(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7350659号
(P7350659)

(45)発行日　令和5年9月26日(2023.9.26)

(24)登録日　令和5年9月15日(2023.9.15)

(51)国際特許分類			FI		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/09	Z
C12N	*15/31*	*(2006.01)*	C12N	15/31	ZNA
C40B	*50/06*	*(2006.01)*	C40B	50/06	
C40B	*40/02*	*(2006.01)*	C40B	40/02	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	

請求項の数　14　（全297頁）

(21)出願番号　特願2019-567368(P2019-567368)
(86)(22)出願日　平成30年6月6日(2018.6.6)
(65)公表番号　特表2020-524493(P2020-524493A)
(43)公表日　令和2年8月20日(2020.8.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/036352
(87)国際公開番号　WO2018/226893
(87)国際公開日　平成30年12月13日(2018.12.13)
審査請求日　令和3年6月4日(2021.6.4)
(31)優先権主張番号　62/515,934
(32)優先日　平成29年6月6日(2017.6.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　517366688
ザイマージェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国９４６０８カリフォルニア州エメリービル、カイロン・ウェイ５３００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａの改良のためのハイスループット（ＨＴＰ）ゲノム操作プラットフォーム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

所望の表現型を獲得するためにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐ．微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（ＨＴＰ）方法であって、

ａ）同じゲノム株バックグラウンドを有する最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のゲノムを撹乱することによって、ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーはプロモータースワップ微生物株ライブラリーを含み、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを含み、前記プロモーターは、配列番号１～６９および１７２～１７５からなる群から選択される配列を有する、ステップと；

ｂ）ステップａ）の前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

ｃ）遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝

的バリエーションは、前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；
ｄ）前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；
ｅ）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、ステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む新しいＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製される、ステップと
を含む、方法。
【請求項２】
前記遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性が、ステップｃ）で前記遺伝的バリエーションを組み合わせる前に考慮されない、請求項１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項３】
ステップｃ）で組み合わされる少なくとも１つの遺伝的バリエーションが、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域にない、請求項１または２に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項４】
ステップ（ｃ）における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む前記後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、
１）前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーに属する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを導入するステップであって、前記プラスミドは、選択マーカー、対抗選択マーカー、基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片およびプラスミド主鎖配列を含み、前記ＤＮＡ断片は、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにも属する別の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；
２）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づく組込み事象によってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；
３）前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと
によって産生される、請求項１～３のいずれか一項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項５】
前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、請求項４に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項６】
前記選択が、組み込まれた前記プラスミドの複製なしで実施される、請求項４または５に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項７】
前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、
ａ）前記最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたはそのサブセットである；
ｂ）前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである；

ｃ）先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーまたはそのサブセットである；あるいは
ｄ）先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、請求項１～６のいずれか一項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項８】
前記ステップａ）における前記最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、
ａ）産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む；または
ｂ）$Ｓ_{1}Ｇｅｎ_{1}$で表される産生株微生物および$Ｓ_{ｎ}Ｇｅｎ_{ｎ}$で表されるこれらに由来する後続の任意の数の微生物世代を含み、ｎは世代の数に対応する、
請求項１～７のいずれか一項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項９】
前記ステップｃ）が、プロトプラスト融合技法を使用することによって前記遺伝的バリエーションを迅速に統合することを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項１０】
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターであって、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号１～６９および１７２～１７５からなる群から選択される配列を有する、プロモーターを含む、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
【請求項１１】
前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株であり、獲得されるべき所望の表現型が、改善された表現型性能である、請求項１～９のいずれか一項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項１２】
ａ）後続ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す；
ｂ）前記改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される；または
ｃ）前記改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、
請求項１１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【請求項１３】
前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、請求項１２に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

【請求項１４】
前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、請求項１３に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、その全体において参照によって本明細書に組み込まれる２０１７年６月６日に出願された米国仮特許出願第６２／５１５，９３４号からの優先権の利益を主張する。
【０００２】
配列表に関する陳述
本願に添付された配列表は、紙コピーの代わりにテキストフォーマットで提供されており、参照により本明細書に組み込まれている。配列表を含有するテキストファイルの名称は、ＺＹＭＲ＿０１３＿０１ＷＯ＿ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔである。テキストファイルは、約１８５ＫＢであり、２０１８年６月６日に作成されたものであり、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。
【０００３】
分野
本開示は、ハイスループット（ＨＴＰ）微生物ゲノム操作を対象とする。開示されるＨＴＰゲノム操作プラットフォームは、コンピューターで駆動され、分子生物学、自動化、および高度な機械学習プロトコールを統合する。この統合プラットフォームは、一式のＨＴＰ分子ツールセットを利用して、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生み出す。これらのライブラリーは、とりわけ、科学的洞察および反復パターン認識から得られる。特に、教示されるプラットフォームは、従来の扱いにくい微生物種においてＨＴＰ微生物ゲノム操作を実施することができる。
【背景技術】
【０００４】
背景
人間は、目的の産物を生成するのに千年間にわたって微生物細胞の生合成経路の力を利用してきており、その最古の例としては、アルコール、酢、チーズ、およびヨーグルトがある。これらの産物は、今日でも依然として大きな需要があり、また、微生物が産生可能な産物のレパートリーが増え続けている。遺伝子操作技術の出現により、科学者は、様々な生物体中に新規生合成経路を設計およびプログラムして、広い範囲の工業、医療用、および消費者向け製品を生産することが可能になった。実際に、微生物細胞培養が、低分子、抗生物質、ワクチン、殺虫剤、酵素、燃料、および工業用化学物質におよぶ産物を生産するのに現在使用されている。
【０００５】
最新の工業用微生物によって産生される多数の産物を考慮すると、エンジニアが、所与の微生物が標的産物を産生することができる速度および効率を改善するのに極めて大きいプレッシャーの下にあることは驚くに当たらない。
【０００６】
様々な手法が、関与する微生物を「改良する」ことによって生物学に基づく工業プロセスの経済性を改善するのに使用されてきた。例えば、多くの製薬工業および化学工業では、微生物培養の親株が化学物質またはＵＶ放射線への曝露によって連続的に変異され、生産性、収率、および力価などの性能増大について引き続いてスクリーニングされる、微生物株改良プログラムを利用する。この変異誘発プロセスは、株が産物性能の適当な増大を実証するまで広範に繰り返される。次いで後続の「改善された」株は、商業生産で利用される。
【０００７】
上記に暗示したように、変異誘発による改善された工業用微生物株の同定は、時間がか

かり、非効率である。このプロセスは、まさにその本質から、計画性のないものであり、産物産出について望ましい結果を有する変異の際の１つのつまずきを利用する。

【０００８】

伝統的な微生物株改良プログラムが非効率であるだけでなく、このプロセスは、高い程度の有害な変異誘発性ロード（mutagenic load）を有する工業用株に至る場合もある。これらのタイプのプログラムに供された工業用株における変異の蓄積は、かなり大きなものとなり得、性能改善の速度における最終的な停滞に至り得る。

【０００９】

これは、特に、多くの研究者が「扱いにくい」と考えていた微生物、すなわち、伝統的な株操作ツールが、利用可能ではないか、または単に機能しないかのいずれかである微生物についての問題である。以前、このような群であるＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．は、操作するのが難しいことで有名な微生物である。これは、広範な研究が実行され、ゲノム操作ツールが容易に利用可能なモデルシステムの微生物と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．のための多くの重要なツールが、まだ創製、試験および／または改善されていないためである。

【００１０】

よって、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．は、産生の目的で微生物を改善する研究者の試みのためのユニークな課題を提示する。これらの課題は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．におけるゲノム操作の分野を妨げ、研究者がこの微生物システムの最大の可能性を利用するのを阻んでいる。

【００１１】

よって、伝統的な株改良プログラムに固有の上述した欠点を被らず、有益な変異を発見および統合するプロセスを大いに加速する工業用微生物を操作する新しい方法についての当技術分野における大きな必要性が存在する。

【００１２】

さらに、微生物株改良の分野において現在使用されている時代遅れの有害なプロセスによって開発された工業用株を「再建する」方法の緊急の必要性が存在する。さらに、当技術分野は、伝統的に扱いにくい微生物種においてＨＴＰゲノム操作プロセスを実施することができるツールおよびプロセスを切望している。かつて、ＨＴＰゲノム操作プロセスが現在利用可能ではないこのような属の微生物種は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１３】

開示の概要

本開示は、伝統的な微生物株改良プログラムに関連した無数の問題を被らないハイスループット（ＨＴＰ）微生物ゲノム操作プラットフォームを提供する。

【００１４】

さらに、本明細書で教示されるＨＴＰプラットフォームは、数１０年のランダム変異誘発に基づく株改良プログラムによって有益でない変異を蓄積してきた工業用微生物を再建する（rehabilitate）ことができる。

【００１５】

本明細書に記載のＨＴＰプラットフォームは、研究者が、伝統的に扱いにくい微生物生物体においてＨＴＰゲノム操作を実施することを可能にする、新規微生物操作ツールおよびプロセスを提供する。例えば、教示されるプラットフォームは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．におけるＨＴＰゲノム操作を可能にするその種類の最初のものである。これまで、この群の微生物は、ＨＴＰゲノム操作に適用できなかった。したがって、開示したプラットフォームは、この微生物システムにおけるゲノム操作の分野に革命を起こすだろう。

【００１６】

開示されるＨＴＰゲノム操作プラットフォームは、コンピューターで駆動され、分子生物学、自動化、および高度な機械学習プロトコールを統合する。この統合プラットフォームは、一式のＨＴＰ分子ツールセットを利用して、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生み出す。これらのライブラリーは、とりわけ、科学的洞察および反復パターン認識から得られる。

【００１７】

教示されるＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、微生物において試験するための特定のゲノム変更のライブラリーを提供することによって、ゲノム操作プロセスのドライバーとして機能する。特定のライブラリーまたはライブラリーの組合せを利用して操作された微生物は、結果として生じる成果、例えば、目的の産物の産生についてＨＴＰ様式で効率的にスクリーニングされる。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを利用して微生物において試験するための特定のゲノム変更を明らかにし、次いでこれらの変更を内包する宿主微生物ゲノムを引き続いてスクリーニングするこのプロセスは、効率的な反復様式でインプリメントされる。一部の態様では、ゲノム操作キャンペーンの反復サイクルまたは「ラウンド」は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、またはそれ超の反復／サイクル／ラウンドであり得る。

【００１８】

よって、一部の態様では、本開示は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、９２５、９５０、９７５、１０００またはそれ超の「ラウンド」のＨＴＰ遺伝子操作（例えば、ＳＮＰスワップ、ＰＲＯスワップ、ＳＴＯＰスワップ、またはこれらの組合せのラウンド）を行う方法を教示する。

【００１９】

一部の実施形態では、本開示は、各後続のＨＴＰ遺伝子操作ラウンドが先のラウンドの遺伝子操作で同定された遺伝的バリエーションに基づく線形手法を教示する。他の実施形態では、本開示は、各後続のＨＴＰ遺伝子操作ラウンドが先に行われた分析を含む任意の先のラウンドの遺伝子操作、および別個のＨＴＰ遺伝子操作ブランチで同定された遺伝的バリエーションに基づく非線形手法を教示する。

【００２０】

これらの反復サイクルからのデータは、大規模データ分析およびパターン認識を可能にし、それは統合プラットフォームによって利用され、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー実装の後続のラウンドを通知する。したがって、教示されるプラットフォームで利用されるＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、大規模データパターン認識アルゴリズムから利益を得、各反復ラウンドの微生物操作によってより有益となる高度に動的なツールである。

【００２１】

一部の実施形態では、本開示の遺伝子設計ライブラリーは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、

７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、９２５、９５０、９７５、１０００、またはそれ超の個々の遺伝子変化（例えば、少なくともＸの数のＰＲＯスワップライブラリーにおけるプロモーター：遺伝子組合せの）を含む。

【００２２】

一部の実施形態では、本開示は、ＨＴＰ株改良法の微生物株への適用を記述する実例およびテキストを提供する。一部の実施形態では、本開示の株改良法は、任意の宿主細胞に適用可能である。

【００２３】

一部の実施形態では、本開示は、所望の表現型を獲得するために微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（ＨＴＰ）方法であって、ａ）最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーとして、撹乱されたゲノムを有する最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のゲノムを得ることによって、最初のＨＴＰ遺伝子設計を創製するステップであって、複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物は、同じゲノム株バックグラウンドを有し、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーは、ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む、ステップと；ｂ）所望の表現型について最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｃ）遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；ｄ）所望の表現型について後続のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｅ）微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々の微生物株を含む新しいＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが創製される、ステップを含む、方法を教示する。

【００２４】

遺伝的バリエーションを組み合わせる場合、遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性は、考慮されても、考慮されなくてもよい。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性は、考慮されない。例えば、同じ遺伝子、または同様の機能／構造を有する遺伝子の遺伝的バリエーションは、組合せのために選択される。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性は、遺伝的バリエーションを組み合わせる前に考慮されない。いずれの場合にも、その後のスクリーニングおよび選択するステップは、目的の産物の改善された産生などの所望の表現型を有する操作されたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を同定するために実行することができる。

【００２５】

一部の実施形態では、遺伝的バリエーションは、目的の産物の直接合成もしくは代謝に関連する１つもしくは複数の遺伝子座、または合成もしくは代謝の調節に関連する遺伝子座にある。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションは、目的の産物の直接合成または代謝に関連せず、合成または代謝の調節に関連しない、１つまたは複数の遺伝子座にある。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションは、それらの好ましい機能または特定のゲノムの組合せ構造の任意の特定の仮説なしで組合せのためにランダムに選び取られる。例

えば、一部の実施形態では、組合せの目的は、ポリケチドまたは非リボソームペプチドをコードする遺伝子中のものなどのＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域中のＤＮＡモジュールを置換するためではない。

【００２６】

一部の実施形態では、異なる源に由来する遺伝的バリエーションが組み合わされる前述の方法のステップ（ｃ）において、様々な技法を使用することができる。一部の実施形態では、相同組換えプラスミドシステムが使用される。一部の実施形態では、ステップ（ｃ）における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物は、１）最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーに属する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを導入するステップであって、プラスミドは、（ｉ）選択マーカー、（ｉｉ）対抗選択マーカー、（ｉｉｉ）基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片、およびプラスミド主鎖配列を含み、ＤＮＡ断片は、最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにも属する別の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；２）ゲノム中の選択マーカーの存在に基づく組込み事象によってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；３）対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされたプラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップとによって産生される。

【００２７】

一部の実施形態では、本開示の方法は、ゲノムのモジュール性のこれらのエリアにおいて標的化ゲノム編集を実施することができるだけではなく、任意のゲノムの状況で、ゲノム全体にわたる標的化ゲノム編集が可能である。したがって、本開示の標的化ゲノム編集は、任意の領域でＳ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノムを編集することができ、モジュール性を有するエリアでの単なる編集に縛られない。

【００２８】

一部の実施形態では、プラスミドは、温度感受性を含まない。

【００２９】

一部の実施形態では、選択ステップ３）は、組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される。

【００３０】

一部の実施形態では、本開示は、最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー、開始／停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリー、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つであることを教示する。一部の実施形態では、前記微生物ライブラリーは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．ライブラリーである。

【００３１】

一部の実施形態では、本開示は、それぞれが遺伝的バリエーションのユニークな組合せを含む後続の複数の微生物を作製する方法であって、組み合わされた遺伝的バリエーションのそれぞれが、最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーまたは先行するステップのＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーに由来する、方法を教示する。

【００３２】

一部の実施形態では、後続の複数の微生物における遺伝的バリエーションの組合せは、最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーまたは先行するステップのＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーにおける遺伝的バリエーションのすべての可能な組合せのサブセットを含むことになる。

【００３３】

一部の実施形態では、本開示は、後続のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが、最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーまたは先行するステップのＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーにおける遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーであることを教示する。

【００３４】

例えば、先のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが遺伝的バリエーションＡ、Ｂ、Ｃ、およびＤのみを有している場合、前記バリエーションの部分的コンビナトリアルは、それぞれがＡＢ、ＡＣ、またはＡＤの遺伝的バリエーションのユニークな組合せのいずれかを含む３種の微生物を含む後続のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーを含むことができる（変異が表される順序は重要でない）。先行するステップのＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーの遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーは、それぞれがＡＢ、ＡＣ、ＡＤ、ＢＣ、ＢＤ、またはＣＤの遺伝的バリエーションのユニークな組合せのいずれかを含む６種の微生物を含むはずである。

【００３５】

一部の実施形態では、本開示の方法は、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、トランスポゾン変異誘発、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つの方法を利用してゲノムを撹乱することを教示する。

【００３６】

現在開示した方法の一部の実施形態では、最初の複数の微生物は、工業生産株微生物に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む。一部の実施形態では、微生物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．である。

【００３７】

現在開示した方法の一部の実施形態では、最初の複数の微生物は、Ｓ１Ｇｅｎ１で表される工業生産株微生物、およびＳｎＧｅｎｎで表されるこれらに由来する任意の数の後続の微生物世代を含む。一部の実施形態では、微生物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．である。

【００３８】

一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを生成するための方法であって、ａ）参照微生物株および第２の微生物株を提供するステップであって、第２の微生物株は、参照微生物株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；ｂ）参照微生物株または第２の微生物株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、参照微生物株と第２の微生物株との間の複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００３９】

ＳＮＰスワップライブラリーの一部の実施形態では、参照微生物株のゲノムが撹乱されて、第２の微生物株内に見出される同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される。

【００４０】

本開示のＳＮＰスワップライブラリー方法の一部の実施形態では、第２の微生物株のゲノムが撹乱されて、参照微生物株内に見出されない同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される。

【００４１】

一部の実施形態では、ＳＮＰスワップライブラリーの遺伝的バリエーションは、参照微生物株と第２の微生物株との間で同定されたすべての遺伝的バリエーションのサブセット

を含む。
【００４２】
一部の実施形態では、ＳＮＰスワップライブラリーの遺伝的バリエーションは、参照微生物株と第２の微生物株との間の同定された遺伝的バリエーションのすべてを含む。
【００４３】
一部の実施形態では、本開示は、工業用微生物株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、ａ）親系統微生物株およびそれに由来する工業用微生物株を提供するステップであって、工業用微生物株は、親系統微生物株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；ｂ）親系統微生物株または工業用微生物株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、親系統微生物株と工業用微生物株との間の複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと；ｃ）参照微生物株に対する表現型性能改善について最初のＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択することによって、前記微生物株に表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；ｄ）それぞれが遺伝的バリエーションのユニークな組合せを含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；ｅ）参照微生物株に対する表現型性能改善について後続のＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択することによって、前記微生物株に追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；ｆ）微生物株が、工業用微生物株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを内包する個々の微生物株を含む新しいＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。
【００４４】
一部の実施形態では、本開示は、工業用微生物株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、親系統微生物株のゲノムが撹乱されて、工業用微生物株内に見出される同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。
【００４５】
一部の実施形態では、本開示は、工業用微生物株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、工業用微生物株のゲノムが撹乱されて、親系統微生物株内に見出されない同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。
【００４６】
一部の実施形態では、本開示は、プロモータースワップ微生物株ライブラリーを生成するための方法であって、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のプロモー

タースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つに作動可能に連結したプロモーターラダー由来のプロモーターの１つを含む、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、配列番号１～配列番号６９の配列、またはこれらの組合せを有するプロモーターを含む。

【００４７】

一部の実施形態では、本開示は、所望の表現型を獲得するために微生物を進化させるゲノム操作のプロモータースワップ方法であって、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のプロモータースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つに作動可能に連結したプロモーターラダー由来のプロモーターの１つを含む、ステップと；ｃ）所望の表現型について最初のプロモータースワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｄ）それぞれが遺伝的バリエーションのユニークな組合せを含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のプロモータースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；ｅ）所望の表現型について後続のプロモータースワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｆ）微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するプロモータースワップ微生物株ライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを内包する個々の微生物株を含む新しいプロモータースワップ微生物株ライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００４８】

一部の実施形態では、本開示は、ターミネータースワップ微生物株ライブラリーを生成するための方法であって、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のターミネータースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数に作動可能に連結した基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つを含む、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００４９】

一部の実施形態では、本開示は、所望の表現型を獲得するために微生物を進化させるゲノム操作のターミネータースワップ方法であって、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株を含む最初のターミネータースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステッ

プであって、前記複数の個々の微生物株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数に作動可能に連結した基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つを含む、ステップと；ｃ）所望の表現型について最初のターミネータースワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｄ）それぞれが遺伝的バリエーションのユニークな組合せを含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のターミネータースワップ微生物株ライブラリーを生み出すステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；ｅ）所望の表現型について後続のターミネータースワップ微生物株ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｆ）微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するターミネータースワップ微生物株ライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを内包する個々の微生物株を含む新しいターミネータースワップ微生物株ライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。一部の実施形態では、ターミネーターラダーは、配列番号７０～配列番号８０の配列、またはこれらの組合せを有するターミネーターを含む。

【００５０】

一部の実施形態では、本開示は、所望の表現型を獲得するために微生物を進化させるゲノム操作のトランスポゾン変異誘発方法であって、ａ）トランスポサーゼ酵素およびＤＮＡペイロード配列を提供するステップを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、トランスポサーゼは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．で機能する。一部の実施形態では、転置行列は、ＥＺ－Ｔｎ５トランスポゾンシステムに由来する。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロード配列は、前記トランスポサーゼによって認識され得るモザイクエレメント（ＭＥ）に隣接する。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンであり得る。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、選択マーカーを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、対抗選択マーカーを含む。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、選択可能マーカーを含有するＤＮＡペイロードのループアウトを促進するために使用される。一部の実施形態では、ＧｏＦトランスポゾンは、ＧｏＦエレメントを含む。一部の実施形態では、ＧｏＦトランスポゾンは、プロモーター配列および／または可溶性タグ配列を含む。一部の実施形態では、方法は、ｂ）転置行列およびＤＮＡペイロード配列を組み合わせて複合体を形成するステップと、ｃ）転置行列－ＤＮＡペイロード複合体を微生物株に形質転換するステップとをさらに含み、このようにして微生物株のゲノムにＤＮＡペイロード配列のランダム組込みをもたらす。ＤＮＡペイロードのランダム組込みを含む株は、最初のトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを形成する。一部の実施形態では、方法は、ｄ）所望の表現型について最初のトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ｅ）遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ｆ）所望の表現型について後続のトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ｇ）微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｅ）～ｆ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺

伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々の微生物株を含む新しいトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーが創製される、ステップをさらに含む。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５１】

一部の実施形態では、本開示は、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）スワップ微生物株ライブラリーを生成するための方法を教示する。一部の実施形態では、前記方法は、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のリボソーム結合部位を含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の微生物株を含む最初のＲＢＳ微生物株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つに作動可能に連結したＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つを含む、ステップとを含む。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５２】

一部の実施形態では、本開示は、所望の表現型を獲得するために微生物を進化させるゲノム操作のリボソーム結合部位（ＲＢＳ）スワップ方法であって、ａ）基準微生物株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、基準微生物株において異なる発現プロファイルを呈する複数のＲＢＳを含む、ステップと；ｂ）基準微生物株のゲノムを操作することによって、複数の個々の微生物株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の微生物株を含む最初のＲＢＳライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、基準微生物株に内在する標的遺伝子の１つと作動可能に連結したＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つを含む、ステップと；ｃ）所望の表現型について最初のＲＢＳライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｄ）遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のＲＢＳライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々の微生物株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；ｅ）所望の表現型について後続のＲＢＳライブラリーの個々の微生物株をスクリーニングおよび選択するステップと；ｆ）微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＲＢＳライブラリーの少なくとも２つの個々の微生物株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々の微生物株を含む新しいＲＢＳライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。一部の実施形態では、ターミネーターラダーは、配列番号９７～配列番号１２７の配列、またはこれらの組合せを有するターミネーターを含む。

【００５３】

一部の実施形態では、本開示は、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーを生成するための方法を教示する。一部の実施形態では、方法は、ａ）参照微生物株および第２の微生物株を提供するステップであって、第２の微生物株は、複数の同定可能な遺伝的バリエーションを含み、このような遺伝的バリエーションは、参照微生物株内に存在しない、一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失を含むが、これらに限定されない任意のタイプであり得る、ステップと；ｂ）前記微生物によって産生される１つまたは複数の所定の産物の存在下でより耐性の株について選択するステップとを含む。一部の実施形態では、方法は、ｃ）選択された株の性能（例えば、株において産生される１つまたは複数の産物の収率）を分析し、ＨＴＰスクリーニングによって、参照微生物株と比較して改善された性能

を有する株を選択するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ｄ）改善された性能を引き起こす変異の位置および／または配列を同定するステップをさらに含む。確認された改善された性能を有するこれらの選択された株は、最初の抗代謝産物／発酵産物ライブラリーを形成する。このようなライブラリーは、複数の個々の微生物株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の微生物株を含み、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、複数の同定可能な遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。一部の実施形態では、微生物株によって産生される所定の産物は、スピノシン合成経路に関与する任意の分子、またはスピノシンの産生に影響し得る任意の分子である。一部の実施形態では、所定の産物としては、これらに限定されないが、スピノシンＡ、スピノシンＢ、スピノシンＣ、スピノシンＤ、スピノシンＥ、スピノシンＦ、スピノシンＧ、スピノシンＨ、スピノシンＩ、スピノシンＪ、スピノシンＫ、スピノシンＬ、スピノシンＭ、スピノシンＮ、スピノシンＯ、スピノシンＰ、スピノシンＱ、スピノシンＲ、スピノシンＳ、スピノシンＴ、スピノシンＵ、スピノシンＶ、スピノシンＷ、スピノシンＸ、スピノシンＹ、ノルロイシン、ノルバリン、シュードアグリコン（例えば、異なるスピノシン化合物のための、ＰＳＡ、ＰＳＤ、ＰＳＪ、ＰＳＬなど）およびアルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）が挙げられる。

【００５４】

一部の実施形態では、本開示は、（ａ）（１）１つまたは複数のバックグラウンド微生物株に対する遺伝子変化を表す入力、および（２）対応する性能尺度を含む訓練セットで設定された（populated with）予測モデルにアクセスするステップと；（ｂ）遺伝子変化を表す予測モデルに試験入力（test input）を適用するステップであって、試験入力は、これらの遺伝子変化を組み入れる候補微生物株に対応する、ステップと；（ｃ）予測モデルに少なくとも部分的に基づいて候補微生物株の表現型性能を予測するステップと；（ｄ）これらの予測された性能に少なくとも部分的に基づいて候補微生物株の第１のサブセットを選択するステップと；（ｅ）候補微生物株の第１のサブセットの測定された表現型性能を得るステップと；（ｆ）これらの測定された表現型性能に少なくとも部分的に基づいて候補微生物株の第２のサブセットの選択物を得るステップと；（ｇ）（２）選択された候補微生物株の第２のサブセットの対応する測定された性能とともに（１）選択された候補微生物株の第２のサブセットに対応する入力を予測モデルの訓練セットに加えるステップと；（ｈ）少なくとも１つの候補微生物株の測定された表現型性能が性能測定基準を満たすまで、（ｂ）～（ｇ）を繰り返すステップとによって候補微生物株の設計を反復して改善することを教示する。一部の場合では、予測モデルへの試験入力の第１の適用の間に、試験入力によって表される遺伝子変化が、１つまたは複数のバックグラウンド微生物株に対する遺伝子変化を含み、試験入力の後続の適用の間に、試験入力によって表される遺伝子変化が、候補微生物株の先に選択された第２のサブセット内の候補微生物株に対する遺伝子変化を含む。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５５】

一部の実施形態では、第１のサブセットの選択は、上位性効果に基づき得る。これは、第１のサブセットの第１の選択の間に、１つまたは複数のバックグラウンド微生物株に対する遺伝子変化を表す複数のそれぞれの入力の適用に応じて、１つまたは複数のバックグラウンド微生物株の性能尺度間の相違点の程度を決定するステップと、少なくとも２つの候補微生物株内に組み入れられる遺伝子変化の適用に応じて、１つまたは複数のバックグラウンド微生物株の性能尺度の相違点の程度に少なくとも部分的に基づいて、少なくとも２つの候補微生物株を第１のサブセットに含めるために選択するステップとによって達成することができる。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５６】

一部の実施形態では、本発明は、候補微生物株の反復改良において上位性効果を適用す

る方法であって、少なくとも１つの微生物バックグラウンド株に行われた対応する遺伝子変化に応じて、測定された性能を表すデータを得るステップと；少なくとも２つの遺伝子変化の対応する応答性能尺度間の相違点の程度に少なくとも部分的に基づいて、少なくとも２つの遺伝子変化の選択物を得るステップであって、相違点の程度が、少なくとも２つの遺伝子変化が異なる生物学的経路を通じたこれらの対応する応答性能尺度に影響する程度に関連する、ステップと；選択された遺伝子変化を含む微生物バックグラウンド株に対する遺伝子変化を設計するステップとを含む、方法を教示する。一部の場合では、少なくとも２つの選択された遺伝子変化が設計される微生物バックグラウンド株は、測定された応答性能を表すデータが得られた少なくとも１つの微生物バックグラウンド株と同じである。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５７】

一部の実施形態では、本開示は、単一タイプの遺伝子微生物ライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良法を教示する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰスワップライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良法を教示する。他の実施形態では、本開示は、ＰＲＯスワップライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＳＴＯＰスワップライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、開始／停止コドンスワップライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーのみを利用するＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。

【００５８】

他の実施形態では、本開示は、２つまたはそれよりも多くのタイプの遺伝子微生物ライブラリーを利用するＨＴＰ株改良方法を教示する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰスワップライブラリーおよびＰＲＯスワップライブラリーを組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰスワップライブラリーおよびＳＴＯＰスワップライブラリーを組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＰＲＯスワップライブラリーおよびＳＴＯＰスワップライブラリーを組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰスワップライブラリーを、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび／または抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーと組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＰＲＯスワップライブラリーを、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび／または抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーと組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＳＴＯＰスワップライブラリーを、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび／または抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーと組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、ターミネータースワップライブラリーを、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび／または抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーと組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび／または抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーと組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーおよび抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリーを組み合わせるＨＴＰ株改良方法を教示する。

【００５９】

他の実施形態では、本開示は、複数のタイプの遺伝子微生物ライブラリーを利用するＨ

ＴＰ株改良法を教示する。一部の実施形態では、遺伝子微生物ライブラリーは、組合せ変異（例えば、１つまたは複数の遺伝子に適用されるプロモーター／ターミネーター組合せラダー）を生成するように組み合わせられる。さらに他の実施形態では、本開示のＨＴＰ株改良法は、１つまたは複数の伝統的な株改良法と組み合わせることができる。

【００６０】

一部の実施形態では、本開示のＨＴＰ株改良法は、改良された宿主細胞をもたらす。すなわち、本開示は、１つまたは複数の宿主細胞性質を改善する方法を教示する。一部の実施形態では、改善される宿主細胞性質は、宿主細胞によって産生される目的の産物の体積生産性、比生産性、収率、または力価からなる群から選択される。一部の実施形態では、改善される宿主細胞性質は、体積生産性である。一部の実施形態では、改善される宿主細胞性質は、比生産性である。一部の実施形態では、改善される宿主細胞性質は、収率である。

【００６１】

一部の実施形態では、本開示のＨＴＰ株改良法は、ＨＴＰ株改良法に供されない対照宿主細胞に対して１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれ超の少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。一部の実施形態では、本開示のＨＴＰ株改良方法は、ＳＮＰスワップ、ＰＲＯスワップ、ＳＴＯＰスワップ、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物選択／発酵産物耐性微生物ライブラリー、およびこれらの組合せからなる群から選択される。

【００６２】

よって、一部の実施形態では、本開示のＳＮＰスワップ方法は、ＳＮＰスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれ超の少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。

【００６３】

よって、一部の実施形態では、本開示のＰＲＯスワップ方法は、ＰＲＯスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１

９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれ超の少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。

【００６４】

一部の実施形態では、本開示のターミネータースワップ方法は、ＰＲＯスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれよりも高い少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。

【００６５】

一部の実施形態では、本開示のトランスポゾン変異誘発方法は、ＰＲＯスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれよりも高い少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。

【００６６】

一部の実施形態では、本開示のリボソーム結合部位ライブラリーを使用する方法は、ＰＲＯスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、

４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれよりも高い少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。一部の実施形態では、本開示の抗代謝産物選択／発酵産物耐性方法は、ＰＲＯスワップ方法に供されない対照宿主細胞に対して、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、またはそれよりも高い少なくとも１つの宿主細胞性質の改善（例えば、これらの間の任意の範囲および部分範囲を組み入れての、目的の生体分子の収率または生産性のＸ％の改善）を呈する宿主細胞をもたらす。

【００６７】

本開示は、２つまたはそれよりも多くの微生物株における遺伝子変化の迅速な統合のための、およびＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における遺伝的多様性を生成するための方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、プロトプラスト融合に基づく。一部の実施形態では、少なくとも１つの微生物株が「マークされた」変異を含有するとき、方法は、以下のステップを含む：（１）統合のために操作された株のプールから親株を選択するステップ；（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ；（３）目的の株を融合するステップ；（４）細胞を回収するステップ；（５）「マークされた」変異を有する細胞を選択するステップ；および（６）他の親株に由来する変異の存在について成長している細胞をジェノタイピングするステップ。必要に応じて、方法は、（７）「マークされた」変異からプラスミドを除去するステップをさらに含む。一部の実施形態では、微生物株が「マークされた」変異のどれも含有しないとき、方法は、以下のステップを含む：（１）統合のために操作された株のプールから親株を選択するステップ；（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ；（３）目的の株を融合するステップ；（４）細胞を回収するステップ；（５）第１の親株に由来する変異の存在について細胞を選択するステップ；および（６）他の親株に由来する変異の存在について細胞を選択するステップ。一部の実施形態では、株は、第１の親株および／または他の親株に由来する変異に関連する表現型に基づいて選択される。一部の実施形態では、株は、ジェノタイピングに基づいて選択される。一部の実施形態では、ジェノタイピングするステップは、ハイスループット手順で行われる。

【００６８】

一部の実施形態では、ステップ（３）において、変異の有用な（新規な）組合せを生成する勝算を増加させるために、「マークされた」変異を有する株（stain）のより少ない細胞を使用することができ、このようにしてこれらの「マークされた」細胞を相互作用させ、異なる変異を有する細胞と融合させる機会を増加させる。一部の実施形態では、ステップ（４）において、細胞は、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培

地に蒔かれ、これは、手順を簡素化し、より容易な自動化を可能にする。浸透圧安定化剤は、対抗選択マーカー遺伝子（例えば、ｓａｃＢ遺伝子）を含有する可能性がある細胞の増殖を可能にするようなものである。プロトプラスト化細胞は、処理に対して非常に敏感で、容易に死滅する。このステップは、十分な細胞を回収することを保証する。このステップがより良好に機能するほど、より多くの材料を下流分析のために使用することができる。一部の実施形態では、ステップ（５）において、ステップは、成長している細胞に適切な抗生物質をオーバーレイすることによってなしとげられる。親細胞のどちらもが「マークされた」変異を有さない場合では、株を、目的の株を同定するために他の手段によってジェノタイピングすることができる。このステップは、必要に応じてであり得るが、これは、細胞融合を受ける可能性が最も高い細胞を富化させることを保証する。複数の遺伝子座を「マーク」することが可能であり、この方法により、目的の組合せをより素早く生成できるが、次いで複数のプラスミドは、「無傷の」株を有したい場合に除去されなければならない場合がある。一部の実施形態では、ステップ（６）において、ジェノタイピングされるコロニーの数は、交差の複雑性および選択スキームに依存する。一部の実施形態では、ステップ（７）は、必要に応じてであり、追加の検証またはクライアント送達のために推奨される。一部の実施形態では、株についての操作サイクルの最後に、すべてのプラスミドのレムナントを除去する必要がある。これが、いつ、どのぐらいの頻度で実行されるかは、ユーザーの裁量である。一部の実施形態では、対抗選択可能なｓａｃＢ遺伝子の存在は、このステップを直接的なものにする。一部の実施形態では、少なくとも１つの株は「マークされた」変異を有する。一部の実施形態では、単一の統合ステップの間に融合した株の数は、２またはそれよりも多く、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、またはそれよりも多くあり得る。一部の実施形態では、融合するための１つまたは複数の株を、目的の遺伝子座で選択マーカーによってタグ化することができる。

【００６９】

本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における使用のためのレポータータンパク質および関連するアッセイも提供する。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｄａｓｈｅｒ　ＧＦＰ（配列番号８１）、Ｐａｐｒｉｋａ　ＲＦＰ（配列番号８２）および酵素のベーターグルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）（配列番号８３）からなる群から選択される。一部の実施形態では、これらのレポーター遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、Ｅ．ｃｏｌｉまたはＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．のいずれかのためにコドン最適化されている。一部の実施形態では、本開示の蛍光タンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．において観察される内在性蛍光のスペクトルと重複しないスペクトルを有する。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における目的の遺伝子の活性を決定するために使用される。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における目的のプロモーター配列の強度を決定するために使用される。このようなプロモーターは、天然、合成、またはこれらの組合せであってもよい。天然のプロモーターは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．に生来のもの、またはＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．にとって異種のもののいずれかであり得る。

【００７０】

一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における目的のターミネーター配列の強度を決定するために使用される。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における目的の開始コドンまたは停止コドンの強度を決定するために使用される。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における目的のリボソーム結合部位配列の強度を決定するために使用される。一部の

実施形態では、レポータータンパク質は、配列がＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．のゲノムからループアウトしている場合に、決定するためのマーカーとして使用される。

【００７１】

本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．における遺伝子エレメントの挿入のための中立の組込み部位（ＮＩＳ）も提供する。これらの中立の組込み部位は、個々の遺伝子または多重遺伝子のカセットがＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株のゲノム内に安定的および効率的に組み込まれ得る遺伝的な遺伝子座である。これらの部位への配列の組込みは、株の増殖に対して効果を有さないか、または限られた効果を有する。一部の実施形態では、中立の組込み部位は、配列番号１３２～配列番号１４２の配列を有する遺伝子座からなる群から選択される。一部の実施形態では、ユニークな遺伝子配列（すなわち、透かし）は、株または系統を標識化するためにＮＩＳに挿入され得る（例えば、独自の理由のため）。

【００７２】

一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子エレメントは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．の本明細書に記載の単一の中立の組込み部位に挿入される。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子エレメントは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．の本明細書に記載の２つまたはそれよりも多くの中立の組込み部位、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１の中立の組込み部位に挿入される。一部の実施形態では、中立の組込み部位に挿入された遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株は、挿入を有さない参照株と比較して同等の増殖を有する。一部の実施形態では、中立の組込み部位に挿入された遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株は、挿入を有さない参照株と比較して、改善された性能（例えば、スピノシンなどの１つまたは複数の目的の分子の改善された収率）を有する。一部の実施形態では、多様性ライブラリーに由来する中立の組込み部位に挿入された遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株は、本開示に記載の他の株ライブラリーとさらに組み合わされて、参照株と比較して改善された性能を有する新しい株を創製し、選択することができる。一部の実施形態では、中立の組込み部位に挿入された遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株は、さらに変異誘発させ、所望の表現型を有する追加の新しい株について選択することができる。

【００７３】

本開示は、ドナー微生物細胞からＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のレシピエント細胞に遺伝物質を移入させるための方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、（１）レシピエント細胞を、中期指数期まで継代培養するステップと（必要に応じて）；（２）ドナー細胞を中期指数期まで継代培養するステップと（必要に応じて）；（３）ドナーおよびレシピエント細胞を組み合わせるステップと；（４）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物をコンジュゲーション培地に蒔くステップと；（５）プレートをインキュベートして、細胞をコンジュゲートさせるステップと；（６）ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；（７）非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；（８）さらにプレートをインキュベートして、組み込まれたレシピエント細胞を成長させるステップとを含む。一部の実施形態では、ドナー微生物細胞はＥ．ｃｏｌｉ細胞である。一部の実施形態では、レシピエント微生物細胞は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐ．細胞である。

【００７４】

一部の実施形態では、以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれよりも多くが利用される：（１）レシピエント細胞は、洗浄される；（２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；（３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする少なくとも約４８時間前に継代培養される；（４）

コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．６～１：１．０である；（５）ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約１５～２４時間後に混合物に送達される；（６）レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約４０～４８時間後に混合物に送達される；（７）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれたコンジュゲーション培地は、少なくとも約３時間～１０時間乾燥される；（８）コンジュゲーション培地は、少なくとも約３ｇ／Ｌのグルコースを含む；（９）ドナー細胞の濃度は、約ＯＤ６００＝０．４である；ならびに（１０）レシピエント細胞の濃度は、約ＯＤ５４０＝１３．０である。

【００７５】

一部の実施形態では、ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞が感受性であるが、レシピエント細胞が耐性である薬物である。一部の実施形態では、レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞が耐性であるが、レシピエント細胞が感受性である薬物である。

【００７６】

一部の実施形態では、ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ナリジクス酸（nalidixic）であり、濃度は、約５０～約１５０μｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、スペクチノマイシンであり、濃度は、約１０～約３００μｇ／ｍｌである。

【００７７】

一部の実施形態では、ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ナリジクス酸であり、濃度は、約１００μｇ／ｍｌである。

【００７８】

一部の実施形態では、レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、アプラマイシンであり、濃度は、約５０～約２５０μｇ／ｍｌである。

【００７９】

一部の実施形態では、レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、アプラマイシンであり、濃度は、約１００μｇ／ｍｌである。

【００８０】

一部の実施形態では、方法は、ハイスループットプロセスで実施される。一部の実施形態では、方法は、４８ウェルのＱ－ｔｒａｙ上で実施される。

【００８１】

一部の実施形態では、ハイスループットプロセスは、自動化されている。

【００８２】

一部の実施形態では、ドナー細胞およびレシピエント細胞の混合物は、液体混合物であり、液体混合物のアンプル体積は、ロッキング動作を伴う培地に蒔かれ、液体混合物は、培地の全面積にわたって分散する。

【００８３】

一部の実施形態では、本方法は、ドナー細胞によって提供された組み込まれたＤＮＡを有するレシピエント細胞の後続の播種のために、酵母ピン（yeast pin）によるコロニーピッキングによって接合完了体を移入する自動化プロセスを含む。

【００８４】

一部の実施形態では、コロニーピッキングは、ディッピング動作または撹拌動作のいずれかで実施される。

【００８５】

一部の実施形態では、コンジュゲートする培地は、約３～１０ｇ／Ｌのグルコースを含む改変ＩＳＰ４培地である。

【００８６】

一部の実施形態では、混合物中のドナー細胞またはレシピエント細胞の総数は、約５×10^6～約９×10^6である。一部の実施形態では、コンジュゲーションのために使用さ

れるドナー細胞の濃度は、約ＯＤ０．１～約ＯＤ０．６である。
【００８７】
一部の実施形態では、方法は、以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたは７つで実施される：（１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；（２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；（３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；（４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．８である；（５）ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約２０時間後に混合物に送達される；（６）混合物中のドナー細胞の量またはレシピエント細胞の量は、約7×10^{6}である；ならびに（７）コンジュゲーション培地は、約６ｇ／Ｌのグルコースを含む。
【００８８】
本開示は、標的とするゲノム遺伝子座で遺伝的バリエーションを含有する無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をもたらす、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、ａ）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを導入するステップを含み、前記プラスミドは、（ｉ）選択マーカー、（ｉｉ）対抗選択マーカー、（ｉｉｉ）標的遺伝子座でＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムに組み込まれる遺伝的バリエーションを含有するＤＮＡ断片であって、所望の遺伝的バリエーションに隣接する標的ゲノム遺伝子座に対する相同アームを有するＤＮＡ断片、ならびに（ｉｖ）プラスミド主鎖配列を含む。
【００８９】
一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において標的化ゲノム編集の方法は、ｂ）ゲノム中の選択マーカーの存在に基づいて、最初の相同組換えを受け、標的遺伝子座に組み込まれた遺伝的バリエーションを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；ｃ）対抗選択マーカーの非存在に基づいて、標的遺伝子座に組み込まれた遺伝的バリエーションを有するが、プラスミド主鎖をループアウトする追加の相同組換えを受けているＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップとをさらに含む。一部の実施形態では、選択ステップｂ）および選択ステップｃ）は、同時に実施される。一部の実施形態では、選択ステップｂ）および選択ステップｃ）は、逐次的に実施される。選択の結果として、遺伝的バリエーションを含有するＤＮＡ断片は、選択されたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の標的遺伝子座でＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムに組み込まれるが、選択マーカー、対抗選択マーカーおよび／またはプラスミド主鎖配列は、選択されたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムから「ループアウト」される。
【００９０】
標的とするゲノム遺伝子座は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムの任意の領域を含み得る。一部の実施形態では、標的とするゲノム遺伝子座は、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有しないゲノム領域を含む。
【００９１】
一部の実施形態では、標的化ゲノム編集のためのプラスミドは、温度感受性レプリコンを含まない。
【００９２】
一部の実施形態では、標的化ゲノム編集のためのプラスミドは、複製起点を含まない。
【００９３】
一部の実施形態では、選択ステップ（ｃ）は、組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される。
【００９４】
一部の実施形態では、プラスミドは、単一相同組換えベクターである。一部の実施形態では、プラスミドは、二重相同組換えベクターである。
【００９５】

一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である。

【００９６】

一部の実施形態では、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている。

【００９７】

一部の実施形態では、ｓａｃＢ遺伝子は、配列番号１４６の配列を含む。一部の実施形態では、ｐｈｅＳ遺伝子は、配列番号１４７または配列番号１４８の配列を含む。

【００９８】

一部の実施形態では、プラスミドは、形質転換によってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入される。

【００９９】

一部の実施形態では、形質転換は、プロトプラスト形質転換である。

【０１００】

一部の実施形態では、プラスミドは、コンジュゲーションによってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入され、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、レシピエント細胞であり、ドナー細胞は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを移入するプラスミドを含む。一部の実施形態では、コンジュゲーションは、プラスミドを含むＥ．ｃｏｌｉドナー細胞に基づく。一部の実施形態では、標的遺伝子座は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株中の目的の化合物の産生に関連する遺伝子座である。一部の実施形態では、目的の化合物はスピノシンである。

【０１０１】

結果として生じるゲノム編集されたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、目的の化合物の改善された産生などの１つまたは複数の所望の形質を有し得る。一部の実施形態では、結果として生じるＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、ゲノム編集なしの対照株と比較して、目的の化合物の産生を増大させる。

【０１０２】

一部の実施形態では、方法は、ハイスループット手順として実施される。

【０１０３】

前述のハイスループット（ＨＴＰ）方法は、自動化設備（例えば、液体ハンドラーまたはプレートハンドラーマシン）の少なくとも１つのピースを利用して、前記方法の少なくとも１つのステップを実行することができる。本開示のＨＴＰ方法は、方法がより少ない人的資源を用いて大規模で実行され得るので、微生物（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種）のゲノム操作のより素早く、かつ労働力がより少ない方法を提供する。例えば、一部の実施形態では、本開示の任意の方法は、複数の株が１つずつではなく同時に創製および／または試験されるように、４８ウェルプレート、９６ウェルプレート、１９２ウェルプレート、３８４ウェルプレートなどで実施される。方法は、自動化設備を使用しない他の方法と比較して多くの時間を節約する。一部の実施形態では、方法は、同じまたはより少ない人的資源が本開示の方法で使用されるときに、自動化設備を使用しない他の方法と比較して、約１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、１５０倍、２００倍、２５０倍、３００倍、またはそれよりも速い。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目１）

所望の表現型を獲得するためにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（ＨＴＰ）方法であって、

ａ．同じゲノム株バックグラウンドを有する最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のゲノムを撹乱することによって、ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｂ．前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；
ｃ．遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；
ｄ．前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；
ｅ．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む新しいＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製される、ステップと
を含む、方法。

（項目２）
前記遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性が、ステップ（ｂ）で前記遺伝的バリエーションを組み合わせる前に考慮されない、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目３）
組み合わされる少なくとも１つの遺伝的バリエーションが、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域にない、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目４）
ステップ（ｃ）における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む前記後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、
１）前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーに属する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを導入するステップであって、前記プラスミドは、選択マーカー、対抗選択マーカー、基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片およびプラスミド主鎖配列を含み、前記ＤＮＡ断片は、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにも属する別の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；
２）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づく組込み事象によってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；
３）前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと
によって産生される、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目５）
前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、項目４に記載のＨＴＰ方法。

（項目６）
前記選択ステップ（３）が、組み込まれた前記プラスミドの複製なしで実施される、項目４に記載のＨＴＰ方法。

（項目７）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、

プロモータースワップ微生物株ライブラリー、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー、開始／停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目８）

前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーである、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目９）

前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１０）

株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する前記後続のＨＴＰ遺伝子設計が、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーである、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１１）

前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１２）

前記ゲノムを撹乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、トランスポゾン変異誘発、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つの方法を利用することを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１３）

前記最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１４）

前記最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、S_1Gen_1で表される産生株微生物およびS_nGen_nで表されるこれらに由来する後続の任意の数の微生物世代を含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１５）

前記ステップｃが、プロトプラスト融合技法を使用することによって前記遺伝的バリエーションを迅速に統合することを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１６）

前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１７）

前記プロモータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号１～６９および１７２～１７５から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含む、項目１６に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

（項目１８）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目１９）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、ターミネータースワップ微生物株ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２０）
前記ターミネータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号７０～８０から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含む、項目１９に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２１）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２２）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンおよび／または機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンを含む、項目２１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２３）
前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項目２２に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２４）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２５）
リボソーム結合部位微生物株ライブラリーが、配列番号９７～１２７から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含む、項目２４に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２６）
前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーを含む、項目１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２７）
前記抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーが、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中でのスピノシン合成に関与する分子に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む、項目２６に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
（項目２８）
ＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株および第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーション

を含む、ステップと；
ｂ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株または前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと
を含む、方法。
（項目２９）
前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出される前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される、項目２８に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目３０）
前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出されない前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される、項目２８に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目３１）
結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーを一緒に含む、項目２８に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目３２）
結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットを一緒に含む、項目２８に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目３３）
産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、
ａ．親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株およびそれに由来する産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；
ｂ．前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株または前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記最初のライブラリー中の各株は、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションを含む、ステップと；
ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａ

ｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーを創製するステップと；
ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続の株ライブラリーの個々の株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しいＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目３４）
前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのすべてを含む完全コンビナトリアルライブラリーである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目３５）
前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、参照親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのサブセットを含む完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目３６）
前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目３７）
前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目３８）
前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目３９）
前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４０）
前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出される前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される、項目３３に記載の産生Ｓａ

ｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４１）
前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出されない前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４２）
前記ゲノムを撹乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも１つの方法を利用することを含む、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４３）
後続ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４４）
後続ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４５）
ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４６）
ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４７）
前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目４６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４８）
前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目４６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目４９）
前記同定された遺伝的バリエーションが、プロモータースワップライブラリー由来の人工プロモータースワップ遺伝的バリエーションをさらに含む、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

（項目５０）
前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリー、または後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーのいずれかの少なくとも１つの微生物株のゲノムを操作して、内在性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ標的遺伝子に作動可能に連結したプロモーターラダー由来の１つまたは複数のプロモーターを含ませるステップをさらに含む、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目５１）
前記株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー、開始／停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項目３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目５２）
前記株ライブラリーが、
１）配列番号１～６９から選択される配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含むプロモータースワップ微生物株ライブラリー；
２）配列番号７０～８０から選択される配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含むターミネータースワップ微生物株ライブラリー；および
３）配列番号９７～１２７から選択される配列を有する少なくとも１つのリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含むＲＢＳライブラリー
からなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項目５１に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
（項目５３）
プロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由来のプロモーターの１つまたは複数を含む、ステップと
を含む、方法。
（項目５４）
前記複数のプロモーターの少なくとも１つが、配列番号１～６９から選択される配列を有するプロモーターを含む、項目５３に記載のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目５５）
産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由来の前記プロモーターの１つまたは複数を含む、ステップと；
ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、前記表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｅ．参照Ｅ．ｃｏｌｉ株に対する所望の前記表現型性能改善について前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の新しいプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目５６）
前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。
（項目５７）
前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。
（項目５８）
前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。
（項目５９）

前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６０）

前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６１）

後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６２）

後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６３）

ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６４）

ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６５）

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目６４に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６６）

前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目６５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

（項目６７）

前記プロモーターラダーが、配列番号１～６９から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含む、項目５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌ

ｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。
（項目６８）
ターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数を含む、ステップと
を含む、方法。
（項目６９）
産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数を含む、ステップと；
ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏ

ｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目７０）
前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７１）
前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７２）
前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７３）
前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７４）
後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７５）
後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７６）
ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。
（項目７７）
ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント

分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

（項目７８）

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目７７に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

（項目７９）

前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目７８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

（項目８０）

前記ターミネーターラダーが、配列番号７０～８０から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含む、項目６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

（項目８１）

リボソーム結合部位（ＲＢＳ）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のＲＢＳを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つまたは複数を含む、ステップと

を含む、方法。

（項目８２）

産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のＲＢＳを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つまたは複数を含む、ステップと；

ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈ

ａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目８３）
前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目８４）
前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目８５）
前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目８６）
前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目８７）
後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目８８）
後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加

を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目８９）

ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目９０）

ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目９１）

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目９０に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目９２）

前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目９１に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目９３）

前記ＲＢＳラダーが、配列番号９７～１２７から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのＲＢＳを含む、項目８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

（項目９４）

トランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株多様性ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ）１つまたは複数の基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の細胞の集団にトランスポゾンを導入するステップと；

ｂ）ランダムに組み込まれたトランスポゾンを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数のランダムに組み込まれたトランスポゾンを含む、ステップと

を含む、方法。

（項目９５）

ｃ）前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１つの増大を呈する後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーについて選択するステップをさらに含む、項目９４に記載の方法。

（項目９６）

前記トランスポゾンが、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムへの前記トランスポゾンのｉｎ　ｖｉｖｏ転位を可能にするトランスポゾンおよびトランスポサーゼタンパク質の複合体を使用して、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導

入される、項目９４に記載の方法。
（項目９７）
前記トランスポサーゼタンパク質が、ＥＺ－Ｔｎ５トランスポソームシステムに由来する、項目９４に記載の方法。
（項目９８）
前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンである、項目９４に記載の方法。
（項目９９）
前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項目９４に記載の方法。
（項目１００）
産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、
ａ．トランスポゾン変異誘発により基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数のトランスポゾンを含む、ステップと；
ｂ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｃ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｄ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｅ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目１０１）
前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０２）
前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブ

ラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０３）
前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０４）
前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０５）
後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０６）
後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０７）
ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０８）
ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１０９）
前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目１０８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１１０）
前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目１０９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１１１）
前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンを含む、項目１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒ

ａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１１２）
前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項目１１１に記載の方法。
（項目１１３）
抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ）所定の代謝産物および／または発酵産物に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションの少なくとも１つは、前記所定の代謝産物および／または発酵産物に対して耐性をもたらす、ステップと；
ｂ）前記所定の代謝産物および／または前記発酵産物に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を収集して、前記抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するステップと
を含む、方法。
（項目１１４）
前記所定の代謝産物および／または発酵産物が、スピノシン合成経路に関与する分子、ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する分子、リシン産生経路に関与する分子、トリプトファン経路に関与する分子、トレオニン経路に関与する分子、アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する分子、ならびにデノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子からなる群から選択される、項目１１３に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目１１５）
１）前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであって、必要に応じて、各株が、約５０μｇ／ｍｌ～約２ｍｇ／ｍｌのスピノシンＪ／Ｌに対して耐性であり；
２）前記ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）またはノルロイシンであって、必要に応じて、各株が、約１ｍＭ～約５ｍＭのアルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）に対して耐性であり；
３）前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ－ケトビタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；
４）前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは５－フオロインドールであり；
５）前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベーター－ヒドロキシノルバリンであり；
６）前記アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；
７）前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、項目１１４に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目１１６）
ｂ）前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１つの増大を呈する後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーについて選択するステップ
をさらに含む、項目１１３に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。
（項目１１７）
前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける各株が、スピノシンの合成の増大を呈する、項目１１６に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

（項目１１８）
産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、
ａ）複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを提供するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数の遺伝的バリエーションを含み、前記遺伝的バリエーションは、所定の代謝産物または発酵産物に対する耐性をもたらす、ステップと；
ｂ）参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｃ）前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｄ）前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｅ）前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しい抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
（項目１１９）
前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２０）
前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２１）
前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行する抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２２）
前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行する抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライ

ブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２３）
後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２４）
後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２５）
ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２６）
ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目１２５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２７）
前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目１２６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２８）
前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項目１２７に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
（項目１２９）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号１～６９からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３０）
前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項目１２９に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３１）
前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目１２９に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。

（項目１３２）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含み、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号１～６９からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１３３）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号７０～８０からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３４）
前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項目１３３に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３５）
前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目１３３に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３６）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含み、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記ターミネーターは、配列番号７０～８０からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１３７）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号９７～１２７からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３８）
前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項目１３７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１３９）
前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記ＲＢＳを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目１３７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１４０）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含み、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号９７～１２７からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１４１）
トランスポゾンを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞は、前記トランスポゾンなしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。

（項目１４２）
前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンである、項目１４１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１４３）
前記機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンが、プロモーター、対抗選択マーカー、および／または可溶性タグを含む、項目１４２に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１４４）
前記トランスポゾンが、配列番号１２８～１３１からなる群から選択される配列を含む、項目１４１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
（項目１４５）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、配列番号１２８～１３１からなる群から選択される配列を有するトランスポゾンを含み、各株中の前記トランスポゾンは、異なるゲノム遺伝子座にある、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１４６）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、
１）スピノシン合成経路に関与する分子、
２）ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する分子、
３）リシン産生経路に関与する分子、
４）トリプトファン経路に関与する分子、
５）トレオニン経路に関与する分子、
６）アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する分子、ならびに／または
７）デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子
に対する前記株の耐性をもたらす遺伝的バリエーションを含む、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１４７）
１）前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであり；
２）前記ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）またはノルロイシンであり；
３）前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ－ケトビタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；
４）前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは５－フオロインドールであり；
５）前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベーター－ヒドロキシノルバリンであり；
６）前記アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；
７）前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、
項目１４６に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１４８）
前記分子が、スピノシンＪ／Ｌであり、各株が、約５０μｇ／ｍｌ～約２ｍｇ／ｍｌのスピノシンＪ／Ｌに対して耐性である、項目１４７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１４９）
前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）であり、各株が、約１ｍＭ～約５ｍＭのａＭＭに対して耐性である、項目１４７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
（項目１５０）

レポーター遺伝子を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株であって、前記レポーター遺伝子は、
ａ）緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されており；
ｂ）緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されており；
ｃ）ベーターグルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）タンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されている、
からなる群から選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５１）
ａ）前記緑色蛍光レポータータンパク質が、配列番号１４３のアミノ酸配列を有し；
ｂ）赤色蛍光レポータータンパク質が、配列番号１４４のアミノ酸配列を有し；
ｃ）前記ｇｕｓＡタンパク質が、配列番号１４５のアミノ酸配列を有する、
項目１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５２）
ａ）前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８１の配列を有し；
ｂ）前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８２の配列を有し；
ｃ）前記ｇｕｓＡタンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８３の配列を有する、
項目１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５３）
前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、互いに異なる、項目１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５４）
前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の内在性の蛍光と異なる、項目１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５５）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム中の１つまたは複数の中立の組込み部位に組み込まれたＤＮＡ断片を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株であって、前記中立の組込み部位は、配列番号１３２～１４２から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号１３２～１４２のいずれか１つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５６）
前記組み込まれたＤＮＡ断片なしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目１５５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５７）
前記組み込まれたＤＮＡ断片なしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの改善されたスピノシン産生を有する、項目１５６に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１５８）
前記組み込まれたＤＮＡ断片が、レポータータンパク質をコードする配列を含む、項目１５５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。

（項目１５９）
前記組み込まれたＤＮＡ断片が、トランスポゾンを含む、項目１５５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１６０）
前記組み込まれたＤＮＡ断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位（ａｔｔＢ）を含む、項目１５５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
（項目１６１）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムにＤＮＡ断片を組み込む方法であって、前記ＤＮＡ断片は、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノム中の中立の組込み部位に組み込まれ、前記中立の組込み部位は、配列番号１３２～１４２から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号１３２～１４２のいずれか１つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、方法。
（項目１６２）
前記ＤＮＡ断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位（ａｔｔＢ）を含む、項目１６１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムにＤＮＡ断片を組み込む方法。
（項目１６３）
少なくとも２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝子変異を迅速に統合するための方法であって、
（１）少なくとも２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、各株は、他の株に存在しないユニークなゲノム変異を含む、ステップと；
（２）前記親株のそれぞれからプロトプラストを調製するステップと；
（３）前記親株由来の前記プロトプラストを融合して、２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムを含む融合プロトプラストを産生するステップであって、各親株の前記ゲノムの間の相同組換えが起こる、ステップと
（４）ステップ（３）で産生した前記融合プロトプラストからＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞を回収するステップと；
（５）第１の親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ユニークなゲノム変異を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞について選択するステップと；
（６）第２の親株の前記ユニークなゲノム変異の存在について、ステップ（５）で得られた前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞をジェノタイピングするステップとを含み、
それによって、２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する前記ユニークなゲノム変異を含む新しいＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を得る、方法。
（項目１６４）
前記ユニークなゲノム変異の一方が、選択可能マーカーに連結されるが、他方のユニークなゲノム変異が、いかなる選択可能マーカーにも連結されない、項目１６３に記載の方法。
（項目１６５）
ステップ（３）において、前記選択可能マーカーに連結された前記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラスト：前記選択可能マーカーに連結されない前記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラストの比が、１：１未満である、項目１６４に記載の方法。
（項目１６６）
前記比が、約１：１０～約１：１００、またはそれ未満である、項目１６５に記載の方法。
（項目１６７）
ステップ（４）において、プロトプラスト細胞が、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培地に蒔かれる、項目１６３に記載の方法。
（項目１６８）

ステップ（５）が、前記ユニークなゲノム変異の１つが、選択薬物に耐性をもたらす選択可能マーカーに連結されるときに、成長している前記細胞において適切な前記選択薬物の抗生物質でオーバーレイすることによってなしとげられる、項目１６３に記載の方法。

（項目１６９）

ステップ（５）が、前記ユニークなゲノム変異のどれも、選択可能マーカーに連結されないときに、ジェノタイピングすることによってなしとげられる、項目１６３に記載の方法。

（項目１７０）

２つより多い株に由来する遺伝子変異が、単一の統合プロセスの間に、ランダムに統合される、項目１６３に記載の方法。

（項目１７１）

ステップ（２）において、前記プロトプラストが、約５０００×ｇの速度で、約５分間遠心分離することによって、最初に収集される、項目１６３に記載の方法。

（項目１７２）

脱脂綿を通して前記プロトプラストを濾過するステップを含まない、項目１６３に記載の方法。

（項目１７３）

前記融合プロトプラストが、上層寒天ではなくＲ２ＹＥ培地上で回収される、項目１６３に記載の方法。

（項目１７４）

前記Ｒ２ＹＥ培地が、０．５Ｍのソルビトールおよび０．５Ｍのマンノースを含む、項目１７３に記載の方法。

（項目１７５）

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法であって、

ａ）選択マーカー、対抗選択マーカー、編集される前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片、およびプラスミド主鎖配列を含むプラスミドを基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入するステップと；

ｂ）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて組込み事象を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；

ｃ）前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップであって、前記対抗選択マーカーは、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である、ステップと

を含む、方法。

（項目１７６）

編集されたゲノムを有する結果として生じたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記編集なしの親株と比較して、より良好な性能を有する、項目１７５に記載の方法。

（項目１７７）

前記結果として生じたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記編集なしの親株と比較して、スピノシン産生の増大を有する、項目１７６に記載の方法。

（項目１７８）

前記ｓａｃＢ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項目１７５に記載の方法。

（項目１７９）

前記ｓａｃＢ遺伝子が、配列番号１４６によってコードされるアミノ酸配列に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目１７８に記載の方法。

（項目１８０）

前記ｐｈｅＳ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項目１７５に記載の方法。

（項目１８１）

前記ｐｈｅＳ遺伝子が、配列番号１４７または配列番号１４８によってコードされるア

ミノ酸に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目１８０に記載の方法。
（項目１８２）
ドナー微生物細胞から遺伝物質をＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のレシピエント細胞に移入させる方法であって、
１）必要に応じて、レシピエント細胞を、後期指数期または静止期まで継代培養するステップと；
２）必要に応じて、ドナー細胞を中期指数期まで継代培養するステップと；
３）ドナーおよびレシピエント細胞を組み合わせるステップと；
４）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物をコンジュゲーション培地に蒔くステップと；
５）プレートをインキュベートして、細胞をコンジュゲートさせるステップと；
６）ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；
７）非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；
８）さらにプレートをインキュベートして、組み込まれたレシピエント細胞を成長させるステップと
を含む、方法。
（項目１８３）
前記ドナー微生物細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、項目１８２に記載の方法。
（項目１８４）
以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれよりも多くが利用される、項目１８２に記載の方法：
１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；
２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；
３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；
４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．６～１：１．０である；
５）前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約１５～２４時間後に前記混合物に送達される；
６）前記レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約４０～４８時間後に前記混合物に送達される；
７）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれた前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約３時間～１０時間乾燥される；
８）前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約３ｇ／Ｌのグルコースを含む；
９）ドナー細胞の濃度は、約ＯＤ６００＝０．１～０．６である；
１０）レシピエント細胞の濃度は、約ＯＤ５４０＝５．０～１５．０である。
（項目１８５）
前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約５０～約１５０μｇ／ｍｌである、項目１８４に記載の方法。
（項目１８６）
前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約１００μｇ／ｍｌである、項目１８５に記載の方法。
（項目１８７）
前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アプラマイシンであり、その濃度が、約５０～約２５０μｇ／ｍｌである、項目１８４に記載の方法。
（項目１８８）
前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アプラマイシンであり、その濃度が、約１００μｇ／ｍｌである、項目１８７に記載の方法。
（項目１８９）

ハイスループットプロセスで実施される、項目１８２に記載の方法。
（項目１９０）
４８ウェルのＱ－ｔｒａｙ上で実施される、項目１８９に記載の方法。
（項目１９１）
前記ハイスループットプロセスが、自動化されている、項目１８９に記載の方法。
（項目１９２）
ドナー細胞およびレシピエント細胞の前記混合物が、液体混合物であり、前記液体混合物のアンプル体積が、ロッキング動作を伴う前記培地に蒔かれ、前記液体混合物が、前記培地の全面積にわたって分散する、項目１９１に記載の方法。
（項目１９３）
前記ドナー細胞によって提供された組み込まれたＤＮＡを有するレシピエント細胞の後続の播種のために、酵母ピンによるコロニーピッキングによって接合完了体を移入する自動化プロセスを含む、項目１９１に記載の方法。
（項目１９４）
前記コロニーピッキングが、ディッピング動作または撹拌動作のいずれかで実施される、項目１９３に記載の方法。
（項目１９５）
コンジュゲートする培地が、約３～１０ｇ／Ｌのグルコースを含む改変ＩＳＰ４培地である、項目１８４に記載の方法。
（項目１９６）
前記混合物中のドナー細胞またはレシピエント細胞の総数が、約５×10^6～約９×10^6である、項目１８４に記載の方法。
（項目１９７）
以下の条件の少なくとも４つで実施される、項目１８２に記載の方法：
１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；
２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；
３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；
４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．８である；
５）前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約２０時間後に前記混合物に送達される；
６）前記混合物中の前記ドナー細胞の量または前記レシピエント細胞の量は、約７×10^6である；ならびに
７）前記コンジュゲーション培地は、約６ｇ／Ｌのグルコースを含む。
（項目１９８）
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法であって、標的としたゲノム遺伝子座で遺伝的バリエーションを含有する無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をもたらし、
ａ）プラスミドをＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入するステップであって、前記プラスミドは、
ｉ．選択マーカー、
ｉｉ．対抗選択マーカー、
ｉｉｉ．標的遺伝子座で前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムに組み込まれる遺伝的バリエーションを含有するＤＮＡ断片であって、所望の遺伝的バリエーションに隣接する前記標的ゲノム遺伝子座に対する相同アームを有するＤＮＡ断片、および
ｉｖ．プラスミド主鎖配列を含む、ステップと；
ｂ）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて、最初の相同組換えを受け、前記標的遺伝子座に組み込まれた前記遺伝的バリエーションを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；

ｃ）前記対抗選択マーカーの非存在に基づいて、前記標的遺伝子座に組み込まれた前記遺伝的バリエーションを有するが、前記プラスミド主鎖をループアウトする追加の相同組換えを受けているＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップとを含み、前記標的とするゲノム遺伝子座が、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有しないゲノム領域を含む前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムの任意の領域を含んでいてもよい、方法。

（項目１９９）

前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、項目１９８に記載の方法。

（項目２００）

前記プラスミドが、複製起点を含まない、項目１９８に記載の方法。

（項目２０１）

前記選択ステップ（ｃ）が、前記組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される、項目１９８に記載の方法。

（項目２０２）

前記プラスミドが、単一相同組換えベクターである、項目１９８に記載の方法。

（項目２０３）

前記プラスミドが、二重相同組換えベクターである、項目１９８に記載の方法。

（項目２０４）

前記対抗選択マーカーが、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である、項目１９８に記載の方法。

（項目２０５）

前記ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項目２０４に記載の方法。

（項目２０６）

前記ｓａｃＢ遺伝子が、配列番号１４６によってコードされるアミノ酸配列に対して９０％の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目２０５に記載の方法。

（項目２０７）

前記ｐｈｅＳ遺伝子が、配列番号１４７または配列番号１４８によってコードされるアミノ酸に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目２０５に記載の方法。

（項目２０８）

前記プラスミドが、形質転換によって前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入される、項目１９８に記載の方法。

（項目２０９）

前記形質転換が、プロトプラスト形質転換である、項目１９８に記載の方法。

（項目２１０）

前記プラスミドが、コンジュゲーションによって前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入され、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、レシピエント細胞であり、前記プラスミドを含むドナー細胞が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に前記プラスミドを移入する、項目１９８に記載の方法。

（項目２１１）

前記コンジュゲーションが、前記プラスミドを含むＥ．ｃｏｌｉドナー細胞に基づく、項目１９８に記載の方法。

（項目２１２）

前記標的遺伝子座が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株中の目的の化合物の産生に関連する遺伝子座である、項目１９８に記載の方法。

（項目２１３）

結果として生じるＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記ゲノム編集なしの対照株と比較して、目的の化合物の産生の増加を有する、項目１９８に記載の方法。

（項目２１４）

前記目的の化合物が、スピノシンである、項目２１２または項目２１３に記載の方法。
（項目２１５）
ハイスループット手順として実施される、項目１９８に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【０１０４】
【図１】図１は、多様性プール中のバリエーションを増加させるための本開示のＤＮＡ組換えの方法を示す。物理的または酵素的／化学的な手段により、ＤＮＡ切片、例えば、関連のある種からのゲノム領域を切断することができる。切断したＤＮＡ領域を融解し、再アニールさせ、その結果、オーバーラップする遺伝子領域が、ポリメラーゼ伸長反応を開始する。産物が１つまたは複数の出発配列に由来するエレメントを含むキメラＤＮＡに再アセンブルされるまで、後続の融解／伸長反応を実施する。
【０１０５】
【図２】図２は、選択された配列の改変（例えば、スワップするための１００個のＳＮＰ）を用いて、新しい宿主生物を生成するための本開示の方法の概要を示す。手短に述べると、方法は以下を含む：（１）所望のＤＮＡ挿入断片を、設計し、アセンブリー反応において１つまたは複数の合成オリゴを組み合わせることによって生成する、（２）ＤＮＡ挿入断片を、形質転換プラスミド中にクローニングする、（３）完成したプラスミドを、所望の産生株中に移入させ、そのプラスミドが宿主株のゲノム中に組み込まれる、および、（４）選択マーカーおよび他の望まれないＤＮＡエレメントを、宿主株からループアウトする。ＤＮＡアセンブリーの各ステップは、追加の、品質管理（ＱＣ）のステップ、例えば、増幅およびシーケンシングのためにプラスミドをＥ．ｃｏｌｉ細菌中にクローニングするステップも含むことができる。
【０１０６】
【図３】図３は、本開示の形質転換プラスミドアセンブリー、および宿主生物中へのそのプラスミドの組込みを示す。挿入断片ＤＮＡ（insert DNA）を、アセンブリー反応において１つまたは複数の合成オリゴを組み合わせることによって生成する。所望の配列を含有するＤＮＡ挿入断片に、ゲノムの標的領域に相同なＤＮＡの領域を隣接させる。これらの相同領域は、ゲノムの組込みを促進し、一旦組み込まれると、続くステップでベクター骨格のＤＮＡをループアウトするように設計されたダイレクトリピート領域を形成する。アセンブルされたプラスミドは、挿入断片ＤＮＡを含有し、任意選択で、１つまたは複数の選択マーカーも含有する。
【０１０７】
【図４】図４は、選択された、宿主株に由来するＤＮＡの領域をループアウトするための手順を示す。挿入されたＤＮＡおよび宿主ゲノムのダイレクトリピート領域は、組換え事象において「ループアウトする」ことができる。選択マーカーについて対抗選択された細胞は、ダイレクトリピート領域が隣接するループＤＮＡの欠失を含有する。
【０１０８】
【図５】図５は、本開示の株改良プロセスの実施形態を示す。遺伝子改変を含有する宿主株配列（遺伝子設計）を、多様な株バックグラウンドにおいて、株性能の改善（株構築）について試験する。有益な変異を示す株を分析し（ヒットＩＤおよび分析）、データを、さらに分析するために、ライブラリー（とりわけ、例えば、ＳＮＰスワップライブラリー、ＰＲＯスワップライブラリーおよびそれらの組合せ）に保存する。追加の反復分析のために、本開示の選択規則により、１つまたは複数のライブラリーに由来するエレメントの組合せについて予測される効果に基づいて新たに提案される宿主株配列が生成される。
【０１０９】
【図６Ａ】図６Ａおよび図６Ｂは、本開示の実施形態のうちの１つのＤＮＡアセンブリー、形質転換および株スクリーニングのステップを示す。図６Ａは、ＤＮＡ断片を構築するためのステップ、前記ＤＮＡ断片をベクター中にクローニングするためのステップ、前記ベクターを宿主株中に形質転換するためのステップ、および選択配列を対抗選択によりループアウトするためのステップを示す。図６Ｂは、ハイスループット培養するためのステ

ップ、スクリーニングするためのステップ、および選択された宿主株を評価するためのステップを示す。この図はまた、培養物タンク中の、選択された株の培養、スクリーニングおよび評価を行う任意選択のステップも示す。
【図６Ｂ】図６Ａおよび図６Ｂは、本開示の実施形態のうちの１つのＤＮＡアセンブリー、形質転換および株スクリーニングのステップを示す。図６Ａは、ＤＮＡ断片を構築するためのステップ、前記ＤＮＡ断片をベクター中にクローニングするためのステップ、前記ベクターを宿主株中に形質転換するためのステップ、および選択配列を対抗選択によりループアウトするためのステップを示す。図６Ｂは、ハイスループット培養するためのステップ、スクリーニングするためのステップ、および選択された宿主株を評価するためのステップを示す。この図はまた、培養物タンク中の、選択された株の培養、スクリーニングおよび評価を行う任意選択のステップも示す。
【０１１０】
【図７】図７は、本開示の自動化されたシステムの一実施形態を示す。本開示は、宿主生物のクローニング、形質転換、培養、スクリーニングおよび／またはシーケンシングが可能な多様なモジュールを有する自動化されたロボットシステムの使用を教示する。
【０１１１】
【図８】図８は、本開示の宿主株改良プログラムの実施形態の概要を示す。
【０１１２】
【図９】図９は、およそ８．４×１０^{6}個の塩基対を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのゲノムを描写する（すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれているGalmおよびSparks、「Natural product derived insecticides：discovery and development of spinetoram」J.Ind Microbiol Biotechnol.２０１５年、DOI 10.1007/s10295-015-1710-xから採用）。
【０１１３】
【図１０】図１０は、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍにおける本開示の形質転換実験を示す。０．５ｋｂ～５．０ｋｂの範囲のＤＮＡ挿入断片を、微生物株のゲノムの（相対的な位置１～２４として示す）多様な領域への挿入に対して標的化した。明るい色により、組込みの成功を示し、一方、より暗い色により、挿入の失敗を示す。
【０１１４】
【図１１】図１１は、本開示の方法に従う第１のラウンドのＳＮＰスワッピングの実験を示す。（１）ＣからのＳＮＰをすべて、基準株Ａ中に個々および／またはコンビナトリアルにクローニングする（ＡからＣへの「ウェーブアップ」）。（２）ＣからのＳＮＰをすべて、市販株Ｃから個々および／またはコンビナトリアルに除去する（ＣからＡへの「ウェーブダウン」）。（３）ＢからのＳＮＰをすべて、基準株Ａ中に個々および／またはコンビナトリアルにクローニングする（ＡからＢへのウェーブアップ）。（４）ＢからのＳＮＰをすべて、市販株Ｂから個々および／またはコンビナトリアルに除去する（ＢからＡへのウェーブダウン）。（５）ＣにユニークなＳＮＰをすべて、個々および／またはコンビナトリアルに市販株Ｂ中にクローニングする（ＢからＣへのウェーブアップ）。（６）ＣにユニークなＳＮＰをすべて、市販株Ｃから個々および／またはコンビナトリアルに除去する（ＣからＢへのウェーブダウン）。
【０１１５】
【図１２Ａ】図１２Ａ～図１２Ｄは、プロモータースワップのプロセスにおいて利用できる、スピノシン合成に関与する遺伝子標的の例を示す。図１２Ａは、他のゲノム遺伝子座に存在する遺伝子を含むスピノシン生合成遺伝子クラスターのグラフ表示である。図１２Ｂは、スピノシンポリケチド骨格の生合成アセンブリーである。図１２Ｃは、最終スピノシンＡおよびスピノシンＤ分子を形成するための架橋反応および個別化反応を表す。図１２Ｄは、３’－Ｏ－エチル化および５，６－二重結合還元によるスピネトラムへの後続の合成変換を伴うスピノシンＪの発酵ベースの産生を表す。すべての図面をGalmおよびSparks、２０１５年から採用する。
【図１２Ｂ】図１２Ａ～図１２Ｄは、プロモータースワップのプロセスにおいて利用でき

る、スピノシン合成に関与する遺伝子標的の例を示す。図１２Ａは、他のゲノム遺伝子座に存在する遺伝子を含むスピノシン生合成遺伝子クラスターのグラフ表示である。図１２Ｂは、スピノシンポリケチド骨格の生合成アセンブリーである。図１２Ｃは、最終スピノシンＡおよびスピノシンＤ分子を形成するための架橋反応および個別化反応を表す。図１２Ｄは、３’－Ｏ－エチル化および５，６－二重結合還元によるスピネトラムへの後続の合成変換を伴うスピノシンＪの発酵ベースの産生を表す。すべての図面をGalmおよびSparks、２０１５年から採用する。

【図１２Ｃ】図１２Ａ～図１２Ｄは、プロモータースワップのプロセスにおいて利用できる、スピノシン合成に関与する遺伝子標的の例を示す。図１２Ａは、他のゲノム遺伝子座に存在する遺伝子を含むスピノシン生合成遺伝子クラスターのグラフ表示である。図１２Ｂは、スピノシンポリケチド骨格の生合成アセンブリーである。図１２Ｃは、最終スピノシンＡおよびスピノシンＤ分子を形成するための架橋反応および個別化反応を表す。図１２Ｄは、３’－Ｏ－エチル化および５，６－二重結合還元によるスピネトラムへの後続の合成変換を伴うスピノシンＪの発酵ベースの産生を表す。すべての図面をGalmおよびSparks、２０１５年から採用する。

【図１２Ｄ】図１２Ａ～図１２Ｄは、プロモータースワップのプロセスにおいて利用できる、スピノシン合成に関与する遺伝子標的の例を示す。図１２Ａは、他のゲノム遺伝子座に存在する遺伝子を含むスピノシン生合成遺伝子クラスターのグラフ表示である。図１２Ｂは、スピノシンポリケチド骨格の生合成アセンブリーである。図１２Ｃは、最終スピノシンＡおよびスピノシンＤ分子を形成するための架橋反応および個別化反応を表す。図１２Ｄは、３’－Ｏ－エチル化および５，６－二重結合還元によるスピネトラムへの後続の合成変換を伴うスピノシンＪの発酵ベースの産生を表す。すべての図面をGalmおよびSparks、２０１５年から採用する。

【０１１６】

【図１３】図１３は、同定した遺伝子標的のためのプロモータースワップのプロセスを行うために利用されている例示的なプロモーターライブラリーを示す。ＰＲＯスワップ（すなわちプロモータースワップ）プロセスに利用するプロモーターは、実施例４および表１に見出されるプロモーターである。経路標的の非限定的な例を左のボックスに表し、プロモーターラダーのメンバーの様々な発現強度を中央のボックスに表す。見て分かるように、プロモーターは、強から弱の範囲の発現強度の「ラダー」を提供する。

【０１１７】

【図１４】図１４は、プロモータースワッピングの遺伝的結果が、標的とされる特定の遺伝子に依存することを示す。

【０１１８】

【図１５】図１５は、シード培地中で４８時間成長させたプロモーター株の平均蛍光を示す、例示的なＨＴＰプロモータースワッピングのデータを示す（以前にＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて特徴付けられた非生来のプロモーター、ＰｅｒｍＥ＊に対する変化倍率として提示される非産生条件。相対強度は、およそ５０倍のダイナミックレンジにわたる。３つの生来のプロモーターは、ラダー中の５つの最も強力なプロモーターに含まれ、Ｐ１は、ＰｅｒｍＥ＊よりもおよそ５倍強力であり、２番目に強力なプロモーターよりも約２倍強い。また、合成プロモーターの相対強度は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓについての文献に報告されている結果と類似している。ＡおよびＢは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの異なる株を表す。Ｘ軸は、異なるプロモーターを表し、Ｙ軸は、蛍光により測定した場合の各プロモーターの相対強度を含む。教示するＰＲＯスワップの分子ツールを利用して、任意の目的の化合物の産生を最適化し、かつ／または増加させることができる。当業者であれば、いかにして所望の化合物の産生をコードする標的遺伝子を選び、次いで、教示するＰＲＯスワップの手順を利用するかを理解するはずである。本明細書で教示するリシンの収率の増加を例示するのに示したデータと、本出願中に提示する詳細な開示とにより、ＰＲＯスワップの分子ツールが、ＨＴＰゲノム操作の広く適用可能な進歩となり得ることを当業者は容易に認識するはずである。

【０１１９】
【図１６】図１６は、Ｚｙｍｅｒｇｅｎの９６ウェルプレートモデル（産生関連条件）中で成長したプロモーターラダー株（株Ａおよび株Ｂ）において測定した、対数変換して基準に合わせた蛍光の概要である。これらの株は、宿主ゲノム中に組み込まれた異なるプロモーター＞ＧＦＰ発現カセットを有する。網がけのボックスは、プロモーターの評価の第１のラウンド中に評価した株を示し、後の実験の内部対照を表す。下のバーは、平均蛍光のベースラインを示す。
【０１２０】
【図１７】図１７は、表８に記載したプロモーターＰ２１およびＰ１を有するように操作した株において改善されたスピノシンのＪ＋Ｌ力価を表す。特に、７０００２２５６３５は、株＿Ｂ＿３ｇ０５０９７のＰ１プロモーターを含有し；７０００２０６６４０は、株＿Ｂ＿３ｇ００９２０のＰ２１プロモーターを含有し；７０００２０６５０９は、株＿Ｂ＿３ｇ０２５０９のＰ１プロモーターを含有し；７０００２０６７４５は、株＿Ｂ＿３ｇ０７４５６のＰ２１プロモーターを含有し；７０００２０６７５２は、株＿Ｂ＿３ｇ０７７６６のＰ２１プロモーターを含有し；７０００２３５４８１は、株＿Ｂ＿３ｇ０４６７９のＰ２１プロモーターを含有する。各株のＩＤは、所与の遺伝子（上記の遺伝子型を有する）でのプロモータースワップを表し、したがって、株のＩＤは、それぞれ特定の株の遺伝子型を指す。各ドットは、本発明者らのハイスループットアッセイで試験した株のウェルまたは試料を表す（すなわち、それらは、同じ株に対して収集したすべて個別のデータ点である）。選択したプロモータースワップ株は、スピノシンの産生についてハイスループットアッセイで試験したときに親株（７００１５３５９３）よりも改良を示した。選択可能マーカー、プロモーター遺伝子対、および相同領域を含有するプラスミドを導入して中立部位でゲノム内に組み込むためにコンジュゲーションを使用することにより株を操作した（方法に関するさらなる詳細については、本開示の対抗選択可能マーカーのセクションを参照されたい）。
【０１２１】
【図１８】図１８は、本開示に記載した方法を使用することによりＣｏｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍにおいて行った検討中のインプットデータについての相対的な株性能の分布の例を示す。しかし、類似の手順が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのためにカスタマイズされており、本発明者らにより順調に実施されている。ゼロの相対的な性能は、操作された株がプレート中の基準株に等しく良好に機能したことを示す。本明細書に記載するプロセスは、ゼロを有意に上回って機能する可能性がある株を同定するように設計される。
【０１２２】
【図１９】図１９は、本開示の実施形態のうちの１つの、ＤＮＡアセンブリーおよび形質転換のステップを示す。フローチャートは、ＤＮＡ断片を構築するためのステップ、前記ＤＮＡ断片をベクター中にクローニングするためのステップ、前記ベクターを宿主株中に形質転換するためのステップ、および選択配列を対抗選択によりループアウトするためのステップを示す。
【０１２３】
【図２０】図２０は、ハイスループット培養するためのステップ、スクリーニングするためのステップ、および選択された宿主株を評価するためのステップを示す。この図はまた、培養物タンク中の、選択された株の培養、スクリーニングおよび評価を行う任意選択のステップも示す。
【０１２４】
【図２１】図２１は、本開示のプロモーターラダーに従って一連の調節性の発現を示す、例示的なプロモーターの発現プロファイルを示す。プロモーターＡの発現は、細菌培養の誘導期にピークに達し、一方、プロモーターＢおよびＣはそれぞれ、対数期および定常期にピークに達する。
【０１２５】
【図２２】図２２は、本開示のプロモーターラダーに従って一連の調節性の発現を示す、

例示的なプロモーターの発現プロファイルを示す。プロモーターＡの発現は、選択された基質を添加すると、即時にピークに達するが、基質の濃度が低下するにつれて、検出不能なレベルに急速に戻る。プロモーターＢの発現は、選択された基質を添加すると、即時にピークに達し、基質の対応する低下と一緒に、ゆっくり低下して、検出不能なレベルに戻る。プロモーターＣの発現は、選択された基質を添加すると、ピークに達し、培養全体を通して、基質が消散してしまった後でさえ、高度な発現状態を維持する。

【０１２６】

【図２３】図２３は、本開示のプロモーターラダーに従って一連の構成性の発現レベルを示す、例示的なプロモーターの発現プロファイルを示す。プロモーターＡは、最も低い発現を示し、それに続いて、プロモーターＢおよびＣがそれぞれ、発現レベルを増加させる。

【０１２７】

【図２４】図２４は、株改良のための本開示のＬＩＭＳシステムの実施形態を図示する。

【０１２８】

【図２５】図２５は、本開示のＬＩＭＳシステムの実施形態のクラウドコンピューティングの実装を図示する。

【０１２９】

【図２６】図２６は、本開示の反復予測株設計ワークフローの実施形態を示す。

【０１３０】

【図２７】図２７は、本開示の実施形態に従う、コンピューターシステムの実施形態を図示する。

【０１３１】

【図２８】図２８は、本開示の一実施形態に従うＤＮＡアセンブリーに関連するワークフローを示す。このプロセスは、４つの段階：重要部分（part）の生成、プラスミドアセンブリー、プラスミドのＱＣ、および形質転換のためのプラスミドの調製に分けられる。重要部分の生成の間に、オリゴのシーケンシングのベンダーから、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ Ｓｙｓｔｅｍ（ＬＩＭＳ）により設計されたオリゴを発注し、宿主生物から標的配列をＰＣＲにより増幅するために使用する。これらのＰＣＲの重要部分は、清浄して、混入物を除去し、断片の分析により、すなわち、観察される断片サイズと理論的な断片サイズとのｉｎ ｓｉｌｉｃｏでの品質管理比較、およびＤＮＡの定量を行って、成功について評価する。重要部分を、酵母中にアセンブリーベクターと一緒に形質転換し、プラスミド中に相同組換えによりアセンブルする。アセンブルされたプラスミドを、酵母から単離し、Ｅ．ｃｏｌｉ中に形質転換して、続いて、アセンブリーの品質管理および増幅を行う。プラスミドアセンブリーの品質管理の間に、各プラスミドのいくつかの複製物を単離し、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）を使用して増幅し、正確なアセンブリーについて酵素消化および断片の分析により評価する。ＱＣプロセス中に同定した正確にアセンブルされたプラスミドをヒットピッキングし、恒久的なストックを生成し、プラスミドＤＮＡを抽出し、定量してから、標的宿主生物中に形質転換する。

【０１３２】

【図２９】図２９は、本開示の実施形態に従って、微生物株を設計するための変異の選択における上位性効果の考慮事項を示すフローチャートである。

【０１３３】

【図３０】図３０は、プロトプラスト融合により２つのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．株を統合するためのプロトコールの例を示す。

【０１３４】

【図３１】図３１Ａ～図３１Ｄは、ｄａｓｈｅｒＧＦＰおよびｐａｐｒｉｋａＲＦＰの蛍光スペクトル（それぞれ図３１Ａおよび図３１Ｂ）ならびにＧＦＰ株とＲＦＰ株との混合（１：１）培養物の相対蛍光（それぞれ図３１Ｃおよび図３１Ｄ）の図解を示す。ｄａｓｈｅｒＧＦＰの蛍光励起および発光スペクトルは、ｐａｐｒｉｋａＲＦＰと異なり、両方のレポーターを発現している試料（下のパネル、混合（１：１））から、他方のレポータ

ーからの重大な干渉なしにＧＦＰまたはＲＦＰの蛍光を測定することを可能にしている。下左：ｅｒｍＥ＊＞ＲＦＰ株、ｅｒｍＥ＊＞ＧＦＰ株および両方の株の１：１混合物の相対ＧＦＰ蛍光。ＲＦＰ株では、ｅｒｍＥ＊＞ＧＦＰ株から測定した蛍光と比べてＧＦＰチャネル中の蛍光がほとんど～まったく検出不能であり、混合培養は、（予期した通り）ＧＦＰ株単独のおよそ１／２であるシグナルを産生する。下右：同様に、ＲＦＰ蛍光について最適なパラメータを使用する場合（上右）、ｅｒｍＥ＊＞ＲＦＰ株について強い蛍光シグナルが検出されるが、ｅｒｍＥ＊＞ＧＦＰ株についてほとんど～まったくシグナルが観察されず、１：１混合物は、今回もｅｒｍＥ＊＞ＲＦＰ株の蛍光シグナルのおよそ１／２である蛍光シグナルを産生する。したがって、蛍光レポーターＤａｓｈｅｒＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａＲＦＰは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて機能し、異なる蛍光シグネチャーを有する。ＤａｓｈｅｒＧＦＰの蛍光励起および発光スペクトルは、ＰａｐｒｉｋａＲＦＰと異なり、両方のレポーターを発現している試料（下のパネル、混合（１：１））から、他方のレポーターからの重大な干渉なしにＧＦＰまたはＲＦＰの蛍光を測定することを可能にしている。

【０１３５】

【図３２】図３２は、２シストロン性の二重レポーター試験カセットの設計ならびに機能転写ターミネーターおよび無ターミネーター（ＮｏＴ）対照について予期される相対蛍光を表す図解を示す。ターミネーター試験カセットは、２つの蛍光レポータータンパク質、ｄａｓｈｅｒＧＦＰ（ＧＦＰ）およびｐａｐｒｉｋａＲＦＰ（ＲＦＰ）がタンデムに配列されたものからなる。これらのレポーターの２シストロン性発現は、ｅｒｍＥ＊プロモーターにより駆動される。下流のレポーター（ＲＦＰ）の発現は、上流のリボソーム結合部位（ＲＢＳ）により可能になる。非機能ターミネーター配列が存在する場合、ＲＦＰおよびＧＦＰの発現は、ターミネーターが存在しない場合（ＮｏＴ対照）に観察される発現に類似している。しかし、機能転写ターミネーターがＧＦＰ遺伝子とＲＦＰ遺伝子との間に挿入された場合、ＲＦＰの発現は減弱される。基準に合わせた（ＮｏＴ対照の蛍光を使用）後のＧＦＰに対する減弱のパーセントは、ターミネーター配列の強度を示す。

【０１３６】

【図３３】図３３は、ターミネーター機能試験の結果を示す。バーは、液体培養で４８時間成長させた後のＳ．ｓｐｉｎｏｓａターミネーター（Ｔ１～Ｔ１２）カセット株または無ターミネーター（ＮｏＴ）カセット株の平均（＋１ｓ．ｄ．）相対ＧＦＰ蛍光またはＲＦＰ蛍光を表す。反復した培養物の蛍光を、９６ウェルアッセイプレート中でＴｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ１０００ Ｐｒｏ（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）プレートリーダーを用いて測定した。蛍光をＯＤ（ＯＤ５４０）の基準に合わせ、相対蛍光として（ＮｏＴ、対照培養物のＧＦＰ蛍光またはＲＦＰ蛍光に対する比率として）報告した。ＮｏＴに対するＧＦＰ蛍光の減弱は、おそらくｍＲＮＡの安定性に影響することによる、上流遺伝子（ｄａｓｈｅｒＧＦＰ）の発現に対するターミネーター配列の影響を反映する。株内のＧＦＰに対するＲＦＰ蛍光の減弱は、ターミネーターの強度－それが転写を終結する能力－を反映する。試験した配列のうち、Ｔ１が、最も高い性能であり、ＲＦＰの発現におよそ８６％の低下をもたらしたのに対し、ＧＦＰは、ＧＦＰの発現に＜３０％の低下をもたらした。対照的に、Ｔ２、Ｔ４およびＴ８は、ＲＦＰの発現を減弱させるのに失敗したので、転写ターミネーターとして非機能的であるように見える。バーは、平均＋／－１ＳＤを表す。

【０１３７】

【図３４】図３４は、ターミネーターおよび２つの株のバックグラウンドのそれぞれについて、基準に合わせた相対ＲＦＰ蛍光に比した、基準に合わせた相対ＧＦＰ蛍光の相関プロットを示す。破線は、１：１の相関を表す。この線の下の点は、ＧＦＰ＞ＲＦＰの株を表す（ＲＦＰ蛍光の減弱を示す）。この線を下回る距離（赤の網がけ）は、相対ターミネーター強度を示す。密度楕円は、９０％信頼区間を示す。このプロットは、相対ターミネーター強度の可視化を可能にする。

【０１３８】

【図３５】図３５は、ｇｕｓＡレポーターがＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて機能することを示す。バーは、２つの異なる親株（ＡおよびＢ）で創製したｅｒｍＥ＊＞ｇｕｓＡ株からの無細胞ライセートのインキュベーション後の４０５ｎｍの吸光度により示される平均ｇｕｓＡ活性（＋／－１標準偏差）を示す。４０５ｎｍでの吸光度は、４－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルクロニド基質に作用するｇｕｓＡの酵素活性に起因する黄色に比例する。

【０１３９】

【図３６】図３６は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの内因性蛍光を示す。図は、ＰＢＳで洗浄後の培養Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ細胞の蛍光スキャンにより測定した相対蛍光を表す。曲線は、３５０～６９０ｎｍで２０ｎｍ間隔の励起に起因する蛍光を表す。蛍光は、５００ｎｍ未満で相対的に強いが、励起波長が大きくなるほど減少する。ＤａｓｈｅｒＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａＲＦＰに関連した範囲では、内因性蛍光は最小限である。これらの実験について、ＤａｓｈｅｒＧＦＰを５０５ｎｍで励起させ、発光を５２５～５４５ｎｍの間で捕捉した。これに最も類似しているのは、約５１０ｎｍから始まる曲線である。ＰａｐｒｉｋａＲＦＰを５６４ｎｍで励起させ、蛍光を５８５～６１０ｎｍの間で捕捉した。この範囲で内因性蛍光は、ほぼまったく観察されない。

【０１４０】

【図３７】図３７は、ｐＣＭ３２、ｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１のプラスミドマップを示す。（１）ｐＣＭ３２（左）ならびにｐＣＭ３２エクシジョナーゼ（ｘｉｓ）、インテグラーゼ（ｉｎｔ）および結合部位（ａｔｔＰ）を含有する、コンジュゲーションプラスミドのプラスミドマップ。ボックスで囲んだ部分は、組込みを試験するためにコンジュゲーションベクターにクローニングしたプラスミドの領域を示す（Chenら、Applied Microbiology and Biotechnology.PMID 26260388 DOI：10.1007/s00253-015-6871-zから）；（２）Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａプラスミドｐＳＥ１０１の線形マップ。インテグラーゼ（ｉｎｔ）および結合部位（ａｔｔＰ）をマップの左端に示す（Te Poeleら（2008）Actinomycete integrative and conjugative elements.Antonie Van Leeuwenhoek ９４巻、１２７～１４３頁。）；（３）Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａプラスミドｐＳＥ２１１の線形マップ。インテグラーゼ（ｉｎｔ）および結合部位（ａｔｔＰ）をマップの左端に示す（Te Poeleらから）。

【０１４１】

【図３８】図３８は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノムに対するｐＣＭ３２結合部位のヌクレオチドブラスト（Ｂｌａｓｔｎ）の結果を示す。９９％よりも高い同一性の部位（１４９／１５０ｂｐ）が、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに見出される。

【０１４２】

【図３９】図３９は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノムに対するｐＳＥ１０１結合部位のヌクレオチドブラスト（Ｂｌａｓｔｎ）の結果を示す。９４％よりも高い同一性（１０４／１１１ｂｐ）で、コア７６ヌクレオチドにおいて１００％の同一性を有する部位が、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに見出される。

【０１４３】

【図４０】図４０は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノムに対するｐＳＥ２１１結合部位のヌクレオチドブラスト（Ｂｌａｓｔｎ）の結果を示す。８８％よりも高い同一性（１２２／１３８ｂｐ）で、コア７６ヌクレオチドにおいて１００％の同一性を有する部位が、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに見出される。

【０１４４】

【図４１Ａ】図４１Ａは、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ複製プラスミド（ＡＩＣＥ）ｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１の線形マップを示すが（Te Poeleら、（２００８年）Actinomycete integrative and conjugative elements.Antonie Van Leeuwenhoek ９４巻、１２７～１４３頁から採用。）、これは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに使用される自己複製プラスミドである。斜線のついた矢印は、ＤＮＡの複製に関与すると考えられる遺伝子を表す。図４１Ｂは、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ染色体複製起点を含有する例示的な複製プラスミドの図解を示す。Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａの複製起点がＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおけ

るプラスミドの複製を維持することができるかどうかを試験するために、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａの複製起点を、カナマイシン耐性遺伝子、Ｅ．ｃｏｌｉ複製起点（ｐＢＲ３２２）および転移起点（ｏｒｉｇｉｎ　ｏｆ　ｔｒａｎｓｆｅｒ）（ｏｒｉＴ）を含有するプラスミド中にクローニングして、コンジュゲーションによるプラスミドの送達を可能にする。
【図４１Ｂ】図４１Ａは、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ複製プラスミド（ＡＩＣＥ）ｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１の線形マップを示すが（Te Poeleら、（２００８年）Actinomycete integrative and conjugative elements.Antonie Van Leeuwenhoek ９４巻、１２７～１４３頁から採用。）、これは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに使用される自己複製プラスミドである。斜線のついた矢印は、ＤＮＡの複製に関与すると考えられる遺伝子を表す。図４１Ｂは、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ染色体複製起点を含有する例示的な複製プラスミドの図解を示す。Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａの複製起点がＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるプラスミドの複製を維持することができるかどうかを試験するために、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａの複製起点を、カナマイシン耐性遺伝子、Ｅ．ｃｏｌｉ複製起点（ｐＢＲ３２２）および転移起点（ｏｒｉｇｉｎ　ｏｆ　ｔｒａｎｓｆｅｒ）（ｏｒｉＴ）を含有するプラスミド中にクローニングして、コンジュゲーションによるプラスミドの送達を可能にする。
【０１４５】
【図４２】図４２は、プラスミド設計、機能評価のために使用するアッセイ、および本発明者らのＲＢＳライブラリースクリーニングの結果の図解を示す。本発明者らは、３２個の組込みプラスミド（ＲＢＳを含有する３１個およびＲＢＳなし対照）を設計し、構築した。ｅｒｍＥ＊プロモーターとレバンスクラーゼをコードする遺伝子（ｓａｃＢ）との間のＳ．ｓｐｉｎｏｓａ組込み骨格内に各ＲＢＳを無傷でクローニングすることによりこれらを構築した。結果として得られた株を液体培養で４８時間成長させ、系列希釈物をＴＳＡおよびＴＳＡ＋５％スクロースオムニトレイ上に蒔いた。ＲＢＳが機能的な場合、スクロース上で成長させたときにｓａｃＢが発現して毒性をもたらした（成長しない）。ＲＢＳを含有する株の成長を陽性対照（ｓａｃＢ　ＲＢＳを含有する株）および陰性対照（ＲＢＳなし）と比較することにより、本発明者らは、ＲＢＳの相対強度を決定することができた。このアッセイを使用して、本発明者らは、１９個の機能－１６個の「機能」ＲＢＳおよび3個の「低機能」ＲＢＳを同定した。これらの分析の結果を、下の図４３Ａ～図４３Ｅに示す。
【０１４６】
【図４３Ａ】図４３Ａ～Ｅは、スクロース感受性アッセイのＲＢＳ機能分析の結果－Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ　ＲＢＳループイン株についてＴＳＡ＋Ｋａｎ１００＋５％スクロースに比したＴＳＡ＋Ｋａｎ１００上での成長の比較－を表す。
【図４３Ｂ】図４３Ａ～Ｅは、スクロース感受性アッセイのＲＢＳ機能分析の結果－Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ　ＲＢＳループイン株についてＴＳＡ＋Ｋａｎ１００＋５％スクロースに比したＴＳＡ＋Ｋａｎ１００上での成長の比較－を表す。
【図４３Ｃ】図４３Ａ～Ｅは、スクロース感受性アッセイのＲＢＳ機能分析の結果－Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ　ＲＢＳループイン株についてＴＳＡ＋Ｋａｎ１００＋５％スクロースに比したＴＳＡ＋Ｋａｎ１００上での成長の比較－を表す。
【図４３Ｄ】図４３Ａ～Ｅは、スクロース感受性アッセイのＲＢＳ機能分析の結果－Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ　ＲＢＳループイン株についてＴＳＡ＋Ｋａｎ１００＋５％スクロースに比したＴＳＡ＋Ｋａｎ１００上での成長の比較－を表す。
【図４３Ｅ】図４３Ａ～Ｅは、スクロース感受性アッセイのＲＢＳ機能分析の結果－Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ　ＲＢＳループイン株についてＴＳＡ＋Ｋａｎ１００＋５％スクロースに比したＴＳＡ＋Ｋａｎ１００上での成長の比較－を表す。
【０１４７】
【図４４】図４４は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるトランスポゾン変異誘発のためのプラスミドの線形マップを表す。機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾン、機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾン、および機能獲得型（ＧｏＦ）リサイクル可能トランスポゾンを示す。
【０１４８】

【図４５】図４５は、潜在的な中立の組込み部位を同定するために使用したＳ．ｓｐｉｎｏｓａゲノムにわたる平均遺伝子発現のヒートマップの区画の例を表す。
【０１４９】
【図４６】図４６は、産物（例えば、スピノシンＪ／Ｌ）の存在が、タンク内の濃度の１／１００でＳ．ｓｐｉｎｏｓａの成長を阻害することを示す例を表す。
【０１５０】
【図４７】図４７は、スピノシンＪ／Ｌの存在下での株の選択が、スピノシンＪ／Ｌの存在下で親よりもよく成長する分離株を産生したことを表す。
【０１５１】
【図４８Ａ】図４８Ａおよび図４８Ｂは、スピノシンＪ／Ｌ（図４８Ａ）およびａＭＭ（図４８Ｂ）の両方による選択が、ＨＴＰプレート発酵モデルにおいて親よりも性能のよい株を産生したことを示す。
【図４８Ｂ】図４８Ａおよび図４８Ｂは、スピノシンＪ／Ｌ（図４８Ａ）およびａＭＭ（図４８Ｂ）の両方による選択が、ＨＴＰプレート発酵モデルにおいて親よりも性能のよい株を産生したことを示す。
【０１５２】
【図４９Ａ】図４９Ａ～図４９Ｃは、ｓａｃＢまたはｐｈｅＳを対抗選択マークとして使用する、無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ株を創製するプロセスを表す。図４９Ａは、相同組換えを使用する、ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中へのプラスミドの導入を示す。図４９Ｂは、正の選択を使用する、シングルクロスオーバー組込み事象のための選択を示す。図４９Ｃは、組み換えられてプラスミド主鎖を失った株を得るために負の選択を使用し、それによって無傷の操作された株を創製することを示す。
【図４９Ｂ】図４９Ａ～図４９Ｃは、ｓａｃＢまたはｐｈｅＳを対抗選択マークとして使用する、無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ株を創製するプロセスを表す。図４９Ａは、相同組換えを使用する、ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中へのプラスミドの導入を示す。図４９Ｂは、正の選択を使用する、シングルクロスオーバー組込み事象のための選択を示す。図４９Ｃは、組み換えられてプラスミド主鎖を失った株を得るために負の選択を使用し、それによって無傷の操作された株を創製することを示す。
【図４９Ｃ】図４９Ａ～図４９Ｃは、ｓａｃＢまたはｐｈｅＳを対抗選択マークとして使用する、無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ株を創製するプロセスを表す。図４９Ａは、相同組換えを使用する、ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中へのプラスミドの導入を示す。図４９Ｂは、正の選択を使用する、シングルクロスオーバー組込み事象のための選択を示す。図４９Ｃは、組み換えられてプラスミド主鎖を失った株を得るために負の選択を使用し、それによって無傷の操作された株を創製することを示す。
【０１５３】
【図５０】図５０は、ｓａｃＢがそれぞれの対抗選択剤スクロースに対するＳ．ｓｐｉｎｏｓａの感受性を付与するという実証である。ｓａｃＢ遺伝子を有するまたは有さない株を５％のスクロース感受性について試験した。培養液の希釈系列を６回の反復で、ＴＳＡ／Ｋａｎ１００および５％スクロースを含有するＴＳＡまたはＴＳＡ／Ｋａｎ１００上にスポットした。これにより、５％スクロースを含有する選択培地上に遺伝子を発現している株の制限成長が引き起こされる。図中「＊」は、この株が選択なしで継代培養されたことを示す。
【０１５４】
【図５１】図５１は、ｐｈｅＳが株Ａにおいてそれぞれの対抗選択剤４ＣＰに対するＳ．ｓｐｉｎｏｓａの感受性を付与するという実証である。株Ａ／ＰｈｅＳ（ＳＳ）および株Ａ／Ｐｈｅ（ＳＥ）を２ｇ／Ｌの４ＣＰ感受性について試験した。培養液の希釈系列を６回の反復で、ＴＳＡ／Ｋａｎ１００および４ＣＰを含有するＴＳＡ／Ｋａｎ１００上にスポットした。ＳＥは、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ由来のｐｈｅＳ遺伝子を表し、ＳＳは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ由来のｐｈｅＳ遺伝子を表す。２週間インキュベーション後に、両方のＰｈｅＳ発現株Ａ派生株は、ＴＳＡ／Ｋａｎ１００－４ＣＰ上で成長阻害されるが、ＴＳ

Ａ／Ｋａｎ１００上では無影響である。これは、ＰｈｅＳ（ＳＳ）およびＰｈｅＳ（ＳＥ）がＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて対抗選択マーカーとして役立つ潜在性を有することを示す。

【０１５５】

【図５２】図５２は、対抗選択マーカーとしてｓａｃＢを使用してＨＴＰにおいて操作された株の株ＱＣの結果を示す。６２個の操作された株Ａおよび１４個の操作された株Ｂを作製した。

【０１５６】

【図５３】図５３は、Ｃｏｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍにおいて行った、相関尺度を使用して計算した類似性マトリックスである。しかし、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａについて類似の手順がカスタマイズされており、本発明者らによってうまく実施されている。マトリックスは、ＳＮＰバリアント間の機能類似性の描写である。低い機能類似性を有するＳＮＰの統合は、より高い機能類似性を有するＳＮＰの統合とは対照的に、株性能を改善する可能性がより高いことが期待される。

【０１５７】

【図５４】図５４Ａ～図５４Ｂは、Ｃｏｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍにおいて行った上位性マッピングの実験結果を示す。しかし、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのために類似の手順がカスタマイズされており、本発明者らによってうまく実施されている。低い機能類似性を有するＳＮＰスワップとＰＲＯスワップとの組合せにより、改善された株性能が得られる。図５４Ａは、すべてのＳＮＰ／ＰＲＯスワップの機能類似性によりクラスター化された樹状図を示す。図５４Ｂは、産物の収率により測定した場合の、宿主株の、統合したＳＮＰの性能を示す。より大きなクラスターの距離が、宿主株の統合性能の改善と相関する。

【０１５８】

【図５５】図５５は、実験計画（ＤＯＥ）手法を使用してコンジュゲーション効率を改善するために考慮される要因を示す。

【０１５９】

【図５６】図５６Ａ～図５６Ｂは、ＨＴＰ形式のＥ．ｃｏｌｉ　Ｓ１７＋ＳＳ０１５ドナー細胞の成長（図５６Ａ）、およびＨＴＰ形式でＥ．ｃｏｌｉ　Ｓ１７＋ＳＳ０１５ドナー細胞を使用するコンジュゲーション実験からの結果（図５６Ｂ）を示す。

【０１６０】

【図５７】図５７は、ＨＴＰコンジュゲーションプロトコールに記載した検出のためのＱｐｉｘパラメータを使用して同定したコロニーを示す。

【０１６１】

【図５８】図５８は、パッチから播種し、ＨＴＰ形式で成長した後のＳ．ｓｐｉｎｏｓａ培養物の成長を示す。

【０１６２】

【図５９】図５９は、ＤＯＥベースの最適化の過程を経て完了したコンジュゲーション実験の結果を示す。

【０１６３】

【図６０】図６０は、ＪＭＰ分配モデル化分析によりコンジュゲーション効率に関連づけられると決定された条件を示す。

【０１６４】

【図６１】図６１は、本明細書に記載のＳＮＰスワップを有するように操作された株における、改善されたスピノシンＪ＋Ｌの力価を表す。初期（変異誘発前）の株系統と比較して後期の株に存在するＳＮＰを同定し、後期の株（７０００１５３５９３）からこれらを除去することによりＳＮＰスワップ（ＳＮＰＳＷＰ）株を操作した。選択したＳＮＰＳＷＰ株は、スピノシン産生のためのハイスループットアッセイで試験した場合、親株（７０００１５３５９３）よりも改良を示した。この場合、７０００１５３５９３は、「後期株」と、結果として生じるＳＮＰＳＷＰの親株との両方である。「後期株」は、初期および

後期系統に頼るＳＮＰ　ＳＷＰ実施（swping）の原理のせいで言及されるものである。
【０１６５】
【図６２】図６２は、本明細書に記載のターミネーターを有するように操作された株における改良されたスピノシンＪ＋Ｌの力価を表す。表９に列挙されるターミネーターをいくつかの遺伝子標的の約２５ｂｐ前に導入することによりターミネーター挿入株を操作した。選択したターミネーター挿入株は、スピノシン産生のためのハイスループットアッセイで試験した場合、親株（７０００１５３５９３）よりも改善を示した。
【０１６６】
【図６３】図６３は、本明細書に記載のＲＢＳ配列を有するように操作された株における改善されたスピノシンＪ＋Ｌの力価を表す。表１１に列挙されるＲＢＳをコア生合成遺伝子標的の約０～１５ｂｐ前に導入することによりＲＢＳスワップ（ＲＢＳＳＷＰ）株を操作した。選択したＲＢＳＳＷＰ株は、スピノシン産生のためのハイスループットアッセイで試験した場合、親株（７０００１５３５９３）よりも改良を示した。
【０１６７】
【図６４Ａ】図６４Ａ～図６４Ｃは、異なる株のバックグラウンドで株操作効力を変更し得る、選択マーカーならびに発現を制御するための遺伝子エレメント（ターミネーターおよびプロモーター）の異なる構成を含むように複数の骨格がクローニングされたことを示す。一部の場合では、異なる組込み部位に相同アームを有するように骨格をクローニングして、骨格の効力に及ぼすゲノム部位の効果を試験した。プロモーターｐＤ１－７、Ｐｅｒｍ２、およびＰｅｒｍ８ならびにターミネーターＡ＿Ｔは、以前に特徴付けられたプロモーターであり、本明細書に列挙する他の遺伝子エレメントがこの作業に引用される。
【図６４Ｂ】図６４Ａ～図６４Ｃは、異なる株のバックグラウンドで株操作効力を変更し得る、選択マーカーならびに発現を制御するための遺伝子エレメント（ターミネーターおよびプロモーター）の異なる構成を含むように複数の骨格がクローニングされたことを示す。一部の場合では、異なる組込み部位に相同アームを有するように骨格をクローニングして、骨格の効力に及ぼすゲノム部位の効果を試験した。プロモーターｐＤ１－７、Ｐｅｒｍ２、およびＰｅｒｍ８ならびにターミネーターＡ＿Ｔは、以前に特徴付けられたプロモーターであり、本明細書に列挙する他の遺伝子エレメントがこの作業に引用される。
【図６４Ｃ】図６４Ａ～図６４Ｃは、異なる株のバックグラウンドで株操作効力を変更し得る、選択マーカーならびに発現を制御するための遺伝子エレメント（ターミネーターおよびプロモーター）の異なる構成を含むように複数の骨格がクローニングされたことを示す。一部の場合では、異なる組込み部位に相同アームを有するように骨格をクローニングして、骨格の効力に及ぼすゲノム部位の効果を試験した。プロモーターｐＤ１－７、Ｐｅｒｍ２、およびＰｅｒｍ８ならびにターミネーターＡ＿Ｔは、以前に特徴付けられたプロモーターであり、本明細書に列挙する他の遺伝子エレメントがこの作業に引用される。
【０１６８】
【図６５】図６５は、遺伝子発現のノックダウン（減弱または防止）のためのターミネーターライブラリーの適用を評価するために使用した発現カセットを示す。
【０１６９】
【図６６Ａ】図６６Ａ～図６６Ｂは、プロモーターとＧＦＰのコード配列との間にターミネーターを挿入する結果、ＧＦＰ発現（蛍光）の減弱がもたらされることを示す。ターミネーターノックダウンＧＦＰ試験カセットがゲノムに組み込まれた株の、基準に合わせたＧＦＰ蛍光（平均＋／－９５％信頼区間）を示す。図６６Ａは、強いプロモーター（配列番号２５）とＧＦＰとの間にＴ１、Ｔ３、Ｔ５、Ｔ１１およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４、７９および８０）が挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターのない対照株を示す。図６６Ｂは、中等度に強いプロモーター（配列番号３３）とＧＦＰとの間にＴ１、Ｔ３、Ｔ５およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４および８０）が挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターのない対照株を示す。典型的にはダイヤモンドの上下に観察される水平のダッシュで標準偏差を示す。図の右側の円は、すべての対のチューキー－クレーマー法ＨＳＤ検定に基づく群間の有意差を

示す（重複／交差しない円は、相互に有意に異なる群を示す）。
【図６６Ｂ】図６６Ａ～図６６Ｂは、プロモーターとＧＦＰのコード配列との間にターミネーターを挿入する結果、ＧＦＰ発現（蛍光）の減弱がもたらされることを示す。ターミネーターノックダウンＧＦＰ試験カセットがゲノムに組み込まれた株の、基準に合わせたＧＦＰ蛍光（平均＋／－９５％信頼区間）を示す。図６６Ａは、強いプロモーター（配列番号２５）とＧＦＰとの間にＴ１、Ｔ３、Ｔ５、Ｔ１１およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４、７９および８０）が挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターのない対照株を示す。図６６Ｂは、中等度に強いプロモーター（配列番号３３）とＧＦＰとの間にＴ１、Ｔ３、Ｔ５およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４および８０）が挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターのない対照株を示す。典型的にはダイヤモンドの上下に観察される水平のダッシュで標準偏差を示す。図の右側の円は、すべての対のチューキー－クレーマー法ＨＳＤ検定に基づく群間の有意差を示す（重複／交差しない円は、相互に有意に異なる群を示す）。
【０１７０】
【図６７】図６７は、ＳＮＰスワップペイロードが、表示した中立部位に組み込まれた、株Ｂ由来株の産物（スピノシンＪ＋Ｌ）の力価を表す。部位１、２、３、４、６、９および１０に組み込まれた株は、類似の産物力価を有し、予期される力価（株Ｂの平均力価；図の上の方のバー）と異ならない。中立部位７での組込みは、産物の力価にマイナスの影響を有するように見える。ミーンダイヤモンド（ｍｅａｎ　ｄｉａｍｏｎｄ）は、群平均および９５％信頼区間を示す。典型的にはダイヤモンドの上下に観察される水平のダッシュで標準偏差を示す。図の右側の円は、すべての対のチューキー－クレーマー法ＨＳＤ検定に基づく群間の有意差を示す（重複／交差しない円は、相互に有意に異なる群を示す）。
【０１７１】
【図６８】図６８は、表示した中立部位に組み込まれた場合のＧＦＰの発現の比較を示す。データは、ＧＦＰ発現カセット－強いプロモーター（配列番号２５）がＧＦＰ（配列番号８１）の発現を駆動する－が、表示した中立部位に組み込まれた、ＷＴ由来株およびＢ由来株の基準に合わせた蛍光を示す。Ｐ１－対照は、以前に報告した中立部位に組み込まれたこのカセットの蛍光を示す。発現は大部分の部位で類似している。ＮＳ７だけが、本発明者らが評価した他の中立部位（ＮＳ２、ＮＳ３、ＮＳ４、ＮＳ６、およびＮＳ１０）と有意に異なった。典型的にはダイヤモンドの上下に観察される水平のダッシュで標準偏差を示す。図の右側の円は、すべての対のチューキー－クレーマー法ＨＳＤ検定に基づく群間の有意差を示す（重複／交差しない円は、相互に有意に異なる群を示す）。
【０１７２】
【図６９】図６９は、抗代謝産物選択により操作された株をスピノシン産生の性能について試験したことを示す。すべての株は、親と比べてスピノシン産生性能の低下を示した。株を同定するために、この手法は最適化する必要がある。
【発明を実施するための形態】
【０１７３】
詳細な説明
定義
以下の用語は、当業者であればよく理解していると考えられるが、以下の定義を、本開示の主題の説明を容易にするために示す。
【０１７４】
用語「ａ」または「ａｎ」は、そのエンティティの１つまたは複数を指し、すなわち、複数形の指示対象を指すことができる。したがって、用語「ａ」または「ａｎ」、「１つまたは複数」および「少なくとも１つ」は、本明細書で互換的に使用される。さらに、不定冠詞「ａ」または「ａｎ」による「要素」への言及は、文脈により唯一の要素が存在することが明確に要求されない限り、１つを超える要素が存在する可能性を除外しない。
【０１７５】
本明細書で使用される場合、用語「細胞生物」、「微生物（microorganism）」、ま

たは「微生物（microbe）」は、広く解釈されるべきである。これらの用語は、互換的に使用され、これらに限定されないが、２つの原核生物ドメイン、細菌および古細菌、ならびにある特定の真核真菌および原生生物を含む。一部の実施形態では、本開示は、本開示内に存在するリスト／表および図面の「微生物（microorganism）」または「細胞生物」ま
たは「微生物（microbe）」に言及する。この特徴付けは、表および図面の同定された分類学的な属だけでなく、同定された分類学的な種、ならびに前記表または図面内の任意の生物体の様々な新規のおよび新しく同定または設計された株も参照することができる。同じ特徴付けが、実施例などの本明細書の他の部分におけるこれらの用語の記述にも当てはまる。

【０１７６】

用語「原核生物」は、当技術分野で認識されており、核または他の細胞小器官を含有しない細胞を指す。原核生物は一般に、２つのドメイン、細菌および古細菌の１つに分類される。古細菌と細菌ドメインの生物体間の決定的な差異は、１６ＳリボソームＲＮＡ内のヌクレオチド塩基配列の基本的な差異に基づく。

【０１７７】

用語「古細菌」は、Ｍｅｎｄｏｓｉｃｕｔｅｓ門の生物体のカテゴリー分類を指し、典型的には、珍しい環境内で見つかり、リボソームタンパク質の数および細胞壁におけるムラミン酸の欠如を含めたいくつかの判定基準によって原核生物の残りと区別される。ｓｓｒＲＮＡ分析に基づいて、古細菌は、２つの系統学的に別個の群：ＣｒｅｎａｒｃｈａｅｏｔａおよびＥｕｒｙａｒｃｈａｅｏｔａからなる。これらの生理機能に基づいて、古細菌は、３つのタイプ：メタン生成菌（メタンを産生する原核生物）；高度好塩菌（非常に高濃度の塩（ＮａＣｌ）で生きる原核生物）；および高度（超）好熱菌（thermophilus）（非常に高温で生きる原核生物）へと整理することができる。古細菌を細菌と区別する統一的古細菌フィーチャ（すなわち、細胞壁内にムレインが無いこと、エステル連結膜脂質など）に加えて、これらの原核生物は、これらをその特定の生息環境に適応させるユニークな構造的または生化学的属性を呈する。Ｃｒｅｎａｒｃｈａｅｏｔａは、超好熱性硫黄依存性原核生物から主になり、Ｅｕｒｙａｒｃｈａｅｏｔａは、メタン生成菌および高度好塩菌を含有する。

【０１７８】

「細菌」または「真正細菌」は、原核生物体のドメインを指す。細菌は、以下の少なくとも１１の別個の群を含む：（１）２つの主要な亜門：（１）高Ｇ＋Ｃ群（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ、その他）（２）低Ｇ＋Ｃ群（Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａｓ）が存在するグラム陽性（グラム＋）細菌；（２）Ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ、例えば、紅色光合成＋非光合成グラム陰性細菌（最も「一般的な」グラム陰性細菌を含む）；（３）ラン藻類、例えば、酸素発生型光合成生物；（４）スピロヘータおよび関連種；（５）Ｐｌａｎｃｔｏｍｙｃｅｓ；（６）Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ、Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉａ；（７）Ｃｈｌａｍｙｄｉａ；（８）緑色硫黄細菌；（９）緑色非硫黄細菌（嫌気性光合成生物も）；（１０）放射線抵抗性ミクロコッカスおよび類縁体；（１１）ＴｈｅｒｍｏｔｏｇａおよびＴｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅｓ。

【０１７９】

用語「遺伝的に改変された宿主細胞」、「組換え宿主細胞」、および「組換え株」は、本明細書で互換的に使用され、本開示のクローニングおよび形質転換方法によって遺伝的に改変された宿主細胞を指す。よって、この用語は、宿主細胞（例えば、細菌、酵母細胞、真菌細胞、ＣＨＯ、ヒト細胞など）であって、それが由来した天然に存在する生物体と比較して、それが変更された、改変された、または異なる遺伝子型および／または表現型（例えば、遺伝子改変が微生物のコーディング核酸配列に影響するとき）を呈するように遺伝的に変更、改変、または操作された、宿主細胞を含む。一部の実施形態では、この用

語は、問題の特定の組換え宿主細胞だけでなく、このような宿主細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことが理解される。

【０１８０】

用語「野生型微生物」または「野生型宿主細胞」は、天然に存在する細胞、すなわち、遺伝的に改変されていない細胞を記述する。

【０１８１】

用語「遺伝子操作された」は、宿主細胞のゲノムの任意のマニピュレーション（例えば、核酸の挿入、欠失、変異、または置き換えによる）を指すことができる。

【０１８２】

用語「対照」または「対照宿主細胞」は、遺伝子改変または実験処置の効果を決定するための適切な比較宿主細胞（comparator host cell）を指す。一部の実施形態では、対照宿主細胞は、野生型細胞である。他の実施形態では、対照宿主細胞は、処置宿主細胞を差別化する遺伝子改変（複数可）を除いて、遺伝的に改変された宿主細胞と遺伝的に同一である。一部の実施形態では、本開示は、対照宿主細胞としての親株（例えば、株改良プログラムの基礎として使用されたＳ$_1$株）の使用を教示する。他の実施形態では、宿主細胞は、処置宿主細胞において試験されている特異的プロモーターまたはＳＮＰを欠く遺伝的に同一の細胞であり得る。

【０１８３】

本明細書で使用される用語「産生株」または「産生微生物」は、産生株の性能を改善する（例えば、株を、１つまたは複数の化合物の商業生産のためのより良好な候補にする）野生型または対照宿主細胞生物に由来する１つまたは複数の遺伝子の差を含む宿主細胞を指す。一部の実施形態では、産生株は、商業生産において現在使用されている株である。一部の実施形態では、産生株は、株の性質を改善する１つまたは複数のラウンドの変異／遺伝子操作を受けている生物体である。

【０１８４】

本明細書で使用される場合、用語「対立遺伝子（複数可）」は、遺伝子の１つまたは複数の代替形態のいずれかを意味し、これらの対立遺伝子すべては、少なくとも１つの形質または特性と関係する。二倍体細胞では、所与の遺伝子の２つの対立遺伝子は、一対の相同染色体上の対応する遺伝子座を占有する。

【０１８５】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子座（locus）」（遺伝子座（loci）複数形）は、例えば、遺伝子または遺伝子マーカーが見出される染色体上の具体的な１つもしくは複数の場所または部位を意味する。

【０１８６】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝的に連結された」は、２種またはそれ超の形質であって、これらが交雑によって分離するのが困難であるように、繁殖中に高い割合で共遺伝される、形質を指す。

【０１８７】

本明細書で使用される「組換え」または「組換え事象」は、染色体交差または独立組合せを指す。

【０１８８】

本明細書で使用される場合、用語「表現型」は、個々の遺伝子構造（すなわち、遺伝子型）と環境との間の相互作用から生じる個々の細胞、細胞培養物、生物体、または生物体の群の観察可能な特性を指す。

【０１８９】

本明細書で使用される場合、用語「キメラの」または「組換えの」は、核酸配列またはタンパク質配列を記述するとき、少なくとも２つの異種ポリヌクレオチドもしくは２つの異種ポリペプチドを連結して単一の巨大分子にする、または少なくとも１つの天然の核酸もしくはタンパク質配列の１つもしくは複数のエレメントを再編成する核酸またはタンパク質配列を指す。例えば、用語「組換えの」は、例えば、化学合成による、または遺伝子

操作技法による核酸の単離セグメントのマニピュレーションによる、配列の２つの別の方法で分離されたセグメントの人工の組合せを指すことができる。

【０１９０】

本明細書で使用される場合、「合成ヌクレオチド配列」または「合成ポリヌクレオチド配列」は、天然に存在することが知られていない、または天然に存在しないヌクレオチド配列である。一般に、このような合成ヌクレオチド配列は、任意の他の天然に存在するヌクレオチド配列と比較したとき、少なくとも１つのヌクレオチド差異を含む。

【０１９１】

本明細書で使用される場合、用語「核酸」は、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはこれらの類似体の、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造を指し、よって、二本鎖および一本鎖ＤＮＡ、ならびに二本鎖および一本鎖ＲＮＡを含む。これは、修飾核酸、例えば、メチル化および／またはキャッピングされた核酸、修飾塩基、主鎖修飾を含有する核酸なども含む。用語「核酸」および「ヌクレオチド配列」は、互換的に使用される。

【０１９２】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子」は、生物学的機能と関連したＤＮＡの任意のセグメントを指す。よって、遺伝子は、これらに限定されないが、コード配列および／またはこれらの発現に要求される調節配列を含む。遺伝子は、例えば、他のタンパク質の認識配列を形成する非発現ＤＮＡセグメントも含み得る。遺伝子は、目的の源からのクローニング、または公知のもしくは予測された配列情報からの合成を含めた、様々な源から得ることができ、所望のパラメータを有するように設計された配列を含み得る。

【０１９３】

本明細書で使用される場合、用語「相同の」または「相同体」または「オルソログ」は、当技術分野で公知であり、共通の祖先またはファミリーメンバーを共有し、配列同一性の程度に基づいて決定される関連配列を指す。用語「相同性」、「相同の」、「実質的に同様の」、および「実質的に対応する」は、本明細書で互換的に使用される。これらは、核酸断片であって、１つまたは複数のヌクレオチド塩基の変化が、遺伝子発現を媒介し、またはある特定の表現型を生じさせる核酸断片の能力に影響しない、核酸断片を指す。これらの用語は、本開示の核酸断片の修飾、例えば、最初の無修飾断片と比べて得られる核酸断片の機能的性質を実質的に変更しない１つまたは複数のヌクレオチドの欠失または挿入も指す。したがって、当業者が十分に理解するように、本開示は、具体的な例示的な配列より多くを包含することが理解される。これらの用語は、１つの種、亜種、種類、栽培品種、または株内に見出される遺伝子と、別の種、亜種、種類、栽培品種、または株内の対応するまたは等価な遺伝子との間の関係を記述する。本開示の目的に関して、相同配列が比較される。「相同配列」または「相同体」または「オルソログ」は、機能的に関連していると見なされ、考えられ、または知られている。機能的関係は、これらに限定されないが、（ａ）配列同一性の程度および／または（ｂ）同じもしくは同様の生物学的機能を含めた、いくつかのやり方のいずれか１つにおいて示され得る。好ましくは、（ａ）および（ｂ）の両方が示される。相同性は、当技術分野で容易に利用可能なソフトウェアプログラム、Current Protocols in Molecular Biology（F.M. Ausubelら編、１９８７年）補遺３０、セクション７．７１８、表７．７１に論じられたものなどを使用して決定することができる。いくつかの整列プログラムは、ＭａｃＶｅｃｔｏｒ（Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｌｔｄ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｕ．Ｋ．）、ＡＬＩＧＮ Ｐｌｕｓ（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｅｄｕｃａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）、およびＡｌｉｇｎＸ（Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）である。別の整列プログラムは、デフォルトパラメータを使用するＳｅｑｕｅｎｃｈｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｃｏｄｅｓ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、Ｍｉｃｈｉｇａｎ）である。

【０１９４】

本明細書で使用される場合、用語「内在性の」または「内在性遺伝子」は、天然に存在

する遺伝子であって、それが宿主細胞ゲノム内に天然に見出される場所における天然に存在する遺伝子を指す。本開示との関連で、異種プロモーターを内在性遺伝子に作動可能に連結することは、既存の遺伝子であって、その遺伝子が天然に存在する場所における、既存の遺伝子の前に異種プロモーター配列を遺伝的に挿入することを意味する。本明細書に記載の内在性遺伝子は、本開示の方法のいずれかによって変異された天然に存在する遺伝子の対立遺伝子を含み得る。

【０１９５】

本明細書で使用される場合、用語「外因性の」は、用語「異種の」と互換的に使用され、その生来の源（native source）以外の何らかの源に由来する物質を指す。例えば、用語「外因性タンパク質」または「外因性遺伝子」は、非生来の源または場所由来であり、生物系に人工的に供給されたタンパク質または遺伝子を指す。

【０１９６】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド変化」は、当技術分野でよく理解されているように、例えば、ヌクレオチド置換、欠失、および／または挿入を指す。例えば、変異は、サイレント置換、付加、または欠失を生じさせるが、コードされるタンパク質の性質もしくは活性、またはタンパク質が作製される方法を変更しない変更を含有する。

【０１９７】

本明細書で使用される場合、用語「タンパク質修飾」は、当技術分野でよく理解されているように、例えば、アミノ酸置換、アミノ酸修飾、欠失、および／または挿入を指す。

【０１９８】

本明細書で使用される場合、用語、核酸またはポリペプチドの「少なくとも一部」または「断片」は、このような配列の最小限のサイズ特性を有する部分、または最大で全長分子の、および全長分子を含めた、全長分子の任意のより大きい断片を意味する。本開示のポリヌクレオチドの断片は、遺伝子調節エレメントの生物活性部分をコードすることができる。遺伝子調節エレメントの生物活性部分は、遺伝子調節エレメントを含む本開示のポリヌクレオチドの１つの部分を単離し、本明細書に記載の活性を評価することによって調製することができる。同様に、ポリペプチドの部分は、４アミノ酸、５アミノ酸、６アミノ酸、７アミノ酸などであり得、最大で全長ポリペプチドまで伸び得る。使用される部分の長さは、特定の用途に依存する。ハイブリダイゼーションプローブとして有用な核酸の部分は、１２ヌクレオチドという短さであり得；一部の実施形態では、それは、２０ヌクレオチドである。エピトープとして有用なポリペプチドの部分は、４アミノ酸という短さであり得る。完全長ポリペプチドの機能を果たすポリペプチドの部分は一般に、４アミノ酸より長いはずである。

【０１９９】

バリアントポリヌクレオチドは、ＤＮＡシャッフリングなどの変異誘発および組換え誘導（recombinogenic）手順に由来する配列も包含する。このようなＤＮＡシャッフリングのストラテジーは、当技術分野で公知である。例えば、Stemmer（１９９４年）、PNAS、９１巻：１０７４７～１０７５１頁；Stemmer（１９９４年）、Nature、３７０巻：３８９～３９１頁；Crameriら（１９９７年）、Nature Biotech.、１５巻：４３６～４３８頁；Mooreら（１９９７年）、J. Mol. Biol.、２７２巻：３３６～３４７頁；Zhangら（１９９７年）、PNAS、９４巻：４５０４～４５０９頁；Crameriら（１９９８年）、Nature、３９１巻：２８８～２９１頁；ならびに米国特許第５，６０５，７９３号および同第５，８３７，４５８号を参照。

【０２００】

本明細書に開示のポリヌクレオチドのＰＣＲ増幅に関して、オリゴヌクレオチドプライマーを、目的の任意の生物体から抽出されたｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡから対応するＤＮＡ配列を増幅するためのＰＣＲ反応で使用するのに設計することができる。ＰＣＲプライマーを設計しＰＣＲクローニングするための方法は、当技術分野で一般に公知であり、Sambrookら（２００１年）、Molecular Cloning:A Laboratory Manual（３版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、New York）に開示されてい

る。Innisら編（１９９０年）、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications（Academic Press、New York）；InnisおよびGelfand編（１９９５年）、PCR Strategies（Academic Press、New York）；ならびにInnisおよびGelfand編（１９９９年）PCR Methods Manual（Academic Press、New York）も参照。ＰＣＲの公知の方法としては、これらに限定されないが、対プライマー、ネステッドプライマー、単一特異的プライマー、縮重プライマー、遺伝子特異的プライマー、ベクター特異的プライマー、部分ミスマッチプライマーなどを使用する方法が挙げられる。

【０２０１】

本明細書で使用される用語「プライマー」は、増幅標的にアニールし、ＤＮＡポリメラーゼを結合させ、それによって、プライマー伸長産物の合成が誘導される条件下で、すなわち、ヌクレオチド、およびＤＮＡポリメラーゼなどの重合のための作用物質の存在下で、かつ適当な温度およびｐＨで配置されたとき、ＤＮＡ合成の開始点として機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。（増幅）プライマーは、好ましくは、増幅の効率を最大にするために一本鎖である。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、重合のための作用物質の存在下で伸長産物の合成をプライムするのに十分長くなければならない。プライマーの正確な長さは、プライマーの温度および組成（Ａ／Ｔ対Ｇ／Ｃ含有量）を含めた多くの因子に依存する。一対の双方向性プライマーは、ＰＣＲ増幅などのＤＮＡ増幅の技術分野で一般に使用されるように、１つの順方向プライマーおよび１つの逆方向プライマーからなる。

【０２０２】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、コード配列または機能ＲＮＡの発現を制御することができるＤＮＡ配列を指す。一部の実施形態では、プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流エレメントからなり、後者のエレメントは、エンハンサーと呼ばれることが多い。したがって、「エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激することができるＤＮＡ配列であり、プロモーターの固有のエレメントまたはプロモーターのレベルもしくは組織特異性を増強するために挿入される異種エレメントであり得る。プロモーターは、その全体が生来の遺伝子に由来する場合があり、または天然に見出される異なるプロモーターに由来する異なるエレメントから構成される場合があり、または合成ＤＮＡセグメントを含むことさえできる。異なるプロモーターは、異なる組織もしくは細胞型における、または発達の異なる段階における、または異なる環境条件に応じて遺伝子の発現を指示することができることが当業者によって理解されている。ほとんどの場合、調節配列の正確な境界は、完全に画定されていないので、あるバリエーションのＤＮＡ断片は、同一のプロモーター活性を有し得ることがさらに認識されている。

【０２０３】

本明細書で使用される場合、語句「組換えコンストラクト」、「発現コンストラクト」、「キメラコンストラクト」、「コンストラクト」、および「組換えＤＮＡコンストラクト」は、本明細書で互換的に使用される。組換えコンストラクトは、核酸断片の人工の組合せ、例えば、天然に一緒に見出されない調節配列およびコード配列を含む。例えば、キメラコンストラクトは、異なる源に由来する調節配列およびコード配列、または同じ源に由来するが、天然に見出されるものと異なる様式で配列されている調節配列およびコード配列を含み得る。このようなコンストラクトは、それ自体で使用することができ、またはベクターと併せて使用することができる。ベクターが使用される場合、ベクターの選択は、当業者に周知であるように、宿主細胞を形質転換するのに使用される方法に依存する。例えば、プラスミドベクターを使用することができる。当業者は、本開示の単離核酸断片のいずれかを含む宿主細胞を順調に形質転換、選択、および増殖させるためにベクター上に存在しなければならない遺伝子エレメントをよく知っている。当業者は、異なる独立した形質転換事象は、異なるレベルおよびパターンの発現をもたらし（Jonesら（１９８５年）、EMBO J.、４巻：２４１１～２４１８頁；De Almeidaら（１９８９年）、Mol. Gen. Genetics、２１８巻：７８～８６頁）、よって、所望の発現レベルおよびパターンをディスプレイする系（line）を得るために、複数の事象がスクリーニングされなければ

ならないことも認識する。このようなスクリーニングは、とりわけ、ＤＮＡのサザン分析、ｍＲＮＡ発現のノーザン分析、タンパク質発現のイムノブロッティング分析、または表現型分析によってなしとげることができる。ベクターは、自発的に複製する、または宿主細胞の染色体内に組み込むことができるプラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、プロ－ウイルス、ファージミド、トランスポゾン、人工染色体などであり得る。ベクターは、自律複製していない裸のＲＮＡポリヌクレオチド、裸のＤＮＡポリヌクレオチド、同じ鎖内のＤＮＡおよびＲＮＡの両方から構成されるポリヌクレオチド、ポリリシンコンジュゲートＤＮＡまたはＲＮＡ、ペプチドコンジュゲートＤＮＡまたはＲＮＡ、リポソームコンジュゲートＤＮＡなどでもあり得る。本明細書で使用される場合、用語「発現」は、機能的最終産物、例えば、ｍＲＮＡまたはタンパク質（前駆体または成熟）の産生を指す。

【０２０４】

「作動可能に連結した」は、本文脈において、本開示によるプロモーターポリヌクレオチドのさらなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとの、前記さらなるポリヌクレオチドの転写をもたらす連続した配置を意味する。

【０２０５】

本明細書で使用される用語「目的の産物」または「生体分子」は、供給原料から微生物によって産生される任意の産物を指す。一部の場合では、目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコールなどであり得る。例えば、目的の産物または生体分子は、任意の一次または二次細胞外代謝産物であり得る。一次代謝産物は、とりわけ、エタノール、クエン酸、乳酸、グルタミン酸、グルタメート、リシン、スピノシン、スピネトラム、トレオニン、トリプトファン、および他のアミノ酸、ビタミン、多糖などであり得る。二次代謝産物は、とりわけ、ペニシリンのような抗生物質化合物、またはシクロスポリンＡのような免疫抑制剤、ジベレリンのような植物ホルモン、ロバスタチンのようなスタチン薬、グリセオフルビンのような殺真菌薬などであり得る。目的の産物、または生体分子は、微生物によって産生される任意の細胞内コンポーネント、例えば、カタラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ、ラクターゼ、ストレプトキナーゼ、および多くのその他を含めた微生物酵素でもあり得る。細胞内コンポーネントとして、組換えタンパク質、例えば、インスリン、Ｂ型肝炎ワクチン、インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子、ストレプトキナーゼなども挙げることができる。

【０２０６】

用語「炭素源」は一般に、細胞増殖のための炭素の源として使用されるのに適した物質を指す。炭素源としては、これらに限定されないが、バイオマス加水分解物、デンプン、スクロース、セルロース、ヘミセルロース、キシロース、およびリグニン、ならびにこれらの基質のモノマーコンポーネントが挙げられる。炭素源は、これらに限定されないが、ポリマー、炭水化物、酸、アルコール、アルデヒド、ケトン、アミノ酸、ペプチドなどを含めた様々な形態での様々な有機化合物を含み得る。これらとしては、例えば、様々な単糖、例えば、グルコース、デキストロース（Ｄ－グルコース）など、マルトース、オリゴ糖、多糖、飽和もしくは不飽和脂肪酸、スクシネート、ラクテート、アセテート、エタノールなど、またはこれらの混合物がある。光合成生物は、光合成の産物として炭素源をさらに産生することができる。一部の実施形態では、炭素源は、バイオマス加水分解物およびグルコースから選択され得る。

【０２０７】

用語「供給原料」は、他の産物が作製され得る微生物または発酵プロセスに供給される原料または原料の混合物として定義される。例えば、バイオマスまたはバイオマスに由来する炭素化合物などの炭素源は、発酵プロセスにおいて目的の産物（例えば、低分子、ペプチド、合成化合物、燃料、アルコールなど）を産生する微生物の供給原料である。しかし、供給原料は、炭素源以外の栄養分を含有し得る。

【０２０８】

用語「体積生産性」または「生産速度」は、単位時間当たり、媒体の体積当たりに形成

される産物の量として定義される。体積生産性は、１時間当たり１リットル当たりのグラム（ｇ／Ｌ／ｈ）で報告することができる。

【０２０９】

用語「比生産性」は、産物の形成の速度として定義される。比生産性は、１時間当たり細胞乾燥重量（ＣＤＷ）１グラム当たりの産物のグラム（ｇ／ｇ　ＣＤＷ／ｈ）での比生産性として本明細書でさらに定義される。所与の微生物の$ＯＤ_{６００}$に対するＣＤＷの関係を使用して、比生産性を、１時間当たり６００ｎｍにおける培養ブロスの光学密度（ＯＤ）当たり培養培地１リットル当たりの産物のグラム（ｇ／Ｌ／ｈ／ＯＤ）として表現することもできる。

【０２１０】

用語「収率」は、原料の単位重量当たりに得られる産物の量として定義され、基質１ｇ当たりの産物のｇ（ｇ／ｇ）として表現することができる。収率は、理論的収率のパーセンテージとして表現することができる。「理論的収率」は、産物を作製するのに使用される代謝経路の化学量論比によって決まる所与の量の基質あたりに産生され得る産物の最大量として定義される。

【０２１１】

用語「力価（titre）」または「力価（titer）」は、溶液の強度または溶液中の物質の濃度として定義される。例えば、発酵ブロス中の目的の産物（例えば、低分子、ペプチド、合成化合物、燃料、アルコールなど）の力価は、発酵ブロス１リットル当たりの溶液中の目的の産物のｇ（ｇ／Ｌ）として記述される。

【０２１２】

用語「総力価」は、プロセスにおける初期体積またはプロセスにおける操作体積に対する、プロセスから取り出され、回収される溶液中の目的の産物、適用可能な場合、気相中の目的の産物、および任意の目的の産物を含むがこれらに限定されない、プロセスにおいて産生されるすべての目的の産物の和として定義される。

【０２１３】

本明細書で使用される場合、用語「ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー」または「ライブラリー」は、本開示による遺伝子撹乱のコレクションを指す。一部の実施形態では、本発明のライブラリーは、ｉ）データベースまたは他のコンピューターファイル中の配列情報のコレクション、ｉｉ）上述の一連の遺伝子エレメントをコードする遺伝子コンストラクトのコレクション、またはｉｉｉ）前記遺伝子エレメントを含む宿主細胞株として顕在化させ得る。一部の実施形態では、本開示のライブラリーは、個々のエレメントのコレクション（例えば、ＰＲＯスワップライブラリーのプロモーターのコレクションまたはＳＴＯＰスワップライブラリーのターミネーターのコレクション）を指すことができる。他の実施形態では、本開示のライブラリーは、遺伝子エレメントの組合せ、例えば、プロモーター：：遺伝子、遺伝子：ターミネーター、またはさらにはプロモーター：遺伝子：ターミネーターの組合せも指すことができる。一部の実施形態では、本開示のライブラリーは、宿主生物におけるライブラリーの各メンバーを適用する効果と関連したメタデータをさらに含む。例えば、本明細書で使用されるライブラリーは、特定の種における１つまたは複数の表現型に対するこれらの組合せの結果として生じる効果と一緒に、プロモーター：：遺伝子配列組合せのコレクションを含み、よって、将来のプロモータースワップにおいて前記組合せを使用することについて将来の予測値を改善することができる。

【０２１４】

本明細書で使用される場合、用語「ＳＮＰ」は、核内低分子多形（複数可）を指す。一部の実施形態では、本開示のＳＮＰは、広く解釈されるべきであり、一塩基多型、配列挿入、欠失、反転、および他の配列置き換えを含む。本明細書で使用される場合、用語「非同義の」または「非同義ＳＮＰ」は、宿主細胞タンパク質におけるコード変化をもたらす変異を指す。一部の実施形態では、本開示のＳＮＰは、１つまたは複数の遺伝子の追加のコピー（例えば、生合成酵素遺伝子をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドのコピー）を含む。

【０２１５】
ゲノム操作の「ハイスループット（ＨＴＰ）」方法は、自動化設備（例えば、液体ハンドラーまたはプレートハンドラーマシン）の少なくとも１つのピースを利用して、前記方法の少なくとも１つのステップを実行し得る。
【０２１６】
「無傷のゲノム編集」または「無傷の遺伝子置き換え」は、所望のゲノム編集がなしとげられた後に任意のマーカー配列または任意のプラスミド主鎖配列が種のゲノムに導入されることなく、所与の種の特定のゲノム配列を編集する方法を指す。ゲノム編集は、１つまたは複数のゲノムの核酸の、置換、欠失および／または付加であり得る。
【０２１７】
株改良の伝統的な方法
株改良の伝統的な手法は、２つのタイプの手法：指向株操作およびランダム変異誘発に広く分類され得る。
【０２１８】
株改良の指向操作方法は、特定の生物体の少数の遺伝子エレメントの計画された撹乱を伴う。これらの手法は、典型的には、特定の生合成プログラムまたは発生プログラムをモジュレートすることに着目し、前記経路に影響する遺伝因子および代謝因子の先の知識を利用する。その最も単純な実施形態では、指向操作は、特徴付けられた形質（例えば、遺伝子、プロモーター、または測定可能な表現型を生じさせることができる他の遺伝子エレメント）を、１つの生物体から同じまたは異なる種の別の生物体への移入を伴う。
【０２１９】
株操作のランダム手法は、性能改善を同定するように設計された広範なスクリーニングに加えて、親株のランダム変異誘発を伴う。これらのランダム変異を生じさせる手法には、紫外線への曝露、またはメタンスルホン酸エチルなどの変異誘発化学物質が含まれる。ランダムで概ね予測不可能であるが、株改良のこの伝統的手法は、より指向性の遺伝子マニピュレーションと比較していくつかの利点を有していた。第１に、多くの工業用生物体は、これらの遺伝子レパートリーおよび代謝レパートリーの観点からあまりよく特徴付けられておらず（かつあまりよく特徴付けられていないままであり）、代替の指向改善手法を不可能でなくとも困難にした。
【０２２０】
第２に、比較的よく特徴付けられたシステムにおいてでさえ、工業的性能改善をもたらす遺伝子型の変化は、予測するのが困難であり、時に、既知および未知の機能の多くの遺伝子における累積的変異を必要とする上位性表現型として現れるだけである。
【０２２１】
さらに、長年、所与の工業用生物体において指向ゲノム変異を引き起こすのに要求される遺伝的ツールは、利用可能でなく、または非常に遅く、かつ／もしくは使用するのが困難であった。
【０２２２】
しかし、伝統的な株改良プログラムの適用の拡大により、所与の株系統における獲得が次第に低減し、最終的にさらなる株効率の可能性が枯渇する。有益なランダム変異は、相対的に希有な事象であり、大きいスクリーニングプールおよび高い変異率を必要とする。これは必然的に、「改善された」株における多くの中立のかつ／または有害な（もしくは部分的に有害な）変異の不慮の蓄積をもたらし、それは、最終的に将来の効率向上に対して重荷となる。
【０２２３】
伝統的な累積的改善手法の別の制限事項は、任意の株測定基準に対する任意の特定の変異の効果について分かっている情報が皆無かそれに近いことである。これは基本的に、有益な変異を組み合わせ、統合し、または中立のもしくは有害な変異誘発の「荷物（baggage）」を除去する研究者の能力を制限する。
【０２２４】

変異誘発系統内の株間で変異をランダムに組み換える他の手法および技術が存在する。例えば、ＤＮＡシャッフリング、進化、または分子育種と時に呼ばれる反復的配列組換えのいくつかのフォーマットおよび例は、１９９４年２月１７日に出願された米国特許出願第０８／１９８，４３１号、１９９５年２月１７日に出願された第ＰＣＴ／ＵＳ９５／０２１２６号、１９９５年４月１８日に出願された第０８／４２５，６８４号、１９９５年１０月３０日に出願された第０８／５３７，８７４号、１９９５年１１月３０日に出願された第０８／５６４，９５５号、１９９６年３月２５日に出願された第０８／６２１，８５９号、１９９６年３月２５日に出願された第０８／６２１，４３０号、１９９６年４月１８日に出願された第ＰＣＴ／ＵＳ９６／０５４８０号、１９９６年５月２０日に出願された第０８／６５０，４００号、１９９６年７月３日に出願された第０８／６７５，５０２号、１９９６年９月２７日に出願された第０８／７２１，８２４号、および１９９６年９月２７日に出願された第０８／７２２，６６０号；Stemmer、Science、２７０巻：１５１０頁（１９９５年）；Stemmerら、Gene、１６４巻：４９～５３頁（１９９５年）；Stemmer、Bio/Technology、１３巻：５４９～５５３頁（１９９５年）；Stemmer、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、９１巻：１０７４７～１０７５１頁（１９９４年）；Stemmer、Nature、３７０巻：３８９～３９１頁（１９９４年）；Crameriら、Nature Medicine、２巻（１号）：１～３頁（１９９６年）；Crameriら、Nature Biotechnology、１４巻：３１５～３１９頁（１９９６年）に記載されている。これらのそれぞれは、すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０２２５】

これらとしては、プロトプラスト融合、および変異された株全体にわたるゲノム組換えを促進する全ゲノムシャッフリングなどの技法が挙げられる。酵母および糸状菌などの一部の工業用微生物について、天然の接合サイクル（mating cycle）もペアワイズゲノム組換えのために活用することができる。このように、有害な変異を、変異体を親株で「戻し交配する」ことによって除去し、有益な変異を統合することができる。さらに、２つの異なる株系統由来の有益な変異を潜在的に組み合わせることができ、それにより、単一の株系統をそのままで変異させることから入手可能であり得るものよりもさらなる改善可能性がもたらされる。

【０２２６】

伝統的な株改良プログラムを超えるさらなる改良を提供するために、本開示は、コンピューターで駆動され、分子生物学、自動化、データ分析、および機械学習プロトコールを統合するユニークなＨＴＰゲノム操作プラットフォームを示す。この統合プラットフォームは、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを構築するのに使用される一式のＨＴＰ分子ツールセットを利用する。これらの遺伝子設計ライブラリーは、以下で詳しく述べられる。

【０２２７】

教示されるＨＴＰプラットフォームおよびそのユニークな微生物遺伝子設計ライブラリーは、微生物株発生および進化のパラダイムを基本的にシフトする。例えば、工業用微生物株を開発する伝統的な変異誘発ベース方法は、最終的に、何年ものランダム変異誘発にわたって蓄積された重い変異誘発性ロードを背負った微生物に至る。

【０２２８】

この問題を解決する（すなわち、これらの微生物によって蓄積された遺伝的荷物を除去する）能力は、数十年にわたって微生物研究者が成し遂げられなかった。しかし、本明細書に開示のＨＴＰプラットフォームを利用すると、これらの工業用株を「再建する」ことができ、有害である遺伝子変異を同定および除去することができる。調和して、有益と同定される遺伝子変異を保持し、一部の場合では、改善することができる。結果として生じる微生物株は、これらの親株と比較して優れた表現型形質（例えば、目的の化合物の改善された産生）を実証する。

【０２２９】

さらに、本明細書に教示のＨＴＰプラットフォームは、微生物株性能に対して個々の変異が有する効果を同定し、特徴付け、定量することができる。この情報、すなわち、所与

の遺伝子変化ｘが宿主細胞表現型ｙに対してどのような効果を有するか（例えば、目的の化合物または産物の産生）を生成することができ、次いで、以下で論じられる微生物ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーに記憶することができる。すなわち、各遺伝子順列についての配列情報および宿主細胞表現型に対するその効果が１つまたは複数のデータベースに記憶され、後続の分析（例えば、以下で論じられる上位性マッピング（epistasis mapping））に利用可能である。本開示は、遺伝子挿入コンストラクトの形態で、または前記遺伝子順列を含有する１種または複数の宿主細胞生物体の形態で貴重な遺伝子順列を物理的に保存／記憶する方法も教示する（例えば、以下で論じられるライブラリーを参照）。

【０２３０】

これらのＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーをて洗練されたデータ分析および機械学習プロセスと統合された反復プロセスと結びつけると、宿主細胞を改善するための劇的に異なる方法が出現する。したがって、教示されるプラットフォームは、宿主細胞株を開発する先に論じられた伝統的な方法と基本的に異なる。教示されるＨＴＰプラットフォームは、先の方法に関連した欠点の多くを被らない。これらおよび他の利点は、以下で論じられる、ＨＴＰ分子ツールセットおよび得られる遺伝子設計ライブラリーを参照して明らかである。

【０２３１】

遺伝子設計＆微生物操作：一式のＨＴＰ分子ツールおよびＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを利用する株改良の系統的なコンビナトリアル手法

上述した通り、本開示は、株全体にわたる遺伝子変化の反復性系統的導入および除去によって微生物生物体を操作するための新規ＨＴＰプラットフォームおよび遺伝子設計ストラテジーを提供する。プラットフォームは、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーの創製を可能にし、所与の宿主株への遺伝子変更の効率的なインプリメンテーションを可能にする一式の分子ツールによって支持される。

【０２３２】

本開示のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、特定の微生物株バックグラウンド内に導入され得る可能な遺伝子変更の源として機能を果たす。このように、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、所与の微生物株の初期のまたはさらなる操作に適用され得る遺伝的多様性の宝庫または遺伝子撹乱のコレクションである。宿主株へのインプリメンテーションのために遺伝子設計をプログラムするための技法は、本明細書にその全体が参照により組み込まれている「Microbial Strain Design System and Methods for Improved Large Scale Production of Engineered Nucleotide Sequences」という表題の、係属中の米国特許出願第１５／１４０，２９６号に記載されている。

【０２３３】

このプラットフォームで利用されるＨＴＰ分子ツールセットは、とりわけ、（１）プロモータースワップ（ＰＲＯスワップ）、（２）ＳＮＰスワップ、（３）開始／停止コドン交換、（４）ＳＴＯＰスワップ、（５）配列最適化、（６）トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、（７）リボソーム結合部位（ＲＢＳ）多様性ライブラリー、および（８）抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーを含み得る。本開示のＨＴＰ方法は、（９）上位性マッピングプロトコール、を含めたＨＴＰツールセットの統合／コンビナトリアル使用を指示するための方法も教示する。上述した通り、この一式の分子ツールは、単独または組合せのいずれかで、ＨＴＰ遺伝子設計宿主細胞ライブラリーの創製を可能にする。

【０２３４】

実証されるように、教示されるＨＴＰ微生物操作プラットフォームとの関連で上述のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを利用すると、有益な「原因となる」変異または遺伝子区画の同定および統合、ならびにまた、受動変異または有害な変異または遺伝子区画の同定および除去が可能になる。この新しい手法は、伝統的なランダム変異誘発または指向遺伝子操作（directed genetic engineering）によって達成することができなかった株性能の急速な改善を可能にする。遺伝的荷重を除去し、または遺伝的荷重を有さない株内に有益な変化を統合すると、さらなる改善を可能にし得る追加のランダム変異誘発の新しい、ロバストな出発点も提供される。

【０２３５】
一部の実施形態では、本開示は、オルソゴナルな有益な変化が、変異誘発株系統の様々な個別分岐にわたって同定されるので、これらを、より良好に働く株へと急速に統合することもできることを教示する。これらの変異はまた、変異誘発系統の一部でない株、例えば、指向遺伝子操作によって獲得される改良を有する株へと統合され得る。
【０２３６】
一部の実施形態では、本開示は、それが、発現および非発現遺伝子エレメントを含む複数の異なるゲノム領域にわたって変異のゲノムワイドコンビナトリアル効果を分析し、集められた情報（例えば、実験結果）を使用して株を増強させることが予期される変異組合せを予測するという点で公知の株改良手法と異なる。
【０２３７】
一部の実施形態では、本開示は、ｉ）開示される発明を介した改良に適用できる工業用微生物および他の宿主細胞、ｉｉ）下流分析のための多様性プールの生成、ｉｉｉ）大きいバリアントプールをハイスループットスクリーニングおよびシーケンシングするための方法およびハードウェア、ｉｖ）ゲノムワイド変異の相乗効果の機械学習コンピューター分析および予測のための方法およびハードウェア、ならびにｖ）ハイスループット株操作のための方法を教示する。
【０２３８】
以下の分子ツールおよびライブラリーは、例示的な微生物例の観点から論じられている。当業者は、本開示のＨＴＰ分子ツールは、真核細胞およびより高等の生命体を含めた任意の宿主細胞に適合することを認識する。
【０２３９】
微生物操作プラットフォームで利用される様々なＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーの創製を可能にする同定されたＨＴＰ分子ツールセットのそれぞれを、次に論じる。
【０２４０】
１．プロモータースワップ：プロモータースワップ微生物株ライブラリーを得るための分子ツール
一部の実施形態では、本開示は、全宿主株表現型に対する有益な効果（例えば、収率または生産性）を生じさせるのに最適な発現性質を有するプロモーターを選択する方法を教示する。
【０２４１】
例えば、一部の実施形態では、本開示は、一連の発現強度（例えば、以下に論じられるプロモーターラダー）、または優れた調節性質（例えば、選択された遺伝子のより厳格な調節制御）を呈する、宿主細胞内の１つもしくは複数のプロモーターを同定し、かつ／または１つもしくは複数のプロモーターのバリアントを生成する方法を教示する。これらの同定および／または生成されるプロモーターの特定の組合せを、以下でより詳細に説明されるプロモーターラダーとして一緒にグループ化することができる。
【０２４２】
次いで、問題のプロモーターラダーは、目的の所与の遺伝子と関連させられる。よって、プロモーターP_1～P_8（一連の発現強度を呈するように同定および／または生成された８つのプロモーターを表す）を有し、プロモーターラダーを微生物中の目的の単一遺伝子と関連させる（すなわち、所与の標的遺伝子に作動可能に連結した所与のプロモーターで微生物を遺伝的に操作する）場合、８つのプロモーターの各組合せの効果を、操作された微生物が標的遺伝子と関連した特定のプロモーター（複数可）を除いて他の点では同一の遺伝的バックグラウンドを有することを考慮して、各コンビナトリアル取り組みの結果として生じる操作された株のそれぞれを特徴付けることによって確認することができる。
【０２４３】
このプロセスを介して操作された結果として生じる微生物は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。
【０２４４】

ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、特定の標的遺伝子に作動可能に連結した所与のプロモーターを代表し、前記ライブラリーは、「プロモータースワップ微生物株ライブラリー」と呼ばれる。

【０２４５】

さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与のプロモーターｘは、所与の遺伝子ｙに作動可能に連結しており、前記コレクションは、「プロモータースワップライブラリー」と呼ばれる。

【０２４６】

さらに、表１中のプロモーターを含む同じプロモーターラダーを利用して微生物を操作することができ、ここで、これらのプロモーターのそれぞれは、異なる遺伝子標的に作動可能に連結される。この手順の結果は、目的の標的遺伝子に作動可能に連結した特定のプロモーターを除いて、他の点では遺伝的に同一と仮定される微生物である。これらの微生物は、適切にスクリーニングし、特徴付け、別のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生じさせることができる。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー内の微生物株を特徴付けると、リレーショナルデータベース、オブジェクト指向データベース、または大規模分散ＮｏＳＱＬデータベースを含めた任意のデータ記憶コンストラクトに記憶することができる情報およびデータが生じる。このデータ／情報は、例えば、所与の遺伝子標的に作動可能に連結しているときの所与のプロモーターの効果であり得る。このデータ／情報は、本開示のプロモーターのうちの２つまたはそれ超を所与の遺伝子標的に作動可能に連結することから生じるより広いセットのコンビナトリアル効果でもあり得る。

【０２４７】

プロモーターおよび標的遺伝子の上述の例は、単に例示的であり、その理由は、この概念は、一連の発現強度および任意の所与の数の標的遺伝子の呈示に基づいて一緒にグループ化された任意の所与の数のプロモーターを用いて適用することができるためである。当業者は、任意の遺伝子標的の前に２つまたはそれ超のプロモーターを作動可能に連結する能力も認識する。よって、一部の実施形態では、本開示は、プロモーターラダー由来の１、２、３、またはそれ超のプロモーターが１つまたは複数の遺伝子に作動可能に連結したプロモータースワップライブラリーを教示する。

【０２４８】

要約すると、様々なプロモーターを利用して生物体内の様々な遺伝子の発現を駆動することは、目的の形質を最適化する強力なツールである。本発明者らが開発したプロモータースワッピングの分子ツールは、少なくとも１つの条件下で少なくとも１つの遺伝子座の発現を変更することが実証されたプロモーター配列のラダーを使用する。次いでこのラダーは、ハイスループットゲノム操作を使用して生物体内の遺伝子の群に系統的に適用される。この群の遺伝子は、いくつかの方法のいずれか１つに基づいて目的の形質に影響を与える高い見込みを有すると決定される。これらは、目的の形質に対する公知の機能もしくは影響に基づく選択物、または先に決定された有益な遺伝的多様性に基づくアルゴリズム選択物を含み得る。一部の実施形態では、遺伝子の選択物は、所与の宿主内のすべての遺伝子を含み得る。他の実施形態では、遺伝子の選択物は、ランダムに選択された所与の宿主内のすべての遺伝子のサブセットであり得る。

【０２４９】

次いで、遺伝子に連結したプロモーター配列を含有する生物体の結果として生じるＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが、ハイスループットスクリーニングモデルにおいて性能について評価され、性能を増大させるプロモーター－遺伝子連鎖が決定され、情報がデータベースに記憶される。遺伝子撹乱（すなわち、所与の遺伝子ｙに作動可能に連結した所与のプロモーターｘ）のコレクションは、「プロモータースワップライブラリー」を形成し、これは、微生物操作処理で利用される潜在的な遺伝子変更の源として利用することができる。経時的に、より大きいセットの遺伝子撹乱は、より多様な宿主細胞バックグラウンドに対してインプリメントされるので、各ライブラリーは、実験的に確認されたデ

ータのコーパスとしてより強力になり、それを使用して目的の任意のバックグラウンドに対する標的とした変化をより正確かつ予想通りに設計することができる。

【０２５０】

生物体内の遺伝子の転写レベルは、生物体挙動に影響するための重要な管理点である。転写は、翻訳（タンパク質発現）としっかりと共役し、このタンパク質は、生物体挙動を決定する量で発現される。細胞は、数千の異なるタイプのタンパク質を発現し、これらのタンパク質は、多数の複雑なやり方で相互作用して機能を生み出す。一連のタンパク質の発現レベルを系統的に変更することによって、機能は、複雑性のために、予測することが困難であるように変更され得る。一部の変更は、性能を増大させることができ、したがって、性能を評価するための機構と連関して、この技法は、機能が改善された生物体の生成を可能にする。

【０２５１】

低分子合成経路との関連で、酵素は、基質で始まり、目的の低分子で終わる、直鎖または分岐鎖中で該酵素の低分子基質および産物を介して相互作用する。これらの相互作用は、順次連結されるので、このシステムは、分散制御を呈し、１つの酵素の発現の増大は、別の酵素が律速となるまで経路フラックスを増大させることができるだけである。

【０２５２】

代謝制御分析（ＭＣＡ）は、実験データおよび第１原理から、どの１つまたは複数の酵素が律速であるかを決定するための方法である。しかし、ＭＣＡは、それが新しい律速な酵素を決定するのに各発現レベル変化後に広範な実験を必要とするので、限定されている。プロモータースワッピングは、この状況において有利であり、その理由は、プロモーターラダーを経路内の各酵素に適用することによって、律速の酵素が見出され、同じことを後続のラウンドで行って律速となる新しい酵素を見出すことができるためである。さらに、機能の読み取りは、目的の低分子のより良好な産生であるので、どの酵素が律速であるかを決定する実験は、産生を増大させる操作と同じであり、よって開発時間を短縮する。一部の実施形態では、本開示は、多ユニット酵素の個々のサブユニットをコードする遺伝子へのＰＲＯスワップの適用を教示する。さらに他の実施形態では、本開示は、個々の酵素、または生合成経路全体の調節を担う遺伝子にＰＲＯスワップ技法を適用する方法を教示する。

【０２５３】

一部の実施形態では、本開示のプロモータースワップツールを使用して、選択された遺伝子標的の最適の発現を同定することができる。一部の実施形態では、プロモータースワップの目標は、標的遺伝子の発現を増大させて代謝経路または遺伝経路における障壁を低減することであり得る。他の実施形態では、プロモータースワップの目標は、標的遺伝子の発現が要求されないとき、前記標的遺伝子の発現を低減して宿主細胞内の不要なエネルギー消費を回避することであり得る。

【０２５４】

転写、輸送、またはシグナル伝達のような他の細胞系という状況で、様々な合理的な方法を使用して、どのタンパク質が発現変化の標的であり、その変化が何であるべきかを経験的に試みて見出すことができる。これらの合理的な方法は、性能を改善するものを見出すのに試験されなければならない撹乱の数を低減するが、これらは、かなりのコストでそれを行う。遺伝子欠失スタディにより、その存在が特定の機能に極めて重要であるタンパク質が同定され、次いで重要な遺伝子を過剰発現させることができる。タンパク質相互作用の複雑性に起因して、これは、性能の増大において効果的でないことが多い。細胞におけるタンパク質レベルの関数として転写またはシグナル伝達挙動を第１原理から記述することを試みる異なるタイプのモデルが開発された。これらのモデルは、多くの場合、発現変化が異なる機能または改善された機能をもたらし得る標的を示唆する。これらのモデルの根底をなす仮定は、過度に単純化されており、パラメータは、測定するのが困難であり、したがって、これらが行う予測は、特に非モデル生物体について誤っていることが多い。遺伝子欠失およびモデル化の両方を用いると、ある特定の遺伝子にどのように影響する

かを決定するのに要求される実験は、性能を改善する変化を起こすための後続の仕事と異なる。プロモータースワッピングは、これらの課題を回避し、その理由は、特定の撹乱の重要性を強調する構築された株も、すでに改良された株であるためである。

【０２５５】

よって、特定の実施形態では、プロモータースワッピングは、

【０２５６】

１．「ラダー」として作用する一連の「ｘ」プロモーターを選択するステップ。理想的にはこれらのプロモーターは、多重ゲノム遺伝子座全体にわたって高度に多様な発現をもたらすことが示されているが、唯一の要件は、これらが遺伝子発現を何らかのやり方で撹乱することである。

【０２５７】

２．標的にする一連の「ｎ」遺伝子を選択するステップ。このセットは、ゲノム内のあらゆるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、またはＯＲＦのサブセットであり得る。サブセットは、先に実証された有益な撹乱（先のプロモータースワップもしくは先のＳＮＰスワップ）との関連によって、先に生成された撹乱間の上位性相互作用に基づくアルゴリズム選択、標的にする有益なＯＲＦに関する仮説に基づく他の選択判定基準によって、またはランダム選択を介して、機能に関連したＯＲＦについてのアノテーションを使用して選択することができる。他の実施形態では、「ｎ」標的化遺伝子は、非コードＲＮＡを含めた非タンパク質コード遺伝子を含み得る。

【０２５８】

３．以下の遺伝子改変を迅速に、かつ一部の実施形態では、並行して実行するためのハイスループット株操作：生来のプロモーターが標的遺伝子ｎの前に存在し、その配列が公知であるとき、生来のプロモーターをラダー内のｘプロモーターのそれぞれで置き換える。生来のプロモーターが存在せず、またはその配列が未知であるとき、ラダー内のｘプロモーターのそれぞれを遺伝子ｎの前に挿入する（例えば、図１３および１４を参照）。よって、一部の実施形態では、ＳＮＰスワップライブラリーは、プロモーター挿入ライブラリーであり得、ここで、プロモーターなしまたは弱いプロモーターを有する遺伝子エレメントは、新しく追加されたプロモーターによって試験される。プロモーターＳＷＰライブラリー改変のためのこのような遺伝子としては、これらに限定されないが、（１）スピノシンなどの目的の化合物のコア生合成経路における遺伝子；（２）前駆体合成またはプール利用可能性の調節に直接関与する遺伝子などの目的の化合物の前駆体プール利用可能性に関与する遺伝子；（３）補助因子の利用に関与する遺伝子；（４）転写調節因子を用いてコードする遺伝子；（５）栄養素利用性の輸送体をコードする遺伝子；および（６）産物の排出輸送体などが挙げられる。このように、株の「ライブラリー」（ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーとも呼ばれる）が構築され、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況（genetic context）においてｎ標的に作動可能に連結したｘプロモーターの一事例である。先に記載したように、プロモーターの組合せを挿入し、ライブラリーが構築される組み合わせの可能性（combinatorial possibility）の範囲を拡張することができる。

【０２５９】

４．１つまたは複数の測定基準に対する株の性能が最適化されている性能を示す状況における株のライブラリーのハイスループットスクリーニング。

を含むマルチステッププロセスである。

【０２６０】

この基本プロセスを拡張して、とりわけ、（１）相互作用プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化として、単一株バックグラウンド内に複数の有益な撹乱を統合することによって、株性能をさらに改善することができる。複数の撹乱は、確定した変化の特定のセット、または変化の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得る。例えば、標的のセットが経路内のあらゆる遺伝子である場合、撹乱のライブラリーを株の先のライブラリーの改善された１つまたは複数のメ

ンバー内に逐次再生すると、任意の所与の反復においてどの遺伝子が律速であるかにかかわらず経路内の各遺伝子の発現レベルを最適化することができ；（２）ライブラリーの個々のおよびコンビナトリアル生成の結果として生じる性能データを、そのデータを使用して各撹乱の相互作用に基づいて撹乱の最適のセットを予測するアルゴリズムに送り；（３）上記２つの手法の組合せをインプリメントする（図１３を参照）。

【０２６１】

上記に論じた分子ツールまたは技法は、プロモータースワッピングとして特徴付けられるが、プロモーターに限定されず、一連の標的の発現レベルを系統的に変更する他の配列変化を含み得る。一連の遺伝子の発現レベルを変更するための他の方法は、ａ）リボソーム結合部位（または真核生物内のコザック配列）のラダー；ｂ）各標的の開始コドンの他の開始コドンのそれぞれでの置き換え（すなわち、以下に論じられる開始／停止コドン交換）；ｃ）転写物の５’もしくは３’末端への、または任意の他の場所における配列を安定化し、または不安定にする様々なｍＲＮＡの結合、ｄ）タンパク質中の任意の場所における配列を安定化し、または不安定にする様々なタンパク質の結合を含み得る。

【０２６２】

手法は、工業用微生物を用いて本開示において例示されているが、所望の形質が遺伝子変異体の集団において同定され得る任意の生物体に適用可能である。例えば、これは、ＣＨＯ細胞、酵母、昆虫細胞、藻類、および植物などの多細胞生物の性能を改善するのに使用することができる。

【０２６３】

２．ＳＮＰスワップ：ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを得るための分子ツール

ある特定の実施形態では、ＳＮＰスワッピングは、微生物株の改良のランダム変異誘発手法ではなく、むしろ、株全体にわたる個々の核内低分子多形ヌクレオチド変異（Small Nuclear Polymorphism nucleotide mutation）（すなわち、ＳＮＰ）の系統的な導入または除去を伴う（それが名称「ＳＮＰスワッピング」の由来である）。

【０２６４】

このプロセスを介して操作される結果として生じる微生物は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。

【０２６５】

ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、所与のＳＮＰの存在または非存在を代表し、前記ライブラリーは、「ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー」と呼ばれる。

【０２６６】

さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与のＳＮＰが存在し、または所与のＳＮＰが存在せず、前記コレクションは、「ＳＮＰスワップライブラリー」と呼ばれる。

【０２６７】

一部の実施形態では、ＳＮＰスワッピングでは、同定された有益な性能効果を有する標的ＳＮＰ「ビルディングブロック」の最適な組合せを用いて宿主生物を再構築する。よって、一部の実施形態では、ＳＮＰスワッピングでは、反復プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化としてのいずれかで、単一株バックグラウンド内に複数の有益な変異を統合することを伴う。複数の変化は、確定した変化の特定のセット、または変異の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得る。

【０２６８】

他の実施形態では、ＳＮＰスワッピングでは、反復プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化としてのいずれかで、株から有害と同定された複数の変異の除去も関与する。複数の変化は、規定された変化の特定のセット、または変異の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得る。一部の実施

形態では、本開示のＳＮＰスワッピング方法は、有益なＳＮＰの付加ならびに有害なおよび／または中立の変異の除去の両方を含む。

【０２６９】

ＳＮＰスワッピングは、変異誘発および目的とする形質改善のための選択に供された株の系統における有益および有害な変異の両方を同定および活用する強力なツールである。ＳＮＰスワッピングは、ハイスループットゲノム操作技法を利用して、変異誘発系統における個々の変異の影響を系統的に決定する。ゲノム配列は、既知の性能改善を有する変異誘発系統の１つまたは複数の世代にわたる株について決定される。次いでハイスループットゲノム操作が系統的に使用されて、より早期の系統株における改良された株由来の変異を反復し、かつ／またはより後期の株内の変異をより早期の株配列に戻す。次いでこれらの株の性能が評価され、目的の改善された表現型に対する各個々の変異の寄与を決定することができる。上述した通り、このプロセスから生じる微生物株が分析され／特徴付けられ、宿主株全体にわたる微生物株改良を通知することができるＳＮＰスワップ遺伝子設計ライブラリーの基礎を形成する。

【０２７０】

有害な変異を除去すると、即時に性能を改善することができ、変異誘発荷重に供されていない株バックグラウンド内の有益な変異を統合すると、株性能を迅速かつ大いに改善することができる。ＳＮＰスワッピングプロセスを介して生成される様々な微生物株は、ＨＴＰ遺伝子設計ＳＮＰスワッピングライブラリーを形成し、それは、様々な付加／欠失／または統合されたＳＮＰを含むが、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドを有する微生物株である。

【０２７１】

先に論じた通り、性能改善のためのランダム変異誘発および後続のスクリーニングは、工業用株改良のために一般に使用される技法であり、大規模製造に現在使用されている多くの株は、長年、時に数十年の期間にわたって反復してこのプロセスを使用して開発されてきた。ゲノム変異の生成のランダム手法、例えば、ＵＶ放射線またはメタンスルホン酸エチルなどの化学的変異誘発物質への曝露は、工業用株改良の好適な方法であった。その理由は、１）工業用生物体は、遺伝的または代謝的にあまりよく特徴付けられておらず、指向改善手法のための標的選択を困難または不可能にする場合があり、２）相対的に十分に特徴付けられたシステムにおいてでさえ、工業的性能改善をもたらす変化は、予測するのが困難であり、既知の機能を有さない遺伝子の撹乱を必要とする場合があり、３）所与の工業用生物体において指向ゲノム変異を作製するための遺伝的ツールは、利用可能でなく、または非常に遅く、かつ／もしくは使用するのが困難である場合があるためである。

【０２７２】

しかし、このプロセスの上述の利益にもかかわらず、いくつかの公知の不利点も存在する。有益な変異は、相対的に希有な事象であり、定まったスクリーニング能力を用いてこれらの変異を見出すために、変異率は、十分に高くなければならない。これにより、望まれない中立のおよび部分的に有害な変異が有益な変化とともに株内に組み入れられることが多い。経時的に、この「変異誘発荷重」が蓄積し、全体的なロバスト性、および増殖速度などの重要な形質が欠損した株を生じる。最終的に、「変異誘発荷重」は、ランダム変異誘発による性能のさらなる改善を得ることをますます困難または不可能にする。適当なツールを用いない場合、株系統の個別分岐および並列分岐に見出される有益な変異を統合することが不可能である。

【０２７３】

ＳＮＰスワッピングは、変異誘発系統内の株を比較するとき観察される一部またはすべての変異を系統的に反復し、または戻すことによってこれらの制限事項を克服する一手法である。このように、有益な（「原因となる」）変異を同定および統合することもでき、かつ／または有害な変異を同定および除去することもできる。これにより、さらなるランダム変異誘発または標的化遺伝子操作によって達成することができなかった株性能の迅速な改善が可能になる。

【０２７４】
遺伝的荷重を除去し、または有益な変化を遺伝的荷重が無い株内に統合すると、さらなる改善を可能にすることができる追加のランダム変異誘発の新しいロバストな出発点ももたらされる。
【０２７５】
さらに、オルソゴナルな有益な変化が、変異誘発株系統の様々な個別分岐にわたって同定されるので、これらを、より良好に働く株へと急速に統合することができる。これらの変異はまた、変異誘発系統の一部でない株、例えば、指向遺伝子操作によって獲得される改良を有する株へと統合され得る。
【０２７６】
変異誘発系統内の株間の変異をランダムに組み換える他の手法および技術が存在する。これらとしては、プロトプラスト融合、および変異された株全体にわたるゲノム組換えを促進する全ゲノムシャッフリングなどの技法が挙げられる。酵母および糸状菌などの一部の工業用微生物について、天然の接合サイクルもペアワイズゲノム組換えのために活用することができる。このように、有害な変異を、変異体を親株で「戻し交配する」ことによって除去し、有益な変異を統合することができる。
【０２７７】
伝統的な手法は、株全体にわたる個々の変異の系統的導入または除去によるランダム変異の発見を組み合わせるために、本明細書に開示のＳＮＰスワッピング方法と共に使用することができる。
【０２７８】
一部の実施形態では、本開示は、多様性プールの生物体の中に存在するＳＮＰ配列多様性を同定するための方法を教示する。多様性プールは、分析に利用される所与の数ｎの微生物であり得、前記微生物のゲノムは、「多様性プール」を代表する。
【０２７９】
特定の態様では、多様性プールは、特定の時点における「ベースライン」または「参照」遺伝子配列を有する元の親株（S_1）（S_1Gen_1）、および次いで前記S_1株に由来し／それから開発された、かつS_1のベースラインゲノムに関して異なるゲノムを有する任意の数の後続の子孫株（S_{2-n}）（$S_{2-n}Gen_{2-n}$）であり得る。
【０２８０】
例えば、一部の実施形態では、本開示は、多様性プール内の微生物ゲノムをシーケンシングして各株内に存在するＳＮＰを同定することを教示する。一実施形態では、多様性プールの株は、歴史的な微生物産生株である。よって、本開示の多様性プールは、例えば、工業用参照株、および伝統的な株改良プログラムを介して産生された１つまたは複数の変異工業用株を含み得る。
【０２８１】
一部の実施形態では、多様性プール内のＳＮＰは、「参照株」を参照して決定される。一部の実施形態では、参照株は、野生型株である。他の実施形態では、参照株は、任意の変異誘発に供される前の元の工業用株である。参照株は、専門家が定義することができ、元の野生型株または元の工業用株である必要はない。基準株は、前記参照株に由来し、またはそれから開発された後続の株が比較される「基準」、「参照」、または元の遺伝的バックグラウンドと見なされるものを単に代表する。
【０２８２】
多様性プール内のすべてのＳＮＰが同定されると、本開示は、ＳＮＰスワッピングの方法およびスクリーニング方法を教示して、個々にかつ／または群内でＳＮＰの効果（例えば、目的の表現型の創製）を描写する（すなわち、定量し、特徴付ける）。
【０２８３】
一部の実施形態では、本開示のＳＮＰスワッピング方法は、変異株（例えば、$S_{2-n}Gen_{2-n}$の中からの株）内で同定された１つまたは複数のＳＮＰを参照株（S_1Gen_1）または野生型株に導入する（「ウェーブアップ」）ステップを含む。

【０２８４】
他の実施形態では、本開示のＳＮＰスワッピング方法は、変異株（例えば、$S_{2-n}Gen_{2-n}$の中からの株）内で同定された１つまたは複数のＳＮＰを除去する（「ウェーブダウン」）ステップを含む。
【０２８５】
一部の実施形態では、１つまたは複数のＳＮＰ変化（導入または除去のいずれか）を含むそれぞれの生成された株は、培養され、本開示の１つまたは複数の判定基準（例えば、目的の化学物質または産物の産生）下で分析される。分析された宿主株のそれぞれからのデータは、宿主株内に存在する特定のＳＮＰまたはＳＮＰの群と関連付けられ、または相関付けられ、将来使用するために記録される。よって、本開示は、任意の数の目的の微生物遺伝的または表現型形質に対する所与のＳＮＰの効果を同定することができる、大きい、高度にアノテートされたＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの創製を可能にする。これらのＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーに記憶された情報は、ＨＴＰゲノム操作プラットフォームの機械学習アルゴリズムに知らせ、プロセスの将来の反復を指示し、それは最終的に、高度に望ましい性質／形質を有する進化した微生物生物体をもたらす。
【０２８６】
一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、正遺伝学的手順で実行することができる。例えば、一部の実施形態では、ＳＮＰもしくは別のタイプの遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性は、公知ではないか、またはＳＮＰもしくは他の遺伝的バリエーションのどちらがスワップまたは組み合わされるかの決定において考慮されない。代わりに、遺伝的バリエーションの組合せは、公知または予測される遺伝子の機能の考慮なしで行われるが、先の株の性能の人間または機械学習分析によって影響を受け得る。任意の単一の理論によって束縛されることを望むことなく、本発明者は、人間の予想および期待によって制限されないので、機能にとらわれないスクリーニングが効果的であると考えている。よって、一部の実施形態では、本開示の方法は、遺伝子操作への「知的設計」手法を考慮していない（および、これによって落胆さえし得る）遺伝的バリエーションの価値のある組合せの発見を可能にする。
【０２８７】
一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、逆遺伝学的手順で実行することができる。例えば、一部の実施形態では、ＳＮＰもしくは別のタイプの遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性は、既知であり、ＳＮＰもしくは別のタイプの遺伝的バリエーションがスワップされる場合考慮される。例えば、一部の実施形態では、目的の化合物（例えば、スピノシン）の合成、変換および／または分解に関与する遺伝子における遺伝的バリエーションは、このような組合せが所望の表現型を有する改善された株をもたらし得る理由についての少なくとも一部の仮説を伴って、特に選択および組み合わされる。このような遺伝子の機能および／または同一性の情報としては、これらに限定されないが、（１）スピノシンなどの目的の化合物のコア生合成経路における遺伝子；（２）前駆体合成またはプール利用可能性の調節に直接関与する遺伝子などの目的の化合物の前駆体プール利用可能性に関与する遺伝子；（３）補助因子の利用に関与する遺伝子；（４）転写調節因子を用いてコードする遺伝子；（５）栄養素利用性の輸送体をコードする遺伝子；および（６）産物の排出輸送体などが挙げられる。
【０２８８】
一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、少なくとも１つの遺伝子または遺伝的バリエーションの機能および／または同一性が考慮されるハイブリッド手順で実行することができるが、別の遺伝的バリエーションを含有する少なくとも１つの遺伝子の機能および／または同一性は、遺伝的バリエーションが組み合わされる場合考慮されない。
【０２８９】
ある特定の遺伝子は、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有する。例えば、ポリケチドおよび非リボソームペプチドは、モジュール性を有することが見出されている（その全体が参照により組み込まれる、ＵＳ２０１７／０１０１６５９を参照）

。このようなタンパク質中の機能タンパク質ドメインは、ゲノム上でのＤＮＡの繰り返しセグメントをもたらす繰り返し様式（モジュール１－モジュール２－モジュール３・・・）で配列される。一部の実施形態では、組み合わされる少なくとも１つの遺伝的バリエーションは、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域にない。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションの組合せは、このような遺伝子におけるコードするＤＮＡモジュールの繰り返されたセグメントの置換、欠失または付加を含まない。本開示の方法は、ゲノムのモジュール性のこれらのエリアにおいて標的化ゲノム編集を実施することができるだけではなく、任意のゲノムの状況で、ゲノム全体にわたる標的化ゲノム編集が可能である。したがって、本開示の標的化ゲノム編集は、任意の領域でＳ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノムを編集することができ、モジュール性を有するエリアでの単なる編集に縛られない。

【０２９０】

３．開始／停止コドン交換：開始／停止コドン微生物株ライブラリーを得るための分子ツール

一部の実施形態では、本開示は、開始および停止コドンバリアントをスワップする方法を教示する。例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅおよび哺乳動物の典型的な停止コドンは、それぞれＴＡＡ（ＵＡＡ）およびＴＧＡ（ＵＧＡ）である。単子葉植物の典型的な停止コドンは、ＴＧＡ（ＵＧＡ）であり、一方、昆虫およびＥ．ｃｏｌｉは一般に、停止コドンとしてＴＡＡ（ＵＡＡ）を使用する（Dalphinら（１９９６年）、Nucl. Acids Res.、２４巻：２１６～２１８頁）。他の実施形態では、本開示は、ＴＡＧ（ＵＡＧ）停止コドンの使用を教示する。

【０２９１】

本開示は、開始コドンをスワップすることを同様に教示する。一部の実施形態では、本開示は、ほとんどの生物体（特に真核生物）によって利用されているＡＴＧ（ＡＵＧ）開始コドンの使用を教示する。一部の実施形態では、本開示は、原核生物は、ＡＴＧ（ＡＵＧ）を最も多く使用し、その後にＧＴＧ（ＧＵＧ）およびＴＴＧ（ＵＵＧ）が続くことを教示する。

【０２９２】

他の実施形態では、本発明は、ＡＴＧ開始コドンをＴＴＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＡＴＧ開始コドンをＧＴＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＧＴＧ開始コドンをＡＴＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＧＴＧ開始コドンをＴＴＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＴＧ開始コドンをＡＴＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＴＧ開始コドンをＧＴＧで置き換えることを教示する。

【０２９３】

他の実施形態では、本発明は、ＴＡＡ停止コドンをＴＡＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＡＡ停止コドンをＴＧＡで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＧＡ停止コドンをＴＡＡで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＧＡ停止コドンをＴＡＧで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＡＧ停止コドンをＴＡＡで置き換えることを教示する。一部の実施形態では、本発明は、ＴＡＧ停止コドンをＴＧＡで置き換えることを教示する。

【０２９４】

４．Ｓｔｏｐスワップ：最適化配列微生物株ライブラリーを得るための分子ツール

一部の実施形態では、本開示は、細胞遺伝子転写の最適化によって宿主細胞生産性を改善する方法を教示する。遺伝子転写は、転写開始（ＲＮＡｐ動員および転写複合体形成）、伸長（鎖合成／拡張）、ならびに転写終結（ＲＮＡｐ脱離および終結）を含めたいくつかの別個の生物学的現象の結果である。多くの関心が、遺伝子の転写モジュレーションによる（例えば、プロモーターを変更し、または調節転写因子を誘導することによる）遺伝

子発現の制御に注がれているが、比較的少ない取り組みが遺伝子ターミネーター配列のモジュレーションを介した転写のモジュレーションに向けて行われている。

【０２９５】

転写が遺伝子発現レベルに影響を与える最も明白なやり方は、Ｐｏｌ ＩＩ開始の速度によるものであり、これは、プロモーターまたはエンハンサー強度およびトランス活性化因子の組合せによってモジュレートすることができる（Kadonaga, JT.、２００４年、「Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors」、Cell.、２００４年１月２３日；１１６巻（２号）：２４７～５７頁）。真核生物では、伸長速度も、オルタナティブスプライシングに影響を与えることによって遺伝子発現パターンを決定する場合がある（Cramer P.ら、１９９７年、「Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing.」、Proc Natl Acad Sci U S A.、１９９７年１０月１４日；９４巻（２１号）：１１４５６～６０頁）。遺伝子上の終結の失敗は、プロモーターのＰｏｌ ＩＩへのアクセシビリティを低減することによって下流遺伝子の発現を損なわせ得る（Greger IH.ら、２０００年、「Balancing transcriptional interference and initiation on the GAL7 promoter of Saccharomyces cerevisiae.」、Proc Natl Acad Sci U S A.、２０００年７月１８日；９７巻（１５号）：８４１５～２０頁）。このプロセスは、転写干渉として公知であり、下等真核生物において特に関連しており、その理由は、これらが密集した遺伝子を有することが多いためである。

【０２９６】

終結配列も、配列が属する遺伝子の発現に影響し得る。例えば、スタディは、真核生物における非効率な転写終結は、スプライスされていないプレｍＲＮＡを蓄積させることを示す（West, S.およびProudfoot, N.J.、２００９年、「Transcriptional Termination Enhances Protein Expression in Human Cells」、Mol Cell.、２００９年２月１３日；３３巻（３～９号）；３５４～３６４頁を参照）。他のスタディも、３’末端プロセシングが非効率な終結によって遅延され得ることを示した（West, Sら、２００８年、「Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination.」、Mol Cell.、２００８年３月１４日；２９巻（５号）：６００～１０頁）。転写終結も、合成の部位から転写物を放出することによってｍＲＮＡ安定性に影響し得る。

【０２９７】

原核生物における転写の終結

原核生物では、Ｒｈｏ非依存性およびＲｈｏ依存性終結と呼ばれる２つの主要機構が転写終結を媒介する。Ｒｈｏ非依存性終結シグナルは、外因性転写終結因子を要求せず、その理由は、一連のウリジン（Ｕ）残基とともにこれらの配列から転写されるＲＮＡにおけるステムループ構造の形成が、転写複合体からのＲＮＡ鎖の放出を促進するためである。一方、Ｒｈｏ依存性終結は、ｍＲＮＡ上でＲｈｏと呼ばれる転写終結因子およびシス作用エレメントを必要とする。Ｒｈｏの最初の結合部位、Ｒｈｏ利用（ｒｕｔ）部位は、実際のターミネーター配列の上流の、高シチジン／低グアノシン含有量、および合成されているＲＮＡにおける相対的に小さい二次構造によって特徴付けられる伸長された（約７０ヌクレオチド、時に８０～１００ヌクレオチド）一本鎖領域である。ポリメラーゼ休止部位と遭遇すると、終結が起こり、転写物がＲｈｏのヘリカーゼ活性によって放出される。

【０２９８】

ターミネータースワッピング（ＳＴＯＰスワップ）

一部の実施形態では、本開示は、最適な発現性質を有する終結配列（「ターミネーター」）を選択して、全体的な宿主株生産性に対して有益な効果を生じさせる方法を教示する。

【０２９９】

例えば、一部の実施形態では、本開示は、一連の発現強度を呈する、宿主細胞内の１つもしくは複数のターミネーターを同定し、かつ／または１つもしくは複数のターミネーターのバリアントを生成する（例えば、以下に論じられるターミネーターラダー）方法を教

示する。これらの同定および／または生成されるターミネーターの特定の組合せを、以下でより詳細に説明されるターミネーターラダーとして一緒にグループ化することができる。

【０３００】

次いで、問題のターミネーターラダーは、目的の所与の遺伝子と関連させられる。よって、ターミネーターT_1～T_8（１つまたは複数のプロモーターと組み合わされるとき、一連の発現強度を呈するように同定および／または生成された８つのターミネーターを表す）を有し、ターミネーターラダーを宿主細胞内の目的の単一遺伝子と関連させる（すなわち、所与の標的遺伝子の３’末端に作動可能に連結した所与のターミネーターで宿主細胞を遺伝的に操作する）場合、ターミネーターの各組合せの効果を、操作された宿主細胞が標的遺伝子と関連した特定のプロモーター（複数可）を除いて他の点では同一の遺伝的バックグラウンドを有することを考慮して、各コンビナトリアル取り組みの結果として生じる操作された株のそれぞれを特徴付けることによって確認することができる。このプロセスを介して操作される結果として生じる宿主細胞は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。

【０３０１】

ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、特定の標的遺伝子に作動可能に連結した所与のターミネーターを代表し、前記ライブラリーは、「ターミネータースワップ微生物株ライブラリー」または「ＳＴＯＰスワップ微生物株ライブラリー」と呼ばれる。

【０３０２】

さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与のターミネーターｘは、所与の遺伝子ｙに作動可能に連結しており、前記コレクションは、「ターミネータースワップライブラリー」または「ＳＴＯＰスワップライブラリー」と呼ばれる。

【０３０３】

さらに、プロモーターT_1～T_8を含む同じターミネーターラダーを利用して微生物を操作することができ、ここで、８つのターミネーターそれぞれは、１０の異なる遺伝子標的に作動可能に連結している。この手順の結果は、目的の標的遺伝子に作動可能に連結した特定のターミネーターを除いて、他の点では遺伝的に同一と仮定される８０の宿主細胞株である。これらの８０の宿主細胞株は、適切にスクリーニングし、特徴付け、別のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生じさせることができる。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー内の微生物株を特徴付けると、リレーショナルデータベース、オブジェクト指向データベース、または大規模分散ＮｏＳＱＬデータベースを限定することなく含めた任意のデータベースに記憶することができる情報およびデータが生じる。このデータ／情報は、例えば、所与の遺伝子標的に作動可能に連結しているときの所与のターミネーター（例えば、T_1～T_8）の効果を含み得る。このデータ／情報は、プロモーターT_1～T_8のうちの２つまたはそれ超を所与の遺伝子標的に作動可能に連結することから生じるより広いセットのコンビナトリアル効果でもあり得る。

【０３０４】

８のターミネーターおよび１０の標的遺伝子の上述の例は、単に例示的であり、その理由は、この概念は、一連の発現強度および任意の所与の数の標的遺伝子の呈示に基づいて一緒にグループ化された任意の所与の数のプロモーターを用いて適用することができるためである。

【０３０５】

要約すると、様々なターミネーターを利用して生物体内の様々な遺伝子の発現をモジュレートすることは、目的の形質を最適化する強力なツールである。本発明者らが開発したターミネータースワッピングの分子ツールは、少なくとも１つの条件下で少なくとも１つの遺伝子座の発現を変更することが実証されたターミネーター配列のラダーを使用する。次いでこのラダーは、ハイスループットゲノム操作を使用して生物体内の遺伝子の群に系

統的に適用される。この群の遺伝子は、いくつかの方法のいずれか１つに基づいて目的の形質に影響を与える高い見込みを有すると決定される。これらは、公知の機能に基づく選択、または目的の形質に対する影響、または先に決定された有益な遺伝的多様性に基づくアルゴリズムによる選択を含み得る。

【０３０６】

次いで、遺伝子に連結したターミネーター配列を含有する生物体の結果として生じるＨＴＰ遺伝子設計微生物ライブラリーが、ハイスループットスクリーニングモデルにおいて性能について評価され、性能を増大させるプロモーター－遺伝子連鎖が決定され、情報がデータベースに記憶される。遺伝子撹乱（すなわち、所与の遺伝子ｙに連結した所与のターミネーターｘ）のコレクションは、「ターミネータースワップライブラリー」を形成し、これは、微生物操作処理で利用される潜在的な遺伝子変更の源として利用することができる。経時的に、より大きいセットの遺伝子撹乱は、より大きい多様性の微生物バックグラウンドに対してインプリメントされるので、各ライブラリーは、実験的に確認されたデータのコーパスとしてより強力になり、それを使用して目的の任意のバックグラウンドに対する標的とした変化をより正確かつ予想通りに設計することができる。すなわち、一部の実施形態では、本開示は、本発明の遺伝子設計ライブラリーのいずれかと関連したメタデータ内に埋もれた先の実験結果に基づく、宿主細胞内への１つまたは複数の遺伝子変化の導入を教示する。

【０３０７】

よって、特定の実施形態では、ターミネータースワッピングは、以下を含むマルチステッププロセスである。

【０３０８】

１．「ラダー」として作用する一連の「ｘ」ターミネーターを選択するステップ。理想的にはこれらのターミネーターは、多重ゲノム遺伝子座全体にわたって高度に多様な発現をもたらすことが示されているが、唯一の要件は、これらが遺伝子発現を何らかのやり方で撹乱することである。

【０３０９】

２．標的にする一連の「ｎ」遺伝子を選択するステップ。このセットは、ゲノム内のあらゆるＯＲＦ、またはＯＲＦのサブセットであり得る。サブセットは、先に実証された有益な撹乱（先のプロモータースワップ、ＳＴＯＰスワップもしくはＳＮＰスワップ）との関連によって、先に生成された撹乱間の上位性相互作用に基づくアルゴリズム選択、標的にする有益なＯＲＦに関する仮説に基づく他の選択判定基準によって、またはランダム選択を介して、機能に関連したＯＲＦについてのアノテーションを使用して選択することができる。他の実施形態では、「ｎ」標的化遺伝子は、非コードＲＮＡを含めた非タンパク質コード遺伝子を含み得る。

【０３１０】

３．以下の遺伝子改変を迅速に、かつ並行して実行するためのハイスループット株操作：生来のターミネーターが標的遺伝子ｎの３’末端に存在し、その配列が公知であるとき、生来のターミネーターをラダー内のｘターミネーターのそれぞれで置き換える。生来のターミネーターが存在せず、またはその配列が未知であるとき、ラダー内のｘターミネーターのそれぞれを遺伝子停止コドンの後に挿入する。

【０３１１】

このように、株の「ライブラリー」（ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーとも呼ばれる）が構築され、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況においてｎ標的に連結したｘターミネーターの一事例である。先に記載したように、ターミネーターの組合せを挿入し、ライブラリーが構築される組み合わせの可能性の範囲を拡張することができる。

【０３１２】

４．　１つまたは複数の測定基準に対する株の性能が最適化されている性能を示す状況における株のライブラリーのハイスループットスクリーニング。

【０３１３】
この基本プロセスを拡張して、とりわけ、（１）相互作用プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化としてのいずれかで、単一株バックグラウンド内に複数の有益な撹乱を統合するステップによって、株性能をさらに改善することができる。複数の撹乱は、確定した変化の特定のセット、または変化の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得る。例えば、標的のセットが経路内のあらゆる遺伝子である場合、撹乱のライブラリーを株の先のライブラリーの改善された１つまたは複数のメンバー内に逐次再生すると、任意の所与の反復においてどの遺伝子が律速であるかにかかわらず経路内の各遺伝子の発現レベルを最適化することができ；（２）ライブラリーの個々のおよびコンビナトリアル生成の結果として生じる性能データを、そのデータを使用して各撹乱の相互作用に基づいて撹乱の最適のセットを予測するアルゴリズムに送り；（３）上記２つの手法の組合せをインプリメントする。
【０３１４】
手法は、工業用微生物を用いて本開示において例示されているが、所望の形質が遺伝子変異体の集団において同定され得る任意の生物体に適用可能である。例えば、これは、ＣＨＯ細胞、酵母、昆虫細胞、藻類、および植物などの多細胞生物の性能を改善するために使用することができる。
【０３１５】
一部の実施形態では、本開示によるターミネータースワップライブラリーを創製するために使用することができるターミネーター配列のセットが提供される。このターミネーター配列のセットは、表３に記載のセット、および配列番号７０～配列番号８０と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％またはそれよりも高い同一性を有するターミネーター配列などのこれらの任意の機能バリアントを含む。
【０３１６】
５．トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー：トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを得るための分子ツール
本開示に記載のある特定のツールは、微生物株における遺伝子の既存の多型に関するが、微生物株の性能を改善するために有用であり得る新規な変異を創製しない。本開示は、宿主株の改善されたフィーチャをもたらすためにさらにスクリーニングされ得る変異をランダムに創製するトランスポゾン変異誘発システムを教示し、これは、次に全宿主株表現型に対する有益な効果（例えば、収率または生産性）を生じさせる。
【０３１７】
例えば、一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞における１つまたは複数の遺伝子の一連の発現プロファイルを呈する、宿主細胞内で変異を生成および同定する方法を教示する。このプロセスで生成される任意の特定の変異は、以下でより詳細に説明されるトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーとして一緒にグループ化することができる。
【０３１８】
このプロセスを介して操作された結果として生じる微生物は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。
【０３１９】
ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、トランスポゾン変異誘発によって創製される所与の変異を代表し、前記ライブラリーは、「トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー」と呼ばれる。
【０３２０】
さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与の変異は、トランスポゾン変異誘発によって創製される。
【０３２１】
さらに、トランスポゾン変異誘発によって創製される特定の変異を除いて、他の点では遺伝的に同一と仮定される微生物も提供する。これらの微生物は、適切にスクリーニング

し、特徴付け、別のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生じさせることができる。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー内の微生物株を特徴付けると、リレーショナルデータベース、オブジェクト指向データベース、または大規模分散ＮｏＳＱＬデータベースを含めた任意のデータ記憶コンストラクトに記憶することができる情報およびデータが生じる。このデータ／情報は、例えば、宿主細胞の増殖または宿主細胞における分子の産生に対する変異の効果であり得る。このデータ／情報は、２つまたはそれよりも多くの変異から生じるより広いセットのコンビナトリアル効果でもあり得る。

【０３２２】

トランスポゾン変異誘発によって創製される変異の上述の例は、単に例示的であり、その理由は、この概念は、一連の発現プロファイルの呈示および任意の所与の数の遺伝子に対するそれらの影響に基づいて一緒にグループ化された任意の所与の数の変異を用いて適用することができるためである。当業者は、任意の他の変異によるトランスポゾン変異誘発によって創製された変異を統合する能力も認識する。よって、一部の実施形態では、本開示は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれよりも多くの変異が統合されたライブラリーを教示する。

【０３２３】

要約すると、生物体内のトランスポゾン変異誘発によって創製された様々な変異を利用することは、目的の形質を最適化する強力なツールである。本発明者らによって開発されたトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーの分子ツールは、発現プロファイルの変更を有する変異のコレクションを使用する。次いでこのコレクションは、ハイスループットゲノム操作を使用して生物体内に系統的に適用される。この群の変異は、いくつかの方法のいずれか１つに基づいて目的の形質に影響を与える高い見込みを有すると決定される。一部の実施形態では、ライブラリーは、飽和した数の変異を含有する（例えば、理論的には、微生物のゲノム内の各遺伝子が少なくとも１回ヒットする）。一部の実施形態では、トランスポゾン変異誘発ライブラリーにおける変異のゲノムの場所は決定されず、よって、ライブラリーは、微生物のゲノムにおいてランダムに分散された変異を含有する。一部の実施形態では、トランスポゾン変異誘発ライブラリーにおける変異は、関連する表現型に基づいて選択される。一部の実施形態では、トランスポゾン変異誘発ライブラリーにおける変異が特徴付けられ、変異のゲノムの場所が決定され、変異によって破壊された遺伝子が同定される。これらは、目的の形質に対する公知の機能もしくは影響に基づく選択物、または先に決定された有益な遺伝的多様性に基づくアルゴリズム選択物を含み得る。一部の実施形態では、変異の選択物は、所与の宿主内のすべての遺伝子を含み得る。他の実施形態では、変異の選択物は、ランダムに選択された所与の宿主内のすべての遺伝子のサブセットであり得る。他の実施形態では、変異の選択物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．におけるスピノシンなどの所与の分子の合成に関与するすべての遺伝子のサブセットであり得る。

【０３２４】

次いで、トランスポゾン変異誘発によって創製される変異を含有する生物体の結果として生じるＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーは、ハイスループットスクリーニングモデルにおいて性能について評価され、性能を増大させる変異が決定され、情報がデータベースに記憶される。遺伝子撹乱（すなわち、変異）のコレクションは、「トランスポゾン変異誘発ライブラリー」を形成し、これは、微生物操作処理で利用される潜在的な遺伝子変更の源として利用することができる。経時的に、より大きいセットの遺伝子撹乱は、より多様な宿主細胞バックグラウンドに対してインプリメントされるので、各ライブラリーは、実験的に確認されたデータのコーパスとしてより強力になり、それを使用して目的の任意のバックグラウンドに対する標的とした変化をより正確かつ予想通りに設計することができる。

【０３２５】

一部の実施形態では、本開示のトランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを使用して

、遺伝子標的の最適の発現を同定することができる。一部の実施形態では、目標は、標的遺伝子の活性を増大させて代謝経路または遺伝経路における障壁を低減することであり得る。他の実施形態では、目標は、標的遺伝子の発現が要求されないとき、前記標的遺伝子の活性を低減して宿主細胞内の不要なエネルギー消費を回避することであり得る。

【０３２６】

よって、特定の実施形態では、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリーを使用する方法は、以下を含むマルチステッププロセスである。

【０３２７】

１．変異誘発のためにトランスポゾンシステムを選択し、トランスポゾンによって引き起こされる変異を生成する所与の微生物株においてシステムを適用するステップ。理想的には、システムは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株などの選択された微生物株のゲノムにトランスポゾンのランダムな組込みをもたらすために示される。このような組込みは、何らかのやり方で遺伝子発現を撹乱する。

【０３２８】

２．そのゲノム中に組み込まれたトランスポゾンを有する株を迅速に選択するためのハイスループット株操作。このように、株の「ライブラリー」（ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーとも呼ばれる）が構築され、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況においてトランスポゾン変異を含む株である。先に記載したように、変異の組合せを統合し、ライブラリーが構築される組合せの可能性の範囲を拡張することができる。

【０３２９】

３．　１つまたは複数の測定基準に対する株の性能が最適化されている性能を示す状況における株のライブラリーのハイスループットスクリーニング。

【０３３０】

この基本プロセスを拡張して、とりわけ、（１）反復プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化としてのいずれかで、単一株バックグラウンド内に複数の有益な撹乱（変異）を統合するステップよって、株性能をさらに改善することができる。複数の撹乱（変異）は、変異によって改変された遺伝子の機能にかかわらず、確定した変化の特定のセット、または変化の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得；（２）ライブラリーの個々のおよびコンビナトリアル生成の結果として生じる性能データを、そのデータを使用して各撹乱の相互作用に基づいて撹乱の最適のセットを予測するアルゴリズムに送り；（３）上記２つの手法の組合せをインプリメントする。

【０３３１】

一部の実施形態では、トランスポサーゼは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．で機能する。一部の実施形態では、転置行列は、ＥＺ－Ｔｎ５トランスポゾンシステムに由来する。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロード配列は、前記トランスポサーゼによって認識され得るモザイクエレメント（ＭＥ）に隣接する。一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンであり得る。

【０３３２】

一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、選択マーカーを含む。一部の実施形態では、本開示のトランスポゾン変異誘発プロセスで使用することができる選択可能マーカーとしては、これらに限定されないが、アプラマイシンに対する耐性を付与するａａｃ（３）ＩＶ（配列番号１５１）、ゲンタマイシンに対する耐性を付与するａａｃＣ１（配列番号１５２）、ネオマイシンＢに対する耐性を付与するａｃＣ８（配列番号１５３）、スペクチノマイシン／ストレプトマイシンに対する耐性を付与するａａｄＡ（配列番号１５４）、ブレオマイシンに対する耐性を付与するｂｌｅ（配列番号１５５）、クロラムフェニコールに対する耐性を付与するｃａｔ（配列番号１５６）、エリスロマイシンに対する耐性を付与するｅｒｍＥ（配列番号１５７）、ハイグロマイシンに対する耐性を付与するｈｙｇ（配列番号１５８）、およびカナマイシンに対する耐性を付与するｎｅｏ（配列番号１

５９）が挙げられる。一部の実施形態では、選択マーカーは、トランスポゾンを含有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞についてスクリーニングするために使用される。

【０３３３】

一部の実施形態では、ＤＮＡペイロードは、対抗選択マーカーを含む。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、選択可能マーカーを含有するＤＮＡペイロードのループアウトを促進するために使用される。一部の実施形態では、本開示のトランスポゾン変異誘発プロセスで使用することができる対抗選択マーカーとしては、これらに限定されないが、配列番号１６０（ａｍｄＳＹＭ）、配列番号１６１（ｔｅｔＡ）、配列番号１６２（ｌａｃＹ）、配列番号１６３（ｓａｃＢ）、配列番号１６４（ｐｈｅＳ、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ）、配列番号１６５（ｐｈｅＳ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）が挙げられる。

【０３３４】

一部の実施形態では、本開示の方法は、ゲノムのモジュール性のこれらのエリアにおいて標的化ゲノム編集を実施することができるだけではなく、任意のゲノムの状況で、ゲノム全体にわたる標的化ゲノム編集が可能である。したがって、本開示の標的化ゲノム編集は、任意の領域でＳ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノムを編集することができ、モジュール性を有するエリアでの単なる編集に縛られない。

【０３３５】

一部の実施形態では、ＧｏＦトランスポゾンは、ＧｏＦエレメントを含む。一部の実施形態では、ＧｏＦトランスポゾンは、プロモーター配列および／または可溶性タグ配列（例えば、配列番号１６６）を含む。

【０３３６】

一部の実施形態では、本開示のトランスポゾン変異誘発ライブラリーは、あらゆる遺伝子を少なくとも１回ヒットする９５％の信頼度を有する。一部の実施形態では、このようなライブラリーは、生物体中の遺伝子の数のおよそ３倍である分離株の数をスクリーニングすることによって得られる。約８０００のアノテートされた遺伝子を含有するＳ．ｓｐｉｎｏｓａのために、我々は、ゲノムを網羅する約２４，０００のメンバーの変異誘発ライブラリーのサイズを予期する

【０３３７】

一部の実施形態では、株のトランスポゾン変異誘発ライブラリーのハイスループットスクリーニングは、参照株と比較して改善された性能を有する株のコレクションを産生する。一部の実施形態では、これらの収集された株の改善された性能をもたらすトランスポゾン変異誘発に起因するこれらの収集された株における変異は、目的の富化された標的を有する新しい株を産生するために統合される。一部の実施形態では、目的の富化された標的を有するこのような株は、さらなる指向株操作のために、本開示の他の株（例えば、ＳＮＰスワップまたはプロモータースワップライブラリーにおいて改善された性能を有する株）と組み合わせることができる。

【０３３８】

６．リボソーム結合部位（ＲＢＳ）多様性ライブラリー：ＲＢＳ微生物株ライブラリーを得るための分子ツール

一部の実施形態では、本開示は、全宿主株表現型に対する有益な効果（例えば、収率または生産性）を生じさせるのに最適な発現性質を有するリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を選択する方法を教示する。

【０３３９】

例えば、一部の実施形態では、本開示は、一連の発現強度（例えば、以下に論じられるＲＢＳラダー）、または優れた調節性質（例えば、選択された遺伝子のより厳格な調節制御）を呈する、宿主細胞内の１つもしくは複数のＲＢＳを同定し、および／または１つもしくは複数のＲＢＳのバリアントを生成する方法を教示する。これらの同定および／または生成されるＲＢＳの特定の組合せを、以下でより詳細に説明されるＲＢＳラダーとして一緒にグループ化することができる。

【０３４０】

次いで、問題のＲＢＳラダーは、一部の実施形態では、目的の所与の遺伝子と関連させられる。よって、ＲＢＳ１～ＲＢＳ３１（一連の発現強度を呈するように同定および／または生成された３１のＲＢＳを表す、配列番号９７～配列番号１２７）を有し、ＲＢＳラダーを微生物中の目的の単一遺伝子と関連させる（すなわち、所与の標的遺伝子に作動可能に連結した所与のＲＢＳで微生物を遺伝的に操作する）場合、３１のＲＢＳの各組合せの効果を、操作された微生物が標的遺伝子と関連した特定のＲＢＳを除いて他の点では同一の遺伝的バックグラウンドを有することを考慮して、各コンビナトリアル取り組みの結果として生じる操作された株のそれぞれを特徴付けることによって確認することができる。

【０３４１】

このプロセスを介して操作された結果として生じる微生物は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。

【０３４２】

ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、特定の標的遺伝子に作動可能に連結した所与のＲＢＳを代表し、前記ライブラリーは、「ＲＢＳライブラリー」と呼ばれる。

【０３４３】

さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与のＲＢＳｘは、所与の遺伝子ｙに作動可能に連結される（および必要に応じて、所与のプロモーターｚにも連結される）。

【０３４４】

さらに、表１１におけるＲＢＳを含む同じＲＢＳラダーを利用して微生物を操作することができ、ここで、ＲＢＳのそれぞれは、異なる遺伝子標的に作動可能に連結される。この手順の結果は、目的の標的遺伝子に作動可能に連結した特定のＲＢＳを除いて、他の点では遺伝的に同一と仮定される微生物である。これらの微生物は、適切にスクリーニングし、特徴付け、別のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生じさせることができる。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー内の微生物株を特徴付けると、リレーショナルデータベース、オブジェクト指向データベース、または大規模分散ＮｏＳＱＬデータベースを含めた任意のデータ記憶コンストラクトに記憶することができる情報およびデータが生じる。このデータ／情報は、例えば、所与の遺伝子標的に作動可能に連結しているときの所与のＲＢＳの効果であり得る。このデータ／情報は、本開示のＲＢＳのうちの２つまたはそれよりも多くを所与の遺伝子標的に作動可能に連結することから生じるより広いセットのコンビナトリアル効果でもあり得る。

【０３４５】

ＲＢＳおよび標的遺伝子の上述の例は、単に例示的であり、その理由は、この概念は、一連の発現強度および任意の所与の数の標的遺伝子の呈示に基づいて一緒にグループ化された任意の所与の数のＲＢＳを用いて適用することができるためである。当業者は、任意の遺伝子標的の前に２つまたはそれよりも多くのＲＢＳを作動可能に連結する能力も認識する。よって、一部の実施形態では、本開示は、ＲＢＳラダー由来の１、２、３、またはそれよりも多くのＲＢＳが１つまたは複数の遺伝子に作動可能に連結したＲＢＳライブラリーを教示する。

【０３４６】

要約すると、様々なＲＢＳを利用して生物体内の様々な遺伝子の発現を駆動することは、目的の形質を最適化する強力なツールである。本発明者らが開発したＲＢＳライブラリーの分子ツールは、少なくとも１つの条件下で少なくとも１つの遺伝子座の発現を変更することが実証されたＲＢＳ配列のラダーを使用する。次いでこのラダーは、ハイスループットゲノム操作を使用して生物体内の遺伝子の群に系統的に適用される。この群の遺伝子は、いくつかの方法のいずれか１つに基づいて目的の形質に影響を与える高い見込みを有すると決定される。これらは、目的の形質に対する公知の機能もしくは影響に基づく選択物、または先に決定された有益な遺伝的多様性に基づくアルゴリズム選択物を含み得る。

一部の実施形態では、遺伝子の選択物は、所与の宿主内のすべての遺伝子を含み得る。他の実施形態では、遺伝子の選択物は、ランダムに選択された所与の宿主内のすべての遺伝子のサブセットであり得る。

【０３４７】

次いで、遺伝子に連結したＲＢＳ配列を含有する生物体の結果として生じるＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーは、ハイスループットスクリーニングモデルにおいて性能について評価され、性能を増大させるＲＢＳ－遺伝子連鎖が決定され、情報がデータベースに記憶される。遺伝子撹乱（すなわち、所与の遺伝子ｙに作動可能に連結した所与のＲＢＳｘ）のコレクションは、「ＲＢＳ多様性ライブラリー」を形成し、これは、微生物操作処理で利用される潜在的な遺伝子変更の源として利用することができる。経時的に、より大きいセットの遺伝子撹乱は、より多様な宿主細胞バックグラウンドに対してインプリメントされるので、各ライブラリーは、実験的に確認されたデータのコーパスとしてより強力になり、それを使用して目的の任意のバックグラウンドに対する標的とした変化をより正確かつ予想通りに設計することができる。

【０３４８】

生物体内の遺伝子の転写レベルは、生物体挙動に影響するための重要な管理点である。転写は、翻訳（タンパク質発現）としっかりと共役し、このタンパク質は、生物体挙動を決定する量で発現される。細胞は、数千の異なるタイプのタンパク質を発現し、これらのタンパク質は、多数の複雑なやり方で相互作用して機能を生み出す。一連のタンパク質の発現レベルを系統的に変更することによって、機能は、複雑性のために、予測することが困難であるように変更され得る。一部の変更は、性能を増大させることができ、したがって、性能を評価するための機構と連関して、この技法は、機能が改善された生物体の生成を可能にする。

【０３４９】

低分子合成経路との関連で、酵素は、基質で始まり、目的の低分子で終わる、直鎖または分岐鎖中で酵素の低分子基質および産物を介して相互作用する。これらの相互作用は、順次連結されるので、このシステムは、分散制御を呈し、１つの酵素の発現の増大は、別の酵素が律速となるまで経路フラックスを増大させることができるだけである。

【０３５０】

代謝制御分析（ＭＣＡ）は、実験データおよび第１原理から、どの１つまたは複数の酵素が律速であるかを決定するための方法である。しかし、ＭＣＡは、それが新しい律速な酵素を決定するのに各発現レベル変化後に広範な実験を必要とするので、限定されている。ＲＢＳライブラリーは、この状況において有利であり、その理由は、ＲＢＳラダーを経路内の各酵素に適用することによって、律速の酵素が見出され、同じことを後続のラウンドで行って律速となる新しい酵素を見出すことができるためである。さらに、機能の読取りは、目的の低分子のより良好な産生であるので、どの酵素が律速であるかを決定する実験は、産生を増大させる操作と同じであり、よって開発時間を短縮する。一部の実施形態では、本開示は、多ユニット酵素の個々のサブユニットをコードする遺伝子へのＲＢＳライブラリーの適用を教示する。さらに他の実施形態では、本開示は、個々の酵素、または生合成経路全体の調節を担う遺伝子にＲＢＳライブラリー技法を適用する方法を教示する。

【０３５１】

一部の実施形態では、本開示のＲＢＳライブラリーを使用して、選択された遺伝子標的の最適の発現を同定することができる。一部の実施形態では、ＲＢＳライブラリーの目標は、標的遺伝子の発現を増大させて代謝経路または遺伝経路における障壁を低減することであり得る。他の実施形態では、ＲＢＳライブラリーの目標は、標的遺伝子の発現が要求されないとき、前記標的遺伝子の発現を低減して宿主細胞内の不要なエネルギー消費を回避することであり得る。

【０３５２】

転写、輸送、またはシグナル伝達のような他の細胞系という状況で、様々な合理的な方法を使用して、どのタンパク質が発現変化の標的であり、その変化が何であるべきかを経

験的に試みて見出すことができる。これらの合理的な方法は、性能を改善するものを見出すのに試験されなければならない撹乱の数を低減するが、これらは、かなりのコストでそれを行う。遺伝子欠失研究により、その存在が特定の機能に極めて重要であるタンパク質が同定され、次いで重要な遺伝子を過剰発現させることができる。タンパク質相互作用の複雑性に起因して、これは、性能の増大において効果的でないことが多い。細胞におけるタンパク質レベルの関数として転写またはシグナル伝達挙動を第１原理から記述することを試みる異なるタイプのモデルが開発された。これらのモデルは、多くの場合、発現変化が異なる機能または改善された機能をもたらし得る標的を示唆する。これらのモデルの根底をなす仮定は、過度に単純化されており、パラメータは、測定するのが困難であり、したがって、これらが行う予測は、特に非モデル生物体について誤っていることが多い。遺伝子欠失およびモデル化の両方を用いると、ある特定の遺伝子にどのように影響するかを決定するのに要求される実験は、性能を改善する変化を起こすための後続の仕事と異なる。ＲＢＳライブラリー方法は、これらの課題を回避し、その理由は、特定の撹乱の重要性を強調する構築された株も、すでに改良された株であるためである。

【０３５３】

よって、特定の実施形態では、ＲＢＳライブラリーを使用する方法は、以下を含むマルチステッププロセスである。

【０３５４】

１．「ラダー」として作用する「ｘ」ＲＢＳのセットを選択するステップ。理想的にはこれらのＲＢＳは、多重ゲノム遺伝子座全体にわたって高度に多様な発現をもたらすことが示されているが、唯一の要件は、これらが遺伝子発現を何らかのやり方で撹乱することである。

【０３５５】

２．標的にする「ｎ」遺伝子のセットを選択するステップ。このセットは、ゲノム内のあらゆるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、またはＯＲＦのサブセットであり得る。サブセットは、先に実証された有益な撹乱（先のＲＢＳコレクションもしくは先のＳＮＰスワップ）との関連によって、先に生成された撹乱間の上位性相互作用に基づくアルゴリズム選択、標的にする有益なＯＲＦに関する仮説に基づく他の選択判定基準によって、またはランダム選択を介して、機能に関連したＯＲＦについてのアノテーションを使用して選択することができる。他の実施形態では、「ｎ」標的化遺伝子は、非コードＲＮＡを含めた非タンパク質コード遺伝子を含み得る。

【０３５６】

３．以下の遺伝子改変を迅速に、かつ一部の実施形態では、並行して実行するためのハイスループット株操作：生来のＲＢＳが標的遺伝子ｎの前に存在し、その配列が公知であるとき、生来のＲＢＳをラダー内のｘＲＢＳのそれぞれで置き換える。生来のＲＢＳが存在せず、またはその配列が未知であるとき、ラダー内のｘＲＢＳのそれぞれを遺伝子ｎの前に挿入する。このように、株の「ライブラリー」（ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーとも呼ばれる）が構築され、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況においてｎ標的に作動可能に連結したｘＲＢＳの一事例である。先に記載したように、ＲＢＳの組合せを挿入し、ライブラリーが構築される組合せの可能性の範囲を拡張することができる。

【０３５７】

４．　１つまたは複数の測定基準に対する株の性能が最適化されている性能を示す状況における株のライブラリーのハイスループットスクリーニング。

【０３５８】

この基本プロセスを拡張して、とりわけ、（１）相互作用プロセスにおいて１つずつ、または単一ステップにおける複数の変化としてのいずれかで、単一株バックグラウンド内に複数の有益な撹乱を統合することによって、株性能をさらに改善することができる。複数の撹乱は、確定した変化の特定のセット、または変化の部分的にランダム化されたコンビナトリアルライブラリーのいずれかであり得る。例えば、標的のセットが経路内のあら

ゆる遺伝子である場合、撹乱のライブラリーを株の先のライブラリーの改善された１つまたは複数のメンバー内に逐次再生すると、任意の所与の反復においてどの遺伝子が律速であるかにかかわらず経路内の各遺伝子の発現レベルを最適化することができ；（２）ライブラリーの個々のおよびコンビナトリアル生成の結果として生じる性能データを、そのデータを使用して各撹乱の相互作用に基づいて撹乱の最適のセットを予測するアルゴリズムに送り；（３）上記２つの手法の組合せをインプリメントする。

【０３５９】

手法は、工業用微生物を用いて本開示において例示されているが、所望の形質が遺伝子変異体の集団において同定され得る任意の生物体に適用可能である。例えば、これは、ＣＨＯ細胞、酵母、昆虫細胞、藻類、および植物などの多細胞生物の性能を改善するのに使用することができる。

【０３６０】

一部の実施形態では、本開示のＲＢＳライブラリーは、遺伝的多様性の源として使用することができる。一部の実施形態では、本開示のＲＢＳラダーは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入されたときに、株の改善された性能をもたらす。このように改善された株は、本開示の追加の遺伝的多様性を有する他の株（例えば、ＳＮＰスワップまたはプロモータースワップライブラリーにおける改善された性能を有する株）とさらに統合して、目的の富化された標的を有する新しい株を産生することができる。一部の実施形態では、目的の富化された標的を有するこのような株は、さらなる指向株操作のために使用することができる。

【０３６１】

７．抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリー：多型微生物株ライブラリーを得るための分子ツール

微生物による所望の化合物の産生を改善するために、多くの場合、最終産物の阻害の問題を克服することが必要である。微生物は、発酵プロセスの一部として、様々な化合物を産生する。時に、このような化合物の蓄積は、微生物の増殖および生理機能を著しく阻害する。発酵を改善し、微生物が所望の代謝産物を合成することができる間の時間を延長するために、ａ）最終産物の潜在的な毒性、およびｂ）所望の最終産物の形成のために必要な分子経路のフィードバックの阻害を克服しなければならない。

（ａ）一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞における１つまたは複数の遺伝子の一連の発現プロファイル、特に宿主細胞における所与の代謝産物または発酵産物に対する改善された耐性をもたらす変異を呈し、よって、宿主細胞の性能を改善する、宿主細胞内の変異を生成および同定する方法を教示する。このプロセスで同定された任意の特定の変異は、以下でより詳細に説明される抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーとして一緒にグループ化することができる。

【０３６２】

このプロセスを介して操作された結果として生じる微生物は、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを形成する。

【０３６３】

ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、このプロセスを介して形成される実際の物理的な微生物株コレクションを指すことができ、各メンバー株は、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドにおいて、プロセスにおいて同定される所与の変異を代表し、前記ライブラリーは、「抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリー」と呼ばれる。

【０３６４】

さらに、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、遺伝子撹乱のコレクションを指すことができ、この場合、所与の変異は、本明細書に記載のプロセスによって創製される。

【０３６５】

さらに、所与の代謝産物または発酵産物に対する耐性を引き起こす特定の変異を除いて、他の点では遺伝的に同一と仮定される微生物も提供する。これらの微生物は、適切にスクリーニングし、特徴付け、別のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを生じさせることができ

る。ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリー内の微生物株を特徴付けると、リレーショナルデータベース、オブジェクト指向データベース、または大規模分散ＮｏＳＱＬデータベースを含めた任意のデータ記憶コンストラクトに記憶することができる情報およびデータが生じる。このデータ／情報は、例えば、宿主細胞の増殖または宿主細胞における分子の産生に対する変異の効果であり得る。このデータ／情報は、２つまたはそれよりも多くの変異から生じるより広いセットのコンビナトリアル効果でもあり得る。

【０３６６】

プロセスによって創製される変異の上述の例は、単に例示的であり、その理由は、この概念は、一連の発現プロファイルの呈示および任意の所与の数の遺伝子に対するそれらの影響に基づいて一緒にグループ化された任意の所与の数の変異を用いて適用することができるためである。当業者は、任意の他の変異による本明細書に記載のプロセスによって創製された変異を統合する能力も認識する。よって、一部の実施形態では、本開示は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれよりも多くの変異が統合されたライブラリーを教示する。

【０３６７】

要約すると、生物体中で所与の代謝産物または発酵産物に対する耐性を引き起こす様々な変異を利用することは、目的の形質を最適化する強力なツールである。分子ツールは、所与の代謝産物または発酵産物に対する耐性の変異のコレクションを使用する。一部の実施形態では、このような変異は、スピノシンなどの１つまたは複数の所与の分子の収率または産生の増大などの株における改善された性能をもたらす。次いでこのコレクションは、ハイスループットゲノム操作を使用して生物体内に系統的に適用される。この群の変異は、いくつかの方法のいずれか１つに基づいて目的の形質に影響を与える高い見込みを有すると決定される。これらは、目的の形質に対する公知の機能もしくは影響に基づく選択物、または先に決定された有益な遺伝的多様性に基づくアルゴリズム選択物を含み得る。一部の実施形態では、変異の選択物は、所与の宿主内のすべての遺伝子を含み得る。他の実施形態では、変異の選択物は、ランダムに選択された所与の宿主内のすべての遺伝子のサブセットであり得る。他の実施形態では、変異の選択物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．におけるスピノシンなどの所与の分子の合成に関与するすべての遺伝子のサブセットであり得る。

【０３６８】

次いで、所与の代謝産物または発酵産物に対する耐性を引き起こす変異を含有する生物体の結果として生じるＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーが、ハイスループットスクリーニングモデルにおいて性能について評価され、性能を増大させる変異が決定され、情報がデータベースに記憶される。遺伝子撹乱（すなわち、変異）のコレクションは、「抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリー」を形成し、これは、微生物操作処理で利用される潜在的な遺伝子変更の源として利用することができる。経時的に、より大きいセットの遺伝子撹乱は、より多様な宿主細胞バックグラウンドに対してインプリメントされるので、各ライブラリーは、実験的に確認されたデータのコーパスとしてより強力になり、それを使用して目的の任意のバックグラウンドに対する標的とした変化をより正確かつ予想通りに設計することができる。

【０３６９】

一部の実施形態では、本開示の抗代謝産物選択／発酵産物耐性多様性ライブラリーを使用して、遺伝子標的の最適の発現を同定することができる。一部の実施形態では、目標は、標的遺伝子の活性を増大させて代謝経路または遺伝経路における障壁を低減することであり得る。他の実施形態では、目標は、標的遺伝子の発現が要求されないとき、前記標的遺伝子の活性を低減して宿主細胞内の不要なエネルギー消費を回避することであり得る。

【０３７０】

よって、特定の実施形態では、抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーを適用する方法は、以下を含むマルチステッププロセスである。

【０３７１】
１．宿主株における１つまたは複数の所与の代謝産物または発酵産物に対して耐性である株を迅速に選択するためのハイスループット株操作。理想的には、システムは、多型が所与の代謝産物または発酵産物の合成に関連するか否かにかかわらず、すべてのタイプの多型を有する株を同定するために示される。
【０３７２】
２．実際に性能（例えば、所与の代謝産物または発酵産物の収率または産生の増大）が改善された株を迅速に選択するためのハイスループット株操作。このように、株の「ライブラリー」（ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーとも呼ばれる）が構築され、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況において１つまたは複数の有益な多型を含む株である。先に記載したように、多型の組合せを統合し、ライブラリーが構築される組合せの可能性の範囲を拡張することができる。
【０３７３】
３．　１つまたは複数の測定基準に対する株の性能が最適化されている性能を示す状況における株のライブラリーのハイスループットスクリーニング。
【０３７４】
一部の実施形態では、方法は、細胞増殖の阻害を引き起こす好ましい代謝産物／発酵産物、代謝産物／発酵産物の適切な濃度を選択するなどの上述した最初の選択するステップ１についてのストラテジーを決定するステップも含む。
【０３７５】
一部の実施形態では、本開示の抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーは、遺伝的多様性の源として使用することができる。一部の実施形態では、本開示の方法によって同定された代謝産物または発酵産物に対する改善された耐性をもたらす変異は、株の改善された性能をもたらす。このように改善された株は、本開示の追加の遺伝的多様性を有する他の株（例えば、ＳＮＰスワップもしくはプロモータースワップライブラリー、またはトランスポゾン変異誘発ライブラリーにおける改善された性能を有する株）とさらに統合して、目的の富化された標的を有する新しい株を産生することができる。一部の実施形態では、目的の富化された標的を有するこのような株は、さらなる指向株操作のために使用することができる。
【０３７６】
８．配列最適化：最適化配列微生物株ライブラリーを得るための分子ツール
一実施形態では、提供した開示の方法は、宿主生物が発現する１つまたは複数のコドン最適化遺伝子を含む。様々な宿主内での発現を改善するためにコドンを最適化するための方法は、当技術分野で公知であり、文献において記載されている（その全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第２００７／０２９２９１８号を参照）。特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好適なコドンを含有する最適化されたコード配列（Murrayら、（１９８９年）、Nucl. Acids Res.、１７巻：４７７～５０８頁も参照）を調製して、例えば、翻訳の速度を増大させ、または非最適配列から産生される転写物と比較して、より長い半減期などの望ましい性質を有する組換えＲＮＡ転写物を生成することができる。
【０３７７】
タンパク質発現は、転写、ｍＲＮＡプロセシング、ならびに翻訳の安定性および開始に影響するものを含めた多数の因子によって支配される。よって、最適化は、任意の特定の遺伝子のいくつかの配列フィーチャのいずれかに対処することができる。具体例として、希少コドン誘導翻訳休止は、タンパク質発現を低減し得る。希少コドン誘導翻訳休止は、宿主生物において稀に使用される目的のポリヌクレオチド中のコドンの存在が、利用可能なｔＲＮＡプールにおけるその不足に起因してタンパク質翻訳に対して負の効果を有し得ることを含む。
【０３７８】
代替の翻訳開始も、異種タンパク質発現を低減し得る。代替翻訳開始は、リボソーム結

合部位（ＲＢＳ）として機能することができるモチーフを偶然に含有する合成ポリヌクレオチド配列を含み得る。これらの部位は、遺伝子内部部位から短縮タンパク質の翻訳を開始することができる。精製中に除去することが困難であり得る短縮タンパク質を産生する可能性を低減する一方法は、最適化ポリヌクレオチド配列から推定上の内部ＲＢＳ配列を排除するステップを含む。

【０３７９】

リピート誘導ポリメラーゼのスリッページは、異種タンパク質発現を低減し得る。リピート誘導ポリメラーゼのスリッページは、フレームシフト変異をもたらし得るＤＮＡポリメラーゼのスリッページまたはスタッタリングを引き起こすことが示されているヌクレオチド配列リピートを伴う。このようなリピートは、ＲＮＡポリメラーゼのスリッページも引き起こし得る。高いＧ＋Ｃ含有量偏りを有する生物体では、ＧまたはＣヌクレオチドリピートから構成されるより高い程度のリピートが存在し得る。したがって、ＲＮＡポリメラーゼのスリッページを誘導する可能性を低減する一方法は、ＧまたはＣヌクレオチドの長いリピートを変更するステップを含む。

【０３８０】

二次構造の干渉も異種タンパク質発現を低減し得る。二次構造は、ＲＢＳ配列または開始コドンを隔離することができ、タンパク質発現の低減と相関している。ステムループ構造も、転写休止および減衰に関与することができる。最適化ポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列のＲＢＳおよび遺伝子コード領域内に最小限の二次構造を含有して、転写および翻訳の改善を可能にすることができる。

【０３８１】

例えば、最適化プロセスは、宿主が発現する所望のアミノ酸配列を同定することによって始めることができる。アミノ酸配列から、候補ポリヌクレオチドまたはＤＮＡ配列を設計することができる。合成ＤＮＡ配列の設計中に、コドン使用の頻度を、宿主発現生物体のコドン使用と比較することができ、希有な宿主コドンを合成配列から除去することができる。さらに、合成候補ＤＮＡ配列を、望ましくない酵素制限部位を除去し、任意の所望のシグナル配列、リンカー、または非翻訳領域を付加または除去するために修飾することができる。合成ＤＮＡ配列は、翻訳プロセスを妨害し得る二次構造、例えば、Ｇ／Ｃリピートおよびステムループ構造の存在について分析することができる。

【０３８２】

９．上位性マッピング － 有益な遺伝子統合（genetic consolidation）を可能にする予測的分析用ツール

一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞内に有益な遺伝子変更を予測し、組み合わせるための上位性マッピング法（epistasis mapping method）を教示する。遺伝子変更は、上述のＨＴＰ分子ツールセット（例えば、プロモータースワップ、ＳＮＰスワップ、開始／停止コドン交換、配列最適化）のいずれかによって生み出すことができ、これらの遺伝子変更の効果は、得られたＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの特徴付けから分かる。よって、本明細書で使用される場合、用語の上位性マッピングは、宿主性能の増大を生じさせる可能性のある遺伝子変更の組合せ（例えば、有益なＳＮＰまたは有益なプロモーター／標的遺伝子の関連付け）を同定する方法を含む。

【０３８３】

諸実施形態では、本開示の上位性マッピング法は、２つの異なる機能群からの有益な変異の組合せは、同じ機能群からの変異の組合せと比較して、宿主性能を改善する可能性が高いというアイデアに基づく。例えば、Costanzo、The Genetic Landscape of a Cell、Science、３２７巻、５９６４号、２０１０年１月２２日、４２５～４３１頁を参照（その全体が本明細書に参照により組み込まれている）。

【０３８４】

同じ機能群からの変異は、同じ機構によって働く可能性が高く、よって、全体的な宿主性能に対して負または中立の上位性を呈する可能性が高い。対照的に、異なる機能群からの変異は、独立した機構によって働く可能性が高く、それは、宿主性能の改善、および一

部の事例では相乗効果をもたらし得る。

【０３８５】

よって、一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰ変異を分析して、異なる機能群に属すると予測されるＳＮＰを同定する方法を教示する。一部の実施形態では、ＳＮＰ機能群類似度は、変異相互作用プロファイルの余弦類似度（相関係数と類似、図５４Ａを参照）を計算することによって決定される。本開示は、変異類似度マトリックス（図５３を参照）またはデンドログラム（図５４Ａを参照）を介してＳＮＰを比較することも例示する。

【０３８６】

よって、上位性マッピング手順は、１つまたは複数の遺伝的バックグラウンドにおいて適用される遺伝子変異の多様性を、１つまたは複数の遺伝的バックグラウンド内に前記変異を効率的かつ有効に統合する目的で、グループ化および／またはランク付けするための方法を提供する。

【０３８７】

諸態様では、統合は、標的生体分子を産生させるのに最適化された新規株を生み出す目的で実施される。教示した上位性マッピング手順によって、変異の機能分類を同定することが可能であり、このような機能分類は、望ましくない上位性効果を最小限にする統合ストラテジーを可能にする。

【０３８８】

先に説明した通り、工業発酵で使用するための微生物の最適化は、経済、社会、および自然界に関する広い暗示を含む重要で困難な問題である。伝統的に、微生物操作は、ランダム変異誘発の遅く不確かなプロセスによって実施されてきた。このような手法は、細胞の自然進化能力を活用して、人工的に課された選択圧に適応させる。このような手法はまた、有益な変異の珍しさ、基礎をなす適応度地形の荒削りさによって制限されており、より一般に、細胞生物学および分子生物学における現況技術を十分に利用しない。

【０３８９】

最新の手法は、機構レベルでの細胞機能の新しい理解および特定の表現型目標への標的化遺伝子マニピュレーションを実施する新しい分子生物学ツールを活用する。実際には、このような合理的手法は、生物学の根本的な複雑性によって混乱する。原因となる機構は、特に、それぞれに有益な効果が観察された２つまたはそれ超の変化を組み合わせようと試みる場合、理解が不十分である。時に、遺伝子変化のこのような統合は、正の結果（所望の表現型活性の増大によって測定される）を生じるが、正味の正の結果は、予期されたものより低くなり得、一部の場合では、予期されたものより高くなり得る。他の事例では、このような組合せは、正味の中立効果または正味の負の効果を生む。この現象は、上位性と呼ばれ、微生物操作（および一般に遺伝子操作）の基本的な課題の１つである。

【０３９０】

上述した通り、本ＨＴＰゲノム操作プラットフォームは、伝統的な微生物操作手法に関連した問題の多くを解決する。本ＨＴＰプラットフォームは、自動化技術を使用して、数百または数千の遺伝子変異を一度に実施する。特定の態様では、上述した合理的手法と異なり、開示したＨＴＰプラットフォームは、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、Microbial Strain Design System And Methods For Improved Large-Scale Production Of Engineered Nucleotide Sequencesという表題の米国出願第１５／１４０，２９６号に開示されている通り、数千の変異体の並列構築を可能にして、関連したゲノム空間の大きいサブセットをより有効に探索する。「あらゆること」を試すことによって、本ＨＴＰプラットフォームは、本発明者らの限られた生物学的理解によって誘導される困難を回避する。

【０３９１】

しかし同時に、本ＨＴＰプラットフォームは、ゲノム空間の組合せによる爆発的サイズ、および遺伝的相互作用の複雑性を考慮して生成されたデータセットを解明する計算手法の有効度によって基本的に制限されるという問題に直面する。所望の結果を生じる組合せの非ランダム選択を最大にするやり方で広大なコンビナトリアル空間のサブセットを探索

する技法が必要とされる。

【０３９２】

いくぶん類似のＨＴＰ手法が、酵素最適化の場合において有効であると証明された。このニッチな問題において、目的のゲノム配列（１０００塩基の程度の）は、物理的構成が幾分複雑なタンパク質鎖をコードする。正確な構成は、その構成要素の原子成分間の集団電磁相互作用によって決定される。短いゲノム配列および物理的に制約された折り畳み問題のこの組合せは、貪欲最適化ストラテジーに具体的に役に立つ。すなわち、あらゆる残基において配列を個々に変異させ、結果として生じる変異体をシャッフルして、配列活性応答モデル化（Sequence Activity Response modeling）に適合する分解能で局所的配列空間を有効にサンプリングすることが可能である。

【０３９３】

しかし、生体分子の完全ゲノム最適化に関して、このような残基中心の手法は、いくつかの重要な理由で不十分である。第１に、生体分子のゲノム最適化に伴う関連した配列空間の指数関数的増大のため。第２に、生体分子合成における調節、発現、および代謝相互作用の複雑性の追加のため。本発明者らは、教示される上位性マッピング手順を介してこれらの問題を解決した。

【０３９４】

変異のコレクション間の上位性相互作用を、前記変異を１つまたは複数の遺伝的バックグラウンド内により効率的かつ有効に統合する目的で、モデル化するための教示される方法は、当技術分野において革新的であり、高度に必要とされる。

【０３９５】

上位性マッピング手順を記述する場合、用語「より効率的な」および「より有効な」は、特定の表現型の目的に関して統合株の中での望ましくない上位性相互作用の回避を指す。

【０３９６】

プロセスを上記で一般に詳しく述べてきたので、より具体的なワークフロー例を次に記載する。

【０３９７】

第１に、Ｍ個の変異のライブラリーおよび１つまたは複数の遺伝的バックグラウンド（例えば、親菌株）から始める。ライブラリーの選択も遺伝的バックグラウンドの選択も、ここに記載した方法に特異的でない。しかし特定のインプリメンテーションでは、変異のライブラリーは、もっぱら、または組合せで：ＳＮＰスワップライブラリー、プロモータースワップライブラリー、または本明細書に記載の任意の他の変異ライブラリーを含み得る。

【０３９８】

一インプリメンテーションでは、単一の遺伝的バックグラウンドのみが提供される。この場合、別個の遺伝的バックグラウンド（微生物変異体）のコレクションが、この単一のバックグラウンドから最初に生成される。これは、変異の一次ライブラリー（またはそのあるサブセット）を所与のバックグラウンドに適用して、例えば、特定のＳＮＰのＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーまたは特定のプロモーターのＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを所与の遺伝的バックグラウンドに適用して、それに組み入れられている所与のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーからの特定の遺伝子変更を除いて同一の遺伝的バックグラウンドを有する微生物変異体の集団（おそらく１００または１，０００）を生み出すことによって達成され得る。以下に詳述する通り、この実施形態は、コンビナトリアルライブラリーまたはペアワイズライブラリーをもたらし得る。

【０３９９】

別のインプリメンテーションでは、別個の公知の遺伝的バックグラウンドのコレクションを単に与えることができる。以下に詳述する通り、この実施形態は、コンビナトリアルライブラリーのサブセットをもたらし得る。

【０４００】

特定のインプリメンテーションでは、遺伝的バックグラウンドの数およびこれらのバッ

クグラウンド間の遺伝的多様性（変異の数または配列編集距離などで測定した）は、この方法の有効度を最大にするように決定される。

【０４０１】

遺伝的バックグラウンドは、天然の、生来の、もしくは野生型株、または変異された、操作された株であり得る。Ｎ個の別個のバックグラウンド株は、ベクトルｂで表すことができる。一例では、バックグラウンドｂは、Ｎ個の一次変異m_0＝（m_1、m_2、… m_N）を野生型バックグラウンド株b_0に適用して、Ｎ個の変異されたバックグラウンド株ｂ＝m_0b_0＝（m_1b_0、m_2b_0、… m_N b_0）（式中、m_ib_0は、変異m_iのバックグラウンド株b_0への適用を表す）を形成することによって形成される操作されたバックグラウンドを表すことができる。

【０４０２】

いずれの場合にも（すなわち、単一の提供された遺伝的バックグラウンドまたは遺伝的バックグラウンドのコレクション）、結果は、Ｎ個の遺伝的に別個のバックグラウンドのコレクションである。関連した表現型が各バックグラウンドについて測定される。

【０４０３】

第２に、Ｍ個の変異のコレクションm_1内の各変異が、Ｎ個のバックグラウンド株ｂのコレクション内の各バックグラウンドに適用されて、Ｍ×Ｎ個の変異体のコレクションが形成される。Ｎ個のバックグラウンドが変異の一次セットm_0（上述した）を適用することによってそれ自体得られたインプリメンテーションでは、変異体の結果として生じるセットは、時に、コンビナトリアルライブラリーまたはペアワイズライブラリーと呼ばれる。公知のバックグラウンドのコレクションが明示的に提供された別のインプリメンテーションでは、変異体の結果として生じるセットは、コンビナトリアルライブラリーのサブセットと呼ぶことができる。操作されたバックグラウンドベクトルの生成と同様に、諸実施形態では、入力インターフェース２０２は、変異ベクトルm_1およびバックグラウンドベクトルｂ、ならびに外積などの指定されたオペレーションを受け取る。

【０４０４】

上記操作されたバックグラウンド例を続けて、Ｍ×Ｎコンビナトリアルライブラリーの形成は、m_1×m_0b_0、ｂ＝m_0b_0のＮ個のバックグラウンドに適用されたm_1の外積によって形成された行列によって表すことができ、この場合、m_1中の各変異は、ｂ内の各バックグラウンド株に適用される。結果として生じるＭ×Ｎ行列の各ｉ番目の行は、バックグラウンドコレクションｂ内のすべての株へのm_1内のｉ番目の変異の適用を表す。一実施形態では、m_1＝m_0であり、行列は、出発株b_0への同じ変異のペアワイズ適用を表す。その場合、行列は、その対角線回りで対称であり（Ｍ＝Ｎ）、対角線は、任意の分析において無視することができ、その理由は、それが同じ変異の２回の適用を表すためである。

【０４０５】

諸実施形態では、Ｍ×Ｎ行列の形成は、入力インターフェース２０２に化合物発現m_1×m_0b_0を入力することによって達成することができる。発現のコンポーネントベクトルは、直接入力することができ、これらの要素は、１つもしくは複数のＤＮＡ仕様を介して、またはインタープリター２０４によるインタープリテーション中にベクトルの検索を可能にするライブラリー２０６への呼出しとして明示的に指定される。「Microbial Strain Design System and Methods for Improved Large Scale Production of Engineered Nucleotide Sequences」という表題の米国特許出願第１５／１４０，２９６号に記載されている通り、インタープリター２０４、実行エンジン２０７、発注エンジン（order placement engine）２０８、およびファクトリー２１０を介して、ＬＩＭＳシステム２００は、入力された発現によって指定された微生物株を生成する。

【０４０６】

第３に、図２９を参照すると、分析装置２１４は、Ｍ×Ｎコンビナトリアルライブラリー行列（４２０２）内の各変異体について表現型応答を測定する。したがって、応答のコレクションは、Ｍ×Ｎ応答行列Ｒと解釈することができる。Ｒの各要素は、r_{ij}＝ｙ（ｍ

ｉ，ｍｊ）として表すことができ、式中、ｙは、変異ｍｉによって変異された、操作されたコレクションｂ内のバックグラウンド株ｂｊの応答（性能）を表す。単純性および実用性のために、本発明者らは、ペアワイズ変異を仮定し、この場合、ｍ１＝ｍ０である。今回の場合のように、変異のセットがペアワイズ変異ライブラリーを表す場合、結果として生じる行列は、遺伝子相互作用行列、またはより特定すれば、変異相互作用行列とも呼ばれる場合がある。

【０４０７】

当業者は、一部の実施形態では、上位性効果および予測的株設計に関するオペレーションは、ＬＩＭＳシステム２００の自動手段を通じて、例えば、分析装置２１４によって、または人によるインプリメンテーションによって、または自動化手段およびマニュアル手段の組合せを通じて完全に実施することができることを認識する。オペレーションが完全に自動化されていない場合、ＬＩＭＳシステム２００のエレメント、例えば、分析装置２１４は、例えば、その独自のオペレーション可能な能力を通じた結果を生成するのではなく、オペレーションを人が遂行した結果を受け取ることができる。本明細書の他の場所で記載されている通り、分析装置２１４などのＬＩＭＳシステム２００のコンポーネントは、１つまたは複数のコンピューターシステムによって完全または部分的にインプリメントすることができる。一部の実施形態では、特に、予測的株設計に関するオペレーションが自動化手段およびマニュアル手段の組合せによって実施される場合、分析装置２１４は、コンピューターハードウェア、ソフトウェア、もしくはファームウェア（またはこれらの組合せ）だけでなく、以下の表５に列挙されたもの、例えば、「性能を評価する」のカテゴリー下に列挙された装置などの人のオペレーターが運転する装置も含み得る。

【０４０８】

第４に、分析装置２１２は、応答行列を正規化する。正規化は、バイアスを除去し、かつ／またはこの方法に特異的な効果の関連した部分を単離する目的で測定された応答値を調整するマニュアルおよび／またはこの実施形態では、自動化プロセスからなる。図２９に関して、第１のステップ４２０２は、正規化された測定データを得ることを含み得る。一般に、予測的株設計および上位性マッピングを対象とする請求項において、用語「性能尺度」または「測定された性能」などは、未処理であっても、何らかの様式で処理された、例えば、正規化データであっても測定データを反映する測定基準を記述するのに使用され得る。特定のインプリメンテーションでは、正規化は、測定された応答値から先に測定されたバックグラウンド応答を減じることによって実施することができる。そのインプリメンテーションでは、結果として生じる応答要素は、ｒｉｊ＝ｙ（ｍｉ，ｍｊ）－ｙ（ｍｊ）として形成することができ、式中、ｙ（ｍｊ）は、一次変異ｍｊを親株ｂ０に適用することによって引き起こされた操作されたコレクションｂ内の操作されたバックグラウンド株ｂｊの応答である。正規化された応答行列の各行は、その対応する変異の応答プロファイルとして扱われることに留意されたい。すなわち、ｉ番目の行は、ｊ＝１～Ｎについてすべてのバックグラウンド株ｂｊに適用された対応する変異ｍｉの相対的効果を記述する。

【０４０９】

ペアワイズ変異の例に関して、２つの変異の結果として生じる株の組み合わされた性能／応答は、個々に、変異のそれぞれに対する株の性能／応答より大きい、小さい、またはそれに等しい場合がある。この効果は、「上位性」として公知であり、一部の実施形態では、ｅｉｊ＝ｙ（ｍｉ，ｍｊ）－（ｙ（ｍｉ）＋ｙ（ｍｊ））として表すことができる。この数学的表現の変形は、可能であり、例えば、どのように個々の変化が生物学的に相互作用するかに依存し得る。上述したように、同じ機能群からの変異は、同じ機構によって働く可能性が高く、よって、全体的な宿主性能に対して負または中立の上位性を呈する可能性が高い。対照的に、異なる機能群からの変異は、独立した機構によって働く可能性が高く、それは、例えば、重複する変異効果を低減することによって宿主性能の改善をもたらし得る。よって、同じでない応答を生じる変異は、同様の応答を生じる変異より相加的な様式で組み合わさる可能性が高い。これは、次ステップにおける類似度の計算につながる。

【０４１０】

第５に、分析装置２１４は、応答の中の類似度、ペアワイズ変異例では、応答行列（４２０４）内のｉ番目の変異の効果とｊ番目（例えば、一次）変異の効果との間の類似度を測定する。Ｒのｉ番目の行は、Ｎ個のバックグラウンド株上のｉ番目の変異m_iの性能効果を表し、そのそれぞれは、それ自体上述した操作された変異の結果であり得ることを想起されたい。よって、ｉ番目の変異の効果とｊ番目の変異の効果との間の類似度は、ｉ番目の行とｊ番目の行との間の類似度s_{ij}、それぞれρ_iおよびρ_jによって表されて類似度行列Ｓを形成することができ、その一例は、図５３に例示されている。類似度は、多くの公知の技法、例えば、相互相関または絶対余弦類似度、例えば、$s_{ij}=abs(cos(\rho_i,\rho_j))$を使用して測定され得る。

【０４１１】

余弦類似度のような測定基準の代替または補足として、応答プロファイルをクラスター化して類似度の程度を決定することができる。クラスタリングは、適当な距離尺度（例えば、Ｅｕｃｌｉｄｅａｎ、Ｈａｍｍｉｎｇなど）と併せて距離に基づくクラスタリングアルゴリズム（例えば、ｋ－平均、階層的凝縮型など）を使用することによって実施することができる。代替として、クラスタリングは、適当な類似度尺度（例えば、余弦、相関など）とともに類似度に基づくクラスタリングアルゴリズム（例えば、スペクトル、ミンカットなど）を使用して実施することができる。もちろん、任意の数の標準的な機能的なオペレーション（例えば、指数関数）を介して類似度尺度にマッピングすることができ、逆もまた同様である。一インプリメンテーションでは、階層的凝縮型クラスタリングを絶対余弦類似度と併せて使用することができる（図５４Ａを参照）。

【０４１２】

クラスタリングの一例として、Ｃを変異m_iのｋ個の別個クラスターへのクラスタリングとする。Ｃを、c_{ij}が、変異ｉがクラスターｊに属する程度、０から１の値であるクラスターメンバーシップ行列とする。そのとき、変異ｉとｊとの間のクラスターに基づく類似度は、$C_i \times C_j$（Ｃのｉ番目の行とｊ番目の行とのドット積）によって与えられる。一般に、クラスターに基づく類似度行列は、CC^T（すなわち、Ｃ×Ｃ－転置行列）によって与えられる。ハードクラスタリング（変異が正確に１つのクラスターに属する）の場合では、２つの変異間の類似度は、これらが同じクラスターに属する場合、１であり、そうでない場合、０である。

【０４１３】

Costanzo、The Genetic Landscape of a Cell、Science、３２７巻、５９６４号、２０１０年１月２２日、４２５～４３１頁（その全体が本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている通り、変異応答プロファイルのこのようなクラスタリングは、細胞の根本的な機能的な機構のおおよそのマッピングに関係する。すなわち、一緒にクラスター化する変異は、根本的な生物学的プロセスまたは代謝経路に関係付けられる傾向がある。このような変異は、「機能群」と本明細書で呼ばれる。この方法の重要な知見は、２つの変異が同じ生物学的プロセスまたは経路によって働く場合、観察される効果（特に観察される利益）は、重複し得ることである。反対に、２つの変異が遠位機構によって働く場合、有益な効果が重複する可能性は低い。

【０４１４】

第６に、上位性効果に基づいて、分析装置２１４は、図２９（４２０６）に示した通り、同じでない応答に至る変異の対を選択し、例えば、これらの余弦類似度測定基準は、類似度閾値未満に入り、またはこれらの応答は、十分に分離したクラスター内に入る（例えば、図５３および図５４Ａにおける）。これらの相違点に基づいて、選択された変異の対は、同様の対より良好にバックグラウンド株内に統合するはずである。

【０４１５】

十分に異なった応答に至る選択された変異の対に基づいて、ＬＩＭＳシステム（例えば、インタープリター２０４、実行エンジン２０７、発注依頼者（order placer）２０８、およびファクトリー２１０のすべて、またはある組合せ）を使用して、これらの選択された変異を有する微生物株を設計することができる（４２０８）。諸実施形態では、本明

細書で以下に、かつ他の場所で記載する通り、上位性効果を、予測モデルに組み入れる、またはそれと併せて使用して株選択を重み付けまたは選別することができる。

【０４１６】

ある好適な予測モデルを介してライブラリーからの変異のコレクションを特定のバックグラウンド内に統合することによって得られる仮定の株の性能（別名スコア）を推定することが可能であると仮定される。教示される方法で利用される代表的な予測モデルは、「ゲノムワイド遺伝子設計判定基準の効果のコンピューター分析および予測」というより大きいセクションに見出される「予測的株設計」という表題の以下のセクションに提供されている。

【０４１７】

線形回帰などの予測的株設計技法を使用する場合、分析装置２１４は、例えば、回帰結果を選別して十分に同じでない変異のみを保存することによって、低い類似度尺度を有する変異にモデルを制限することができる。代替として、予測モデルは、類似度行列を用いて重み付けることができる。例えば、一部の実施形態は、類似度行列を使用する重み付き最小二乗回帰を使用して、提案された変異の相互依存性を特徴付けることができる。一例として、重み付けは、回帰モデルに「カーネル」トリックを施すことによって実施することができる。（「カーネルトリック」が多くの機械学習モデル化手法に一般的である程度に、この再重み付けストラテジーは、線形回帰に制限されない）。

【０４１８】

このような方法は、当業者に公知である。諸実施形態では、カーネルは、要素１－ｗ＊s_{ij}を有する行列であり、式中、１は、恒等行列の要素であり、ｗは、０から１の間の実数値である。ｗ＝０であるとき、これは、標準回帰モデルに変換される。実際には、ｗの値は、ペアワイズコンビナトリアルコンストラクトおよびこれらの付随効果ｙ（m_i，m_j）に対して評価されるとき、予測モデルの精度（r^2値または二乗平均平方根誤差（ＲＭＳＥ））に関係する。１つの単純なインプリメンテーションでは、ｗは、$w=1-r^2$と定義される。この場合、モデルが完全に予測的であるとき、$w=1-r^2=0$であり、統合は、予測モデルだけに基づき、上位性マッピング手順は、役割を果たさない。一方、予測モデルがまったく予測的でない場合、$w=1-r^2=1$であり、統合は、上位性マッピング手順だけに基づく。各反復中、精度を評価してモデル性能が改善しているかどうかを決定することができる。

【０４１９】

本明細書に記載の上位性マッピング手順は、どのモデルが分析装置２１４によって使用されているかに依存しないことが明らかであるはずである。このような予測モデルを考慮すると、コンビナトリアル統合（combinatorial consolidation）を介して変異ライブラリーにアクセス可能なすべての仮定の株をスコア付けおよびランク付けすることが可能である。

【０４２０】

一部の実施形態では、上位性効果を説明するために、同じでない変異応答プロファイルを分析装置２１４が使用して、予測モデルからの各仮定の株に関連したスコアおよびランクを強化することができる。この手順は、同じでない応答プロファイルを有する候補株（例えば、多様なクラスターから引き出される株）を支持するための、スコアの再重み付けとして広く考えることができる。１つの単純なインプリメンテーションでは、株は、相違点閾値を満たさない、または同じクラスターから引き出された構成要素の変異（適当な重み付けを有する）の数によって低減されたそのスコアを有し得る。特定のインプリメンテーションでは、仮定の株の性能推定値は、仮定の株に関連した構成要素の変異（やはり適当な重み付けを有する）のすべての対に関連した類似度行列の項の和によって低減され得る。仮定の株は、これらの強化されたスコアを使用して再ランク付けすることができる。実際には、このような再重み付け算出は、最初のスコア推定値と併せて実施することができる。

【０４２１】

結果は、混乱させる上位性相互作用をより有効に回避するように強化されたスコアおよびランクを有する仮定の株のコレクションである。仮定の株をこの時構築することができ、またはこれらは、続いて分析または使用するために別の計算方法に送ることができる。

【０４２２】

当業者は、本明細書に記載の上位性マッピングおよび反復性予測的株設計は、ペアワイズ変異のみを使用することに限定されず、はるかに多くの変異をバックグラウンド株に同時に適用するように拡張することができることを認識する。別の実施形態では、追加の変異を、本明細書に記載の予測方法に従って選択された変異を使用して既に変異された株に順次適用することができる。別の実施形態では、上位性効果は、互いにわずかに異なるいくつかの株バックグラウンドに同じ遺伝子変異を適用し、改変された株バックグラウンドの中の正の応答プロファイルにおける任意の有意差に留意することによってインピュートされる。

【０４２３】

外因性ＤＮＡを導入するためのＨＴＰコンジュゲートするコンジュゲーション

本開示は、ドナー微生物細胞からＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のレシピエント細胞に遺伝物質を移入させるための方法も提供する。ドナー微生物細胞は、これらに限定されないが、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞を含む、任意の適切なドナー細胞であり得る。レシピエント微生物細胞は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ株などのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種であり得る。

【０４２４】

一般に、方法は、以下の（１）レシピエント細胞を、中期指数期まで継代培養するステップと（必要に応じて）；（２）ドナー細胞を中期指数期まで継代培養するステップと（必要に応じて）；（３）ドナーおよびレシピエント細胞を組み合わせるステップと；（４）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物をコンジュゲーション培地に蒔くステップと；（５）プレートをインキュベートして、細胞をコンジュゲートさせるステップと；（６）ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；（７）非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；（８）さらにプレートをインキュベートして、組み込まれたレシピエント細胞を成長させるステップとを含む。

【０４２５】

本出願の発明者らは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ中の外因性ＤＮＡコンジュゲーションの頻度の驚くべき増大をもたらす最適化し得る条件を発見した。このような条件としては、これらに限定されないが、（１）レシピエント細胞は、洗浄される（例えば、コンジュゲートする前）；（２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、比較的低い温度でコンジュゲートされる；（３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に長時間継代培養される；（４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の適切な比；（５）ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬がコンジュゲーション混合物に送達される適切なタイミング；（６）レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬のコンジュゲーション混合物への適切なタイミング；（７）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれたコンジュゲーション培地を乾燥させる適切なタイミング；（８）高濃度のグルコース；（９）ドナー細胞の適切な濃度；ならびに（１０）レシピエントの適切な濃度が挙げられる。

【０４２６】

一部の実施形態では、コンジュゲーションの増大をもたらす以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれよりも多くが利用される：

（１）レシピエント細胞は、洗浄される；

（２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１°、３２℃、３３℃、例えば、３０℃の温度でコンジュゲートされる；

（３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に、少なくとも約４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２，５３、５４、５５時間、例えば、約４８時間継代培養される；

（４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．５、１：０．６、１：０．７、１：０．８、１：０．９、１：１．０、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９または１：２．０、例えば、約１：０．６～１：１．０である；
（５）ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０時間後、例えば約２４時間後に混合物に送達される；
（６）レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４または５５時間、例えば、約４０～４８時間後に混合物に送達される；
（７）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれたコンジュゲーション培地は、少なくとも約１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間または１５時間乾燥される；
（８）コンジュゲーション培地は、少なくとも約０．５ｇ／Ｌ、１ｇ／Ｌ、１．５ｇ／Ｌ、２ｇ／Ｌ、２．５ｇ／Ｌ、３ｇ／Ｌ、３．５ｇ／Ｌ、４ｇ／Ｌ、４．５ｇ／Ｌ、５ｇ／Ｌ、５．５ｇ／Ｌ、６ｇ／Ｌ、６．５ｇ／Ｌ、７ｇ／Ｌ、７．５ｇ／Ｌ、８ｇ／Ｌ、８．５ｇ／Ｌ、９ｇ／Ｌ、９．５ｇ／Ｌ、１０ｇ／Ｌまたはそれよりも多くのグルコースを含む；
（９）ドナー細胞の濃度は、約ＯＤ６００＝０．１、０．１５、０．２、０．２５、０．３０、０．３１、０．３２、０．３３、０．３４、０．３５、０．３６、０．３７、０．３８、０．３９、０．４、０．４１、０．４２、０．４３、０．４４、０．４５、０．４６、０．４７、０．４８、０．４９、０．５０、０．５１、０．５２、０．５３、０．５４、０．５５、０．５６、０．５７、０．５８、０．５９、０．６０、０．６５、０．７０、０．７５、０．８０、０．８５、０．９０、０．９５、１．０である；ならびに
（１０）レシピエント細胞の濃度は、約ＯＤ５４０＝１．０、２．０、３．０、４．０、５．０、６．０、７．０、８．０、９．０、１０．０、１０．５、１１．０、１１．５、１２．０、１２．５、１３．０、１３．５、１４．０、１４．５または１５．０である。

【０４２７】

一部の実施形態では、混合物中のドナー細胞またはレシピエント細胞の総数は、約５×10^6、６×10^6、７×10^6、８×10^6または約９×10^6である。

【０４２８】

一部の実施形態では、ドナー細胞はＥ．ｃｏｌｉ細胞であり、ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬はナリジクス酸である。一部の実施形態では、ナリジクス酸の濃度は、約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、６０、１７０、１８０、１９０または２００μｇ／ｍｌである。

【０４２９】

一部の実施形態では、レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬はアプラマイシンであり、濃度は、約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００μｇ／ｍｌである。

【０４３０】

本明細書に記載の方法は、ハイスループットプロセスで実施することができる。一部の実施形態では、方法は、４８ウェルのＱ－ｔｒａｙ上で実施される。一部の実施形態では、ハイスループットプロセスは、部分的または完全に自動化されている。

【０４３１】

一部の実施形態では、ドナー細胞およびレシピエント細胞の混合物は、液体混合物であり、液体混合物のアンプル体積は、ロッキング動作を伴う培地に蒔かれ、液体混合物は、培地の全面積にわたって分散する。

【０４３２】

一部の実施形態では、方法は、ドナー細胞によって提供された組み込まれたＤＮＡを有するレシピエント細胞の後続の播種のために、酵母ピンによるコロニーピッキングによって接合完了体を移入する自動化プロセスを含む。一部の実施形態では、コロニーピッキングは、ディッピング動作または撹拌動作のいずれかで実施される。

【０４３３】

一部の実施形態では、方法は、以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたは７つで実施される：（１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；（２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；（３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；（４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．８である；（５）ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、ドナー細胞およびレシピエント細胞が混合された約２０時間後に混合物に送達される；（６）混合物中のドナー細胞の量またはレシピエント細胞の量は、約７×１０６である；（７）コンジュゲーション培地は、約６ｇ／Ｌのグルコースを含む。

【０４３４】

経路のリファクタリング

本開示は、経路をリファクタリングするための方法を提供する。本明細書で使用される場合、用語「経路のリファクタリング」という用語は、微生物における１つまたは複数の完全または部分的に最適な生合成経路を構築するプロセスを指す。一部の実施形態では、生合成経路は、スピノシンなどの１つまたは複数の目的の産物の合成に関連する。

【０４３５】

経路をリファクタリングする方法は、本開示の１つまたは複数のツールを利用することができる。任意の特定の理論によって束縛されることを望むことなく、経路をリファクタリングする方法は、生合成経路に直接関与する１つもしくは複数の遺伝子の活性、または生合成経路に間接的に関与する１つもしくは複数の遺伝子（例えば、目的の所与の産物の生合成に間接的に影響し得る遺伝子）の活性を微調整することができる。一部の実施形態では、生合成経路に関与する１つまたは複数の遺伝子を微調整するために、方法は、これらに限定されないが、プロモーターラダーライブラリー、ＲＢＳラダーライブラリー、ターミネーターライブラリー、開始／停止コドンライブラリーなどを含む、本開示の１つまたは複数の遺伝的多様性ライブラリーを利用するステップを含む。一部の実施形態では、生合成経路に関与する１つまたは複数の遺伝子の活性は、本明細書に開示の少なくとも１つの遺伝的ツールによって改変される。一部の実施形態では、改変された遺伝子を有する株は、本開示に記載のハイスループットシステムによってスクリーニングされて、改変なしの株などのチェック株と比較して改善された性能を有する株を同定することができる。

【０４３６】

結果として、生合成経路に関与する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多くの遺伝子が微調整される。一部の実施形態では、任意の数の遺伝子が微調整される。一部の実施形態では、微調整された遺伝子は、同じシグナル伝達経路または合成経路にある。一部の実施形態では、微調整された遺伝子は、異なるシグナル伝達経路または合成経路にある。一部の実施形態では、ある特定の遺伝子の活性は、改変が株の改善された性能をもたらす限り、必要により改変される。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子の活性は、チェック株における活性と比較して、上方制御される。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子の活性は、チェック株における活性と比較して、下方制御される。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子の発現のタイミングは、チェック株におけるタイミングと比較して、変更される。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子の発現の場所は、チェック株における場所と比較して、変更される。一部の実施形態では、速度決定ステップ（ＲＤＳ）または律速ステップに関与する１つまたは複数の遺伝子の活性は、チェック株における活性と比較して、改変される。一部の実施形態では、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多くの改変遺伝子の遺伝子座が統合されて、さらに微調整された生合成経路を有する株が創製される。

【０４３７】
一部の実施形態では、経路をリファクタリングする方法は、本開示の微生物のゲノムに遺伝物質を組み入れるステップを含む。一部の実施形態では、微生物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐ．であり、遺伝物質は、微生物のゲノム中の特定の位置（例えば、「ランディングパッド」）に組み入れられる。一部の実施形態では、特定の位置は、本明細書に記載の本開示の中立の組込み部位（ＮＩＳ）から選択される。
【０４３８】
一部の実施形態では、遺伝物質は、自己複製可能ベクターを介して本開示の微生物に導入される。一部の実施形態では、微生物は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐ．であり、遺伝物質は、本明細書に記載の本開示の自己複製プラスミドによって微生物に導入される。
【０４３９】
遺伝子設計に受け入れられる生物体
開示されるＨＴＰゲノム操作プラットフォームは、工業用微生物細胞培養物（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．）で例示されるが、所望の形質を遺伝子変異体の集団内で同定することができる任意の宿主細胞生物体に適用可能である。
【０４４０】
よって、本明細書で使用される場合、用語「微生物」は、広く解釈されるべきである。これは、これらに限定されないが、２つの原核生物ドメイン、細菌および古細菌、ならびにある特定の真核真菌および原生生物を含む。しかし、ある特定の態様では、「高等」真核生物、例えば、昆虫、植物、および動物を本明細書に教示の方法において利用することができる。
【０４４１】
適切な宿主細胞としては、これらに限定されないが、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｃａｖｅｒｎａｅ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｃｅｂｕｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｄｅｎｄｒａｎｔｈｅｍａｅ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｆｌａｖａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｇｈａｒｄａｉｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｇｌｏｒｉｏｓａｅ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｇｒｅｇｏｒｉｉ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈａｌｏｐｈｉｌｅ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈａｌｏｔｏｌｅｒａｎｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｉｒｓｕｔｅ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｏｒｄｅｉ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｉｎｄｉｃａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｊｉａｎｇｘｉｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｌａｃｉｓａｌｓｉ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｐｈａｔｔｈａｌｕｎｇｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｑｉｊｉａｏｊｉｎｇｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｏｓｅａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｈａｎｄｏｎｇｅｎｓｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓｐｏｒｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｔａｂｅｒｉ、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅおよびＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｔｒｉｐｔｅｒｙｇｉｉが挙げられる。
【０４４２】
一部の実施形態では、宿主細胞は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｉｎｄｉａｎｅｓｉｓ（ＡＴＣＣ（登録商標）ＢＡＡ－２５５１（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ（Ｗａｋｓｍａｎ）、Ｌａｂｅｄａ（ＡＴＣＣ（登録商標）３１７７２（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ（Ｗａｋｓｍａｎ）、Ｌａｂｅｄａ（ＡＴＣＣ（登録商標）１１９１２（商標））、

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）２９０３４（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｉｒｓｕｔａ ｓｕｂｓｐ．ｈｉｒｓｕｔａ、ＬａｃｅｙおよびＧｏｏｄｆｅｌｌｏｗ（ＡＴＣＣ（登録商標）２７８７５（商標））、ＮＥＢ＃９９８（ＡＴＣＣ（登録商標）９８１０２（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｉｒｓｕｔａ ｓｕｂｓｐ．ｋｏｂｅｎｓｉｓ（Ｉｗａｓａｋｉら）、Ｌａｃｅｙ（ＡＴＣＣ（登録商標）２０５０１（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）２９０３５（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ（Ｗａｋｓｍａｎ）、Ｌａｂｅｄａ（ＡＴＣＣ（登録商標）１１６３５Ｄ－５（商標））ＡＴＣＣ（登録商標）番号：１１６３５Ｄ－５（商標）、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｔａｂｅｒｉ（Ｌａｂｅｄａ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）４９８４２（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｉｒｓｕｔａ ｓｕｂｓｐ．ｈｉｒｓｕｔａ、ＬａｃｅｙおよびＧｏｏｄｆｅｌｌｏｗ（ＡＴＣＣ（登録商標）２７８７６（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ａｕｒａｎｔｉａｃａ、Ｅｔｉｅｎｎｅら（ＡＴＣＣ（登録商標）５１３５１（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｇｒｅｇｏｒｉｉ、Ｇｏｏｄｆｅｌｌｏｗら（ＡＴＣＣ（登録商標）５１２６５（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ（Ｗａｋｓｍａｎ）、Ｌａｂｅｄａ（ＡＴＣＣ（登録商標）１１６３５（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）３３５１５（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）１５３４７（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａ、ＭｅｒｔｚおよびＹａｏ（ＡＴＣＣ（登録商標）４９４６０（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）２１４５０（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｈｏｒｄｅｉ、Ｇｏｏｄｆｅｌｌｏｗら（ＡＴＣＣ（登録商標）４９８５６（商標））、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（Ｋｒａｓｉｌ’ｎｉｋｏｖおよびＡｇｒｅ）、Ｋｏｒｎ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈら（ＡＴＣＣ（登録商標）２９６８１（商標））、ｐＩＪ４３［ＭＣＢ１０２３］（ＡＴＣＣ（登録商標）３９１５６（商標））、ｐＯＪ３１（ＡＴＣＣ（登録商標）７７４１６（商標））、ならびにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｒｅｃｔｉｖｉｒｇｕｌａ（２１４５１）から選択される。

【０４４３】

遺伝子設計＆ＨＴＰ微生物操作プラットフォームにおいて利用するための遺伝的多様性プールの生成

一部の実施形態では、本開示の方法は、遺伝子設計として特徴付けられる。本明細書で使用される場合、用語の遺伝子設計は、新しい優れた宿主細胞を設計および生み出すために特定の遺伝子、遺伝子の部分、プロモーター、停止コドン、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、リボソーム結合部位、ターミネーター、または他のＤＮＡ配列の最適のバリアントを同定および選択することによる宿主生物のゲノムの再構築または変更を指す。

【０４４４】

一部の実施形態では、本開示の遺伝子設計法における第１のステップは、新しい宿主ゲノムを再構築することができる複数の配列バリエーションを有する最初の遺伝的多様性プール集団を得ることである。

【０４４５】

一部の実施形態では、本明細書に教示の遺伝子設計法における後続のステップは、上述のＨＴＰ分子ツールセット（例えば、ＳＮＰスワッピングまたはプロモータースワッピング）の１つまたは複数を使用して、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを構築することであり

、次いでこのライブラリーは、宿主細胞において試験するための特定のゲノム変更のライブラリーを提供することによってゲノム操作プロセスのドライバーとして機能する。

【０４４６】

既存の野生型株からの多様性プールの利用

一部の実施形態では、本開示は、所与の野生型集団の微生物の中に存在する配列多様性を同定するための方法を教示する。したがって、多様性プールは、分析に利用される所与の数ｎの野生型微生物であり得、前記微生物のゲノムは、「多様性プール」を代表する。

【０４４７】

一部の実施形態では、多様性プールは、前記野生型微生物の中で天然の遺伝的バリエーション中に存在する既存の多様性の結果であり得る。このバリエーションは、所与の宿主細胞の株バリアントから生じる場合があり、または完全に異なる種である微生物の結果である場合がある。遺伝的バリエーションは、天然に存在するか否かにかかわらず、株の遺伝子配列の任意の差異を含み得る。一部の実施形態では、遺伝的バリエーションは、ＳＮＰスワップ、ＰＲＯスワップ、開始／停止コドンスワップ、ＳＴＯＰスワップ、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位多様性ライブラリー、抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーなどを含み得る。

【０４４８】

既存の工業用株バリアントからの多様性プールの利用

本開示の他の実施形態では、多様性プールは、伝統的な株改良プロセスの間に創製された株バリアント（例えば、ランダム変異を介して生成され、長年にわたって収率改善のために選択された１種または複数の宿主生物株）である。よって、一部の実施形態では、多様性プールまたは宿主生物は、歴史的な産生株のコレクションを含み得る。

【０４４９】

特定の態様では、多様性プールは、特定の時点で「ベースライン」遺伝子配列を有する元の親微生物株（S_1）（S_1Gen_1）、およびさらに、前記S_1株に由来し、／それから開発された、かつS_1のベースラインゲノムに関して異なるゲノムを有する任意の数の後続の子孫株（S_2、S_3、S_4、S_5など、S_{2-n}に一般化可能）（$S_{2-n}Gen_{2-n}$）であり得る。

【０４５０】

例えば、一部の実施形態では、本開示は、多様性プール内の微生物ゲノムをシーケンシングして各株に存在するＳＮＰを同定することを教示する。一実施形態では、多様性プールの株は、歴史的な微生物産生株である。よって、本開示の多様性プールは、例えば、工業用基準株、および伝統的な株改良プログラムを介して産生された１種または複数の変異工業用株を含み得る。

【０４５１】

多様性プール内のすべてのＳＮＰが同定されたら、本開示は、個々にかつ群において、ＳＮＰの効果（例えば、目的の表現型の創製）を描写する（すなわち、定量し、特徴付ける）ためのＳＮＰスワッピングの方法およびスクリーニング方法を教示する。よって、上述した通り、教示したプラットフォームにおける最初のステップは、複数の配列バリエーション、例えば、ＳＮＰを有する最初の遺伝的多様性プール集団を得ることであり得る。次いで、教示したプラットフォームにおける後続のステップは、上述のＨＴＰ分子ツールセット（例えば、ＳＮＰスワッピング）の１つまたは複数を使用して、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを構築することであり得、次いでこのライブラリーは、微生物において試験するための特定のゲノム変更のライブラリーを提供することによってゲノム操作プロセスのドライバーとして機能する。

【０４５２】

一部の実施形態では、本開示のＳＮＰスワッピング方法は、変異株（例えば、$S_{2-n}Gen_{2-n}$の中からの株）内で同定された１つまたは複数のＳＮＰを基準株（S_1Gen_1）または野生型株に導入するステップを含む。

【０４５３】

他の実施形態では、本開示のＳＮＰスワッピング方法は、変異株（例えば、$S_{2-n}Gen_{2-n}$の中からの株）内で同定された１つまたは複数のＳＮＰを除去するステップを含む。

【０４５４】

変異誘発を介した多様性プールの創製

一部の実施形態では、細胞の所与の多様性プール集団における目的の変異は、変異誘発化学物質または放射線を含めた、株を変異させる任意の手段によって人工的に生成することができる。用語「変異誘発させること」は、細胞核酸材料において１つまたは複数の遺伝子改変を誘導するための方法を指すのに本明細書で使用される。

【０４５５】

用語「遺伝子改変」は、ＤＮＡの任意の変更を指す。代表的な遺伝子改変は、ヌクレオチド挿入、欠失、置換、およびこれらの組合せを含み、単一塩基という小さいものまたは数万塩基という大きいものであり得る。よって、用語「遺伝子改変」は、染色体の領域を含むＤＮＡの位置または配向が変更されるヌクレオチド配列の反転および他の染色体再配列を包含する。染色体再配列は、染色体内再配列または染色体間再配列を含むことができる。

【０４５６】

一実施形態では、本主張の主題において使用される変異誘発方法は、実質的にランダムであり、その結果、遺伝子改変は、変異誘発される核酸材料内の任意の利用可能なヌクレオチド位置で行うことができる。別の言い方をすれば、一実施形態では、変異誘発させることは、特定のヌクレオチド配列における出現の優先または頻度の増加を示さない。

【０４５７】

本開示の方法は、これらに限定されないが、紫外光、Ｘ線照射、ガンマ照射、Ｎ－エチル－Ｎ－ニトロソ尿素（ＥＮＵ）、メチルニトロソ尿素（methyinitrosourea）（ＭＮＵ）、プロカルバジン（ＰＲＣ）、トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、アクリルアミドモノマー（ＡＡ）、クロラムブシル（ＣＨＬ）、メルファラン（ＭＬＰ）、シクロホスファミド（ＣＰＰ）、硫酸ジエチル（ＤＥＳ）、エチルメタンスルホネート（ＥＭＳ）、メチルメタンスルホネート（ＭＭＳ）、６－メルカプトプリン（６－ＭＰ）、マイトマイシン－Ｃ（ＭＭＣ）、Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン（ＭＮＮＧ）、$^{3}H_{2}O$、およびウレタン（ＵＲ）を含めた任意の変異誘発剤を使用することができる（例えば、Rinchik、１９９１年；Markerら、１９９７年；およびRussell、１９９０年を参照）。追加の変異誘発剤は、iephb.nw.ru/～spirov/hazard/mutagen_lst.に記載されているものを含めて当業者に周知である。

【０４５８】

一部の実施形態では、本開示に記載の１つまたは複数の変異誘発ストラテジーは、目的の変異を、生成し、スクリーニングし、統合するために用いることができる。一部の実施形態では、本開示に記載の遺伝的ツールは、遺伝的多様性を生み出すために使用することができる。例えば、プロモータースワップ方法、ＳＮＰスワップ方法、開始／停止コドンスワップ方法、ターミネータースワップ方法、トランスポゾン変異誘発方法、リボソーム結合部位方法、抗代謝産物選択／発酵産物耐性方法、またはこれらの任意の組合せを、遺伝的多様性を生み出すための他の機会として利用することができる。

【０４５９】

用語「変異誘発させること」は、細胞機能を変更（例えば、標的化変異によって）またはモジュレートすることによって、変異誘発の速度、品質、または程度を増強する方法も包含する。例えば、細胞を変質させ、またはモジュレートすることによって、ＤＮＡ修復、変異誘発物質代謝、変異誘発物質感受性、ゲノム安定性、またはこれらの組合せが機能していない、または欠損しているようにすることができる。よって、通常ゲノム安定性を維持する遺伝子機能の破壊を使用して変異誘発を増強することができる。破壊の代表的な標的としては、これらに限定されないが、ＤＮＡリガーゼＩ（Bentleyら、２００２年）およびカゼインキナーゼＩ（米国特許第６，０６０，２９６号）が挙げられる。

【０４６０】
一部の実施形態では、本開示の切断酵素をコードする核酸を生成するために、部位特異的変異誘発（例えば、トランスフォーマー部位指向変異誘発キット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などの市販キットを使用するプライマー指向変異誘発）を使用して、核酸配列全体にわたって複数の変化をもたらす。
【０４６１】
１種または複数の変異誘発剤に曝露した際の遺伝子改変の頻度は、処置の用量および／または繰り返しを変更することによってモジュレートすることができ、特定の用途に合わせることができる。
【０４６２】
よって、一部の実施形態では、本明細書で使用される「変異誘発」は、エラープローンＰＣＲ変異誘発、オリゴヌクレオチド指向性変異誘発、部位指向変異誘発、トランスポゾン変異誘発、および本明細書に記載の技法のいずれかによる反復的配列組換えを含めて、変異を誘導するためのすべての当技術分野で公知の技法を含む。
【０４６３】
多様性を生成するための単一遺伝子座変異
一部の実施形態では、本開示は、ゲノムＤＮＡの選択された部分を導入し、欠失させ、または置き換えることによって細胞集団を変異させることを教示する。よって、一部の実施形態では、本開示は、特定の遺伝子座に変異を標的化するための方法を教示する。他の実施形態では、本開示は、標的ＤＮＡ領域を選択的に編集するための遺伝子編集技術、例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮＳ、またはＣＲＩＳＰＲの使用を教示する。
【０４６４】
他の実施形態では、本開示は、宿主生物の外で選択されたＤＮＡ領域を変異させ、次いで変異配列を宿主生物内に挿入して戻すことを教示する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、生来のプロモーターまたは合成プロモーターを変異させて、様々な発現性質を有する一連のプロモーターバリアント（以下のプロモーターラダーを参照）を生成することを教示する。他の実施形態では、本開示は、ＰｒｏＳＡＲなどの単一遺伝子最適化技法に適合する（本明細書に参照により組み込まれている、Foxら、２００７年、「Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution.」、Nature Biotechnology、２５巻（３号）、３３８～３４３頁）。
【０４６５】
一部の実施形態では、ＤＮＡの選択された領域は、自然バリアントの遺伝子シャッフリング、または合成オリゴでのシャッフリング、プラスミド－プラスミド組換え、ウイルスプラスミド組換え、ウイルス－ウイルス組換えを介してｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成される。他の実施形態では、ゲノム領域は、エラープローンＰＣＲを介して生成される（例えば、図１を参照）。
【０４６６】
一部の実施形態では、選択された遺伝子領域内で変異を生成するステップは、「リアセンブリーＰＣＲ」によって実践される。簡単に言えば、オリゴヌクレオチドプライマー（オリゴ）が、目的の核酸配列のセグメントをＰＣＲ増幅するために合成され、その結果、オリゴヌクレオチドの配列は、２つのセグメントの接合部と重複する。重複領域は、典型的には、長さが約１０～１００ヌクレオチドである。セグメントのそれぞれは、一連のこのようなプライマーで増幅される。次いでＰＣＲ産物は、アセンブリープロトコールに従って「リアセンブルされる」。簡単に説明すると、アセンブリープロトコールでは、ＰＣＲ産物は、例えば、ゲル電気泳動またはサイズ排除クロマトグラフィーによって最初に精製されてプライマーから離れる。精製産物は、一緒に混合され、追加のプライマーの非存在下で（「セルフプライミング」）、ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオシドトリホスフェート（ｄＮＴＰ）および適切な緩衝塩の存在下で、約１～１０サイクルの変性、リアニーリング、および伸長に供される。遺伝子に隣接するプライマーを用いた後続のＰＣＲが使用されて、完全にリアセンブルおよびシャッフルされた遺伝子の収量が拡大される。

【０４６７】
本開示の一部の実施形態では、上記に論じたものなどの変異ＤＮＡ領域は、変異体配列について富化され、その結果、複数の変異体スペクトル、すなわち、変異の可能な組合せが、より効率的にサンプリングされる。一部の実施形態では、変異配列は、アセンブリー反応の前に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで親和性精製材料を増幅する好適なステップを用いて、ｍｕｔＳタンパク質親和性マトリックスを介して同定される（Wagnerら、Nucleic Acids Res.、２３巻（１９号）：３９４４～３９４８頁（１９９５年）；Suら、Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)、８３巻：５０５７～５０６１頁（１９８６年））。次いでこの増幅された材料は、本願の後の部分に記載されているアセンブリーまたはリアセンブリーＰＣＲ反応にかけられる。
【０４６８】
プロモーターラダー
プロモーターは、遺伝子が転写される速度を調節し、様々なやり方で転写に影響を与えることができる。構成的プロモーターは、例えば、内部または外部の細胞条件にかかわらず、定速でこれらの関連する遺伝子の転写を指示し、一方、調節可能プロモーターは、内部および／または外部の細胞条件、例えば、増殖速度、温度、具体的な環境化学物質に対する応答などに応じて遺伝子が転写される速度を増減する。プロモーターは、これらの正常な細胞コンテクストから単離することができ、操作されて、実質的に任意の遺伝子の発現を調節することができ、細胞増殖、産物収率、および／または目的の他の表現型の有効な改変を可能にする。
【０４６９】
一部の実施形態では、本開示は、下流の遺伝子設計法で使用するためのプロモーターラダーライブラリーを生成するための方法を教示する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、一連の発現強度または優れた調節性質を呈する、１つもしくは複数のプロモーターを同定し、かつ／または宿主細胞内で１つもしくは複数のプロモーターのバリアントを生成する方法を教示する。これらの同定および／または生成されたプロモーターの特定の組合せは、以下でより詳細に説明されるプロモーターラダーとして一緒にグループ化することができる。
【０４７０】
一部の実施形態では、本開示は、プロモーターラダーの使用を教示する。一部の実施形態では、本開示のプロモーターラダーは、連続した範囲の発現プロファイルを呈するプロモーターを含む。例えば、一部の実施形態では、プロモーターラダーは、刺激に応答して、または構成的発現を通じて一連の発現強度を呈する天然の、生来の、または野生型プロモーターを同定することによって創製される（例えば、図１３および図２１～２３を参照）。これらの同定されたプロモーターは、プロモーターラダーとして一緒にグループ化することができる。
【０４７１】
一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも２つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも３つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも４つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも５つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも６つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、異なる発現プロファイルを有する少なくとも７つのプロモーターを含む。
【０４７２】
他の実施形態では、本開示は、異なる条件にわたって一連の発現プロファイルを呈するプロモーターラダーの創製を教示する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、発現ピークが発酵の異なる段階全体にわたって広がったプロモーターのラダーを生み出すことを

教示する（例えば、図２１を参照）。他の実施形態では、本開示は、特異的刺激に応答して異なる発現ピークダイナミクスを有するプロモーターのラダーを生み出すことを教示する（例えば、図２２を参照）。当業者は、本開示の調節プロモーターラダーは、任意の１つまたは複数の調節プロファイルの代表であり得ることを認識する。

【０４７３】

一部の実施形態では、本開示のプロモーターラダーは、応答の連続的な範囲にわたって予測可能な様式で遺伝子発現を撹乱するように設計される。一部の実施形態では、プロモーターラダーの連続的な特質は、株改良プログラムに追加の予測力を付与する。例えば、一部の実施形態では、選択された代謝経路のスワッピングプロモーターまたは終結配列は、非常に最適の発現比またはプロファイルを同定する宿主細胞性能曲線を生成することができ、標的とした遺伝子が特定の反応または遺伝的カスケードにとってもはや制限因子でない一方、不適切な環境下で不要な過剰発現または誤発現も回避する株を生成する。一部の実施形態では、プロモーターラダーは、所望のプロファイルを呈する天然の、生来の、または野生型プロモーターを同定することによって創製される。他の実施形態では、プロモーターラダーは、天然に存在するプロモーターを変異させて複数の変異プロモーター配列を得ることによって創製される。これらの変異プロモーターのそれぞれは、標的遺伝子発現に対する効果について試験される。一部の実施形態では、編集されたプロモーターは、様々な条件にわたって発現活性について試験され、その結果、各プロモーターバリアントの活性が記録され／特徴付けられ／アノテートされ、かつデータベース内に記憶される。結果として生じる編集されたプロモーターバリアントは、引き続いて組織化されて、これらの発現の強度に基づいて配列されたプロモーターラダーにされる（例えば、頂部付近に高度発現バリアントおよび底部付近に減弱された発現を有し、したがって、用語「ラダー」をもたらす）。

【０４７４】

一部の実施形態では、本開示は、同定された天然に存在するプロモーターおよび変異されたバリアントプロモーターの組合せであるプロモーターラダーを教示する。

【０４７５】

一部の実施形態では、本開示は、以下の判定基準：１）構成的プロモーターのラダーを表した；および２）短いＤＮＡ配列、理想的には１００塩基対未満によってコードされ得る、の両方を満たした天然の、生来の、または野生型プロモーターを同定する方法を教示する。一部の実施形態では、本開示の構成的プロモーターは、２つの選択された成長条件（典型的には、工業的な培養中に経験した条件の間で比較した）にわたって一定の遺伝子発現を呈する。一部の実施形態では、本開示のプロモーターは、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、またはそれよりも多くの塩基対のコアプロモーターからなる。一部の実施形態では、５’ＵＴＲがある。一部の実施形態では、５’ＵＴＲは、長さが約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、またはそれよりも多くの塩基対の間である。

【０４７６】

一部の実施形態では、上述の同定した天然に存在するプロモーター配列の１つまたは複数が、遺伝子編集のために選択される。一部の実施形態では、天然のプロモーターは、上述した変異方法のいずれかを介して編集される。他の実施形態では、本開示のプロモーターは、所望の配列を有する新しいプロモーターバリアントを合成することによって編集される。

【０４７７】

２０１５年１２月７日に出願された米国特許出願第６２／２６４，２３２号および２０１６年１２月７日に出願されたＰＣＴ　ＷＯ２０１７／１００３７６の開示全体は、これらのそれぞれは、すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれてい

る。

【０４７８】

本開示のプロモーターの非網羅的なリストを以下の表１に提供する。

【表１－１】

表1.本開示の選択されたプロモーター配列

配列番号	プロモーター名
1	P7160
2	P7253
3	P6681
4	P6316
5	P6806
6	P3159
7	P0757
8	P5011
9	P1409
10	P4735
11	P2900
12	P0801
13	P21
14	PA9
15	PA3
16	PB4
17	PB12
18	PB1
19	PC1
20	P72
21	P-C4-1
22	P-A5-19
23	P-C4-14
24	P-D1-7
25	P1
26	P2
27	P3
28	P3v2
29	P4
30	P4v2
31	P5
32	P5v2
33	P6
34	P7
35	P8
36	P9

【表１－２】

配列番号	プロモーター名
37	PspnA
38	PspnAv2
39	PspnF
40	PspnG
41	PspnQ
42	PspnQv2
43	P21_変異体
44	P1_コア
45	P1(-33)
46	P1+リボスイッチ
47	P21-P1
48	P1-P21
49	P1765
50	P3747
51	P5078
52	P7419
53	P7156 (P3)
54	P7256
55	P1941
56	P3405 (P8)
57	P3407
58	P2428
59	P0927
60	P0889
61	P0186
62	P3702_v2
63	P7156_v2
64	P7256_v2
65	P1765_v2
66	P7539_v2
67	P7276_v2
68	P0941_v2
69	P0889_v2

【０４７９】

一部の実施形態では、本開示のプロモーターは、表１由来のプロモーターと少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、または７５％の配列同一性を呈する。

【０４８０】

ターミネーターラダー

一部の実施形態では、本開示は、ＲＮＡコードエレメントの末端の３’位で１つまたは複数の転写終結配列を提供することによって、遺伝子操作された宿主株を改良する方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、終結配列を付加すると、遺伝子操作された宿主内の選択された遺伝子のＲＮＡ転写の効率が改善されることを教示する。他の実施形態では、本開示は、終結配列を付加すると、遺伝子操作された宿主内の選択された遺伝子のＲＮＡ転写の効率が低減されることを教示する。よって、一部の実施形態では、本開示のターミネーターラダーは、一連の転写効率を呈する一連のターミネーター配列（例えば、１つの弱いターミネーター、１つの平均のターミネーター、および１つの強いプロモーター）を含む。

【０４８１】

転写終結配列は、転写で、オープンリーディングフレームをコードするヌクレオチド配列の下流に配置されたとき、オープンリーディングフレームの転写を終了させる任意のヌクレオチド配列であり得る。このような配列は、当技術分野で公知であり、原核生物、真核生物、またはファージ起源のものであり得る。ターミネーター配列の例としては、これらに限定されないが、ＰＴＨ－ターミネーター、ｐＥＴ－Ｔ７ターミネーター、Ｔ３－Ｔφターミネーター、ｐＢＲ３２２－Ｐ４ターミネーター、水疱性口内炎（vesicular stomatitus）ウイルスターミネーター、ｒｒｎＢ－Ｔ１ターミネーター、ｒｒｎＣターミネーター、ＴＴａｄｃ転写ターミネーター、ならびに酵母認識終結配列、例えば、Ｍａｔα（α－因子）転写ターミネーター、生来のα－因子転写終結配列、ＡＤＲ１転写終結配列、ＡＤＨ２転写終結配列、およびＧＡＰＤ転写終結配列が挙げられる。転写ターミネーター配列の非網羅的なリストは、ｉＧＥＭレジストリにおいて見出すことができ、これは、http://partsregistry.org/Terminators/Catalogで利用可能である。

【０４８２】

一部の実施形態では、転写終結配列は、ポリメラーゼ特異的であっても非特異的であってもよいが、本実施形態において使用するために選択される転写ターミネーターは、選択されたプロモーターとの「機能的組合せ」を形成するべきであり、ターミネーター配列は、プロモーターで開始するＲＮＡポリメラーゼのタイプによって転写を終結することができるべきであることを意味する。例えば、一部の実施形態では、本開示は、真核生物ＲＮＡ　ｐｏｌ　ＩＩプロモーターおよび真核生物ＲＮＡ　ｐｏｌ　ＩＩターミネーター、Ｔ７プロモーターおよびＴ７ターミネーター、Ｔ３プロモーターおよびＴ３ターミネーター、酵母認識プロモーターおよび酵母認識終結配列などは一般に、機能的組合せを形成するはずであることを教示する。使用される転写終結配列の実体（identity）は、転写が所与のプロモーターから終結される効率に基づいて選択することもできる。例えば、異種転写ターミネーター配列は、ＲＮＡコードエレメントの転写的に下流に提供されて、所与のプロモーターから少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の終結効率を達成することができる。

【０４８３】

一部の実施形態では、操作された発現コンストラクトからのＲＮＡ転写の効率は、ＲＮＡコードエレメントの末端の３’位で２つまたはそれ超のヘアピンを含む二次構造を形成する核酸配列を提供することによって改善することができる。特定の理論によって束縛されることを望むことなく、二次構造は、転写伸長複合体を不安定化させ、ポリメラーゼをＤＮＡ鋳型から解離した状態にし、それによって、非機能的配列の非生産的転写を最小限にし、所望のＲＮＡの転写を増大させる。したがって、２つまたはそれ超の隣接するヘアピンを含む二次構造を形成する終結配列を提供することができる。一般に、ヘアピンは、それ自体で折り返してアームが一本鎖ループによって接続されている対を成したステム領域を形成することができるパリンドロームヌクレオチド配列によって形成することができる。一部の実施形態では、終結配列は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ超の隣接するヘアピンを含む。一部の実施形態では、隣接するヘアピンは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５の対を成していないヌクレオチドによって分離されている。一部の実施形態では、ヘアピンステムは、長さが４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、またはそれ超の塩基対を含む。ある特定の実施形態では、ヘアピンステムは、長さが１２～３０塩基対である。ある特定の実施形態では、終結配列は、約９～２５塩基対を含むステム領域を有する２つまたはそれ超の中型のヘアピンを含む。一部の実施形態では、ヘアピンは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドのループ形成領域を含む。一部の実施形態では、ループ形成領域は、４～８ヌクレオチドを含む。特定の理論によって束縛されることを望むことなく、二次構造の安定性は、終結効率と相関し得る

。ヘアピン安定性は、その長さ、それが含有するミスマッチまたはバルジの数、および対を成した領域の塩基組成によって決定される。グアニンとシトシンとの間の対合は、３つの水素結合を有し、２つしか有さないアデニン－チミン対合と比較してより安定である。ヘアピン形成パリンドロームヌクレオチド配列のＧ／Ｃ含有量は、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％またはそれ超であり得る。一部の実施形態では、ヘアピン形成パリンドロームヌクレオチド配列のＧ／Ｃ含有量は、少なくとも８０％である。一部の実施形態では、終結配列は、原核生物、真核生物、またはファージ起源の１つまたは複数の転写ターミネーター配列に由来する。一部の実施形態では、一連の４、５、６、７、８、９、１０またはそれ超のアデニン（Ａ）をコードするヌクレオチド配列が、終結配列の３’に提供される。

【０４８４】

一部の実施形態では、本開示は、一連のタンデム終結配列の使用を教示する。一部の実施形態では、一連の２、３、４、５、６、７、またはそれ超の第１の転写ターミネーター配列を、ｄｓＲＮＡコードエレメントの最終ヌクレオチドの３’に直接、またはｄｓＲＮＡコードエレメントの最終ヌクレオチドの３’に、少なくとも１～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～１，０００、もしくはそれ超のヌクレオチドの距離で配置することができる。タンデム転写ターミネーター配列間のヌクレオチドの数は、様々であり得、例えば、転写ターミネーター配列は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、またはそれ超のヌクレオチドによって分離され得る。一部の実施形態では、転写ターミネーター配列は、構造予測アルゴリズムによって決定されるこれらの予測された二次構造に基づいて選択することができる。構造予測プログラムは、当技術分野で周知であり、例えば、ＣＬＣ　Ｍａｉｎ　Ｗｏｒｋｂｅｎｃｈを含む。

【０４８５】

当業者は、本開示の方法が、任意の終結配列に適合することを認識する。一部の実施形態では、本開示は、アノテートされたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．のターミネーターの使用を教示する。他の実施形態では、本開示は、http://partsregistry.org/Terminators/Catalogで利用可能であるｉＧＥＭレジストリにおいて見出される転写ターミネーター配列の使用を教示する。本開示の転写ターミネーター配列の非網羅的なリストを以下の表２に提供する。

【表２－１】

表 2.本開示の終結配列の非網羅的なリスト。

E. coli			
名称	説明	方向	長さ
BBa_B0010	E. coli rrnB 由来の T1	順方向	80
BBa_B0012	大腸菌ファージ T7 由来の TE	順方向	41
BBa_B0013	大腸菌ファージ T7 由来の TE(+/-)	順方向	47
BBa_B0015	二重ターミネーター(B0010-B0012)	順方向	129

【表２－２】

BBa_B0017	二重ターミネーター(B0010-B0010)	順方向	168
BBa_B0053	ターミネーター(His)	順方向	72
BBa_B0055	--説明なし--		78
BBa_B1002	ターミネーター(人工、小さい、 %T~=85%)	順方向	34
BBa_B1003	ターミネーター(人工、小さい、 %T~=80)	順方向	34
BBa_B1004	ターミネーター(人工、小さい、 %T~=55)	順方向	34
BBa_B1005	ターミネーター(人工、小さい、 %T~=25%	順方向	34
BBa_B1006	ターミネーター(人工、大きい、 %T~>90)	順方向	39
BBa_B1010	ターミネーター(人工、大きい、 %T~<10)	順方向	40
BBa_I11013	バイオブリック部分 BBa_B0015 の修飾		129
BBa_I51003	--説明なし--		110
BBa_J61048	[rnpB-T1]ターミネーター	順方向	113
BBa_K1392970	ターミネーター+Tetr プロモーター+T4 エンドリシン		623
BBa_K1486001	アラビノースプロモーター+ CpxR	順方向	1924
BBa_K1486005	アラビノースプロモーター+ sfGFP-CpxR [Cterm]	順方向	2668
BBa_K1486009	CxpR & Split IFP1.4 [Nterm + Nterm]	順方向	3726
BBa_K780000	Bacillus subtilis のターミネーター		54

【表２－３】

BBa_K864501	T22, P22後期ターミネーター	順方向	42
BBa_K864600	T0 (21 imm)転写ターミネーター	順方向	52
BBa_K864601	ラムダt1転写ターミネーター	順方向	
BBa_B0011	LuxICDABEG (+/-)	双方向性	46
BBa_B0014	二重ターミネーター(B0012-B0011)	双方向性	95
BBa_B0021	LuxICDABEG (+/-)、逆向き	双方向性	46
BBa_B0024	二重ターミネーター(B0012-B0011)、逆向き	双方向性	95
BBa_B0050	ターミネーター(pBR322, +/-)	双方向性	33
BBa_B0051	ターミネーター(yciA/tonA, +/-)	双方向性	35
BBa_B1001	ターミネーター(人工、小さい %T~=90)	双方向性	34
BBa_B1007	ターミネーター(人工、大きい、 %T~=80)	双方向性	40
BBa_B1008	ターミネーター(人工、大きい、 %T~=70)	双方向性	40
BBa_B1009	ターミネーター(人工、大きい、 %T~=40%)	双方向性	40
BBa_K187025	pABにおけるターミネーター、BioBytesプラスミド		60
BBa_K259006	GFP-ターミネーター	双方向性	823
BBa_B0020	ターミネーター(逆方向B0010)	逆方向	82
BBa_B0022	大腸菌ファージT7由来のTE、逆向き	逆方向	41
BBa_B0023	大腸菌ファージT7由来のTE、逆向き	逆方向	47
BBa_B0025	二重ターミネーター(B0015)、逆向き	逆方向	129

【表２－４】

BBa_B0052	ターミネーター(rrnC)	順方向	41
BBa_B0060	ターミネーター(逆方向 B0050)	双方向性	33
BBa_B0061	ターミネーター(逆方向 B0051)	双方向性	35
BBa_B0063	ターミネーター(逆方向 B0053)	逆方向	72
酵母および他の真核生物			
名称	**説明**	**方向**	**長さ**
BBa_J63002	S. cerevisiae 由来の ADH1 ターミネーター	順方向	225
BBa_K110012	STE2 ターミネーター	順方向	123
BBa_K1462070	cyc1		250
BBa_K1486025	ADH1 ターミネーター	順方向	188
BBa_K392003	酵母 ADH1 ターミネーター		129
BBa_K801011	TEF1 酵母ターミネーター		507
BBa_K801012	ADH1 酵母ターミネーター		349
BBa_Y1015	CycE1		252
BBa_J52016	真核生物--SV40 早期ポリ A シグナル配列に由来する	順方向	238
BBa_J63002	S. cerevisiae 由来の ADH1 ターミネーター	順方向	225
BBa_K110012	STE2 ターミネーター	順方向	123
BBa_K1159307	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S ターミネーター		217
BBa_K1462070	cyc1		250

【表２－５】

BBa_K1484215	ノパリン合成酵素ターミネーター		293
BBa_K1486025	ADH1 ターミネーター	順方向	188
BBa_K392003	酵母 ADH1 ターミネーター		129
BBa_K404108	hGH ターミネーター		481
BBa_K404116	hGH_[AAV2]-右-ITR		632
BBa_K678012	SV40 ポリ A、哺乳動物細胞のターミネーター		139
BBa_K678018	hGH ポリ A、哺乳動物細胞のターミネーター		635
BBa_K678019	BGH ポリ A、哺乳動物ターミネーター		233
BBa_K678036	Aspergillus nidulans の trpC ターミネーター		759
BBa_K678037	T1-motni、Aspergillus niger のターミネーター		1006
BBa_K678038	T2-motni、Aspergillus niger のターミネーター		990
BBa_K678039	T3-motni、Aspergillus niger のターミネーター		889
BBa_K801011	TEF1 酵母ターミネーター		507
BBa_K801012	ADH1 酵母ターミネーター		349
BBa_Y1015	CycE1		252

【０４８６】

本開示の追加のターミネーター配列の非網羅的なリストを以下の表３に提供する。ターミネーター配列のそれぞれは、異種ターミネーターまたは異種ターミネーターポリヌクレオチドと呼ぶことができる。

【表３】

表3.本開示の選択されたターミネーター配列

ID	関連遺伝子	配列	源	サイズ (bp)
T1	(伸長因子)	CCCGAACCTTCGGGGGCGGGCCCTCTTGCTTTTCAAT (配列番号 70)	*S. spinosa*	37
T2	(ロイシルアミノペプチダーゼ)	CGGGCAATAATACGTGCCCGGACGGTAGTGCGAGCACGAGGTGGGTACG (配列番号 71)	*S. spinosa*	49
T3	(チトクロムP450ヒドロキシラーゼ)	AGTTTGTCGAACCGGCGGCGTTCGCCGGcTTTACCTTGCGC (配列番号 72)	*S. spinosa*	41
T4	(F0F1 ATPシンターゼサブユニットベータ)	GGTTTCTCGAACCAGTGCTTTGCGTACTGGTTGTCGTTGCAG (配列番号 73)	*S. spinosa*	42
T5	(FAD 連結オキシドレダクターゼ)	CGGAGCCAGAGGGCGCCTGAGTGCCTGTTTTTGATCC (配列番号 74)	*S. erythraea*	37
T6	(ホスホリボシルトランスフェラーゼ)	AAACGCCCCCGGCTCCGGCCGGGGGCgTTTTTGGTTGTG (配列番号 75)	*S. erythraea*	39
T7	(ATP 結合タンパク質)	AGACGCAGGAGGTCTCGTGAGGGGCTTTTCCGCGAGC (配列番号 76)	*S. erythraea*	37
T8	SACE_0757 (50sリボソームタンパク質 L32)	CGTGTGACTTGTCCCACTCGGGGTTTTTGTCGCGA (配列番号 77)	*S. erythraea*	35
T9	(tRNA-Arg)	GGATTCGTCCGGCCGAGGCCAATCGGCTTTTCGGGGCCC (配列番号 78)	*S. erythraea*	39
T11	(lsr2)	GCTTTCGTCGGCCGGGAACGCCCTGGTGTTTCTTACCG (配列番号 79)	*S. erythraea*	38
T12	(AraC)	TTGGGTGGATTCACCCCTACCGGGTGTTTTTCTCGGCT (配列番号 80)	*S. erythraea*	38
NoT	なし	-	-	0

【０４８７】

一部の実施形態では、本開示のターミネーターは、上記表３からのターミネーターと少なくとも１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７９％、７８％、７７％、７６％、または７５％の配列同一性を呈する。

【０４８８】

仮説主導型多様性プールおよびヒルクライミング

本開示は、本開示のＨＴＰゲノム操作方法は、宿主細胞性能の有意な獲得を達成するのに先の遺伝的知識を必要としないことを教示する。実際に、本開示は、ランダム変異誘発、および既存の宿主細胞バリアントの中での遺伝的多様性の同定（例えば、野生型宿主細

胞と工業用バリアントとの間の比較など）を含めたいくつかの機能にとらわれない（functionally agnostic）手法を介して多様性プールを生成する方法を教示する。

【０４８９】

しかし、一部の実施形態では、本開示は、下流のＨＴＰ操作に使用される遺伝的多様性変異を設計する仮説主導方法も教示する。すなわち、一部の実施形態では、本開示は、選択された変異の指向設計を教示する。一部の実施形態では、指向変異は、本開示の操作ライブラリー（例えば、ＳＮＰスワップ、ＰＲＯスワップ、ＳＴＯＰスワップ、トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、リボソーム結合部位多様性ライブラリー、抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリー）中に組み入れられる。

【０４９０】

一部の実施形態では、本開示は、遺伝子アノテーション、仮定された（もしくは確認された）遺伝子機能、またはゲノム内の場所に基づく指向変異の創製を教示する。本開示の多様性プールは、文献において宿主細胞の性能の増大に関連した特異的代謝経路または遺伝経路に関与すると仮定された遺伝子内の変異を含み得る。他の実施形態では、本開示の多様性プールは、宿主性能の改善に関連したオペロン内に存在する遺伝子への変異も含み得る。さらに他の実施形態では、本開示の多様性プールは、アルゴリズムが予測した機能または他の遺伝子アノテーションに基づく遺伝子への変異も含み得る。

【０４９１】

一部の実施形態では、本開示は、仮説主導型変異の標的に優先順位をつけるための「シェル」ベースの手法を教示する。標的優先順位付けのシェルメタファーは、少数の主要遺伝子のみが宿主細胞の性能の特定の態様（例えば、単一生体分子の産生）のほとんどを担うという仮説に基づく。これらの主要遺伝子は、シェルのコアに位置しており、その後、第２の層における二次効果遺伝子、第３のシェルにおける三次効果などが続く。例えば、一実施形態では、シェルのコアは、選択された代謝経路内の極めて重要な生合成酵素（例えば、クエン酸の産生）をコードする遺伝子を含み得る。第２のシェルに位置した遺伝子は、産物転換またはフィードバックシグナル伝達を担う生合成経路内の他の酵素をコードする遺伝子を含み得る。この例示的なメタファー下の第３の段の遺伝子は、生合成経路の発現のモジュレーションまたは宿主細胞内の全般的な炭素フラックスの調節を担う調節遺伝子を含みやすい。

【０４９２】

本開示は、あらゆる同定された変異からの性能獲得を最適化するための「ヒルクライム」法も教示する。一部の実施形態では、本開示は、ＨＴＰ多様性ライブラリー内のランダム、天然の、または仮説主導型変異が、宿主細胞性能に関連した遺伝子の同定をもたらすことができることを教示する。例えば、本方法は、遺伝子コード配列に、またはその付近に位置した１つまたは複数の有益なＳＮＰを同定することができる。この遺伝子は、宿主細胞性能に関連している場合があり、その同定は、生物体のコンビナトリアル遺伝子変異空間における性能「ヒル」の発見に類似し得る。

【０４９３】

一部の実施形態では、本開示は、ＳＮＰ変異において具現化された同定されたヒル周囲のコンビナトリアル空間を探索する方法を教示する。すなわち、一部の実施形態では、本開示は、その遺伝子ノード（すなわち、ヒルクライミング）から得られる性能獲得を最適化するための同定された遺伝子および関連した調節配列の撹乱を教示する。よって、本開示の方法によれば、遺伝子は、ランダム変異誘発から供給された多様性ライブラリー内で最初に同定することができるが、同じ遺伝子内の別の配列の指向変異によって株改良プログラムにおいて使用するために後に改善され得る。

【０４９４】

ヒルクライミングの概念は、単一遺伝子配列を囲繞するコンビナトリアル空間の探索を超えて拡張することもできる。一部の実施形態では、特定の遺伝子内の変異は、宿主細胞性能に対する特定の代謝経路または遺伝経路の重要性を明らかにすることができる。例えば、一部の実施形態では、単一ＲＮＡ分解遺伝子内の変異が有意な宿主性能獲得をもたら

したという発見を、宿主生物から追加の性能獲得を引き出すための手段として関連したＲＮＡ分解遺伝子を変異させるための基礎として使用することができる。当業者は、上記のバリアントが指向遺伝子設計へのシェルおよびヒルクライム手法を記述することを認識する。ハイスループットスクリーニング。

【０４９５】

細胞培養および発酵

本開示の細胞は、任意の所望の生合成反応または選択に適切に改変された慣例的な栄養培地中で培養することができる。一部の実施形態では、本開示は、プロモーターを活性化するための誘導培地中での培養を教示する。一部の実施形態では、本開示は、形質転換体（例えば、抗生物質）の選択剤、または阻害条件（例えば、高エタノール条件）下で増殖させるのに適した生物体の選択を含めた選択剤を含む培地を教示する。一部の実施形態では、本開示は、細胞増殖のために最適化された培地中の増殖細胞培養を教示する。他の実施形態では、本開示は、産物収率のために最適化された培地中の増殖細胞培養を教示する。一部の実施形態では、本開示は、細胞増殖を誘導することができ、最終産物産生に必要な前駆体（例えば、エタノール産生のための高レベルの糖）も含有する培地中の増殖培養を教示する。

【０４９６】

例えば、温度、ｐＨなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともに使用するのに適したものであり、当業者に明らかである。述べたように、多くの参考文献が、細菌、植物、動物（哺乳動物を含む）、および古細菌起源の細胞を含めた多くの細胞の培養および産生に利用可能である。例えば、Sambrook、Ausubel（すべて上記）、ならびにBerger、Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology、１５２巻、Academic Press, Inc.、San Diego、CA；ならびにFreshney（１９９４年）、Culture of Animal Cells、a Manual of Basic Technique、３版、Wiley-Liss、New York、およびそれに引用された参考文献；DoyleおよびGriffiths（１９９７年）、Mammalian Cell Culture:Essential Techniques、John Wiley and Sons、NY；Humason（１９７９年）、Animal Tissue Techniques、４版、W. H. Freeman and Company；ならびにRicciardelleら、（１９８９年）、In Vitro Cell Dev. Biol.、２５巻：１０１６～１０２４頁を参照。これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれている。植物細胞培養および再生について、Payneら（１９９２年）、Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems、John Wiley & Sons, Inc.、New York、N.Y.；GamborgおよびPhillips（編）（１９９５年）、Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual、Springer-Verlag（Berlin Heidelberg N.Y.）；Jones編（１９８４年）、Plant Gene Transfer and Expression Protocols、Humana Press、Totowa、N.J.、ならびにPlant Molecular Biology（１９９３年）、R. R. D. Croy編、Bios Scientific Publishers、Oxford、U.K. ISBN 0 12 198370 6。これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれている。一般に細胞培養培地は、AtlasおよびParks（編）、The Handbook of Microbiological Media（１９９３年）、CRC Press、Boca Raton、Fla.に示されており、これは、参照により本明細書に組み込まれている。細胞培養の追加の情報は、Sigma-Aldrich, Inc（St Louis、Mo.）からのLife Science Research Cell Culture Catalogue（「Sigma-LSRCCC」）、および例えば、やはりSigma-Aldrich, Inc（St Louis、Mo.）からのThe Plant Culture Catalogue and supplement（「Sigma-PCCS」）などの入手可能な市販の文献に見出され、これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれている。

【０４９７】

使用される培養培地は、適当な様式で、それぞれの株の要求を満たさなければならない。様々な微生物の培養培地の記載は、American Society for Bacteriologyの「Manual of Methods for General Bacteriology」（Washington D.C.、USA、１９８１年）に存在する。

【０４９８】
本開示は、目的の産物を発酵調製するためのプロセスであって、ａ）適当な培地中で本開示による微生物を培養し、発酵ブロスをもたらすステップと；ｂ）ａ）の発酵ブロス中、かつ／または微生物の細胞内で目的の産物を濃縮するステップとを含む、プロセスをさらに提供する。
【０４９９】
一部の実施形態では、本開示は、生成される微生物を、所望の有機－化学化合物を産生させる目的で、例えば、ＷＯ０５／０２１７７２に記載されているように連続的に、あるいはバッチプロセス（バッチ培養）またはフェドバッチもしくは繰り返しフェドバッチプロセスで不連続に培養することができることを教示する。公知の培養方法についての全般的な特質の概要は、Chmiel（Bioprozesstechnik. 1: Einfuehrung in die Bioverfahrenstechnik（Gustav Fischer Verlag、Stuttgart、１９９１年））による教科書、またはStorhas（Bioreaktoren and periphere Einrichtungen（Vieweg Verlag、Braunschweig/Wiesbaden、１９９４年））による教科書において入手可能である。
【０５００】
一部の実施形態では、本開示の細胞は、バッチまたは連続発酵条件下で増殖される。
【０５０１】
古典的なバッチ発酵は、クローズドシステムであり、培地の組成は、発酵の開始時に設定され、発酵中に人為的な変更に供されない。バッチシステムの変形は、フェドバッチ発酵であり、これは、本開示においても使用を見出す。この変形では、基質は、発酵が進行するにつれて徐々に添加される。フェドバッチシステムは、異化産物抑制が細胞の代謝を阻害する可能性がある、および培地中の基質の量が限定されていることが望ましい場合、有用である。バッチ発酵およびフェドバッチ発酵は、一般的であり、当技術分野で周知である。
【０５０２】
連続発酵は、目的の所望の生体分子産物を処理および回収するために、規定された発酵培地がバイオリアクターに連続的に添加され、等量の馴化培地が同時に除去されるシステムである。一部の実施形態では、連続発酵は一般に、一定の高密度で培養物を維持し、この場合、細胞は、主に、対数期増殖にある。一部の実施形態では、連続発酵は一般に、静止または後期対数／静止期増殖で培養物を維持する。連続発酵システムは、定常状態増殖条件を維持しようと努める。
【０５０３】
連続発酵プロセスのための栄養分および成長因子をモジュレートするための方法、ならびに産物形成の速度を最大化するための技法は、工業微生物学の技術分野で周知である。
【０５０４】
例えば、本開示の培養のための炭素源の限定されないリストとしては、糖および炭水化物、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、糖蜜、サトウダイコンまたはサトウキビ加工からのスクロース含有溶液、デンプン、デンプン加水分解物、およびセルロースなど；油脂、例えば、ダイズ油、ヒマワリ油、落花生油、およびココナツ脂肪など；脂肪酸、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、およびリノール酸など；アルコール、例えば、グリセロール、メタノール、およびエタノールなど；ならびに有機酸、例えば、酢酸または乳酸などが挙げられる。
【０５０５】
本開示の培養のための窒素源の限定されないリストとしては、有機窒素含有化合物、例えば、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、トウモロコシ浸出液、ダイズ粉、および尿素；または無機化合物、例えば、硫酸アンモニウム、アンモニウムクロリド、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、および硝酸アンモニウムが挙げられる。窒素源は、個々に、または混合物として使用され得る。
【０５０６】
本開示の培養のための可能なリン源の限定されないリストとしては、リン酸、リン酸二

水素カリウムもしくはリン酸水素二カリウム、または対応するナトリウム含有塩が挙げられる。

【０５０７】

培養培地は、例えば、金属、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、および鉄などの塩化物または硫酸塩、例えば、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄などの形態で塩をさらに含み得、これらは、増殖に必要である。

【０５０８】

最後に、アミノ酸などの必須の成長因子、例えば、ホモセリンおよびビタミン、例えば、チアミン、ビオチン、またはパントテン酸を、上述した物質に加えて使用することができる。

【０５０９】

一部の実施形態では、培養物のｐＨは、これらに限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、もしくはアンモニア水を含めた任意の酸もしくは塩基または緩衝塩；あるいは適当な様式でのリン酸または硫酸などの酸性化合物によって制御することができる。一部の実施形態では、ｐＨは一般に、６．０～８．５、好ましくは６．５～８の値に調整される。

【０５１０】

一部の実施形態では、本開示の培養物は、例えば、脂肪酸ポリグリコールエステルなどの消泡剤を含み得る。一部の実施形態では、本開示の培養物は、例えば、抗生物質などの適当な選択物質を添加することによって、培養物のプラスミドを安定化するように改変される。

【０５１１】

一部の実施形態では、培養は、好気性条件下で実行される。これらの条件を維持するために、酸素または酸素含有気体混合物、例えば、空気などが、培養物に導入される。過酸化水素を富化させた液体を使用することが同様に可能である。発酵は、適切な場合、高圧で、例えば、０．０３～０．２ＭＰａの高圧で実行される。培養物の温度は、通常２０℃～４５℃、好ましくは２５℃～４０℃、特に好ましくは３０℃～３７℃である。バッチプロセスまたはフェドバッチプロセスでは、培養は、好ましくは、回収されるのに十分な目的の所望の産物（例えば、有機－化学化合物）の量が形成されるまで継続される。この目的は通常、１０時間～１６０時間以内に達成することができる。連続プロセスでは、より長い培養時間が可能である。微生物の活動により、発酵培地中で、かつ／または前記微生物の細胞内で目的の産物が濃縮（蓄積）される。

【０５１２】

一部の実施形態では、培養は、嫌気性条件下で実行される。

【０５１３】

スクリーニング

一部の実施形態では、本開示は、ハイスループット初期スクリーニングを教示する。他の実施形態では、本開示は、性能データのロバストなタンクベースの検証も教示する（図６Ｂを参照）。

【０５１４】

一部の実施形態では、ハイスループットスクリーニングプロセスが、バイオリアクター内の株の性能を予測するのに設計される。先に記載した通り、培養条件は、生物体に適しており、バイオリアクター条件を反映しているように選択される。個々のコロニーが精選され、９６ウェルプレート中に移され、適当な量の時間にわたってインキュベートされる。細胞は、追加のシード培養のために新しい９６ウェルプレートに、または産生培養に引き続いて移される。培養物は、様々な長さの時間にわたってインキュベートされ、この場合、複数の測定を行うことができる。これらは、産物、バイオマス、またはバイオリアクター内の株の性能を予測する他の特性の測定を含み得る。ハイスループット培養結果は、バイオリアクター性能を予測するのに使用される。

【０５１５】

一部の実施形態では、タンクベースの性能検証が使用されて、ハイスループットスクリーニングによって単離された株の性能が確認される。候補株は、生産性または収率などの関連した株性能特性について、ベンチスケール発酵反応器を使用してスクリーニングされる。

【０５１６】

産物回収および定量

目的の産物の産生についてスクリーニングするための方法は、当業者に公知であり、本明細書全体にわたって論じられている。このような方法は、本開示の株をスクリーニングするとき使用することができる。

【０５１７】

一部の実施形態では、本開示は、非分泌型細胞内産物を産生するように設計された株を改善する方法を教示する。例えば、本開示は、細胞内酵素、油、医薬品、または他の貴重な低分子もしくはペプチドを産生する細胞培養物のロバスト性、収率、効率、または全体的な望ましさを改善する方法を教示する。非分泌型細胞内産物の回収または単離は、本明細書に記載のものを含めて当技術分野で周知である溶解技法および回収技法によって達成することができる。

【０５１８】

例えば、一部の実施形態では、本開示の細胞は、遠心分離、濾過、沈殿、または他の方法によって回収することができる。次いで回収された細胞は、当業者に周知である凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、もしくは細胞溶解剤の使用、または他の方法を含めた任意の好都合な方法によって破壊される。

【０５１９】

結果として生じる目的の産物、例えば、ポリペプチドは、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって回収／単離および任意選択で精製することができる。例えば、産物ポリペプチドは、これらに限定されないが、遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、疎水性相互作用、クロマトフォーカシング、およびサイズ排除）、または沈降を含めた慣例的な手順によって栄養培地から単離することができる。最後に、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を、最終精製ステップで使用することができる。（例えば、ともに参照により本明細書に組み込まれている、Parryら、２００１年、Biochem. J.、３５３巻：１１７頁、およびHongら、２００７年、Appl. Microbiol. Biotechnol.、７３巻：１３３１頁に記載の細胞内タンパク質の精製を参照）。

【０５２０】

上述した参考文献に加えて、様々な精製方法は、例えば、Sandana（１９９７年）、Bioseparation of Proteins、Academic Press, Inc.；Bollagら（１９９６年）、Protein Methods、２版、Wiley-Liss、NY；Walker（１９９６年）、The Protein Protocols Handbook、Humana Press、NJ；HarrisおよびAngal（１９９０年）、Protein Purification Applications: A Practical Approach、IRL Press at Oxford、Oxford、England；HarrisおよびAngal Protein Purification Methods:A Practical Approach、IRL Press at Oxford、Oxford、England；Scopes（１９９３年）、Protein Purification: Principles and Practice、３版、Springer Verlag、NY；JansonおよびRyden（１９９８年）、Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications、２版、Wiley-VCH、NY；ならびにWalker（１９９８年）、Protein Protocols on CD-ROM、Humana Press、NJに示されたものを含めて、当技術分野で周知である。これらの文献のすべては、参照により本明細書に組み込まれている。

【０５２１】

一部の実施形態では、本開示は、分泌産物を産生させるように設計された株を改良する方法を教示する。例えば、本開示は、貴重な低分子またはペプチドを産生する細胞培養物のロバスト性、収率、効率、または全体的な望ましさを改善する方法を教示する。

【０５２２】
一部の実施形態では、免疫学的方法は、本開示の細胞によって産生される分泌型または非分泌型産物を検出および／または精製するのに使用することができる。一例示的手法では、従来の方法を使用して産物分子に対して（例えば、インスリンポリペプチドまたはその免疫原性断片に対して）産生される抗体は、ビーズ上に固定化され、エンドグルカナーゼが結合している条件下で細胞培養培地と混合され、沈降される。一部の実施形態では、本開示は、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）の使用を教示する。
【０５２３】
他の関連した実施形態では、米国特許第５，５９１，６４５号、米国特許第４，８５５，２４０号、米国特許第４，４３５，５０４号、米国特許第４，９８０，２９８号、およびSe-Hwan Paekら、「Development of rapid One-Step Immunochromatographic assay, Methods」、２２巻、５３～６０頁、２０００年）に開示された免疫クロマトグラフィーが使用される。これらの文献のそれぞれは、本明細書に参照により組み込まれている。一般的な免疫クロマトグラフィーは、２つの抗体を使用することによって検体を検出する。第１の抗体は、試験溶液中に、または試験溶液が滴下される、多孔質膜から作製されたおよそ矩形状をした試験片の末端の部分に存在する。この抗体は、ラテックス粒子または金コロイド粒子で標識される（この抗体は、以下で標識抗体と呼ばれる）。滴下された試験溶液が検出されるべき検体を含むとき、標識抗体は、検体を認識して検体と結合する。検体と標識抗体との複合体は、アブソーバーに向けて毛管現象によって流れ、このアブソーバーは、濾紙から作製され、標識抗体を含んだ末端と反対の末端に結合している。流れている間に、検体と標識抗体との複合体は、多孔質膜の中間に存在している第２の抗体（これは、以下でタッピング抗体（tapping antibody）と呼ばれる）によって認識および捕捉され、この結果として、複合体は、可視シグナルとして多孔質膜上の検出部分に現れ、検出される。
【０５２４】
一部の実施形態では、本開示のスクリーニング方法は、測光検出技法（吸収、蛍光）に基づく。例えば、一部の実施形態では、検出は、抗体に結合したＧＦＰなどのフルオロフォア検出剤の存在に基づき得る。他の実施形態では、測光検出は、細胞培養からの所望の産物の蓄積に基づき得る。一部の実施形態では、産物は、培養物または前記培養物からの抽出物のＵＶを介して検出可能であり得る。
【０５２５】
当業者は、本開示の方法が、目的の任意の望ましい生体分子産物を産生する宿主細胞に適合することを認識する。以下の表４は、本開示の範囲内に含まれる産物カテゴリー、生体分子、および宿主細胞の限定されないリストを提示する。これらの例は、例示的な目的で提供されており、決して本開示の技術の適用性を限定するように意味していない。

【表４－１】

表 4.-本開示の目的の宿主細胞および産物の限定されないリスト。

産物カテゴリー	産物	宿主カテゴリー	宿主
アミノ酸	リシン	細菌	*Corynebacterium glutamicum*
アミノ酸	メチオニン	細菌	*Escherichia coli*
アミノ酸	MSG	細菌	*Corynebacterium glutamicum*
アミノ酸	トレオニン	細菌	*Escherichia coli*

【表４－２】

産物カテゴリー	産物	宿主カテゴリー	宿主
アミノ酸	トレオニン	細菌	*Corynebacterium glutamicum*
アミノ酸	トリプトファン	細菌	*Corynebacterium glutamicum*
酵素	酵素(11)	糸状菌	*Trichoderma reesei*
酵素	酵素(11)	真菌	*Myceliopthora thermophila (C1)*
酵素	酵素(11)	糸状菌	*Aspergillus oryzae*
酵素	酵素(11)	糸状菌	*Aspergillus niger*
酵素	酵素(11)	細菌	*Bacillus subtilis*
酵素	酵素(11)	細菌	*Bacillus licheniformis*
酵素	酵素(11)	細菌	*Bacillus clausii*
香味&芳香	アガーウッド	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	アンブロックス	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	ヌートカトン	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	パチュリ油	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*

【表４－３】

産物カテゴリー	産物	宿主カテゴリー	宿主
香味&芳香	サフラン	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	ビャクダン油	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	バレンセン	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
香味&芳香	バニリン	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
食品	CoQ10/ユビキノール	酵母	*Schizosaccharomyces pombe*
食品	オメガ３脂肪酸	微細藻類	*Schizochytrium*
食品	オメガ６脂肪酸	微細藻類	*Schizochytrium*
食品	ビタミンB12	細菌	*Propionibacterium freudenreichii*
食品	ビタミンB2	糸状菌	*Ashbya gossypii*
食品	ビタミンB2	細菌	*Bacillus subtilis*
食品	エリスリトール	酵母様真菌	*Torula coralline*
食品	エリスリトール	酵母様真菌	*Pseudozyma tsukubaensis*

【表４－４】

産物カテゴリー	産物	宿主カテゴリー	宿主
食品	エリスリトール	酵母様真菌	*Moniliella pollinis*
食品	ステビオールグリコシド	酵母	*Saccharomyces cerevisiae*
親水コロイド	ジウタンガム	細菌	*Sphingomonas sp*
親水コロイド	ゲランガム	細菌	*Sphingomonas elodea*
親水コロイド	キサンタンガム	細菌	*Xanthomonas campestris*
中間体	1,3-PDO	細菌	*Escherichia coli*
中間体	1,4-BDO	細菌	*Escherichia coli*
中間体	ブタジエン	細菌	*Cupriavidus necator*
中間体	n-ブタノール	細菌（偏性嫌気性菌）	*Clostridium acetobutylicum*
有機酸	クエン酸	糸状菌	*Aspergillus niger*
有機酸	クエン酸	酵母	*Pichia guilliermondii*
有機酸	グルコン酸	糸状菌	*Aspergillus niger*
有機酸	イタコン酸	糸状菌	*Aspergillus terreus*
有機酸	乳酸	細菌	*Lactobacillus*

【表４－５】

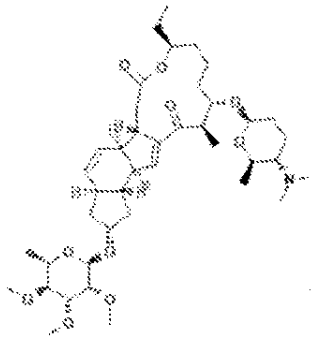
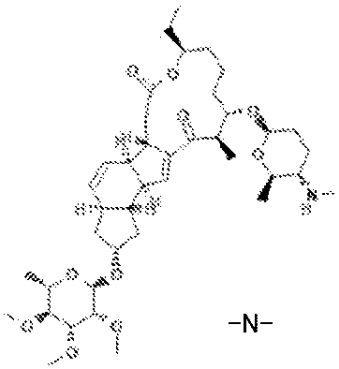
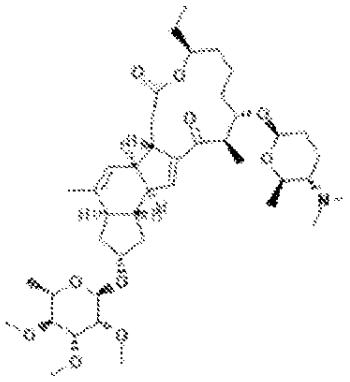
産物カテゴリー	産物	宿主カテゴリー	宿主
有機酸	乳酸	細菌	*Geobacillus thermoglucosidasius*
有機酸	LCDAs - DDDA	酵母	*Candida*
ポリケチド/Ag	スピノサド	細菌	*Saccharopolyspora spinosa*
ポリケチド/Ag	スピネトラム	細菌	*Saccharopolyspora spinosa*
イソフラボン	ゲニステイン	細菌	*Saccharopolyspora erythraea*
酵素	コリンオキシダーゼ	細菌	*Streptomyces, Thermoactinomyces* または *Saccharopolyspora*
医薬組成物	クマミジン化合物	細菌	*Saccharopolyspora sp.*
線形動物の幼虫発生の阻害剤	イベルメクチンアグリコン	細菌	*Saccharopolyspora erythraea*
酵素の阻害剤	HMG-CoA 還元酵素阻害剤	細菌	*Saccharopolyspora sp.*
有機酸	カルボン酸異性体	細菌	*Saccharopolyspora hirsuta*
抗生物質	エリスロマイシン	細菌	*Saccharopolyspora erythraea*

【０５２６】

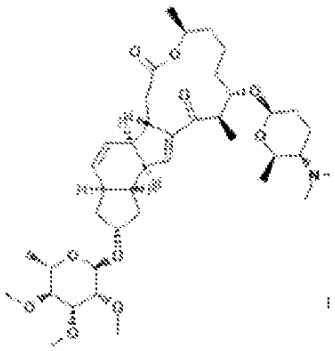
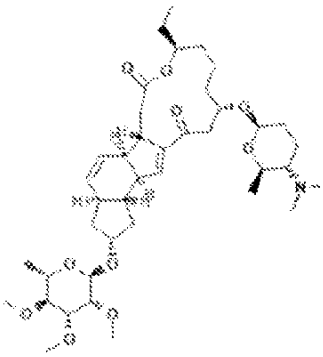
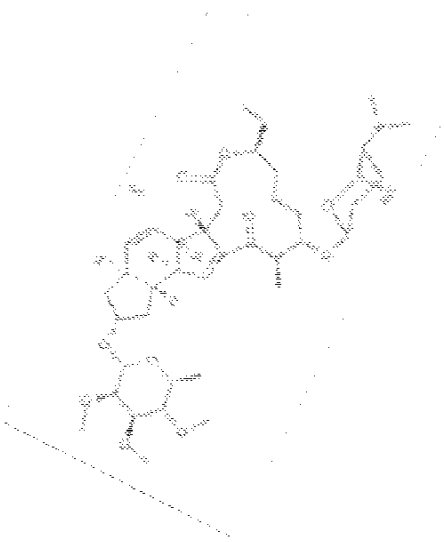
一部の実施形態では、宿主細胞はＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．である。一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ株である。Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．で産生される目的の産物を以下の表４．１に提供する。

【表４．１－１】

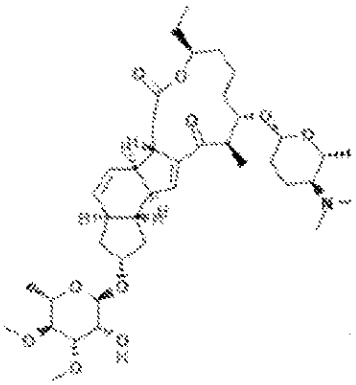
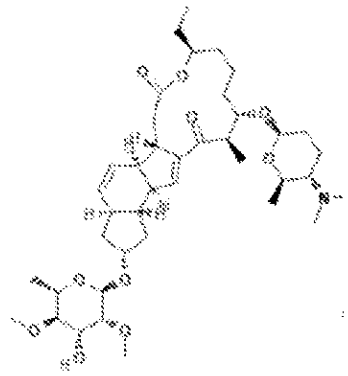
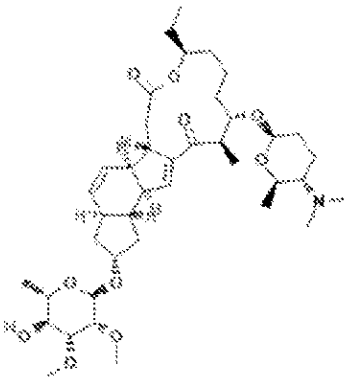
表4.1　本開示の*Saccharopolyspora spp.*における目的の産物の限定されないリスト

産物名	構造
スピノシン A	
スピノシン B	
スピノシン C	4″-ジ -N-デメチル−スピノシン A
スピノシン D	

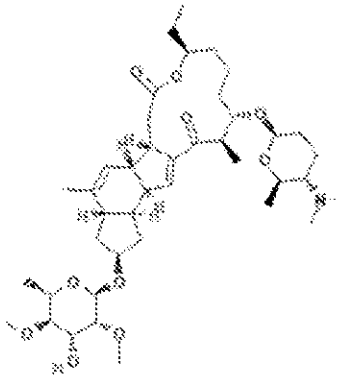
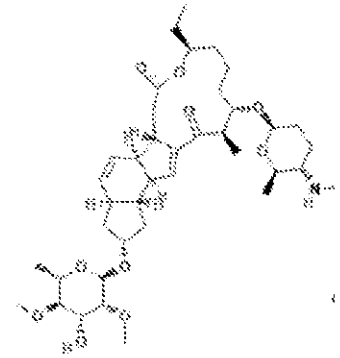
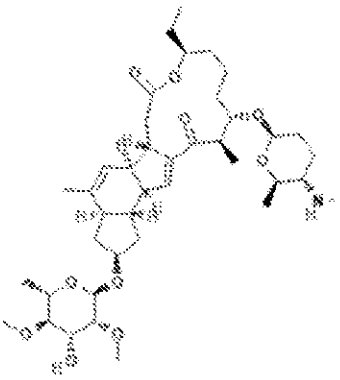
【表４．１－２】

産物名	構造
スピノシンＥ	
スピノシンＦ	
スピノシンＧ	

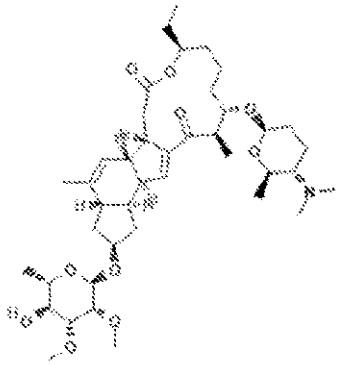
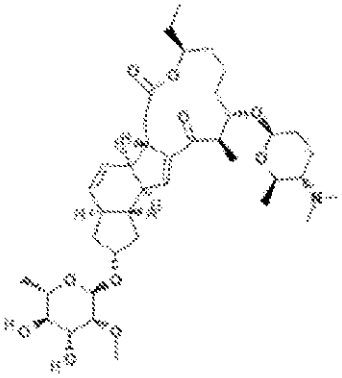
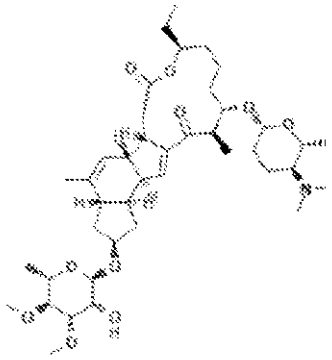
【表４．１－３】

産物名	構造
スピノシンH	
スピノシンI	なし
スピノシンJ	
スピノシンK	

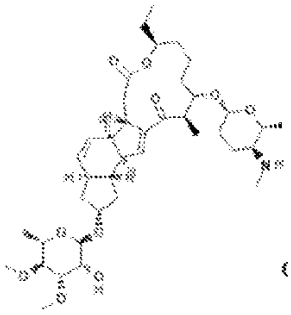
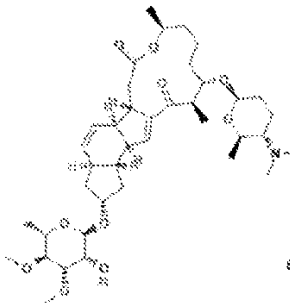
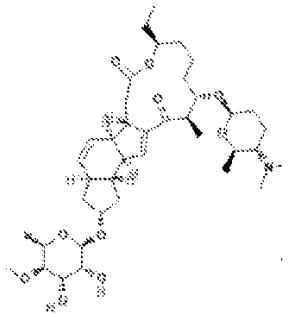
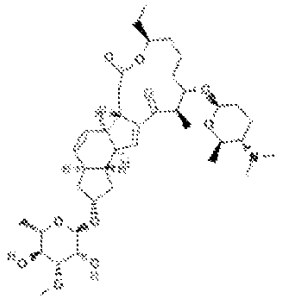
【表４．１－４】

産物名	構造
スピノシンＬ	
スピノシンＭ	
スピノシンＮ	

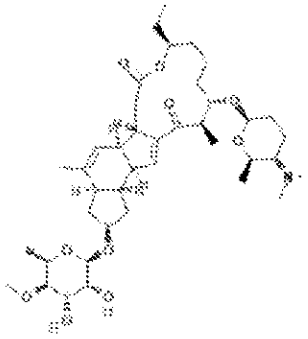
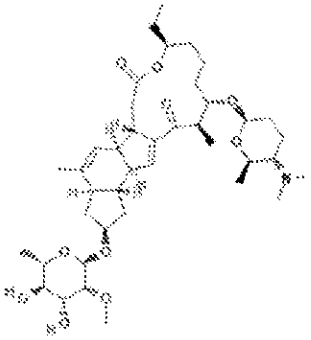
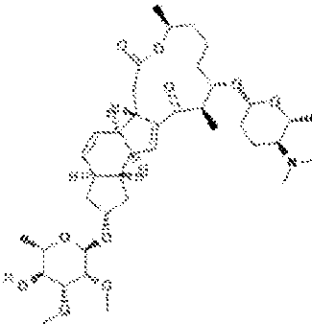
【表４．１－５】

産物名	構造
スピノシンＯ	
スピノシンＰ	
スピノシンＱ	

【表４．１－６】

産物名	構造
スピノシンR	
スピノシンS	
スピノシンT	
スピノシンU	

【表４．１－７】

産物名	構造
スピノシンＶ	
スピノシンＷ	
スピノシンＸ	なし
スピノシンＹ	

【０５２７】

スピノシンは、２種のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａの発酵から産生する前例のない化合物の大きなファミリーである。これらのコア構造は、２つのサッカライドが付加されたポリケチド由来四環式マクロライドである。これらは、作物および他の植物に広範囲の損害を引き起こす多くの商業的に重大な種に対する強力な殺虫活性を示す。これらは、家畜、コンパニオンアニマルおよびヒトの重要な外部寄生虫に対する活性も示す。Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａｄは、２つの主要な発酵因子であるスピノシンＡおよびＤの規定された組合せである。スピノシンＡおよびスピノシンＤの両方は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａについての２つの最も豊富な発酵成分である。構造－活性相関（ＳＡＲ）が広く研究されており、半合成の第二世代の誘導体であるスピネトラムの開発をもたらした（Kirst、The Journal of Antibiotics（２０１０年）６３巻、１０１～１１１頁）。様々なスピノシン発酵に由来する多数の構造的に関連する化合物が、現在、単離および同定されている。これらの構造は、スピノシンＡのアグリコンまたはサッカライドにおける単一タイプの変化のいくつかの一般的なカテゴリーに分類される。一部の因子は、スピノシンＡに対してＣ－メチル

基の１つの付加または１つの消失のいずれかを有し、これは、ポリケチドフレームワークの形成の間の適切な時間で、アセテートおよびプロピオネートの交換によって生合成的に生じ得る。スピノシンＤ（６－メチル－スピノシンＡ）に加えて、他の単一のＣ－メチル修飾因子としては、スピノシンＥ（１６－デメチル－スピノシンＡ）およびスピノシンＦ（２２－デメチル－スピノシンＡ）が挙げられる。２つのサッカライドの修飾としては、スピノシンＨ（２’－Ｏ－デメチル－スピノシンＡ）、スピノシンＪ（３’－Ｏ－デメチル－スピノシンＡ）、スピノシンＢ（４’’－Ｎ－デメチル－スピノシンＡ）およびスピノシンＣ（４’’－ジ－Ｎ－デメチル－スピノシンＡ）が挙げられる。別の構造変化は、Ｌ－オッサミンなどの異なるサッカライドによる、アミノ糖のＤ－ホロサミンの置き換えである（スピノシンＧ）。近年、スピノサド生合成経路はより正確に明らかになっている：タイプＩポリケチドシンターゼの原因であるｓｐｎＡ、ｓｐｎＢ、ｓｐｎＣ、ｓｐｎＤおよびｓｐｎＥ；ポリケチドシンターゼ産物を修飾するためのｓｐｎＦ、ｓｐｎＪ、ｓｐｎＬおよびｓｐｎＭ（Kimら、「Enzyme-catalysed 4+ 2 cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A」、Nature.、２０１１年、４７３巻：１０９～１１２頁）；ラムノース結合およびメチル化のためのｓｐｎＧ、ｓｐｎＨ、ｓｐｎＩおよびｓｐｎＫ（Kimら、「Biosynthesis of spinosyn in Saccharopolyspora spinosa: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of SpnH, SpnI and SpnK」、Ｊ Am Chem Soc.、２０１０年、１３２巻：２９０１～２９０３頁）；ホロサミン生合成のためのｓｐｎＰ、ｓｐｎＯ、ｓｐｎＮ、ｓｐｎＱ、ｓｐｎＲおよびｓｐｎＳ；ラムノース生合成のためのｇｔｔ、ｇｄｈ、ｅｐｉおよびｋｒｅ（Madduriら、「Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in Saccharopolyspora spinosa」、Ｊ Bacteriol.、２００１年、１８３巻：５６３２～５６３８頁）、ならびにスピノサド遺伝子クラスターの４つの遺伝子の他に、ＯＲＦ－Ｌ１６、ＯＲＦ－Ｒ１およびＯＲＦ－Ｒ２は、スピノサド生合成に対する効果を有さない。これらの遺伝子は、本明細書に記載の遺伝子操作方法の潜在的な標的の中である。スピノシン合成に関与する追加の遺伝子は、米国特許第７，６２６，０１０号、同第８，６２４，００９号に記載されており、すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０５２８】

スピネトラムは、化学的に修飾されたスピノシンＪ／Ｌの混合物である。混合物は、２つの主な因子の３’－Ｏ－エチル－５，６－ジヒドロスピノシンＪおよび３’Ｏ－エチルスピノシンＬを含む。スピネトラムはより広いスペクトルを有し、スピノサドと比較してより強力であり、野外における残効性が改善されている。スピネトラムの創製は、分子設計が、パターンを認識するための哺乳動物の脳における神経連絡を模倣するソフトウェアを用いる人工神経ネットワーク（ＡＮＮ）に基づくストラテジーの結果であり、提案された分子修飾の活性を推定するために使用することができる。したがって、ラムノース部分におけるある特定のアルキル置換パターン、特に、２’，３’，４’－トリ－Ｏ－エチルスピノシンＡ類似体が有望な修飾を表すことが見出された。さらに、ラムノース－３’－Ｏ－エチル化が２’－または４’－Ｏ－エチル化に対する活性の増強に主な寄与体を表すことを示した。最終的に、スピネトラムが創製された（Sparksら、２００８年、Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram.、Ｊ Comput Aid Mol Des、２２巻：３９３～４０１頁、doi:10.1007/s10822-008-9205-8）。

【０５２９】

一部の実施形態では、目的の産物はスピノサドである。スピノサドは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの発酵によって得られた天然産物のファミリーに由来する新規の作用機序の殺虫剤である。スピノシンは、２０を超える天然形態を生じ、２００を超える合成形態（スピノソイド）が研究室で生成されている（Watson、Gerald（２００１年５月３１日）、「Actions of Insecticidal Spinosyns on gama-Aminobutyric Acid Responses for Small-Diameter Cockroach Neurons」、Pesticide Biochemistry and Physiology、７１巻：２０～２８頁、その全体が参照により組み込まれている）。スピノサドは

、おおよそ１７：３の比で、２つのスピノシド、主な成分のスピノシンＡおよびスピノシンＤ（少量の成分）のミックスを含有する。

【０５３０】

一部の実施形態では、変異Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株についてスクリーニングするために使用することができる分子としては、これらに限定されないが、１）スピノシン合成経路に関与する分子（例えば、スピノシン）；２）ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する分子（例えば、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）またはノルロイシン）；３）リシン産生経路に関与する分子（例えば、チアリシンまたはアルファ－ケトビタレート（ketobytarate）およびアスパルテートヒドキシメート（aspartate hydoxymate）の混合物）；４）トリプトファン経路に関与する分子（例えば、アザセリンまたは５－フオロインドール（fuoroindole））；５）トレオニン経路に関与する分子（例えば、ベーター－ヒドロキシノルバリン）；６）アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する分子（例えば、セルレニン）；７）デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子（例えば、プリンまたはピリミジン類似体）が挙げられる。

【０５３１】

一部の実施形態では、スクリーニングのために使用されるスピノシンの濃度は、約１０μｇ／ｍｌ、２０μｇ／ｍｌ、３０μｇ／ｍｌ、４０μｇ／ｍｌ、５０μｇ／ｍｌ、６０μｇ／ｍｌ、７０μｇ／ｍｌ、８０μｇ／ｍｌ、９０μｇ／ｍｌ、１００μｇ／ｍｌ、２００μｇ／ｍｌ、３００μｇ／ｍｌ、４００μｇ／ｍｌ、５００μｇ／ｍｌ、６００μｇ／ｍｌ、７００μｇ／ｍｌ、８００μｇ／ｍｌ、９００μｇ／ｍｌ、１ｍｇ／ｍｌ、２ｍｇ／ｍｌ、３ｍｇ／ｍｌ、４ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、６ｍｇ／ｍｌ、７ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ、９ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、またはそれよりも高い。

【０５３２】

一部の実施形態では、スクリーニングのために使用されるａＭＭの濃度は、約０．１ｍＭ、０．２ｍＭ、０．３ｍＭ、０．４ｍＭ、０．５ｍＭ、０．６ｍＭ、０．７ｍＭ、０．８ｍＭ、０．９ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、またはそれよりも高い。

【０５３３】

一部の実施形態では、スクリーニングのために使用される分子の正確な濃度は、使用される株に応じて、経験的に決定され得る。一般に、基準株は、操作された株よりも感受性が高い。

【０５３４】

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．のための遺伝的ツール、リソース、組成物、方法および株は、米国特許第６９６０４５３号、同第６２７０７６８号、同第５６３１１５５号、同第５６７０３６４号、同第５５５４５１９号、同第５１８７０８８号、同第５２０２２４２号、同第６６１６９５３号、同第５１７１７４０号、同第６４２０１７７号、同第８６２４００９号、同第７６２６０１０号、同第５１２４２５８号、同第５３６２６３４号、同第６０４３０６４号、同第４２９３６５１号、同第４３８９４８６号、同第６６２７４２７号、同第５６６３０６７号、同第５０８１０２３号、同第６７８０６３３号、同第６００４７８７号、同第６３６５３９９号、同第５８０１０３２号、同第８７４１６０３号、同第４３２８３０７号、同第４４２５４３０号、同第７０２２５２６号、同第５２３４８２８号、同第５７８６１８１号、同第５１５３１２８号、同第８８４１０９２号、同第４２５１５１１号、同第９３０９５２４号、同第６４３７１５１号、同第５９０８７６４号、同第８９１１９７０号、同第５８２４５１３号、同第６５２４８４１号、同第７１９８９２２号、同第６２００８１３号、同第９３３４５１４号、同第５４９６９３１号、同第７６３０８３６号、同第５１９８３６０号、同第６７１０１８９号、同第６２５１６３６号、同第７８０７４１８号、同第６７８０６２０号、同第６５００９６０号および同第７４５９２９４号に見出すことができる。これらのそれぞれは、すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０５３５】

選択判定基準および目標

本開示の方法に適用される選択判定基準は、株改良プログラムの具体的な目標によって変動する。本開示は、任意のプログラム目標を満たすように適応させることができる。例えば、一部の実施形態では、プログラム目標は、差し迫った期限を伴わずに反応の単一バッチ収率を最大化することであり得る。他の実施形態では、プログラム目標は、生合成収率をリバランスして、特異的な産物を産生させ、または特定の比の産物を産生させることであり得る。他の実施形態では、プログラム目標は、産物の化学構造を改変すること、例えば、ポリマーの炭素鎖を長くすることであり得る。一部の実施形態では、プログラム目標は、性能特性、例えば、収率、力価、生産性、副生成物排除、プロセスエクスカーションに対する寛容性、最適な増殖温度、および増殖速度を改善することであり得る。一部の実施形態では、プログラム目標は、微生物によって産生される目的の産物の体積生産性、比生産性、収率、または力価によって測定した宿主性能の改善である。

【０５３６】

他の実施形態では、プログラム目標は、入力量当たりの最終産物収率（例えば、スクロース１ポンド当たりに産生されるエタノールの合計量）の観点から市販の株の合成効率を最適化することであり得る。他の実施形態では、プログラム目標は、例えば、バッチ完了率、または連続培養システムにおける歩留まり率の観点から測定した、合成速度を最適化することであり得る。他の実施形態では、プログラム目標は、特定のファージに対する株の耐性を増大させること、またはさもなければ培養条件下で株の活力／ロバスト性を増大させることであり得る。

【０５３７】

一部の実施形態では、株改良プロジェクトは、１つを超える目標を対象とする場合がある。一部の実施形態では、株プロジェクトの目標は、品質、信頼性、または全体的な収益性次第であり得る。一部の実施形態では、本開示は、上述した株性質の１つまたは複数を有する関連した選択された変異または変異の群の方法を教示する。

【０５３８】

当業者は、特定のプロジェクト目標を満たすように株選択判定基準をどのように合わせるかを認識する。例えば、反応が飽和しているときの株の単一バッチ最大収量の選択は、単一バッチ収量が高い株を同定するのに適切であり得る。一連の温度および条件にわたる収率の一貫性に基づく選択は、ロバスト性および信頼性が増大した株を同定するのに適切であり得る。

【０５３９】

一部の実施形態では、初期のハイスループットフェーズおよびタンクベースの検証の選択判定基準は、同一となる。他の実施形態では、タンクベースの選択は、追加のおよび／または異なる選択判定基準下で働き得る。例えば、一部の実施形態では、ハイスループット株選択は、単一バッチ反応完了収率に基づき得る一方、タンクベースの選択は、反応速度に対する収率に基づく選択を含むように拡張することができる。

（ａ）一部の実施形態では、選択方法は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．の１つもしくは複数の特定の代謝産物および／または１つもしくは複数の発酵産物に対して耐性である株を選択するステップを含む。一部の実施形態では、様々な遺伝的多型を含む株のコレクションは、所与の分子に対してスクリーニングされる。株のコレクションは、本開示に記載の任意の株ライブラリー、またはこれらの組合せであり得る。選択が行われる分子は、株によって産生された任意の最終産物、または株の増殖もしくは最終産物の収率に影響する中間産物であり得る。例えば、一部の実施形態では、分子は、上記の表４．１のものなどの目的のスピノシン、またはスピノシンの産生に影響する任意の分子であり得る。本質的に、選択は、ａによって産生された１つまたは複数の所定の産物の存在下で、より耐性の株について行われる。一部の実施形態では、方法は、ｃ）選択された株の性能（例えば、株において産生される１つまたは複数の産物の収率）を分析し、ＨＴＰスクリーニングによって、参照微生物株と比較して改善された性能を有する株を選択するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ｄ）改善された性能を引き起こ

す変異の位置および／または配列を同定するステップをさらに含む。確認された改善された性能を有するこれらの選択された株は、最初の抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーを形成する。このようなライブラリーは、複数の個々の微生物株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の微生物株を含み、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、複数の同定可能な遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する。一部の実施形態では、微生物株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株である。一部の実施形態では、微生物株によって産生される所定の産物は、スピノシン合成経路に関与する任意の分子、またはスピノシンの産生に影響を与え得る任意の分子である。一部の実施形態では、所定の産物としては、これらに限定されないが、スピノシンＡ、スピノシンＢ、スピノシンＣ、スピノシンＤ、スピノシンＥ、スピノシンＦ、スピノシンＧ、スピノシンＨ、スピノシンＩ、スピノシンＪ、スピノシンＫ、スピノシンＬ、スピノシンＭ、スピノシンＮ、スピノシンＯ、スピノシンＰ、スピノシンＱ、スピノシンＲ、スピノシンＳ、スピノシンＴ、スピノシンＵ、スピノシンＶ、スピノシンW、スピノシンＸ、スピノシンＹ、ノルロイシン、ノルバリン、シュードアグリコン（例えば、異なるスピノシン化合物のための、ＰＳＡ、ＰＳＤ、ＰＳＪ、ＰＳＬなど）および／またはアルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）が挙げられる。

【０５４０】

シーケンシング

【０５４１】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の生物体の全ゲノムシーケンシングを教示する。他の実施形態では、本開示は、本開示の方法の品質対照としてのプラスミド、ＰＣＲ産物、および他のオリゴのシーケンシングも教示する。大および小プロジェクトのためのシーケンシング法は、当業者に周知である。

【０５４２】

一部の実施形態では、核酸をシーケンシングするための任意のハイスループット技法を、本開示の方法において使用することができる。一部の実施形態では、本開示は、全ゲノムシーケンシングを教示する。他の実施形態では、本開示は、遺伝的バリエーションを同定するためのアンプリコンシーケンシング、ウルトラディープシーケンシングを教示する。一部の実施形態では、本開示は、タグメンテーションを含めたライブラリー調製の新規方法も教示する（ＷＯ／２０１６／０７３６９０を参照）。ＤＮＡシーケンシング技法としては、標識ターミネーターまたはプライマー、およびスラブまたはキャピラリーにおけるゲル分離を使用する古典的ジデオキシシーケンシング反応（サンガー法）；可逆的に終止される標識ヌクレオチドを使用する合成によるシーケンシング、ピロシーケンシング；４５４シーケンシング；標識オリゴヌクレオチドプローブのライブラリーへの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション；ライゲーションが後に続く標識クローンのライブラリーへの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションを使用する合成によるシーケンシング；重合ステップ中の標識ヌクレオチドの組み入れのリアルタイムモニタリング；ポロニーシーケンシング；およびＳＯＬｉＤシーケンシングが挙げられる。

【０５４３】

本開示の一態様では、固体表面上の個々の分子を空間的に単離するステップであって、個々の分子が並行してシーケンシングされる、ステップを含むシーケンシングのハイスループット方法が使用される。このような固体表面として、非多孔性表面（Ｓｏｌｅｘａシーケンシング、例えば、Bentleyら、Nature、４５６巻：５３～５９頁（２００８年）またはＣｏｍｐｌｅｔｅ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓシーケンシング、例えば、Drmanacら、Science、３２７巻：７８～８１頁（２０１０年）などにおける）、ビーズ結合鋳型または粒子結合鋳型を含み得るウェルのアレイ（４５４、例えば、Margulliesら、Nature、４３７巻：３７６～３８０頁（２００５年）、またはイオントレントシーケンシング、米国特許公開２０１０／０１３７１４３号もしくは同第２０１０／０３０４９８２号を用いてなど）、微細加工膜（ＳＭＲＴシーケンシング、例えば、Eidら、Science、３２３巻：１３３～１３８頁（２００９年）を用いてなど）、またはビーズアレイ（ＳＯＬｉＤシーケンシング

またはポロニーシーケンシング、例えば、Kimら、Science、３１６巻：１４８１～１４１４頁（２００７年）を用いるような）を挙げることができる。

【０５４４】

別の実施形態では、本開示の方法は、単離分子が固体表面上で空間的に単離される前または後のいずれかに単離分子を増幅するステップを含む。事前の増幅は、エマルジョンＰＣＲなどのエマルジョンに基づく増幅、またはローリングサークル増幅を含み得る。Ｓｏｌｅｘａに基づくシーケンシングも教示されており、この場合、Bentleyら（上記に引用した）に、かつ製造者の指示（例えば、ＴｒｕＳｅｑ（商標）試料調製キットおよびデータシート、Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．、２０１０年）に；かつさらに、参照により組み込まれている以下の参考文献：米国特許第６，０９０，５９２号；同第６，３００，０７０号；同第７，１１５，４００号；およびＥＰ０９７２０８１Ｂ１に記載されている通り、個々の鋳型分子が固体表面上で空間的に単離され、その後これらがブリッジＰＣＲによって並行して増幅されて別個のクローン集団またはクラスターを形成し、次いでシーケンシングされる。

【０５４５】

一実施形態では、固体表面上で配置および増幅された個々の分子は、１ｃｍ^{2}当たり少なくとも１０^{5}クラスターの密度で；または１ｃｍ^{2}当たり少なくとも５×１０^{5}の密度で；または１ｃｍ^{2}当たり少なくとも１０^{6}クラスターの密度でクラスターを形成する。一実施形態では、相対的に高い誤り率を有するシーケンシング化学反応が使用される。このような実施形態では、このような化学反応によって生じる平均品質スコアは、配列リード長の単調低下関数である。一実施形態では、このような低下は、配列リードの０．５パーセントが１～７５位に少なくとも１つの誤差を有し；配列リードの１パーセントが７６～１００位に少なくとも１つの誤差を有し；配列リードの２パーセントが１０１～１２５位に少なくとも１つの誤差を有することに対応する。

【０５４６】

ゲノムワイド遺伝子設計判定基準の効果のコンピューター分析および予測

一部の実施形態では、本開示は、所与の宿主株内に組み入れている特定の遺伝子変更の効果を予測する方法を教示する。さらなる態様では、本開示は、所与の宿主株内に、前記宿主が特定の表現型形質または株パラメータを有するために組み入れるべきである提案された遺伝子変更を生成するための方法を提供する。所与の態様では、本開示は、新規宿主株を設計するのに利用することができる予測モデルを提供する。

【０５４７】

一部の実施形態では、本開示は、各ラウンドのスクリーニングの性能結果を分析する方法、およびその後のラウンドのスクリーニングで株性能を増強すると予測される新しく提案されたゲノムワイド配列修飾をおこすための方法を教示する。

【０５４８】

一部の実施形態では、本開示は、システムが、先のスクリーニング結果に基づいて宿主株に提案された配列修飾をおこすことを教示する。一部の実施形態では、本システムの推奨は、直前のスクリーニングからの結果に基づく。他の実施形態では、本システムの推奨は、先行するスクリーニングのうちの１つまたは複数の累積的結果に基づく。

【０５４９】

一部の実施形態では、本システムの推奨は、先に開発されたＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーに基づく。例えば、一部の実施形態では、本システムは、同じまたは異なる宿主生物において、先のスクリーニングからの結果を保存し、異なるプロジェクトにこれらの結果を適用するように設計される。

【０５５０】

他の実施形態では、本システムの推奨は、科学的洞察に基づく。例えば、一部の実施形態では、推奨は、遺伝子の公知の性質（アノテートされた遺伝子データベースおよび関連した文献などの源からの）、コドン最適化，転写スリップ、ｕＯＲＦ、または他の仮説主導型配列、および宿主最適化に基づく。

【０５５１】
一部の実施形態では、システムまたは予測モデルが推奨した宿主株への提案された配列修飾は、（１）プロモータースワップ、（２）ＳＮＰスワップ、（３）開始／停止コドン交換、（４）配列最適化、（５）Ｓｔｏｐスワップ、および（５）上位性マッピングを含む開示した分子ツールセットの１つまたは複数の利用によって実行される。
【０５５２】
本明細書に記載のＨＴＰ遺伝子操作プラットフォームは、任意の特定の微生物または表現型形質（例えば、特定の化合物の産生）に関してとらわれない。すなわち、本明細書に教示のプラットフォームおよび方法は、任意の宿主細胞とともに利用して、任意の所望の表現型形質を有するように前記宿主細胞を操作することができる。さらに、１つの新規宿主細胞を生み出すのに使用される所与のＨＴＰ遺伝子操作プロセスから学習した教訓を、教示された方法の間に行われる無数のプロセスパラメータの記憶、特徴付け、および分析の結果として、任意の数の他の宿主細胞に適用することができる。
【０５５３】
上位性マッピングセクションにおいて言及したように、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーからの変異のコレクションをある好適な予測モデルを介して特定のバックグラウンド内に統合することによって得られる仮定の株の性能（別名スコア）を推定することが可能である。このような予測モデルを考慮すると、コンビナトリアル統合を介して変異ラブラリーにアクセス可能なすべての仮定の株をスコア付けおよびランク付けすることが可能である。以下のセクションは、本ＨＴＰプラットフォームにおいて利用される特定のモデルを概説する。
【０５５４】
予測的株設計
遺伝子変化および株性能を記述し、株内の変化の組成に基づいて株性能を予測し、高い予測された性能を有する候補設計を推奨し、予測を選別して二次の考慮事項、例えば、既存の株に対する類似度、上位性、または予測における信頼度を最適化する方法を含む、予測的株設計の手法が本明細書に記載されている。
【０５５５】
株設計モデルへの入力
一実施形態では、例示を容易にする目的で、入力データは、２つのコンポーネント：（１）遺伝子変化のセットおよび（２）相対的株性能を含み得る。当業者は、このモデルは、オーバーフィッティングの対抗する考慮事項に留意しながら、容易に拡張して多種多様な入力を考慮することができることを認識する。遺伝子変化に加えて、調整され得る入力パラメータ（独立変数）の一部は、細胞型（属、種、株、系統発生的特徴付けなど）、および発酵が細胞を用いて行われている下でのプロセスパラメータ（例えば、環境条件、装置のハンドリング、修飾技法など）である。
【０５５６】
遺伝子変化のセットは、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーと呼ばれる遺伝子撹乱の先に論じたコレクションに由来し得る。相対的株性能は、任意の所与のパラメータまたは目的の表現型形質（例えば、目的の化合物、低分子、または産物の産生）に基づいて評価することができる。
【０５５７】
細胞型は、一般的なカテゴリー、例えば、原核生物システムおよび真核生物システム、属、種、株、組織培養物（分散細胞に対して）などにおいて指定され得る。調整され得るプロセスパラメータは、温度、圧力、反応器構成、および培地組成が挙げられる。反応器構成の例には、プロセスがバッチであっても連続であっても、反応器の体積、および連続である場合、体積流量などが含まれる。もしあれば、細胞が存在する、支持構造体を指定することもできる。培地組成の例としては、電解質の濃度、栄養分、老廃物、酸、ｐＨなどが挙げられる。
【０５５８】

予測的株設計モデルを生み出すのに次に使用される最初の線形回帰モデルにおいて利用される選択されたＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーからの遺伝子変化のセット

予測的株設計モデルを創製するために、同じ微生物種の株における遺伝子変化が最初に選択される。各遺伝子変化の履歴も提供される（例えば、この株系統における最近の修飾を示す「最後の変化」）。よって、この株の性能をその親の性能と比較することは、「最後の変化」の変異の性能に関するデータ点を表す。

【０５５９】

構築された株性能評価

教示したモデルの目標は、株に導入される遺伝子変化の組成に基づいて株性能を予測することである。比較のための標準を構築するために、株性能をアッセイプレート１つ当たり、株１つ当たりの性能の中央値を最初に算出することによって一般的な参照株と比べて算出する。次いで、相対的性能を、同じプレート内の操作された株と一般的な参照株との間の平均性能の差異として計算する。プレート内の比較に算出を制限することにより、検討中の試料がすべて同じ実験条件を受けたことを保証する。

【０５６０】

図１８は、検討中の入力データについての相対的株性能の分布の例を示す。これは、本開示に記載の方法を使用することによって、Ｃｏｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍで行った。しかし、同様の手順はＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのためにカスタマイズされ、本発明者らによって成功裏に実行されている。ゼロの相対的性能は、操作された株がプレート内基準または「参照」株と同等によく働いたことを示す。ゼロを有意に上回って働きやすい株を同定する予測モデルの能力が目的のものである。さらに、かつより一般的に、いくつかの判定基準によって任意の所与の株がその親より性能が優れているかどうかが、目的のものである。実際には、判定基準は、親レベルを超えるある閾値を満たす、または超える産物力価であり得るが、所望の方向で親からの統計的に有意な差異を有することも、代替としてまたは追加的に使用することができる。基準株または「参照」株の役割は、プレート内またはプレート間で比較を行うための付加された正規化因子として単に機能を果たすことである。

【０５６１】

留意すべき概念は、親株と参照株との間の差異のものである。親株は、現在のラウンドの変異誘発について使用したバックグラウンドである。参照株は、特にプレート間で比較を促進するためにあらゆるプレートで実行される対照株であり、典型的には、上記に言及した「基準株」である。しかし、基準株（例えば、全体的な性能をベンチマークするのに使用される野生型株または工業用株）は、所与のラウンドの株改良において変異誘発標的であるという意味において必ずしも「基準」である必要はないので、より記述的な用語は、「参照株」である。

【０５６２】

要約すると、基準／参照株は、一般に、構築された株の性能をベンチマークするのに使用され、一方、親株は、関連した遺伝的バックグラウンドにおける特異的な遺伝子変化の性能をベンチマークするのに使用される。

【０５６３】

線形回帰を用いた構築された株の性能のランク付け

開示したモデルの目標は、構築された株内に導入される遺伝子変化の組成の関数として相対的株性能を記述することによって構築された株の性能をランク付けることである。本開示全体にわたって論じられるように、様々なＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーは、操作された株内に導入される可能な遺伝子変化（例えば、遺伝子撹乱／変更）のレパートリーを提供する。線形回帰は、現在記載されている例示的な予測モデルの基礎である。

【０５６４】

次いで、相対的性能に対する遺伝子変化およびそれらの効果は、回帰に基づくモデル化のために入力される。株性能は、株内に含有される遺伝子変化の組成の関数として、一般的な基準株と比べてランク付けされる。

【０５６５】
構築された株を特徴付けるための線形回帰
線形回帰は、インプリメンテーションおよび解釈の容易さのために、記載されたＨＴＰゲノム操作プラットフォームにとって魅力的な方法である。結果として生じる回帰係数は、各遺伝子変化の存在に帰することができる相対的株性能の平均の増大または低下として解釈することができる。
【０５６６】
例えば、一部の実施形態では、本技法は、本発明者らに、元のプロモーターを別のプロモーターに変化させると、任意の負の上位性相互作用の非存在下で、相対的株性能が平均でおよそ１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれより多くのユニット改善され、よって潜在的に高度に望ましい変化であると結論付けることを可能にする（注意：入力は、無単位正規化値である）。
【０５６７】
したがって、教示した方法は、様々な教示したライブラリーからの自己のゲノム内に導入された様々な遺伝子撹乱を有する構築された株を記述し／特徴付け、ランク付けるための線形回帰モデルを使用する。
【０５６８】
予測的設計モデル化
構築した株からのデータを利用した上述した線形回帰モデルは、まだ構築されていない株についての性能予測を行うのに使用することができる。
【０５６９】
手順は、以下の通り要約することができる：遺伝子変化のすべての可能な構成をｉｎｓｉｌｉｃｏで生成する、それに続き、回帰モデルを使用して相対的株性能を予測する、それに続き、性能による候補株設計を注文する。よって、未だ構築されていない株の性能を予測するための回帰モデルを利用することによって、本方法は、より少ない実験を同時に行いながらより高い性能の株の産生を可能にする。
【０５７０】
構成の生成
まだ構築されていない株の性能を予測するモデルを構築するとき、第１のステップは、設計候補の配列を生成することである。これは、株内の遺伝子変化の総数を固定し、次いで遺伝子変化のすべての可能な組合せを明確にすることによって行われる。例えば、潜在的な遺伝子変化／撹乱の総数を２９（例えば、２９の可能なＳＮＰ、もしくは２９の異なるプロモーター、または遺伝子撹乱のユニバースが２９である限り、これらの任意の組合せ）に設定し、次いで２９の潜在的な遺伝子変化のすべての可能な３メンバー組合せを設計する決定を下すことができ、３，６５４の候補株設計がもたらされる。
【０５７１】
上述の３，６５４候補株にコンテクストを提供するために、ｎ！／（（ｎ－ｒ）！＊ｒ！）を使用してｎの可能なメンバーからサイズｒの非重複グループの数を算出することができることを考慮されたい。ｒ＝３である場合、ｎ＝２９は、３，６５４を与える。よって、２９の潜在的な変化のすべての可能な３メンバー組合せを設計する場合、結果は、３，６５４候補株である。
【０５７２】
新しい株設計の性能の予測
入力としてコンビナトリアル構成を用いて上記で構築した線形回帰を使用して、次いで、各候補設計の予期される相対的性能を予測することができる。例えば、上位１００の予測された株設計についての変化の組成を２次元マップに要約することができ、ここで、ｘ軸は、潜在的な遺伝子変化（２９の可能な遺伝子変化）のプールを列挙し、ｙ軸は、ランク順序を示す。黒色セルは、候補設計における特定の変化の存在を示すために使用することができ、一方、白色セルは、その変化の非存在を示すために使用することができる。
【０５７３】

予測精度は、新しい知見がモデルを反復して保持および再フィットするにつれて経時的に増大するはずである。本発明者らによるスタディからの結果は、予測モデルを反復して保持および改善することができる方法を例示する。モデル予測の品質は、予測値と観測値との間の関連性の強度を示す相関係数、または平均モデル誤差の尺度である二乗平均平方根誤差を含めたいくつかの方法によって評価することができる。モデル評価のための選択された測定基準を使用して、システムは、モデルが保持されるべきときの規則を定義することができる。

【０５７４】

上記モデルに対して２つの述べられていない仮定は、（１）上位性相互作用が存在しないこと；および（２）予測モデルを構築するために利用される遺伝子変化／撹乱はすべて、遺伝子変化の提案された組合せとして、同じバックグラウンドにおいて作製されたことを含む。

【０５７５】

二次フィーチャのフィルタリング

上記実例は、予測された宿主細胞性能に基づく線形回帰予測に着目した。一部の実施形態では、本線形回帰方法は、非生体分子因子、例えば、飽和バイオマス、耐性、または他の測定可能な宿主細胞フィーチャに適用することもできる。よって、本開示の方法は、構築するための候補に優先順位を付けるとき、予測された性能以外の他のフィーチャを考慮することも教示する。追加の関連したデータが存在すると仮定して、非線形項も、回帰モデルに含められる。

【０５７６】

既存の株との密接な関係

すでに構築されたものと同様である予測された株は、最上位の予測された候補でないにもかかわらず、時間およびコスト削減をもたらすことができる。

【０５７７】

変化の多様性

上述のモデルを構築するとき、遺伝子変化は、上位性相互作用の存在に起因して真に相加的となる（線形回帰によって仮定し、上記仮定として述べた通り）と確認することができない。したがって、遺伝子変化相違点の知識は、正の相加性の見込みを増大させるのに使用することができる。例えば、最上位にランク付けされた株由来の変化が同じ代謝経路上にあり、同様の性能特性を有すると分かると、その情報を使用して、変化の同じでない組成を有する別の最上位ランクの株を選択することができる。上位性マッピングに関して上記セクションに記載した通り、予測された最良の遺伝子変化を選別して十分に同じでない応答プロファイルを有する変異に選択を制限することができる。代替として、線形回帰は、予測に重み付けするために類似度行列を使用する重み付き最小二乗回帰であり得る。

【０５７８】

予測された性能の多様性

最後に、予測モデルを検証し、引き続いて改善するために、中程度のまたは不満足な予測された性能を有する株を設計するように選択することができる。

【０５７９】

反復株設計最適化

諸実施形態では、発注エンジン２０８は、最上位の候補変異を組み入れている微生物株を製造するために工場注文（factory order）をファクトリー２１０に出す。フィードバック－ループ様式では、結果を分析装置２１４によって分析して、どの微生物が所望の表現型性質を呈するかを決定することができる（３１４）。分析フェーズ中に、修飾された株培養物が評価されて、これらの性能、すなわち、工業規模で産生される能力を含めて、これらの所望の表現型性質の発現が決定される。例えば、分析フェーズでは、とりわけ、プレートの画像データが使用されて、コロニー健康の指標として微生物コロニー増殖が測定される。分析装置２１４が使用されて、遺伝子変化が表現型性能と相関付けられ、結果として生じる遺伝子型－表現型相関データをライブラリー内に保存して（それは、ライブ

ラリー２０６内に記憶され得る）、将来の微生物産生を知らせる。
【０５８０】
特に、十分に高い測定された性能を実際にはもたらす候補変化を、上記表４などの表にデータベース中の行として加えることができる。このようにして、最良に働く変異が、教師付き機械学習様式で予測的株設計モデルに加えられる。
【０５８１】
ＬＩＭＳは、先のファクトリーランから発生した相関に基づいて、設計／構築／試験／分析サイクルを反復する。後続のサイクル中に、分析装置２１４は、単独で、または人のオペレーターと併せて、相関データを使用して遺伝子改変を微調整することによってより微細な粒度を有するより良好な表現型性能を達成して、入力インターフェース２０２に入力して戻すための基準株としての最良候補を選択することができる。このようにして、本開示の実施形態の実験室情報管理システム（ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ　ｓｙｓｔｅｍ）は、品質改善フィードバックループをインプリメントする。
【０５８２】
つまり、図２６のフロー図を参照して、反復予測的株設計ワークフローを以下の通り記述することができる。
・入出力変数、例えば、入力として遺伝子変化および出力として性能フィーチャの訓練セットを生成する（３３０２）。生成は、先の遺伝子変化およびこれらの遺伝子変化を組み入れている微生物株の対応する測定された性能に基づいて分析装置２１４によって実施することができる。
・訓練セットに基づいて初期モデル（例えば、線形回帰モデル）を開発する（３３０４）。これは、分析装置２１４によって実施することができる。
・設計候補株を生成する（３３０６）
・一実施形態では、分析装置２１４は、変化の組合せの形態でバックグラウンド株に行われる遺伝子変化の数を固定することができる。これらの変化を表すために、分析装置２１４は、インタープリター２０４に、変化のこれらの組合せを表す１つまたは複数のＤＮＡの仕様を提供することができる。（これらの遺伝子変化またはこれらの変化を組み入れる微生物株は、「試験入力」と呼ばれる場合がある）。インタープリター２０４は、１つまたは複数のＤＮＡの仕様を解釈し、エグゼキューションエンジン２０７は、ＤＮＡの仕様を実行してこれらの変化について個々の候補設計株を表す分解された出力を有するＤＮＡの仕様をポピュレートする。
・モデルに基づいて、分析装置２１４は、各候補設計株の予期される性能を予測する（３３０８）。
・分析装置２１４は、最高の予測された性能を有する限られた数の候補設計、例えば１００を選択する（３３１０）。
・上位性マッピングに関して本明細書の他の場所で記載したように、分析装置２１４は、例えば、上位性効果について上位の設計を選別し、または予測モデル内に、上位性を計算に入れることによって上位性などの二次効果について説明することができる。
・発注エンジン２０８によって作成された工場注文に基づいて選別された候補株を構築する（ファクトリー２１０で）（３３１２）。
・分析装置２１４は、選択された株の実際の性能を測定し、これらの優れた実際の性能に基づいて限られた数のこれらの選択された株を選択し（３３１４）、設計変化およびこれらの結果として生じる性能を予測モデルに加える（３３１６）。線形回帰の例において、設計変化およびこれらの関連した性能のセットを表４中の新しい行として加える。
・次いで分析装置２１４は、新しい設計候補株の生成に戻って反復し（３３０６）、停止条件が満たされるまで反復し続ける。停止条件は、例えば、性能測定基準、例えば、収率、増殖速度、または力価を満たす少なくとも１つの微生物株の測定された性能を含み得る。
【０５８３】

上記例では、株設計の反復最適化は、フィードバックおよび線形回帰を使用して機械学習をインプリメントする。一般に、機械学習は、限られた数の標識データの例を使用し、次いで未知のデータに対して同じタスクを実施して、情報タスク（分類または回帰など）の性能における性能判定基準、例えば、パラメータ、技法、または他のフィーチャの最適化として記述することができる。上記線形回帰の例のものなどの教師付き機械学習では、機械（例えば、演算デバイス）は、例えば、訓練データが呈するパターン、カテゴリー、統計的関係、または他の属性を同定することによって学習する。次いで学習の結果が使用されて、新しいデータが、同じパターン、カテゴリー、統計的関係、または他の属性を呈するかどうかが予測される。

【０５８４】

本開示の実施形態は、訓練データが入手可能であるとき、他の教師付き機械学習技法を使用することができる。訓練データの非存在下で、諸実施形態では、教師なし機械学習が使用される場合がある。代替として、諸実施形態では、少量の標識データおよび大量の未標識データを使用して、半教師付き機械学習が使用され得る。諸実施形態では、フィーチャ選択が使用されて最も関連したフィーチャのサブセットが選択されることによって機械学習モデルの性能が最適化される場合もある。選択される機械学習手法のタイプに応じて、線形回帰の代替として、またはそれに加えて、諸実施形態では、例えば、ロジスティック回帰、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン（ＳＶＭ）、デシジョンツリー、隠れマルコフモデル、ベイジアンネットワーク、グラムシュミット、強化ベースの学習、階層的クラスタリングを含めたクラスターに基づく学習、遺伝的アルゴリズム、および当技術分野で公知の任意の他の適当な学習機械が使用され得る。特に、諸実施形態では、ロジスティック回帰が使用されて分類自体とともに分類（例えば、異なる機能群への遺伝子の分類）の確率が提供され得る。例えば、Shevade、A simple and efficient algorithm for gene selection using sparse logistic regression、Bioinformatics、１９巻、１７号、２００３年、２２４６～２２５３頁、Lengら、Classification using functional data analysis for temporal gene expression data、Bioinformatics、２２巻、１号、Oxford University Press（２００６年）、６８～７６頁を参照。これらのすべては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０５８５】

諸実施形態では、グラフィックスプロセシングユニット（ＧＰＵ）加速アーキテクチャが使用される場合があり、これは、特に、ディープニューラルネットワーク（ＤＮＮ）として公知の形態で、機械学習タスクの実施において評判が増大していることが見出されている。本開示の実施形態では、ＧＰＵに基づく機械学習、例えば、GPU-Based Deep Learning Inference: A Performance and Power Analysis、NVidia Whitepaper、２０１５年１１月、Dahlら、Multi-task Neural Networks for QSAR Predictions、コンピューターサイエンス学科、トロント大学、２０１４年６月（arXiv:1406.1231 [stat.ML]）に記載されているものが使用され得る。これらの文献のすべては、本明細書にその全体が参照により組み込まれている。本開示の実施形態に適用可能な機械学習技法は、他の参考文献の中でも、Libbrechtら、Machine learning applications in genetics and genomics、Nature Reviews: Genetics、１６巻、２０１５年６月、Kashyapら、Big Data Analytics in Bioinformatics: A Machine Learning Perspective、Journal of Latex Class Files、１３巻、９号、２０１４年９月、Prompramoteら、Machine Learning in Bioinformatics、Bioinformatics Technologiesの第５章、１１７～１５３頁、Springer Berlin Heidelberg、２００５年にも見出すことができ、これらのすべては、本明細書にその全体が参照により組み込まれている。

【０５８６】

反復予測的株設計：例

以下は、上記に概説した反復予測的株設計ワークフローの例示的用途を提供するものである。

【０５８７】

訓練入力変数および出力変数の初期セットを調製した。このセットは、確定した遺伝子組成を有する１８６４のユニークな操作された株を含んでいた。各株は、５から１５の間の操作された変化を含有していた。合計３３６のユニークな遺伝子変化が該訓練に存在した。

【０５８８】

初期の予測コンピューターモデルを開発した。インプリメンテーションは、一般化線形モデル（４次多項式カーネルを用いたカーネルリッジ回帰）を使用した。インプリメンテーションは、２つの個別の表現型（収率および生産性）をモデル化する。これらの表現型を、以下に示す通り、加重和として組み合わせてランク付けのための単一スコアを得た。様々なモデルパラメータ、例えば、正則化係数を、指定された訓練データに対してｋ倍交差検証を介してチューニングした。

【０５８９】

インプリメンテーションは、上記上位性マッピングセクションに記載した相互作用効果のいずれの明確な分析も組み入れない。しかし、当業者が理解するはずであるように、インプリメントされる一般化線形モデルは、カーネルの２、３、および４次項を通じて暗黙的に相互作用効果を捕捉することができる。

【０５９０】

モデルを訓練セットに対して訓練する。訓練の後、収率モデルの訓練データへの有意な品質フィッティングを実証することができる。

【０５９１】

次いで、候補株を生成する。この実施形態は、親株への新しい遺伝子変化の導入に関連した連続構築制約を含む。ここでは、候補は、所望の数の変化の関数として単に見なされない。代わりに、分析装置２１４は、出発点として、高性能測定基準を有すると分かっている先に設計された株（「シード株」）のコレクションを選択する。分析装置２１４は個々に、遺伝子変化をシード株のそれぞれに適用する。導入された遺伝子変化は、シード株内にすでに存在するものを含まない。様々な技術的、生物学的、または他の理由で、ある特定の変異は、明示的に要求され、または明示的に除外される。

【０５９２】

モデルに基づいて、分析装置２１４は、候補株設計の性能を予測した。分析装置２１４は、目的の２つの表現型（収率および生産性）に関する予測された性能に基づいて「最良」から「最悪」に候補をランク付けた。具体的には、分析装置２１４は、加重和を使用して候補株をスコア付けした：

【０５９３】

スコア＝０．８＊ｙｉｅｌｄ／ｍａｘ（ｙｉｅｌｄｓ）＋０．２＊ｐｒｏｄ／ｍａｘ（ｐｒｏｄｓ）、

式中、ｙｉｅｌｄは、候補株について予測された収率を表し、

ｍａｘ（ｙｉｅｌｄｓ）は、すべての候補株に対する最大収率を表し、

ｐｒｏｄは、候補株についての生産性を表し、

ｍａｘ（ｐｒｏｄｓ）は、すべての候補株に対する最大収率を表す。

【０５９４】

分析装置２１４は、能力の制約およびオペレーションの制約の両方を課すことによって候補のランク付けされたリストから推奨の最終セットを生成する。一部の実施形態では、能力限界は、所与の数、例えば、４８のコンピューター生成候補設計株で設定することができる。

【０５９５】

訓練されたモデル（上述した）を使用して各候補株の予期される性能（収率および生産性についての）を予測することができる。分析装置２１４は、上記に与えたスコア付関数を使用して候補株をランク付けることができる。次いで、能力およびオペレーションの制約を適用して４８の候補株の選別されたセットを得ることができる。次いで、選別された候補株を、発注エンジン２０８が作成した工場注文に基づいて構築する（ファクトリー２

１０において）（３３１２）。注文は、候補株に対応するＤＮＡの仕様に基づき得る。
【０５９６】
実際には、ビルドプロセスは、予期された失敗率を有し、それによって株のランダムセットを構築しない。
【０５９７】
分析装置２１４を使用して選択された株の実際の収率および生産性性能を測定することもできる。分析装置２１４は、３つの判定基準：モデル精度；株性能の改善；および人間の専門家が作成した設計との同等性（または改善）に基づいてモデルおよび推奨株を評価することができる。
【０５９８】
収率および生産性表現型を、推奨株について測定し、モデルが予測した値と比較することができる。
【０５９９】
次に、分析装置２１４は、推奨株のそれぞれの親株からのパーセンテージ性能変化を計算する。
【０６００】
予測精度は、予測値と観測値との間の関連性の強度を示す相関係数、または平均モデル誤差の尺度である二乗平均平方根誤差を含めたいくつかの方法によって評価することができる。実験の多くのラウンドにわたって、モデル予測がずれる場合があり、新しい遺伝子変化を訓練入力に加えて予測精度を改善することができる。本例に関して、設計変化およびこれらの結果として生じる性能を予測モデルに加えた（３３１６）。
【０６０１】
サービスとしてのゲノム設計および操作
本開示の実施形態では、図２５のＬＩＭＳシステムソフトウェア３２１０を、図２５のクラウドコンピューティングシステム３２０２において実装して、複数のユーザーが本開示の実施形態によって微生物株を設計および構築するのを可能にすることができる。図２５は、本開示の実施形態によるクラウドコンピューティング環境３２０４を例示する。図２５に例示したものなどのクライアントコンピューター３２０６は、インターネットなどのネットワーク３２０８を介してＬＩＭＳシステムにアクセスする。諸実施形態では、ＬＩＭＳシステムアプリケーションソフトウェア３２１０は、クラウドコンピューティングシステム３２０２内に存在する。ＬＩＭＳシステムは、図２５に例示したタイプの１つまたは複数のプロセッサーを使用して１つまたは複数のコンピューターシステムを使用することができる。クラウドコンピューティングシステム自体は、ネットワーク３２０８を介してＬＩＭＳシステムアプリケーション３２１０をクライアントコンピューター３２０６にインターフェースをとるためのネットワークインターフェース３２１２を含む。ネットワークインターフェース３２１２は、アプリケーションプログラミングインターフェース（ＡＰＩ）を含むことによって、クライアントコンピューター３２０６におけるクライアントアプリケーションがＬＩＭＳシステムソフトウェア３２１０にアクセスするのを可能にすることができる。特に、ＡＰＩを通じて、クライアントコンピューター３２０６は、限定することなく、入力インターフェース２０２、インタープリター２０４、エグゼキューションエンジン２０７、発注エンジン２０８、ファクトリー２１０をランさせるソフトウェア、ならびに試験装置２１２および分析装置２１４を含めたＬＩＭＳシステム２００のコンポーネントにアクセスすることができる。サービス型ソフトウェア（ＳａａＳ）のソフトウェアモジュール３２１４は、クライアントコンピューター３２０６へのサービス型ＬＩＭＳシステムソフトウェア３２１０を提供する。クラウド管理モジュール３２１６は、クライアントコンピューター３２０６によるＬＩＭＳシステム３２１０へのアクセスを管理する。クラウド管理モジュール３２１６は、マルチテナントアプリケーションを使用するクラウドアーキテクチャ、当技術分野で公知の仮想化または他のアーキテクチャが、複数のユーザーにサービスすることを可能にし得る。
【０６０２】

ゲノム自動化

本開示の方法を自動化すると、同時に複数の試験株バリアントからの標的産物のハイスループット表現型スクリーニングおよび同定が可能になる。

【０６０３】

上述のゲノム操作予測モデルリングプラットフォームは、数百および数千の変異体株がハイスループット様式で構築される事実を前提としている。以下に記載のロボットシステムおよびコンピューターシステムは、このようなハイスループットプロセスを実行することができる構造機構である。

【０６０４】

一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞生産性を改善し、または工業用株を再建する方法を教示する。このプロセスの一部として、本開示は、ＤＮＡをアセンブルし、新しい株を構築し、プレート中の培養物をスクリーニングし、タンク発酵のモデルにおける培養物をスクリーニングする方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、新しい宿主株を創製および試験する上述の方法の１つまたは複数は、自動化ロボットによって助けられることを教示する。

【０６０５】

一部の実施形態では、本開示は、図６Ａ～Ｂに表したハイスループット株操作プラットフォームを教示する。

【０６０６】

ＨＴＰロボットシステム

一部の実施形態では、本開示の自動化された方法は、ロボットシステムを含む。本明細書に概説したシステムは一般に、９６－または３８４－ウェルマイクロタイタープレートの使用を対象とするが、当業者が十分に理解するように、任意の数の異なるプレートまたは構成を使用することができる。さらに、本明細書に概説したステップのいずれか、またはすべてを自動化することができ、よって例えば、システムは、完全または部分的に自動化され得る。

【０６０７】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、１つまたは複数の作業モジュールを含む。例えば、一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、ＤＮＡ合成モジュール、ベクタークローニングモジュール、株形質転換モジュール、スクリーニングモジュール、およびシーケンシングモジュールを含む（図７を参照）。

【０６０８】

当業者が十分に理解するとおり、自動化システムは、これらに限定されないが、液体ハンドラー；１つまたは複数のロボットアーム；マイクロプレートを適所配置するためのプレートハンドラー；プレートシーラー、プレートピアサー、非交差汚染プレート上のウェルの蓋を除去および交換するための自動化蓋ハンドラー；使い捨てチップを用いて試料分配するための使い捨てチップアセンブリー；試料分配のための洗浄可能なチップアセンブリー；９６ウェルローディングブロック；一体型サーマルサイクラー；冷却された試薬ラック；マイクロタイタープレートピペットポジション（任意選択で冷却された）；プレートおよびチップのためのスタッキングタワー；磁気ビーズ処理ステーション；濾過システム；プレートシェーカー；バーコードリーダーおよびアプリケーター；ならびにコンピューターシステムを含めた多種多様なコンポーネントを含み得る。

【０６０９】

一部の実施形態では、本開示のロボットシステムは、ハイスループットピペット操作を可能にして遺伝子標的化および組換え用途のプロセスにおけるすべてのステップを実施する自動化液体および粒子ハンドリングを含む。これは、液体および粒子マニピュレーション、例えば、吸引、分注、混合、希釈、洗浄、正確な容量移送；ピペットチップの取戻しおよび廃棄；ならびに単一試料吸引からの複数の送達についての同一体積の繰り返しピペット操作などを含む。これらのマニピュレーションは、交差汚染のない液体、粒子、細胞、および生物体移送である。機器は、フィルター、膜、および／または娘プレートへのマ

イクロプレート試料の自動化複製、高密度移送、フルプレート連続希釈、ならびに大容量オペレーションを遂行する。

【０６１０】

一部の実施形態では、本開示の特注自動化液体ハンドリングシステムは、ＴＥＣＡＮ機械（例えば、特注ＴＥＣＡＮ　Ｆｒｅｅｄｏｍ　Ｅｖｏ）である。

【０６１１】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、マルチウェルプレート、ディープウェルプレート、スクウェアウェルプレート、試薬トラフ、試験管、ミニチューブ、マイクロチューブ、クライオバイアル、フィルター、マイクロアレイチップ、光ファイバー、ビーズ、アガロースゲルおよびアクリルアミドゲルのためのプラットフォームに適合し、他の固相マトリックスまたはプラットフォームは、アップグレード可能なモジュラーデッキ上に収容されている。一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、ソースおよび産出試料、試薬、試料および試薬希釈、アッセイプレート、試料および試薬リザーバー、ピペットチップ、ならびにアクティブチップ洗浄ステーションを配置するための多位置作業面のための少なくとも１つのモジュラーデッキを含有する。

【０６１２】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、ハイスループット電気穿孔システムを含む。一部の実施形態では、ハイープット電気穿孔システムは、９６または３８４－ウェルプレート内で細胞を形質転換することができる。一部の実施形態では、ハイスループット電気穿孔システムとしては、ＶＷＲ（登録商標）ハイスループット電気穿孔システム、ＢＴＸ（商標）、Ｂｉｏ－Ｒａｄ（登録商標）Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（商標）、または他のマルチウェル電気穿孔システムが挙げられる。

【０６１３】

一部の実施形態では、一体型サーマルサイクラーおよび／または温度調節器が、制御ブロックまたはプラットフォームなどの熱交換器の温度を安定化させるのに使用されて、０℃～１００℃に試料をインキュベートする正確な温度制御をもたらす。

【０６１４】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、液体、粒子、細胞、および多細胞生物をロボット制御でマニピュレートすることができる、単一もしくは複数の磁気プローブ、親和性プローブ、レプリケーター、またはピペッタを有する交換可能なマシンヘッド（単一またはマルチチャネル）に適合する。マルチウェルまたはマルチチューブ磁気分離器および濾過ステーションは、単一または複数の試料フォーマットにおいて液体、粒子、細胞、および生物体をマニピュレートする。

【０６１５】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、カメラビジョンおよび／または分光計システムに適合する。よって、一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、進行中の細胞培養における色および吸収の変化を検出およびロギングすることができる。

【０６１６】

一部の実施形態では、本開示の自動化システムは、複数のハードウェアアドオンに柔軟であり、適応できることによって、システムが複数のアプリケーションを実行することを可能にするように設計される。ソフトウェアプログラムモジュールは、方法の創製、改変、および試行を可能にする。システムの診断モジュールは、セットアップ、機器整列、およびモータ動作を可能にする。特注のツール、実験機器、ならびに液体および粒子移送パターンは、異なるアプリケーションをプログラムおよび実施することを可能にする。データベースは、方法およびパラメータ記憶を可能にする。ロボットインターフェースおよびコンピューターインターフェースは、機器間の通信を可能にする。

【０６１７】

よって、一部の実施形態では、本開示は、図１９に表したハイスループット株操作プラットフォームを教示する。

【０６１８】

当業者は、本開示のＨＴＰ操作方法を実行することができる様々なロボットプラットフォームを認識する。以下の表５は、図１９に記載した本開示のＨＴＰ操作ステップの各ステップを実行することができる科学的装置の非排他的リストを提供する。

【表５－１】

表 5-本開示の HTP 操作方法に適合する科学的装置の非排他的なリスト。

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
DNA 片の取得および構築	液体ハンドラー	DNA 部分の PCR 増幅のプライマー/鋳型のヒットピッキング（移行による組合せ）	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	サーマルサイクラー	DNA 部分の PCR 増幅	Inheco Cycler, ABI 2720, ABI Proflex 384, ABI Veriti, または等価物
QC DNA 部分	断片分析器（キャピラリー電気泳動）	適切なサイズの PCR 産物を確認するためのゲル電気泳動	Agilent Bioanalyzer, AATI Fragment Analyzer, または等価物
	シーケンサー（サンガー:Beckman）	部分/鋳型の配列の検証	Beckman Ceq-8000, Beckman GenomeLab（商標）, または等価物
	NGS（次世代シーケンシング）機器	部分/鋳型の配列の検証	Illumina MiSeq シリーズシーケンス, illumina Hi-Seq, Ion torrent, pac bio または他の等価物
	ナノドロップ/プレートリーダー	DNA 試料の濃度の評価	Molecular Devices SpectraMax M5, Tecan M1000, または等価物

【表５－２】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
DNAアセンブリーの生成	液体ハンドラー	クローニングベクターとともにアセンブルするためのDNA部分のヒットピッキング(移行による組合せ)、アセンブリー反応/プロセスのための試薬の添加	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
QC DNAアセンブリー	コロニーピッカー	液体培地にコロニーを接種するため	Scirobotics Pickolo, Molecular Devices QPix 420
	液体ハンドラー	プライマー/鋳型のヒットピッキング、試料の希釈	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	断片分析器(キャピラリー電気泳動)	適切なサイズのアセンブルされた産物を確認するためのゲル電気泳動	Agilent Bioanalyzer, AATI Fragment Analyzer
	シーケンサー(サンガー:Beckman)	アセンブルされたプラスミドの配列の検証	ABI3730 Thermo Fisher, Beckman Ceq-8000, Beckman GenomeLab(商標), または等価物
	NGS(次世代シーケンシング)機器	アセンブルされたプラスミドの配列の検証	Illumina MiSeq シリーズシーケンス, illumina Hi-Seq, Ion torrent, pac bio または他の等価物

【表５－３】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
基準株およびDNAアセンブリーの調製	遠心分離機	細胞のスピニング/ペレット化	Beckman Avanti 床遠心分離機, Hettich Centrifuge
DNAの基準株への形質転換	エレクトロポレーター	細胞のエレクトロポレーションによる形質転換	BTX Gemini X2, BIO-RAD MicroPulser Electroporator
	弾道形質転換	細胞の弾道形質転換	BIO-RAD PDS1000
	インキュベーター、サーマルサイクラー	化学変換/熱ショックのため	Inheco Cycler, ABI 2720, ABI Proflex 384, ABI Veriti, または等価物
	液体ハンドラー	DNA、細胞、緩衝液を組み合わせるため	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
基準株のゲノム内へのDNAの組込み	コロニーピッカー	液体培地にコロニーを接種するため	Scirobotics Pickolo, Molecular Devices QPix 420

【表５－４】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
	液体ハンドラー	寒天上への細胞の移動、培養プレートから異なる培養プレートへの移動のため（他の選択培地への接種）	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	プラットフォームシェーカー-インキュベーター	マイクロタイタープレート培養物の振とうによるインキュベーション	Kuhner Shaker ISF4-X, Infors-ht Multitron Pro
QC形質転換株	コロニーピッカー	液体培地にコロニーを接種するため	Scirobotics Pickolo, Molecular Devices QPix 420
	液体ハンドラー	プライマー/鋳型のヒットピッキング、試料の希釈	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	サーマルサイクラー	株の cPCR 検証	Inheco Cycler, ABI 2720, ABI Proflex 384, ABI Veriti, または等価物
	断片分析器（キャピラリー電気泳動）	適切なサイズの cPCR 産物を確認するためのゲル電気泳動	Infors-ht Multitron Pro, Kuhner Shaker ISF4-X
	シーケンサー（サンガー:Beckman）	導入された修飾の配列検証	Beckman Ceq-8000, Beckman GenomeLab（商標）, または等価物
	NGS（次世代シーケンシング）機器	導入された修飾の配列検証	Illumina MiSeq シリーズシーケンス, illumina Hi-Seq, Ion torrent, pac bio または他の等価物

【表５－５】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
試験プレートへのQCされた株の選択および統合	液体ハンドラー	培養プレートから異なる培養プレートへの移動のため(産生培地への接種)	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	コロニーピッカー	液体培地にコロニーを接種するため	Scirobotics Pickolo, Molecular Devices QPix 420
	プラットフォームシェーカー-インキュベーター	マイクロタイタープレート培養物の振とうによるインキュベーション	Kuhner Shaker ISF4-X, Infors-ht Multitron Pro
シードプレート中の株の培養	液体ハンドラー	培養プレートから異なる培養プレートへの移動のため(産生培地への接種)	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	プラットフォームシェーカー-インキュベーター	マイクロタイタープレート培養物の振とうによるインキュベーション	Kuhner Shaker ISF4-X, Infors-ht Multitron Pro
	液体ディスペンサー	液体培養基のマイクロタイタープレートへの分注	Well mate (Thermo), Benchcel2R (velocity 11), plateloc (velocity 11)
	マイクロプレートラベラー	バーコーダーのプレートへの適用	Microplate labeler (a2+ cab - agilent), benchcell 6R (velocity11)

【表５－６】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
株からの産物の産生	液体ハンドラー	培養プレートから異なる培養プレートへの移動のため(産生培地への接種)	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	プラットフォームシェーカー-インキュベーター	マイクロタイタープレート培養物の振とうによるインキュベーション	Kuhner Shaker ISF4-X, Infors-ht Multitron Pro
	液体ディスペンサー	液体培養基の複数のマイクロタイタープレートおよびシールプレートへの分注	well mate (Thermo), Benchcel2R (velocity 11), plateloc (velocity 11)
	マイクロプレートラベラー	バーコーダーのプレートへの適用	microplate labeler (a2+ cab - agilent), benchcell 6R (velocity11)
性能の評価	液体ハンドラー	下流分析のための培養ブロスの処理のため	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	UHPLC, HPLC	前駆体および標的化合物の定量分析	Agilent 1290 Series UHPLC ならびに UV および RI 検出器を有する 1200 Series HPLC、または等価物、また任意の LC/MS
	LC/MS	前駆体および標的化合物ならびに副産物および分解産物の高度に特異的な分析	1290 Series UHPLC にカップリングした Agilent 6490 QQQ および 6550 QTOF

【表５－７】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
	分光光度計	分光光度計に基づくアッセイを使用する異なる化合物の定量	Tecan M1000, spectramax M5, Genesys 10S
フラスコ中の株の培養	発酵槽:	振とうでのインキュベーション	Sartorius, DASGIPs (Eppendorf), BIO-FLOs (Sartorius-stedim). Applikon
	プラットフォームシェーカー		innova 4900, または任意の等価物
株からの産物の産生	発酵槽: DASGIPs (Eppendorf), BIO-FLOs (Sartorius-stedim)		
性能の評価	液体ハンドラー	培養プレートから異なる培養プレートへの移動のため(産生培地への接種)	Hamilton Microlab STAR, Labcyte Echo 550, Tecan EVO 200, Beckman Coulter Biomek FX, または等価物
	UHPLC, HPLC	前駆体および標的化合物の定量分析	Agilent 1290 Series UHPLC ならびに UV および RI 検出器を有する 1200 Series HPLC、または等価物、また任意の LC/MS
	LC/MS	前駆体および標的化合物ならびに副産物および分解産物の高度に特異的な分析	1290 Series UHPLC にカップリングした Agilent 6490 QQQ および 6550 QTOF

【表５－８】

	装置タイプ	実施したオペレーション	適合する装置 メーカー（Make）/モデル/構成
	フローサイトメーター	株性能の特徴付け（生存能の測定）	BD Accuri, Millipore Guava
	分光光度計	株性能の特徴付け（バイオマスの測定）	Tecan M1000, Spectramax M5,または他の等価物

【０６１９】
コンピューターシステムハードウェア
図２７は、本開示の実施形態による非一時的コンピューター可読媒体（例えば、メモリー）内に記憶されたプログラムコードを実行するのに使用され得るコンピューターシステム８００の一例を例示する。コンピューターシステムは、入力／出力サブシステム８０２を含み、これは、アプリケーションに応じて人間のユーザーおよび／または他のコンピューターシステムとインターフェースで接続するのに使用することができる。Ｉ／Ｏサブシステム８０２は、例えば、キーボード、マウス、グラフィカルユーザーインターフェース、タッチスクリーン、または入力のための他のインターフェース、および例えば、ＬＥＤもしくは他のフラットスクリーンディスプレイ、あるいはアプリケーションプログラムインターフェース（ＡＰＩ）を含めた出力のための他のインターフェースを含み得る。ＬＩＭＳシステムのコンポーネントなどの本開示の実施形態の他のエレメントは、コンピューターシステム８００のもののようなコンピューターシステムで実装することができる。
【０６２０】
プログラムコードは、二次メモリー８１０もしくはメインメモリー８０８または両方内の永続記憶装置などの非一時的媒体内に記憶することができる。メインメモリー８０８として、ランダムアクセスメモリー（ＲＡＭ）などの揮発性メモリー、またはリードオンリーメモリー（ＲＯＭ）などの不揮発性メモリー、ならびに指示およびデータにより速くアクセスするための異なるレベルのキャッシュメモリーを挙げることができる。二次メモリーとして、永続記憶装置、例えば、ソリッドステートドライブ、ハードディスクドライブ、または光ディスクなどを挙げることができる。１つまたは複数のプロセッサー８０４は、１つまたは複数の非一時的媒体からのプログラムコードを読み込み、コードを実行してコンピューターシステムが本明細書の実施形態によって実施される方法をなしとげることを可能にする。当業者は、プロセッサー（複数可）は、ソースコードを取り込み、ソースコードを解釈またはコンパイルして、プロセッサー（複数可）８０４のハードウェアゲートレベルで理解可能であるマシンコードにすることができることを理解する。プロセッサー（複数可）８０４は、計算集約型タスクを扱うためのグラフィックスプロセシングユニット（ＧＰＵ）を含み得る。特に、機械学習では、１つまたは複数のＣＰＵ　８０４は、大量のデータの処理を１つまたは複数のＧＰＵ　８０４にオフロードすることができる。
【０６２１】
プロセッサー（複数可）８０４は、１つまたは複数の通信インターフェース８０７、例えば、ネットワークインターフェースカード、ＷｉＦｉトランシーバーなどを介して外部ネットワークと通信することができる。バス８０５は、Ｉ／Ｏサブシステム８０２、プロセッサー（複数可）８０４、周辺デバイス８０６、通信インターフェース８０７、メモリー８０８、および永続記憶装置８１０を通信可能にカップルする。本開示の実施形態は、この代表的なアーキテクチャに限定されない。代替の実施形態は、異なる配置およびタイプのコンポーネント、例えば、入出力コンポーネントおよびメモリーサブシステムのための別個のバスを使用することができる。
【０６２２】

当業者は、本開示の実施形態のエレメントの一部またはすべて、およびこれらの付随するオペレーションは、コンピューターシステム８００のもののような１つまたは複数のプロセッサーおよび１つまたは複数のメモリーシステムを含む１つまたは複数のコンピューターシステムによって完全または部分的にインプリメントされ得ることを理解する。特に、本明細書に記載のＬＩＭＳシステム２００ならびに任意のロボットおよび他の自動化システムまたはデバイスのエレメントは、コンピューター実装することができる。一部のエレメントおよび機能性は、ローカルにインプリメントすることができ、他のものは、例えば、異なるサーバーを通じたネットワークにわたって分散様式で、例えば、クライアント－サーバー様式でインプリメントすることができる。特に、図２５に示したように、サーバーサイドオペレーションを、サービス型ソフトウェア（ＳａａＳ）様式で複数のクライアントに利用可能にすることができる。

【０６２３】

本文脈における用語のコンポーネントは、ソフトウェア、ハードウェア、もしくはファームウェア（またはこれらの任意の組合せ）コンポーネントを広く指す。コンポーネントは、典型的には、指定された入力（複数可）を使用して有用なデータまたは他の出力を生成することができる機能コンポーネントである。コンポーネントは、自己充足型であってもよく、または自己充足型でなくてもよい。アプリケーションプログラム（「アプリケーション」とも呼ばれる）は、１つもしくは複数のコンポーネントを含み得、またはコンポーネントは、１つもしくは複数のアプリケーションプログラムを含むことができる。

【０６２４】

一部の実施形態は、他のモジュールまたはアプリケーションコンポーネントとともにコンポーネントの一部、すべてを含み、またはどれも含まない。なおさらに、様々な実施形態は、これらのコンポーネントの２つもしくはそれ超を単一モジュール内に組み入れ、かつ／またはこれらのコンポーネントの１つもしくは複数の機能性の一部を異なるコンポーネントと結びつけることができる。

【０６２５】

用語「メモリー」は、情報を記憶させるのに使用される任意のデバイスまたは機構であり得る。本開示の一部の実施形態によれば、メモリーは、これらに限定されないが、揮発性メモリー、不揮発性メモリー、およびダイナミックメモリーの任意のタイプを包含するように意図されている。例えば、メモリーは、ランダムアクセスメモリー、メモリー記憶デバイス、光学メモリーデバイス、磁気媒体、フロッピー（登録商標）ディスク、磁気テープ、ハードドライブ、ＳＩＭＭ、ＳＤＲＡＭ、ＤＩＭＭ、ＲＤＲＡＭ、ＤＤＲ　ＲＡＭ、ＳＯＤＩＭＭＳ、消去可能プログラム可能リードオンリーメモリー（ＥＰＲＯＭ）、電気的消去可能プログラム可能リードオンリーメモリー（ＥＥＰＲＯＭ）、コンパクトディスク、ＤＶＤなどであり得る。一部の実施形態によれば、メモリーは、１つまたは複数のディスクドライブ、フラッシュドライブ、データベース、ローカルキャッシュメモリー、プロセッサーキャッシュメモリー、リレーショナルデータベース、フラットデータベース、サーバー、クラウドベースプラットフォームなどを含み得る。さらに、当業者は、情報を記憶するための多くの追加のデバイスおよび技法をメモリーとして使用することができることを十分に理解する。

【０６２６】

メモリーは、プロセッサー上の１つまたは複数のアプリケーションまたはモジュールをランさせるための指示を記憶させるのに使用され得る。例えば、メモリーは、一部の実施形態では、本願に開示のモジュールおよび／またはアプリケーションの１つまたは複数の機能性を実行するのに必要な指示のすべてまたは一部を収納するのに使用することができる。

【０６２７】

遺伝子設計予測に基づくＨＴＰ微生物株操作：例示的なワークフロー

一部の実施形態では、本開示は、本開示のコンピューター分析システムの推奨に基づく新しい宿主生物の指向操作を教示する。

【０６２８】
一部の実施形態では、本開示は、すべての遺伝子設計およびクローニング方法に適合する。すなわち、一部の実施形態では、本開示は、伝統的なクローニング技法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、制限酵素消化、ライゲーション、相同組換え、ＲＴ　ＰＣＲ、および当技術分野で一般に公知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれている、Sambrookら（２００１年）、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（３版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、New York）に開示されているその他のものなどの使用を教示する。
【０６２９】
一部の実施形態では、クローン化された配列は、本明細書に教示のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーのいずれか由来の可能なもの、例えば、プロモータースワップライブラリー由来のプロモーター、ＳＮＰスワップライブラリー由来のＳＮＰ、開始コドンもしくは停止コドン交換ライブラリー由来の開始コドンもしくは停止コドン、ＳＴＯＰスワップライブラリー由来のターミネーター、または配列最適化ライブラリー由来の配列最適化を含み得る。
【０６３０】
さらに、特定の構築物内に含まれるべき正確な配列組合せは、上位性マッピング機能によって知らされ得る。
【０６３１】
他の実施形態では、クローン化された配列は、合理的な設計（仮説主導型）に基づく配列および／または科学刊行物などの他のソースに基づく配列も含むことができる。
【０６３２】
一部の実施形態では、本開示は、ｉ）カスタムメイドＳＮＰ特異的ＤＮＡを生成するステップと、ｉｉ）ＳＮＰ特異的プラスミドをアセンブルするステップと、ｉｉｉ）ＳＮＰ特異的ＤＮＡで標的宿主細胞を形質転換するステップと、ｉｖ）任意の選択マーカーをループアウトさせるステップとを含む、指向操作の方法を教示する（図２を参照）。
【０６３３】
図６Ａは、ＤＮＡを取得およびアセンブルステップと、ベクターをアセンブルするステップと、宿主細胞を形質転換するステップと、選択マーカーを除去するステップとを含む、本開示の株操作法の一般的なワークフローを表す。
【０６３４】
特異的ＤＮＡオリゴヌクレオチドを構築する
一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞生物体のＤＮＡセグメントを挿入することおよび／または置き換えることおよび／または変更することおよび／または欠失させることを教示する。一部の態様では、本明細書に教示の方法は、宿主生物のゲノム内に組み入れる目的のオリゴヌクレオチド（すなわち、標的ＤＮＡセグメント）を構築することを伴う。一部の実施形態では、本開示の標的ＤＮＡセグメントは、公知の鋳型からのコピーもしくはカット、変異、またはＤＮＡ合成を含む、当技術分野で公知の任意の方法を介して得ることができる。一部の実施形態では、本開示は、標的ＤＮＡ配列を生成するための市販の遺伝子合成産物（例えば、ＧｅｎｅＡｒｔ（商標）、ＧｅｎｅＭａｋｅｒ（商標）、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（商標）、Ａｎａｇｅｎ（商標）、Ｂｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎ（商標）、Ｅｎｔｅｌｅｃｈｏｎ（商標）、ＧｅＮＯｓｙｓ，Ｉｎｃ．、またはＱｉａｇｅｎ（商標））に適合する。
【０６３５】
一部の実施形態では、標的ＤＮＡセグメントは、宿主生物の選択されたＤＮＡ領域内にＳＮＰを組み入れる（例えば、有益なＳＮＰを付加する）ように設計されている。他の実施形態では、ＤＮＡセグメントは、宿主生物のＤＮＡからＳＮＰを除去する（例えば、有害なまたは中立のＳＮＰを除去する）ように設計されている。
【０６３６】
一部の実施形態では、本発明の方法で使用されるオリゴヌクレオチドは、当技術分野で

公知の酵素合成または化学合成の方法のいずれかを使用して合成することができる。オリゴヌクレオチドは、固体支持体、例えば、制御細孔ガラス（ＣＰＧ）、ポリスチレンビーズ、またはＣＰＧを含有し得る熱可塑性ポリマーから構成される膜上で合成することができる。オリゴヌクレオチドは、アレイ上で、マイクロフルイディクスを使用して並列のマイクロスケールで（Tianら、Mol. BioSyst.、５巻、７１４～７２２頁（２００９年））、または両方の組合せを提供する公知の技術で（Jacobsenら、米国特許出願第２０１１／０１７２１２７号を参照）合成することもできる。

【０６３７】

アレイ上の、またはマイクロフルイディクスによる合成は、より低い試薬使用を通じてコストを低減することによって、慣例的な固体支持体合成に対して利点を提供する。遺伝子合成に要求される規模は低く、したがって、アレイから、またはマイクロフルイディクスを通じて合成されるオリゴヌクレオチド産物の規模は、許容される。しかし、合成されるオリゴヌクレオチドは、固体支持体合成を使用するときより低い品質のものである（Tian、以下を参照；Staehlerら、米国特許出願第２０１０／０２１６６４８号も参照）。

【０６３８】

多数の進歩が、それが１９８０年代に最初に記載されて以来、伝統的な４ステップホスホラミダイト化学において達成されている（例えば、ペルオキシアニオンの脱保護を使用するSierzchalaら、J. Am. Chem. Soc.、１２５巻、１３４２７～１３４４１頁（２００３年）；代替の保護基についてHayakawaら、米国特許第６，０４０，４３９号；ユニバーサル支持体についてAzhayevら、Tetrahedron、５７巻、４９７７～４９８６頁（２００１年）；大孔ＣＰＧの使用によるより長いオリゴヌクレオチドの改善された合成についてKozlovら、Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids、２４巻（５～７号）、１０３７～１０４１頁（２００５年）；および改善された誘導体化についてDamhaら、NAR、１８巻、３８１３～３８２１頁（１９９０年）を参照）。

【０６３９】

合成のタイプにかかわらず、次いで結果として生じるオリゴヌクレオチドは、より長いオリゴヌクレオチドのためのより小さいビルディングブロックを形成することができる。一部の実施形態では、より小さいオリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知のプロトコール、例えば、ポリメラーゼ鎖アセンブリー（ＰＣＡ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、および熱力学的にバランスの取れたインサイドアウト合成（thermodynamically balanced inside-out synthesis）（ＴＢＩＯ）を使用して一緒に繋ぐことができる（Czarら、Trends in Biotechnology、２７巻、６３～７１頁（２００９年）を参照）。ＰＣＡでは、所望のより長い産物の全長にまたがるオリゴヌクレオチドが、複数のサイクル（典型的には約５５サイクル）においてアニールおよび伸長されて完全長産物を最終的に達成する。ＬＣＲは、リガーゼ酵素を使用して２つのオリゴヌクレオチドを繋ぎ、これらはともにアニールされて第３のオリゴヌクレオチドになる。ＴＢＩＯ合成は、所望の産物の中心から開始し、遺伝子の５’末端における順方向鎖と、かつ遺伝子の３’末端における逆方向鎖と相同である重複オリゴヌクレオチドを使用することによって両方向で漸次伸長される。

【０６４０】

より大きい二本鎖ＤＮＡ断片を合成する別の方法は、トップストランドＰＣＲ（ＴＳＰ）によってより小さいオリゴヌクレオチドを組み合わせることである。本方法では、複数のオリゴヌクレオチドが所望の産物の全長にわたり、隣接するオリゴヌクレオチド（複数可）に対して重複領域を含有する。増幅は、ユニバーサル順方向プライマーおよび逆方向プライマーを用いて、かつ複数のサイクルの増幅を介して実施することができ、全長の二本鎖ＤＮＡ産物が形成される。次いでこの産物は、任意選択の誤差補正およびさらなる増幅を受けることができ、それにより、所望の二本鎖ＤＮＡ断片最終産物がもたらされる。

【０６４１】

ＴＳＰの一方法では、全長の所望の産物を形成するのに組み合わされるより小さいオリゴヌクレオチドのセットは、４０～２００塩基の間の長さであり、互いに少なくとも約１５～２０塩基重複する。実用的な目的のために、重複領域は、オリゴヌクレオチドの特異

的アニーリングを保証するために最低でも十分長く、使用される反応温度でアニールするために十分高い融解温度（T_m）を有するべきである。重複は、所与のオリゴヌクレオチドが隣接するオリゴヌクレオチドによって完全に重複されるポイントまで伸長することができる。重複の量は、最終産物の品質に対していずれの効果も有さないようである。アセンブリー内の最初および最後のオリゴヌクレオチドビルディングブロックは、順方向および逆方向の増幅プライマーのための結合部位を含有するべきである。一実施形態では、最初および最後のオリゴヌクレオチドの末端側終端配列は、同じ相補性を有する配列を含有してユニバーサルプライマーの使用を可能にする。

【０６４２】

特注プラスミドアセンブリング／クローニング

一部の実施形態では、本開示は、宿主生物のゲノム内に所望の標的ＤＮＡ切片（例えば、特定のＳＮＰを含有する）を挿入することができるベクターを構築するための方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、標的ＤＮＡ、相同アーム、および少なくとも１つの選択マーカーを含むベクターをクローニングする方法を教示する（図３を参照）。

【０６４３】

一部の実施形態では、本開示は、宿主生物内への形質転換に適した任意のベクターに適合する。一部の実施形態では、本開示は、宿主細胞に適合するシャトルベクターの使用を教示する。一実施形態では、本明細書に提供される方法において使用するためのシャトルベクターは、Ｅ．ｃｏｌｉおよび／またはＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞に適合するシャトルベクターである。本明細書に提供される方法において使用するためのシャトルベクターは、本明細書に記載の選択および／または対抗選択のためのマーカーを含み得る。マーカーは、当技術分野で公知のかつ／または本明細書に提供される任意のマーカーであり得る。シャトルベクターは、任意の調節配列（複数可）および／または当技術分野で公知の前記シャトルベクターのアセンブリーにおいて有用な配列をさらに含み得る。シャトルベクターは、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉまたはＣ．ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍなど本明細書に提供される宿主細胞内での繁殖に必要とされ得る任意の複製起点をさらに含むことができる。調節配列は、当技術分野で公知の、または本明細書に提供される任意の調節配列、例えば、宿主細胞の遺伝機構によって使用される、プロモーター、開始、停止、シグナル、分泌、および／または終結配列などであり得る。ある特定の事例では、標的ＤＮＡは、任意のリポジトリまたはカタログ製品から入手可能なベクター、コンストラクト、またはプラスミド、例えば、市販のベクター（例えば、ＤＮＡ２．０特注またはＧＡＴＥＷＡＹ（登録商標）ベクターを参照）内に挿入することができる。ある特定の事例では、標的ＤＮＡは、任意のリポジトリまたはカタログ製品から入手可能なベクター、コンストラクト、またはプラスミド、例えば、市販のベクター（例えば、ＤＮＡ２．０特注またはＧＡＴＥＷＡＹ（登録商標）ベクターを参照）内に挿入することができる。

【０６４４】

一部の実施形態では、本開示のアセンブリー／クローニング方法は、以下のアセンブリーストラテジー：ｉ）ＩＩ型慣習的クローニング、ｉｉ）ＩＩ　Ｓ型媒介または「ゴールデンゲート」クローニング（例えば、Engler, C.、R. Kandzia、およびS. Marillonnet、２００８年、「A one pot, one step, precision cloning method with high-throughput capability」、PLos One、３巻：ｅ３６４７頁；Kotera, I.およびT. Nagai、２００８年、「A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme」、J Biotechnol、１３７巻：１～７頁；Weber, E.、R. Gruetzner、S. Werner、C. Engler、およびS. Marillonnet、２０１１年、Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning、PloS One、６巻：ｅ１９７２２頁を参照）、ｉｉｉ）ＧＡＴＥＷＡＹ（登録商標）組換え、ｉｖ）ＴＯＰＯ（登録商標）クローニング、エキソヌクレアーゼ媒介アセンブリー（Aslanidisおよびde Jong、１９９０年、「Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)」、Nucleic Acids Research、１８巻、２０号、６０６９頁）、ｖ）相同組換え、ｖｉ

）非相同末端結合、ｖｉｉ）ギブソンアセンブリー（Gibsonら、２００９年、「Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases」、Nature Methods、６巻、３４３～３４５頁）、またはこれらの組合せの少なくとも１つを使用することができる。モジュラーＩＩＳ型ベースアセンブリーストラテジーは、ＰＣＴ公開ＷＯ２０１１／１５４１４７に開示されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれている。

【０６４５】

一部の実施形態では、本開示は、少なくとも１つの選択マーカーを有するベクターをクローニングすることを教示する。選択圧下で原核細胞（例えば、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ゼオシン、スペクチノマイシン／ストレプトマイシンに対する）、または真核細胞（例えば、ジェネテシン、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、ゼオシン）内の選択について抗生物質耐性機能をコードすることが多い様々な選択マーカー遺伝子が当技術分野で公知である。他のマーカーシステム、例えば、順調に形質導入された宿主細胞において発現されるＸ－ｇａｌまたは緑色もしくは赤色蛍光タンパク質などの蛍光レポーターの存在下で陽性クローンを選択するのに細菌において使用される周知のブルー／ホワイトスクリーニングシステムは、望まれるまたは望まれない細胞のスクリーニングおよび同定を可能にする。そのほとんどが原核生物系内でのみ機能的である選択マーカーの別のクラスは、産生細胞を死滅させる毒性遺伝子産物を発現する、「デス遺伝子（death gene）」とも呼ばれることが多い対抗選択可能マーカー遺伝子に関する。このような遺伝子の例としては、ｓａｃＢ、ｒｐｓＬ（ｓｔｒＡ）、ｔｅｔＡＲ、ｐｈｅＳ、ｔｈｙＡ、ｇａｔａ－１、またはｃｃｄＢが挙げられ、その機能は、（Reyratら、１９９８年、「Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis」、Infect Immun.、６６巻（９号）：４０１１～４０１７頁）に記載されている。

【０６４６】

対抗選択マーカー

本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．の遺伝子操作のための対抗選択マーカーも提供する。一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａである。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、レバンスクラーゼ（ＥＣ２．４．１．１０）をコードするｓａｃＢ（レバンスクラーゼ）遺伝子、フェニルアラニンｔＲＮＡシンテターゼ（ｐｈｅＳ）遺伝子、またはこれらの組合せである。

【０６４７】

一部の実施形態では、ｓａｃＢまたはｐｈｅＳ遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．のためにコドン最適化されている。一部の実施形態では、ｓａｃＢをコードするヌクレオチド配列は配列番号１４６を含む。一部の実施形態では、ｓａｃＢをコードするヌクレオチド配列は、配列番号１４６と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれよりも高い相同性を有する。一部の実施形態では、ｐｈｅＳをコードするヌクレオチド配列は配列番号１４７または配列番号１４８を含む。一部の実施形態では、ｐｈｅＳをコードするヌクレオチド配列は、配列番号１４７または配列番号１４８と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれよりも高い相同性を有する。

【０６４８】

本開示の対抗選択マーカー遺伝子を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．のためのゲノムの組込みのためのプラスミドも提供する。一部の実施形態では、プラスミドは、プラスミド主鎖、対抗選択マーカー遺伝子に加えて陽性選択マーカー、相同左アーム配列、相同右アーム配列およびＤＮＡペイロード（例えば、組み込まれる編集された遺伝子）を含む。相同左および右アーム配列は、標的化野生型遺伝子座およびＤＮＡペイ

ロードの間の相同組換えを可能にする。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である。

【０６４９】

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．の変異株を生成する方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、ａ）親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に本開示の対抗選択マーカー遺伝子を含むプラスミドを導入するステップを含む。これは、相同組換えまたは任意の他の適切なプロセスを使用することによって行うことができる。一部の実施形態では、方法は、ｂ）陽性選択を使用して組込み事象を有する株について選択するステップ（例えば、プラスミド中の陽性選択マーカーに基づいて）をさらに含む。一部の実施形態では、方法は、陰性選択を使用してループアウトされたプラスミド主鎖を有する株について選択するステップ（例えば、対抗選択マーカー遺伝子に基づいて）をさらに含む。一部の実施形態では、結果として生じたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、組込みＤＮＡなしの親株と比較してより良好な性能を有する。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である。

【０６５０】

レバンスクラーゼ（ＥＣ２．４．１．１０）は、化学反応を触媒する酵素である。

スクロース＋（２，６－ベータ－Ｄ－フルクトシル）ｎ⇔{＼ｄｉｓｐｌａｙｓｔｙｌｅ＼ｒｉｇｈｔｌｅｆｔｈａｒｐｏｏｎｓ}＼ｒｉｇｈｔｌｅｆｔｈａｒｐｏｏｎｓグルコース＋（２，６－ベータ－Ｄ－フルクトシル）ｎ＋１

この酵素の２つの基質は、スクロースおよび（２，６－ベータ－Ｄ－フルクトシル）ｎであるが、その２つの産物は、グルコースおよび（２，６－ベータ－Ｄ－フルクトシル）ｎ＋１である。この酵素は、グリコシルトランスフェラーゼのファミリー、具体的には、ヘキソシルトランスフェラーゼに属する。この酵素クラスの系統名は、スクロース：２，６－ベータ－Ｄ－フルクタン６－ベータ－Ｄ－フルクトシルトランスフェラーゼである。一般的な使用における他の名称としては、スクロース６－フルクトシルトランスフェラーゼ、ベータ－２，６－フルクトシルトランスフェラーゼおよびベータ－２，６－フルクタン：Ｄ－グルコース１－フルクトシルトランスフェラーゼが挙げられる。

【０６５１】

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における無傷の標的化ゲノム編集

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓｅ株などのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法も提供する。方法は、標的としたゲノム遺伝子座で遺伝的バリエーションを含有する無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をもたらす。

【０６５２】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）ゲノム編集プラスミドをＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入するステップを含む。前記ゲノム編集プラスミドは、（１）選択マーカー；（２）対抗選択マーカー；（３）ゲノムに導入される１つまたは複数の所望の遺伝的バリエーションを有するＤＮＡ断片；および（４）プラスミド主鎖配列を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の所望の遺伝的バリエーションを有するＤＮＡ断片は、標的遺伝子座でＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムに組み込まれる１つまたは複数の遺伝的バリエーション、および所望の遺伝的バリエーションに隣接する標的ゲノム遺伝子座に対する相同アームを含む。

【０６５３】

一部の実施形態では、方法は、（ｂ）ゲノム中の選択マーカーの存在に基づいて、最初の相同組換えを受け、標的遺伝子座に組み込まれた遺伝的バリエーションを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップをさらに含む。

【０６５４】

一部の実施形態では、方法は、（ｃ）対抗選択マーカーの非存在に基づいて、標的遺伝子座に組み込まれた遺伝的バリエーションを有するが、プラスミド主鎖をループアウトする追加の相同組換えを受けているＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択す

るステップをさらに含む。一部の実施形態では、対抗選択マーカーは、本開示に記載のものから選択される。

【０６５５】

一部の実施形態では、方法のステップ（ｂ）およびステップ（ｃ）は、同じ培地で同時に実施される。一部の実施形態では、本方法のステップ（ｂ）およびステップ（ｃ）は、別個の培地で逐次的に実施される。

【０６５６】

一部の実施形態では、標的としたゲノム遺伝子座は、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有しないゲノム領域を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムの任意の領域を含んでいてもよい。

【０６５７】

一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において機能する温度感受性レプリコンを含まない。

【０６５８】

一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内でプラスミドの自己複製を可能にする複製起点を含まない。

【０６５９】

一部の実施形態では、選択ステップ（ｃ）は、組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される。

【０６６０】

一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株中のゲノム編集プラスミドは、本開示に記載のコンジュゲーション方法を使用してＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入される。一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドを送達するドナー細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である。一部の実施形態では、レシピエント細胞はＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ細胞である。代替として、一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に直接形質転換される。

【０６６１】

様々な相同組換えプラスミドを使用することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドは、単一相同組換えベクターである。単一相同組換えプラスミドは、「挿入カセット」を含むことができる。挿入相同組換えカセットは、単一相同組換えクロスオーバー事象を促進する標的部位に対して十分な配列同一性を共有する単一領域を含む。具体的な実施形態では、挿入カセットは、目的のポリヌクレオチドをさらに含む。シングルクロスオーバー事象のみが起こるので、挿入カセット全体、およびそれに含有されるプラスミド／ベクターは、標的部位で組み込まれる。このような挿入カセットは、一般に、環状ベクター／プラスミドに含有される。米国公開第２００３／０１３１３７０号、同第２００３／０１５７０７６号、同第２００３／０１８８３２５号および同第２００４／０１０７４５２号、Thomasら（１９８７年）、Cell、５１巻：５０３～５１２頁ならびにPenningtonら（１９９１年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、８８巻：９４９８～９５０２頁を参照。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０６６２】

一部の実施形態では、ゲノム編集プラスミドは、二重相同組換えベクターである。例えば、相同組換えカセットは、「置き換えベクター」を含む。置き換え相同組換えカセットは、対応する真核細胞中の標的部位の第１および第２の領域に対して十分な配列同一性を有する第１および第２の領域を含む。二重相同組換えのクロスオーバー事象が起こり、第１および第２の領域の内部の任意のポリヌクレオチドが、標的部位で組み込まれる（すなわち、カセットの相同の第１の領域および標的部位の対応する第１の領域の間の相同組換え、ならびに組換えカセットの相同の第２の領域および標的部位の対応する第２の領域の間の相同組換え）。Yangら（２０１４年）、Applied and Environmental Microbiology、８０巻：３８２６～３８３４頁、Posfaiら（１９９９年）、Nucleic Acids Re

search、２７巻（２号）：４４０９～４４１５頁、Grafら（２０１１年）、Applied and Environmental Microbiology、７７巻：５５４９～５５５２号を参照。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０６６３】

プロトプラスト形成法

一実施形態では、本明細書に提供される方法およびシステムは、糸状菌細胞由来のプロトプラストの生成を使用する。プロトプラストを調製するための適当な手順は、例えば、ＥＰ２３８，０２３およびYeltonら（１９８４年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、８１巻：１４７０～１４７４頁）に記載されたものを含めて任意の当技術分野で公知のものであり得る。一実施形態では、プロトプラストは、１種または複数の溶菌酵素またはこれらの混合物を用いて糸状菌細胞の培養物を処理することによって生成される。溶菌酵素は、ベーターグルカナーゼおよび／またはポリガラクツロナーゼであり得る。一実施形態では、プロトプラストを生成するための酵素混合物は、ＶｉｎｏＴａｓｔｅ濃縮物である。酵素処理の後、プロトプラストは、例えば、遠心分離などの当技術分野で公知の方法を使用して単離することができる。

【０６６４】

前培養および実際のプロトプラスト形成（protoplasting）ステップを変えて、プロトプラストの数および形質転換効率を最適化することができる。例えば、接種量の変動、接種方法、前培養培地、前培養時間、前培養温度、混合条件、洗浄緩衝液組成、希釈比、溶菌酵素処理中の緩衝液組成、使用される溶菌酵素のタイプおよび／または濃度、溶菌酵素とのインキュベーションの時間、プロトプラスト洗浄手順および／または緩衝液、実際の形質転換中のプロトプラストおよび／またはポリヌクレオチドおよび／または形質転換試薬の濃度、形質転換中の物理的パラメータ、最大で得られる形質転換体までの形質転換後の手順が存在し得る。

【０６６５】

本開示は、２つまたはそれよりも多くの微生物株における遺伝子変化の迅速な統合のための、およびプロトプラスト融合に基づくＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．における遺伝的多様性を生成するための方法も提供する。一部の実施形態では、少なくとも１つの微生物株が「マークされた」変異を含有するとき、方法は、以下のステップを含む：（１）統合のために操作された株のプールから親株を選択するステップ；（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ；（３）目的の株を融合するステップ；（４）細胞を回収するステップ；（５）「マークされた」変異を有する細胞を選択するステップ；および（６）他の親株に由来する変異の存在について成長している細胞をジェノタイピングするステップ。必要に応じて、方法は、（７）「マークされた」変異からプラスミドを除去するステップをさらに含む。一部の実施形態では、微生物株が「マークされた」変異のどれも含有しないとき、方法は、以下のステップを含む：（１）統合のために操作された株のプールから親株を選択するステップ；（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ；（３）目的の株を融合するステップ；（４）細胞を回収するステップ；（５）第１の親株に由来する変異の存在について細胞を選択するステップ；および（６）他の親株に由来する変異の存在について細胞を選択するステップ。一部の実施形態では、株は、第１の親株および／または他の親株に由来する変異に関連する表現型に基づいて選択される。一部の実施形態では、株は、ジェノタイピングに基づいて選択される。一部の実施形態では、ジェノタイピングするステップは、ハイスループット手順で行われる。

【０６６６】

本明細書に記載の方法は、伝統的な方法と比較して極めて効率が良い。例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｐ．における変異を組み合わせる伝統的な様式は、組込みおよび対抗選択（約４５日）によって基準株への第１の変異を生成し、このようにして変異株（例えば、Ｍｕｔ１）を生成し、次いで、Ｍｕｔ１株をレシピエントとして使用する次の変異のプロセスを繰り返して行い、再び４５日の操作プロセスを完了して、こ

のようにして２つの変異を有する新しい株（例えば、Ｍｕｔ２）を生成させる。しかし、本開示の方法は、同じ株に達するのに、約１４日、１５日、１６日、１７日、１８日、１９日、２０日または２１日未満のみしか必要ではない。

【０６６７】

一部の実施形態では、ステップ（３）において、変異の有用な（新規な）組合せを生成する勝算を増加させるために、「マークされた」変異を有する株のより少ない細胞を使用することができ、このようにしてこれらの「マークされた」細胞を相互作用させ、異なる変異を有する細胞と融合させる機会を増加させる。一部の実施形態では、「マークされた」変異を有する株の細胞の「マークされていない」変異を有する株の細胞に対する比は、約１：１．５、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：５５、１：６０、１：６５、１：７０、１：７５、１：８０、１：８５、１：９０、１：９５、１：１００、１：２００、１：３００、１：４００、１：５００、１：６００、１：７００、１：８００、１：９００、１：１０００、またはそれよりも高い。

【０６６８】

一部の実施形態では、ステップ（４）において、細胞は、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培地に蒔かれ、これは、手順を簡素化し、より容易な自動化を可能にする。浸透圧安定化剤は、対抗選択マーカー遺伝子（例えば、ｓａｃＢ遺伝子）を含有する可能性がある細胞の増殖を可能にするようなものである。プロトプラスト化細胞は、処理に対して非常に敏感で、容易に死滅する。このステップは、十分な細胞を回収することを保証する。このステップがより良好に機能するほど、より多くの材料を下流分析のために使用することができる。

【０６６９】

一部の実施形態では、ステップ（５）において、ステップは、成長している細胞に適切な抗生物質をオーバーレイすることによってなしとげられる。親細胞のどちらもが「マークされた」変異を有さない場合では、株を、目的の株を同定するために他の手段によってジェノタイピングすることができる。このステップは、必要に応じてであり得るが、これは、細胞融合を受ける可能性が最も高い細胞を富化させることを保証する。複数の遺伝子座を「マーク」することが可能であり、この方法により、目的の組合せをより素早く生成できるが、次いで複数のプラスミドは、「無傷の」株を有したい場合に除去されなければならない場合がある。

【０６７０】

一部の実施形態では、ステップ（６）において、ジェノタイピングされたコロニーの数は、交差の複雑性および選択スキームに依存する。

【０６７１】

一部の実施形態では、ステップ（７）は、必要に応じてであり、追加の検証またはクライアント送達のために推奨される。一部の実施形態では、株についての操作サイクルの最後に、すべてのプラスミドのレムナントを除去する必要がある。これが、いつ、どのぐらいの頻度で実行されるかは、ユーザーの裁量である。一部の実施形態では、対抗選択可能なｓａｃＢ遺伝子の存在は、このステップを直接的なものにする。一部の実施形態では、少なくとも１つの株は「マークされた」変異を有する。一部の実施形態では、単一の統合ステップの間に融合した株の数は、２またはそれよりも多く、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、またはそれよりも多くあり得る。一部の実施形態では、融合するための１つまたは複数の株を、目的の遺伝子座で選択マーカーによってタグ化することができる。一部の実施形態では、親株の１つが「マークされた」遺伝子変異を含むとき、他の親株における遺伝子変異はマークされないが、マークされていない株対マークされた株の比は、約１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１、９

０：１、１００：１、１５０：１、２００：１、２５０：１、３００：１、またはそれよりも高い。一部の実施形態では、親の集団が、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはそれよりも多くを超えてマークされていない株を有するとき、それぞれの等しい比率が使用される。一部の実施形態では、生きているマークされていない株および死んだマークされた株が使用されるとき、生：死の比は、約１：１または約１：２（生：死）である。

【０６７２】

本開示の方法は、先に記載の方法（Practical Streptomyces Genetics、ISBN 0-7084-0623-8）と比較して重要な改善を含有する。このような改善としては、これらに限定されないが、以下が挙げられる。

・プロトプラスト生成のための最初の遠心分離は、より高速（５０００×ｇ対１０００×ｇ）で、より短い時間の５分対１０分で行われる。これは、プロトコールを完了させるために必要な時間を短縮する。

・一部の実施形態では、改変された組成を有するＹＥＭＥ培地は、ｓａｃＢ遺伝子を有する株の使用を順応させるために使用される典型的なＹＥＭＥ組成物は、スクロースを含み、これは、ｓａｃＢ遺伝子を有する株には許容されない。我々の改変ＹＥＭＥ培地は、スクロースを１Ｍのソルビトールで置換する。

・一部の実施形態では、プロトプラストから菌糸体を分離するために、消化された細胞を脱脂綿に通して行われる濾過ステップはない。一部の実施形態では、酵素処理後に菌糸体が残っていないので、このステップは必要ではない。

・一部の実施形態では、産生したプロトプラストは、Practical Streptomyces Genetics（ISBN 0-7084-0623-8）において推奨されている体積の約１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、またはそれ未満で再懸濁され、後続のスピンステップで除去され、自動化を容易にする。

・一部の実施形態では、融合プロトプラストは、上層寒天ではなくＲ２ＹＥブロス中で回収される。これは、自動化およびハンドリングを大幅に簡素化する。寒天は固化およびチップを詰まらせ得、プロトコールの間、保温する必要がある。ブロスはこれらの複雑さを有さない。この改変は、プロトプラストの生存能を大幅に低下させない。

・一部の実施形態では、プロトプラストは、０．５Ｍのソルビトールおよび０．５Ｍのマンノースで補充されたＲ２ＹＥ培地で回収される。この処方は、開発するために時間および実験が必要であった。本発明者らは、もともと、１Ｍまたは０．５Ｍでのソルビトールのみの使用を試みていたが、これは、プロトプラストの安定化に有効ではなく、細胞増殖は、１Ｍのソルビトールの存在下で遅かった。しかし、本発明者らは、培地がソルビトールおよびマンノース（それぞれ０．５Ｍ）で補充されると、浸透圧安定化培地としてより良好に機能することを見出した。

【０６７３】

一部の実施形態では、ステップ（２）において、細胞壁は、リゾチーム処理によって除去される。一部の実施形態では、無菌Ｐ－緩衝液中に約１ｍｇ／ｍｌ、２ｍｇ／ｍｌ、３ｍｇ／ｍｌ、４ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、６ｍｇ／ｍｌ、７ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ、９ｍｇ／ｍｌ、または１０ｍｇ／ｍｌのリゾチームが使用される。一部の実施形態では、総インキュベーション時間は、３７℃で、約７０分、７５分、８０分、８５分、９０分、９５分、または１００分である。一部の実施形態では、結果として生じたプロトプラストは、それらが水によって溶解されるか否かを評価することによって、検証される。一部の実施形態では、顕微鏡によって、および浸透圧安定化された培地における成長によって、感水性を決定することができる。

【０６７４】

宿主細胞の形質転換

一部の実施形態では、本開示のベクターは、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃、またはＴｉ媒介遺伝子移入を含めた様々な技法のいずれかを使用して宿主細胞内に導入することができる（Christie, P.J.およびGordon, J.E.、

２０１４年、「The Agrobacterium Ti Plasmids」、Microbiol SPectr.、２０１４年；２巻（６号）；１０．１１２８頁を参照）。特定の方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、または電気穿孔が挙げられる（Davis, L.、Dibner, M.、Battey, I.、１９８６年、「Basic Methods in Molecular Biology」）。形質転換の他の方法としては、例えば、酢酸リチウム形質転換および電気穿孔が挙げられる。例えば、Gietzら、Nucleic Acids Res.、２７巻：６９～７４頁（１９９２年）；Itoら、J. Bacterol.、１５３巻：１６３～１６８頁（１９８３年）；ならびにBeckerおよびGuarente、Methods in Enzymology、１９４巻：１８２～１８７頁（１９９１年）を参照。一部の実施形態では、形質転換宿主細胞は、組換え宿主株と呼ばれる。

【０６７５】

一部の実施形態では、本開示は、本開示の９６－ウェルプレートロボットプラットフォームおよび液体ハンドリング機械を使用する細胞のハイスループット形質転換を教示する。

【０６７６】

一部の実施形態では、本開示は、上述した１種または複数の選択マーカーを有する形質転換細胞をスクリーニングすることを教示する。このような一実施形態では、カナマイシン耐性マーカー（ＫａｎＲ）を含むベクターで形質転換された細胞を、有効量のカナマイシン抗生物質を含有する培地に蒔く。カナマイシンが入った培地上で目に見えるコロニー形成単位は、ベクターカセットをこれらのゲノム内に組み入れたと推定される。所望の配列の挿入は、関連した挿入部位のＰＣＲ、制限酵素分析、および／またはシーケンシングを介して確認することができる。

【０６７７】

選択された配列のループアウト

一部の実施形態では、本開示は、宿主生物からＤＮＡの選択された領域をループアウトする方法を教示する。ループアウト法は、Nakashimaら、２０１４年、「Bacterial Cellular Engineering by Genome Editing and Gene Silencing.」、Int. J. Mol. Sci.、１５巻（２号）、２７７３～２７９３頁に記載された通りのものであり得る。一部の実施形態では、本開示は、陽性形質転換体から選択マーカーをループアウトすることを教示する。ループアウト欠失技法は、当技術分野で公知であり、（Tearら、２０１４年、「Excision of Unstable Artificial Gene-Specific inverted Repeats Mediates Scar-Free Gene Deletions in Escherichia coli.」、Appl. Biochem. Biotech.、１７５巻：１８５８～１８６７頁）に記載されている。本明細書に提供される方法で使用されるループアウト法は、シングルクロスオーバー相同組換えまたはダブルクロスオーバー相同組換えを使用して実施することができる。一実施形態では、本明細書に記載の選択された領域のループアウトは、本明細書に記載のシングルクロスオーバー相同組換えを使用することを必然的に伴い得る。

【０６７８】

第１に、ループアウトベクター（loop out vector）が、宿主生物のゲノム内の選択された標的領域内に挿入される（例えば、相同組換え、ＣＲＩＳＰＲ、または他の遺伝子編集技法を介して）。一実施形態では、シングルクロスオーバー相同組換えが、図３に表したものなどの環状プラスミドまたはベクターをループインするために、環状プラスミドまたはベクターと宿主細胞ゲノムとの間に使用される。挿入されるベクターは、既存のまたは導入される近傍の宿主配列のダイレクトリピートである配列を用いて設計することができ、その結果、ダイレクトリピートがルーピングおよび欠失を予定しているＤＮＡの領域に隣接する。挿入されると、ループアウトプラスミドまたはベクターを含有する細胞を、選択領域の欠失について対抗選択することができる（例えば、図４；選択遺伝子に対する耐性の欠如を参照）。

【０６７９】

当業者は、ループアウト手順の記載は、ゲノムから望まれない領域を欠失させるための一例示的方法を代表するにすぎないことを認識する。実際に、本開示の方法は、これらに

限定されないが、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮＳ、ＦＯＫ、または他のエンドヌクレアーゼを介した遺伝子編集を含めて、ゲノム欠失の任意の方法に適合する。当業者は、相同組換え技法を介してゲノムの望まれない領域を置き換える能力も認識する。

【０６８０】

中立の組込み部位。外来遺伝子およびさらに全経路は、多くの場合、シャーシ生物体に移植され、プラスミドに基づく発現、またはゲノム組込みのための中立部位の同定のいずれかが必要である。ゲノム組込みがより安定で、プラスミドに基づく発現と比較して予測可能であるので、これは、多くの場合、改変のため、特に工業用微生物株のための好ましい方法である。

【０６８１】

これらの中立の組込み部位は、個々の遺伝子または多重遺伝子のカセットがＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．株などの微生物株のゲノム内に安定的および効率的に組み込まれ得る遺伝的な遺伝子座である。これらの部位への配列の組込みは、株の増殖に対して効果がないか、または限られた効果を有する。本明細書で使用される場合、「中立の組込み部位」とは、微生物細胞の染色体上に生来存在する遺伝子または染色体の遺伝子座を指し、その正常な機能は、細胞の増殖のため、またはある特定の生物学的プロセスのためのすべての機能を実施する細胞の能力のために必要ではない。その遺伝子内に通常存在しないＤＮＡ配列の組込みによって破壊されたとき、破壊された中立の組込み部位遺伝子を宿す細胞は、生物学的プロセスを生産的に実施することができる。

【０６８２】

一部の実施形態では、本開示は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける中立の組込み部位（ＮＩＳ）を提供する。このような中立の組込み部位としては、これらに限定されないが、配列番号１３２～配列番号１４２のいずれか１つの配列を有する遺伝子座が挙げられる。これらのＮＩＳは、すべてのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．の中で保存的であり得る。よって、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるＮＩＳに対する相同性を共有しないが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ以外のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．における遺伝子座は、潜在的な中立の組込み部位でもある。

【０６８３】

このような中立の組込み部位は、複数の有用性を有する。例えば、相対的に大きなサイズの外因性ＤＮＡ断片は、本明細書に記載の単一の中立の組込み部位に挿入され得る。このようなＤＮＡ断片は、宿主細胞の増殖に影響することなく、少なくとも５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、１７ｋｂ、１８ｋｂ、１９ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、６０ｋｂ、７０ｋｂ、８０ｋｂ、９０ｋｂ、１００ｋｂ、またはそれよりも大きいサイズを有し得る。

【０６８４】

ＮＩＳに組み込まれるＤＮＡ断片は、任意の所望の配列であり得る。このような組み込まれるＤＮＡ断片は、宿主細胞に新しい機能をもたらし、宿主細胞の既存の機能を増強し、または宿主細胞の増殖に負に影響し得る任意の因子の効果を低減し得る。例えば、中立の組込み部位に挿入される遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．株は、挿入を有さない参照株と比較して、改善された性能（例えば、スピノシンなどの１つまたは複数の目的の分子の改善された収率）を有し得る。

【０６８５】

一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、宿主細胞に対して相同および／または異種の配列を含む。一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、宿主細胞で機能する選択されたプロモーターを含む。一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、宿主細胞で機能する選択されたターミネーター配列を含む。一部の実施形態では、プロモーターおよびターミネーター配列は、本開示に記載の配列または本分野において公知のもののいずれかであり得る。

【０６８６】

一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、１つまたは複数の選択マーカーを含み、これは、組み込まれたＤＮＡ断片を含む細胞について選択するために使用することができる。一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、対抗選択マーカーを含み、これは、組み込まれたＤＮＡ断片の完全または一部のループアウトを促進するために使用することができる。

【０６８７】

一部の実施形態では、１つまたは複数の外因性遺伝子は、本開示に記載のようにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．のＮＩＳに組み込んで、新規経路を確立するなど、微生物種に新規機能を導入することができる。一部の実施形態では、このような新規経路は、天然の宿主細胞に存在しない、合成経路および／またはシグナル伝達形質導入経路である。一部の実施形態では、組み込まれるＤＮＡ断片は、インテグラーゼのための結合部位を含有し、生合成経路またはその成分のその後の効率的な標的化組込みを可能にする。一部の実施形態では、二次代謝産物のための生合成経路の一部である１つまたは複数の遺伝子産物をコードする全遺伝子クラスターまたは遺伝子クラスターの一部を含むＤＮＡ断片が、本開示のＮＩＳに組み込まれる。二次代謝産物は、多くの場合、食害および他の種間の防御に対する植物防御における重要な役割を果たす。二次代謝産物は、複雑な微生物環境における栄養素および生息地についての争いにおいて役割を有し得る。一部の実施形態では、二次代謝産物は、競合する細菌、真菌、酵母または他の生物体に対して生物活性を有する。一部の実施形態では、二次代謝産物は、競合相手の栄養摂取酵素の阻害剤として作用するか、または抗細菌もしくは抗真菌活性を直接示す。一部の実施形態では、二次代謝産物は、競合相手の防御機構を無効にし、さらに他に、競合相手の攻撃機構を無効にする。二次代謝産物が、化学特性の観点で信じがたい豊富な多様性を示すことは周知である。したがって、人間は、薬、香味剤、およびレクリエーショナルドラッグとして一部の二次代謝産物を使用する。二次代謝産物は、以下のカテゴリーに分けることができる。ベーターラクタム、アルカロイド、テルペノイド、グリコシド、天然フェノール、フェナジン、ビフェニルおよびジベンゾフラン（dibenzufuran）などの小さな「低分子」；ポリケチド、複合グリコシド、非リボソームペプチドおよび上記３つのハイブリッドなどの大きなモジュール型「分子工場」によって産生される大きな「低分子」；ならびにリボソームペプチドなどの非「低分子」－ＤＮＡ、ＲＮＡ、リボソーム、または多糖の「古典的な」生体高分子。

【０６８８】

一部の実施形態では、本開示のＮＩＳは、ベクターに組み入れることができる。「ベクター」は、別のＤＮＡセグメント（例えば、外来遺伝子）が、結合されたセグメントの複製をもたらし、導入された配列の発現を生じるように組み入れられ得る、プラスミド、ファージ、細菌人工染色体（ＢＡＣ）またはコスミドなどのレプリコンである。ベクターは、プロモーターおよび導入されるＤＮＡに異種であるが宿主細胞によって認識および使用される１つまたは複数の制御エレメント（例えば、エンハンサーエレメント）を含み得る。一部の実施形態では、前記ベクターは、異なる微生物種のゲノムにさらに組み入れられ得、このようにして、異なる微生物種においてＮＩＳを確立する。例えば、本開示に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのＮＩＳは、関連するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種のゲノムに組み入れることができる。

【０６８９】

インテグラーゼ

「インテグラーゼ」と呼ばれる酵素は、２つの結合（ａｔｔ）部位（宿主の染色体中のｔＲＮＡ遺伝子内に典型的に位置する保存ヌクレオチド配列）を認識し、２つのＤＮＡ分子を繋ぎ、ＤＮＡの二本鎖の破損を触媒する。再接合事象は、レシピエント細胞の他のＤＮＡにＤＮＡ分子の１つの組込みをもたらす（Ｎ．Ｄ．Ｇｒｉｎｄｌｅｙ、Ｋ．Ｌ．Ｗｈｉｔｅｓｏｎ、Ｐ．Ａ．Ｒｉｃｅ、２００６年、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ.、７５巻、５６７～６０５頁）。したがって、インテグラーゼは、保存部位で認識および結合によってＤＮＡペイロードの標的組込みを指向することができる。

【０６９０】
本開示は、ドナー生物体から宿主細胞へのＤＮＡ断片の標的化クローニングおよび／または移入のための組成物および方法を提供する。一部の実施形態では、改変される宿主細胞は、所与のインテグラーゼによって認識され得るａｔｔ部位と同一の配列または相同性を有する配列を含む。一部の実施形態では、改変される宿主細胞は、所与のインテグラーゼによって認識され得るａｔｔ部位と同一の配列または相同性を有する配列を含まない。第２のシナリオでは、ａｔｔ部位と同一の配列または相同性を有する配列は、本開示に記載のＮＩＳなどの宿主細胞中の中立の組込み部位に最初に挿入され得る。
【０６９１】
一部の実施形態では、インテグラーゼは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種に由来する。一部の実施形態では、インテグラーゼは、Ｓ．ｅｎｄｏｐｈｙｔｉｃａ、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａまたは Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに由来する。一部の実施形態では、インテグラーゼは、配列番号８５、８７、８９、９１、９３、またはその任意の機能的バリアントの配列を含む。
【０６９２】
一部の実施形態では、インテグラーゼは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種に由来するａｔｔ部位を認識する。一部の実施形態では、ａｔｔ部位は、Ｓ．ｅｎｄｏｐｈｙｔｉｃａ、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａまたは Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに由来する。一部の実施形態では、インテグラーゼの結合部位は、配列番号１６７～１７１、またはその任意の機能的バリアントの配列を含む。
【０６９３】
一部の実施形態では、宿主細胞のゲノムに組み込まれるＤＮＡ断片は、少なくとも５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、１７ｋｂ、１８ｋｂ、１９ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、６０ｋｂ、７０ｋｂ、８０ｋｂ、９０ｋｂ、１００ｋｂ、またはそれよりも大きいサイズを有する。
【０６９４】
本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種などの宿主細胞のゲノムに外因性ＤＮＡを組み込むためのベクターを提供する。
【０６９５】
一部の実施形態では、ベクターは、エクシジョナーゼ（ｘｉｓ）、インテグラーゼ（ｉｎｔ）および／または結合部位（ａｔｔＰ）をコードする配列を含む。一部の実施形態では、前記ベクター中の配列は、Ｓ．ｅｎｄｏｐｈｙｔｉｃａに由来する。一部の実施形態では、ベクターは、Chenら（「Characterization of the chromosomal integration of Saccharopolyspora plasmid pCM32 and its application to improve production of spinosyn in Saccharopolyspora spinosa」、Applied Microbiology and Biotechnology、PMID 26260388、DOI: 10.1007/s00253-015-6871-z）に記載のｐＣＭ３２に基づく。一部の実施形態では、前記ベクター中の配列は、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａに由来する。一部の実施形態では、ベクターは、Te Poeleら（「Actinomycete integrative and conjugative elements」、Antonie Van Leeuwenhoek、９４巻、１２７～１４３頁）に記載のｐＳＥ１０１および／またはｐＳＥ２１１に基づく。
【０６９６】
一部の実施形態では、本開示のベクターは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのゲノム中の配列を認識する。一部の実施形態では、本開示のインテグラーゼによって認識され得るＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのゲノム中の配列は、配列番号１６７～１７１、またはこれらの任意の機能的バリアントから選択される配列を有する。一部の実施形態では、Ｓ．ｅｎｄｏｐｈｙｔｉｃａおよび／または Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａに由来するａｔｔ部位は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのゲノムに導入される。一部の実施形態では、Ｓ．ｅｎｄｏｐｈｙｔｉｃ

ａおよび／またはＳ．ｅｒｙｔｈｒａｅａに由来するａｔｔ部位は、本開示に記載のもののいずれかなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのＮＩＳに導入される。

【０６９７】

インテグラーゼを使用するための追加のツールおよび方法は、ＷＯ／２００１／０５１６３９Ａ２、ＷＯ／２０１３／１８９８４３Ａ１、ＷＯ／２００１／０８７９３６Ａ２、ＷＯ／２００１／０８３８０３Ａ１、ＷＯ／２００１／０７５１１６Ａ２および米国特許第６５６９６６８号に記載されている。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０６９８】

複製起点

本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種のために使用することができる自己複製プラスミドシステムのための複製起点および複製エレメントも提供する。

【０６９９】

一部の実施形態では、自己複製の起点およびエレメントは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．において実施され得るタイプの遺伝子操作およびスクリーニングを増強する。一部の実施形態では、自己複製起点は、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａからの推定染色体複製起点に由来する（配列番号９４）。一部の実施形態では、自己複製起点は、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａからのプラスミドｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１の複製における放線菌組込み接合エレメント（ＡＩＣＥ）に由来する（それぞれ、配列番号９５および配列番号９６）。一部の実施形態では、本開示の自己複製のための起点は、抗生物質耐性マーカーを含有するプラスミドに、自己複製のために必要な他の遺伝子あり、またはなしで、アセンブルされる（例えば、ＡＩＣＥの場合において）。アセンブルされたプラスミドは、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．に送達され得、抗生物質選択を使用して、自己複製プラスミドを有する形質転換体について選択することができる。

【０７００】

一部の実施形態では、本開示の自己複製起点は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種に導入することができる。一部の実施形態では、複製起点を含むＤＮＡ断片は、相対的に大きな、例えば、少なくとも５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、１７ｋｂ、１８ｋｂ、１９ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、６０ｋｂ、７０ｋｂ、８０ｋｂ、９０ｋｂ、１００ｋｂ、またはそれよりも大きいサイズを有する。

【０７０１】

一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種に導入される複製起点を含むＤＮＡ断片は、宿主細胞に新しい機能をもたらす、宿主細胞の既存の機能を増強する、または宿主細胞の増殖に負に影響し得る任意の因子の効果を低減し得る。例えば、ゲノムに挿入される遺伝子エレメントを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．株は、挿入を有さない参照株と比較して、改善された性能（例えば、スピノシンなどの１つまたは複数の目的の分子の改善された収率）を有し得る。

【０７０２】

一部の実施形態では、導入される複製起点を含むＤＮＡ断片は、宿主細胞に対して相同および／または異種の配列を含む。一部の実施形態では、導入される複製起点を含むＤＮＡ断片は、宿主細胞で機能する選択されたプロモーターを含む。一部の実施形態では、導入されるＤＮＡ断片は、宿主細胞で機能する選択されたターミネーター配列を含む。一部の実施形態では、プロモーターおよびターミネーター配列は、本開示に記載の配列または本分野において公知のもののいずれかであり得る。

【０７０３】

一部の実施形態では、導入される複製起点を含むＤＮＡ断片は、１つまたは複数の選択

マーカーを含み、これは、ＤＮＡ断片を含む細胞について選択するために使用することができる。一部の実施形態では、導入される複製起点を含むＤＮＡ断片は、対抗選択マーカーを含み、これは、ＤＮＡ断片の完全または一部のループアウトを促進するために使用することができる。

【０７０４】

一部の実施形態では、１つまたは複数の外因性遺伝子は、複製起点と一緒にＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．に導入されて、新規経路を確立するなど、微生物種に新規機能を導入することができる。一部の実施形態では、このような新規経路は、天然の宿主細胞に存在しない、合成経路および／またはシグナル伝達形質導入経路である。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子産物をコードする全遺伝子クラスターまたは遺伝子クラスターの一部を含むＤＮＡ断片は、二次代謝産物のための生合成経路の一部である。

【０７０５】

レポーター

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａは、非常にわずかしか分子生物学ツールが確立されていない、大いに扱いにくい属の宿主である。これらのツールは、操作ツールおよび操作の取り組みの開発のために極めて重要である。本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａなどのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ種のためのレポータータンパク質およびアッセイも提供する。よって、本開示は、不足しているレポーターシステムを提供する。

【０７０６】

一部の実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．で機能するレポータータンパク質を提供する。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、蛍光タンパク質および酵素のベータ－グルクロニダーゼである。一部の実施形態では、蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質である。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、Ｄａｓｈｅｒ　ＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａ　ＲＦＰ（ATUM、https://www.atum.bio/products/protein-paintbox?exp=2）ならびに酵素のベータ－グルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）（Jeffersonら（１９８６年）、「Beta-Glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker」、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、８３巻（２２号）：８４４７～５１頁）である。

【０７０７】

一部の実施形態では、レポータータンパク質をコードする遺伝子は、コドン最適化されている。一部の実施形態では、蛍光タンパク質をコードする遺伝子は、Ｅ．ｃｏｌｉのためにコドン最適化されている。一部の実施形態では、蛍光タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号８１または配列番号８２のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、ベータ－グルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）をコードする遺伝子は、例えば、配列番号８３のヌクレオチド配列を有する、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける発現のためにコドン最適化されている。

【０７０８】

一部の実施形態では、蛍光タンパク質をコードする遺伝子は、レポータータンパク質の蛍光の励起および発光スペクトルを変更するために修飾される。

【０７０９】

一部の実施形態では、２つまたはそれよりも多くの蛍光タンパク質は、単一のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞中で使用される。一部の実施形態では、緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質は、単一のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞中で使用される。一部の実施形態では、緑色蛍光レポータータンパク質および赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光の励起および発光スペクトルは、互いに異なる。

【０７１０】

一部の実施形態では、本開示のレポータータンパク質は、遺伝子発現のための調節エレ

メントの活性を決定するために使用される。一部の実施形態では、調節エレメントは、プロモーター、リボソーム結合部位、開始／停止コドン、ターミネーター、エンハンサー、サプレッサー、一本鎖ＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、よく似たエレメント、またはこれらの任意の組合せであり得る。例えば、プロモーターが、本開示のレポーターをコードする配列に作動可能に連結され、微生物株中で発現するとき、遺伝子発現の促進におけるプロモーターの強度は、蛍光シグナルによって決定することができる。同様に、本開示のレポーターをコードする配列が、ターミネーター配列に作動可能に連結されるとき、遺伝子発現の抑制におけるターミネーターの強度は、蛍光シグナルによって決定することができる。よって、一部の実施形態では、レポーターは、プロモーター、リボソーム結合部位、開始／停止コドン、ターミネーター、エンハンサー、サプレッサー、一本鎖ＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、およびよく似たエレメントの群の強度を決定するため、よって、ラダー（ライブラリー）を確立するために有用である。一部の実施形態では、本開示のレポータータンパク質は、スクリーニングツールとして使用することができる。例えば、レポータータンパク質によって「マークされた」所与の表現型を有する株は、例えば、フローサイトメトリーによって、レポータータンパク質の存在もしくは非存在、または励起スペクトル下のプレートにおける観察に基づいて、選別することができる。

【０７１１】

一部の実施形態では、本開示のレポータータンパク質は、内在性または外因性のポリペプチドに融合して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞中で発現することができる。一部の実施形態では、レポータータンパク質は、ユーザーが所望する任意の方法で使用することができる。

【０７１２】

一部の実施形態では、本開示のレポータータンパク質をコードする遺伝子は、ターミネーター配列に連結され得る。一部の実施形態では、ターミネーターは、配列番号１４９の配列を有する。

【実施例】

【０７１３】

以下の実施例は、本開示の種々の実施形態を例証するために提供するのであって、それらには、いかなる場合であっても、本開示を制限する意図はない。特許請求の範囲により定義される、本開示の精神の範囲内に包含されるその変化および他の使用は、当業者により認識される。

【０７１４】

簡潔な目次を、下記に提供するが、これはもっぱら、読者を支援するためである。この目次により、本出願の実施例または開示の範囲を制限する意図は全くない。

【表６－１】

表 6-実施例のセクションの目次

実施例の番号	表題	簡潔な説明
1	*Saccharopolyspora* の HTP 形質転換および SNP ライブラリー創製の実証	本開示の**ハイスループット遺伝子操作**法の実施形態を記載する。
2	HTP ゲノム操作-工業用微生物株を再建/改良するための、SNP ライブラリーのインプリメンテーション	工業用生物を、本開示の **SNP スワップ**方法により再建するための手法について記載する。
3	HTP ゲノム操作-*Saccharopolyspora* 中でのスピノシン産生における株性能を改善するための、SNP スワップライブラリーのインプリメンテーション	**スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* の株性能を改善**するための **SNP スワップ**技法のインプリメンテーションについて記載する。また、選択された**二次および三次の変異の統合**も開示する。
4	HTP ゲノム操作-工業用微生物株を改良するための、プロモータースワップライブラリーのインプリメンテーション	宿主生物の株性能を、本開示の **PRO スワップ**遺伝子設計ライブラリーにより改善するための方法について記載する。
5	HTP ゲノム操作-スピノシンの産生に関して、株性能を改善するための PRO スワップライブラリーのインプリメンテーション	**スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* 株の性能を改善**するための **PRO スワップ**技法のインプリメンテーションについて記載する。
6	上位性マッピング-変異の有益な統合を予測するための、アルゴリズムツール	**遺伝子変異の有益な統合を予測する**ための、本開示の**自動化されたツール/アルゴリズム**の実施形態について記載する。
7	HTP ゲノム操作-PRO スワップ変異の統合および多因子のコンビナトリアルな試験	本開示の HTP 方法により、**遺伝子/遺伝子設計ライブラリーを複数組み合わせたコンビナトリアルな統合により創製される大きな解空間を有効に探索すること**が可能になることについて記載し、例示する。

【表６－２】

実施例の番号	表題	簡潔な説明
8	HTP ゲノム操作-工業用宿主株を改良するための、ターミネーターライブラリーのインプリメンテーション	本開示の **STOP スワップ**遺伝子設計ライブラリーの適用について記載し、例示する。
9	HTP ゲノム操作-遺伝子変化の迅速な統合および *Saccharopolyspora* において遺伝的多様性を生成するため	遺伝子変化を**迅速に統合**するためおよび**スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* 株**において遺伝的多様性を生成するための方法について記載する。
10	HTP ゲノム操作-*Saccharopolyspora* に使用するためのレポータータンパク質および関連アッセイ	*Saccharopolyspora spinosa* における **3 つのレポーター遺伝子の利用および定量的な評価**の実施形態について記載する。 本発明はまた、*S. spinosa* における GusA の発現の定量的な評価を可能にする比色分析アッセイの最適化および適用についても記載する。
11	HTP ゲノム操作-*Saccharopolyspora spinosa* における標的化した効率的なゲノム組込みのためのインテグラーゼベースのシステム	*Saccharopolyspora* のゲノム内に**遺伝子エレメントを組み込むためのインテグラーゼベースのシステム**について記載する。
12	*Saccharopolyspora spinosa* のための自己複製プラスミドシステムのための複製起点	*Saccharopolyspora* において複製機能を有する**複製起点および複製エレメント**について記載する。
13	HTP ゲノム操作-工業用宿主株を改良するための、ターミネーターライブラリーのインプリメンテーション	スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* の株性能を改善するための**リボソーム結合部位**技法のインプリメンテーションについて記載する。

【表６－３】

実施例の番号	表題	簡潔な説明
14	HTP ゲノム操作-*Saccharopolyspora* の株性能を改善するための、トランスポゾン変異誘発ライブラリーのインプリメンテーション	スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* の株性能を改善するためのトランスポゾン変異誘発技法のインプリメンテーションについて記載する。
15	*Saccharopolyspora* における遺伝子エレメントの挿入のための中立の組込み部位	配列を *Saccharopolyspora* のゲノム内に組み込むための**中立の組込み部位**のインプリメンテーションについて記載する。
16	HTP ゲノム操作-*Saccharopolyspora* の株性能を改善するための、抗代謝産物選択/発酵産物耐性ライブラリーのインプリメンテーション	スピノシンを産生する *Saccharopolyspora* の株性能を改善するための**抗代謝産物/発酵産物耐性**技法のインプリメンテーションについて記載する。
17	HTP ゲノム操作-無傷の変異体株を生成するための *S. spinosa* における対抗選択マーカーとしての sacB または pheS の使用	**対抗選択マーカーとして sacB または pheS を使用して無傷の変異** *Saccharopolyspora* 株を**創製する**方法のインプリメンテーションについて記載する。
18	*Saccharopolyspora* の HTP コンジュゲーションおよび Saccharopolyspora 内への外因性 DNA 導入の実証	本開示の**ハイスループット遺伝子操作**法の実施形態について記載する。

【０７１５】

（実施例１）

ＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのＨＴＰ形質転換およびＳＮＰライブラリー創製の実証

この実施例は、本開示のＨＴＰ遺伝子操作法の実施形態を示す。宿主細胞を、異なるサイズの多様なＳＮＰ配列を用いて形質転換し、すべて、ゲノムの異なるエリアを標的化する。結果から、本開示の方法により、任意の種類の迅速な遺伝子変化を、宿主細胞のゲノム全体にわたり生成することが可能であることが示されている。

【０７１６】

Ａ．形質転換ベクターのクローニング

「カスタムプラスミドのアセンブリー／クローニング」のセクションにおける上記の記載の通り、および図３に示すように、多様なＳＮＰを、所定のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓｅ株）からランダムに選び、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａクローニングベクター中に、酵母相同組換えクローニングの技法を使用してクローニングして、各ＳＮＰがダイレクトリピート領域に隣接する、ベクターをアセンブルする。

【０７１７】

この実施例のためのＳＮＰカセットは、約０．５Ｋｂ、１Ｋｂ、２Ｋｂおよび５Ｋｂの範囲のダイレクトリピート相同アームの様々な長さまたは任意の他の所望の長さを含むように設計する。さらに、ＳＮＰカセットは、下記でより詳細に記載する通り、ゲノムの種々の明確に異なる領域を標的とする相同組換えのために設計する。Ｃｏｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍにおいて実証された例示的な形質転換実験については、図１０を参照されたい。しかし、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのために類似の手順がカスタマイズされており、本発明者らによってうまく実施されている。

【０７１８】

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノムのサイズは、約８，５８１，９２０ｂｐであり（図９を参照されたい）、約８，３０２個の予測されたコード配列（ＣＤＳ）を含有する。Panら（ＪＯＵＲＮＡＬ　ＯＦ　ＢＡＣＴＥＲＩＯＬＯＧＹ、２０１１年６月、３１５０～３１５１頁、doi:10.1128/JB.00344-11）を参照されたい。ゲノムを、等しいサイズの遺伝子領域に恣意的に分けることができ、ＳＮＰカセットを、領域のそれぞれを標的とするように設計する。

【０７１９】

各ＤＮＡ挿入断片を、相同領域のＰＣＲ増幅により、商業的に供給されているオリゴ、および鋳型としての、上に記載した宿主株のゲノムＤＮＡを使用して産生する。ゲノム中に導入しようとするＳＮＰを、オリゴのテールにコードする。酵母において、ＰＣＲ断片を、ベクターの骨格中に相同組換えを使用してアセンブルする。

【０７２０】

ベクター中への各ＳＮＰおよび相同アームのクローニングを、図６Ａ～Ｂ、図３および表５に記載するＨＴＰ操作のワークフローに従って実施する。

【０７２１】

Ｂ．　Ｅ．ｃｏｌｉ中へのアセンブルされたクローンの形質転換

最初に、標準的な熱ショック形質転換の技法を使用して、ベクターをＥ．ｃｏｌｉ中へ形質転換して、正確にアセンブルされたクローンを同定し、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａの形質転換のためのベクターＤＮＡを増幅する。

【０７２２】

例えば、形質転換したＥ．ｃｏｌｉ細菌を、アセンブリーの成功について試験する。各Ｅ．ｃｏｌｉ形質転換プレートからのコロニーを培養し、正確なアセンブリーについてＰＣＲにより試験する。このプロセスを、形質転換の場所のそれぞれおよび異なる挿入断片サイズのそれぞれについて繰り返す。この実験からの結果を、各処理（挿入断片サイズおよびゲノムの場所）について試験するコロニーから同定した正確なコロニーの数として表す。

【０７２３】

Ｃ．　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中へのアセンブルされたクローンの形質転換

バリデートしたクローンを、電気穿孔によりＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ宿主細胞に形質転換する。各形質転換について、１μｇのＤＮＡ当たりのコロニー形成単位（ＣＦＵ）の数を、挿入断片サイズの関数として決定した。また、ゲノムへの組込みを、相同アームの長さの関数としても分析する。

【０７２４】

また、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ形質転換体中の標的化したゲノムの場所に関するゲノムへの組込み効率も分析する。

【０７２５】

Ｄ．　選択マーカーのループアウト

挿入断片カセットの組込みに成功したことが同定されたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａの培養物を培地上で培養し、対抗選択して、選択遺伝子をループアウトする。これらの結果から、ループアウト効率が、０．５ｋｂ～５ｋｂの相同アームの長さまたは他の所望の長さにわたり一様に維持されるかどうかが示される。

【０７２６】

ループアウト事象をさらにバリデートするために、耐性を示すコロニーを培養し、シーケンシングにより分析する。

【０７２７】

（実施例２）

ＨＴＰゲノム操作－工業用微生物株を再建／改良するための、ＳＮＰライブラリーのインプリメンテーション

この実施例は、本開示のＨＴＰ株改良プログラムのＳＮＰスワップライブラリーのいくつかの態様を例示する。具体的には、実施例は、現時点で存在する工業用株を再建するためのいくつかの想定されるアプローチを示す。この実施例は、「基準」株と「中間」株と

工業用株との間に存在し得る遺伝子の複数の差により生み出される表現型の解空間を探索する、ウェーブアップおよびウェーブダウンのアプローチについて記載する。

【０７２８】

Ａ．多様性プール中のＳＮＰの同定

本開示の方法を使用する例示的な株改良プログラムを、工業生産用微生物株に対して実施する；これを、本明細書では「Ｃ」と呼ぶ。このプログラムについての多様性プールの株を、Ａ、ＢおよびＣにより表す。株Ａは、あらゆる変異誘発の前の、元々の、産生のための宿主株を表した。株Ｃは、現在の工業用株を表し、従来の株改良プログラムによる長年の変異誘発および選択を受けている。株Ｂは、「中位」の株を表し、何らかの変異誘発を受けており、株Ｃの先行株であった。。

【０７２９】

株Ａ、株Ｂおよび株Ｃについて、シーケンシングし、それらのゲノムを、株間の遺伝子の差について分析する。すべての非同義ＳＮＰを同定する。これらのうち、ある特定のＳＮＰがＣにユニークであり、加えて、ある特定のＳＮＰがＢおよびＣにより共有され、ある特定のＳＮＰが株Ｂにユニークである。これらのＳＮＰを、下流の株改良サイクルのために多様性プールとして使用する。

【０７３０】

Ｂ．ＳＮＰスワッピングの分析

実施例２のパートＡの多様性プールから同定したＳＮＰを分析して、宿主細胞の性能に対するそれらの効果を決定する。株性能の最初の「学習」のラウンドを、下に記載し、図１１に図示した通り、６つのステップに分解する。

【０７３１】

第１に、ＣからのＳＮＰをすべて、基準株Ａ中に個々および／またはコンビナトリアルにクローニングする。これらの形質転換体の目的は、有益なＳＮＰを同定することである。

【０７３２】

第２に、ＣからのＳＮＰをすべて、市販株Ｃから個々および／またはコンビナトリアルに除去する。これらの形質転換体の目的は、中立のＳＮＰおよび有害なＳＮＰを同定することである。また、追加の任意選択のステップ３～６についても、下に記載する。２つの遺伝的な時点（genetic time point）（基準株Ａおよび工業用株Ｃ）からのＳＮＰを付加および減じる、第１および第２のステップを、本明細書では「ウェーブ」と呼び、ウェーブは、「ウェーブアップ」（基準株へのＳＮＰの付加、第１のステップ）および「ウェーブダウン」（工業用株からのＳＮＰの除去、第２のステップ）を含む。ウェーブの概念を、ＳＮＰのさらなる付加／削減に拡張する。

【０７３３】

第３に、ＢからのＳＮＰをすべて、基準株Ａ中に個々および／またはコンビナトリアルにクローニングする。これらの形質転換体の目的は、有益なＳＮＰを同定することである。形質転換体のうちのいくつかはまた、第１のステップで産生する形質転換体についてのバリデーションデータとしても役立つ。

【０７３４】

第４に、ＢからのＳＮＰをすべて、市販株Ｂから個々および／またはコンビナトリアルに除去する。これらの形質転換体の目的は、中立のＳＮＰおよび有害なＳＮＰを同定することである。形質転換体のうちのいくつかはまた、第２のステップで産生する形質転換体についてのバリデーションデータとしても役立つ。

【０７３５】

第５に、Ｃにユニークなｓｎｐ（すなわち、Ｂ中には存在しない）をすべて、個々および／またはコンビナトリアルに市販株Ｂ中にクローニングする。これらの形質転換体の目的は、有益なＳＮＰを同定することである。形質転換体のうちのいくつかはまた、第１および第３のステップで産生する形質転換体についてのバリデーションデータとしても役立つ。

【０７３６】

第６に、ＣにユニークなＳＮＰをすべて、市販株Ｃから個々および／またはコンビナトリアルに除去する。これらの形質転換体の目的は、中立のＳＮＰおよび有害なＳＮＰを同定することである。形質転換体のうちのいくつかはまた、第２および第４のステップで産生する形質転換体についてのバリデーションデータとしても役立つ。

【０７３７】

これらのステップのそれぞれから収集するデータを使用して、各ＳＮＰを、疎明の、有益、中立または有害として分類する。

【０７３８】

あるいは別の例では、株Ａは、すでにいくつかの変異誘発を有する場合があるが、多すぎる変異誘発を有さない、元々の、産生のための宿主株を表した。株Ｃは、現在の工業用株を表し、従来の株改良プログラムによる長年の変異誘発および選択を受けている。株Ｂは、「中位」の株を表し、株Ｃと比較してずっと少ない変異誘発を受けているが、株Ａと比較して多い変異誘発を受けている古い工業用株である。上記と類似のステップを取り出して、データを生成し、各ＳＮＰを分類するために使用することができる。一部の実施形態では、各バックグラウンド株中にすべてのＳＮＰを作製する代わりに、ＳＮＰのある特定のセットを最初に選択し、さらなる操作のために優先順位を付けることができることが理解されている。

【０７３９】

この操作手法の有用性を実証するデータを図６１に示す。基準株と比較して進歩した系統株から変異誘発性ＳＮＰを同定し、上記の操作手法を使用して、進歩した株からこれらのＳＮＰを無傷で除去した。ポリケチド生産性について「ＳＮＰスワップ」株を親株（進歩した系統株）と比較してプレートアッセイで試験し、一部の株が親株と比較して改良を示した。

【０７４０】

Ｃ．ＳＮＰの有益な組合せを決定するための、上位性マッピングの利用

実施例２のパートＢで同定した有益なＳＮＰを、組み合わせた場合に、宿主の性能を改善する可能性があるＳＮＰを同定するために、本開示の上位性マッピング法により分析する。

【０７４１】

実施例１の操作法を使用して、新たに操作された株バリアントを創製して、ＳＮＰの組合せを、上位性マッピングによる予測に従って試験する。ＳＮＰの統合は、逐次的に行うことができ、または代替的に、複数の分枝にわたって行うこともでき、したがって、１つ超の改良された株が、有益なＳＮＰのサブセットを伴い存在し得る。ＳＮＰの統合は、株改良の複数のラウンドにわたり、有益なＳＮＰの最適な組合せを含有する最終の株を産生するまで続け、最終の株は、中立のＳＮＰまたは有害なＳＮＰの荷物をいずれも有さない。

【０７４２】

（実施例３）

ＨＴＰゲノム操作－Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中でのスピノシン産生における株性能を改善するための、ＳＮＰスワップライブラリーのインプリメンテーション

この実施例では、実施例２のＳＮＰスワップＨＴＰ設計株改良プログラムの一部を例示的に実行し、目標は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ中でのスピノシンの産生の収率および生産性の改善をもたらすことである。

【０７４３】

この実施例のセクションＢは、本開示のＨＴＰ株改良プログラムの、変異を統合するステップをさらに示す。したがって、この実施例は、本開示のＨＴＰ株改良法の第１、第２および第３のラウンドの統合についての実験結果を提供する。

【０７４４】

第２および第３のラウンドの統合のための変異は、別個の遺伝子ライブラリースワップに由来する。したがってまた、これらの結果により、ＨＴＰ株プログラムの、多分枝平行トラック（multi-branch parallel tracks）を実施する能力、および本開示の種々の形

態の遺伝子設計ライブラリーに伴うメタデータ中に埋め込むことができる有益な変異の「メモリー」も示される。

【０７４５】

上記のように、提供された基準参照株（株Ａ）および第２の「操作された」株（株Ｃ）のゲノムについてシーケンシングし、遺伝子の差をすべて同定した。基準株は、変異誘発を経験したことがないＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａバリアントであった。操作された株もまた、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ株であり、これは、従来の変異改良プログラムの数ラウンド後に基準株から産生されたものである。

【０７４６】

Ａ．　ＨＴＰ操作およびハイスループットスクリーニング

本開示のクローニングおよび形質転換の方法に従って、同定したＳＮＰのそれぞれを個々に、基準株中に付加して戻す。単一のＳＮＰを含む新たに創製した株をそれぞれ、スピノシンの収率について、産物力価での性能を評価するように設計した小規模の培養において試験する。小規模の培養は、工業規模の培養からの培地を使用して実施する。標準的な比色分析アッセイを用いて、産物力価を光学的に炭素消耗時に測定する（すなわち、単一バッチの収率を表す）。反応を終点まで進行させ、Ｔｅｃａｎ　Ｍ１０００プレート分光光度計を使用して、光学密度を測定する。

【０７４７】

Ｂ．　第２のラウンドのＨＴＰ操作およびハイスループットスクリーニング－ＳＮＰスワップライブラリーと選択されたＰＲＯスワップヒットとの統合

本開示のＨＴＰ方法の強みの１つは、ＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーを、宿主細胞の表現型に対する各ＳＮＰ／プロモーター／ターミネーター／トランスポゾン変異誘発／抗代謝産物／開始コドンの効果と関連がある情報と一緒に保存する能力である。本発明者らは先に、プロモータースワップの実験を実施したことがあり、この実験で、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａ中でのいくつかのプロモータースワップを同定した（例えば、実施例４を参照されたい）。

【０７４８】

本発明者らは、先に同定した遺伝的多様性、例えば（１）プロモータースワップ（ＰＲＯスワップ）ライブラリー、（２）ＳＮＰスワップライブラリー、（３）開始／停止コドン交換ライブラリー、（４）ＳＴＯＰスワップライブラリー、（５）配列最適化ライブラリー、（６）トランスポゾン変異誘発多様性ライブラリー、（７）リボソーム結合部位（ＲＢＳ）多様性ライブラリー、および（８）抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリー中の遺伝的多様性のうちの１つもまた含むように、この実施例の基準株Ａを改変する。最初のスクリーニングから同定した上位の遺伝的多様性をこの新しい基準株に再導入して、新しい遺伝的多様性微生物ライブラリーを創製する。これまでのステップと同様に、１つまたは複数の遺伝的多様性を含む新たに創製した各株を、スピノシンの収率について試験する。また、選択された候補株を、スピノシンの産生を測定することによって、生産性のプロキシについても試験する。

【０７４９】

ＳＮＰスワップのこの第２のラウンドからの結果から、プロモータースワップ変異を含む基準株において、基準株のスピノシンの収率および生産性を増加させることが可能なＳＮＰが同定される。

【０７５０】

Ｃ．　タンク培養のバリデーション

上記のＨＴＰのステップの間に同定した上位のＳＮＰを含有する株を、中型の試験発酵タンク中に培養する。手短に述べると、各株の小型の培養物を、成長させ、等しい播種量を有する試験発酵タンクに大型の培養物を播種するために使用する。播種物は、同じ細胞密度を含有するように基準に合わせた（ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ）。

【０７５１】

結果として得られたタンク培養物は、培養を所定の時間進行させてから回収する。収率および生産性の測定値を、発酵全体を通して種々の点でタンクから採取した試料中の基質および産物の力価から計算する。試料を、特定の低分子の濃度について、高圧液体クロマトグラフィーにより、適切な標準物質を使用して分析する。

【０７５２】

（実施例４）

ＨＴＰゲノム操作－工業用微生物株を改良するための、プロモータースワップライブラリーのインプリメンテーション

これまでの実施例は、工業用株を再建するために、本開示のＨＴＰ株改良プログラムの力を実証してきた。実施例２および３は、種々の基準株、中間株および工業用株における、現存する遺伝子の多様性を探索する、ＳＮＰスワップの技法およびライブラリーのインプリメンテーションについて記載した。

【０７５３】

この実施例は、本開示のＰＲＯスワップの技法を使用するＨＴＰ株改良プログラムの実施形態を示す。実施例３とは異なり、この実施例は、ＰＲＯスワップライブラリーの生成による変異のデノボ生成のための方法を教示する。

【０７５４】

Ａ．プロモータースワッピングのための標的の同定

前述のように、プロモータースワッピングは、標的とするための「ｎ個」の遺伝子のセットを選択するステップを含む、多段階ステップのプロセスである。

【０７５５】

本明細書に記載のゲノム操作の方法は、プロモータースワッピングのためにゲノム中の任意の場所を標的化することを可能にする。この実施例では、本発明者らは、下に列挙されるコア生合成経路遺伝子を含む遺伝子を同定して、本開示のプロモーターラダー法によりモジュレートした（図１２Ａ～図１２Ｄを参照されたい）。加えて、前駆体プール、補助因子の入手可能性、競合する二次代謝産物、ポリケチドシャペロン、主要な転写調節因子および二次代謝産物産生についてのシグマ因子、基質および産物トランスポーターに関係する遺伝子、ならびに産物形成に未知の関係を有する遺伝子（経路外遺伝子）はすべて、株の改良を可能にするためのプロモータースワッピングの候補である。

【０７５６】

【表７－１】

表 7.–*S.spinosa* でのスピノシン産生に関与する潜在的遺伝子

スピノシン合成経路の遺伝子	遺伝子の情報(配列、機能、その他)
spnA	ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1 spnA
spnB	ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 2 spnB
spnC	ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 3～4 spnC
spnD	ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 5～7 spnD
spnE	ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 8～10 spnE
spnF	メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 spnF
spnG	推定 NDP–ラムノシルトランスフェラーゼ spnG
spnH	推定 O–メチルトランスフェラーゼ spnH
spnI	推定 O–メチルトランスフェラーゼ spnI
spnJ	推定オキシドレダクターゼ spnJ
spnK	推定 O–メチルトランスフェラーゼ spnK
spnL	メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 spnL
spnM	SpnM
spnN	推定 NDP–ヘキソース–3–ケトレダクターゼ spnN
spnO	推定 NDP–ヘキソース–2 3–デヒドラターゼ spnO
spnP	推定 NDP–ホロサミルトランスフェラーゼ (forosamyltransferase) spnP
spnQ	推定 NDP–ヘキソース–3 4–デヒドラターゼ spnQ

【表７－２】

スピノシン合成経路の遺伝子	遺伝子の情報(配列、機能、その他)
spnR	推定アミノトランスフェラーゼ spnR
spnS	推定 N-ジメチルトランスフェラーゼ spnS
kre	dTDP-4-デヒドロラムノースレダクターゼ kre
gdh	dTDP-グルコース 4 6-デヒドラターゼ gdh
epi	dTDP-4-デヒドロラムノース 3 5-エピメラーゼ epi
gtt	グルコース-1-リン酸チミジリルトランスフェラーゼ 1 gtt
MetK	S-アデノシルメチオニンシンターゼ MetK
PFK	ピロリン酸--フルクトース 6-リン酸 1-ホスホトランスフェラーゼ PFK
rsmG	リボソーム RNA 小サブユニットメチルトランスフェラーゼ G rsmG
rpsL	30S リボソームタンパク質 S12 rpsL
gk	グルコキナーゼ
asb1	アントラニル酸シンターゼ成分 1 asb1
pntA	NAD(P)トランスヒドロゲナーゼサブユニットアルファパート 1 pntA
pntB	NAD(P)トランスヒドロゲナーゼサブユニットアルファ pntB
mmsd	メチルマロン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(アシル化)
Acat	アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ
glcP	グルコピラノース
sucA	オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ E1 成分

【０７５７】

Ｂ．プロモーターラダーの創製

プロモータースワップのプロセスのインプリメンテーションにおける別のステップは、「ラダー」として働く「ｘ個」のプロモーターのセットの選択である。これらのプロモーターが複数のゲノム遺伝子座にわたって高度に変動する発現をもたらすことが示されていれば理想的であるが、それらが遺伝子の発現を何らかの様式で撹乱させることが唯一の要件である。

【０７５８】

特定の実施形態では、目的の標的遺伝子と関連がある天然の、生来のまたは野生型のプロモーターを同定し、次いで、前記プロモーターを変異させて、複数の変異プロモーター配列を得ることによって、これらのプロモーターラダーを生み出す。これらの変異プロモーターのそれぞれは、標的遺伝子の発現に対する効果について試験される。一部の実施形態では、編集されたプロモーターは、様々な条件にわたって発現活性について試験され、その結果、各プロモーターバリアントの活性が記録され／特徴付けられ／アノテートされ、かつデータベース内に記憶される。結果として生じる編集されたプロモーターバリアントは、引き続いて組織化されて、これらの発現の強度に基づいて配列された「ラダー」にされる（例えば、頂部付近に高度発現バリアントおよび底部付近に減弱された発現を有し、したがって、用語「ラダー」をもたらす）。

【０７５９】

例示的な本実施形態では、本発明者らは、スピノシン合成経路における標的遺伝子のそれぞれについて、プロモーターラダー：ＯＲＦの組合せを創製する。

【０７６０】

本発明者らの遺伝子操作の取り組み、およびより広くは代謝操作の主な目標は、所望の産物の収率を改善するために、宿主の代謝を変更し、生合成経路を最適化し、経路遺伝子を導入または重複させることである。成功は、生合成遺伝子クラスターの内部（経路上）および外部（経路外）の両方で遺伝子の発現を撹乱し、バランスを取る能力または導入された非生来の遺伝子もしくは遺伝子のコピーを過剰発現する能力に依存する。本発明は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける遺伝子発現を撹乱し、調整することが可能になる遺伝的ツールである。

【０７６１】

改良された表現型を操作するために、操作の複数のラウンドが、しばしば必要である。このラダーの遺伝的多様性は、繰り返しＤＮＡ配列（例えば、オフターゲット組換えのための相同領域）を使用することに関連する、および転写希釈効果についての操作の難題を回避する。このラダー中の配列および配列の源となる多様性のせいで、本発明は、これらの難題を回避する。

【０７６２】

プロモーターラダーは、他のより一般的な宿主（モデル生物；例えば、Sieglら（２０１３年、「Design, construction and characterization of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes.」Metab Eng.１９巻：９８～１０６頁）およびSeghezziら（２０１１年、「The construction of a library of synthetic promoters revealed some specific features of strong Streptomyces promoters.」Appl Microbiol Biotechnol.９０巻（２号）：６１５～２３頁を参照されたい。）のために存在するが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａは、大いに扱いにくい宿主であり、この生物のための遺伝的ツールは、ほとんど開発されていない。本発明は、開発され、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて定量的に特徴付けられた最初のプロモーターラダーを表す。加えて本発明者らは、本明細書に記載のプロモーターが、近くの宿主において予測可能なダイナミクスを示すと予想する。

【０７６３】

推定される生来のプロモーター配列を同定および選択するために本発明者らが使用した手法は、本発明者らに利用可能なデータを利用した。アセンブルされ、アノテートされた、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａについての参照ゲノムを使用して、遺伝子の予測されるコード配列の上流の遺伝子間領域を同定した。ＲＮＡｓｅｑのデータ（発酵中にサンプリングされた反復時系列および２つの株で発現を比較すること）を使用して、強く発現している遺伝子および異なる時間的発現プロファイルを有する遺伝子を同定した。次いで、目的の遺伝子（ＧＯＩ）の上流の配列を、プロモーター－蛍光タンパク質発現カセットの構築のために選択した。発酵に関連したシード培養条件および産生培養条件下で成長したプロモーターラダー株における相対ＧＦＰ蛍光を定量および比較することにより、プロモーターの強度を間接的に評価した。潜在的に有用なプロモーターを下の表８に列挙する。プロモーター評価の第１のラウンドの結果として、プロモーター強度のラダーがもたらされた（図１５）。後続の評価により、本発明者らは、元々同定されたプロモーターよりも顕著に強かった一部を含む、追加的な機能プロモーターを同定することが可能であった（図１６）。

【表８－１】

表 8.プロモーターラダーの概要:配列名、源、特性および試験状況

配列番号	名称	関連する遺伝子	bp	種類	状況
1	P7160	シャペロニン GroEL	141	生来	試験済み
2	P7253	伸長因子 Tu	198	生来	試験済み
3	P6681	F 型 ATP アーゼサブユニットデルタ	232	生来	試験済み
4	P6316	PspA/IM30 ファミリータンパク質	361	生来	試験済み
5	P6806	2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ	303	生来	試験済み
6	P3159	推定エノイル-CoA ヒドラターゼ echA8	253	生来	試験済み
7	P0757	推定 L-リシン-イプシロンアミノトランスフェラーゼ	168	生来	試験済み
8	P5011	仮定のタンパク質	363	生来	試験済み
9	P1409	NAD 特異的グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	300	生来	試験済み
10	P4735	ロイシルアミノペプチダーゼ(アミノペプチダーゼ T)	322	生来	試験済み
11	P2900	チトクローム P450-terp	149	生来	試験済み
12	P0801	ペリプラズムムレインペプチド結合タンパク質前駆体	199	生来	試験済み
13	P21	–	41	Siegl et al.	試験済み
14	PA9	–	41	Siegl et al.	試験済み
15	PA3	–	41	Siegl et al.	試験済み
16	PB4	–	41	Siegl et al.	試験済み
17	PB12	–	41	Siegl et al.	試験済み
18	PB1	–	41	Siegl et al.	試験済み
19	PC1	–	41	Siegl et al.	試験済み
20	P72	–	41	Siegl et al.	試験済み
21	P-C4-1	–	44	Seghezzi et al.	試験済み
22	P-A5-19	–	44	Seghezzi et al.	試験済み

【表８－２】

配列番号	名称	関連する遺伝子	bp	種類	状況
23	P-C4-14	–	44	Seghezzi et al.	試験済み
24	P-D1-7	–	44	Seghezzi et al.	試験済み
25	P1	分泌タンパク質	242	生来	試験済み
26	P2	仮定のタンパク質	65	生来	試験済み
27	P3	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD	201	生来	試験済み
28	P3v2	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD	300	生来	
29	P4	抗原 Ag88	220	生来	試験済み
30	P4v2	抗原 Ag88	177	生来	
31	P5	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータ	200	生来	試験済み
32	P5v2	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータ	299	生来	
33	P6	分子シャペロン GroEL	240	生来	試験済み
34	P7	UDP-4-アミノ-4-デオキシ-L-アラビノース―オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ	242	生来	試験済み
35	P8	プロリンラセマーゼ	300	生来	試験済み
36	P9	フェニルオキサゾリンシンターゼ MbtB	359	生来	試験済み
37	PspnA	ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1	433	生来	試験済み
38	PspnA_v2	ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1	115	生来	試験済み
39	PspnF	メチルトランスフェラーゼ様タンパク質	496	生来	試験済み
40	PspnG	推定 NDP-ラムノシルトランスフェラーゼ	202	生来	試験済み
41	PspnQ	推定 NDP-ヘキソース-3	379	生来	試験済み
42	PspnQ_v2	推定 NDP-ヘキソース-3	261	生来	試験済み
49	P1765	グルタミンシンテターゼ 1	332	生来	試験済み
50	P3747	仮定のタンパク質	300	生来	試験済み
51	P5078	仮定のタンパク質	247	生来	試験済み

【表８－３】

配列番号	名称	関連する遺伝子	bp	種類	状況
52	P7419	嫌気性安息香酸異化転写調節因子	230	生来	試験済み
53	P7156	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD	300	生来	試験済み
54	P7256	30S リボソームタンパク質 S12	300	生来	試験済み
55	P1941	応答調節因子タンパク質 vraR	298	生来	試験済み
56	P3405 (P8)	プロリンラセマーゼ	300	生来	試験済み
57	P3407	ABC 輸送体アルギニン結合タンパク質 1 前駆体	300	生来	試験済み
58	P2428	アセチル-CoA シンテターゼ	248	生来	試験済み
59	P0927	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ	250	生来	試験済み
60	P0889	直鎖グラミシジンデヒドロゲナーゼ LgrE	250	生来	試験済み
61	P0186	L,D-トランスペプチダーゼ触媒ドメイン	298	生来	試験済み
62	P3702_v2	仮定のタンパク質	296	生来	試験済み
63	P7156_v2	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD	300	生来	試験済み
64	P7256_v2	30S リボソームタンパク質 S12	226	生来	試験済み
65	P1765_v2	グルタミンシンテターゼ 1	191	生来	試験済み
66	P7539_v2	抗原 Ag88	177	生来	試験済み
67	P7276_v2	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータ	299	生来	試験済み
68	P0941_v2	仮定のタンパク質	266	生来	試験済み
69	P0889_v2	直鎖グラミシジンデヒドロゲナーゼ LgrE	163	生来	試験済み
43	P21_変異体	–	41	合成	試験済み
44	P1_コア	分泌タンパク質	40	生来	試験済み
45	P1(-33)	分泌タンパク質	209	生来	試験済み
46	P1+リボスイッチ	分泌タンパク質	433	生来	試験済み
47	P21-P1	–	53	合成	試験済み
48	P1-P21	–	52	合成	試験済み

【表８－４】

配列番号	名称	関連する遺伝子	bp	種類	状況
172	Pmut-1	–	41	合成	試験済み
173	B2	–	41	合成	試験済み
174	D1	–	41	合成	試験済み
175	D2	–	41	合成	試験済み

【０７６４】

ライブラリー中のプロモーターの発現強度は、プロモーター配列の下流に配置した蛍光レポータータンパク質を使用することにより特徴付けた。プロモーター－レポーター配列を２つの別個の実験株のゲノム中の中立の組込み部位内に組み込み、異なる成長レジームの下、蛍光を測定して、プロモーターの強度についての定量的な測定基準を提供した。このプロモーターライブラリーは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａおよび関連宿主において、ならびに改良された表現型を操作するために、遺伝子発現のモジュレーションを可能にする（増加させる、減少させる、または時間的ダイナミクスを変更する）。本発明は、この宿主の遺伝子操作のためのいくつかの適用を有する：１）ＰＲＯＳＷＰ（Ｚｙｍｅｒｇｅｎ技法）

と共に使用するため；２）生来の遺伝子の異種コピーまたは重複コピーを過剰発現させるため；３）生合成遺伝子または関連遺伝子の多重遺伝子組込みの発現のバランスを取るため。選択されたプロモーター遺伝子対を操作する結果、ある特定の株では改善されたスピノシン産生がもたらされる（図１７）。

【０７６５】

したがって、本発明者らは少なくとも、プロモーターライブラリーを形成するために以下のプロモーターを提供する：

（１）Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノムから新しく同定された生来のプロモーター配列；

（２）関連宿主生物に使用するために記載された合成プロモーター配列（SieglらおよびSeghezziら）；

（３）多様なプロモーター配列の変異誘発ライブラリー；ならびに

（４）プロモーターのコンビナトリアルな再配列からなる雑種プロモーター配列（進行中）。

【０７６６】

これらのプロモーターは、一連の発現強度を示す一方、顕著なヌクレオチド多様性からなる（図１５および図１６を参照されたい）。プロモーターのこのライブラリーは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａおよび関連宿主において使用することができる、下流の遺伝子の発現を調節するＤＮＡ配列のセットを提供する。本明細書に記載のライブラリーは、例えば、約５０～１００倍のダイナミックレンジに及ぶ発現強度の「ラダー」を示し（図１５および図１６を参照されたい）、加えて、一連のヌクレオチド多様性を示す。操作の反復ラウンドの間に宿主ゲノムを精密に調整して任意の測定可能な表現型を改良するために、プロモーターのこのライブラリーを組み合わせて一緒に使用することができる。各プロモーターの種類、強度およびユニークな配列は、代謝操作でしばしば直面する未知のものおよび課題を克服する機会を提供する。このような変化には、（１）それぞれのユニークな状況でプロモーターがどのように機能するか（それが所与の遺伝子の発現にどのように影響するか）を正確に予測できないこと；（２）所与の遺伝子に最適な発現レベル；（３）時間的ダイナミクスまたは調節が撹乱の成功にどのように影響するかを予測できないこと；および（４）バランスが取れた、または最適化された生合成経路をもたらす発現レベルが含まれるが、それに限定されない。本明細書に記載したプロモーターは、特定の遺伝子標的と相互作用して、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるスピノシンなどの化学物質の改良された産生のための株遺伝子型を付与することができる。

【０７６７】

Ｃ．ラダーからのプロモーターと標的遺伝子との関連性

プロモータースワップのプロセスのインプリメンテーションにおける別のステップは、種々の株のＨＴＰ操作であり、これらの株は、特定の標的遺伝子と関連があるプロモーターラダーからの所与のプロモーターを含む。

【０７６８】

生来のプロモーターが標的遺伝子ｎの前に存在し、その配列が分かっている場合には、生来のプロモーターを、ラダー中のｘプロモーターのそれぞれでの置換えを実施することができる。生来のプロモーターが存在しないかまたはその配列が分かっていない場合には、遺伝子ｎの前に、ラダー中のｘプロモーターのそれぞれの挿入を実施することができる。このようにして、株のライブラリーを構築し、この場合、ライブラリーの各メンバーが、ｎ標的に作動可能に連結しているｘプロモーターの一例であり、は、他の点では同一の遺伝子状況である（例えば、図１３を参照されたい）。

【０７６９】

Ｄ．株のＨＴＰスクリーニング

プロモータースワップのプロセスにおける最後のステップは、上記のライブラリーにおける株のＨＴＰスクリーニングである。得られた株のそれぞれが、ｎ標的に連結しているｘプロモーターの一例を表し、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドである。

【０７７０】

発明者らは、１つまたは複数の測定基準に対するそれらの性能を特徴付けるシナリオにおいて、各株のＨＴＰスクリーニングをインプリメントすることによって、所与の測定基準（例えば、目的の分子の産生の最適化）に関して、プロモーター／標的遺伝子のどの関連性が最も有益であるかを決定することができる。図１３を参照されたい。

【０７７１】

図１７に示す例示的な実施形態では、発明者らは、プロモータースワップのプロセスを利用して、スピノシンの産生を最適化した。上に記載したＰｒｏスワップ方法の適用例を、下の実施例５に記載する。

【０７７２】

（実施例５）

ＨＴＰゲノム操作－スピノシンの産生に関して、株性能を改善するためのＰＲＯスワップライブラリーのインプリメンテーション

以下のセクションは、実施例４に記載の、本開示のＰＲＯスワップＨＴＰ設計株改良プログラムツールの例示的なインプリメンテーションを示す。この実施例では、宿主細胞のスピノシンの収率を増加させるために、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ株を、本開示のＰＲＯスワップ方法に供した。

【０７７３】

Ａ．プロモータースワップ

実施例４に記載した通りプロモータースワップを行った。スピノシン産生に役割を演じると仮定したゲノムにわたる遺伝子を、列挙したプロモーターラダー（例えば図１３）を使用してプロモータースワップのために標的化した。プロモータースワップのためのこのような遺伝子には、（１）スピノシンなどの目的の化合物のコア生合成経路における遺伝子；（２）前駆体合成またはプール利用可能性の調節に直接関与する遺伝子などの目的の化合物の前駆体プール利用可能性に関与する遺伝子；（３）補助因子の利用に関与する遺伝子；（４）転写調節因子を用いてコードする遺伝子；（５）栄養素利用性の輸送体をコードする遺伝子；および（６）産物の排出輸送体などが含まれるが、それに限定されない。

【０７７４】

Ｂ．　ＨＴＰ操作およびハイスループットスクリーニング

プロモータースワップのＨＴＰ操作を実施例１および３に記載した通り行った。結果として得られたプロモータースワップ株のＨＴＰスクリーニングを実施例３に記載した通り行った。異なる機能次元にわたる（コア生合成クラスター～経路外の範囲の）いくつかの遺伝子をプロモータースワップのために標的化し、親株と比べて改善された株性能を示しているデータを図１７に提示する。

【０７７５】

同様に、図１３の左パネルに記載したスピノシン生合成経路から選択された遺伝子およびゲノムにわたる遺伝子についてプロモータースワップを行って、新しい改良された株を同定し、上の表８に記載したプロモーターを使用してプロモータースワップのために標的化する。

【０７７６】

可視化すると、プロモータースワップライブラリースクリーニングの結果は、測定される性能測定基準と最も強く相関する遺伝子標的を同定するために役立つ。

【０７７７】

選択された株を小さいプレート中で再培養し、上記のようにスピノシン収率について試験する。

【０７７８】

（実施例６）

上位性マッピング－変異の有益な統合を予測するためのアルゴリズムツール

この実施例は、本開示のＨＴＰ株改良プログラムの一部として利用する予測モデリング技法の実施形態を記載する。本開示は、（上に記載の、遺伝子設計ライブラリーの使用による）潜在的に有益な変異の最初の同定の後の、ＨＴＰ株改良の第２、第３、第４のおよ

びさらにそれらに続くラウンドにおける、有益な変異を統合する方法を教示する。一部の実施形態では、本開示は、変異の統合が、前記変異それぞれの個々の性能に基づき得ることを教示する。他の実施形態では、本開示は、２つまたはそれ超の変異が、単一の宿主細胞中に統合する場合に、相加効果または相乗効果を示す可能性を予測するための方法を教示する。下記の実施例は、本開示の予測ツールの実施形態を示す。

【０７７９】

実施例３および５のＳＮＰスワップライブラリーおよびプロモータースワッピング（ＰＲＯスワップ）ライブラリーから選択した変異を分析して、宿主の株性能の改善をもたらす可能性が最も高いＳＮＰ／ＰＲＯスワップの組合せを同定する。

【０７８０】

本開示の「上位性マッピング」のセクションの記載の通り、ＳＮＰスワップライブラリーの配列を、コサイン類似性マトリックスを使用して相互に比較する。分析の結果から、各ＳＮＰ／ＰＲＯスワップの組合せについて、機能類似性スコアを得る。すべてのＳＮＰ／ＰＲＯスワップの間の機能類似性の視覚的表現を、図５３にヒートマップに示す。また、結果として得られる、機能類似性スコアを使用して、図５４Ａにおける実施例と類似の、それぞれのＳＮＰ／ＰＲＯスワップ間の類似性の距離を示す樹状図も展開する。

【０７８１】

同じまたは類似の機能群（すなわち、高い機能類似性を有するＳＮＰ／ＰＲＯスワップ）からの変異は、同じ機構により働く可能性が高く、したがって、組み合わせた場合に、全般的な宿主の性能に対して、負または中立の上位性を示す可能性が高い。対照的に、異なる機能群からの変異は、独立の機構により働く可能性がより高く、したがって、宿主の性能に対して、有益な相加的またはコンビナトリアルな効果をもたらす可能性が高い。

【０７８２】

上位性に対する生物学的経路の効果を示すために、様々な機能類似性を示すＳＮＰとＰＲＯスワップとを組み合わせ、宿主株に対して試験する。実施例１の記載の通り、ＳＮＰ／ＰＲＯスワップの３つの組合せを、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノム中に操作する。

【０７８３】

ＳＮＰ／ＰＲＯスワップの組合せを含有するそれぞれの宿主細胞の性能を、実施例３に記載の通り試験し、対照の宿主細胞の性能と比較する。

【０７８４】

したがって、上位性マッピングの手順は、設計した遺伝子変化の有効なおよび／またはプラスの統合について予測／プログラミング／情報提供を行うのに有用である。上位性マッピングの手順による分析的洞察から、微生物株の開発のその後のラウンドを導くことができる予測規則のセットの創製が可能になる。上位性ライブラリーから得られる予測のための洞察は、微生物のタイプおよび標的分子のタイプにわたって使用することができる。

【０７８５】

（実施例７）

ＨＴＰゲノム操作－Ｐｒｏスワップ変異の統合および多因子のコンビナトリアル試験

これまで実施例は、少数の事前選択したＰＲＯスワップ変異とＳＮＰスワップライブラリーとを統合するための方法を示してきた（実施例３）。他の実施例は、相加的または相乗的に有益な宿主細胞の特性をもたらす可能性が最も高い変異の統合を選択するための上位性による方法を示してきた（実施例６）。この実施例は、本開示のＨＴＰ方法により、複数の遺伝子／遺伝子設計ライブラリーの組合せ（例えば、ＰＲＯスワップライブラリー×ＳＮＰライブラリー、またはＰＲＯスワップライブラリー内の組合せ）のコンビナトリアルな統合により創製される大きな解空間を有効に探索することが可能になることを示す。

【０７８６】

本開示のＨＴＰ株改良法のこの例示的な適用例では、実施例５で宿主の性能に対してプラス効果を有することが同定されているプロモータースワップを元々のＰＲＯスワップライブラリーと二次の組合せで統合する。ＰＲＯスワップ変異を統合する決定は、収率または生産性に対するそれぞれの変異の全般的な効果、および２つの変異の組合せが相加的ま

たは相乗的な効果をもたらす可能性に基づく。

【０７８７】

Ａ．　ＰＲＯスワップ株操作のための統合のラウンド

先の実施例１の記載の通り、株を形質転換する。手短に述べると、所望のＰＲＯスワップ変異を１つすでに含有する株をもう一度、第２の所望のＰＲＯスワップ変異を有するように形質転換する。

【０７８８】

単一の変異および統合した二重の変異の解空間を探索するためのＨＴＰ方法はまた、第３、第４およびその後の変異の統合にも適用することができる。

【０７８９】

（実施例８）

ＨＴＰゲノム操作－工業用宿主株を改善するための、ターミネーターライブラリーのインプリメンテーション

本実施例では、本開示のＨＴＰ方法を、ＳＴＯＰスワップを含む追加のＨＴＰ遺伝子設計ライブラリーに適用する。実施例は、本開示によれば、（例えば、ＰＲＯスワップ、ＳＮＰスワップ、ＳＴＯＰスワップ等の）基本の遺伝子設計ライブラリーからのエレメントを組み合わせて、より複雑な遺伝子設計ライブラリー（例えば、プロモーターおよびターミネーターの両方が組み入れられているＰＲＯ－ＳＴＯＰのスワップライブラリー）を生み出すことができることをさらに示す。本開示は、一部の実施形態では、これまでに開示した遺伝子設計ライブラリーのうちのいずれかの組合せから得られるライブラリーを含めた、一切の可能な遺伝子設計ライブラリーを教示する。

【０７９０】

この実施例では、小規模の実験を実施して、遺伝子の発現に対する本発明のＳＴＯＰスワップ方法の効果を実証する。下に記載するように、本開示のターミネーターと、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの２つの生来のプロモーターのうちの１つと対を成し、蛍光タンパク質の発現に影響を及ぼすそれらの能力について分析する。

【０７９１】

コンビナトリアル遺伝子操作および代謝経路不応手法は、遺伝子発現を撹乱し、標的分子の産生に影響するために、または所望の宿主表現型を変更するために、組み合わせて使用できるまたは宿主ゲノム中の正確な場所に挿入できるＤＮＡエレメント（例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター）のライブラリーに依存する。これらのライブラリーの改善された理解および定量的な評価／特徴付けは、遺伝子変化の予測可能性を改善する機会を与えるので、望ましい。一般的なＤＮＡライブラリーの種類のうち、転写ターミネーターが、ほぼ間違いなく最も理解されていない。ターミネーターは、（１）転写を完了することに役割を演じるが、また、（２）ｍＲＮＡの半減期（Curranら、２０１５年、「Short Synthetic Terminators for Improved Heterologous Gene Expression in Yeast.」ACS Synth.Biol.４巻（７号）：８２４～８３２頁）および同じようにタンパク質の発現にも影響する。したがって、ターミネーターは、任意の合成生物学ツールキットの重要なコンポーネントと見なすべきである。ターミネーターライブラリー、またはラダーの創製は、２つの判定基準：（１）転写を終結する能力；（２）上流の遺伝子のｍＲＮＡの半減期および発現に影響する能力の両方に基づきターミネーター性能を評価および定量するための機構を必要とする。本開示は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいてこれを行うためのロバストで最初のツールを提供する。

【０７９２】

類似の解決が存在し、他の生物に使用されている（Chenら、２０１３年、「Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints.」Nat.Methods １０巻、６５９～６６４頁、およびCambrayら、２０１３年、「Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators.」Nucleic Acids Research.４１巻（９号）：５１３９～５１４８頁）が、本開示は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける最初の（１）ターミネーター機能を評価するた

めのシステムおよびアッセイ；（２）開発および特徴付けされた転写ターミネーターライブラリーを提供する。

【０７９３】

推定ターミネーターを同定するために、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａおよびＳ．ｅｒｙｔｈｒａｅａからのゲノム配列を、核酸配列中のｒｈｏ非依存性ターミネーターの予測のためのオンラインツールに入力した）。十分にアノテートされた遺伝子の下流（遺伝子間領域中）に存在するとオンラインツールにより予測された１２個のターミネーター配列（４つの生来の配列および８つの異種配列、下の表９を参照されたい）を分析のために選択した。

【表９】

表9.試験した推定ターミネーターの配列、源およびサイズ

ID	関連遺伝子	配列	源	サイズ (bp)
T1	(伸長因子)	CCCGAACCTTCGGGGGCGGGCCCTCTTGCTTTTCAAT (配列番号 70)	*S. spinosa*	37
T2	(ロイシルアミノペプチダーゼ)	CGGGCAATAATACGTGCCCGGACGGTAGTGCGAGCACGAGGTGGGTACG (配列番号 71)	*S. spinosa*	49
T3	(チトクロームP450ヒドロキシラーゼ)	AGTTTGTCGAACCGGCGGCGTTCGCCGGcTTTACCTTGCGC (配列番号 o. 72)	*S. spinosa*	41
T4	(F0F1 ATPシンターゼサブユニットベータ)	GGTTTCTCGAACCAGTGCTTTGCGTACTGGTTGTCGTTGCAG (配列番号 73)	*S. spinosa*	42
T5	(FAD 連結オキシドレダクターゼ)	CGGAGCCAGAGGGCGCCTGAGTGCCTGTTTTTGATCC (配列番号 74)	*S. erythraea*	37
T6	(ホスホリボシルトランスフェラーゼ)	AAACGCCCCCGGCTCCGGCCGGGGGCgTTTTTGGTTGTG (配列番号 75)	*S. erythraea*	39
T7	(ATP結合タンパク質)	AGACGCAGGAGGTCTCGTGAGGGGCTTTTCCGCGAGC (配列番号 76)	*S. erythraea*	37
T8	(50sリボソームタンパク質 L32)	CGTGTGACTTGTCCCACTCGGGGTTTTTGTCGCGA (配列番号 77)	*S. erythraea*	35
T9	(tRNA-Arg)	GGATTCGTCCGGCCGAGGCCAATCGGCTTTTCGGGGCCC (配列番号 78)	*S. erythraea*	39
T11	(lsr2)	GCTTTCGTCGGCCGGGAACGCCCTGGTGTTTCTTACCG (配列番号 79)	*S. erythraea*	38
T12	(AraC)	TTGGGTGGATTCACCCCTACCGGGTGTTTTTCTCGGCT (配列番号 80)	*S. erythraea*	38
NoT	なし	-	-	0

【０７９４】

これらの推定ターミネーターを試験するために、二重のレポーター設計およびアッセイを利用した。試験に使用する二重のレポーター設計およびアッセイ（実施例１０にさらに記載する）は、推定転写ターミネーター配列の機能性および相対強度の迅速評価を可能にする。このアッセイは、別個のスペクトルシグネチャー（図３１Ａ～Ｄ）を有する２種の蛍光レポータータンパク質（ｄａｓｈｅｒＧＦＰおよびｐａｐｒｉｋａＲＦＰ；ＤＮＡ２．０からのＩＰフリー配列）を使用して、推定転写ターミネーターの性能を評価する。このシステムは、推定ターミネーターが１）転写を停止させ、２）上流の遺伝子の発現に影響する能力についてユーザーがこの推定ターミネーターを評価することを可能にする。二重の蛍光レポーター試験カセットは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの遺伝子操作に必要な推定ターミネーター配列の強度の定量的な評価およびｍＲＮＡ安定性に対する影響を評価するための機構を可能にする。

【０７９５】

これらの性能判定基準の定量的な評価は、ｅｒｍＥ＊プロモーターにより駆動される、２種の蛍光タンパク質の２シストロン性発現を利用する設計により可能になる（Bibbら、１９８５年、「Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene(ermE)of Streptomyces erythraeus.」Gene.３８巻（１～３号）：２１５～２２６頁）。各推定ターミネーター配列を２つのレポーターの間（ＧＦＰの下流でＲＢＳおよびＲＦＰの上流）にクローニングした。陽性対照（同じ多シストロン性カセットであるが、レポーター間にターミネーター配列を有さない；ＮｏＴ；図３

３参照）のＧＦＰ蛍光およびＲＦＰ蛍光を使用して基準に合わせた後、上流のレポーター（ＧＦＰ）に対する下流のレポーター（ＲＦＰ）の発現（蛍光）を決定した。このシステムは、ターミネーターライブラリーの定量的な評価のためのロバストな機構を提供し、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの遺伝子操作に使用するための推定ターミネーター配列の性能を同定および特徴付けするための有用性を有する。このシステムの強みは、別個の蛍光スペクトル（図３１Ａ～Ｄ）を有する２種の蛍光レポーターの適用にある。このレポーターは、他のレポーターからのスペクトル干渉なしに大きいダイナミックレンジ（約５０×）にわたる蛍光（各レポーターのタンパク質発現）の定量を可能にし、したがって、複雑なシグナル補正（重複する蛍光シグナルの解きほぐし）の必要を取り除く。各レポーターの発現は、独立して測定することができる。次いで、他方のレポーターと比べた蛍光（ＲＦＵ）を、ターミネーターを有さない対照株による蛍光と比較することにより、これらの値は、各レポーター発現に寄与する遺伝子エレメントの性能を評価することを可能にする。他のエレメントをすべて一定に保つ一方で、２つのレポーターの間の推定ターミネーター配列をスワップすることにより、（１）異なるターミネーターが存在する場合に上流レポーター（ＧＦＰ）の相対蛍光を比較することにより、ｍＲＮＡ安定性に対するターミネーターの影響；（２）ターミネーターを有さない対照株の蛍光により基準に合わせた後、下流のレポーター（ＲＦＰ）の相対蛍光を上流のレポーター（ＧＦＰ）と比較することにより、ターミネーターが転写を停止させる能力を間接的に評価することができる。このシステムは、本発明者らが、（１）機能ターミネーターおよび（２）ｍＲＮＡの安定性に影響する能力が異なるまたはその安定性を促進する特性を有する、ターミネーターを同定することを可能にする。

【０７９６】

候補ターミネーターの核酸配列を試験カセット中にクローニングし、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中の公知の中立の組込み部位に組み込んだ。結果として得られた株を液体培養で４８時間成長させ（シード培地）、ＰＢＳで洗浄し、プレートリーダーを使用して蛍光（ＧＦＰおよびＲＦＰ）を測定した。蛍光をOD_{540}の吸光度という基準に合わせた。

【０７９７】

アッセイに基づき、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて一連の機能性または強度（下流遺伝子の転写を止めるまたは上流遺伝子の転写を減弱する能力）を有する１１個の転写ターミネーター配列（４つの生来の配列および７つの異種配列、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ由来）のライブラリー。これらの配列は、３５～４９ヌクレオチド長の範囲であり、操作の設計に容易に組み入れることができる（表３；表８；図３２および図３３）。結果は、強度およびｍＲＮＡ安定性に対する影響が様々な、ターミネーターの多様なライブラリーであり、これは、技術者により大きくより多様な解空間と、標的遺伝子の発現を撹乱およびマニピュレートする機会とを与える（図３４）。

【０７９８】

本開示の転写ターミネーター配列のライブラリーは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの遺伝子操作に必要なツールを提供する。転写ターミネーター配列は、いくつかの操作上の適用を有する：（１）上流の調節の意図しない帰結から保護するためのプロモーターまたは遺伝子組込みのインスレーターとして；（２）遺伝子挿入のための転写ターミネーターとして；および（３）ｍＲＮＡの安定性に対するそれらの影響により、または遺伝子のコード配列の上流のプロモーターと翻訳開始部位との間に挿入することにより、発現を調整し、経路のバランスを取るため。この後者の適用は、下流の遺伝子の発現をノックダウンする、または効果的に防止することができる。

【０７９９】

遺伝子発現をノックダウンまたは排除するためのこのターミネーターライブラリーの適用を評価するために、本発明者らは、２つの異なるプロモーター（配列番号２５および３３）の一方と蛍光レポーター（配列番号８１）との間に個々のターミネーター（本発明者らのターミネーターライブラリーのサブセット：配列番号７０、７２、７４、７９および８０）を挿入することにより、この適用を試験した（図６５）。次いで、これらの試験カ

セットを株Ａ内に組み込み、結果として得られた株のＧＦＰ発現を使用して、ＧＦＰ発現の減弱に対するターミネーター挿入の効果を評価した（図６６Ａ～Ｂ）。図６６Ａは、Ｔ１、Ｔ３、Ｔ５、Ｔ１１およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４、７９および８０）が強いプロモーター（配列番号２５）とＧＦＰとの間に挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターなしの対照株を示す。図６６Ｂは、Ｔ１、Ｔ３、Ｔ５およびＴ１２（配列番号７０、７２、７４および８０）が中等度に強いプロモーター（配列番号３３）とＧＦＰとの間に挿入された株の発現を示す。「なし」（左列）は、ターミネーターなしの対照株を示す。典型的にはダイヤモンドの上下に観察される水平のダッシュで標準偏差を示す。図の右側の円は、すべての対のチューキー－クレーマー法ＨＳＤ検定に基づく群間の有意差を示す（重複／交差しない円は、相互に有意に異なる群を示す）。

【０８００】

この操作手法の有用性を実証しているデータを図６２に示す。ターミネーターを、いくつかの標的化した遺伝子の上流に挿入して、遺伝子発現を改変し、ポリケチド生産性についてこれらの操作された株をプレートアッセイで親株と比較して試験した。いくつかの「ターミネーター挿入」株は、親株と比較して改良を示した。一部の実施形態では、ターミネーター挿入のコレクション（配列、ターミネーター－遺伝子の組合せ、または株）を「ターミネーター挿入微生物ライブラリー」と称する。

【０８０１】

（実施例９）

遺伝子変化の迅速な統合およびＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａにおいて遺伝的多様性を生成するため

この実施例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓｅにおける遺伝子変化の迅速な統合および遺伝的多様性の生成のための方法を示す。Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ株の操作は、主として遅い成長およびこの生物のための遺伝的ツールの欠如のせいで、冗長なプロセスである。成長速度の低下およびロバスト性の低下を有する可能性がより高い産生株では、この問題がさらに悪化する。例えば、本発明以前にＳ．ｓｐｉｎｏｓａを操作する方法は、コンジュゲーションにより外来ＤＮＡを導入することである（Ｍａｔｓｕｓｈｉｍａら、１９９４年．Ｇｅｎｅ、１４６巻３９～４５頁）。このプロセスは、宿主ＤＮＡ内に送達したプラスミドのシングルクロスオーバーに基づく。外来ＤＮＡを導入し、目的の株を選択するプロセスは、およそ１４～２１日かかる。操作が、「無傷（ｓｃａｒ－ｌｅｓｓ）」でなければならない場合、変異を送達するために使用されるプラスミドのエレメント（例えば、プラスミド主鎖）を最初の組込みの後に除去して、「ペイロード」だけを残さなければならない。「ペイロード」は、一塩基多型（ＳＮＰ）、遺伝子プロモーターの変化、リボソーム結合部位の変化、遺伝子ターミネーターの変化、多重遺伝子カセット、約１～１００００ｂｐサイズを有する任意の遺伝子エレメント、または任意のサイズの欠失であり得る所望の変異である。送達プラスミドのエレメントの除去は、操作プロセスに別の約２０日を追加する。一部の事例では、送達プラスミドのエレメントの除去は、中立部位での完全遺伝子組込みの場合のように、直ちに必要なわけでない。それらの場合、プラスミド、ならびにプラスミドにコードされる選択可能マーカー（ｋａｎＲ）および対抗選択可能マーカー（ｓａｃＢ）が宿主染色体中に保持され、変異が「マークされている」と見なされる。このような変異を組み合わせる従来のやり方は、組込みおよび対抗選択（約４５日）により基準株中に第１の変異を生成することで変異体株（例えばＭｕｔ１）を生成し、次いでＭｕｔ１株をレシピエントとして使用してプロセスを繰り返して次の変異を有するように進め、再び４５日の操作プロセスを行うことで、２つの変異を有する新しい株（例えばＭｕｔ２）を生成することである。第３の変異を付加するために、最短でもう４５日かかる、などである。

【０８０２】

本開示は、遺伝子変化の迅速統合により、宿主細胞の株改良プログラムを加速する新しい方法を教示する。操作時間を短縮するために、本発明者らは、合理的に操作された変異の迅速統合方法を設計した（既存の方法に改良を加えた）。この新しい方法は、これまで

に操作された株、および／または「良」変異を有する株などの選択された株のプロトプラスト融合に基づく。

【０８０３】

Ａ．　全般的な方法

変異を統合するための例示的な手順を図３０に示す。出発点として、目的の変異を含有するゲノムを有する親株を生成し、選択する。

【０８０４】

一部の実施形態では、それらの変異のうち１つをマークさせることが望ましい。株を生成し、試験した後、本明細書に概説したプロセスを使用して、最良の変異を迅速に統合することができる。手短に述べると、プロトプラストを目的の株から生成し、次いで、「マークされた」株をマークされていない株と比較してずっと低濃度で使用して、異なる比で一緒に混合する。融合後、プロセス用に改変した培地上で結果としての株を回収し、「マークされた」株のための選択を適用し、したがって「マークされた」変異を受けなかったあらゆる細胞を死滅させる。ＨＴＰ株のＱＣは、このように選択された株の中に、その他の混合変異のうちのどれが存在するかを迅速に決定することができる。大部分の株は、その他の変異のうちの少なくとも１つ、一部の場合では１つよりも多くを含有することが予期される。

【０８０５】

このプロセスは、通常、株を生成するのに７～１０日かかり、１回の統合反応は、混合された株の数に応じていくつかの異なる遺伝子型をもたらすことができる。例えば、株Ｍ１、Ｓ１、Ｓ２、およびＰ１の四元（ｆｏｕｒ－ｗａｙ）融合は、４つの希有な単一変異体および１０個の異なる組合せ：Ｍ１　Ｓ１；Ｍ１　Ｓ２；Ｍ１　Ｐ１；Ｓ１　Ｓ２；Ｓ１　Ｐ１；Ｓ２　Ｐ１；Ｍ１　Ｓ１　Ｓ２；Ｍ１　Ｓ２　Ｐ１；Ｓ１　Ｓ２　Ｐ１；Ｍ１　Ｓ１　Ｓ２　Ｐ１をもたらすことができる。加えて、Ｍ１中のマークされた変異の選択が適用される場合、Ｓ１　Ｓ２；Ｓ１　Ｐ１；Ｓ２Ｐ１；Ｓ１　Ｓ２　Ｐ１の種類は、消失するであろう。

【０８０６】

例えば、本明細書に記載の方法は、以下のステップを含有する場合がある：

（１）操作された株のプールから親株を選択し、次いで、選択された株を統合するステップ。一部の実施形態では、株のうちの少なくとも１つは、「マークされた」変異を有する。目的の株を親のために使用することで、後続のステップで有用な株が生成されるチャンスが大きく増加する。

（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ。浸透圧的に安定化された培地および緩衝液中で細胞を成長させる必要があり、この緩衝液および培地は、先行技術と異なる。

（３）目的の株を融合するステップ。一部の実施形態では、変異体の有用な（新規の）組合せを生成するオッズを増加させるために、「マークされた」変異を有する株の細胞をより少なく使用することで、これらの「マークされた」細胞が、異なる変異を有する細胞と相互作用および融合するチャンスを増加させることができる。これは、細胞が一緒に融合し、統合が起こるステップである。このステップの間に使用した株の正確な割合は、ある特定の組合せを得る可能性に影響する。

（４）細胞を回収するステップ。一部の実施形態では、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培地上に細胞を蒔くが、これは、手順を簡略化し、より容易な自動化を可能にする。浸透圧安定化剤は、対抗選択マーカー遺伝子（例えば、ｓａｃＢ遺伝子）を含有し得る細胞の成長を可能にするようなものである。プロトプラスト化された細胞は、処理に対して非常に敏感であり、容易に死滅する。このステップは、十分な細胞が回収されることを保証する。このステップがうまく機能するほど、下流の分析のためにより多くの材料を使用することができる。

（５）「マークされた」変異を有する細胞を選択するステップ。これは、成長中の細胞に適切な抗生物質をオーバーレイすることによって達成される。親細胞のうちどれも「マー

クされた」変異を有さない場合、株を他の手段によってジェノタイピングして、目的の株を同定することができる。このステップは、任意選択であり得るが、細胞融合を受けた可能性が最も高い細胞が富化されることを保証する。複数の遺伝子座を「マークする」ことが可能であり、このやり方で目的の組合せをより速く生成することができるが、「無傷の」株を有することが希望ならば、次いで複数のプラスミドを除去しなければならない場合がある。

（６）他の親株に由来する変異の存在について成長している細胞をジェノタイピングするステップ。このステップは、統合することになるその他の変異の存在を探すものである。ジェノタイピングするためのコロニー数は、交雑の複雑さのみならず選択スキームに依存する。

（７）「マークされた」変異から（場合により）プラスミドを除去するステップ。これは任意選択であり、追加的な検証およびクライアントへの配送のために勧められる。一部の実施形態では、株についての操作サイクルの終わりに、すべてのプラスミド残遺物を除去する必要がある。これがいつ、何回実施されるかは、ユーザーの自由裁量である。一部の実施形態では、対抗選択可能なｓａｃＢ遺伝子の存在が、このステップを簡単明瞭にする。

【０８０７】

生成した株を、目的の所望の表現型について試験することができる。ゲノム上で遺伝的に非常に近接した変異は、統合するのがより困難である。統合が成功するチャンスを増やすために、どの変異が統合のために選択されたかを知っていることが賢明である。加えて、本明細書に記載されるステップ２、３、および４が、成功に不可欠であり、スキップされるまたは適切に実行されない場合、プロトコールの結果は。

【０８０８】

一部の実施形態では、変異のどれも、「マーク」されていない。例えば、変異に遺伝的に連結したマーカーはない。それぞれがユニークなマークされていない変異を含有する、全部でＮ個（Ｎ≧３）の異なる株が統合された場合、本開示の方法は、再帰的シャッフリング事象によりサークル時間の低減および異なるゲノムの間の組換えの最大化された機会を提供する。この場合、この方法は、以下のステップを含む：（１）操作された株のプールから親株を選択し、次いで、選択された株を統合するステップ；（２）統合される株からプロトプラストを調製する（例えば、細胞壁を除去するなど）ステップ；（３）目的の株を融合するステップ。このステップでは、細胞を一緒に融合させ、統合が起こる；（４）細胞を回収するステップ；（５）目的の変異のうち少なくとも１つを有する細胞を選択するステップ。これは、ジェノタイピングすることにより、または目的の変異を同定するための任意の他の適切な手段により行うことができる；（６）他の親株に由来する追加的な１つまたは複数の目的の変異を有する細胞を選択するステップ。

【０８０９】

プロトプラスト（propoplast）を生成する方法には、Kieserら（Practical Streptomyces Genetics、John Innes Center、ISBN0708406238）に記載された方法が含まれるが、それに限定されない。

【０８１０】

Ｂ．結果

１つの実験では、それぞれマークされた遺伝子座から異なる距離にＳＮＰ変異を有する１つのマークされた株および３つのマークされていない株。融合されたプロトプラストを抗生物質の存在下で選択する。このことは、すべてのマークされていない株を死滅させた。各ＳＮＰの遺伝子座をシーケンシングして、遺伝的交換を検証する。任意の特定の理論に縛られることを望むわけではないが、遺伝子座が十分に分離されている場合、交換は、より頻繁な場合がある。

【０８１１】

別の実験では、異なる株に由来する融合プロトプラストを産生するために、１％のマークされた株および９９％のマークされていない株を混合し、選択する。統合変異を有する、選択された株における相対スピノシン産生を試験し、親株（マークされた親株およびマ

ークされていない親株の両方）と比較する。結果は、多様性が生成し、一部の株は、両親よりも優れた性能である一方、一部の株はより悪いまたは同等の性能であることを示す。

【０８１２】

第３の例では、シャッフリングにより生成した表現型多様性を観察し、示す。「マークされた」親からのマーカーを有する細胞だけがこの培地上で成長する。観察された、コロニー形態（つるつるした（ｂａｌｄ）－不透明色の胞子形成（白色）細胞）およびコロニーのサイズ（大および小）における差異は、シャッフリング事象を示す。細胞は、ｓａｃＢマーカーなどの対抗選択マーカーを含有し、それをＲ２ＹＥ　Ｓｏｒｂ／Ｍａｎ培地上で回収する。

【０８１３】

（実施例１０）

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａに使用するためのレポータータンパク質および関連アッセイ

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａは、大いに扱いにくい宿主であり、この生物のための操作ツールの開発および操作の取り組みを支援するために非常に少数の分子生物学的ツールしか必要とされない。レポータータンパク質は、この生物について欠如していた重大なツールを表す。

【０８１４】

本発明者らの遺伝子操作の取り組み、およびより広くは代謝操作の主な目標は、所望の産物の収率を改善するために、宿主代謝を変更し、生合成経路を最適化し、経路遺伝子を導入または重複させることである。成功は、生合成遺伝子クラスターの内部（経路上）および外部（経路外）の両方で遺伝子の発現を撹乱し、バランスを取る能力または導入された非生来の遺伝子もしくは遺伝子のコピーを過剰発現する能力に依存する。これらの取り組みは、操作設計に使用することができるライブラリー遺伝子（ＤＮＡ）エレメント（例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター）の開発および特徴付けを必要とする。それらの発現を評価するためのレポータータンパク質およびアッセイは、これらのライブラリーの特徴付けに不可欠である。

【０８１５】

この例では、本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａにおける３つのレポーター遺伝子の実証および定量的な評価を提供する。本明細書に記載されるこれらの３つのレポーター遺伝子は、２つの蛍光レポータータンパク質（Ｄａｓｈｅｒ　ＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａ　ＲＦＰ；ＡＴＵＭ、https://www.atum.bio/products/protein-paintbox?exp=2）および酵素ベーターグルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）（Jeffersonら（１９８６年）.「Beta-Glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker」.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.８３巻（２２号）：８４４７～５１頁。）を含む。本発明は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいてこれらのマーカーが分子ツールとして順調に使用されたことを最初に示す。本開示は、また、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるＧｕｓＡ発現の定量的な評価を可能にする比色分析アッセイの最適化および適用についても記載する。

【０８１６】

ＤａｓｈｅｒＧＦＰ（ＡＴＵＭ）およびＰａｐｒｉｋａＲＦＰ（ＡＴＵＭ）をコードするヌクレオチド配列を、Ｅ．ｃｏｌｉのためにコドン最適化した（配列番号８１および配列番号８２）。ベーターグルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）をコードするヌクレオチド配列を、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化した（配列番号８３）。

【０８１７】

レポーター遺伝子を試験するために、ｅｒｍＥ＊プロモーター（配列番号１４９）をレポーターコード配列の前にクローニングし、結果として得られたコンストラクトを、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中の公知の中立部位内に組み込んだ。結果として得られた株を４８時間、液体培養（成長培地）で成長させた。培養液の一定分量をＰＢＳで洗浄し、次いで、（１）９６ウェルプレート中の反復培養液の一定分量に対してＴｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ１０００　Ｐｒｏ（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）プレートリーダーを使用した

蛍光測定；（２）Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．のための改変ＯｐｅｎＷｅｔＷａｒｅプロトコール（http://www.openwetware.org/wiki/Beta-glucuronidase_protocols）に従って、４－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルクロニドの存在下において３７℃でインキュベーション後の無細胞抽出物の吸光度（ＯＤ４０５）のいずれかを行った。

【０８１８】

レポーターＤａｓｈｅｒＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａＲＦＰの蛍光を、このようなレポーターを含有するように操作されたＳ．ｓｐｉｎｏｓａ株において測定した。結果は、両方のレポーターがＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて機能すること、およびそれらが別個の蛍光シグネチャーを有することを示している（図３１Ａ～Ｄ参照）。レポーターＤａｓｈｅｒＧＦＰおよびＰａｐｒｉｋａＲＦＰをコードするヌクレオチド配列がＥ．ｃｏｌｉのために最適化されたにもかかわらず、それらがＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいてタンパク質の発現をもたらしたので、これは予想外である。本発明者らが異なるレポーター遺伝子を選択したならば、これは、そうならなかったおそれがある。また、選択された蛍光タンパク質は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａで観察された内因性蛍光スペクトルと重複しなかったスペクトルを有した（図３６）。

【０８１９】

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける最適化されたベーターグルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）のＧｕｓＡ活性を、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．に使用するために開発された比色分析４－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルクロニドアッセイを使用して測定した（Jeffersonら（１９８６年）.「Beta-Glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker」.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.８３巻（２２号）：８４４７～５１頁）。結果は、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．での使用のために開発された４－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルクロニドアッセイ（細胞溶解および酵素反応を含む）がまた、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいても役に立つことを示す（図３５）。

【０８２０】

ＧｕｓＡアッセイのプロトコールを、下記に手短に述べる：

１．ＯＤ６００が０．６と１．０との間になるまで培養物を成長させる。

２．－　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ＝７）　５ｍＬ

－　Ｈ２Ｏ　３ｍＬ

－　塩化カリウム溶液　１ｍＬ

－　硫酸マグネシウム溶液　１ｍＬ

－　β－メルカプトエタノール　３５μＬ

－　リゾチーム　２０ｍｇ

を添加することにより、ＧＵＳ緩衝液１０ｍＬ（１０個の試料を測定する）を調製する。

３．培養液１．５ｍｌを１分間の遠心分離によりペレットにする。

４．－　０．１Ｍ塩化カリウム溶液

－　１０ｍＭ硫酸マグネシウム溶液

－　１Ｍ　Ｎａ２ＣＯ３

－　４－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルクロニド（４－ＮＰＧ）原液（５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ＝７）中に１０ｍｇ／ｍｌ）を１ｍＬだけ作製する！！！

－　β－メルカプトエタノール

－　１０％トリトンＸ－１００（水の中に）

を含有する１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液１ｍｌ中に再懸濁する。

５．遠心分離により再度ペレットにする。

６．ＧＵＳ緩衝液７５０μＬ中に再懸濁する。

７．手短にボルテックスして混合する。

８．３７℃の水浴中で３０分間インキュベートする。

９．１０％トリトンＸを８ｕｌ添加する。

１０．手短にボルテックスし、氷上で５分間インキュベートする。

１１．４－ＮＰＧ溶液を８０ｕｌ添加してタイマーをスタートする。
１２．３７℃の水浴中でインキュベートする。
１３．色が明らかに黄色になったときに（１０分と３０分との間）、１Ｍ　Ｎａ２ＣＯ３を３００μＬ添加することにより反応を停止させる。
１４．時間を記録する。
１５．反応物を全速で１分間遠心分離する。
１６．上清のＯＤ４０５を測定する。

【０８２１】

本発明は、このようなライブラリーの定量的な評価を可能にするが、他の潜在的適用（例えば、バイオセンサーの開発およびコロニーのスクリーニング、ならびに遺伝子編集技法の実証のためのマーカーおよび標的への使用）も有する。本明細書に記載の３つのレポーターは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに使用するために開発された最初のレポーター遺伝子および定量アッセイである。加えて、それらは、他の生物学的システムにおいて一般的なレポーターであるという利点を有し、そうであるから、それらの検出のためにすでに最適化された、確立された方法および機器を使用することが可能である。

【０８２２】

（実施例１１）

ＨＴＰゲノム操作－Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａにおける標的化した効率的なゲノム組込みのためのインテグラーゼベースのシステム

外因性ＤＮＡの組込みは、株性能を改善するための有効な方法であるが、しかし、これは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａでは、特に大きいＤＮＡ片（＞１０ｋｂ）にとって高度に非効率的である。Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのような宿主における生合成経路を重複させるまたは不応にする能力は、代謝操作の取り組みに重大であるが、これらの経路のサイズが、これらの取り組みを禁止させる。

【０８２３】

この実施例は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノムに遺伝子エレメントを組み込むためのインテグラーゼベースのシステムを記載する。インテグラーゼは、保存された部位（ａｔｔ部位；典型的には宿主染色体中のｔＲＮＡ遺伝子内に位置した、保存されたヌクレオチド配列）での認識および結合により、ＤＮＡペイロードの標的化組込みを方向付ける。本発明者らは、本発明により記載されるインテグラーゼベースシステムが、数十キロベースのサイズの遺伝的ペイロードの送達を可能にし、それにより、異種生物からの外因性ＤＮＡの効率的な導入またはＳ．ｓｐｉｎｏｓａ由来の生来の遺伝子の重複を可能にすることを期待する。本発明者らは、以下の選択されたインテグラーゼのうちの１つまたは複数がゲノム中の特異的部位へのＤＮＡの効率的な導入を可能にすることを示すことができることを期待する。

【表１０－１】

表10. *S.spinosa* のゲノム中に遺伝子エレメントを組み込むためのインテグラーゼ

インテグラーゼ	源	配列
pCM32 [1]	*S. endophytica*	pCM32インテグラーゼ+*attP*（配列番号　　84） atgccgcgtaagaaccgcgatgaaggcacccgggcgcccaacggcgcgagcagca tctacaagggcaaagacggctactggcacggccgcgtctggatgggcaccaagga cgacggcagtgaggaccgtcgccacaggtcagcgaagagcgaaacagagctcctc aataaggttcgcaagctcgaacgggagcgggacagcggcaaggtgcagaagcctg gccgcgcctggaccgtcgagaaatggcttacgcactgggtggagaacatcgccgc tcccaccgtgcggccgaccacgatggtcggctaccgcgcctcggtgtataagcat ctgatccccggcgtgggcaagcaccggatcgacaggttgcagccggaacacctcg aaaagctctacgccaagatgcagcgcgatggactcaaggccgcgacagcgcacct cgcgcaccggacggtgcgggtcgcgctgaacgaggccaagaagcgacgtcacatc accgagaacccggccaatatcgcgaagccgcccagggtggacgaggaggagattg tcccgttcacggtggatgaagcccgccggatcctcgcagcagctgcggagacgcg gaacggcgctcgctttgtcatcgcgctgacccttggcctgcgcaggggtgaagca ctcgggttgaagtggtcggatctctcgatcacctggaagcacggatgccggaagg ggagcgcgtgccgggtgggtcgccgagccgagcagtgcggcgagcgtcgcggcag cggcacgctcgtcatccggcgcgcgattcagcagcaggtttggcagcacggttgc tcagaggacaagccgtgcgaccaccgctacggcgctcactgcccgcgccggcata gcggcggtgtggtcgtgaccgatgtgaagtccagggcgggtcggcgaaccgtggg ccttccgcacccggtggtggaagcgctcgaagagcaccgcgcccgccagcggaca gagcgggagaaggcgcgcaacgagtgggacgacgccgattgggtcttcacgaaca

【表１０－２】

インテグラーゼ	源	配列
		ggtggggtcgcccggttcatccgaccgttgactacgacgcctggaaggcactgct cagggcagcgaacgtgcgcaacgcgcggttgcacgacgcacgccacaccgcggcg acgatgttgctggtgttgaaggttccgctgcctgcggtcatggaaatcatgggct ggtcggaagcctctatggccaagcgctacatgcacgtgccgcacgagctcgtgac cgcgatcgcggaccaggtgggtgacctggtgtggcccgtcccagagaccgaggag gaggcgccaccgcctgaggaggagtgggcgctggacgccaaccaggtggcggcga tccggaagctggccggagctctcccgccgcagttgcgggagcagttcgaggcgct gctgcccggcgacgacgaggacgacggcccgacttcgggagtggtcatccctgcg taaccagtgcggccagaacccggcctaacggggcctactgagacgaaaactgaga ctggacat**gcgagaggcccggaagcgagatcgcttccgggcctctgacctgcgga ggatacgggattcgaacccgtgagggctattaacccaacacgatttccaattccg atggcgcgagtgccaggggtagctgaacgtgccttttgcctggtcag**tggcact acggcaacatcaggtgtggcttgatccgtgcgcgt >pCM32インテグラーゼ_タンパク質 （配列番号 85） MPRKNRDEGTRAPNGASSIYKGKDGYWHGRVWMGTKDDGSEDRRHRSAKSETELL NKVRKLERERDSGKVQKPGRAWTVEKWLTHWVENIAAPTVRPTTMVGYRASVYKH LIPGVGKHRIDRLQPEHLEKLYAKMQRDGLKAATAHLAHRTVRVALNEAKKRRHI TENPANIAKPPRVDEEEIVPFTVDEARRILAAAAETRNGARFVIALTLGLRRGEA LGLKWSDLSITWKHGCRKGSACRVGRRAEQCGERRGSGTLVIRRAIQQQVWQHGC SEDKPCDHRYGAHCPRRHSGGVVVTDVKSRAGRRTVGLPHPVVEALEEHRARQRT EREKARNEWDDADWVFTNRWGRPVHPTVDYDAWKALLRAANVRNARLHDARHTAA TMLLVLKVPLPAVMEIMGWSEASMAKRYMHVPHELVTAIADQVGDLVWPVPETEE EAPPPEEEWALDANQVAAIRKLAGALPPQLREQFEALLPGDDEDDGPTSGVVIPA * >pCM32中のattP部位 （配列番号 167） Gcgagaggcccggaagcgagatcgcttccgggcctctgacctgcggaggatacgg gattcgaacccgtgagggctattaacccaacacgatttccaattccgatggcgcg agtgccaggggtagctgaacgtgcctttgcctggtcag
pSE101 [2]	*S. erythraea*	pSE101インテグラーゼ+attP （配列番号 86） atgccccgcaaacgccgcccagaaggcacccgagcccccaacggcgccagcagca tctactacagcgagacggacggctactggcacgggcgcgtcacgatgggcgtccg cgacgacggcaagcccgaccgtcgccacgtccaagccaagaccgagaccgaggtc atcgataaggtccgcaagctcgaacgtgaccgggatagcggcaacgcgcggaagc ctggtcgcgcgtggacagtcgagaagtggctgactcactgggtcgagaacatcgc ggtgcactccgttcggtacaagacgcttcagggctaccgaacggcggtctacaag cacctgatccccggtatcggcgcgcaccggatggaccgcatcgagccggagcact tcgagcggttctacgccaggatgcaggccgccggcgccagtgcagggaccgcaca tcaggtgcaccggactgccaaaacggcattcaacgaatacttccggcggcagcgc atcaccgggaaccccatcgccttcgtgaaagcgccgcgcgtcgaggaaaaggaag tggagccgttcacgccgcaggaagccaagagcatcatcacggccgcgctcaagcg gcgcaacggcgtgcgatacgtcgtcgccttggctctcggttgtcgccaaggcgaa gccctgggttcaagtgggaccgcctcgaccgcgggaaccggctttaccgcgtac ggcaggcattgcagcggcaggcttggcaacacggatgcgacgacccgcacgcctg cggagcacgacttcatcgggtggcgtgcccggacaactgcacccagcatcgcaac cgcaagagctgcattcgcgacgagaagggccaccaccgtccgtgcccgccgaact gcaccaggcacgcgagcagttgcccgcagcggcacggtggtgggctcgtcgaggt cgacgtgaagtcgaaggctggtcgccggagcttcgttctgccagatgaggtcttc gatctgctgatgcgccacgagcaggcgcagcagcgggagcgcaagcacgccggta gcgagtggcaggaggggggctgggtcttcacccagcccaacggccggccgatcga tccgcggcgcgactggggtgagtggaaggacatcttgggggaggcaggtgttcgg gatgctcggctgcacgacgcgcgccacactgcggcgacggtcctcatgctgctcc gcgttccagaccgggccgtccaggatcacatgggctggtcctcgatccggatgaa ggagcgctacatgcacgtcaccgaggaactgcgacgagagatcgccgatcagctc aacgggtacttctgggacgtcaactgagacggaaagtgagacgaaaagcgcctgg tcagggacctgtcgacggcgtttccgctggtagtt**tcggagccgctgaggggact cgaacccctgaccgtccgcttacaa**ggcgggcgctctaccaactgagctacagcg gcgtgcgctacgtcgcgcgcgaacatcgtaagcgtccacc

【表１０－３】

インテグラーゼ	源	配列
		>pSE101インテグラーゼ_タンパク質 （配列番号 87） MPRKRRPEGTRAPNGASSIYYSETDGYWHGRVTMGVRDDGKPDRRHVQAKTETEV IDKVRKLERDRDSGNARKPGRAWTVEKWLTHWVENIAVHSVRYKTLQGYRTAVYK HLIPGIGAHRMDRIEPEHFERFYARMQAAGASAGTAHQVHRTAKTAFNEYFRRQR ITGNPIAFVKAPRVEEKEVEPFTPQEAKSIITAALKRRNGVRYVVALALGCRQGE ALGFKWDRLDRGNRLYRVRQALQRQAWQHGCDDPHACGARLHRVACPDNCTQHRN RKSCIRDEKGHHRPCPPNCTRHASSCPQRHGGGLVEVDVKSKAGRRSFVLPDEVF DLLMRHEQAQQRERKHAGSEWQEGGWVFTQPNGRPIDPRRDWGEWKDILGEAGVR DARLHDARHTAATVLMLLRVPDRAVQDHMGWSSIRMKERYMHVTEELRREIADQL NGYFWDVN* >pSE101中のattP部位 （配列番号 168） Tcggagccgctgaggggactcgaaccccctgaccgtccgcttacaa
pSE211 [3]および[4]	*S. erythraea*	>pSE211インテグラーゼ+*attP* （配列番号 88） acgtcacccaactcgccgccacgctcgcctcgctcgcggccctgctcgccgaaca gcagcccgccccggaacccgagcccgaaccggccgcccgcaggctgcccaaccgc gtgctgctcacggtcgaggaagcggccaagcaactggggctcggcaggaccaaga cctacgcgctggtggcgtctggcgagatcgaatctgtccggatcggtcggctcag gcgcatcccgcgcaccgccatcgacgactacgccgcccgactcatcgcccagcag agcgccgcctgaagggaaccactatggaacaaaagcgcacccgaaaccccaacgg tcgatcgacgatctacctcgggaacgacggctactggcacggccgcgtcaccatg ggcatcggcgacgacggcaagcctgaccggcgccacgtcaagcgcaaggacaagg acgaagttgtcgaggaggtcggcaagctcgaacgggagcgggactccggcaacgt ccgcaagaagggccagccgtggacagtcgagcggtggctgacgcactgggtggag agcatcgcgccgctgacctgccggtacaagaccatgcggggctaccagacggccg tgtacaagcacctcatccccggtttgggcgcgcacaggctcgatcggatccagaa ccatccggagtacttcgagaagttctacctgcgaatgatcgagtcgggactgaag ccggcgacggctcaccaggtacaccgcacggcgcgaacggctttcggcgaggcgt acaagcggggacgcatccagaggaacccggtttcgatcgcaaaggcacctcgggt ggaagaggaggaggtcgaaccgcttgaggtcgaggacatgcagctggtcatcaag gccgccctggaacgccgaaacggcgtccgctacgtcatcgcactggctctcggaa ctcggcagggcgaatcgctcgcgctgaagtggccgcggctgaaccggcagaagcg cacgctgcggatcaccaaggcactccaacgtcagacgtggaagcacgggtgctct gacccgcatcggtgcggcgcgacctaccacaagaccgagccgtgcaaggcggcct gcaagcggcacacgcgagcttgtccgccgccatgcccgccagcttgcaccgaaca cgcccggtggtgcccgcagcgaaccggtggcgggctggtcgaggtcgacgtcaag tcgagggctggacgacggaccgtgacgctgcccgaccaactgttcgacttgatcc tcaagcacgaaaagcttcaggggccgaacgggagctcgcgggcacggagtggca cgacggcgagtggatgttcacccagcccaacggcaagccgatcgatccacgtcag gacctcgacgagtggaaagcaatccttgttgaagccggagtccgcgaggcgcggc tacatgacgcacggcacaccgccgcgactgtgctgttggtcctcggagtgcccga ccgggtcgtgatggagctgatgggctggtcgtccgtcaccatgaagcagcggtac atgcacgtcatcgactccgtccggaacgacgtagcggaccgcctgaacacctact tctggggcaccaactgagacccagactgagacccaaaacgccccgtcgagatcg acgggggcgttttt**ggcagctcttggtggtggccaggggcggggtcgaaccgccga** **ccttccgctt**ttcaggcggacgctcgtaccaactgagctacctggccgttcgcgc ccggctcaaagccgaaccgctgtggcgacccagacgggactcgaacccgcgacct ccgccgtgacagggcggcgcgctaaccaactgcgccactgggccatgttctgttg ttgcgtacccccaacgggattcgaacccgcgctaccgccttgaaagggcggcgtc ctaggccgctagacgatgggggcttggccgattcggaaccgacccggcctcgcct ccaaccggctttccctttcggggcgccccgttgggagcagtgaaagcttacgaca caccccccagcgccccacaacgggggggtccccaaacctcacgagcccccgcgcg gcccacgcccgccggtcacgtcggtcgccaccatatgccatctgaccagccttttt ccatcgcctatcctcagtcggcccact >pSE211インテグラーゼ_プロ （配列番号 89）

【表１０－４】

インテグラーゼ	源	配列
		MEQKRTRNPNGRSTIYLGNDGYWHGRVTMGIGDDGKPDRRHVKRKDKDEVVEEVG KLERERDSGNVRKKGQPWTVERWLTHWVESIAPLTCRYKTMRGYQTAVYKHLIPG LGAHRLDRIQNHPEYFEKFYLRMIESGLKPATAHQVHRTARTAFGEAYKRGRIQR NPVSIAKAPRVEEEEVEPLEVEDMQLVIKAALERRNGVRYVIALALGTRQGESLA LKWPRLNRQKRTLRITKALQRQTWKHGCSDPHRCGATYHKTEPCKAACKRHTRAC PPPCPPACTEHARWCPQRTGGGLVEVDVKSRAGRRTVTLPDQLFDLILKHEKLQG AERELAGTEWHDGEWMFTQPNGKPIDPRQDLDEWKAILVEAGVREARLHDARHTA ATVLLVLGVPDRVVMELMGWSSVTMKQRYMHVIDSVRNDVADRLNTYFWGTN* >pSE211中のattP部位　（配列番号　169） ggcagctcttggtggtggccaggggcggggtcgaaccgccgaccttccgctt
pSE101 相同体	*S. spinosa*	>SS101_相同体　(3g00449)_CDS+*attP*（配列番号　90） atgccacgcaaacgccgcccggaaggcacccgggcacccaacggagccagcagca tctacctcggcaaggacggctactggcacggccgcgtcaccgtcggagttcgcga cgacggtaagcccgaccgccctcacgtccaggccaagaccgaggccgaagtcatc gacaaggtgcgcaagctcgaacgcgatcgcgatgcggggaaggtgcgaaagcctg gccgggcctggaccgtcgagaagtggcttacgcactgggtcgagaacatcgccgc gccatccgtccgttacaagacccttcagggctaccgcacggcggtgtacaagcac ttgatccccggcatcggcgcgcaccggatcgaccgaattgaaccggagcacttcg agaagctctacgcgaagatgcaggaatccggcgcgaaagcgggaaccgcgcacca ggtgcaccgcaccgctcgggccgcctttaacgaagccttccggcgtcggcacctc accgaaagcccggtgcggttcgtgaaagcgccgaaggtcgaagaagaggaagtcg agcccttcacgccgaaggaagcccagcagatcattacggccgcgctcaatcgtcg aaacggcgtgcgattcgtgatcgctctcgcactgggctgccgccagggtgaagcg ctgggcttcaagtgggaacggctcgaccgggaaaacaggctctaccacgttcgga gggcgcttcagcgtcaagcctggcaacacggctgtgaagatccgcacaactgcgg tgcgaggttccaccgggttgcttgcgccgagaactgcaagcggcaccgcaatcgg aagaactgcattcgcaacgagaagggacacgctcgaccgtgcccgccgaactgcg accgacacgccagcagctgcccgaaacggcacggcggaggcctgcgcgaggtgga tgtgaagtcgaaggctggccgccggcggttcgttcttcctgacgagatcttcgac ctgctcatgcggcatgaggaagtccagcggcacgaacgggttcacgccggtaccg agtggcaggagggcggctggatcttcacgcagcccaacggcaggccgatcgatcc gcgccgcgattggggcgagtggaaggagatcctcgcggaggccggtgttcgggat gcccggctgcacgacgcgcggcacaccgcagcgacggtgctcatgctgctccgtg ttccggaccgggccgttcaggaccacatgggatggtcgtcgatccggatgaaaga gcggtacatgcacgtcaccgaggaactgcgccgcgagatcgccgatcagctgaat gggtatttctggaaccccaactgagaccgaaagtgagacggatcgcgcctggtca ccgggtgggcaggcgcgtttccgctggtacgg**tcggagccgctgaggggactcga acccctgaccgtccgcttacaaggc**gggcgctctaccaactgagctacagcggca tgcacttcgtcgtgcggggacatcgtaagcggcgat >SS101_相同体　(3g00449)_タンパク質（配列番号　91） MPRKRRPEGTRAPNGASSIYLGKDGYWHGRVTVGVRDDGKPDRPHVQAKTEAEVI DKVRKLERDRDAGKVRKPGRAWTVEKWLTHWVENIAAPSVRYKTLQGYRTAVYKH LIPGIGAHRIDRIEPEHFEKLYAKMQESGAKAGTAHQVHRTARAAFNEAFRRRHL TESPVRFVKAPKVEEEEVEPFTPKEAQQIITAALNRRNGVRFVIALALGCRQGEA LGFKWERLDRENRLYHVRRALQRQAWQHGCEDPHNCGARFHRVACAENCKRHRNR KNCIRNEKGHARPCPPNCDRHASSCPKRHGGGLREVDVKSKAGRRRFVLPDEIFD LLMRHEEVQRHERVHAGTEWQEGGWIFTQPNGRPIDPRRDWGEWKEILAEAGVRD ARLHDARHTAATVLMLLRVPDRAVQDHMGWSSIRMKERYMHVTEELRREIADQLN GYFWNPN* >pSE101相同体中のattP部位　（配列番号　170） tcggagccgctgaggggactcgaacccctgaccgtccgcttacaaggc
pSE211 相同体	*S. spinosa*	>SS211_相同体　(3g00347)_CDS+*attP*（配列番号　92） atgccacgcaagcgccgcccggaaggcacccgggcacccaacggagccagcagca tctacctcggaaacgacggctactggcacggccgcgtcacgatgggaacccgtga

【表１０－５】

インテグラーゼ	源	配列
		cgacggccgccccgaccgacggcatgtccagggcaagaccgaggccgaagtcata gacaaagtgcgcaagctcgaacgcgaccgcgacgccggacggatgcgcaagcctg gccgggcctggaccgtcgagaagtggctgatgcactggctggagcacattgcgaa gccatcggtccggccgaaaaccgtcgcccggtatcggacttccgtcgagcaatac ctgattcctggtctcggtgcgcaccgcatcgaccgcttgcagccggagaacattg agaagctgtacgcaaaattgctcgctcgcgggttggcgccgtccactgtgcacca tgttcaccggactctgcgcgtcgctttcaacgaggcgttcaagcgggaacacatc acgaaaaacccggtcctcgttgcgaaagcgccgaagctggtcgaaccggagatcg agccgttcaccgtggccgaagcacaacgaattctcgatgttgcacggacacggcg gaatggtgctcggttcgcactcgcgctcgcgctgggaatgcgccagggcgaagct ctcggactcaagtggtccgacctgcgaatcacctggcaccacgggtgcgcatccg gactcaccgaagaacagcaggcggccatcgaaatgctcgcgaaggtcgatccgca gcgatggaagcggcctgacgattccgggtgcggattcaaggacgtggaggactgc ccgcaggctcacccggccgcgacactgaacattcggcgcgcattgcagcgccaca cctggcaacacgggtgcggtgacaaaccgacgtgcggcaagaaacggggcgcgga ctgcccgcagcgtcatggcggcggcttggccatcgtcccggtgaagtcgagggcg gggacgcgctcgatcagcgtgcctgagccgctgattcatgcgttgctcgatcacg acgaggcgcaggatgaggaacggcacttggcccggaacctgtggcacgacgatgg atggatgttcgctcagcccaacgggaaggcgacggacccgagggccgactatggc gaatggcgcgagctgctggacgccgcgaaggttcggccggcgcggctgcacgacg cgcggcacaccgccgcgacgatgttgctggttctcaaggtcgcaccacgggcaat catggacgtgatgggctggtcggaggcgtcgatgctgacccgctacgtccacgtg ccggacgagatcaagcagggcatcgcgggccaggtcggcggactgctgtggaagg actggcagcagcccgacgacggcccagacgacgaggacggcggcaccgccgggca ccctgtcccggcctgacgtgcccactgccagaggaggcgtttgagccggaaactg agccggaacgacaccaggcgctttccgtgtccacggaaagcgcctggtgagagc**g** **gagccgcctaagggaatcgaacccttgacctacgcattacgagtgcgtcgctcta** **gccgactgagctaaggcggc**gttgcacggccaagtgtagcgggccggacctcgcc gtcgttcatggccccgact >SS211_相同体 (3g00347)_タンパク質 (配列番号 93) MPRKRRPEGTRAPNGASSIYLGNDGYWHGRVTMGTRDDGRPDRRHVQGKTEAEVI DKVRKLERDRDAGRMRKPGRAWTVEKWLMHWLEHIAKPSVRPKTVARYRTSVEQY LIPGLGAHRIDRLQPENIEKLYAKLLARGLAPSTVHHVHRTLRVAFNEAFKREHI TKNPVLVAKAPKLVEPEIEPFTVAEAQRILDVARTRRNGARFALALALGMRQGEA LGLKWSDLRITWHHGCASGLTEEQQAAIEMLAKVDPQRWKRPDDSGCGFKDVEDC PQAHPAATLNIRRALQRHTWQHGCGDKPTCGKKRGADCPQRHGGGLAIVPVKSRA GTRSISVPEPLIHALLDHDEAQDEERHLARNLWHDDGWMFAQPNGKATDPRADYG EWRELLDAAKVRPARLHDARHTAATMLLVLKVAPRAIMDVMGWSEASMLTRYVHV PDEIKQGIAGQVGGLLWKDWQQPDDGPDDEDGGTAGHPVPA* >pSE211相同体中のattP部位 (配列番号 171) ggagccgcctaagggaatcgaacccttgacctacgcattacgagtgcgtcgctct agccgactgagctaaggcggc
[1] Chen J, Xia H, Dang F, Xu Q, Li W, Qin Z. Characterization of the chromosomal integration of Saccharopolyspora plasmid pCM32 and its application to improve production of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*. Applied Microbiology and Biotechnology. PMID 26260388 DOI: 10.1007/s00253-015-6871-z [2] Brown DP, Chiang SJ, Tuan JS, Katz L (1988a) Site-specific integration in *Saccharopolyspora erythraea* and multisite integration in Streptomyces lividans of actinomycete plasmid pSE101. J Bacteriol 170:2287–2295 [3]Brown,D.P., Idler, K.B.およびKatz, L. (1990) Characterization of the genetic elements required for site-specific integration of plasmid pSE211 in *Saccharopolyspora erythraea*. J. Bacteriol., 172, 1877–1888.		

【表１０－６】

インテグラーゼ	源	配列
[4] Te Poele E. M., Bolhuis H., Dijkhuizen L. (2008) Actinomycete integrative and conjugative elements. Antonie Van Leeuwenhoek 94, 127–143.		

【０８２４】

ｐＣＭ３２インテグラーゼは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて機能することが示されている（Chenら、「Characterization of the chromosomal integration of Saccharopolyspora plasmid pCM32 and its application to improve production

of spinosyn in Saccharopolyspora spinosa.Applied Microbiology and Biotechnology.」PMID 26260388 DOI:10.1007/s00253-015-6871-z）。これは、ｐＣＭ３２結合部位と９９％の同一性を有する結合部位がＳ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム中に見出されているので、驚くべきことではない（図３８）。Ｃｈｅｎらの著者は、２つの遺伝子の標的化組込みを達成し、それは、改善されたスピノシン力価を有する株をもたらした（その全体として参照により組み込まれている特許出願ＣＮ１０５０８７５０７Ａを参照されたい）。

【０８２５】

ｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１インテグラーゼならびにそれらの結合部位が、記載されている。ｐＳＥ１０１結合部位とｐＳＥ２１１結合部位との両方のコアが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ中に見出される（それぞれ図３９および図４０）。これらのインテグラーゼシステムを試験したが、機能しなかった。本発明者らは、改変したシステムおよび他のインテグラーゼシステムを試験する。

【０８２６】

ｐＣＭ３２、ｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１を使用してＳ．ｓｐｉｎｏｓａ中に配列を組み込むためのベクターを図３７に記載する。同様に、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのｐＳＥ１０１相同体を使用するベクターまたはｐＳＥ１０１相同体も構築することができる。これらのベクターを試験して、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノム中に外因性ＤＮＡを組み込むそれらの能力を検討する。

【０８２７】

本開示に記載した方法により生成した組込み型外因性ＤＮＡを含有するＳ．ｓｐｉｎｏｓａ株を、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａにおける株性能を改善するための基礎として使用することができる。例えば、このような株を、ＨＴＰシステムにおける上記の例に記載したＳＮＰスワップライブラリー、プロモータースワップライブラリー、および／またはターミネーターライブラリーと組み合わせて、スピノシンなどの所望の産物の改善された産生を有する新しいＳ．ｓｐｉｎｏｓａ株を創製することができる。

【０８２８】

表１０に記載したインテグラーゼシステムを試験したが、機能しなかった。本発明者らは、改変したシステムおよび他のインテグラーゼシステムを試験する。

【０８２９】

（実施例１２）

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのための自己複製プラスミドシステムのための複製起点

この実施例では、複製起点および複製エレメント（例えば、プラスミド複製に必要な酵素をコードする遺伝子）が提供される。これらの遺伝子エレメントは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて複製機能性を提供する場合があり、したがって、それらは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのための自己複製プラスミドシステムの構築を可能にし得る。自己複製プラスミドシステムは、この宿主で行うことができる遺伝子操作およびスクリーニングの種類を拡大する。

【０８３０】

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａについて現在欠如している１つの重要な分子遺伝的ツールは、自己複製プラスミドシステムである。プラスミドシステムは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの操作能力をいくつかのやり方で拡張する。例えば、それは、（１）代謝操作設計を試験するための相同組換えによる順調な組込みの必要性を排除することができ（例えば、プラスミドシステムを使用して遺伝子重複または異種酵素を導入して、宿主表現型に対する効果を決定することができよう）；（２）ライブラリー（遺伝子、プロモーター、ターミネーター、またはリボソーム結合部位）のより迅速なスクリーニングを可能にする；（３）ユーザーがプラスミドシステム上におよびその制御下でＣＲＩＳＰＲシステムコンポーネントを導入可能にすることにより、ＣＲＩＳＰＲベースのゲノム編集を促進する。

【０８３１】

Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａにおいて広く使用される自己複製プラスミドｐＷＨＭ４（Varaら、１９８９年、「Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in Saccharopolyspora erythraea(Streptomyces erythraeus」.J.Bacteriol.１７１巻、５８７２～５８８１頁.）およびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｌｉｖｉｄａｎｓ由来の多重コピー広域宿主範囲プラスミドｐＩＪ１０１（Kieserら、１９８２年、「pIJ101、a multi-copy broad host-range Streptomyces plasmid:functional analysis and development of DNA cloning vectors.」Mol Gen Genet １８５巻：２２３～２２８頁）を含む、近縁種由来の他のプラスミドが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて使用するために検討されているが、本発明者らの知るところでは、順調に使用されていない。

【０８３２】

一部の実施形態では、複製起点の源は、Ｓ．ｅｒｙｔｈｒａｅａにおいて見出された推定染色体複製起点、ならびにＳ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ由来のプラスミドｐＳＥ１０１およびｐＳＥ２１１における放線菌組込み接合エレメント（ＡＩＣＥ）（Te Poeleら、（２００８年）Actinomycete integrative and conjugative elements.Antonie Van Leeuwenhoek ９４巻、１２７～１４３頁.）を含む。図４１Ａを参照されたい。放線菌組込み接合エレメント（ＡＩＣＥＳ）は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｐ．を含むａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓに一般的な可動遺伝子エレメントである。これらのエレメントは、ゲノム中に組み込まれて、または自律自己複製プラスミドとして見出すことができる。

【０８３３】

これらの推定複製起点を試験するために、抗生物質耐性マーカーおよび推定複製起点＋／－自己複製に必要な他の遺伝子（例えば、ＡＩＣＥの場合）を含有するプラスミドをアセンブルした。アセンブルしたプラスミドをＳ．ｓｐｉｎｏｓａに送達し、抗生物質選択を使用して、プラスミドを有する形質転換体を選択した。ＰＣＲを使用して、プラスミドの維持および安定性を確認した。例示的なプラスミドを図４１Ｂに示す。これらの推定複製起点を試験したが、機能しなかった。本発明者らは、改変した設計および他の推定複製起点を試験する。

【０８３４】

（実施例１３）

ＨＴＰゲノム操作－Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中でのスピノシンの産生における株性能を改善するための、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）ライブラリーのインプリメンテーション

これまでの実施例は、工業用株を再建するために、本開示のＨＴＰ株改良プログラムの力を実証してきた。実施例２および３は、種々の基準株、中間株および工業用株における、現存する遺伝子の多様性を探索する、ＳＮＰスワップの技法およびライブラリーのインプリメンテーションについて記載した。

【０８３５】

この実施例は、本開示のリボソーム結合部位ライブラリーの技法を使用するＨＴＰ株改良プログラムの実施形態を示す。

【０８３６】

Ａ．　ＲＢＳライブラリーを適用するための標的の同定

ＲＢＳライブラリーの適用は、標的とするための「ｎ」遺伝子のセットを選択するステップを含む、マルチステッププロセスである。

【０８３７】

発明者らは、潜在的な経路遺伝子の群を同定して、本開示のプロモーターラダー法により、モジュレートした。（実施例４および図１２Ａ～図１２Ｄを参照されたい）。

【０８３８】

Ｂ．　ＲＢＳライブラリーの創製

本発明者らの遺伝子操作の取り組み、およびより広くは代謝操作の主な目標は、所望の

産物の収率を改善するために、宿主代謝を変更し、生合成経路を最適化し、経路遺伝子を導入または重複させることである。成功は、生合成遺伝子クラスターの内部（経路上）および外部（経路外）の両方で遺伝子の発現を撹乱し、バランスを取る能力または導入された非生来の遺伝子もしくは遺伝子のコピーを過剰発現する能力に依存する。Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａでは、特徴付けられたＲＢＳを含めて入手可能な遺伝的ツールが限られている。本発明は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるタンパク質発現の組込みおよび調整のための多重遺伝子多シストロン性オペロンの設計を可能にする遺伝子操作ツールである。

【０８３９】

リボソーム結合部位（ＲＢＳ）は、リボソームを動員し、タンパク質の翻訳を開始することを担うｍＲＮＡ転写物上の開始コドンの上流に位置した、ヌクレオチドの短い配列である。したがって、それらは、翻訳およびタンパク質発現の重要な調節因子である。しかし、ＲＢＳはまた、遺伝子の５’ＵＴＲ、プロモーターまたはコード領域中の近傍のヌクレオチドと相互作用して、転写および／または翻訳速度に影響することもできる。これらの相互作用および結果として得られた二次構造により、リボソーム結合部位は、遺伝子の発現を「調整」することができる。

【０８４０】

ＲＢＳライブラリーは、合成生物学のツールキットの一般的なコンポーネントであり、様々な生物について開発されてきた。加えて、目的の遺伝子と好都合に相互作用する合成ＲＢＳを予測するためのツールが開発されている（Salisら、「Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression.」Nat Biotechnol.２００９年；２７巻：９４６～９５０頁.doi:10.1038/nbt.1568.）。しかし、これは、最初のこのようなライブラリーであり、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａについて記載され、特徴付けられた最初の生来のＲＢＳである。

【０８４１】

推定の生来のＲＢＳを同定するために、開始コドンまたは多シストロン性オペロン中の遺伝子の間の遺伝子間領域から上流のヌクレオチド配列を選択した。文献（Luoら、「Comparative proteomic analysis of Saccharopolyspora spinosa SP06081 and PR2 strains reveals the differentially expressed proteins correlated with the increase of spinosad yield.」Proteome SCI.２０１１年、９巻：１～１２頁）からのプロテオームデータに基づき、高度に発現されると予期される遺伝子のために、またはスピノシン産生に関係する遺伝子のために、ＲＢＳを選択した。予測は、分析の時点でＰＡＴＲＩＣデータベース（https://www.patricbrc.org/）から入手可能なアノテーションに基づいた。対抗選択可能マーカー（ｓａｃＢ）を使用してＲＢＳをアッセイした－選択培地上の成長レベルが機能性に関する測定基準を構成した。

【０８４２】

この実施例において、本発明者らは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａおよび関連宿主に使用するための、様々な程度の翻訳活性を有する１９個のリボソーム結合部位（ＲＢＳ）の群のライブラリーを創製した。ライブラリーは、異なる宿主においてこれまでに記載された合成配列およびこれまでに特徴付けられたことがないＳ．ｓｐｉｎｏｓａに生来の配列から構成されている。

【表１１－１】

表 11. RBS 配列、それらの源、サイズ、および関連機能の概要

	遺伝子	RBS 配列	(bp)	機能
RBS1	PermE*	aggaggtcccat (配列番号 97)	12	+
RBS2	spnA (ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1)	ccaggaatcggaggggcagtaccga (配列番号 98)	25	++
RBS3	spnC (ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 3～4)	gcaacttcctggagggaaacgccac (配列番号 99)	25	++
RBS4	spnO (推定 NDP-ヘキソース-2,3-デヒドラターゼ)	tcgtcacggcagtgagggattgggc (配列番号 100)	25	+
RBS5	gdh (gdh (dTDP-グルコース 4,6-デヒドラターゼ))	cgaaatcccggcgaggaagggcgcg (配列番号 101)	25	++
RBS6	リンカー_A (アルデヒドデヒドロゲナーゼ、AldA)	cgcctcggccccttcaggaggagacag (配列番号 102)	28	++
RBS7	リンカー_B (アセト乳酸シンターゼ)	ctccagacgcccacgcaaggagaccc (配列番号 103)	26	++
RBS8	リンカー_C	actagtaaggaggtccaac (配列番号 104)	19	++
RBS9	リンカー_D	aagaggtatatatta (配列番号 105)	15	-
RBS10	gtt (グルコース-1-リン酸チミジリルトランスフェラーゼ 1)	ccaccgctggaggtatccgg (配列番号 106)	20	++
RBS11	TDH (グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ)	aggagagatcggc (配列番号 107)	13	+
RBS12	バイオブリック_1	aaagaggagaaa (配列番号 108)	12	++
RBS13	バイオブリック_2	attaaagaggagaaa (配列番号 109)	15	++
RBS14	GroES (分子シャペロン GroES)	agaaggtggaggtcacacc (配列番号 110)	19	++
RBS15	GroEL (分子シャペロン GroEL)	aagggctgttggaatc (配列番号 111)	16	-
RBS16	IF-1 (翻訳開始因子 IF-1)	attgaggtcgagggtcgg (配列番号 112)	18	-
RBS17	XNR_1700 (ペリプラズムムレインペプチド結合タンパク質前駆体)	ggcggtgaatgatccgccgcgc (配列番号 113)	22	++
RBS18	S20 (30s リボソームタンパク質 S20)	gacgaggaagaggcgccaca (配列番号 114)	20	++
RBS19	S12 (リボソームタンパク質 S12)	acgttacgctcgtcgc (配列番号 115)	15	NA
RBS20	S12 (リボソームタンパク質 S12)	gggacgttacgctcgtcgc (配列番号 116)	19	++
RBS21	DnaK (Hsp 70)	tcgtgacctcggtgctgaaca (配列番号 117)	21	-
RBS22	伸長因子 Tu	aggaggaacaatcca (配列番号 118)	15	NA
RBS23	F0F1 ATP シンターゼサブユニットベータ	ccgcaggaagtgagtgac (配列番号 119)	18	NA
RBS24	分子シャペロン DnaK	cgtgacctcggtgctgaaca (配列番号 120)	20	-
RBS25	ファージショックタンパク質 A、PspA	aattcccggggatctacc (配列番号 121)	18	-
RBS26	2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ	cgaggcgaacgcagcc (配列番号 122)	17	-

【表１１－２】

	遺伝子	RBS 配列	(bp)	機能
RBS27	5-メチルテトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼ	gcgaaggagagccccc (配列番号 123)	16	++
RBS28	50S リボソームタンパク質 L7/L12	ccgaaaggaacgccgac (配列番号 124)	17	++
RBS29	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットアルファ	gaggaaaggaaaacgaa (配列番号 125)	17	++
RBS30	30S リボソームタンパク質 S5	gaacggaagggacgcctg (配列番号 126)	18	NA
RBS31	DnaK (6929)	cggcgggtcggagaggagtgc (配列番号 127)	21	-
RBS32	ネガティブ_1(ermE のみ)	-	0	
注:このライブラリーは、26 個の生来の RBS(関連遺伝子 ID を有するもの)を含有する。残りの 5 つの配列は、合成または異種源である。 (−)=機能なし;(+)=低機能;(++)=機能 「NA」は、本発明者らがデータを有さない RBS を示す。				

【０８４３】

したがって、本開示は、多重遺伝子多シストロン性組込みにおける遺伝子間のスペーサーとして必要とされる機能ＲＢＳ配列の多様なライブラリーを提供する。これらのＲＢＳの配列多様性および強さの変動は、プロモーターと遺伝子との間に異なるＲＢＳを挿入することにより遺伝子の発現を上下に調整するためにこれらを使用する機会を提供する。

【０８４４】

Ｃ．　ライブラリーからのＲＢＳと標的遺伝子との関連性

ＲＢＳライブラリーのインプリメンテーションにおける別のステップは、様々な株のＨＴＰ操作であり、これらの株は、特定の標的遺伝子と関連があるＲＢＳライブラリーからの所与のＲＢＳを含む。

【０８４５】

生来のＲＢＳが標的遺伝子ｎの前に存在し、その配列が分かっている場合には、生来のＲＢＳの、ライブラリー中のＲＢＳのそれぞれでの置き換えを実施することができる。生来のＲＢＳが存在しないかまたはその配列が分かっていない場合には、遺伝子ｎの前に、ライブラリーのＲＢＳのそれぞれの挿入を実施することができる。このようにして、株のライブラリーを構築し、この場合、ライブラリーの各メンバーは、他の点では同一の遺伝子状況でｎ標的に作動可能に連結しているＲＢＳの一例である。

【０８４６】

Ｄ．　株のＨＴＰスクリーニング

ＲＢＳライブラリーを適用することにおける最後のステップは、上記のライブラリーにおける株のＨＴＰスクリーニングである。得られた株のそれぞれは、他の点では同一の遺伝的バックグラウンドでｎ標的に連結しているＲＢＳの一例を表す。

【０８４７】

本発明者らは、１つまたは複数の測定基準に対する株の性能を特徴付けるシナリオにおいて、各株のＨＴＰスクリーニングをインプリメントすることによって、所与の測定基準（例えば、目的の分子の産生の最適化）に関して、ＲＢＳ／標的遺伝子のどの関連性が最も有益であるかを決定することができる。

【０８４８】

この操作手法の有用性を実証しているデータを図６３に示す。リボソーム結合部位をいくつかの標的化遺伝子の上流に挿入して、翻訳効率を改変し、ポリケチド生産性についてこれらの操作された株をプレートアッセイで親株と比較して試験した。いくつかの「ＲＢＳスワップ」株は、親株と比較して改良を示した。

【０８４９】

（実施例１４）

ＨＴＰゲノム操作－Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａにおける株性能を改善するためのトランスポゾン変異誘発ライブラリーのインプリメンテーション

本実施例は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるｉｎ　ｖｉｖｏトランスポゾン変異誘発により株ライブラリーを産生する方法について記載する。結果として得られたライブラリーをスクリーニングして、改良された表現型（例えば、スピノシンなどの特定の化合物の力価）を示す株を同定することができる。株をさらに循環型操作のラウンドに、または株性能に寄与する遺伝子型を解読するために使用することができる。ライブラリー中の株はまた、上の実施例３に使用したＳＮＰスワップライブラリーと同様に、１種または複数の所望の化合物の産生が増加している、改良された株の創製のために、異なる遺伝的撹乱を有する他の株との統合のためにも使用することができる。

【０８５０】

したがって、本開示は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいてＥＺ－Ｔｎ５トランスポソームシステム（Ｅｐｉｃｅｎｔｅｒ　Ｂｉｏ）を使用して、トランスポゾン変異誘発微生物株ライブラリーを創製する方法について記載する。トランスポサーゼ酵素を、モザイクエレメント（ＭＥ）配列に隣接するＤＮＡペイロード配列と最初に複合体化し、結果として得られたタンパク質－ＤＮＡ複合体を細胞内に形質転換することができる。これは、生物のゲノムＤＮＡ中へのＤＮＡペイロードのランダム組込みを結果として招く。導入されることになるペイロードに応じて、機能喪失型（ＬｏＦ）ライブラリーまたは機能獲得型（ＧｏＦ）ライブラリーのいずれかを産生することができる。

【０８５１】

機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンライブラリー－ペイロードの配列を変動させて、多様な表現型応答を誘発することができる。機能喪失型（ＬｏＦ）ライブラリーの基本的な場合では、このペイロードは、順調なトランスポゾン組込み事象の選択を可能にするマーカーを含む。

【０８５２】

ランダム機能喪失型変異は、Ｔｎ５トランスポサーゼシステム（ＥＺ－Ｔｎ５；ＥｐｉＣｅｎｔｒｅ（登録商標））を使用して微生物中にｉｎ　ｖｉｖｏで作製することができる。ＥＺ－Ｔｎ５トランスポサーゼシステムは安定であり、電気穿孔により生きた微生物中に導入することができる。細胞内に入った後、トランスポゾンシステムが宿主細胞中のＭｇ２＋により活性化され、トランスポゾンが、宿主のゲノムＤＮＡ中にランダムに挿入される。

【０８５３】

機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンライブラリー－ＧｏＦライブラリーを創製するために、プロモーターエレメント、可溶性タグ（この場合、機能獲得型可溶性タグトランスポゾンと呼ばれる）、および／または対抗選択可能マーカーなどの追加的なフィーチャを組み入れて、選択可能マーカーを含有しているペイロードの一部分のループアウトを促進し、したがって連続的トランスポゾン変異誘発（この場合、機能獲得型リサイクル可能トランスポゾンと呼ばれる）を可能にすることにより、基本的な場合に遺伝的ペイロードのより複雑な具体化が築かれる。まとめると、これらのインプリメンテーションは、宿主表現型を改良するために多様なライブラリーを創製できるようにする。

【０８５４】

本開示のトランスポゾンのための非限定的で例示的なコンストラクトを図４４に示し、代表的な機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾン、機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾン、機能獲得型リサイクル可能トランスポゾン、および機能獲得型可溶性タグトランスポゾンの配列をそれぞれ配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、および配列番号１３１として提供する。これらのトランスポゾンをトランスポサーゼと複合体化し、細胞内に形質転換することができる。結果として得られた細胞は、ＤＮＡペイロードのランダム組込みを有し、したがって、トランスポゾン変異誘発微生物株ライブラリーを形成する。ライブラリーを、本明細書記載のＨＴＰ手順に従ってさらにスクリーニングし、表現型の改良について評価することができる。トランスポゾン組込みが原因で所望の表現型を有す

る株を、さらなる特徴付けおよび本開示に記載した任意の方法に従うさらなる操作のために単離することができる。

【０８５５】

例えば、ＬｏＦトランスポゾンライブラリーおよびＧｏＦトランスポゾンライブラリーを親株に対してスクリーニングすることができ、性能データ（スピノシンの力価）を分析することができる。これらのライブラリー中の創製された新しい株のいくつかは、親株と比較して改善された性能を有する。

【０８５６】

本明細書に記載した方法は、２つの主な問題を解決する。第１に、十分に研究された生物であっても、ゲノム風景の大部分は、あまり理解されていないままである。十分に理解された遺伝子エレメントが予想外の方法で相互作用する場合があることも気付かれている。この目的のために、本開示は、表現型撹乱を誘発するための有効な遺伝子操作方法を提供する。第２に、低速成長している生物または遺伝的に困難な生物－特に、大きなゲノムを有する生物－の場合、標的化した遺伝的撹乱をすべての可能な遺伝標的に対して実行することは、時間またはコスト的にとても手が出ない場合がある。本開示は、撹乱されたゲノムを有する株を創製する有効な方法を提供し、それは、株の中で所望の化合物を産生することに改善された性能をもたらす場合がある。したがって、本開示は、ｉｎ　ｖｉｖｏトランスポゾン変異誘発を使用して宿主生物の遺伝子エレメントを容易におよびランダムにモジュレートする方法により、これらの問題に取り組む。このようにして、異なる変異（機能獲得型および機能喪失型）を内包する株ライブラリーを非常に素早く作製することができ、新しい遺伝標的を巻き込んで、宿主の表現型をさらに改良することができる。

【０８５７】

（実施例１５）

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａにおける遺伝子エレメントの挿入のための中立の組込み部位

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて遺伝子重複および不応生合成経路を操作することは、この宿主について特徴付けられた公知の中立の組込み部位の数によって限られる。いくつかの中立部位がＳ．ｓｐｉｎｏｓａゲノム内に存在する可能性があるが、現在のところ、１つの中立の組込み部位だけが特徴付けられている。この特定の部位、ｏｂｓＡ（ＵＳ２０１００２８２６２４、その全体として参照により組み込まれている）がこれまでに報告されているが、追加的な部位の欠如が、複数の連続遺伝子変化を作製する本発明者らの能力を制約している。追加的な中立の組込み部位は、複数のコンビナトリアルな遺伝子組込みを操作および試験することが可能な能力、およびスピードを高める。

【０８５８】

ＲＮＡｓｅｑデータ（発酵の間にサンプリングした反復時系列および２つの株における発現比較）を使用して、どちらの株においても、または、発酵の間のどの時点でもほとんどまたはまったく発現しない多重遺伝子座を同定した。ガイディングの理論的根拠は、発酵の間のどの時点でも、または、どちらの株においても発現しない遺伝子は、産生に不可欠または重要である可能性がなさそうであるというものであった（図４５参照）。したがって、これらの遺伝子座への組込みは、表現型に対して有害な効果を有する可能性がなさそうである、またはその可能性が低い。これらの部位を同定した後、遺伝子座を参照ゲノム内に位置付け、組込みコンストラクトを設計して、この部位の中心に単一の塩基対変異を導入した。

【０８５９】

したがって、本開示は、中立の組込み部位のセット－例えば、個々の遺伝子または多重遺伝子カセットをＳ．ｓｐｉｎｏｓａのゲノム内にコンジュゲーションおよび相同組換えにより安定的および効率的に組み込むことができる遺伝子座を提供する。中立部位と見なされるために、ペイロードの遺伝的組込みが、成長に限定的な効果および予測可能な発現レベルを示す。本発明者らが同定し、現在探索中の部位は、ゲノム全体に散在する１１の遺伝子座を含む。各部位は、遺伝的ペイロードを組み込むための組込み部位を生じさせる

ことにより本発明者らの遺伝子操作能力に拡張を加える潜在性を有する。利用可能な部位の数は、完全要因コンビナトリアル遺伝子組込み計画に本発明者らが含めることができる要因数に比例し、したがって本発明者らの操作能力を高める。これらの部位を下の表１２にまとめる。

【表１２】

表12. 11個の推定中立の組込み部位、関連遺伝子、導入された変異および組込み効率-親株毎のコロニー形成単位(CFU)の概要。

中立部位	配列番号	変異	CFUs	
			A	B
1	132	C:G	88	47
2	133	T:A	50	33
3	134	C:G	91	17
4	135	C:G	67	28
5	136	G:C	16	0
6	137	G:C	129	18
7	138	C:G	84	32
8	139	T:A	-	-
9	140	A:T	94	25
10	141	C:G	55	41
11	142	A:T	-	-

アノテーションは、本発明者らが表示の変異を導入した、中立部位の中心にある遺伝子を指す。
CFUは、分割(48ウェル)Q-trayの1つのウェル中で計数したコロニー数(接合完了体)を示す。
*コンジュゲーションが進行中である(結果は未決定)。

【０８６０】

これらの部位は、ほとんど～まったく発現（転写；ｍＲＮＡ）が観察されない多重遺伝子座内に位置する。それらを、２つの異なる株における遺伝子発現を比較するＲＮＡｓｅｑデータの時系列を使用して同定した。

【０８６１】

組込み効率を評価するために、各部位の中心に一塩基多型を導入した。株Ａおよび株Ｂにおいて部位毎にコンジュゲーション効率を報告する（表１２）。

【０８６２】

結果として得られた株Ｂ由来株を、株Ｂ親と比べて産物力価について評価した（図６７）。表示の中立部位にＳＮＰスワップペイロードが組み込まれた株Ｂ由来株の産物力価（スピノシンＪ＋Ｌ）を分析した。部位１、２、３、４、６、９および１０に組込みを有する株は、類似の産物力価を有し、予期される力価（すなわち、株Ｂの平均力価；図の上の方のバー）と異ならない。中立部位７での組込みは、産物力価にマイナスの影響を有するように見える。

【０８６３】

これらの部位をさらに評価し、組み込まれたペイロードの発現を比較するために、本発

明者らは、株Ａ（ＷＴ）およびＢ（図６８）の両方において各部位での組込みに続く、強いプロモーター（配列番号２５）の制御下の蛍光レポーター（配列番号８１）の発現を評価した。発現は、大部分の部位で類似である。ＮＳ７だけが、本発明者らが評価した他の中立部位（ＮＳ２、ＮＳ３、ＮＳ４、ＮＳ６、およびＮＳ１０）と有意に異なった。

【０８６４】

（実施例１６）

ＨＴＰゲノム操作－Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａの株性能を改善するための抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーのインプリメンテーション

本実施例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａにおいて遺伝的多様性を生成するための抗代謝産物選択／発酵産物耐性ライブラリーを創製することおよびＨＴＰ遺伝子操作のためにこのようなライブラリーを使用する方法の実施形態を示す。

【０８６５】

微生物による所望の化合物の産生を改善するために、合理的操作に直ちには受け入れられない分子調節の形態をバイパスすることが、しばしば必要である。例には、異なる経路による最終産物阻害が含まれる。この例では、本発明者らは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａを抗代謝産物（アルファ－メチルメチオニン）または発酵産物（スピノシンＪ／Ｌ）のいずれかに供し、これらの条件下で成長が改善されたコロニーを単離した。このようなコロニーのハイスループットスクリーニングにより、プレートモデルで親株と比較して良好な発酵性能を有する分離株が同定されたが、これは、このストラテジーが株性能の改善に潜在的に有用であることを示している。

【０８６６】

微生物は、発酵プロセスの一部として多種多様な化合物を産生する。時々、このような化合物の蓄積は微生物の成長および生理をひどく阻害する。エタノール産生は、発酵産物による成長阻害（毒性）の例である。分子レベルで、経路の産物は、廃棄物を最小限にするためにその産生を担う酵素をしばしば阻害する可能性がある。これは、微生物の進化と生存に有益であるものの、これらのフィードバック機構は、目標が、ある特定の経路を通過するフラックスおよび産物の蓄積を徹底的に増加させることである工業用発酵をひどく妨害する可能性がある（Fermentation Microbiology and Biotechnology、第３版、ISBN 9781439855799）。発酵を改善し、微生物が所望の代謝産物を合成することができる時間を延長することは、ａ）最終産物の潜在毒性、およびｂ）所望の最終産物の形成に必要な分子経路のフィードバック阻害を克服するために必要である。

【０８６７】

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａの成長は、その発酵産物の存在に感受性である。（図４６）。本発明者らは、産物に対するその寛容性を改善したならば、株生産性が改善され得るという仮説を立てた。したがって、下に概略を示すステップを、発酵産物からよりうまく生き延びることが可能な株を選択するために行った。本発明者らは、より大きい耐性の株を単離した（図４７）。興味深いことに、分離株のうち２つは、スピノシン産生についてのプレートモデルにおいてスピノシンＪ／Ｌに対して親よりもずっと良好な性能を示した（図４８Ａ）。本発明者らはまた、スピノシン産生についてのプレートモデルにおいて代謝産物アルファ－メチル－メチオニン（ａＭＭ）に対して親よりもずっと良好な性能を示した１つの株も単離した（図４８Ｂ）。

【０８６８】

スピノシン産生は、ＮＡＤＰＨおよびＳＡＭを補助因子として必要とした。これらのどちらも、スピノシン形成に制限を加えることができ、それぞれが、それぞれの合成を担う酵素を阻害することができるので、本発明者らは、ＳＡＭによるフィードバック阻害を除去する方法を探索した。Ｅ．ｃｏｌｉにおいて、ＳＡＭは、ＳＡＭの前駆体の合成を担うＭｅｔＡタンパク質を阻害することができる。Ｅ．ｃｏｌｉにおける典型的な手法は、フィードバック調節に非感受性のｍｅｔＡ変異体について選択する抗代謝産物アルファ－メチル－メチオニン（ａＭＭ）の存在下で株を成長させることであった（UsusdaおよびKurahashi、２００５年、Appl Env.Micro、２００５年６月、３２２８～３２３４頁）。Ｓ

．ｓｐｉｎｏｓａには明白なｍｅｔＡ相同体がないが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａは、ａＭＭに感受性であるので、本発明者らは、類似の手法を採用し、耐性変異体が増加したＳＡＭ蓄積を有し、より良好なスピノシン産生であり得ることを期待して耐性変異体を選択した。微生物による所望の化合物の産生を改善するために、合理的操作に直ちには受け入れられない分子調節の形態をバイパスすることが、しばしば必要である。例には、異なる経路による最終産物阻害が含まれる。

【０８６９】

特に本発明者らは、親Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ株を抗代謝産物（例えば、アルファ－メチルメチオニン）または発酵産物（例えば、スピノシンＪ／Ｌ）のいずれかに供した。本発明者らは最初に、選択剤に対するＳ．ｓｐｉｎｏｓａの感受性ならびに実験のための条件および培地を決定した。使用した濃度に関して適正な出発点なしには、実験は、完全に失敗するおそれがある。スピノシンＪ／Ｌ実験について、成長を阻害したが、細胞を死滅させなかった濃度を見出すために数週間および複数の試みを要した。解決は、スピノシン濃度を調整することと、播種のために使用されるバイオマスの量を調整することとの組合せであった。ａＭＭは、最小培地の使用を必要とし、そのことを本発明者らは、選択に進むことができる前に最初に同定およびバリデートしなければならなかった。このステップは、順調な選択ストラテジーのための基礎を築く。最小培地は、下に列挙される組成を有する：

成分（１Ｌ当たり）：

－ 可溶性デンプン　１０．０ｇ
－ リン酸二カリウム　１．０ｇ
－ 硫酸マグネシウム五水和物　１．０ｇ
－ 塩化ナトリウム　１．０ｇ
－ 硫酸アンモニウム　２．０ｇ
－ 炭酸カルシウム　２．０ｇ
－ 硫酸第一鉄五水和物　０．００１ｇ

【０８７０】

選択のための濃度が決定された後、上記の条件でより耐性の高い分離株の選択を実施した。選択のために、液体中での選択のために、培養物の複数回の継代が必要であった（継代７回、約４０世代）。複数の独立した培養物を平行して維持して、課された選択を満足する独立した変異事象のチャンスを増加させた。各継代の持続時間および頻度は、経験的に決定することができる。選択ストラテジーは、どの形質が選択されるかを決定する。不十分な設計は、所望の工業条件下でうまく性能を発揮しない株を選択する結果となるおそれがある。選択の成功を改善するために、優れたアライメントおよび／または軽減ストラテジー（二次スクリーニング）が必要である。スピノシンＪ／Ｌの存在下における株の選択の例を、図４７に示した。選択された株は、スピノシンＪ／Ｌの存在下で明らかに親よりも良好に成長した。

【０８７１】

選択された株をさらにバリデートして、これらの分離株が実際に親株よりも耐性が高いことを実証した。この選択バリデーションは、ストラテジーが機能しており、次のステップにいつ進むかの決定点として使用され得ることの優れた指標である。

【０８７２】

次に、選択された株をＨＴＰスクリーニングによりさらに分析して、選択された特性が所望の工業プロセスのために有益であるかどうかを決定した。細胞は、その大部分が、工業的関心対象でない場合がある多くのやり方で特定の選択課題を解決することができるので、ＨＴＰスクリーニングは、さらに特徴付けされ、統合のために使用されることになる分離株を同定するのに重大なステップである。本発明者らの最初の研究から、選択された分離株の約２～５％だけが目的のもののように見える。ＨＴＰプレート発酵モデルにおいて親よりも優れた性能を有する選択された株の例を図４８Ａ（スピノシンＪ／Ｌ）および図４８Ｂ（ａＭＭ）に示す。

【０８７３】

場合により、選択された株に改善された性能を引き起こした変異を同定することができ、関連配列を単離することができる。これは、本明細書に記載される他の所望の株にこれらの変異を統合することを促進する。最初の試験結果を図６９に示す。

【０８７４】

（実施例１７）

ＨＴＰゲノム操作－無傷の変異体株を生成するためのＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおける対抗選択マーカーとしてのｓａｃＢまたはｐｈｅＳの使用

本実施例は、対抗選択マーカーとしてのｓａｃＢまたは／およびｐｈｅＳを使用して「無傷の」変異Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を創製する実施形態を示す。

【０８７５】

当技術分野においてこれまでに記載されたＵＳ２０１７０１０１６５９Ａ１は、温度感受性複製起点および選択マーカーなどのツールを使用してポリケチドシンターゼ遺伝子座で改善された生産性のためのポリケチド産生株を操作することを論じている。この方法論の詳細な要件および制約（ＰＫＳコード領域の反復性に頼ることを含む）ならびに当技術分野における限られた追加的な例は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａのような工業関連微生物を操作する課題を示す。しかし、ゲノム中の任意の場所で正確なゲノム編集を行うことは、生物の表現型を改良する適用のためを含む、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ宿主株における意図される改変を行うことができるために重要である。加えて、耐性マーカーのリサイクリングは、限られた耐性マーカーが存在する単一株中に遺伝的改変を積み重ねることを可能にし、製造適用におけるこれらの微生物の登録を促進するためにも重要である（すなわち抗生物質耐性なし）。本実施例では、本発明者らは、無傷の、マーカーのない定方向ゲノム編集を可能にするために、ゲノム中の任意の場所を標的化するために使用した相同アームと一緒に対抗選択マーカーとしてｓａｃＢおよび／またはｐｈｅＳの使用を実証する（図４９Ａ～図４９Ｃ参照）。

【０８７６】

ｓａｃＢ遺伝子は、スクロースをレバンに変換するレバンスクラーゼをコードし、レバンは、多数の微生物に有毒であることが公知である（Reyratら、「Counterselectable Markers:Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis」、Infect Immun.１９９８年９月；６６巻（９号）：４０１１～４０１７頁、およびJaegerら、「Expression of the Bacillus subtilis sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium Corynebacterium glutamicum but not in Streptomyces lividans.」、Ｊ Bacteriol.１９９２年８月；１７４巻（１６号）：５４６２～５頁）。スクロースの不在下で、ｓａｃＢ遺伝子のキャリアは、健康的に成長し、スクロースの存在下で、ｓａｃＢ遺伝子を失った株だけが生存することができる。この概念は、多くのグラム陰性微生物に大いに使用されているが、グラム陽性微生物（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍおよびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．を除く）は、典型的にはレバンの効果に耐性である。本発明者らは、本明細書において（図５０）、ｓａｃＢ遺伝子がＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおいて２～３ｌｏｇのスクロース感受性を付与することを実証する。したがって、本発明者らの実験は、ｓａｃＢがマーカーなしの株の生成のためのＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおける対抗選択可能マーカーとして利用できることを示す。ｓａｃＢ遺伝子配列をＳ．ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化した（配列番号１４３）。

【０８７７】

ｐｈｅＳ遺伝子は、細菌を４－クロロフェニルアラニン（４ＣＰ）に対して感受性にするフェニルアラニン－ｔＲＮＡシンテターゼのαサブユニットをコードする（Miyazaki、「Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in Escherichia coli.」Biotechniques.２０１５年２月１日；５８巻（２号）：８６～８頁.）。４－クロロフェニルアラニンの非存在下で、ｐｈｅＳ遺伝子のキャリアは、健康的に成長したが、しかし、４－クロロフェニルアラニンの存在下で、ｐｈｅＳ遺伝子を失った株だけが生存することができる。本発明者らは、本明細

書において（図５１）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｅａ由来のｐｈｅＳ遺伝子の変異バージョンが、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａに４－クロロフェニルアラニン感受性を付与し、したがって、対抗選択可能マーカーとして利用することができることを実証する。Ｍｉｙａｚａｋｉ ２０１５年に記載された変異を有するＳ．ｅｒｙｔｈｒａｅａ由来のｐｈｅＳ遺伝子とＳ．ｓｐｉｎｏｓａ由来のｐｈｅＳ遺伝子との両方を試験し、機能的であることが見出された（それぞれ配列番号１４４および配列番号１４５）。

【０８７８】

株操作のためのベクター骨格を、いくつかの構成で設計して（図４９Ａ～Ｃ）、バックグラウンド株の特性（例えば、選択剤および対抗選択剤に対する基準株耐性／感受性）に応じて株操作効率を変更した。これは、異なるプロモーターを用いて発現された対抗選択可能遺伝子の一方または両方を使用して、コードされたマーカーの発現を変更することを含む。

【０８７９】

このツールを本開示のＨＴＰシステムに適用して、操作された無傷のＳ．ｓｐｉｎｏｓａ株を生成したが、品質管理の結果は、ツールの順調な適用を示す（図５２）。したがって、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける対抗選択マーカーとしてのｓａｃＢおよびｐｈｅＳの使用ならびに遺伝子編集へのそれらの適用が、本明細書に記載される。対抗選択可能マーカーまたは陰性選択マーカーの微生物発現は、特異的基質（ｓａｃＢおよびｐｈｅＳについて、それぞれスクロースおよび４－クロロフェニルアラニン）上で制限された成長を引き起こし、したがって、対抗選択マーカーを含有しない微生物の選択を可能にする。ｓａｃＢおよびｐｈｅＳは、他の宿主において文献中に対抗選択マーカーとして記載されているが、本発明者らの知るところでは、これは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるそれらの使用の最初の特徴付けである。本明細書において本発明者らは、対抗選択を相同組換えと組み合わせて使用して、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおける標的化した無傷の遺伝子編集を行い、これは、ＨＴＰゲノム操作のための強力なツールである。

【０８８０】

（実施例１８）

ＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａのＨＴＰコンジュゲーションおよびＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ内への外因性ＤＮＡ導入の実証

本実施例は、本開示のＨＴＰ遺伝子操作方法の実施形態を示す。特に、本実施例は、ドナー生物としてＥ．ｃｏｌｉを使用して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ（例えば、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ）の種間コンジュゲーションのためのハイスループットプロセスを示す。このプロセスは、シングルクロスオーバー相同組換えにより遺伝材料を導入するために自動化および自動化適合培養形式を使用する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ（例えば、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ）の遺伝的修飾を可能にする。

【０８８１】

Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａは、工業的に関連した宿主であり、本発明は、この宿主におけるゲノム操作のための高度に並列化した取り組みを実現可能にする。これらの結果は、本開示の方法が、宿主細胞のゲノム全体にわたり、任意の種類の迅速な遺伝子変化を生成する、または任意の外因性ＤＮＡを導入することが可能であることを実証する。

【０８８２】

種間コンジュゲーション（属間コンジュゲーションとしても公知）は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａにおける遺伝子移入のための、特にその強力な制限バリアを回避するための有効な機構である。しかし、コンジュゲーションための現在の方法論は、比較的低い効率をもたらし、完了のために手作業の手順を必要とする（すなわち、手動オペレーターにより１回に１０個未満の改変で完了した）。この作業の目標は、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるコンジュゲーション効率を改善すること、およびＳ．ｓｐｉｎｏｓａにおけるハイスループット（ＨＴＰ）ゲノム操作を可能にする、コンジュゲーションのための自動化プロトコールを開発することであった。この問題を解決することは、１）コンジュゲーション効率を上げてＨＴＰ形式で接合完了体を産生すること、および２）培養、プレート

蒔き、およびコロニーピッキングのための自動化プロトコールを開発することを必要とした。

【０８８３】

本発明者らは、ペトリ皿上で標準的なコンジュゲーション手順からのパラメータを使用して、ＨＴＰコンジュゲーションのためのプロトコール開発を開始した。ペトリ皿を使用するいくつかのコンジュゲーションプロトコールは、この作業が始まった時点で開発中であり、本発明者らは、さらなる開発のための基礎として内部プロトコールを選択した。このプロトコールが、他のプロトコールよりも低いコンジュゲーション効率を招いたものの、このプロトコールは、手の取り扱い（例えば、細胞のかき落とし）を必要とする任意の専門化されたステップを必要とせず、したがって、最も自動化に適していた。

【０８８４】

本発明者らは、コンジュゲーション効率を上げる方向に働く一方で、自動化手順のためのプロトコールを平行して開発する、統合手法を採用することを選択した。本発明者らは、ペトリ皿上でのコンジュゲーションのための初期株プロトコールを最適化するための実験計画（ＤＯＥ）手法を使用することにより、このプロセスを開始し、これは、４８ウェル分割Ｑ－ｔｒａｙに対するコンジュゲーションおよび追加的なＤＯＥベースの最適化を行うための基礎として役立った。標準ペトリ皿と比較して、分割Ｑ－ｔｒａｙは、縮小した表面積（ペトリ皿の８分の１）を有する２Ｄ寒天プレート形式を維持し、十分に自動化システムのインターフェースとなる。４８ウェルＱ－ｔｒａｙ形式は、コンジュゲーションのプロセス全体：ドナー培養、ドナー細胞およびレシピエント細胞のプレート蒔き、接合完了体のための抗生物質選択、接合完了体のコロニーピッキング、パッチング（ｐａｔｃｈｉｎｇ）および培養を自動化するための標準的な手順の開発のための基礎を提供した。改良されたコンジュゲーションのための実験因子の大きいパラメータ空間を探索するための実験計画手法を含む実験入力を、下に提供する。

【０８８５】

コンジュゲーション効率を改善するためのＤＯＥを使用する最初の実験のために、本発明者らは、決定的スクリーニング計画ストラテジーを使用することを選択し、それは、多数の実験因子を組み合わせて評価するために一般的に有効である。重要なことに、決定的スクリーニング計画は、因子相互作用にかかわらずモデルを支配している主効果を同定することができ、それらは、また、量的因子の非線形効果も同定することができる。ＤＯＥは、最適化ツールであり、コンジュゲーションについての限られた実験データ（すなわち、ゼロではない接合完了体をもたらした実験）は、最適化の複数ラウンドがＨＴＰ形式に受け入れられるプロトコールを達成するために必要なことを示唆した。

【０８８６】

したがって、コンジュゲーション効率を改善するための本発明者らの作業は、３つの一般相を採用した。第Ｉ相では、本発明者らは、コンジュゲーションの統計的に有意なモデルを知らせなかった実験結果を用いて作業し、反復により効率を改善した。第ＩＩ相で繰り返しコロニーを産生したコンジュゲーション条件のセットを同定すると、本発明者らは、コンジュゲーションの結果をさらに改善するであろう新しい条件を同定することを試みた。第ＩＩＩ相では、本発明者らは、これらの条件に関するデータを使用して、最適化されたコンジュゲーションのために実験条件の新しいセットを開発し、次いで、異なるオペレーターにわたり生物学的反復を行ってそれをバリデートした。

【０８８７】

コンジュゲーションのＤＯＥベースの最適化のために考慮した因子を、図５５に詳述するコンジュゲーションプロトコールの４つの主部分に分類した。それらは、レシピエント株の培養、ドナー株の培養、共培養コンジュゲーション条件、および接合完了体の選択を含む。これらの因子のそれぞれを、改変／最適化のために考慮し、実験試験のために優先した。ＪＭＰソフトウェアバージョン１１．２．１を使用してデータを分析した。特に述べない限り、結果を統計的有意性との関連で下に報告する。

【０８８８】

コンジュゲーションのための主ステップは、
１） レシピエント細胞を中期指数期に継代培養する
２） ドナー細胞を中期指数期に継代培養する
３） ドナー細胞とレシピエント細胞とを組み合わせる
４） ドナー細胞とレシピエント細胞との混合物をコンジュゲーション培地上に蒔く
５） プレートをインキュベートして、細胞をコンジュゲートさせる
６） ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用する
７） 非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用する
８） プレートをさらにインキュベートして、組み込まれたレシピエント細胞（接合完了体）の成長を可能にする
である。

【０８８９】

本発明者らは、下のセクション１にコンジュゲーション効率を上げるための実験および結果について、ならびにセクション２の自動化手順の開発について記載する。

【０８９０】

セクション１：コンジュゲーション効率の改善

実験１．

実験の目標：ＤＯＥ手法を使用してペトリ皿上でのコンジュゲーションを最適化すること。

実験計画：初期株プロトコールを使用したペトリ皿上でのコンジュゲーションは低い効率を招いたので、本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙ形式への移行が、面積の減少のせいで一層低い効率を招くと予測した。したがって、本発明者らは、ＨＴＰ形式に移行したプロトコールが、最大の成功の機会を有するように、ペトリ皿上でのコンジュゲーション効率を改善しようとした。初期株プロトコールを最適化するために、本発明者らは、ＤＯＥ手法を使用し、コンジュゲーションに最大の影響を有すると仮定された実験条件を変動させた：

－ レシピエント継代培養時間：２４～４８時間
－ ナリジクス酸濃度：１４～５０ｕｇ／ｍｌ
－ アプラマイシン濃度：３６～１００ｕｇ／ｍｌ
－ ナリジクス酸送達時間：２～２４時間
－ アプラマイシン送達時間：１６～４８時間
－ 予期されるドナー濃度：１０５～１０８
－ 予期されるレシピエント濃度：１０５～１０９
－ ドナーのレシピエントに対する比：６：１、１：１００
－ ドナーのストレス：抗生物質ストレスなし、またはドナー細胞を４ｕｇ／ｍｌ～８ｕｇ／ｍｌナリジクス酸で１．５時間処理

結果：

接合完了体が得られた条件を表１３に示した。

結果の解釈：

（１）条件３は、接合完了体の最大量を生じ、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり合計で６つの接合完了体をもたらした。

（２）実験データの統計分析は、コンジュゲーション効率に対する任意の単一パラメータの顕著な効果を示さなかった。しかし、注目すべきことに、コロニーを産生した条件はすべて、≧２４時間離れたドナーおよびレシピエントの抗生物質選択時間を使用していた。

【０８９１】

実験２．

実験の目標：

－ ペトリ皿上でのコンジュゲーションのための初期株プロトコールが分割Ｑ－ｔｒａｙ上でのコンジュゲーションのために使用できたかどうかを判定すること
－ ドナー細胞に抗生物質ストレスを適用することがコンジュゲーション効率を改善するかどうかを試験すること
－ 接合完了体の正の選択のための増加したアプラマイシン濃度がコンジュゲーション効

率を改善したかどうかを試験すること
実験計画：
１）本発明者らは、レシピエント細胞の２つの濃度を使用した：
元々のペトリ皿プロトコールによるＯＤ＝１２のＳ．ｓｐｉｎｏｓａ培養物５０ｕｌ
Ｑ－ｔｒａｙウェルの空間の減少を考慮した、ＯＤ＝１２のＳ．ｓｐｉｎｏｓａ培養物５ｕｌ
２）本発明者らは、一定濃度のドナー細胞を使用した：
Ｑ－ｔｒａｙウェルの空間の減少を考慮した、元々のペトリ皿プロトコールの１０分の１
３）本発明者らは、ドナーストレスの効果を探索した：
ドナー細胞培養物の半分を４ｕｇ／ｍｌナリジクス酸で１．５時間処理した
ドナー細胞培養物の半分は、無処理のままであった
４）本発明者らは、接合完了体の選択のために２つのアプラマイシン濃度を使用した：
最終濃度６２．５ｕｇ／ｍｌ寒天
最終濃度１００ｕｇ／ｍｌ寒天
５）各条件を複数のウェルにわたって繰り返して、統計的に有意なデータを提供した
結果：接合完了体が得られた条件を表１４に示した。
結果の解釈：
１）条件Ｅは、最大量の接合完了体を生じ、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり合計で１．５個の接合完了体が得られた。
２）レシピエント細胞濃度の低下は、コンジュゲーション効率を減少させた。
３）アプラマイシン濃度およびドナーストレスは、コンジュゲーション効率に影響しなかった。
４）全体として、これらの結果は、コンジュゲーションを４８ウェルＱ－ｔｒａｙ上で行うことができたことを示した。

【０８９２】

実験３．

実験の目標：実験１からのペトリ皿上でのコンジュゲーションのための最適化されたパラメータが、Ｑ－ｔｒａｙ上のコンジュゲーション効率を改善できたかどうかを判定すること。
実験計画：本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙ上のコンジュゲーションのためにペトリ皿上にコロニーが得られた条件の各セットを試験しようとした。しかし、Ｑ－ｔｒａｙのウェルが、ペトリ皿の面積のおよそ８分の１であるので、本発明者らは、単一のＱ－ｔｒａｙのウェル上のコンジュゲーションのために２つの細胞濃度を試験することを関心対象とした：
－　ペトリ皿実験に使用したものとおよそ同じ合計細胞濃度
－　ペトリ皿実験に使用した合計細胞濃度のおよそ１／８
結果：接合完了体が得られた条件を表１５に示した。
結果の解釈：
１）条件＃８は、最大量の接合完了体を生じ、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり合計で３．３個の接合完了体が得られた。注目すべきは、ドナー濃度についてスケール変更したこの条件は、また、ペトリ皿形式でも最大量の接合完了体を生じた。
２）全体として、本発明者らの最適化されたペトリ皿条件は、４８ウェルＱ－ｔｒａｙ上で改良されたコンジュゲーションを生じた。

【０８９３】

実験４．

実験の目標：Ｑ－ｔｒａｙ上でのコンジュゲーションのためにＤＯＥを実行して、コンジュゲーションのために使用された条件を最適化すること。
実験計画：上記実験の結果から、４８ウェルＱ－ｔｒａｙ上でコンジュゲーションを行うことができたことが明らかであった。これらの効率が非常に低かったので、本発明者らは、コンジュゲーションに最も強い影響を有すると予測された条件を変動させようとした：
・レシピエント継代培養時間：２４～４８時間

・ナリジクス酸濃度：２５～１００ｕｇ／ｍｌ
・アプラマイシン濃度：５０～２００ｕｇ／ｍｌ
・予期されるドナー濃度：10^5～10^6
・予期されるレシピエント濃度：10^5～10^6
・ドナーのレシピエントに対する比：３：１、１：１：、１：３
・ドナーのストレス：抗生物質ストレスなし、またはドナー細胞を４ｕｇ／ｍｌナリジクス酸＋４ｕｇ／ｍｌアプラマイシンで１．５時間処理
結果：接合完了体が得られた条件を表１６に示した。
結果の解釈：
－　得られた接合完了体の最大数は、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり０．７個であった。
－　この低い値は、Ｑ－ｔｒａｙが完全に乾燥されずにインキュベートされたという事実のせいであった可能性がある。
－　試験したパラメータが、矛盾した実験条件により影響されたかどうかを理解するために、追加的なＤＯＥを行うことが重要である。
【０８９４】
　実験５．
実験の目標：
１）実験２からの条件＃８を局所最適として使用して、この条件の周囲で実験パラメータを変動させてＤＯＥを実行すること。
２）プレート蒔きのためにＴｅｃａｎ自動化液体ハンドラーを使用することが、手作業のプレート蒔きと比較してコンジュゲーション効率に影響するかどうかを試験すること（注：この実験まで、コンジュゲーションを完了するために自動化液体ハンドリングと手動液体ハンドリングとの両方が使用されたが、自動化液体ハンドリングが、手動プレート蒔きと比較してより高いまたはより低いコンジュゲーション効率を生じたかどうかは不明のままであった）。
３）コンジュゲーションに対するＱ－ｔｒａｙの乾燥の効果を試験すること。
実験計画：本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙ上のコンジュゲーションのためにペトリ皿上にコロニーが得られた条件の各セットを試験しようとした。しかし、Ｑ－ｔｒａｙのウェルがペトリ皿の面積のおよそ８分の１であるので、本発明者らは、単一のＱ－ｔｒａｙのウェル上のコンジュゲーションのために２つの細胞濃度を試験することを関心対象とした：
１）ペトリ皿実験に使用したものとおよそ同じ合計細胞濃度。
２）ペトリ皿実験に使用した合計細胞濃度のおよそ１／８。
結果：接合完了体が得られた条件を表１７に示した。
結果の解釈：
－　条件１２および７は、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり最大量の接合完了体を生じ、条件１２により、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり合計で８．４個の接合完了体が得られた。
－　アプラマイシン濃度を増加させること（２００ｕｇ／ｍｌ）は、増加したコンジュゲーション効率を生じた。
－　追加の乾燥により、より大きい合計数の接合完了体が得られた。とはいえ、これらのデータは統計的に有意ではなかった。さらに追加の乾燥は、プレートがひび割れて薄くなりすぎることを招き、それはコロニーピッキングなどの下流手順にとって厄介であった。
－　自動化液体ハンドリングは、手作業のプレート蒔きと比較してコンジュゲーション効率に影響しなかった。
－　本発明者らの実験プランのこの時点で、本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり≧５つのコロニーが得られた複数の条件を同定した。本発明者らは、コンジュゲーションのための統計的に有意な線形モデルを構築するためのデータを有していなかったものの、これらの条件は、新しい因子を探索することにより、さらに改善することができたある特定の実験条件を本発明者らが特定したことを示唆した。
【０８９５】

実験６．
実験の目標：
１）コンジュゲーション効率をさらに改善するために新しい実験因子を同定し、コンジュゲーションのための統計モデルを知らせること
２）Ｑ－ｔｒａｙ培地コンポーネント周辺でＤＯＥを実行して、コンジュゲーションのための最適な培地条件を決定すること
実験計画：
本発明者らは、以下の条件を変動させるよう選択した：
－　ＩＳＰ４粉末：２７．８ｇ／Ｌ～５５．５ｇ／Ｌ
－　酵母エキス：０．５ｇ／Ｌ～２ｇ／Ｌ
－　グルコース：１．５ｇ／Ｌ～６ｇ／Ｌ
－　ＭｇＣｌ２：１０ｍＭ～４０ｍＭ
－　追加的な寒天：０ｇ／Ｌ～７．５ｇ／Ｌ
本発明者らは、これまでの高性能条件および追加的な新しい条件を反映した実験条件を使用して、これらの異なる培地条件の効果を試験することを選択した：
－　実験５からの条件＃１２；
－　条件＃８：より高いナリジクス酸およびアプラマイシン濃度を使用して、プレート蒔き手順を促進する；
－　ドナー細胞の濃度変動性を説明するための＃８Ａと名付けた、条件＃８の変更バージョン；
－　これまでの結果に基づき、ドナー対レシピエントの比を１５：１～１：５の間で変動させ、予期される合計細胞濃度を１０５～１０６の間で変動させることにより、４つの新しい条件を生成した。
結果：接合完了体が得られた条件を表１８に示した。
結果の解釈：
－　高グルコースは、増加したコンジュゲーション効率を招いた。他の培地コンポーネントは、すべて、コンジュゲーション効率に対して有意な効果を有するとは判定されなかった。
－　高いナリジクス酸濃度（１００ｕｇ／ｍｌ）は、増加したコンジュゲーション効率を招いた。
－　ＪＭＰによる非線形分配モデル化は、より低いアプラマイシン濃度（１００ｕｇ／ｍｌ）がコンジュゲーション効率を増加させると予測した。
－　条件＃１２、＃８Ａ、および＃８は、順番に、最大数の接合完了体を生じ、条件＃１２により、１８個の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェルが得られた。
【０８９６】
実験７．
実験の目標：最高性能の条件を再実行して、変動するドナー濃度およびレシピエント濃度がこれらの条件の性能を改善することができたかどうかを試験すること
実験計画：
１）本発明者らは、ベースライン条件として実験５からの条件＃７、実験５からの条件＃１２、および実験６からの条件＃８を選択した。
２）本発明者らは、実験にわたり定量された変動性を使用してこれらのベースライン条件からドナー濃度およびレシピエント濃度を変更することを選択した。本発明者らのプロトコールは、細胞濃度のための代理としてＯＤを使用するので、実験の間でドナー濃度およびレシピエント濃度において固有の変動性がある。本発明者らは、この変動量（ＣＶ）を計算し、ドナー濃度およびレシピエント濃度を比例的に変更した。本発明者らは、低（ＣＶにより比例減少）、高（ＣＶにより比例増加）、ならびにベースラインのドナー濃度およびレシピエント濃度のすべての組合せでコンジュゲーション実験を行った。
結果：接合完了体が得られた条件を表１９に示した。
結果の解釈：

１）低いまたは高いドナー濃度およびレシピエント濃度は、コンジュゲーション効率を改善しなかった。
２）元々のベースライン細胞濃度を有する条件＃８および条件＃１２は、最高数の接合完了体を生じ、Ｑ－ｔｒａｙのウェル１つ当たり約５つの接合完了体を有した。
【０８９７】
実験８．
実験の目標：
１）実験６の培地最適化実験からの条件＃８Ａおよび＃１２を繰り返して、新しい培地条件がコンジュゲーション効率を改善したことをバリデートすること。
２）実験６からのＪＭＰ予測を反映するように調整した条件＃１２（アプラマイシン濃度１００ｕｇ／ｍｌ）がコンジュゲーション効率を改善したかどうか試験すること（この条件を＃１２ＪＡと名付けた）。
３）実験５からの条件＃７は、標準培地上で性能が良好であると実証されたので、新しい培地条件を使用して条件＃７を試験すること。
実験計画：－本発明者らは、条件＃１２、＃１２ＪＡ、＃８Ａ、および＃７を新しい培地条件および比較のための標準コンジュゲーション培地条件で実行した。
結果：接合完了体が得られた条件を表２０に示した。
－　結果の解釈：この実験計画についての最高数の接合完了体は、条件＃１２ＪＡについてであり、４０個の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェルが得られた。
－　新しい培地条件は、コンジュゲーション効率を改善することがバリデートされた。
－　統計的有意性を評価するために十分なデータがなかったものの、より低いアプラマイシン濃度は、より大きい数の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェルを生じた。
【０８９８】
実験９．
実験の目標：ドナー細胞およびレシピエント細胞を不正確な密度／成長状態で使用することにより、現時点で最適化されたコンジュゲーション条件の周囲の感受性を評価した。これらのパラメータの変動性は部位毎に起こると予期されるので、これは、コンジュゲーションプロトコールが細胞の濃度または成長期に対してどれだけ感受性であるかの指標を提供する。
実験計画：
－　本発明者らは、コンジュゲーション実験のためのベースライン条件として条件＃８および＃１２を使用した。
－　本発明者らは、ドナー細胞およびレシピエント細胞について低、標準、および高密度のすべての組合せのコンジュゲーション実験を行った。
－　低ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝０．２で使用した。
－　標準ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝０．４で使用した。
－　高ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝０．８で使用した。
－　低レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝９．６。
－　標準レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝１３．０。
－　高レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝１４。
－　新しい最適化された培地条件（実験６での実験からの培地３）を使用して実験を行った。
結果：
１）　ドナー細胞を低密度で使用することにより、接合完了体の合計に約６０％の減少が生じた。
２）　ドナー細胞を高密度で使用することにより、接合完了体の合計に約５０％の減少が生じた。
３）　レシピエント細胞を低密度で使用することにより、接合完了体の合計に約８０％の減少が生じた。
４）　レシピエント細胞を高密度で使用することにより、接合完了体の合計が０になった。

－　結果の解釈：標準細胞密度を有する条件＃１２は、４０個の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェルを生じた。
－　不正確なドナー細胞およびレシピエント細胞濃度／成長期は、ずっと低いコンジュゲーション効率を生じ、正確なレシピエント培養条件が特に重要であった。
【０８９９】
実験１０．
実験の目標：
１）最適化された条件を新しいオペレーターの手でバリデートすること。
２）ドナー細胞およびレシピエント細胞を不正確な密度／成長状態で使用することにより、現時点の最適化されたコンジュゲーション条件の周囲の感受性を評価すること。
実験計画：
－　本発明者らは、条件＃１２ＪＡを新しい最適化された培地条件で使用した。
－　本発明者らは、ドナー細胞およびレシピエント細胞について低、標準、および高密度のすべての組合せのコンジュゲーション実験を行った。
－　低ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝０．３で使用した。
－　標準ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝０．４で使用した。
－　高ドナー細胞培養物をＯＤ６００＝１．０で使用した。
－　低レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝４．６。
－　標準レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝８．０。
－　高レシピエント細胞培養物は、ＯＤ５４０＝１０．６。
結果：
－　ドナー細胞を低密度で使用することにより、接合完了体の合計に約１００％の増加が生じた。
－　ドナー細胞を高密度で使用することにより、接合完了体の合計に約７０％の増加が生じた。
－　レシピエント細胞を低密度で使用することにより、接合完了体の合計に約８０％の減少が生じた。
－　レシピエント細胞を高密度で使用することにより、接合完了体の合計に約８０％の減少が生じた。
結果の解釈：
１）新しいオペレーターによって完了された条件＃１２ＪＡは、１５個の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェルを生じた。これは、これまでの結果から減少したものであり、新しいオペレーターが手順を最初に試みたことが原因の可能性があった。
２）レシピエント細胞濃度／成長期の感受性は、実験９においてこれまでのオペレーターによって決定された実験結果と一致した。
３）不正確なドナー細胞濃度／成長期を使用する結果は、実験９からのデータと一致しなかった。不正確なドナー細胞濃度を使用することにより、標準プロトコールから改善されたコンジュゲーション効率が生じたが、これらのデータは、これまでの実験データとの関連で不確定な有意性であった。
４）レシピエント細胞の顕微鏡観察は、細胞状態を検証するのに有用であった。後期指数期の細胞は、液体培養でより断片化するように見える。

【表１３】

表 13.実験計画に基づく低スループットコンジュゲーションの最適化による結果

	レシピエント洗浄条件	コンジュゲーション温度 (C)	レシピエント継代培養時間 (時間)	ドナーストレス NA (ug/ml)	比 (D:R)	合計細胞	NA 送達時間	Apra 送達時間	NA 濃度 (ug/ml 寒天)	Apra 濃度 (ug/ml 寒天)	接合完了体数/ペトリ皿
1	洗浄なし	30	24	8	0.10	2.74E+06	16	46	28	36	4
2	洗浄なし	37	36	4	1.00	3.34E+07	16	41.5	28	54	3
3	洗浄	30	48	0	42.2	5.00E+06	21	48	28	72	6
4	洗浄なし	37	24	0	1.53	1.00E+07	24	48	14	100	2
5	洗浄なし	30	24	4	2.45	8.40E+06	16	42	32	68	3
SOP	洗浄なし	30	48	0	NA	NA	20	20	14	35	0

【表１４】

表 14:最初の Q-tray コンジュゲーション実験 2 からの結果

条件	レシピエント (cfu/ml)	ドナーストレス、ナリジクス酸(ug/ml)	アプラマイシン濃度(ug/ml 寒天)	接合完了体数/Q-tray のウェル
A	1.65×10^5	0	62.5	0.5
B	1.65×10^5	4	62.5	0.5
C	1.65×10^4	0	62.5	0
D	1.65×10^4	4	62.5	0
E	1.65×10^5	0	100	1.5
F	1.65×10^5	4	100	0.5
G	1.65×10^4	0	100	0
H	1.65×10^4	4	100	0

【表１５】

表 15.LTP コンジュゲーション条件を HTP 形式に移行することによる結果

	レシピエントの洗浄条件	コンジュゲーション温度	レシピエント継代培養時間(時間)	ドナーストレス NA (ug/ml)	比 (D:R)	合計細胞 (cfu/ml)	LTP 条件からの細胞の相対量	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度(ug/ml 寒天)	Apra 濃度(ug/ml 寒天)	接合完了体数/Q-tray のウエル
1	洗浄なし	30	24	8	0.04	2.1E+06	1x	16	46	28	36	0.2
2	洗浄なし	37	36	4	1.15	7.3E+06	1x	16	41.5	28	54	0.0
3	洗浄	30	48	0	1.43	2.1E+06	1x	21	48	28	72	1.5
4	洗浄なし	37	24	0	0.06	3.6E+07	1x	24	48	14	100	0.0
5	洗浄なし	30	24	4	0.29	2.7E+07	1x	16	42	32	68	0.5
SOP	洗浄なし	30	48	0	16.67	2.4E+06	1x	20	20	14	35	0.2
6	洗浄なし	30	24	8	0.04	3.5E+05	1/8x	16	46	28	36	0.0
7	洗浄なし	37	36	4	1.15	1.2E+06	1/8x	16	41.5	28	54	0.0
8	洗浄	30	48	0	1.43	3.5E+05	1/8x	21	48	28	72	3.3
9	洗浄なし	37	24	0	0.06	6.0E+06	1/8x	24	48	14	100	0.0
10	洗浄なし	30	24	4	0.29	4.4E+06	1/8x	16	42	32	68	0.7
SOP (希釈)	洗浄なし	30	48	0	16.67	4.0E+05	1/8x	20	20	14	35	0.0

【表１６】

表 16:コンジュゲーション実験 4 による最良の条件

レシピエントの洗浄条件	コンジュゲーション温度(C)	レシピエント継代培養時間(時間)	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度(ug/ml 寒天)	Apra 濃度(ug/ml 寒天)	比(D:R)	合計細胞濃度(cfu/ml)	接合完了体数/ウェル
洗浄	30	48	21	45	62.5	50	1.1	1.5E+0.6	0.7

【表１７】

表 17:コンジュゲーション実験 5 による最良の条件

	レシピエント洗浄条件	コンジュゲーション温度(C)	レシピエント継代培養時間(時間)	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度(ug/ml 寒天)	Apra 濃度(ug/ml 寒天)	比(D:R)	合計細胞濃度(cfu/ml)	接合完了体数/ウェル
12	洗浄	30	48	20	42	100	200	14.3	3.0E+0.6	8.4
7	洗浄	30	24	20	42	62.5	200	0.1	1.5E+0.6	5.4

【表１８】

表 18:コンジュゲーション実験 6 による最良の条件

	培地	レシピエントの洗浄条件	コンジュゲーション温度(C)	レシピエント継代培養時間(時間)	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度(ug/ml 寒天)	Apra 濃度(ug/ml 寒天)	比(D:R)	合計細胞濃度(cfu/ml)	接合完了体数/ウェル
12	3	洗浄	30	48	18	42	100	200	8.1	1.76E+06	18.0
8A	3	洗浄	30	48	18	42	50	100	0.8	2.66E+05	7.5
8	8	洗浄	30	48	18	42	50	100	5.5	9.47E+05	6.5

【表１９】

表 19:コンジュゲーション実験 7 による最良の条件

	培地	レシピエントの洗浄条件	コンジュゲーション温度(℃)	レシピエント継代培養時間(時間)	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度(ug/ml 寒天)	Apra 濃度(ug/ml 寒天)	比(D:R)	合計細胞濃度(cfu/ml)	接合完了体数/ウェル
12	標準	洗浄	30	48	20	42	100	200	0.006	3.87E+08	5.2
8	標準	洗浄	30	48	20	42	50	100	0.019	6.54E+07	5.5

【表２０】

表 20:コンジュゲーション実験 8 による最良の条件

	培地	レシピエント洗浄条件	コンジュゲーション温度(C)	レシピエント継代培養時間(時間)	NA 送達時間(時間)	Apra 送達時間(時間)	NA 濃度 (ug/ml 寒天)	Apra 濃度 (ug/ml 寒天)	比 (D:R)	合計細胞濃度 (cfu/ml)	接合完了体数/ウェル
12J	3	洗浄	30	48	20	42	100	100	1.23	4.19E+06	39.9
12	3	洗浄	30	48	20	42	100	200	1.23	4.19E+06	19.9
8A	3	洗浄	30	48	20	42	50	100	0.19	1.11E+06	0.8
7	3	洗浄	30	24	20	42	62.5	200	0.08	2.02E+06	1.1

【０９００】

セクション２：自動化の開発

実験１１．ハイスループットドナーの培養（自動化コンポーネント）

実験の目標：ドナー細胞をコンジュゲーションのためのＨＴＰ形式で成長させること

実験計画：

１）本発明者らは、９６ウェルディープウェルスクエアプレート（Ｅ＆Ｋ　ＥＫ－２４４０－ＳＴ）中でＥ．ｃｏｌｉドナー培養物の成長を試験した。一晩培養物のＯＤ６００に基づき、最低のＯＤ読取りを有する培養物が１：１００播種に対応するように播種体積を基準に合わせることにより、培養物を播種した。

２）本発明者らは、成長のためにＬＢ培地の３つの体積：２５０ｕｌ、５００ｕｌ、７５０ｕｌを試験した。
３）コンジュゲーションに対するＨＴＰ成長の効果を評価するために、本発明者らは、このＨＴＰ形式で成長したＥ．ｃｏｌｉ　Ｓ１７＋ＳＳ０１５を使用してコンジュゲーションを行った。
結果：細胞成長およびコンジュゲーションのデータを図５６Ａ～Ｂに示す。
結果の解釈：培養物は、試験したすべての体積でロバストに成長した。加えて、体積５００ｕｌで成長した培養物により、差が統計的に有意でなかったものの、最高数の接合完了体が得られた。体積５００ｕｌは、容易な液体ハンドリングおよびＯＤをチェックするための十分な体積を与えたので、したがって、ハイスループットのドナー成長のために選択した。

【０９０１】

実験１２．コンジュゲーションのためのＨＴＰ形式での細胞および抗生物質のプレート蒔き（自動化コンポーネント）
実験の目標：
１）　細胞および抗生物質をＨＴＰ形式で蒔くこと
２）　ドナー細胞およびレシピエント細胞の上部に抗生物質を重層する複数のプレート蒔きステップがコンジュゲーションのために必要であるので、コンジュゲーションプロトコールにわたり一貫しプレート蒔きを達成すること
実験計画：本発明者らは、４８ウェル分割Ｑ－ｔｒａｙ上に細胞および抗生物質を蒔くための３つの潜在的手順を同定した：
－　スポットプレート蒔き－液体の体積を単一スポットに蒔き、それが蒔かれた領域でそれを乾燥させる
－　ビーズを用いて蒔く－液体の体積を単一スポットに蒔き、次いでウェルの全域に液体を分散させるためにビーズを使用する
－　Ｑ－ｔｒａｙのウェルを溢れさせる－ロッキング動作で液体がウェルの全域に分散するように、十分な液体体積を蒔く
結果：
－　スポットプレート蒔きは、一貫しない細胞プレート蒔きを招き、加えて、蒔かれた細胞の疎水性が、この方法を使用した接合完了体の選択のために抗生物質を蒔くことを困難にした。スポットされた抗生物質の体積は、蒔かれた細胞の全域に分散せず、表面張力を手作業で壊さずに広げることはできなかった。
－　ビーズを用いたプレート蒔きは、一貫したプレート蒔きを生じたが、結果として汚染を招いた。各ウェル中にビーズを含有するＱ－ｔｒａｙを振とうすることにより、蒔かれた液体の跳ね返りが起こったが、時にビーズがウェル間を移動する。加えて、ビーズを用いたプレート蒔きは、自動化システムのインターフェースとなるには顕著なカスタマイゼーションを必要とする。
－　Ｑ－ｔｒａｙのウェルを溢れさせることは、コンジュゲーション手順にわたる一貫したプレート蒔きを可能にし、その結果、細胞および抗生物質は、ウェル領域にわたり均一に蒔かれた。しかし、培養物および抗生物質を蒔いた後、プレートは、完全に乾くために長いインキュベーション期間を必要とした。
－　加えて、プレートを前後にロッキングさせて液体を分散させるために、自動化の解決を開発する必要がある。
結果の解釈：
－　本発明者らのプレート蒔きの試みに基づき、本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙのウェルを溢れさせるために十分な液体を蒔くことが、自動化コンジュゲーションのための使用に最も有望な手順であったことを見出した。この手順は、一貫した均一なプレート蒔きを生じ、容易に自動化液体ハンドラーのインターフェースになることができた。
－　液体を分散させるためにＱ－ｔｒａｙをロッキングさせる手作業のステップを克服するために、本発明者らは、ＶＷＲから３Ｄウェーブ式振とう機を購入し、Ｑ－ｔｒａｙの

寸法に適合するようにそのプラットフォームをカスタム部品で改変した。３Ｄウェーブ式振とう機は、軌道運動およびｚ平面中での運動を行うことができるので、プレートのロッキングを手作業で行った場合と同じ動きを提供した。

【０９０２】

実験１３．接合完了体のピッキング（自動化コンポーネント）

実験の目標：

－　コンジュゲーションプレート上で接合完了体を検出するための標準的な手順を開発すること

－　コンジュゲーションＱ－ｔｒａｙからのコロニーを選択寒天オムニトレイ上でパッチ／スタンプすること

実験計画：

１）本発明者らは、コンジュゲーションプレート上でＳ．ｓｐｉｎｏｓａ接合完了体を同定するためにＱｐｉｘ　４２０および対応するソフトウェアを使用した。

２）本発明者らは、以下のイメージングパラメータを用いて実験して、接合完了体を検出した：

－　閾値

－　曝露

－　ゲイン

－　反転像

－　サブトラクトバックグラウンド

３）本発明者らは、以下のフィーチャ選択パラメータを用いて実験して、ピッキング可能な接合完了体を検出した。：

１）緻密性

２）軸比

３）最小直径

４）最大直径

５）最小近接

４）本発明者らは、２つの異なる種類のピンを用いてピッキングヘッドを使用することを試験した：

１．酵母ピッキングピン（Ｘ４３７７）

２．Ｅ．ｃｏｌｉピッキングヘッド（Ｘ４３７０）

５）本発明者らは、大きいロバストなバッチを産生する取り組みで、固体寒天オムニトレイ上に播種するために２つの異なる機能を使用することを試みた：

－　１回ディップする

－　撹拌する

結果：

－　本発明者らは、Ｑ－ｔｒａｙイメージングプロセスの間にイメージを反転することがＳ．ｓｐｉｎｏｓａ接合完了体を検出するのに非常に有用であったことを見出した。

－　複数のコンジュゲーションプレートをイメージング後、本発明者らは、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ接合完了体を正確に同定するために単一の閾値および曝露の値を使用できなかったことを見出した（図５７参照）。各プレート上のバックグラウンドの変動性のせいで（例えば、残りの死滅したドナーおよびレシピエント細胞）、各プレートのために、閾値および曝露の値を調整することが必要であった。本発明者らは、一連の値を同定して、これらのパラメータのために使用した。

－　本発明者らは、接合完了体を移動させるためにＥ．ｃｏｌｉピンを使用することが機能しなかったことを見出した－これは、これらのピンが後続の播種を可能にするために足るほどうまくＳ．ｓｐｉｎｏｓａ細胞をピッキングすることができないせいである可能性があった。

－　酵母ピンを用いたコロニーピッキングは、プレート播種のためにうまく機能した。しかし、ピッキングの後、ピッキングヘッドは、オムニトレイから完全には離れず、ピッキ

ングヘッドにオムニトレイが付いて来た。オムニトレイをあるべき場所にテープで下に留めると、これはもはや問題ではなくなった。
－　ディップ機能は、播種のためにうまく役立った。撹拌機能も、播種のための有望な方法のように見えた。不幸にも、撹拌機能で播種されたオムニトレイが真菌汚染を経験したので、これらの結果は、確証的でなかった。
結果の解釈：本発明者らは、酵母ピンおよびディップ播種機能を備えるＱｐｉｘピッキングヘッドを使用してプレート変動性に基づき調整することができたＳ．ｓｐｉｎｏｓａ接合完了体をピッキングするためのパラメータの一般セットを確立した。このプロトコールは、Ｅ．ｃｏｌｉ汚染が目に見えないロバストなＳ．ｓｐｉｎｏｓａの成長を生じた。

【０９０３】

実験１４

実験の目標：培養および貯蔵のためにオムニトレイから９６ウェルディープウェルプレート中に接合完了体パッチをピッキングすること。
実験計画：
１．本発明者らは、標準的なピッキング条件を使用してＳ．ｓｐｉｎｏｓａのパッチを９６ウェルディープウェルスクエアプレート（Ｅ＆Ｋ　ＥＫ－２４４０－ＳＴ）中にピッキングすることを試験した。
２．本発明者らは、成長のためにＤＡＳ培地２の３つの体積：３００ｕｌ、４００ｕｌ、５００ｕｌを試験した。
結果：図５８に示すように、培地４００ｕｌを使用して播種したウェルだけがロバストな成長を生じた。
結果の解釈：
１．３００ｕｌおよび５００ｕｌの播種体積がなぜ接合完了体培養物の成長を生じなかったについては、不明であった。これは、培地体積自体よりも播種プロセスと関連したと本発明者らは疑った。
２．このプロトコールは、ピッキングした接合完了体パッチのロバストな成長を保証するためのいくつかの追加的なバリデーションおよび最適化を必要とする。

【０９０４】

要約：図５９は、ＤＯＥベースの最適化を経過し完了したコンジュゲーション実験の結果をまとめたものである。最適化プロセスから、統計分析により、コンジュゲーションのための最も重大な条件が、薬物選択濃度および培地のグルコース濃度であったことが示唆された（図６０参照）。実験分析によりさらに、レシピエント培養物の成長段階が、また、コンジュゲーションのための重大な条件であったことも示唆された。光学密度の読取りは、レシピエント培養物が、コンジュゲーションの準備ができているときを決定する相対的に優れた指標であると思われるが、より最近の実験は、細胞形態も細胞状態を検証するのに有用であることを示唆している。したがって、レシピエント培養物は、光学密度に加えて正しい細胞形態についてチェックされるべきである。最適化されたコンジュゲーションプロトコールは、ドナー濃度および成長期周辺で大きな感受性を示さなかったので、したがって、確立されたプロトコールは、ドナー細胞の成長における偏差に感受性でない場合がある。これは、様々な株とＨＴＰ形式で取り組む場合に好都合である。

【０９０５】

本発明は、ハイスループット（ＨＴＰ）ゲノム操作を可能にするためのコンジュゲーションのための自動化プロトコールを伴う、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ（例えば、Ｓ．ｓｐｉｎｏｓａ）における改善されたコンジュゲーション効率のためのプロセスを可能にする。本発明者らは、ハイスループットコンジュゲーションのためのプロトコールを開発したが、このプロトコールは、２４個の接合完了体／Ｑ－ｔｒａｙのウェル（２つの別々のオペレーターにより二つ組で実行）という全体平均を生じた。接合完了体の最大数が得られたコンジュゲーション条件は、レシピエント細胞を洗浄すること、３０℃でコンジュゲートすること、レシピエント株をおよそ４８時間で継代培養すること、コンジュゲーションの２０時間後に１００ｕｇ／ｍｌナリジクス酸で選択すること、コンジュゲー

ションの４２時間後に１００ｕｇ／ｍｌアプラマイシンで選択すること、６ｇ／Ｌグルコースを有するＩＳＰ４改変培地、約１：０．８のドナー対レシピエント比を合計数約７×１０^{6}個の細胞で使用することを含んでいた。

【表２１－１】

配列番号識別名の付いた本開示の配列

プロモーターラダー			
源	名称	説明	配列番号
Saccharopolyspora spinosa	P7160	シャペロニン GroEL に関連するプロモーター配列	1
Saccharopolyspora spinosa	P7253	伸長因子 Tu に関連するプロモーター配列	2
Saccharopolyspora spinosa	P6681	F 型 ATP アーゼサブユニットデルタに関連するプロモーター配列	3
Saccharopolyspora spinosa	P6316	PspA/IM30 ファミリータンパク質に関連するプロモーター配列	4
Saccharopolyspora spinosa	P6806	2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼに関連するプロモーター配列	5
Saccharopolyspora spinosa	P3159	推定エノイル-CoA ヒドラターゼ echA8 に関連するプロモーター配列	6
Saccharopolyspora spinosa	P0757	推定 L-リシン-イプシロンアミノトランスフェラーゼに関連するプロモーター配列	7
Saccharopolyspora spinosa	P5011	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	8
Saccharopolyspora spinosa	P1409	NAD 特異的グルタミン酸デヒドロゲナーゼに関連するプロモーター配列	9
Saccharopolyspora spinosa	P4735	ロイシルアミノペプチダーゼ(アミノペプチダーゼ T)に関連するプロモーター配列	10
Saccharopolyspora spinosa	P2900	チトクローム P450-terp に関連するプロモーター配列	11
Saccharopolyspora spinosa	P0801	ペリプラズムムレインペプチド結合タンパク質前駆体に関連するプロモーター配列	12
合成	P21	Siegl らに記載された合成プロモーター	13
合成	PA9	Siegl らに記載された合成プロモーター	14
合成	PA3	Siegl らに記載された合成プロモーター	15
合成	PB4	Siegl らに記載された合成プロモーター	16
合成	PB12	Siegl らに記載された合成プロモーター	17
合成	PB1	Siegl らに記載された合成プロモーター	18
合成	PC1	Siegl らに記載された合成プロモーター	19
合成	P72	Siegl らに記載された合成プロモーター	20
合成	P-C4-1	Seghezzi らに記載された合成プロモーター	21
合成	P-A5-19	Seghezzi らに記載された合成プロモーター	22
合成	P-C4-14	Seghezzi らに記載された合成プロモーター	23
合成	P-D1-7	Seghezzi らに記載された合成プロモーター	24
Saccharopolyspora spinosa	P1	分泌タンパク質に関連するプロモーター配列	25
Saccharopolyspora spinosa	P2	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	26
Saccharopolyspora spinosa	P3	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD に関連するプロモーター配列	27

【表２１－２】

Saccharopolyspora spinosa	P3v2	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD、バージョン 2 に関連するプロモーター配列	28
Saccharopolyspora spinosa	P4	抗原 Ag88 に関連するプロモーター配列	29
Saccharopolyspora spinosa	P4v2	抗原 Ag88、バージョン 2 に関連するプロモーター配列	30
Saccharopolyspora spinosa	P5	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータに関連するプロモーター配列	31
Saccharopolyspora spinosa	P5v2	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータに関連するプロモーター配列	32
Saccharopolyspora spinosa	P6	分子シャペロン GroEL に関連するプロモーター配列	33
Saccharopolyspora spinosa	P7	UDP-4-アミノ-4-デオキシ-L-アラビノース--オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼに関連するプロモーター配列	34
Saccharopolyspora spinosa	P8	プロリンラセマーゼに関連するプロモーター配列	35
Saccharopolyspora spinosa	P9	フェニルオキサゾリンシンターゼ MbtB に関連するプロモーター配列	36
Saccharopolyspora spinosa	PspnA	ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1 に関連するプロモーター配列	37
Saccharopolyspora spinosa	PspnA_v2	ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1、バージョン 2 に関連するプロモーター配列	38
Saccharopolyspora spinosa	PspnF	メチルトランスフェラーゼ様タンパク質に関連するプロモーター配列	39
Saccharopolyspora spinosa	PspnG	推定 NDP-ラムノシルトランスフェラーゼに関連するプロモーター配列	40
Saccharopolyspora spinosa	PspnQ	推定 NDP-ヘキソース-3 に関連するプロモーター配列	41
Saccharopolyspora spinosa	PspnQ_v2	推定 NDP-ヘキソース-3、バージョン 2 に関連するプロモーター配列	42
合成	P21_変異体	合成プロモーター	43
Saccharopolyspora spinosa	P1_コア	分泌タンパク質に関連するプロモーター配列	44
Saccharopolyspora spinosa	P1(-33)	分泌タンパク質に関連するプロモーター配列	45
Saccharopolyspora spinosa	P1+リボスイッチ	分泌タンパク質に関連するプロモーター配列	46
合成	P21-P1	合成プロモーター	47
合成	P1-P21	合成プロモーター	48
Saccharopolyspora spinosa	P1765	グルタミンシンテターゼ 1 に関連するプロモーター配列	49
Saccharopolyspora spinosa	P3747	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	50
Saccharopolyspora spinosa	P5078	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	51
Saccharopolyspora spinosa	P7419	嫌気性安息香酸異化転写調節因子に関連するプロモーター配列	52
Saccharopolyspora spinosa	P7156	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD に関連するプロモーター配列	53

【表２１－３】

Saccharopolyspora spinosa	P7256	30S リボソームタンパク質 S12 に関連するプロモーター配列	54
Saccharopolyspora spinosa	P1941	応答調節因子タンパク質 vraR に関連するプロモーター配列	55
Saccharopolyspora spinosa	P3405 (P8)	プロリンラセマーゼに関連するプロモーター配列	56
Saccharopolyspora spinosa	P3407	ABC 輸送体アルギニン結合タンパク質 1 前駆体に関連するプロモーター配列	57
Saccharopolyspora spinosa	P2428	アセチル-CoA シンテターゼに関連するプロモーター配列	58
Saccharopolyspora spinosa	P0927	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼに関連するプロモーター配列	59
Saccharopolyspora spinosa	P0889	直鎖グラミシジンデヒドロゲナーゼ LgrE に関連するプロモーター配列	60
Saccharopolyspora spinosa	P0186	L,D-トランスペプチダーゼ触媒ドメインに関連するプロモーター配列	61
Saccharopolyspora spinosa	P3702_v2	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	62
Saccharopolyspora spinosa	P7156_v2	RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigD に関連するプロモーター配列	63
Saccharopolyspora spinosa	P7256_v2	30S リボソームタンパク質 S12 に関連するプロモーター配列	64
Saccharopolyspora spinosa	P1765_v2	グルタミンシンテターゼ 1 に関連するプロモーター配列	65
Saccharopolyspora spinosa	P7539_v2	抗原 Ag88 に関連するプロモーター配列	66
Saccharopolyspora spinosa	P7276_v2	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットベータに関連するプロモーター配列	67
Saccharopolyspora spinosa	P0941_v2	仮定のタンパク質に関連するプロモーター配列	68
Saccharopolyspora spinosa	P0889_v2	直鎖グラミシジンデヒドロゲナーゼ LgrE に関連するプロモーター配列	69
合成	Pmut-1	合成プロモーター	172
合成	B2	合成プロモーター	173
合成	D1	合成プロモーター	174
合成	D2	合成プロモーター	175

推定ターミネーター

起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
Saccharopolyspora spinosa	T1	伸長因子 tu に関連するターミネーター配列	70
Saccharopolyspora spinosa	T2	ロイシルアミノペプチダーゼに関連するターミネーター配列	71
Saccharopolyspora spinosa	T3	チトクローム P450 ヒドロキシラーゼに関連するターミネーター配列	72

【表２１－４】

Saccharopolyspora spinosa	T4	FOF1 ATP シンターゼサブユニットベータに関連するターミネーター配列	73
Saccharopolyspora erythraea	T5	FAD 連結オキシドレダクターゼに関連するターミネーター配列	74
Saccharopolyspora erythraea	T6	ホスホリボシルトランスフェラーゼに関連するターミネーター配列	75
Saccharopolyspora erythraea	T7	ATP 結合タンパク質に関連するターミネーター配列	76
Saccharopolyspora erythraea	T8	50s リボソームタンパク質 L32 に関連するターミネーター配列	77
Saccharopolyspora erythraea	T9	tRNA-Arg に関連するターミネーター配列	78
Saccharopolyspora erythraea	T11	Isr2 に関連するターミネーター配列	79
Saccharopolyspora erythraea	T12	AraC に関連するターミネーター配列	80
レポーター遺伝子			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
人工配列	DasherGFP レポーター遺伝子	コドン最適化されたレポーター遺伝子 DasherGFP	81
人工配列	PaprikaRFP レポーター遺伝子	コドン最適化されたレポーター遺伝子 PaprikaRFP	82
人工配列	gusA レポーター遺伝子	コドン最適化されたレポーター遺伝子 gusA	83
人工配列	DasherGFP	DasherGFP レポータータンパク質	143
人工配列	PaprikaRFP	PaprikaRFP レポータータンパク質	144
人工配列	gusA	gusA レポータータンパク質	145
人工配列	GFP/RFP のためのターミネーター配列	GFP または RFP レポーター遺伝子を発現させるために使用されたターミネーター配列	150
インテグラーゼ関連配列			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
S. endophytica	pCM32 インテグラーゼ遺伝子	pCM32+attP 配列中のインテグラーゼ	84
S. endophytica	pCM32 インテグラーゼタンパク質	プラスミド pCM32 中のインテグラーゼのタンパク質配列	85
S. endophytica	pCM32 中の attP	pCM32 中の attP 部位配列	167

【表２１－５】

S. erythraea	pSE101 インテグラーゼ遺伝子	pSE101+attP 配列中のインテグラーゼ	86
S. erythraea	pSE101 インテグラーゼタンパク質	プラスミド pSE101 中のインテグラーゼのタンパク質配列	87
S. erythraea	pSE101 中の attP	pSE101 中の attP 部位配列	168
S. erythraea	pSE211 インテグラーゼ遺伝子	pSE211+attP 配列中のインテグラーゼ	88
S. erythraea	pSE211 インテグラーゼタンパク質	プラスミド pSE211 中のインテグラーゼのタンパク質配列	89
S. erythraea	pSE211 中の attP	pSE211 中の attP 部位配列	169
S. spinosa	pSE101 相同体インテグラーゼ遺伝子	*S. spinosa*+attP 配列中の pSE101 インテグラーゼ相同体遺伝子	90
S. spinosa	pSE101 相同体インテグラーゼタンパク質	*S. spinosa* 中の pSE101 インテグラーゼ相同体遺伝子のタンパク質配列	91
S. spinosa	attP pSE101 相同体	pSE101 相同体コンストラクト中の attP 部位配列	170
S. spinosa	pSE211 相同体インテグラーゼ遺伝子	*S. spinosa*+attP 配列中の pSE211 インテグラーゼ相同体遺伝子	92
S. spinosa	pSE211 相同体インテグラーゼタンパク質	*S. spinosa* 中の pSE211 インテグラーゼ相同体遺伝子のタンパク質配列	93
S. spinosa	attP pSE211 相同体	pSE211 相同体コンストラクト中の attP 部位配列	171
複製の起点およびエレメント			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
S. erythraea	*S. erythraea* 中の複製起点	*S. erythraea* 由来の推定染色体複製起点	94
S. erythraea	pSE101 AICE エレメント	複製プラスミド pSE101 中の放線菌組込み接合エレメント(AICE)	95
S. erythraea	pSE211 AICE エレメント	複製プラスミド pSE211 中の放線菌組込み接合エレメント(AICE)	96
リボソーム結合部位(RBS)配列			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
S. spinosa	RBS1	PermE*に関連する RBS	97
S. spinosa	RBS2	spnA(ポリケチドシンターゼローディングおよびエクステンダーモジュール 1)に関連する RBS	98
S. spinosa	RBS3	spnC(ポリケチドシンターゼエクステンダーモジュール 3～4)に関連する RBS	99

【表２１－６】

S. spinosa	RBS4	spn0(推定 NDP-ヘキソース-2,3-デヒドラターゼ)に関連する RBS	100
S. spinosa	RBS5	gdh(gdh(dTDP-グルコース 4,6-デヒドラターゼ))に関連する RBS	101
S. spinosa	RBS6	リンカー_A(アルデヒドデヒドロゲナーゼ、AldA)に関連する RBS	102
S. spinosa	RBS7	リンカー_B(アセト乳酸シンターゼ)に関連する RBS	103
S. spinosa	RBS8	リンカー_C に関連する RBS	104
S. spinosa	RBS9	リンカー_D に関連する RBS	105
S. spinosa	RBS10	gtt(グルコース-1-リン酸チミジリルトランスフェラーゼ 1)に関連する RBS	106
S. spinosa	RBS11	TDH(グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ)に関連する RBS	107
S. spinosa	RBS12	バイオブリック_1 に関連する RBS	108
S. spinosa	RBS13	バイオブリック_2 に関連する RBS	109
S. spinosa	RBS14	GroES(分子シャペロン GroES)に関連する RBS	110
S. spinosa	RBS15	GroEL(分子シャペロン GroEL)に関連する RBS	111
S. spinosa	RBS16	IF-1(翻訳開始因子 IF-1)に関連する RBS	112
S. spinosa	RBS17	XNR_1700(ペリプラズムムレインペプチド結合タンパク質前駆体)に関連する RBS	113
S. spinosa	RBS18	S20(30s リボソームタンパク質 S20)に関連する RBS	114
S. spinosa	RBS19	S12(リボソームタンパク質 S12)に関連する RBS	115
S. spinosa	RBS20	S12(リボソームタンパク質 S12)に関連する RBS	116
S. spinosa	RBS21	DnaK(Hsp70)に関連する RBS	117
S. spinosa	RBS22	伸長因子 Tu に関連する RBS	118
S. spinosa	RBS23	FOF1 ATP シンターゼサブユニットベータに関連する RBS	119
S. spinosa	RBS24	分子シャペロン DnaK に関連する RBS	120
S. spinosa	RBS25	ファージショックタンパク質 A、PspA に関連する RBS	121
S. spinosa	RBS26	2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼに関連する RBS	122
S. spinosa	RBS27	5-メチルテトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼに関連する RBS	123
S. spinosa	RBS28	50S リボソームタンパク質 L7/L12 に関連する RBS	124
S. spinosa	RBS29	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼサブユニットアルファに関連する RBS	125
S. spinosa	RBS30	30S リボソームタンパク質 S5 に関連する RBS	126
S. spinosa	RBS31	DnaK(6929)に関連する RBS	127

【表２１－７】

トランスポゾン配列			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
人工配列	機能喪失型(LoF)トランスポゾン	トランスポゾン変異誘発ペイロード配列 LoF	128
人工配列	機能獲得型(GoF)トランスポゾン	プロモーターを有するトランスポゾン変異誘発ペイロード配列機能獲得型	129
人工配列	機能獲得型リサイクル可能トランスポゾン	対抗選択マーカーを有するトランスポゾン変異誘発ペイロード配列機能獲得型	130
人工配列	機能獲得型可溶性タグトランスポゾン	可溶性タグを有するトランスポゾン変異誘発ペイロード配列機能獲得型	131
人工配列	可溶性タグ	トランスポゾンコンストラクト中に含まれ得る GST 可溶性タグ配列	166
中立部位配列			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
S. spinosa	SS_中立部位_1	*S. spinosa* 中立部位 1	132
S. spinosa	SS_中立部位_2	*S. spinosa* 中立部位 2	133
S. spinosa	SS_中立部位_3	*S. spinosa* 中立部位 3	134
S. spinosa	SS_中立部位_4	*S. spinosa* 中立部位 4	135
S. spinosa	SS_中立部位_5	*S. spinosa* 中立部位 5	136
S. spinosa	SS_中立部位_6	*S. spinosa* 中立部位 6	137
S. spinosa	SS_中立部位_7	*S. spinosa* 中立部位 7	138
S. spinosa	SS_中立部位_8	*S. spinosa* 中立部位 8	139
S. spinosa	SS_中立部位_9	*S. spinosa* 中立部位 9	140
S. spinosa	SS_中立部位_10	*S. spinosa* 中立部位 10	141
S. spinosa	SS_中立部位_11	*S. spinosa* 中立部位 11	142
選択マーカーおよび対抗選択マーカー			
人工配列	SacB 遺伝子	sacB 遺伝子配列、*S. spinosa* のためにコドン最適化	146
人工配列	変異 pheS 遺伝子(*S. erythraea*)	Miyazaki 2015 年に記載された変異を有する、使用した *S. erythraea* 遺伝子配列	147
人工配列	変異 pheS 遺伝子(*S. spinosa*)	Miyazaki 2015 年に記載された変異を有する、使用した *S. spinosa* 遺伝子配列	148
S. erythraea	ermE プロモーター配列	ermE 選択遺伝子の発現を駆動する ermE プロモーター配列	149

【表２１－８】

人工配列	aac(3)IV	アプラマイシンに対する耐性を付与しているaac(3)IVタンパク質	151
人工配列	aacC1	ゲンタマイシンに対する耐性を付与しているaacC1タンパク質	152
人工配列	aacC8	ネオマイシンBに対する耐性を付与しているaacC8タンパク質	153
人工配列	aadA	スペクチノマイシン/ストレプトマイシンに耐性を付与しているaadAタンパク質	154
人工配列	ble	ブレオマイシンに対する耐性を付与しているbleタンパク質	155
人工配列	cat	クロラムフェニコールに対する耐性を付与しているcatタンパク質	156
人工配列	ermE	エリスロマイシンに対する耐性を付与しているermEタンパク質	157
人工配列	hyg	ヒグロマイシンに対する耐性を付与しているhygタンパク質	158
人工配列	neo	カナマイシンに対する耐性を付与しているneoタンパク質	159
人工配列	amdSYM	対抗選択マーカーamdSYM遺伝子	160
人工配列	tetA	対抗選択マーカーtetA遺伝子	161
人工配列	lacY	対抗選択マーカーlacY遺伝子	162
人工配列	sacB	対抗選択マーカーsacB遺伝子	163
人工配列	pheS, *S. erythraea*	*S. erythraea*由来の対抗選択マーカーpheS遺伝子	164
人工配列	pheS, *Corynebacterium*	*Corynebacterium*由来の対抗選択マーカーpheS遺伝子	165
インテグラーゼ結合部位(att部位)			
起源	**名称**	**説明**	**配列番号**
Saccharopolyspora endophytica	-	pCM32中のattP部位	167
Saccharopolyspora erythraea	-	pSE101中のattP部位	168
Saccharopolyspora erythraea	-	pSE211中のattP部位	169
S. spinosa	-	pSE101相同体中のattP部位	170
S. spinosa	-	pSE211相同体中のattP部位	171

【０９０６】

本開示の番号付き実施形態

添付の条項にもかかわらず、本開示は、以下の番号付き実施形態を示す。

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．を進化させるハイスループットゲノム操作

項１．　所望の表現型を獲得するためにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（ＨＴＰ）方法であって、

ａ．同じゲノム株バックグラウンドを有する最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のゲノムを撹乱することによって、ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｂ．前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

ｃ．遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａ

ｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；

ｄ．前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

ｅ．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む新しいＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製される、ステップと

を含む、方法。

項１．１．　所望の表現型を獲得するためにＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐ．微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（ＨＴＰ）方法であって、

ａ．ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を得ることによって、最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｂ．所望の表現型について最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択するステップと；

ｃ．遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；

ｄ．所望の表現型について後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択するステップと；

ｅ．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む新しいＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製される、ステップと

を含む、ゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１．２．　ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、同じゲノム株バックグラウンドを有する最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のゲノムを撹乱することによって産生される、項１．１に記載のＨＴＰ方法。

項２．　前記遺伝的バリエーションを含有する遺伝子の機能および／または同一性が、ステップ（ｂ）で前記遺伝的バリエーションを組み合わせる前に考慮されない、項１から１．２までに記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項３．　組み合わされる少なくとも１つの遺伝的バリエーションが、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域にない、項１から２までのいずれ

か１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項４．　ステップ（ｃ）における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む前記後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、
１）前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーに属する個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株にプラスミドを導入するステップであって、前記プラスミドは、選択マーカー、対抗選択マーカー、基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片およびプラスミド主鎖配列を含み、前記ＤＮＡ断片は、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにも属する別の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；
２）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づく組込み事象によってＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；
３）前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと
によって産生される、項１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項５．　前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、項１から４までのいずれか１項に記載のＨＴＰ方法。
項６．　前記選択ステップ（３）が、組み込まれた前記プラスミドの複製なしで実施される、項１から５までのいずれか１項に記載のＨＴＰ方法。
項７．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー、開始／停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項１から６までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項８．　前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計微生物株ライブラリーの完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーである、項１から７までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項９．　前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、項１から８までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項１０．　株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する前記後続のＨＴＰ遺伝子設計が、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーである、項１から９までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項１１．　前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアルＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのサブセットである、項１から１０までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項１２．　前記ゲノムを撹乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、トランスポゾン変異誘発、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つの方法を利用することを含む、項１から１１までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。
項１３．　前記最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、産生Ｓａ

ｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む、項１から１２までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１４．　前記最初の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物が、S_1Gen_1で表される産生株微生物およびS_nGen_nで表されるこれらに由来する後続の任意の数の微生物世代を含む、項１から１３までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１５．　前記ステップｃが、プロトプラスト融合技法を使用することによって前記遺伝的バリエーションを迅速に統合することを含む、項１から１４までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１６．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリーを含む、項１から１５までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１７．　前記プロモータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号１～６９および１７２～１７５から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含む、項１６に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１８．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリーを含む、項１から１７までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項１９．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、ターミネータースワップ微生物株ライブラリーを含む、項１から１８までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２０．　前記ターミネータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号７０～８０から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含む、項１９に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２１．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリーを含む、項１から２０までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２２．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンおよび／または機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンを含む、項２１に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２３．　前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項２２に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２４．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーを含む、項１から２３までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２５．　リボソーム結合部位微生物株ライブラリーが、配列番号９７～１２７から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含む、項２４に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２６．　前記最初のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーまたは前記後続のＨＴＰ遺伝子設計Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーを含む、項１から２５までのいずれか１項に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

項２７．　前記抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリーが、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中でのスピノシン合成に関与する分子に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む、項２６に記載のゲノム操作のＨＴＰ方法。

ＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成

項２８．　ＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株および第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

ｂ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株または前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと

を含む、方法。

項２９．　前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出される前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される、項２８に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項３０．　前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出されない前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される、項２８から２９までのいずれか１項に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項３１．　結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーを一緒に含む、項２８から３０までのいずれか１項に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項３２．　結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記第２のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットを一緒に含む、項２８から３１までのいずれか１項に記載のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能の再建および改善

項３３．　産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、

ａ．親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株およびそれに由来する産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に存在しない一塩基多型、ＤＮＡ挿入、およびＤＮＡ欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

ｂ．前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株または前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のいずれかのゲノムを撹乱することによって、最初のＳａｃｃｈ

ａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記最初のライブラリー中の各株は、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のＳＮＰスワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーを創製するステップと；

ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続の株ライブラリーの個々の株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しいＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

項３４．　前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのすべてを含む完全コンビナトリアルライブラリーである、項３３に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項３５．　前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、参照親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株と前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのサブセットを含む完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項３３から３４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項３６．　前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項３３から３５までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項３７．　前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項３３から３６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項３８．　前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項３３から３７までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項３９．　前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項３３から３８までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性

能を再建および改善するための方法。
項４０．前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出される前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が付加される、項３３から３９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４１．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムが撹乱されて、前記親系統Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株内に見出されない前記同定された一塩基多型、ＤＮＡ挿入、またはＤＮＡ欠失の１つまたは複数が除去される、項３３から４０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４２．前記ゲノムを撹乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも１つの方法を利用することを含む、項３３から４１までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４３．後続ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項３３から４２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４４．後続ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項３３から４３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４５．ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項３３から４４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４６．ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項３３から４５までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４７．前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベータ－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項４６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４８．前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項４６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。
項４９．前記同定された遺伝的バリエーションが、プロモータースワップライブラリー由来の人工プロモータースワップ遺伝的バリエーションをさらに含む、項３３から４８までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項５０．　前記最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリー、または後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のライブラリーのいずれかの少なくとも１つの微生物株のゲノムを操作して、内在性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ標的遺伝子に作動可能に連結したプロモーターラダー由来の１つまたは複数のプロモーターを含ませるステップをさらに含む、項３３から４９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項５１．　前記株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、ＳＮＰスワップ微生物株ライブラリー、開始／停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物／発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項３３から５０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

項５２．　前記株ライブラリーが、

１）配列番号１～６９から選択される配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含むプロモータースワップ微生物株ライブラリー；

２）配列番号７０～８０から選択される配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含むターミネータースワップ微生物株ライブラリー；および

３）配列番号９７～１２７から選択される配列を有する少なくとも１つのリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含むＲＢＳライブラリー

からなる群から選択される少なくとも１つのライブラリーを含む、項５１に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を再建および改善するための方法。

プロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成および産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのその使用

項５３．　プロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由来のプロモーターの１つまたは複数を含む、ステップと

を含む、方法。

項５４．　前記複数のプロモーターの少なくとも１つが、配列番号１～６９から選択される配列を有するプロモーターを含む、項５３に記載のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項５５．　産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって

、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由来の前記プロモーターの１つまたは複数を含む、ステップと；

ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、前記表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｅ．参照Ｅ．ｃｏｌｉ株に対する所望の前記表現型性能改善について前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の新しいプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

項５６．　前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項５５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項５７．　前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項５５から５６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項５８．　前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項５５から５７までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項５９．　前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項５５から５８までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６０．　前記後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ラ

イブラリーが、先行するプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項５５から５９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６１．　後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項５５から６０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６２．　後続のプロモータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項５５から６１までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６３．　ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項５５から６２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６４．　ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項５５から６３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６５．　前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベータ－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項６４に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６６．　前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項６５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

項６７．　前記プロモーターラダーが、配列番号１～６９から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのプロモーターを含む、項５５から６６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

ターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成および産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのその使用

項６８．　ターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな

遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数を含む、ステップと
を含む、方法。

項６９．　産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法であって、

ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；

ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダー由来のターミネーターの１つまたは複数を含む、ステップと；

ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物を提供することによって、後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。

項７０．　前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項６９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７１．　前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株

ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項６９から７０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７２．　前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項６９から７１までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７３．　前記後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項６９から７２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７４．　後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項６９から７３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７５．　後続のターミネータースワップＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項６９から７４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７６．　ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項６９から７５までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７７．　ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項６９から７６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７８．　前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベータ－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項６９から７７までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項７９．　前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項７８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

項８０．　前記ターミネーターラダーが、配列番号７０～８０から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのターミネーターを含む、項６９から７９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するため

のターミネータースワップ方法。
リボソーム結合部位（ＲＢＳ）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成および産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのその使用
項８１．リボソーム結合部位（ＲＢＳ）Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のＲＢＳを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つまたは複数を含む、ステップと
を含む、方法。
項８２．産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、
ａ．基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する複数の標的遺伝子、およびＲＢＳラダーを提供するステップであって、前記ＲＢＳラダーは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株において異なる発現プロファイルを呈する複数のＲＢＳを含む、ステップと；
ｂ．前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に内在する前記標的遺伝子の１つに作動可能に連結した前記ＲＢＳラダー由来のＲＢＳの１つまたは複数を含む、ステップと；
ｃ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｄ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｅ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｆ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｄ）～ｅ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のＲＢＳ　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライ

ブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

項８３．前記後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項８２に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８４．前記後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項８２から８３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８５．前記後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項８２から８４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８６．前記後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項８２から８５までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８７．後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項８２から８６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８８．後続のＲＢＳ Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｄ）～ｅ）を繰り返す、項８２から８７までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項８９．ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項８２から８８までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項９０．ステップｆ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項８２から８９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項９１．前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベータ－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項８２から９０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項９２．前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシ

ンＬ、またはこれらの組合せである、項９１に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項９３．　前記ＲＢＳラダーが、配列番号９７～１２７から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも１つのＲＢＳを含む、項８２から９２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

トランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成および産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのその使用

項９４．　トランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株多様性ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ）１つまたは複数の基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の細胞の集団にトランスポゾンを導入するステップと；

ｂ）ランダムに組み込まれたトランスポゾンを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数のランダムに組み込まれたトランスポゾンを含む、ステップと

を含む、方法。

項９５．　ｃ）前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１つの増大を呈する後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーについて選択するステップをさらに含む、項９４に記載の方法。

項９６．　前記トランスポゾンが、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムへの前記トランスポゾンのｉｎ　ｖｉｖｏ転位を可能にするトランスポゾンおよびトランスポサーゼタンパク質の複合体を使用して、前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入される、項９４から９５までのいずれか１項に記載の方法。

項９７．　前記トランスポサーゼタンパク質が、ＥＺ－Ｔｎ５トランスポソームシステムに由来する、項９４から９６までのいずれか１項に記載の方法。

項９８．　前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンである、項９４から９７までのいずれか１項に記載の方法。

項９９．　前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項９４から９８までのいずれか１項に記載の方法。

項１００．　産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、

ａ．トランスポゾン変異誘発により基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムを操作することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数のトランスポゾンを含む、ステップと；

ｂ．参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

ｃ．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；

ｄ．前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前

記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｅ．前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。
項１０１．前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項１００に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０２．前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項１００から１０１までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０３．前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項１００から１０２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０４．前記後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項１００から１０３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０５．後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項１００から１０４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０６．後続のトランスポゾン変異誘発Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項１００から１０５までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０７．ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項１００から１０６までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。
項１０８．ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸

、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項１００から１０７までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１０９．　前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベータ－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項１０８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１１０．　前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項１０９に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１１１．　前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンを含む、項１００から１１０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１１２．　前記ＧｏＦトランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび／または対抗選択マーカーを含む、項１１１に記載の方法。

抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの生成および産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するためのその使用

項１１３．　抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法であって、

ａ）所定の代謝産物および／または発酵産物に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択することによって、複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションの少なくとも１つは、前記所定の代謝産物および／または発酵産物に対して耐性をもたらす、ステップと；

ｂ）前記所定の代謝産物および／または前記発酵産物に対して耐性のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を収集して、前記抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するステップと

を含む、方法。

項１１４．　前記所定の代謝産物および／または発酵産物が、スピノシン合成経路に関与する分子、ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する分子、リシン産生経路に関与する分子、トリプトファン経路に関与する分子、トレオニン経路に関与する分子、アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する分子、ならびにデノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子からなる群から選択される、項１１３に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項１１５．　１）前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであって、必要に応じて、各株が、約５０μｇ／ｍｌ～約２ｍｇ／ｍｌのスピノシンＪ／Ｌに対して耐性であり；

２）前記ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）またはノルロイシンであって、必要に応じて、各株が、約１ｍＭ～約５ｍＭのアルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）に対して耐性であり；

３）前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ－ケトビタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；

４）前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは５－フオロインドールであり；

５）前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベーターヒドロキシノルバリンであり；
６）前記アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；
７）前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、項１１３から１１４までのいずれか１項に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項１１６．　ｂ）前記基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１つの増大を呈する後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーについて選択するステップ
をさらに含む、項１１３から１１５までのいずれか１項に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項１１７．　前記後続のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーにおける各株が、スピノシンの合成の増大を呈する、項１１６に記載の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを生成するための方法。

項１１８．　産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法であって、
ａ）複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を含む最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを提供するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、１つまたは複数の遺伝的バリエーションを含み、前記遺伝的バリエーションは、所定の代謝産物または発酵産物に対する耐性をもたらす、ステップと；
ｂ）参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
ｃ）前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供することによって、後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーを創製するステップと；
ｄ）前記参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に対する表現型性能改善について前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
ｅ）前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップｃ）～ｄ）を１回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しい抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも２つの個々のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと
を含む、方法。

項１１９．　前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項１１８に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２０．　前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒ

ａ株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項１１８から１１９までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２１．　前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行する抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項１１８から１２０までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２２．　前記後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーが、先行する抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項１１８から１２２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２３．　後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１０％の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項１１８から１２２までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２４．　後続の抗代謝産物／発酵産物耐性Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーのＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能が、前記産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも１倍の増加を呈するまで、ステップｃ）～ｄ）を繰り返す、項１１８から１２３までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２５．　ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項１１８から１２４までのいずれか１項に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２６．　ステップｅ）の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項１２５に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２７．　前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマミジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ－メチルメチオニン、チアリシン、アルファ－ケトビタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、５－フオロインドール、ベーター－ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項１２６に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

項１２８．　前記スピノシンが、スピノシンＡ、スピノシンＤ、スピノシンＪ、スピノシンＬ、またはこれらの組合せである、項１２７に記載の産生Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能を改善するための方法。

Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞および株ライブラリー

項１２９．　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号１～６９からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏ

ｒａ宿主細胞。
項１３０．前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項１２９に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３１．前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項１２９から１３０までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３２．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含み、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号１～６９からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１３３．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号７０～８０からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３４．前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項１３３に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３５．前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項１３３から１３４までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３６．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含み、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記ターミネーターは、配列番号７０～８０からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１３７．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号９７～１２７からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３８．前記内在性遺伝子が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項１３７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１３９．前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記ＲＢＳを有さない参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項１３７から１３８までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１４０．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含み、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号９７～１２７からなる群から選択される配列を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１４１．トランスポゾンを含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞であって、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞は、前記トランスポゾンなしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型

性能の改善を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１４２．前記トランスポゾンが、機能喪失型（ＬｏＦ）トランスポゾンまたは機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンである、項１４１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１４３．前記機能獲得型（ＧｏＦ）トランスポゾンが、プロモーター、対抗選択マーカー、および／または可溶性タグを含む、項１４２に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１４４．前記トランスポゾンが、配列番号１２８～１３１からなる群から選択される配列を含む、項１４１から１４３までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ宿主細胞。
項１４５．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、配列番号１２８～１３１からなる群から選択される配列を有するトランスポゾンを含み、各株中の前記トランスポゾンは、異なるゲノム遺伝子座にある、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１４６．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株は、
１）スピノシン合成経路に関与する分子、
２）ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する分子、
３）リシン産生経路に関与する分子、
４）トリプトファン経路に関与する分子、
５）トレオニン経路に関与する分子、
６）アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する分子、ならびに／または
７）デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子
に対する前記株の耐性をもたらす遺伝的バリエーションを含む、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１４７．１）前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであり；
２）前記ＳＡＭ／メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）またはノルロイシンであり；
３）前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ－ケトビタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；
４）前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは５－フオロインドールであり；
５）前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベータ－ヒドロキシノルバリンであり；
６）前記アセチル－ＣｏＡ産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；
７）前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、
項１４６に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１４８．前記分子が、スピノシンＪ／Ｌであり、各株が、約５０μｇ／ｍｌ～約２ｍｇ／ｍｌのスピノシンＪ／Ｌに対して耐性である、項１４７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１４９．前記分子が、アルファ－メチルメチオニン（ａＭＭ）であり、各株が、約１ｍＭ～約５ｍＭのａＭＭに対して耐性である、項１４７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株ライブラリー。
項１５０．レポーター遺伝子を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株であって、前記レポーター遺伝子は、
ａ）緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されており；
ｂ）緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されており；
ｃ）ベータ－グルクロニダーゼ（ｇｕｓＡ）タンパク質をコードする遺伝子であって、必

要に応じて前記遺伝子は、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ中での発現のためにコドン最適化されている、
からなる群から選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５１．ａ）前記緑色蛍光レポータータンパク質が、配列番号１４３のアミノ酸配列を有し；
ｂ）赤色蛍光レポータータンパク質が、配列番号１４４のアミノ酸配列を有し；
ｃ）前記ｇｕｓＡタンパク質が、配列番号１４５のアミノ酸配列を有する、
項１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５２．ａ）前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８１の配列を有し；
ｂ）前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８２の配列を有し；
ｃ）前記ｇｕｓＡタンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号８３の配列を有する、
項１５０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５３．前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、互いに異なる、項１５０から１５３までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５４．前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の内在性の蛍光と異なる、項１５０から１５３までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５５．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム中の１つまたは複数の中立の組込み部位に組み込まれたＤＮＡ断片を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株であって、前記中立の組込み部位は、配列番号１３２～１４２から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号１３２～１４２のいずれか１つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５６．前記組み込まれたＤＮＡ断片なしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項１５５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５７．前記組み込まれたＤＮＡ断片なしの参照Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の表現型性能と比較して、所望のレベルの改善されたスピノシン産生を有する、項１５６に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５８．前記組み込まれたＤＮＡ断片が、レポータータンパク質をコードする配列を含む、項１５５から１５７までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１５９．前記組み込まれたＤＮＡ断片が、トランスポゾンを含む、項１５５から１５８までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
項１６０．前記組み込まれたＤＮＡ断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位（ａｔｔＢ）を含む、項１５５から１５９までのいずれか１項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株。
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株におけるＤＮＡ断片の組込みのための中立の組込み部位（ＮＩＳ）
項１６１．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムにＤＮＡ断片を組み込む方法であって、前記ＤＮＡ断片は、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノム中の中立の組込み部位に組み込まれ、前記中立の組込み部位は、配列番号１３２～１４２から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号１３２～１４２のいずれ

か１つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、方法。
項１６２．前記ＤＮＡ断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位（ａｔｔＢ）を含む、項１６１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノムにＤＮＡ断片を組み込む方法。
項１６３．少なくとも２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する遺伝子変異を迅速に統合するための方法であって、
（１）少なくとも２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を提供するステップであって、各株は、他の株に存在しないユニークなゲノム変異を含む、ステップと；
（２）前記親株のそれぞれからプロトプラストを調製するステップと；
（３）前記親株由来の前記プロトプラストを融合して、２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ゲノムを含む融合プロトプラストを産生するステップであって、各親株の前記ゲノムの間の相同組換えが起こる、ステップと
（４）ステップ（３）で産生した前記融合プロトプラストからＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞を回収するステップと；
（５）第１の親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株の前記ユニークなゲノム変異を含むＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞について選択するステップと；
（６）第２の親株の前記ユニークなゲノム変異の存在について、ステップ（５）で得られた前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ細胞をジェノタイピングするステップとを含み、
それによって、２つの親Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に由来する前記ユニークなゲノム変異を含む新しいＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株を得る、方法。
項１６４．前記ユニークなゲノム変異の一方が、選択可能マーカーに連結されるが、他方のユニークなゲノム変異が、いかなる選択可能マーカーにも連結されない、項１６３に記載の方法。
項１６５．ステップ（３）において、前記選択可能マーカーに連結された前記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラスト：前記選択可能マーカーに連結されない前記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラストの比が、１：１未満である、項１６４に記載の方法。
項１６６．前記比が、約１：１０～約１：１００、またはそれ未満である、項１６５に記載の方法。
項１６７．ステップ（４）において、プロトプラスト細胞が、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培地に蒔かれる、項１６３から１６６までのいずれか１項に記載の方法。
項１６８．ステップ（５）が、前記ユニークなゲノム変異の１つが、選択薬物に耐性をもたらす選択可能マーカーに連結されるときに、成長している前記細胞において適切な前記選択薬物の抗生物質でオーバーレイすることによってなしとげられる、項１６３から１６７までのいずれか１項に記載の方法。
項１６９．ステップ（５）が、前記ユニークなゲノム変異のどれも、選択可能マーカーに連結されないときに、ジェノタイピングすることによってなしとげられる、項１６３から１６８までのいずれか１項に記載の方法。
項１７０．２つより多い株に由来する遺伝子変異が、単一の統合プロセスの間に、ランダムに統合される、項１６３から１７０までのいずれか１項に記載の方法。
項１７１．ステップ（２）において、前記プロトプラストが、約５０００×ｇの速度で、約５分間遠心分離することによって、最初に収集される、項１６３から１７１までのいずれか１項に記載の方法。
項１７２．脱脂綿を通して前記プロトプラストを濾過するステップを含まない、項１６３から１７２までのいずれか１項に記載の方法。
項１７３．前記融合プロトプラストが、上層寒天ではなくＲ２ＹＥ培地上で回収される、項１６３から１７３までのいずれか１項に記載の方法。
項１７４．前記Ｒ２ＹＥ培地が、０．５Ｍのソルビトールおよび０．５Ｍのマンノー

スを含む、項１７３に記載の方法。
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集
項１７５．Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法であって、
ａ）選択マーカー、対抗選択マーカー、編集される前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するＤＮＡ断片、およびプラスミド主鎖配列を含むプラスミドを基準Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入するステップと；
ｂ）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて組込み事象を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；
ｃ）前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップであって、前記対抗選択マーカーは、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である、ステップと
を含む、方法。
項１７６．編集されたゲノムを有する結果として生じたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記編集なしの親株と比較して、より良好な性能を有する、項１７５に記載の方法。
項１７７．前記結果として生じたＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記編集なしの親株と比較して、スピノシン産生の増大を有する、項１７６に記載の方法。
項１７８．前記ｓａｃＢ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項１７５から１７７までのいずれか１項に記載の方法。
項１７９．前記ｓａｃＢ遺伝子が、配列番号１４６によってコードされるアミノ酸配列に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項１７８に記載の方法。
項１８０．前記ｐｈｅＳ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項１７５から１７７までのいずれか１項に記載の方法。
項１８１．前記ｐｈｅＳ遺伝子が、配列番号１４７または配列番号１４８によってコードされるアミノ酸に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項１８０に記載の方法。
コンジュゲーションを使用するドナー微生物細胞からＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のレシピエント細胞への遺伝物質の移入
項１８２．ドナー微生物細胞から遺伝物質をＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ微生物のレシピエント細胞に移入させる方法であって、
１）必要に応じて、レシピエント細胞を、後期指数期または静止期まで継代培養するステップと；
２）必要に応じて、ドナー細胞を中期指数期まで継代培養するステップと；
３）ドナーおよびレシピエント細胞を組み合わせるステップと；
４）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物をコンジュゲーション培地に蒔くステップと；
５）プレートをインキュベートして、細胞をコンジュゲートさせるステップと；
６）ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；
７）非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；
８）さらにプレートをインキュベートして、組み込まれたレシピエント細胞を成長させるステップと
を含む、方法。
項１８３．前記ドナー微生物細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、項１８２に記載の方法。
項１８４．以下の条件の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれよりも多くが利用される、項１８２から１８３までのいずれか１項に記載の方法：

１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；
２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；
３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；
４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．６～１：１．０である；
５）前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約１５～２４時間後に前記混合物に送達される；
６）前記レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約４０～４８時間後に前記混合物に送達される；
７）ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれた前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約３時間～１０時間乾燥される；
８）前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約３ｇ／Ｌのグルコースを含む；
９）ドナー細胞の濃度は、約ＯＤ６００＝０．１～０．６である；
１０）レシピエント細胞の濃度は、約ＯＤ５４０＝５．０～１５．０である。
項１８５．　前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約５０～約１５０μｇ／ｍｌである、項１８４に記載の方法。
項１８６．　前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約１００μｇ／ｍｌである、項１８５に記載の方法。
項１８７．　前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アプラマイシンであり、その濃度が、約５０～約２５０μｇ／ｍｌである、項１８４に記載の方法。
項１８８．　前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アプラマイシンであり、その濃度が、約１００μｇ／ｍｌである、項１８７に記載の方法。
項１８９．　ハイスループットプロセスで実施される、項１８２から１８８までのいずれか１項に記載の方法。
項１９０．　４８ウェルのＱ－ｔｒａｙ上で実施される、項１８９に記載の方法。
項１９１．　前記ハイスループットプロセスが、自動化されている、項１８９に記載の方法。
項１９２．　ドナー細胞およびレシピエント細胞の前記混合物が、液体混合物であり、前記液体混合物のアンプル体積が、ロッキング動作を伴う前記培地に蒔かれ、前記液体混合物が、前記培地の全面積にわたって分散する、項１９１に記載の方法。
項１９３．　前記ドナー細胞によって提供された組み込まれたＤＮＡを有するレシピエント細胞の後続の播種のために、酵母ピンによるコロニーピッキングによって接合完了体を移入する自動化プロセスを含む、項１９１に記載の方法。
項１９４．　前記コロニーピッキングが、ディッピング動作または撹拌動作のいずれかで実施される、項１９３に記載の方法。
項１９５．　コンジュゲートする培地が、約３～１０ｇ／Ｌのグルコースを含む改変ＩＳＰ４培地である、項１８４から１９４までのいずれか１項に記載の方法。
項１９６．　前記混合物中のドナー細胞またはレシピエント細胞の総数が、約5×10^{6}～約9×10^{6}である、項１８４から１９４までのいずれか１項に記載の方法。
項１９７．　以下の条件の少なくとも４つで実施される、項１８２から１９６までのいずれか１項に記載の方法：
１）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；
２）ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約３０℃の温度でコンジュゲートされる；
３）レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約４８時間継代培養される；
４）コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約１：０．８である；
５）前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約２０時間後に前記混合物に送達される；

６）前記混合物中の前記ドナー細胞の量または前記レシピエント細胞の量は、約７×１０^{6}である；ならびに
７）前記コンジュゲーション培地は、約６ｇ／Ｌのグルコースを含む。
Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の無傷の方法
項１９８．　Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株における標的化ゲノム編集の方法であって、標的としたゲノム遺伝子座で遺伝的バリエーションを含有する無傷のＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株をもたらし、
ａ）プラスミドをＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入するステップであって、前記プラスミドは、
ｉ．選択マーカー、
ｉｉ．対抗選択マーカー、
ｉｉｉ．標的遺伝子座で前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムに組み込まれる遺伝的バリエーションを含有するＤＮＡ断片であって、所望の遺伝的バリエーションに隣接する前記標的ゲノム遺伝子座に対する相同アームを有するＤＮＡ断片、および
ｉｖ．プラスミド主鎖配列を含む、ステップと；
ｂ）前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて、最初の相同組換えを受け、前記標的遺伝子座に組み込まれた前記遺伝的バリエーションを有するＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップと；
ｃ）前記対抗選択マーカーの非存在に基づいて、前記標的遺伝子座に組み込まれた前記遺伝的バリエーションを有するが、前記プラスミド主鎖をループアウトする追加の相同組換えを受けているＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株について選択するステップとを含み、前記標的とするゲノム遺伝子座が、コードするＤＮＡモジュールの繰り返しセグメントを含有しないゲノム領域を含む前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａゲノムの任意の領域を含んでいてもよい、方法。
項１９９．　前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、項１９８に記載の方法。
項２００．　前記プラスミドが、複製起点を含まない、項１９８から１９９までのいずれか１項に記載の方法。
項２０１．　前記選択ステップ（ｃ）が、前記組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される、項１９８から２００までのいずれか１項に記載の方法。
項２０２．　前記プラスミドが、単一相同組換えベクターである、項１９８から２０１までのいずれか１項に記載の方法。
項２０３．　前記プラスミドが、二重相同組換えベクターである、項１９８から２０２までのいずれか１項に記載の方法。
項２０４．　前記対抗選択マーカーが、ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子である、項１９８から２０３までのいずれか１項に記載の方法。
項２０５．　前記ｓａｃＢ遺伝子またはｐｈｅＳ遺伝子が、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｓｐｉｎｏｓａのためにコドン最適化されている、項２０４に記載の方法。
項２０６．　前記ｓａｃＢ遺伝子が、配列番号１４６によってコードされるアミノ酸配列に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項２０５に記載の方法。
項２０７．　前記ｐｈｅＳ遺伝子が、配列番号１４７または配列番号１４８によってコードされるアミノ酸に対して９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項２０５に記載の方法。
項２０８．　前記プラスミドが、形質転換によって前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入される、項１９８から２０７までのいずれか１項に記載の方法。
項２０９．　前記形質転換が、プロトプラスト形質転換である、項１９８から２０８までのいずれか１項に記載の方法。
項２１０．　前記プラスミドが、コンジュゲーションによって前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に導入され、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、レシピ

エント細胞であり、前記プラスミドを含むドナー細胞が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株に前記プラスミドを移入する、項１９８から２０９までのいずれか１項に記載の方法。

項２１１．　前記コンジュゲーションが、前記プラスミドを含むＥ．ｃｏｌｉドナー細胞に基づく、項１９８から２１０までのいずれか１項に記載の方法。

項２１２．　前記標的遺伝子座が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株中の目的の化合物の産生に関連する遺伝子座である、項１９８から２１１までのいずれか１項に記載の方法。

項２１３．　結果として生じるＳａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ株が、前記ゲノム編集なしの対照株と比較して、目的の化合物の産生の増加を有する、項１９８から２１２までのいずれか１項に記載の方法。

項２１４．　前記目的の化合物が、スピノシンである、項２１２または項２１３に記載の方法。

項２１５．　ハイスループット手順として実施される、項１９８から２１４までのいずれか１項に記載の方法。

【０９０７】

参照による組込み

本明細書に引用したすべての参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、および特許出願は、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている。しかし、本明細書に引用した任意の参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、および特許出願の言及は、これらが有効な先行技術を構成するか、または世界のいずれかの国における共通の一般的知識の一部を形成するという承認または何らかの形式の示唆として解釈されず、かつそのように解釈されるべきでない。

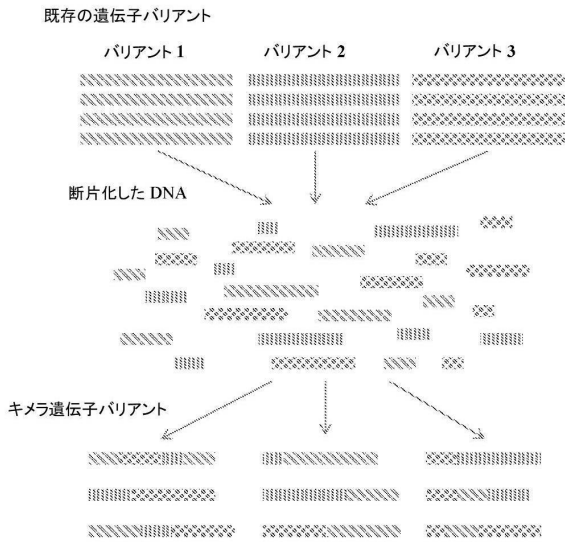
【０９０８】

さらに、２０１６年１２月７日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６５４６４号は、２０１５年１２月７日に出願された米国仮出願第６２／２６４，２３２号２０１６年４月２７日に出願された米国非仮出願第１５／１４０，２９６号、２０１７年４月２７日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／２９７２５号、２０１６年１２月３０日に出願された米国非仮出願第１５／３９６，２３０号、および２０１６年７月２９日に出願された米国仮出願第６２／３６８，７８６号の優先権の利益を主張し、これらはすべて、すべての目的のために、すべての明細書、参照、図面および特許請求の範囲を含むその全体において参照により本明細書に組み込まれている。

【図面】

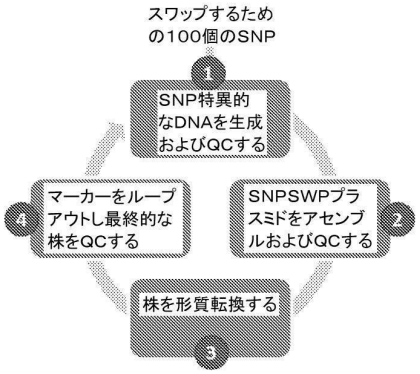
【図１】

Figure 1



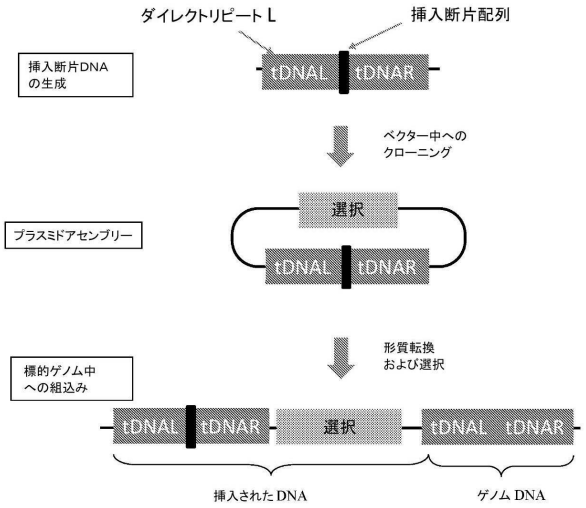
【図２】

Figure 2



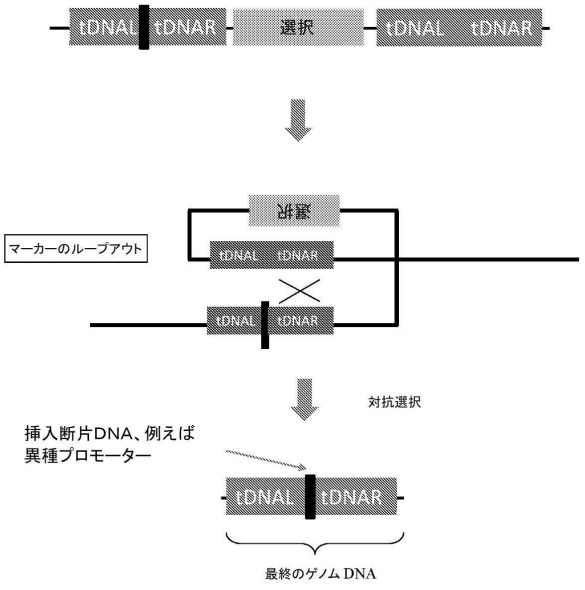
【図３】

Figure 3



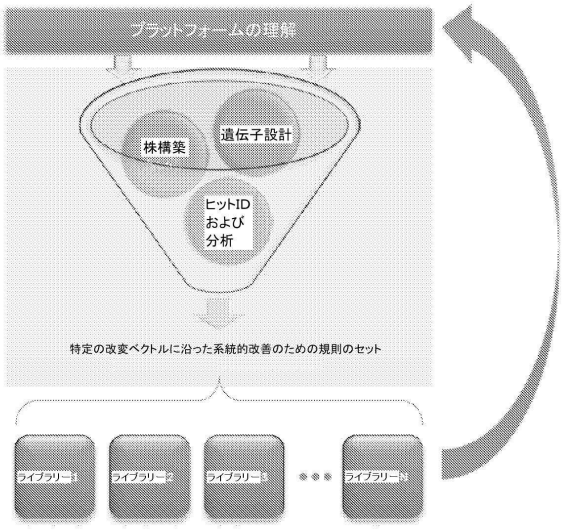
【図４】

Figure 4



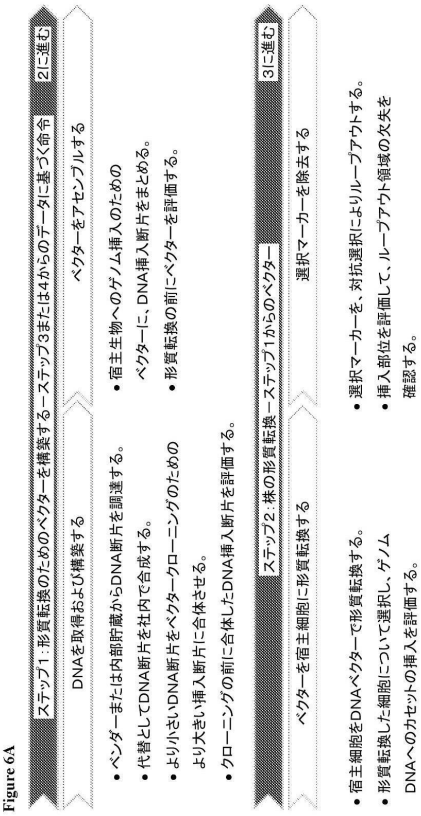
【図５】

Figure 5



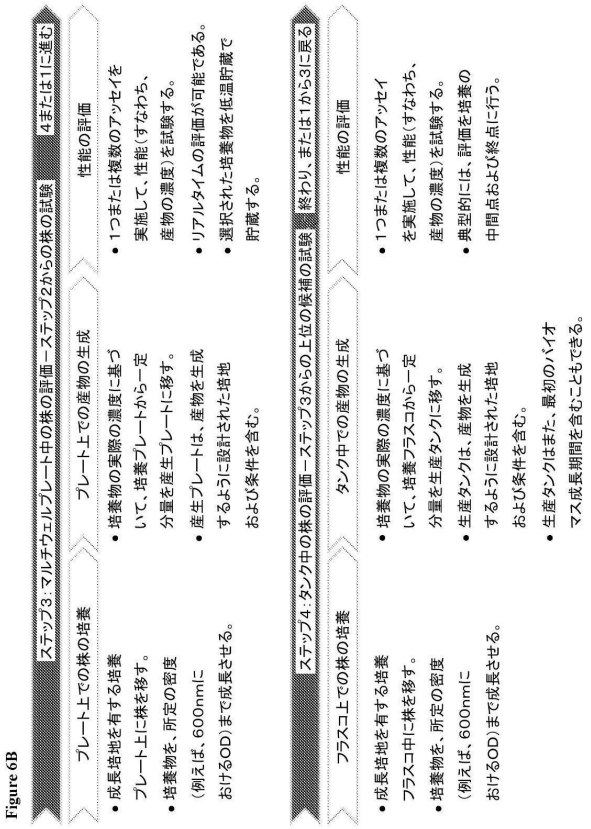
【図６Ａ】

Figure 6A



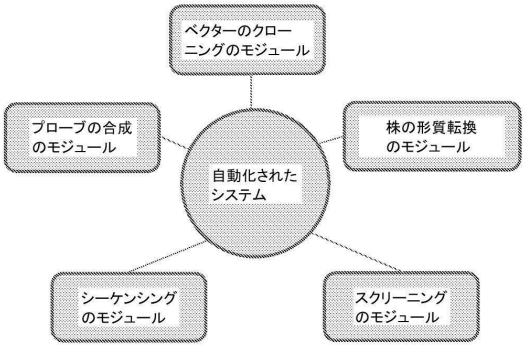
【図６Ｂ】

Figure 6B



【図７】

Figure 7



【図８】

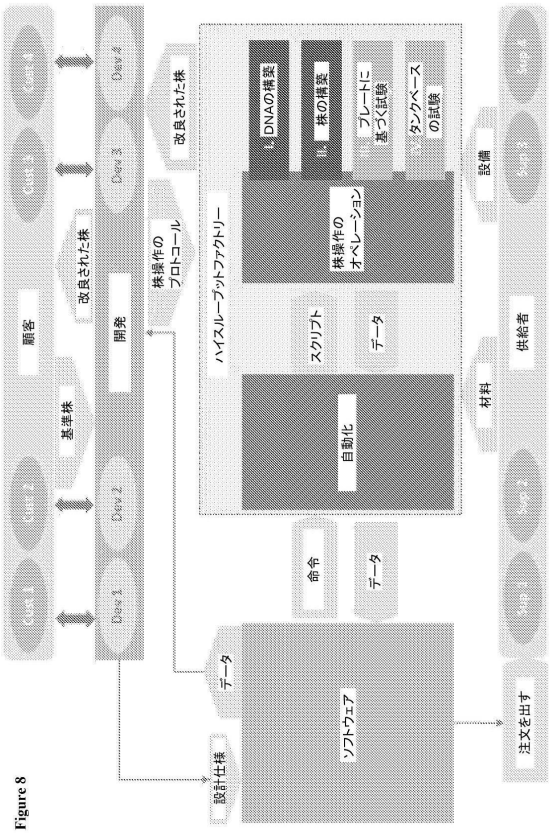
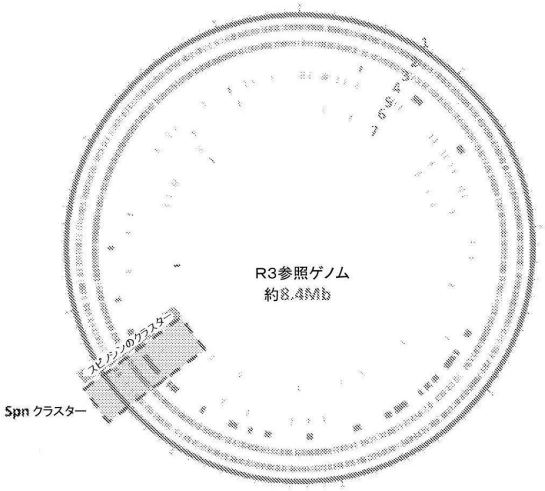


Figure 8

【図９】

Figure 9



【図１０】

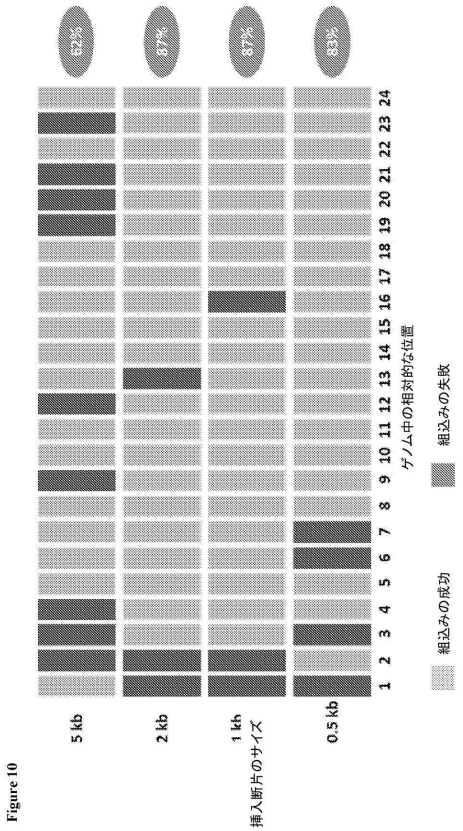
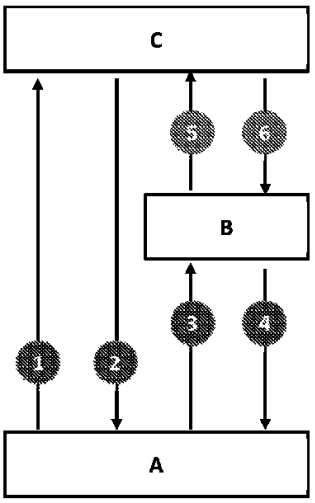


Figure 10

【図１１】

Figure 11



【図１２Ａ】

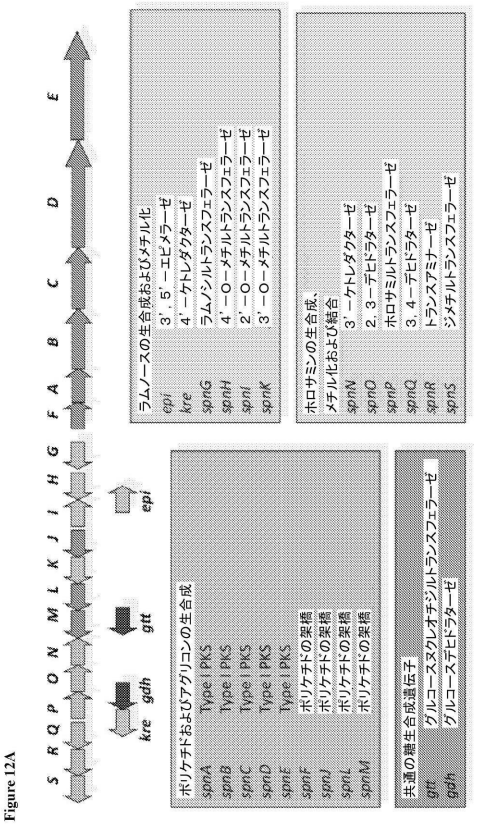


Figure 12A

【図１２Ｂ】

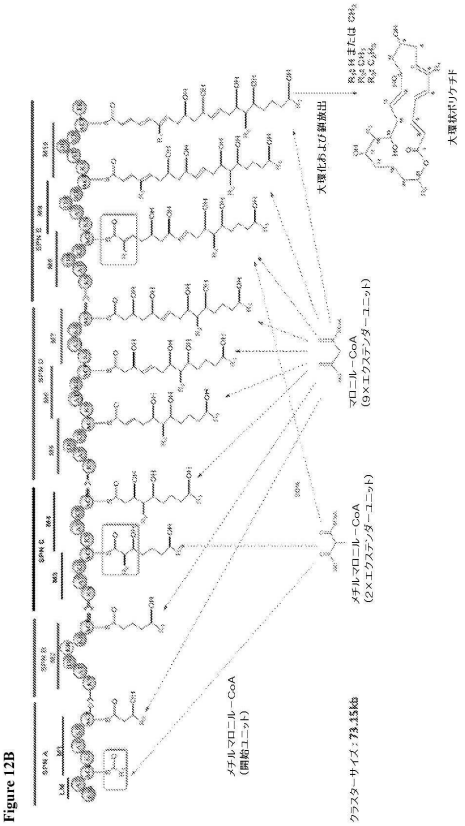


Figure 12B

【図１２Ｃ】

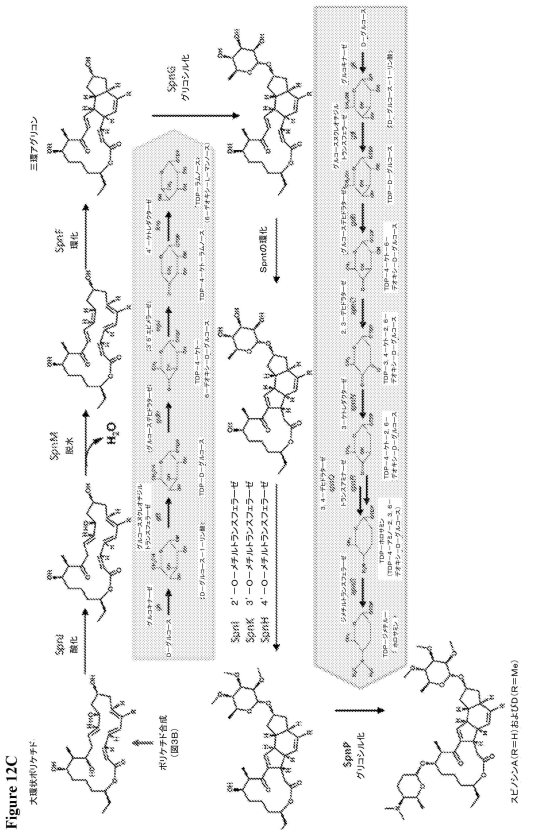


Figure 12C

【図１２Ｄ】

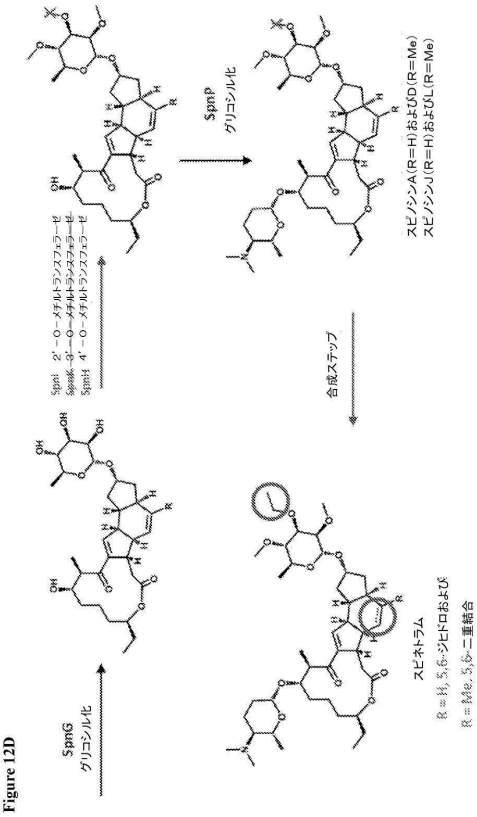


Figure 12D

【図１３】

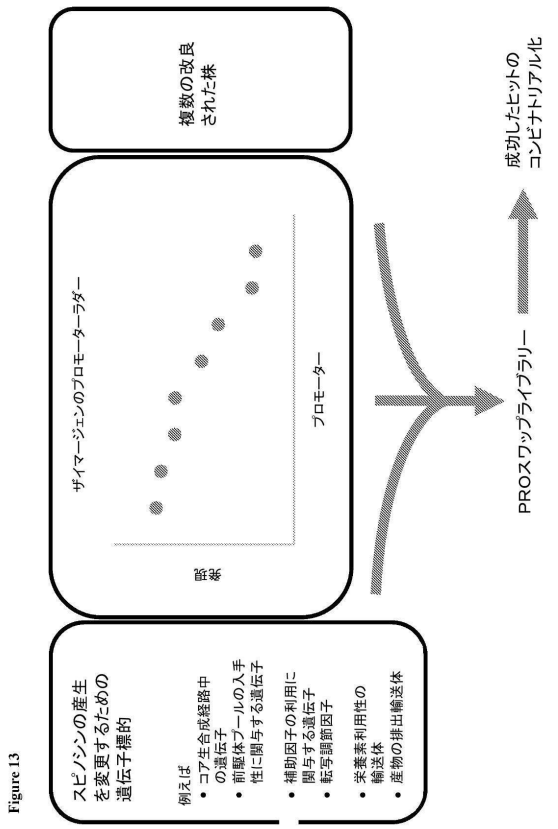


Figure 13

【図１４】

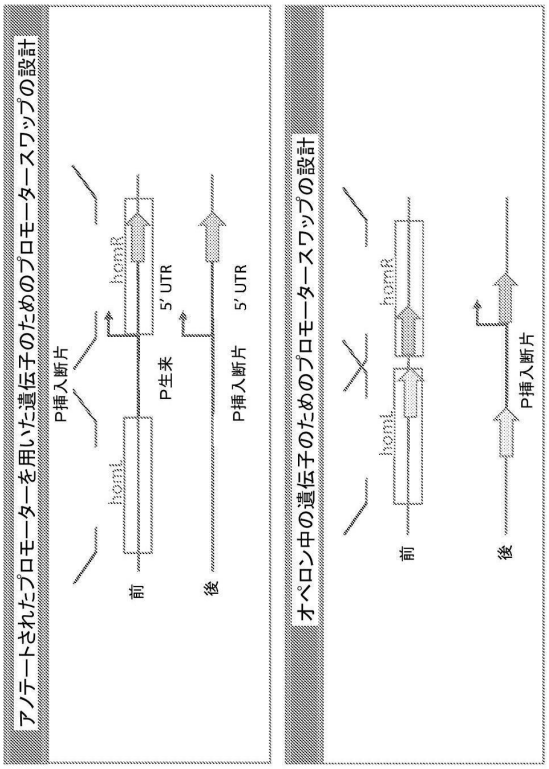


Figure 14

【図１５】

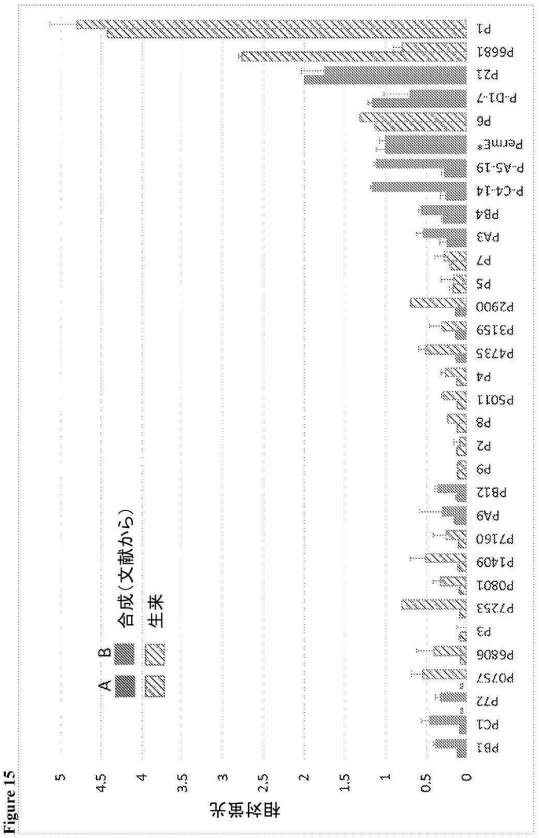


Figure 15

【図１６】

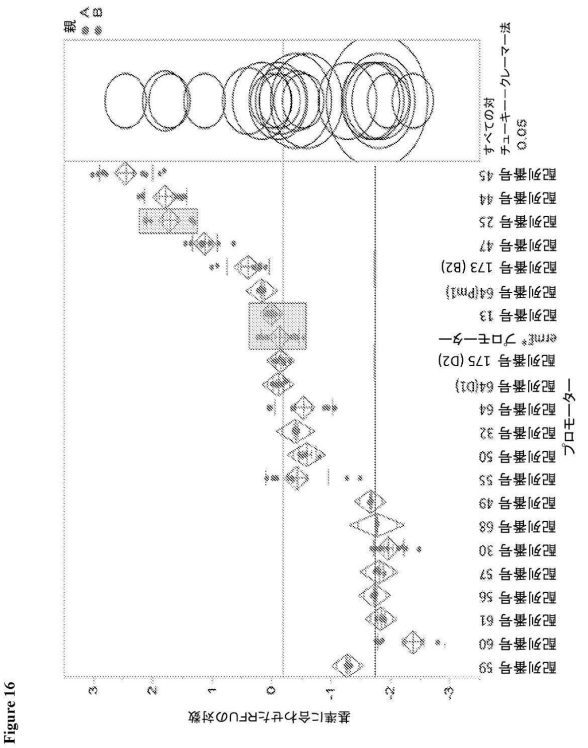
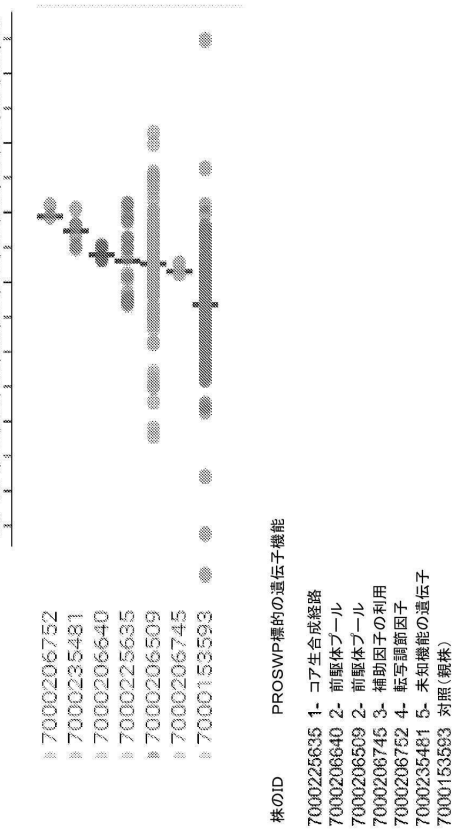


Figure 16

【図１７】

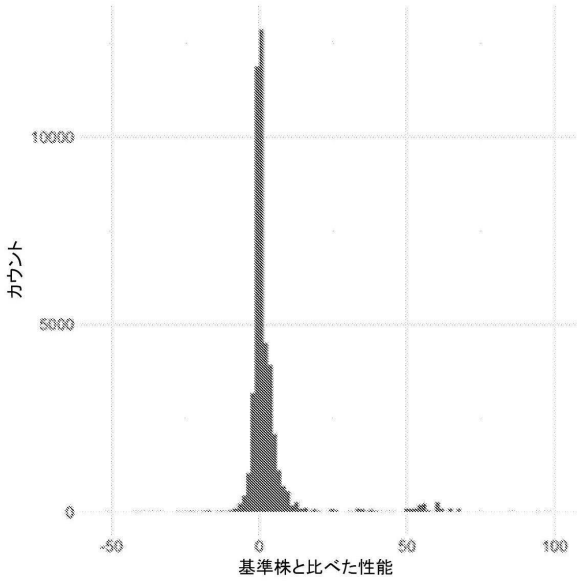
Figure 17

株の性能（スピノシンJ+Lの産生）



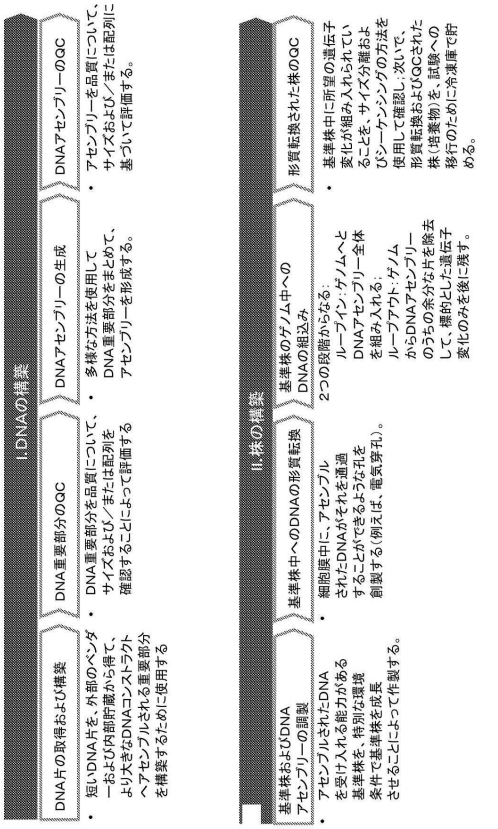
【図１８】

Figure 18



【図１９】

Figure 19



【図２０】

Figure 20

【図２１】

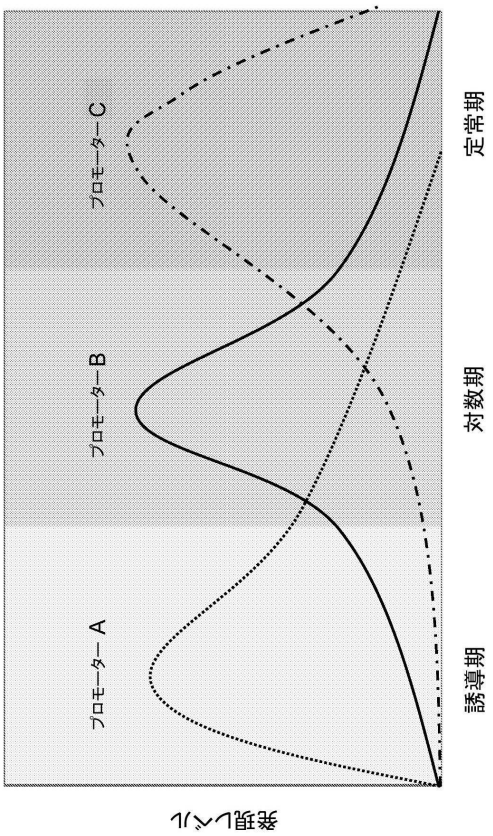


Figure 21

【図２２】

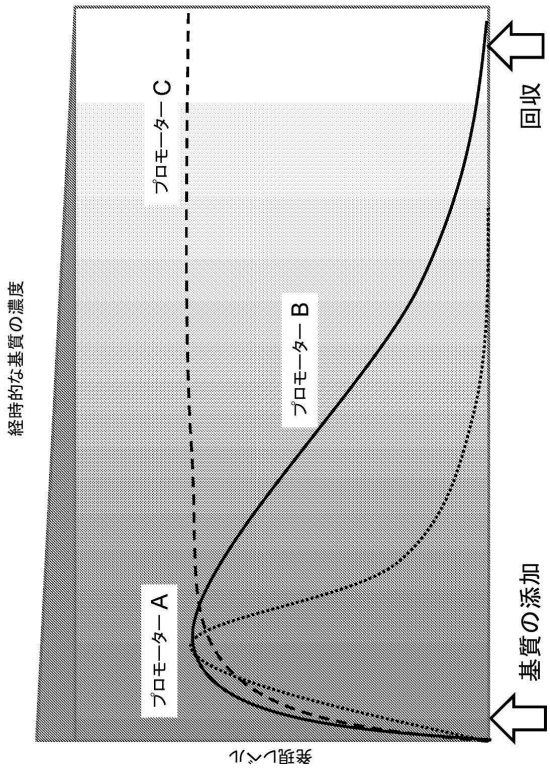


Figure 22

【図２３】

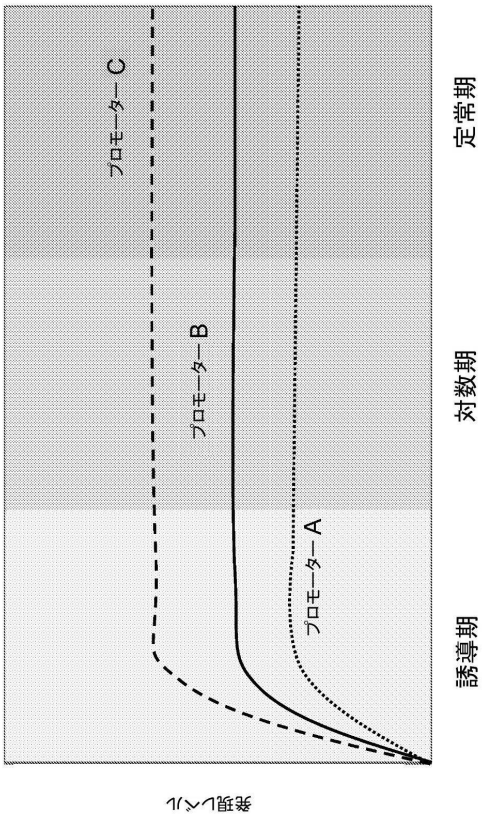


Figure 23

【図２４】

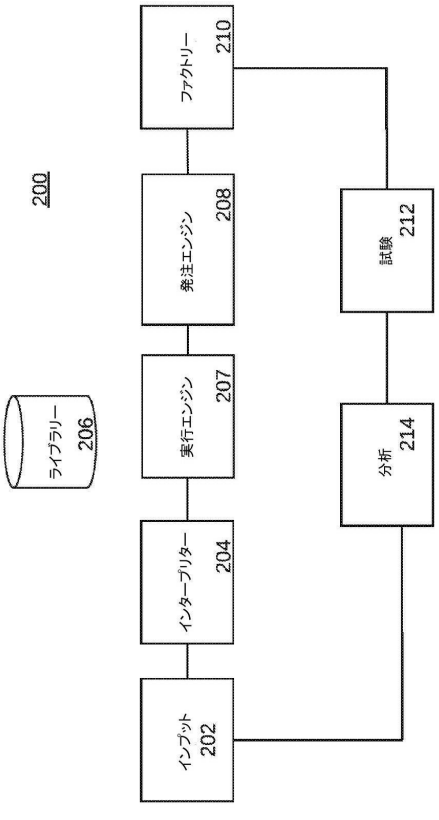
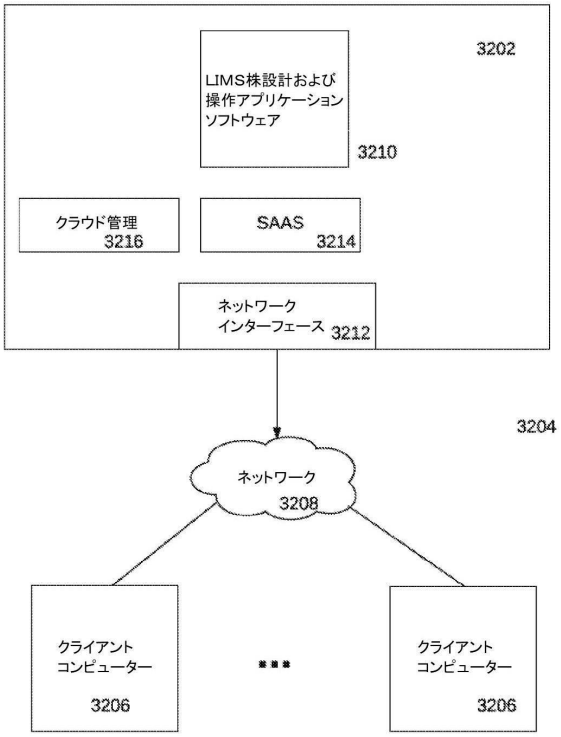


Figure 24

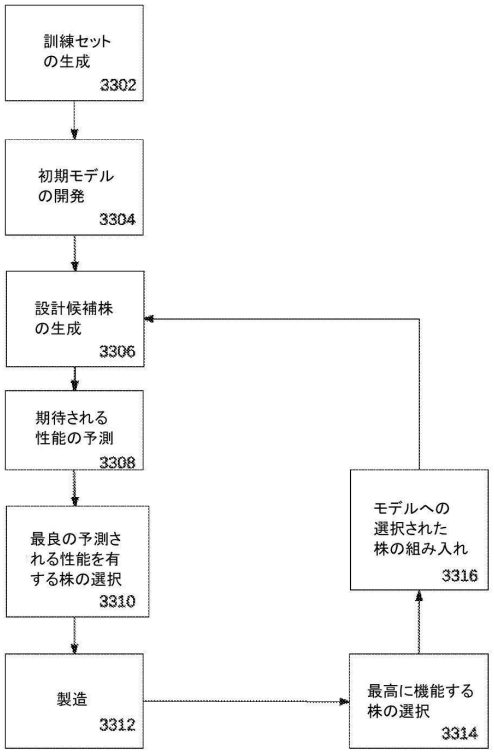
【図２５】

Figure 25



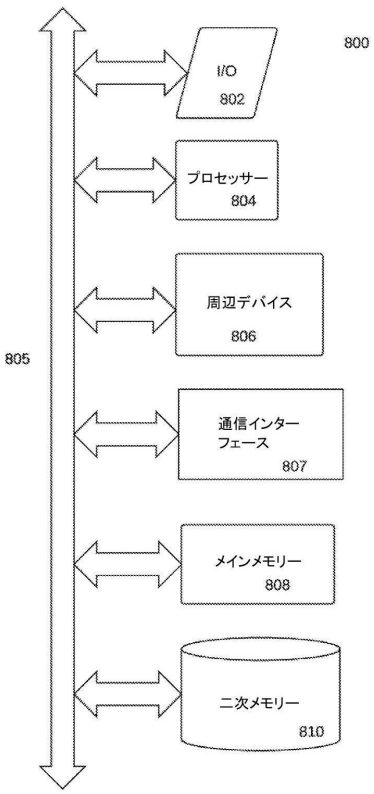
【図２６】

Figure 26



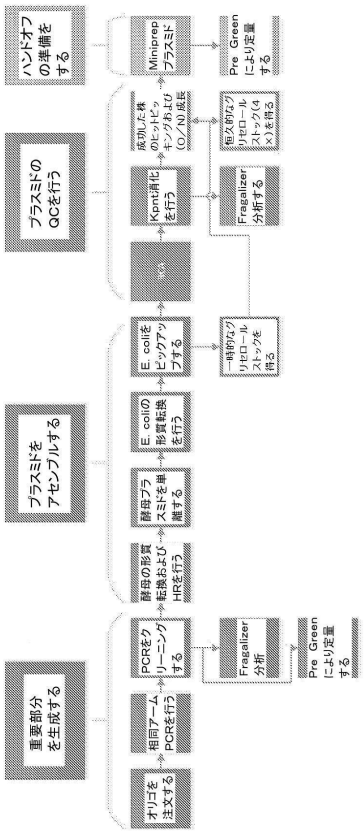
【図２７】

Figure 27



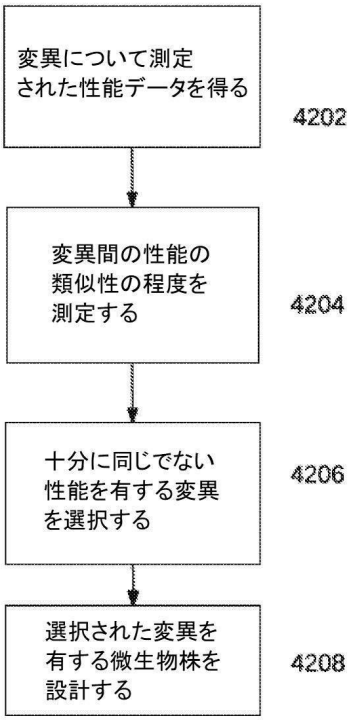
【図２８】

Figure 28



【図２９】

Figure 29



【図３０】

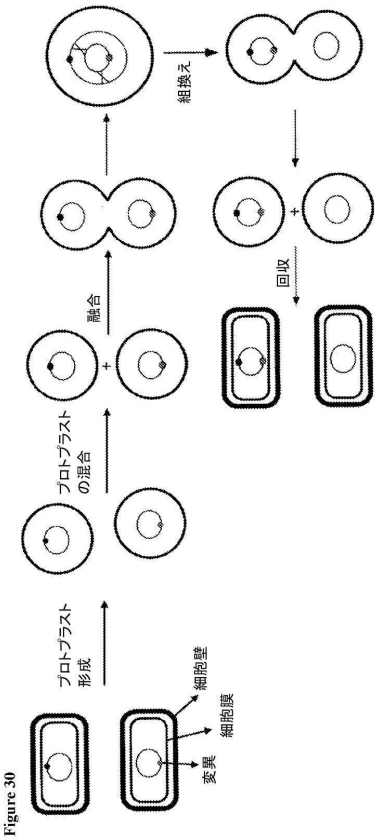


Figure 30

【図３１】

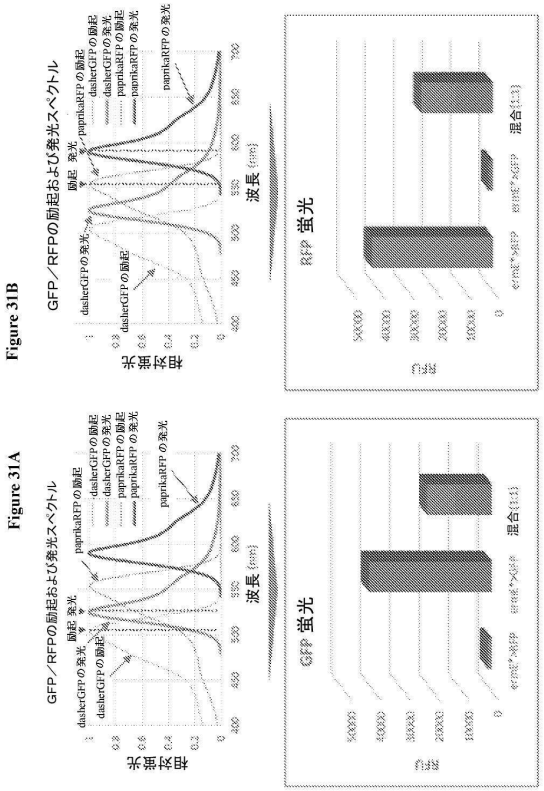


Figure 31B

Figure 31A

Figure 31D

Figure 31C

【図３２】

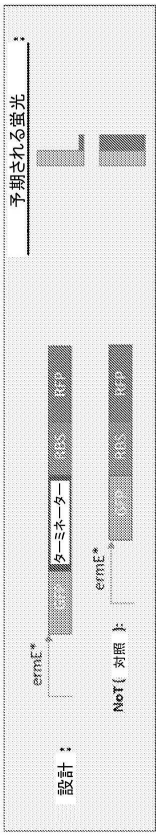


Figure 32

【図３３】

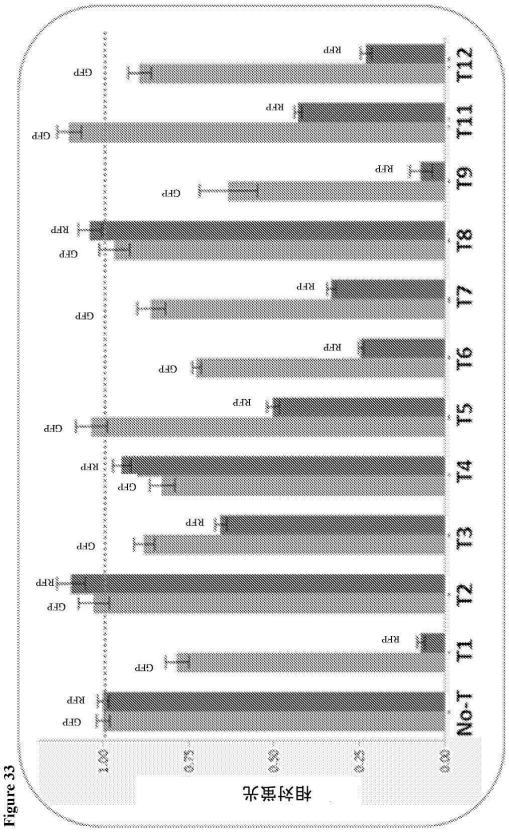


Figure 33

【図３４】

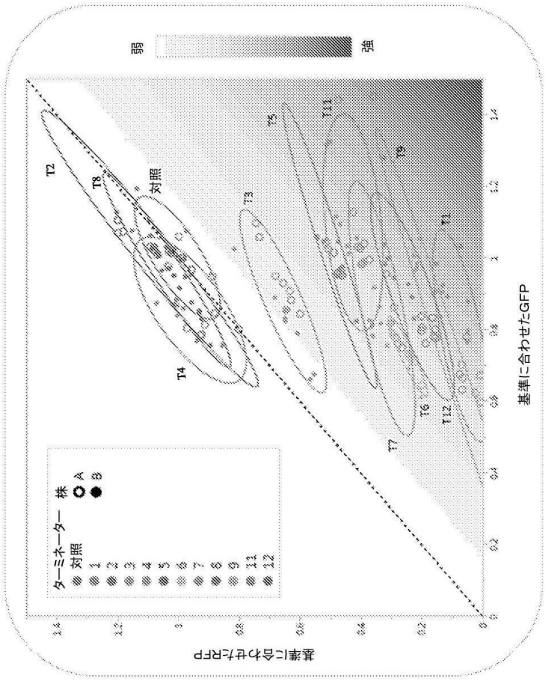


Figure 34

【図３５】

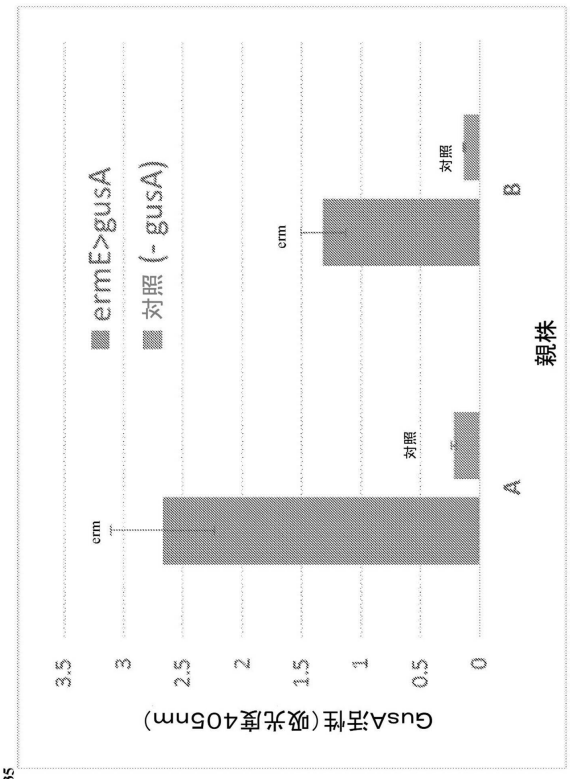


Figure 35

【図３６】

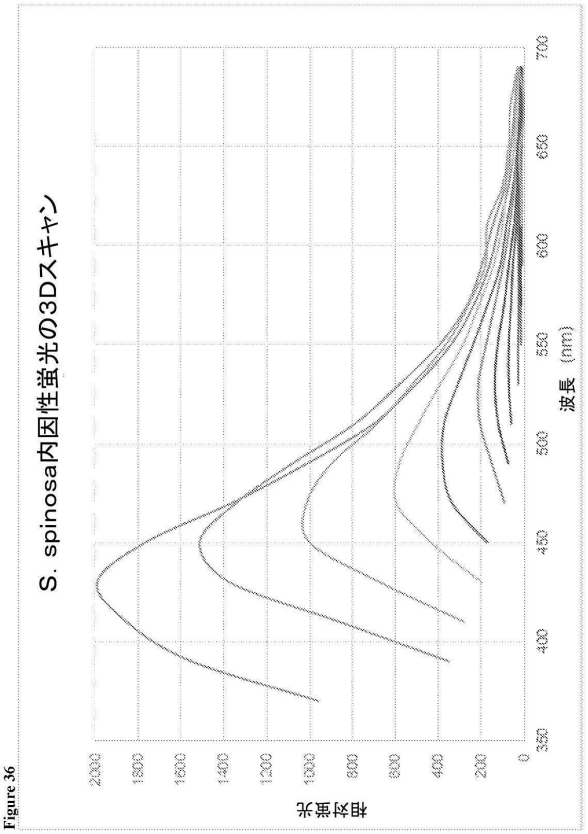
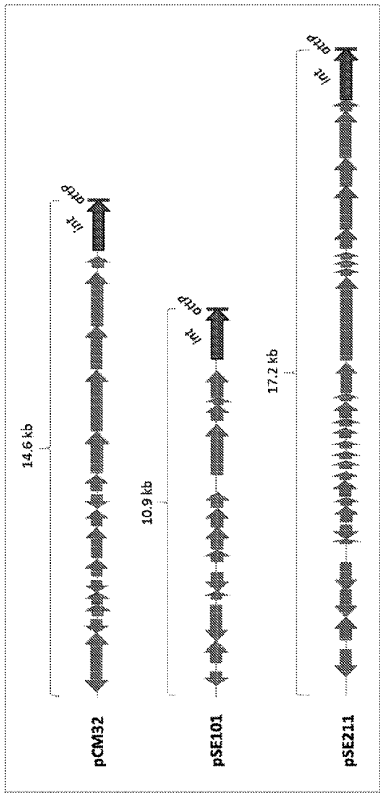


Figure 36

【図３７】

Figure 37



【図３８】

Figure 38

```
配列 ID:  クエリ_234253    長さ: 8373170          マッチ数: 13
関連情報
レンジ 1: 2710919 ～ 2711068グラフィックス次マッチ前マッチ
マッチ#1についてのアライメント統計量
スコア     予想     同一性                ギャップ     ストランド
266 ビット (294)    7e-72    149/150(99%)          0/150(0%)  プラス／マイナス
クエリ  1        GAAAGAGCCCCGGTCGCCATGTCGCGTCCGGGGCTCTGACCAGCGGAGGATACGGGATTC  60
                 ||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
対象    2711068  GAAAGAGCCCCGGTCGCGATGTCGCGTCCGGGGCTCTGACCAGCGGAGGATACGGGATTC  2711009

クエリ  61       GAACCCGTGAGGGCTATTAACCCAACACGATTTCCAATCGTGCGCCTTAGGCGCCTCGGC  120
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
対象    2711008  GAACCCGTGAGGGCTATTAACCCAACACGATTTCCAATCGTGCGCCTTAGGCGCCTCGGC  2710949

クエリ  121      CAATCCTCCGTGCGCGAAGCCTAGCAGGGCG  150
                 ||||||||||||||||||||||||||||||
対象    2710948  CAATCCTCCGTGCGCGAAGCCTAGCAGGGCG  2710919
```

【図３９】

Figure 39

```
配列 ID:  クエリ_181603    長さ: 8373170          マッチ数: 47
関連情報
レンジ 1: 2471978 ～ 2472088 グラフィックス次マッチ前マッチ
マッチ#1についてのアライメント統計量
スコア     予想     同一性                ギャップ     ストランド
163 ビット (186)    1e-42    104/111(94%)          0/111(0%)  プラス／プラス
クエリ  1        GCGCGACGCGAAGCGCACGCGCGCGTAAGCTCAGTTGGTAAGAGCGCCGCCTTGTAAGCGGAC  60
                 || |||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
対象    2471978  GCACGACGCAAGTGCATGCGCGTGTAAGCTCAGTTGGTAAGAGCGCCGCCTTGTAAGCGGAC  2472037

クエリ  61       GGTCAGGGGTTCGAGTCCCCTCAGCGGCTCCGAAACTACCAGCGGAAACGC  111
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
対象    2472038  GGTCAGGGGTTCGAGTCCCCTCAGCGGCTCCGACCGTACCAGCGGAAACGC  2472088
```

【図４０】

Figure 40

```
配列 ID:  クエリ_167905    長さ: 8373170          マッチ数: 1
関連情報
レンジ 1: 3350688 to 3350824 グラフィックス次マッチ前マッチ
マッチ#1についてのアライメント統計量
スコア     予想     同一性                ギャップ     ストランド
170 ビット (188)    4e-43    122/139(88%)          2/139(1%)  プラス／プラス
クエリ  3        TTGAACCCGGCGGCGGCAAGCGGCCAAGGTAGCTCAGTTGGTACGAGCGTCCGGCCTGAAAAGCGC  62
                 ||||||| ||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
対象    3350688  TTGAACCCA--CGCTACGGCCAAGTAGCTCAGTTGGTACGAGCGTCCGGCCTGAAAAGCGC  3350746

クエリ  63       AAGGTCGGCGGTTCGACCCCGCCCTGGCCACCACCAAGAGCTGCGAACA-GCCCCTGCC  121
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| | || || | ||||||||||
対象    3350747  AAGGTCGGCGGTTCGACCCCGCCCCTGGCCACCGCTCAGCCAAGCCAAAACGCCCCTGCC  3350806

クエリ  122      GATCTCGGTGGGGCTTT  139
                 || |||||||| | |
対象    3350807  GAGATCGGCGGGGCGCT  3350824
```

【図４１Ａ】

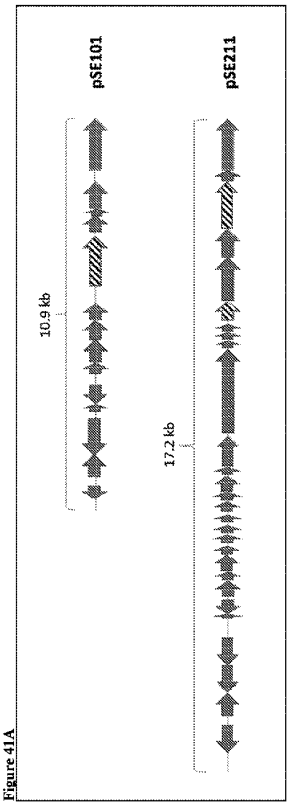


Figure 41A

【図４１Ｂ】

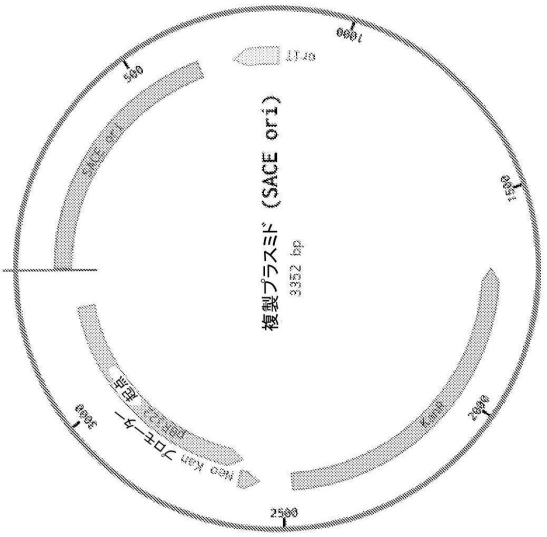


Figure 41B

【図４２】

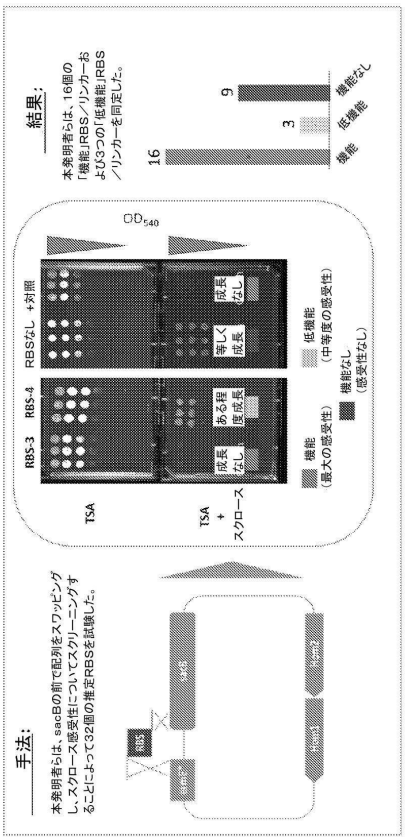


Figure 42

【図４３Ａ】

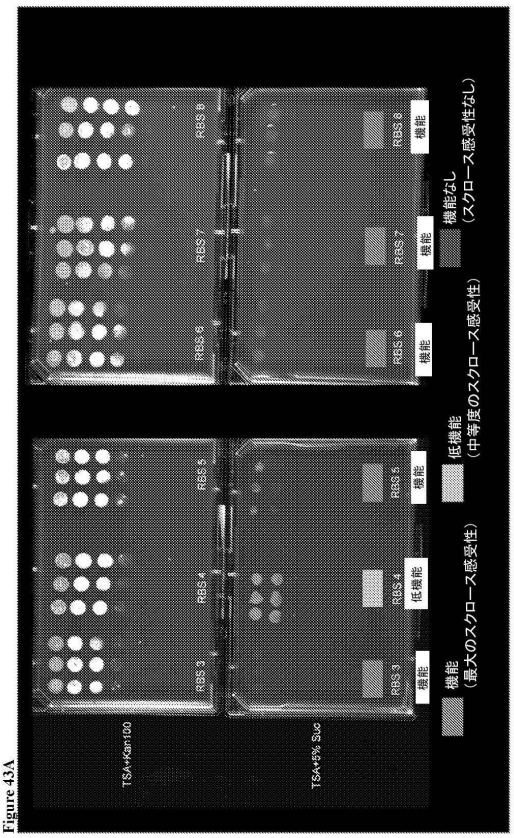


Figure 43A

【図４３Ｂ】

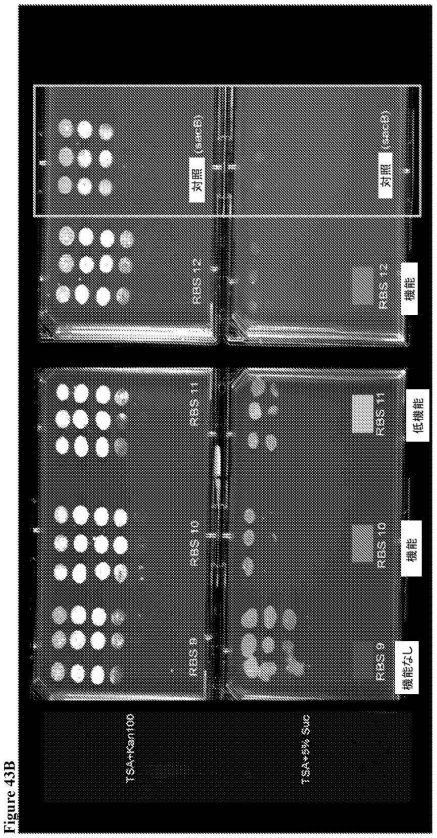


Figure 43B

【図４３Ｃ】

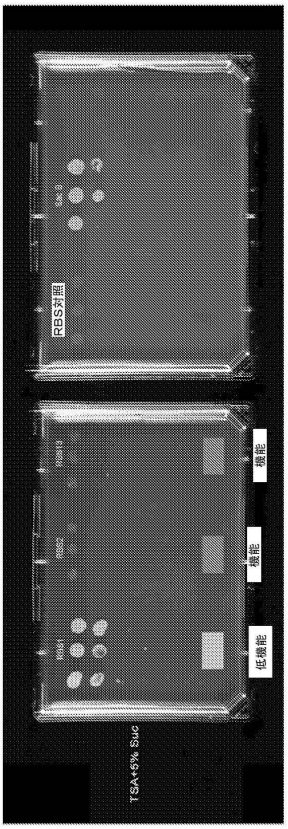


Figure 43C

【図４３Ｄ】

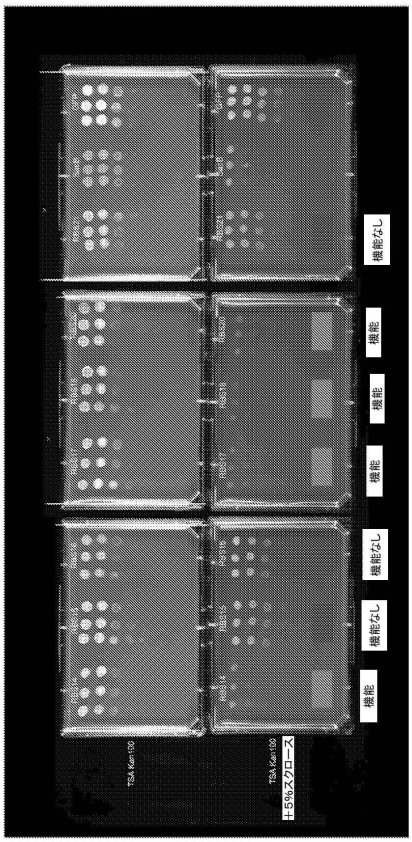


Figure 43D

【図４３Ｅ】

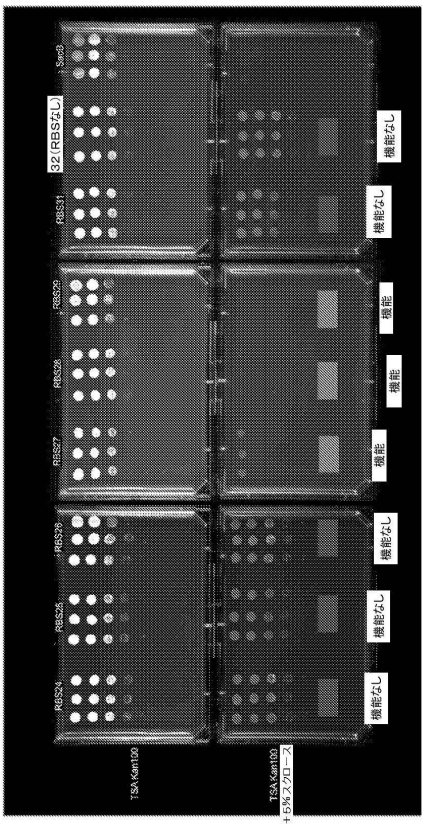


Figure 43E

【図４４】

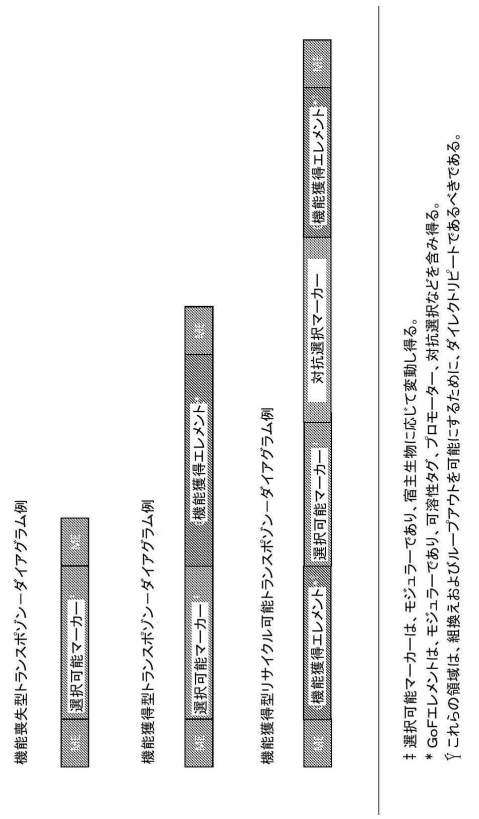


Figure 44

【図４５】

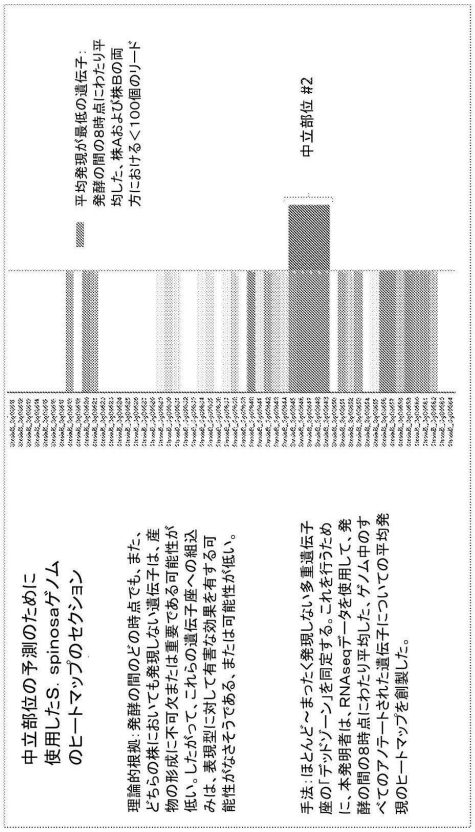


Figure 45

【図４６】

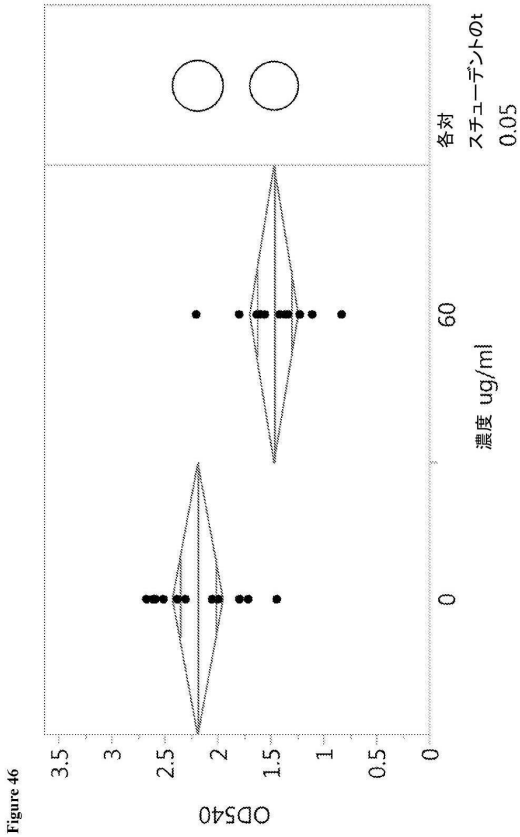


Figure 46

【図４７】

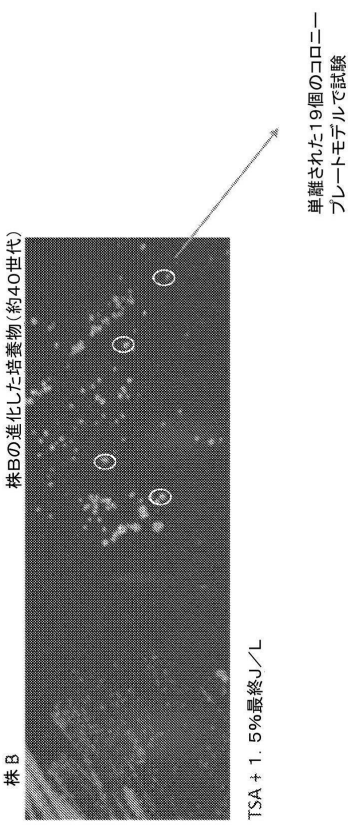


Figure 47

【図４８Ａ】

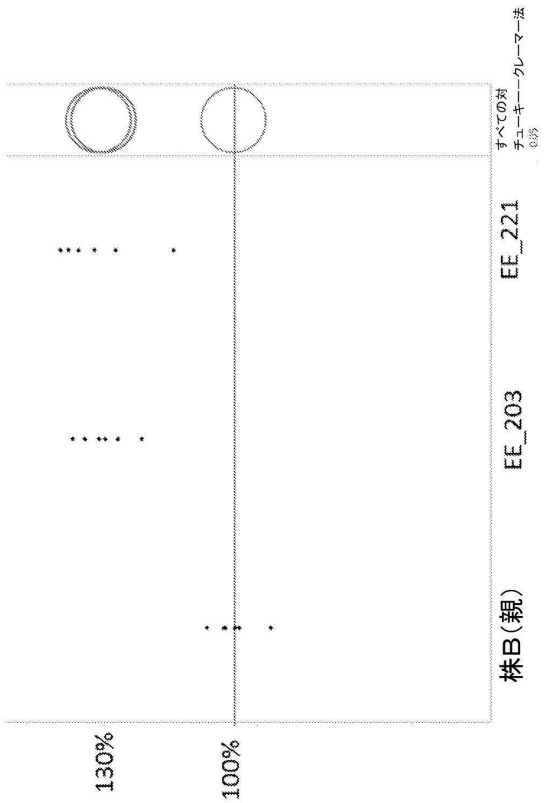


Figure 48A

【図４８Ｂ】

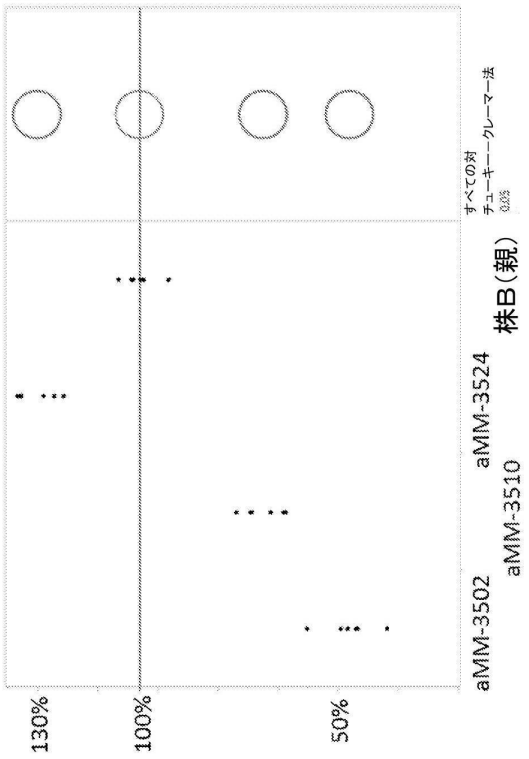


Figure 48B

【図４９Ａ】

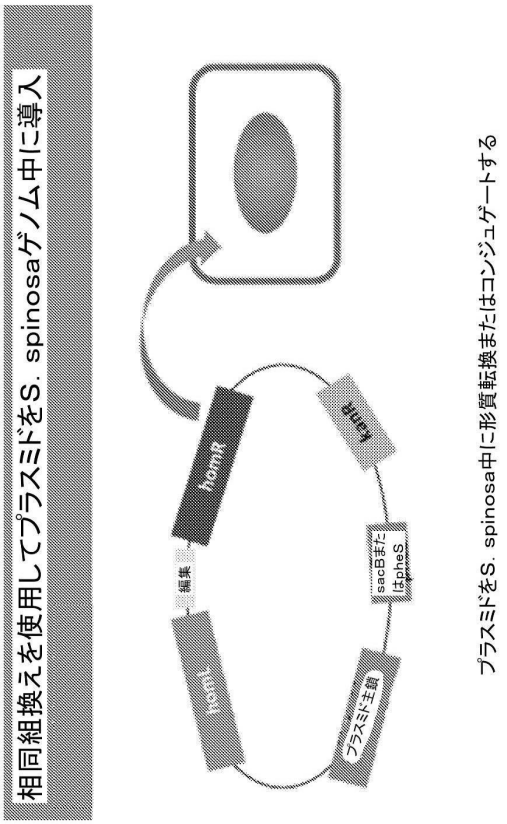


Figure 49A

【図４９Ｂ】

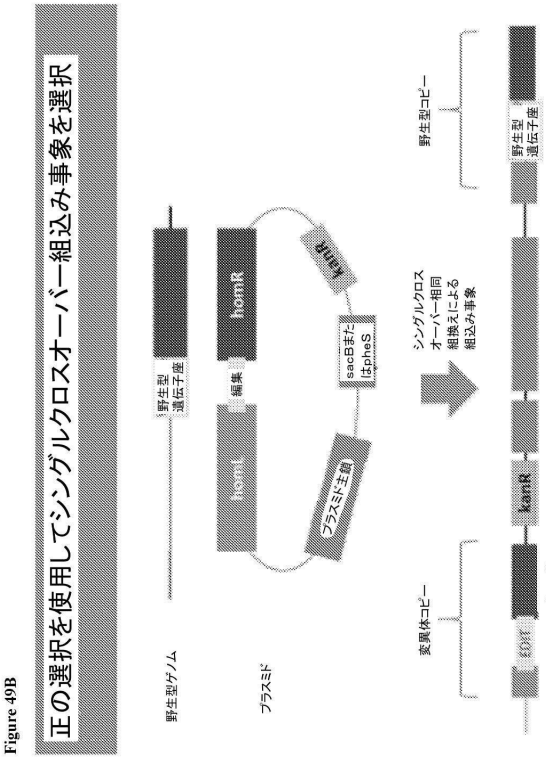


Figure 49B

【図４９Ｃ】

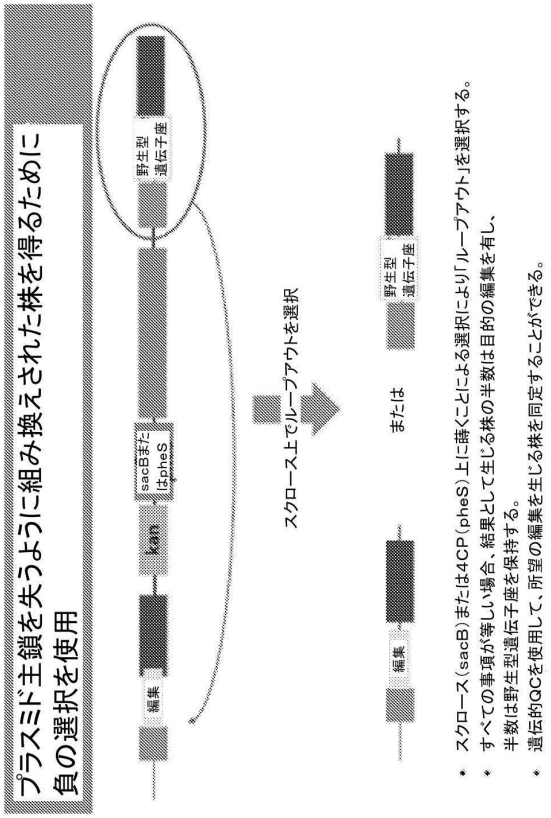


Figure 49C

【図５０】

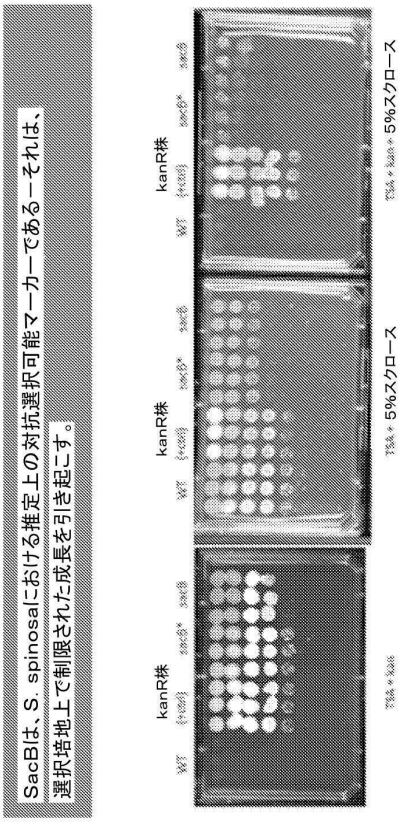


Figure 50

【図５１】

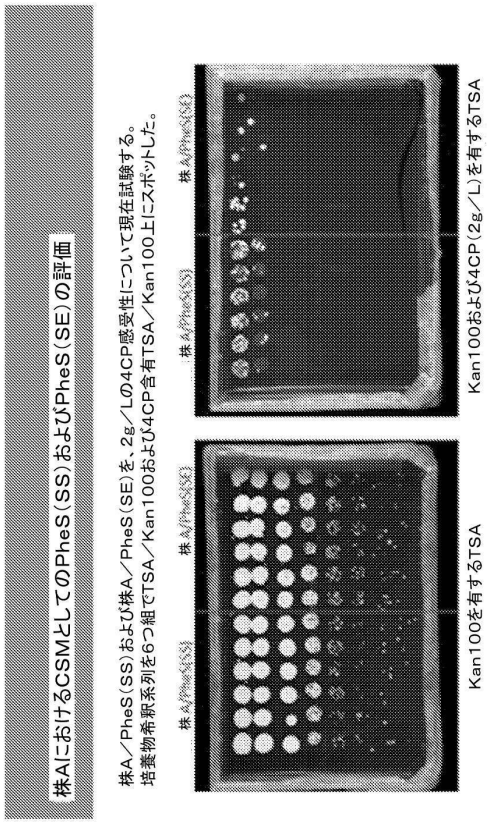


Figure 51

【図５２】

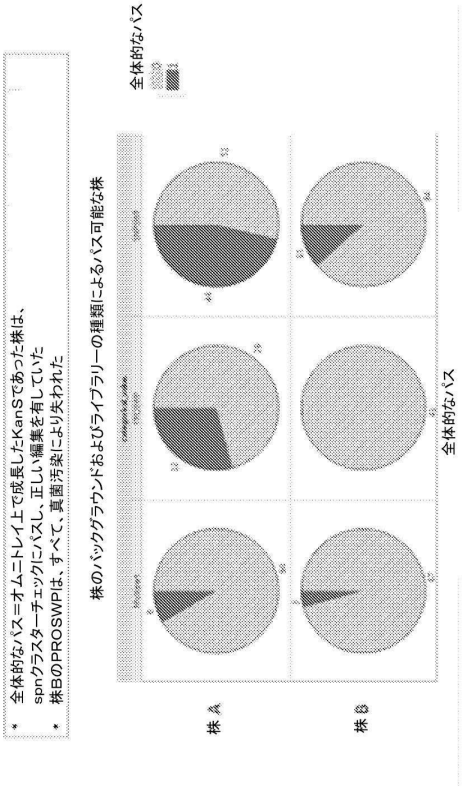


Figure 52

【図５３】

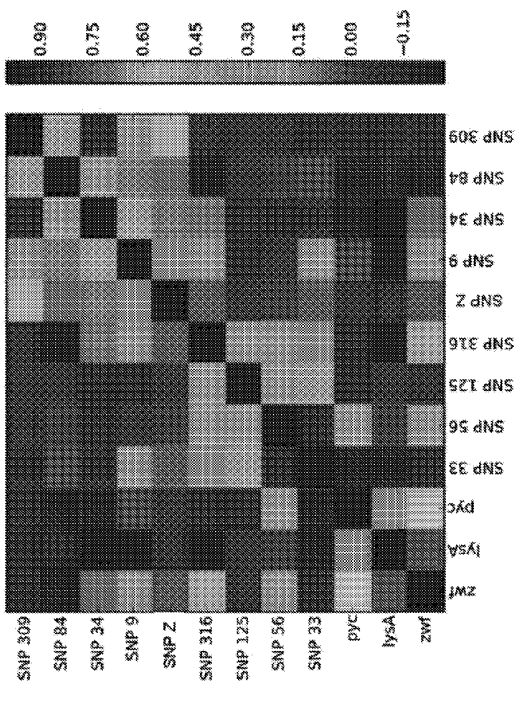


Figure 53

【図５４】

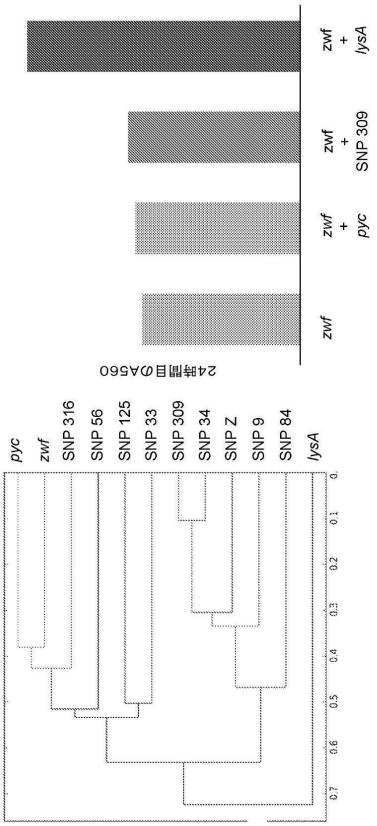


Figure 54B

Figure 54A

【図５５】

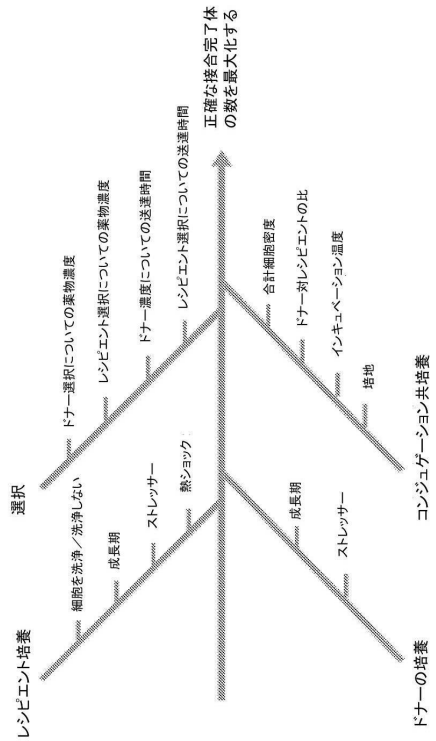
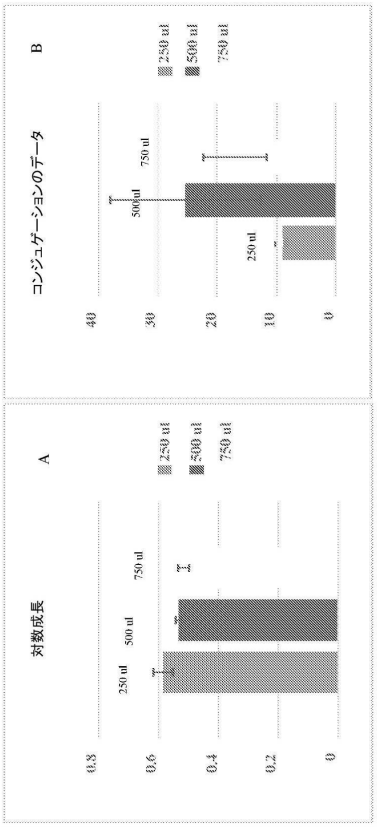


Figure 55

【図５６】



【図５７】

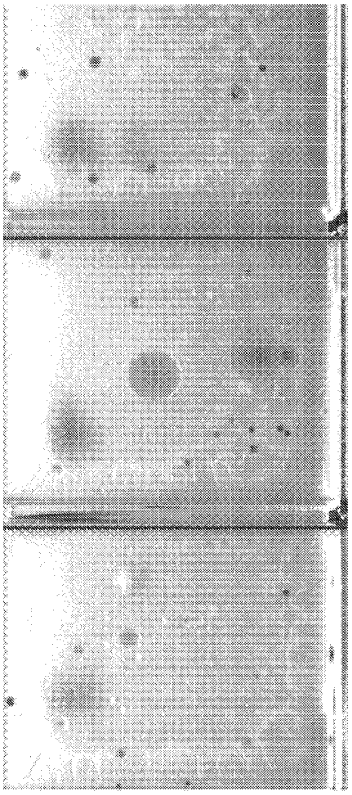


Figure 57

【図５８】

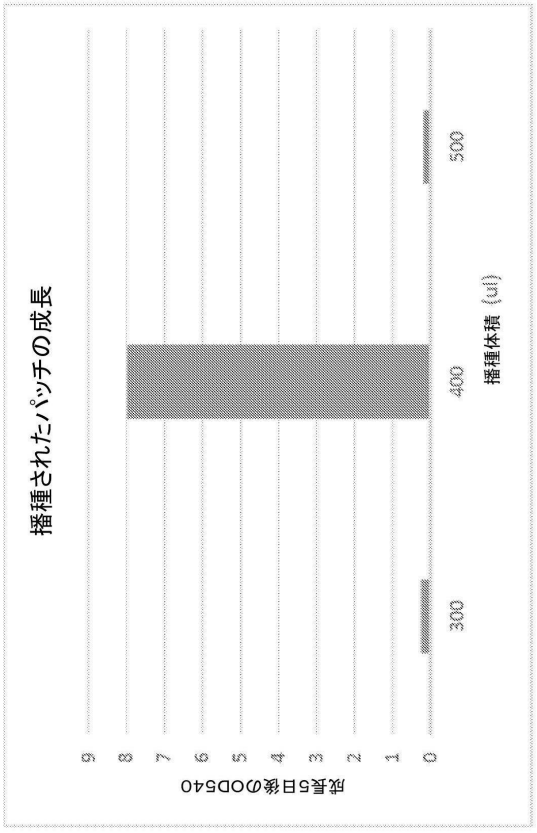


Figure 58

【図５９】

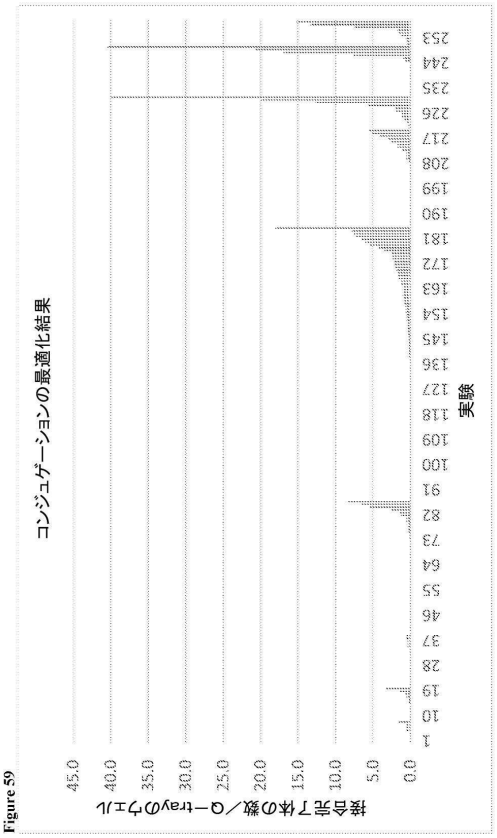


Figure 59

【図６０】

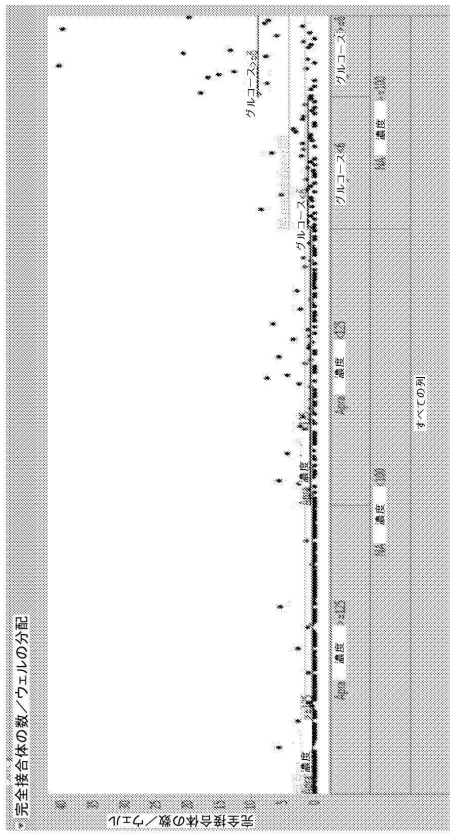


Figure 60

【図６１】

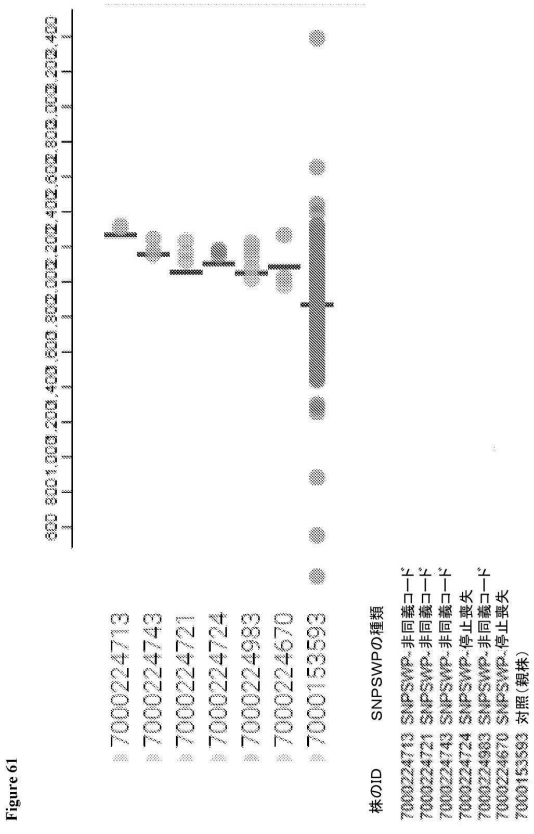


Figure 61

【図６２】

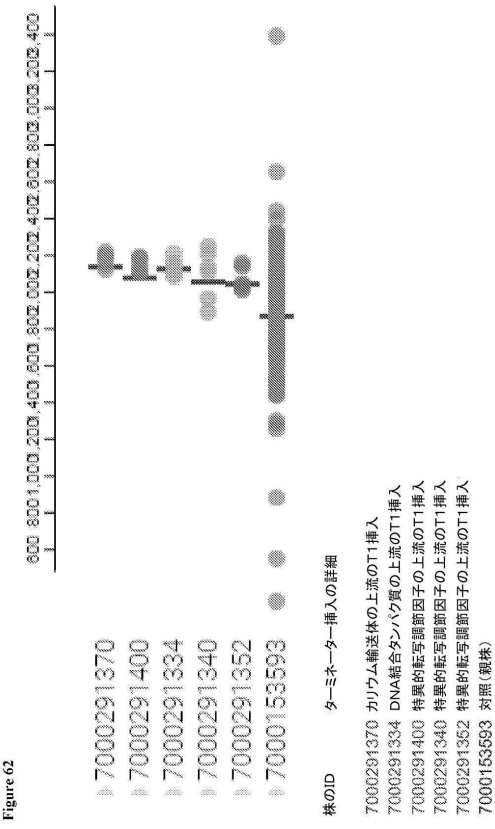


Figure 62

【図６３】

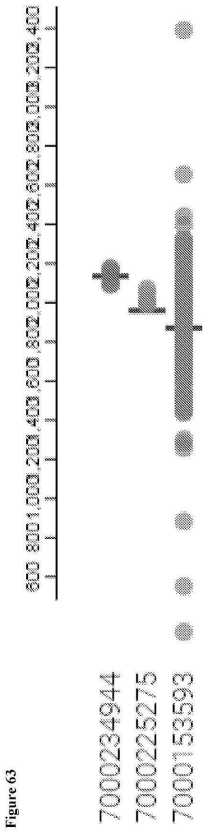


Figure 63

【図６４Ａ】

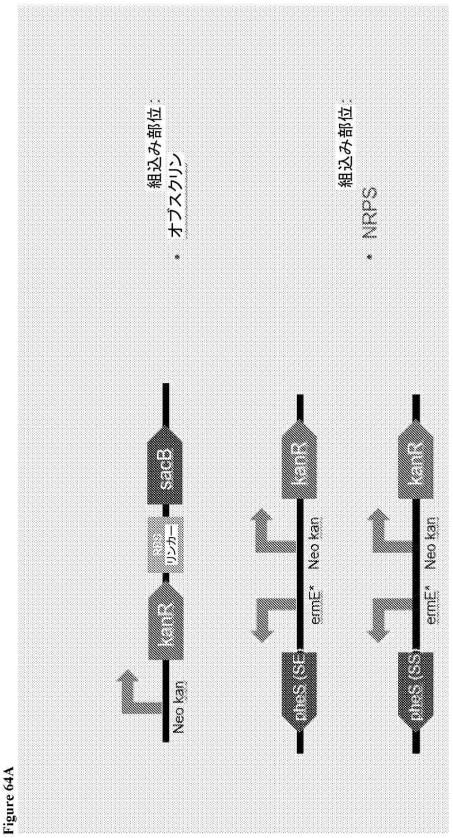


Figure 64A

【図６４Ｂ】

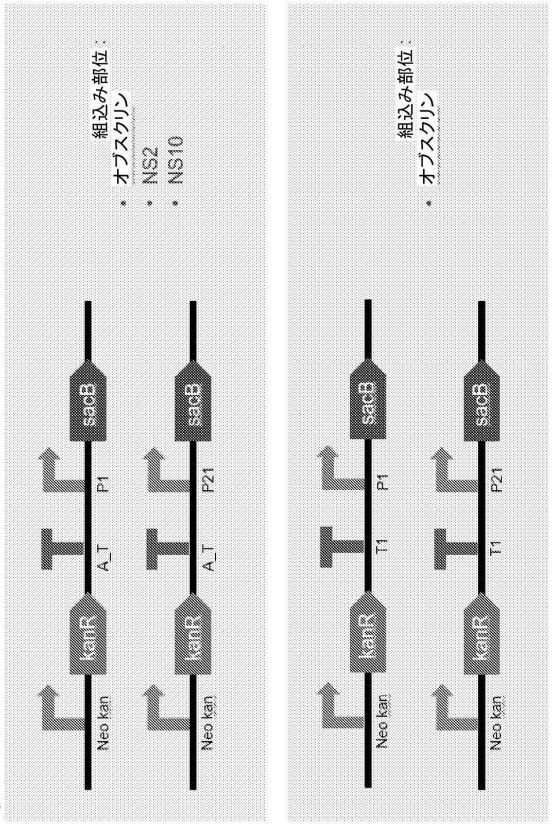


Figure 64B

【図６４Ｃ】

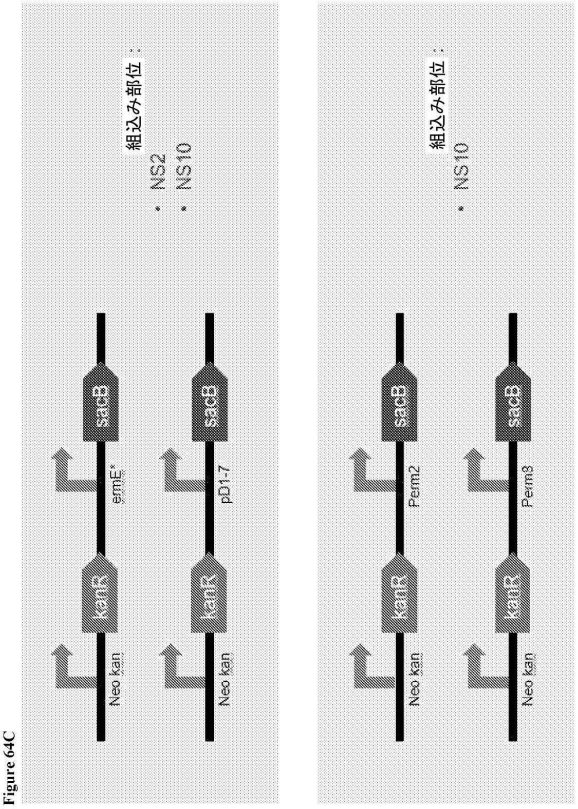


Figure 64C

【図６５】

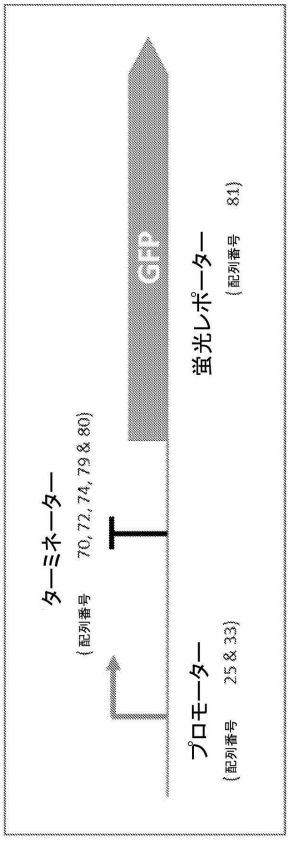


Figure 65

【図６６Ａ】

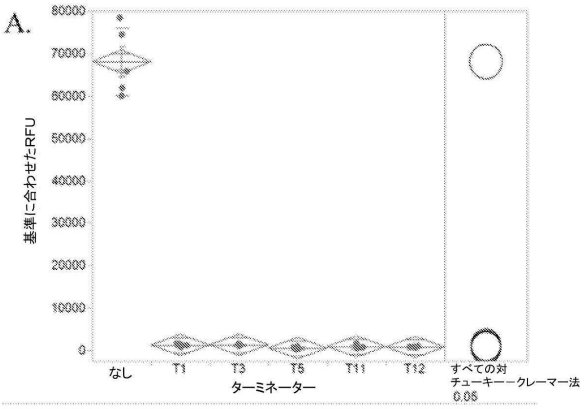
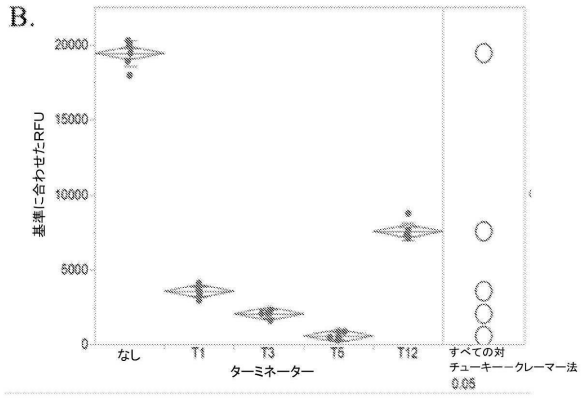


Figure 66A

【図６６Ｂ】

Figure 66B



【図６７】

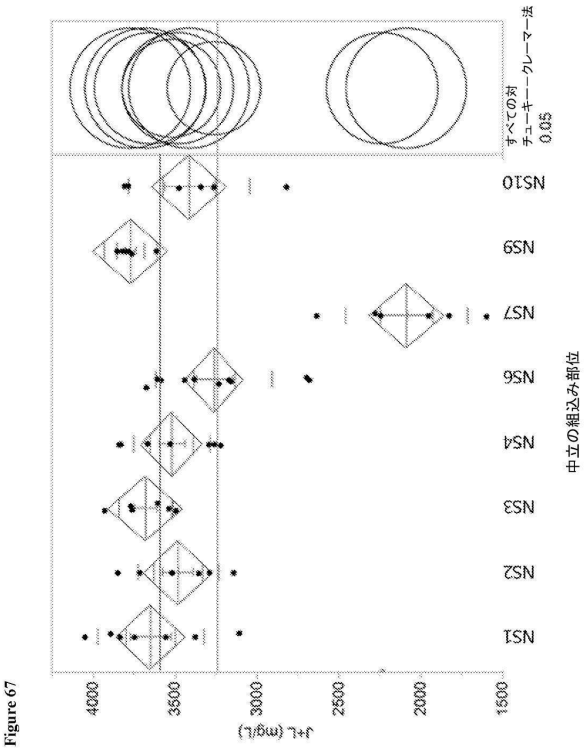


Figure 67

【図６８】

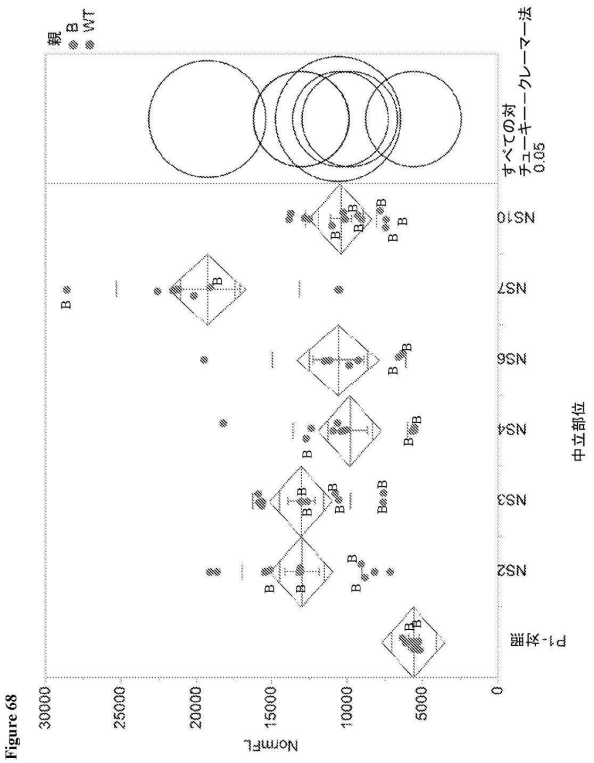


Figure 68

【図６９】

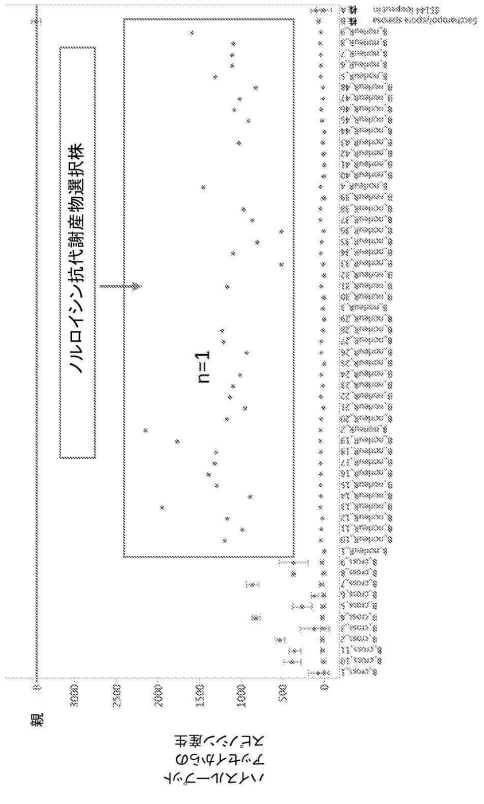


Figure 69

【配列表】
0007350659000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　メイソン， ベンジャミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ゴラノフ， アレクシ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ケリー， ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　キム， ヨンニュン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　モディ， シータル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　パスマルティ， ニハル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ミッツ， ベンジャミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　エンヤート， ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８， エメリービル， ホートン ストリート ５９８０， スイート １０５， ザイマージェン インコーポレイテッド 気付
審査官　田ノ上 拓自

(56)参考文献
Appl. Biochem. Biotechnol., 2009年，Vol.159，p.655-663
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009年，Vol.84，p.641-648，DOI 10.1007/s00253-009-2137-y
Biotechnol. Lett., 2011年，Vol.33，p.733-739，DOI 10.1007/s10529-010-0481-8
J. Biomolecule Reconstruction, 2013年，Vol.10, No.1，p.27-35
Metabolic Engineering, 2013年，Vol.19，p.98-106
Saccharopolyspora Species: Laboratory Maintenance and Enhanced Production of Secondary Metabolites，Current Protocols in Microbiology, 2017年2月，Supplement 44，UNIT 10H.1-13，DOI: 10.1002/cpmc.21
Biotechnology Advances, 2009年，Vol.27，p.996-1005

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ４０Ｂ　５０／０６
Ｃ４０Ｂ　４０／０２
Ｃ１２Ｎ　１／２１
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ