェラーゼ
多価不飽和脂肪アセテート(Cn+1)
多価不飽和二ポキシ脂肪アセテート(Cn+1)

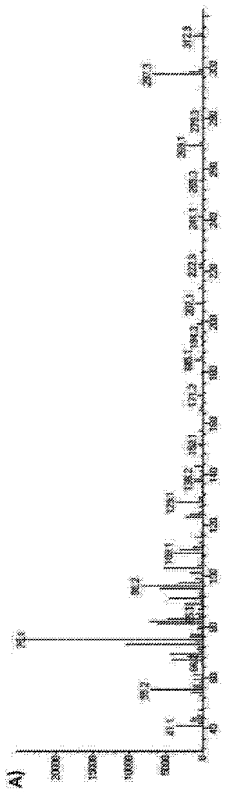
【図５】


S.セレビシエ(S. cerevisiae)レダクターゼスクリーニング
■野生型
■β-酸化欠失
Z11-ヘキサデセノール[uM]
EV
FAR-SL
FAR-HA
FAR-AS

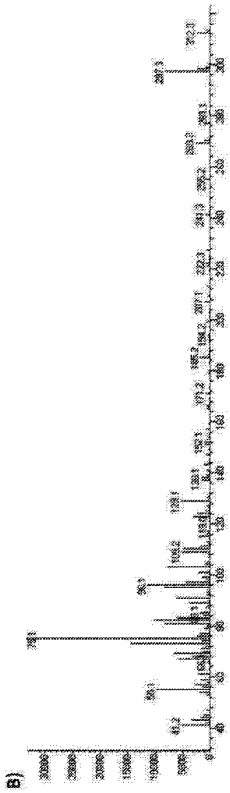
【図６】


A:
- 空のベクター
- 空のベクター +
11Z-C16:1-COOH
テトラデカン二酸
(IS @ 9.6)
ピーク面積
時間/min
B:
- FAR-HA
- FAR-HA +
11Z-C16:1-COOH
11Z-C16:1-OH
@6.22 min
テトラデカン二酸
(IS @ 9.6)
ピーク面積
時間/min

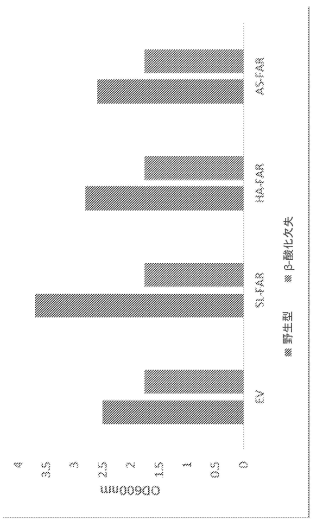
【図７Ａ）】


A)

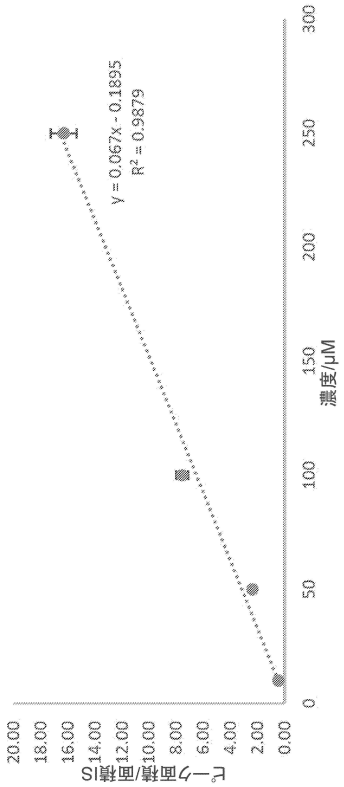
【図７Ｂ）】


B)

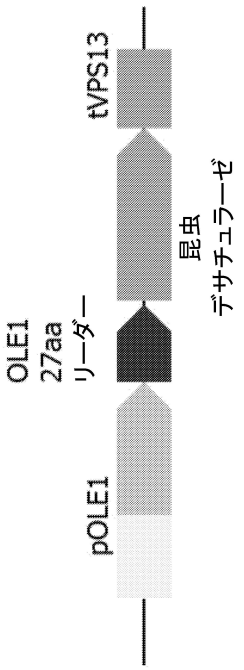
【図８】



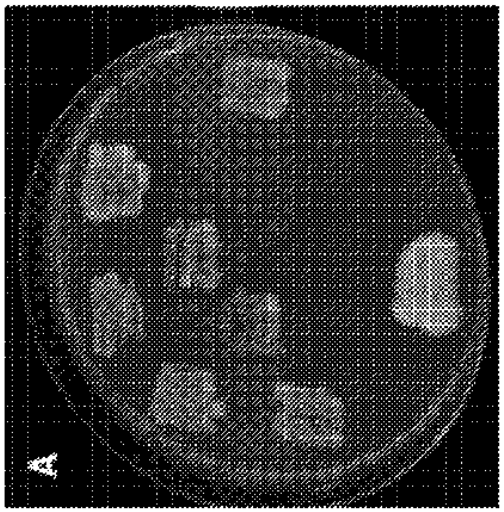
【図９】



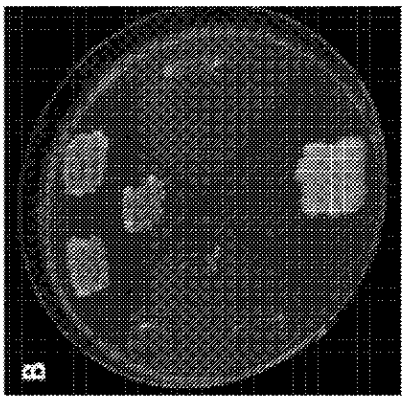
【図１０】



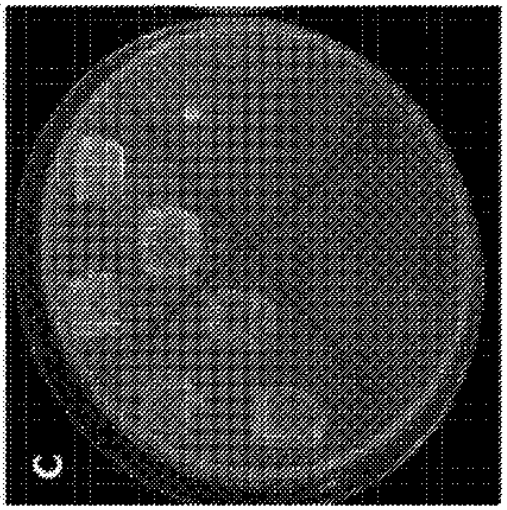
【図１１Ａ】



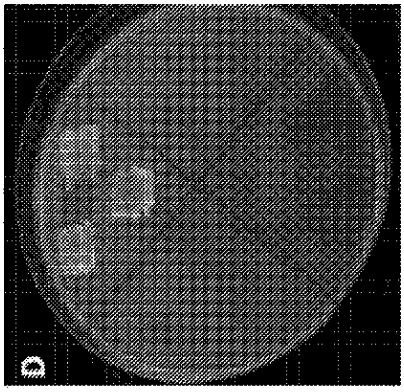
【図１１Ｂ】



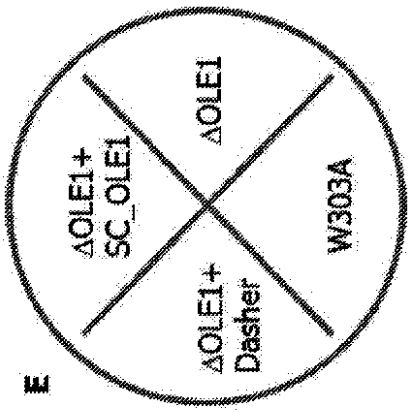
【図１１Ｃ】



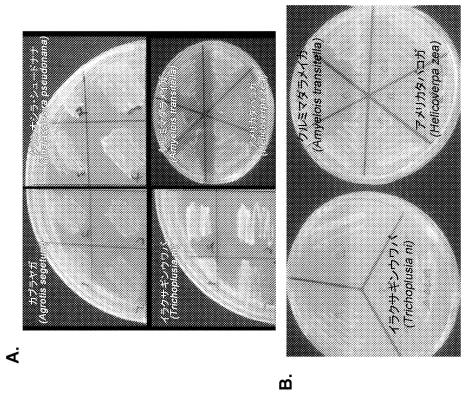
【図１１Ｄ】



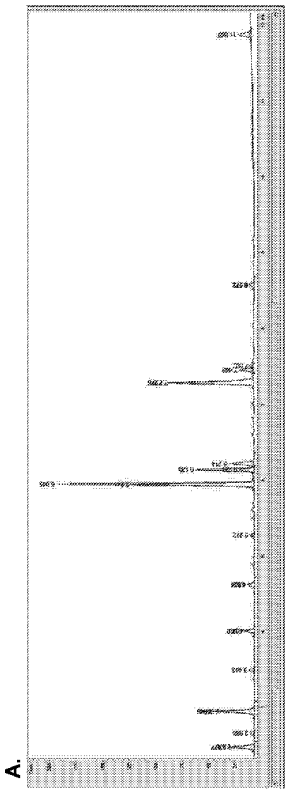
【図１１Ｅ】



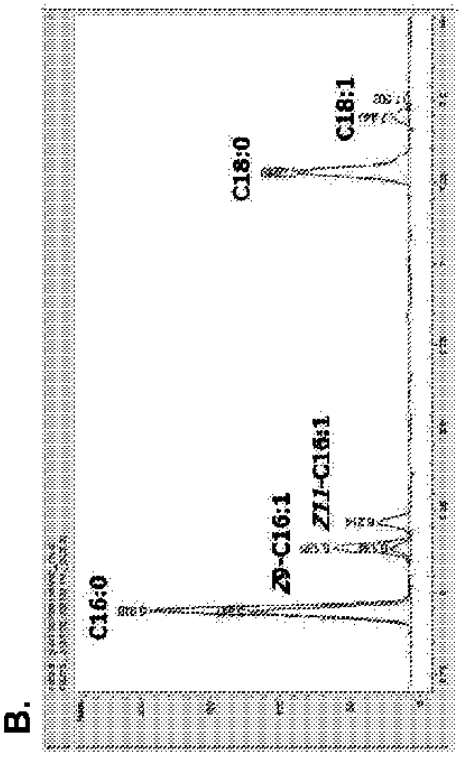
【図１２】



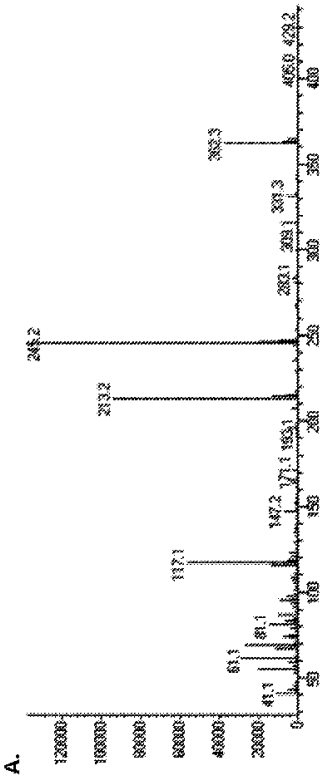
【図１３Ａ】



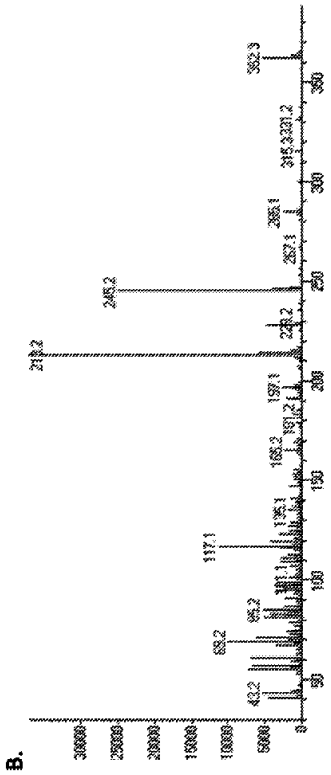
【図１３Ｂ】



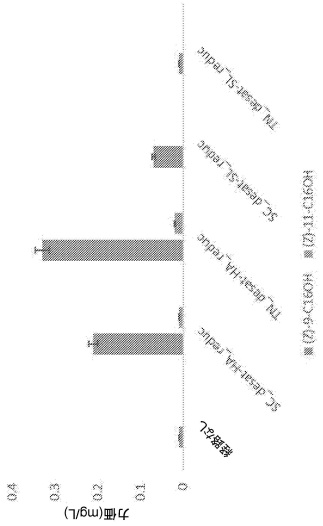
【図１４Ａ】



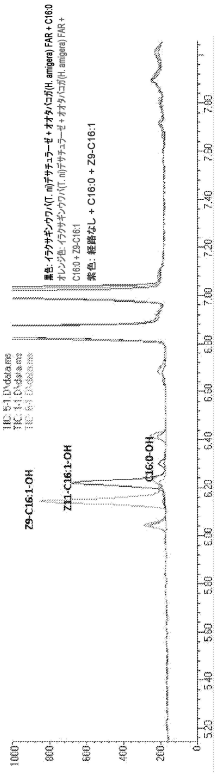
【図１４Ｂ】



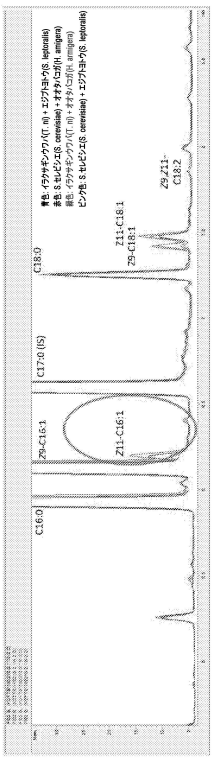
【図１５】



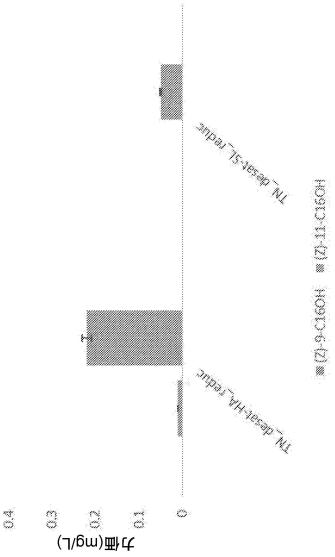
【図１６】



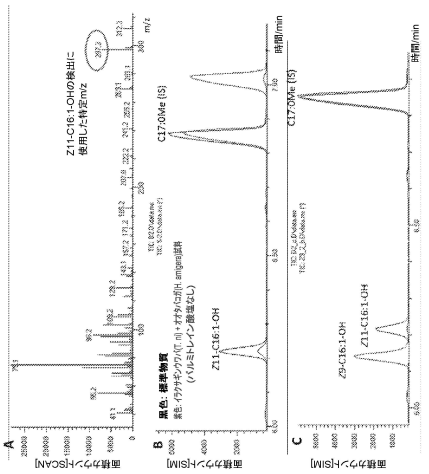
【図１７】



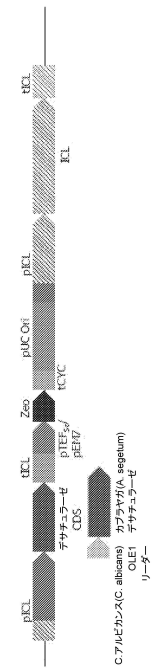
【図１８】



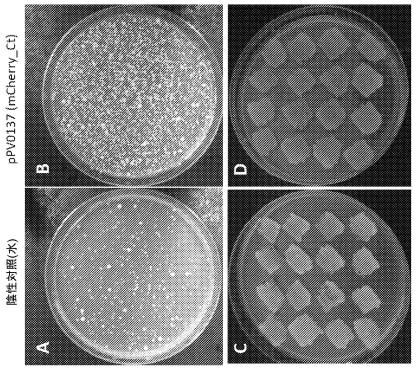
【図１９】



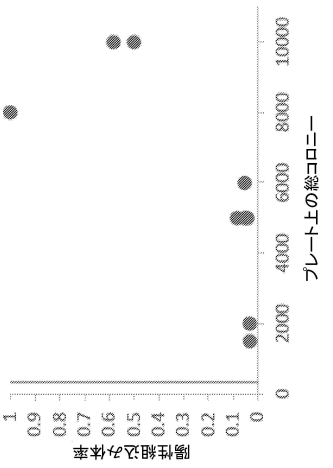
【図２０】



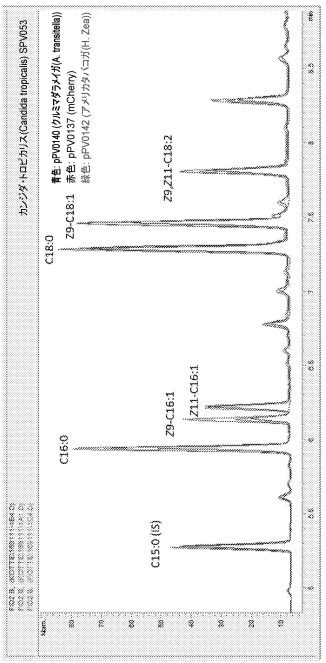
【図２１】



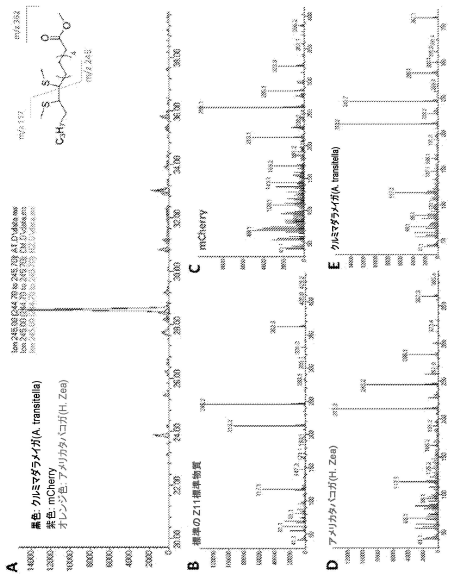
【図２２】



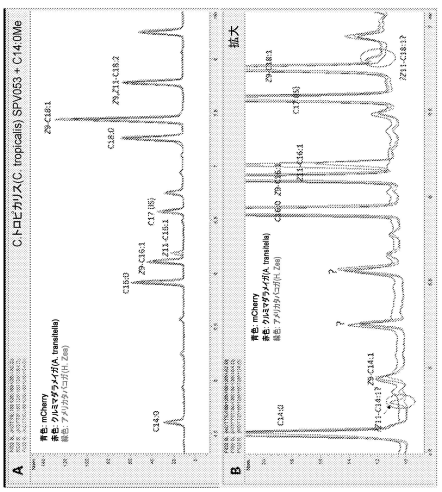
【図２３】



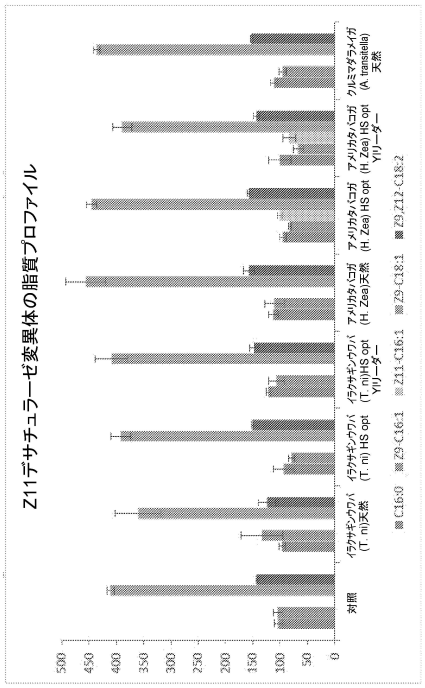
【図２４】



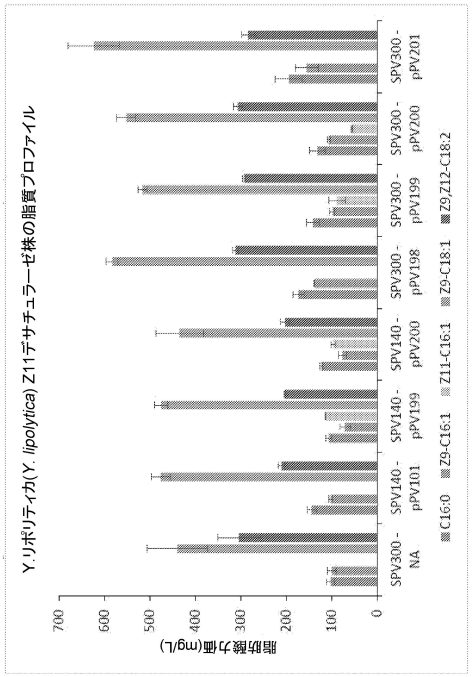
【図２５】



【図２６】



【図２７】



【図２８】

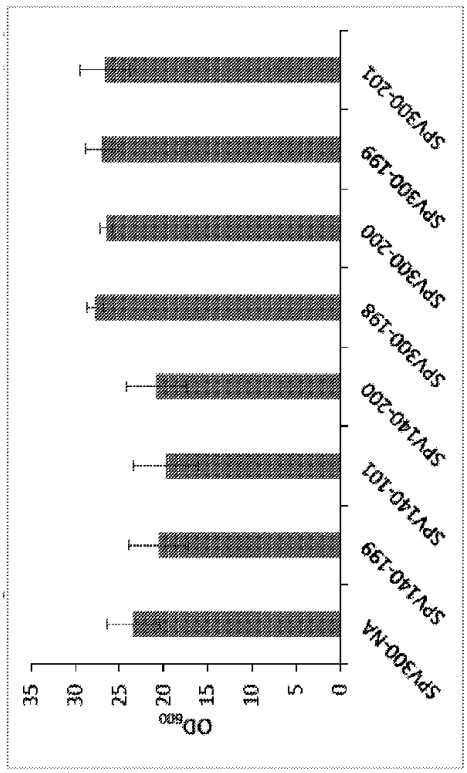
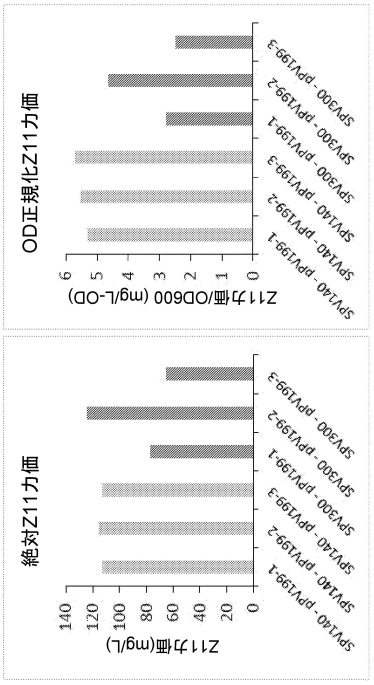
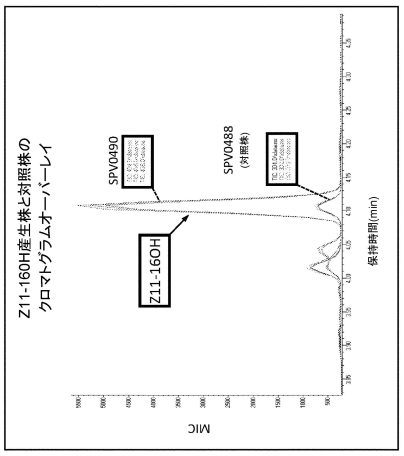


FIGURE 28

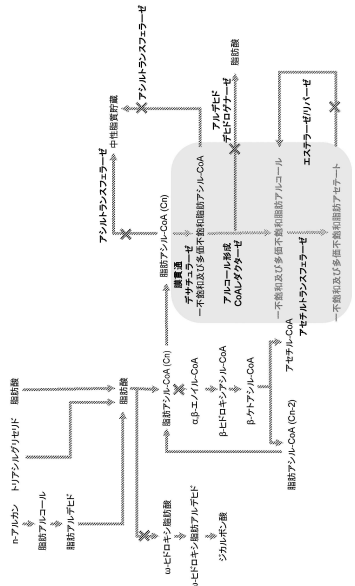
【図２９】



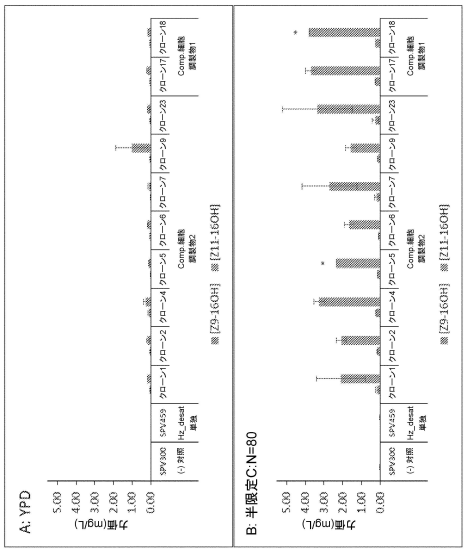
【図３０】



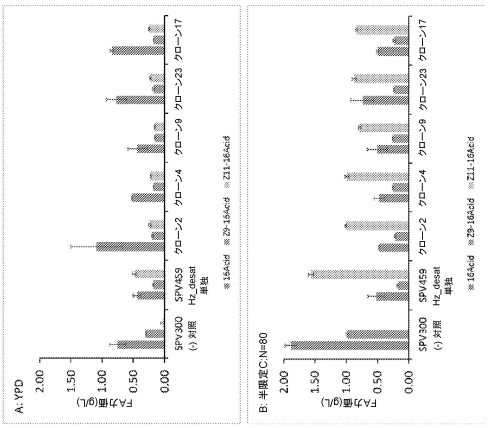
【図３１】



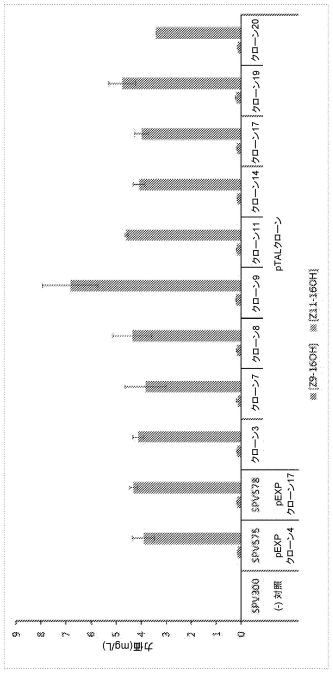
【図３２】



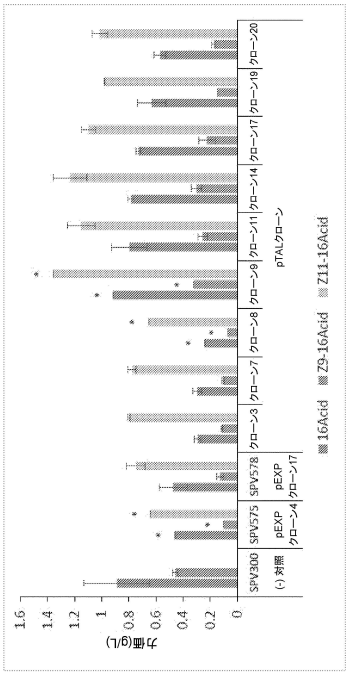
【図３３】



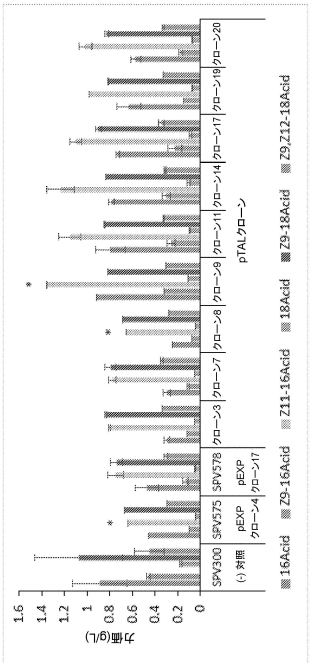
【図３４】



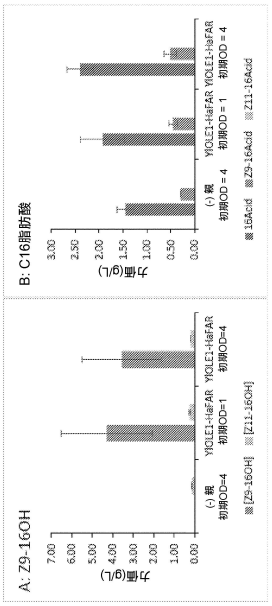
【図３５】



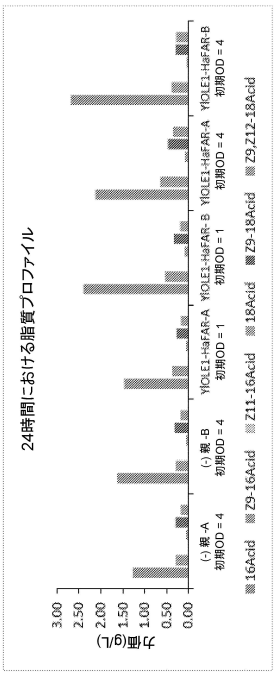
【図３６】



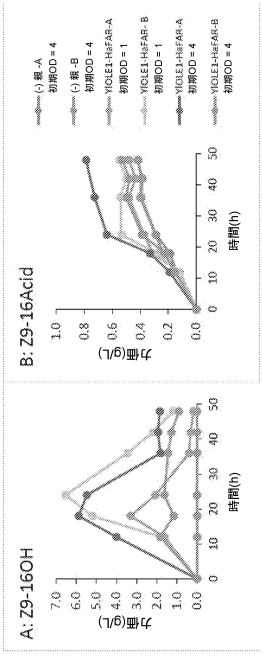
【図３７】



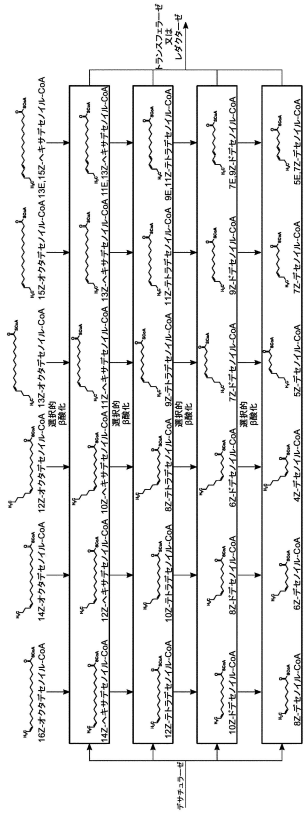
【図３８】



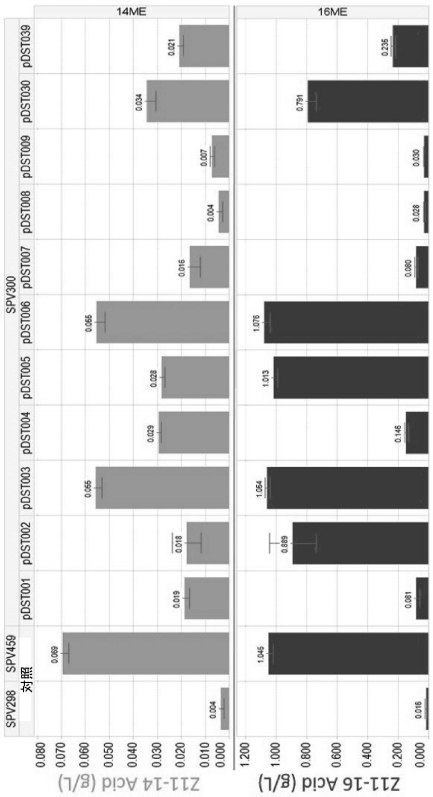
【図３９】



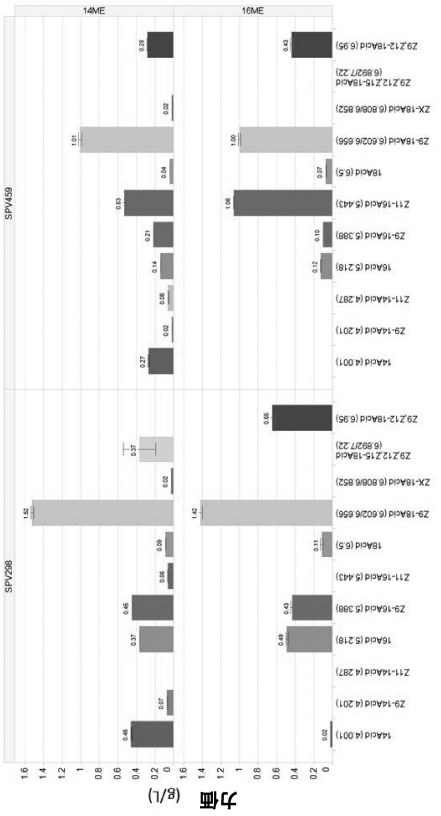
【図４０】



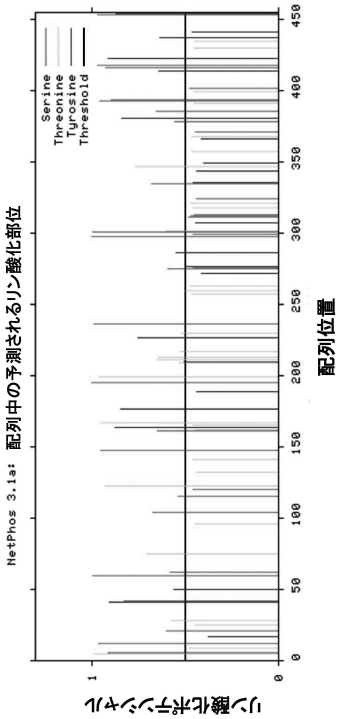
【図４１】



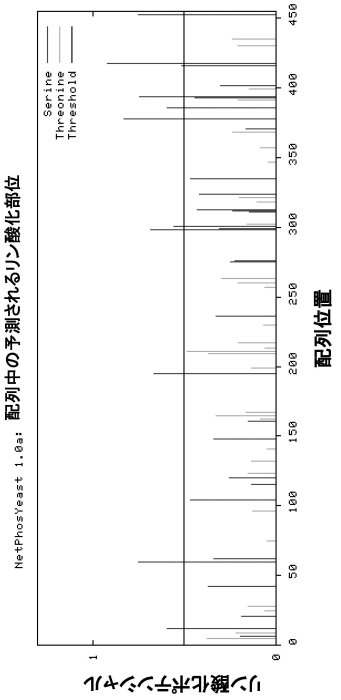
【図４２】



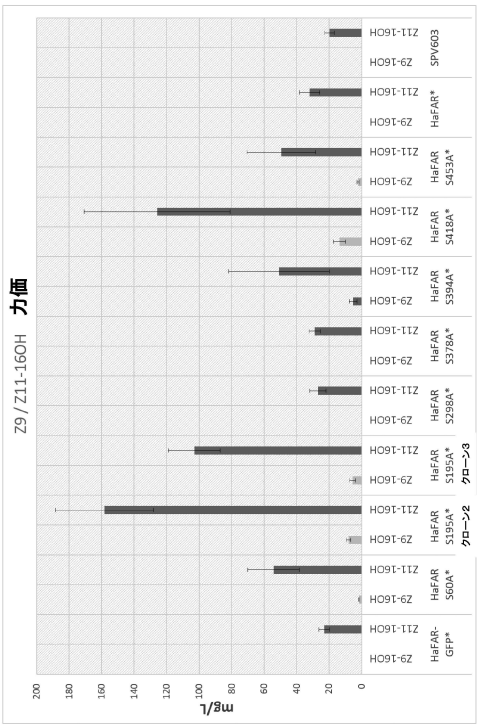
【図４３】



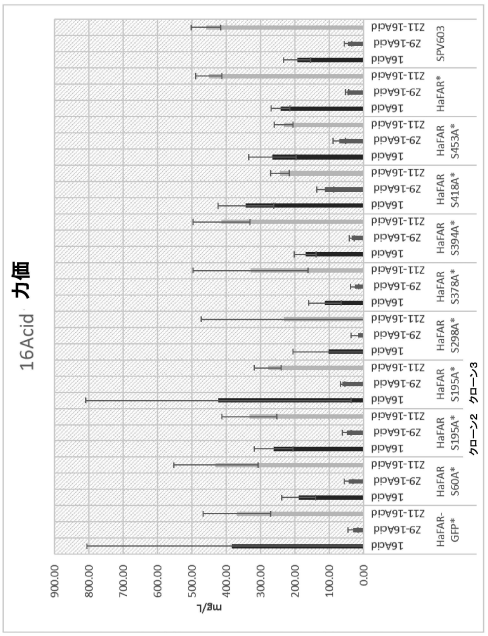
【図４４】



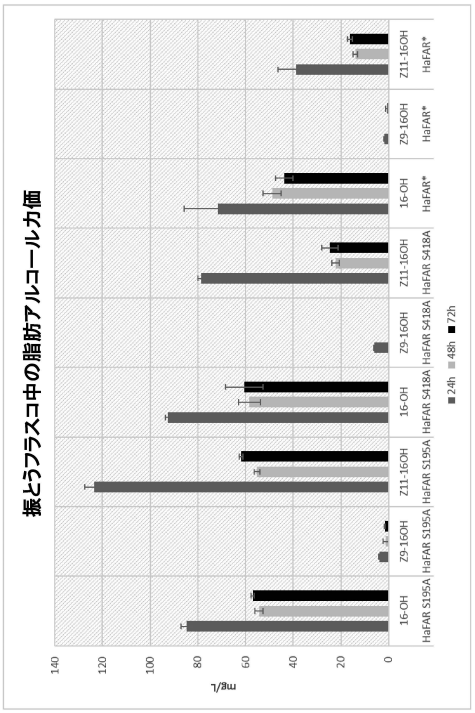
【図４５】



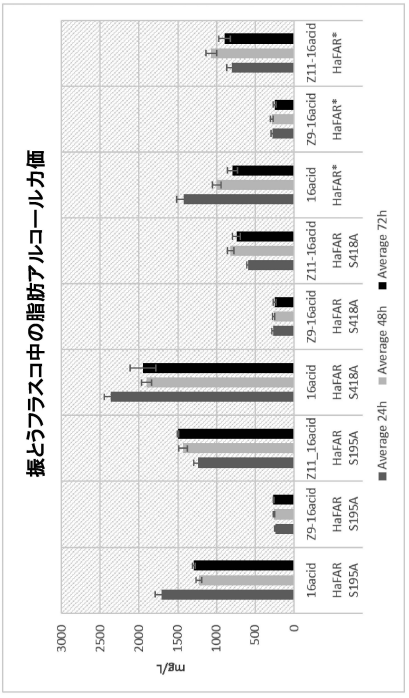
【図４６】



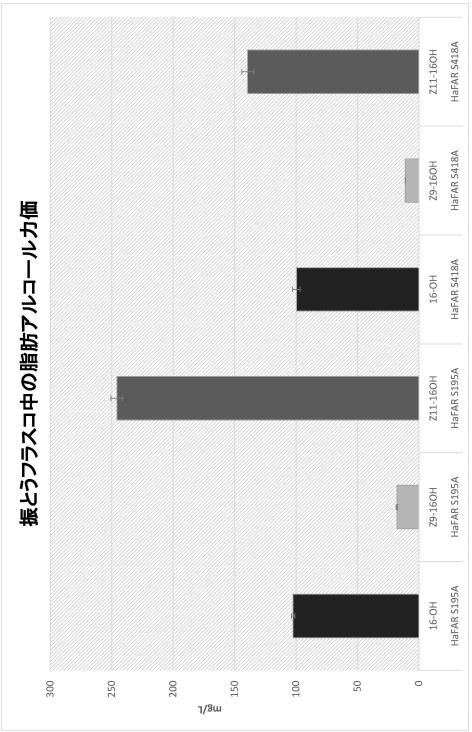
【図４７】



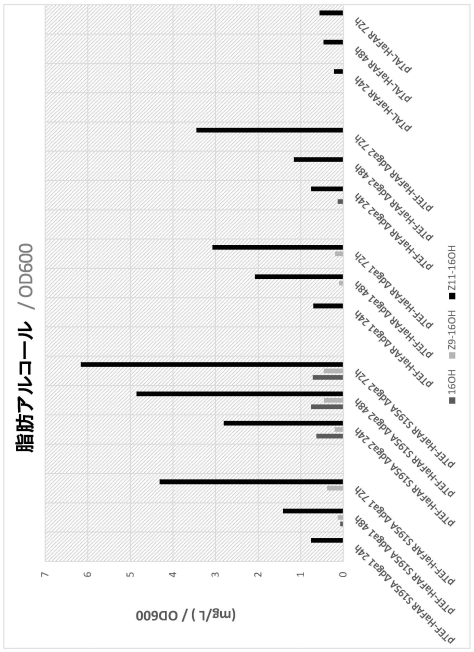
【図４８】



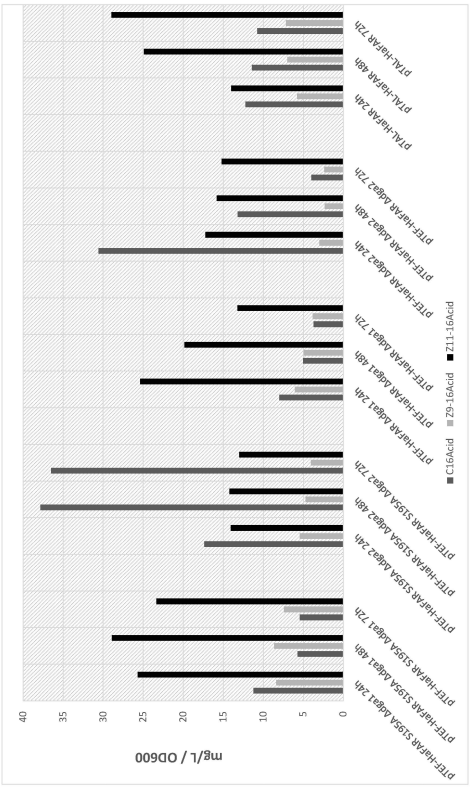
【図４９】



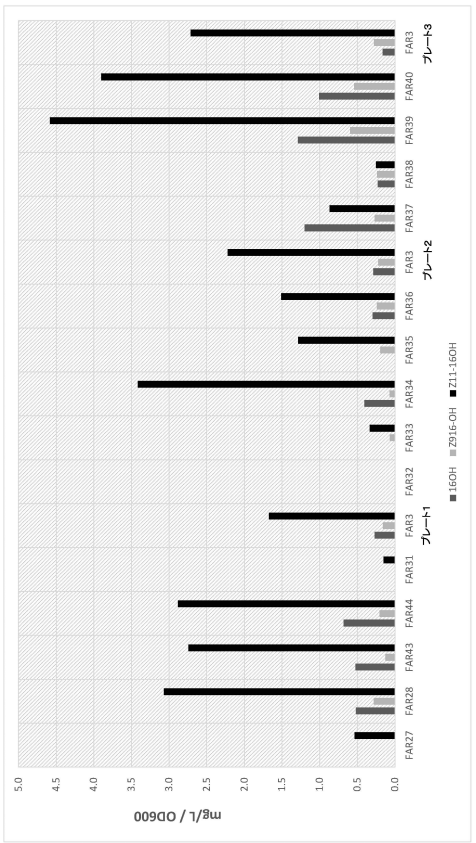
【図５０】



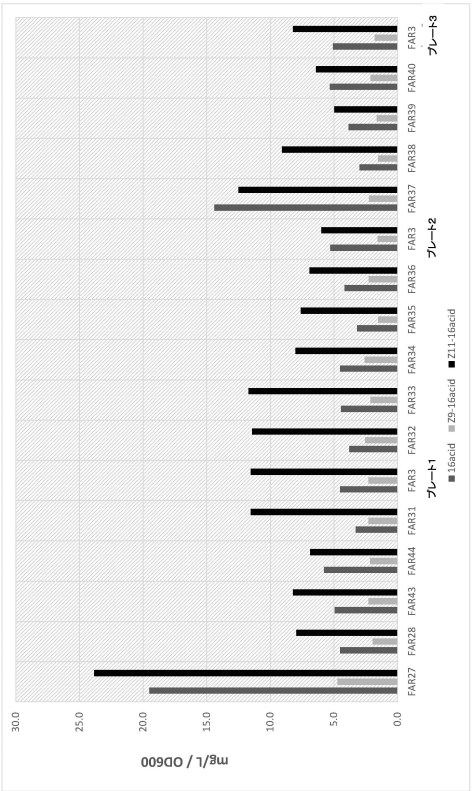
【図５１】



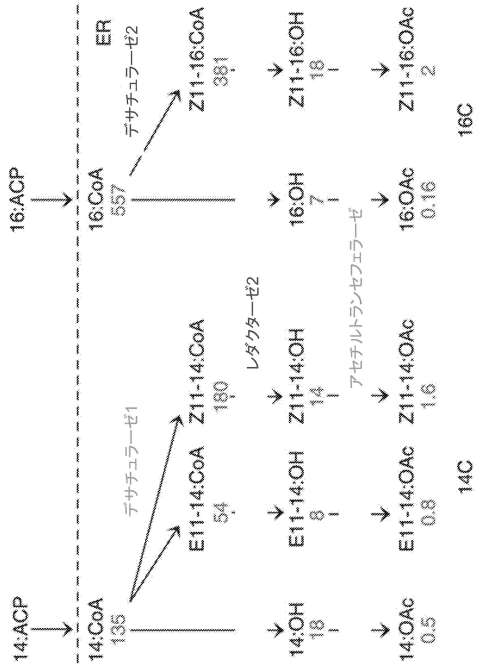
【図５２】



【図５３】



【図５４】



【配列表】

0007216018000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI	
C07C	*67/08*	*(2006.01)*	C07C	67/08
C07C	*47/21*	*(2006.01)*	C07C	47/21
C07C	*45/41*	*(2006.01)*	C07C	45/41
A01N	*63/00*	*(2020.01)*	A01N	63/00
C12N	*9/02*	*(2006.01)*	C12N	9/02
C12N	*9/04*	*(2006.01)*	C12N	9/04
C12N	*9/10*	*(2006.01)*	C12N	9/10
A01N	*31/02*	*(2006.01)*	A01N	31/02
A01N	*35/02*	*(2006.01)*	A01N	35/02
A01N	*37/02*	*(2006.01)*	A01N	37/02

０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ヒール，トーマス
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 マインホルト，ピーター
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ワンプラー，キース
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 コエーリョ，ペドロ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 レオナール，エフェンディ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９０４０４，サンタ モニカ，コロラド アベニュー １７０１，プロヴィヴィ，インコーポレイテッド内

審査官 加藤 幹

(56)参考文献
国際公開第２０１４／２０７１１３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／０８７９６４（WO，Ａ１）
特開昭６１－２５４１９３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／１５９８６９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／２０７３３９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／０４２３０６（WO，Ａ１）
ROSENFIELD, Claire-Lise et al.，Insect Biochemistry Molecular Biology，2001年，Vol. 31，pp. 949-964

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００
Ｃ１２Ｍ １／００－ ３／１０
Ｃ１２Ｎ １／００－ ７／０８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ