

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年4月5日 (2012.4.5)

【公表番号】特表2011-512848(P2011-512848A)

【公表日】平成23年4月28日 (2011.4.28)

【年通号数】公開・登録公報2011-017

【出願番号】特願2010-549897(P2010-549897)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 7/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/04

【手続補正書】

【提出日】平成24年2月20日 (2012.2.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とを有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、天然に存在しない微生物。

【請求項 2】

マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 2 つ、3 つまたは 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 3】

アシル還元経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含み、前記アシル還元経路酵素がアシル - C o A レダクターゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼから選択される、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 4】

前記第一級アルコールが、4 ~ 24 個の間の炭素原子を有するアルコールを含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 5】

第一級アルコールを生産するための方法であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の

天然に存在しない微生物を、実質的に嫌気性の条件下で、前記第一級アルコールを生産するために十分な期間にわたって培養することを含む、方法。

【請求項 6】

前記第一級アルコールを単離することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

1 つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物であって、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、酵素（前記酵素は、前記遺伝子破壊が前記酵素の活性を低下させたときに、前記天然に存在しない微生物の増殖に長鎖アルコール（LCA）生産を連動させるものである）をコードする遺伝子において生じ、それによって前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記天然に存在しない微生物に LCA の生産を付与するものである、天然に存在しない微生物。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記 1 つ以上の遺伝子の欠失を含む、請求項 7 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、

表 I の設計 I ~ X X I によって与えられるか；または

アセトアルデヒド - CoA デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする、

請求項 7 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 10】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、フマル酸レダクターゼ、フマラーゼ、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、請求項 9 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 11】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、および ATP シンターゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、請求項 10 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 12】

LCA を生産するための方法であって、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない微生物を LCA を生産するために十分な期間にわたって培養することを含む、方法。

【請求項 13】

1 つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない真核生物であって、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼおよびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする遺伝子において生じ、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記生物のサイトゾルまたはミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産を付与する、天然に存在しない真核生物。

【請求項 14】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記 1 つ以上の遺伝子の欠失を含む、請求項 13 に記載の生物。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記サイトゾルにおける長鎖アルコールの生産を付与し、そして前記生物はサイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部 NADH デヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部 NADH デヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、請求項 13 に記載の生物。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記サイトゾルにおける長鎖アルコールの生産を付与し、

そして前記生物はアセチル - C o A シンセターゼ (A M P 形成性)、A D P 依存性酢酸 - C o A リガーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸 : N A D P オキシドレダクターゼ、およびピルビン酸ギ酸リアーゼからなる群より選択される酵素 ; またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をサイトゾル内にさらに含む、請求項 1 3 に記載の生物。

【請求項 1 7】

サイトゾルトランスヒドロゲナーゼまたはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をさらに含む、請求項 1 6 に記載の生物。

【請求項 1 8】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記ミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産を付与し、そして前記生物はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部 N A D H デヒドロゲナーゼおよび内部 N A D H デヒドロゲナーゼによって触媒されるグリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトルからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、請求項 1 3 に記載の生物。

【請求項 1 9】

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記ミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産を付与し、そして前記生物はピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸 : N A D P オキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸 C o A リガーゼ、および A M P 形成性アセチル C o A シンセターゼからなる群より選択される酵素 ; またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、請求項 1 3 に記載の生物。

【請求項 2 0】

サイトゾルからミトコンドリアへの N A D H の輸送のための増強された N A D H 輸送シャトルシステムをさらに含む、請求項 1 9 に記載の生物。

【請求項 2 1】

トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、およびピルビン酸オキシダーゼからなる群より選択される酵素 ; またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、請求項 1 9 に記載の生物。

【請求項 2 2】

酵母または真菌であり、前記酵母は、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* および *S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e* を含む *S a c c h a r o m y c e s* 種、*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s* および *K l u y v e r o m y c e s m a r x i a n u s* を含む *K l u y v e r o m y c e s* 種、ならびに *P i c h i a p a s t o r i s* を含む *P i c h i a* 種からなる群より選択され、そして前記真菌は *A s p e r g i l l u s t e r r e u s* および *A s p e r g i l l u s n i g e r* を含む *A s p e r g i l l u s* 種、ならびに *R h i z o p u s a r r h i z u s* および *R h i z o p u s o r y z a e* を含む *R h i z o p u s* 種からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の生物。

【請求項 2 3】

請求項 1 3 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない真核生物を長鎖アルコールを生産するに十分な期間にわたって培養することを含む、長鎖アルコールの生産方法。

【請求項 2 4】

脂肪アシル - C o A を生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含むマロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路を有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

【請求項 2 5】

脂肪酸エステルまたはワックスを生成するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とワックスエステルシンターゼとを有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

【請求項 26】

脂肪酸エステルまたはワックスを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアルコールアセチルトランスフェラーゼとを有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

他の態様において、本明細書に開示する実施形態は、これらの天然に存在しない真核生物の培養を含む、長鎖アルコールの生産方法に関する。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とを有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、天然に存在しない微生物。

(項目 2)

マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 3)

マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 4)

マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5)

前記 4 つの外因性核酸が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、項目 4 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 6)

前記 4 つの外因性核酸が、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、項目 4 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 7)

アシル還元経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、項目1に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 8)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼを含む、項目7に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 9)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アルコールデヒドロゲナーゼを含む、項目7に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 0)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を含む、項目7に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 1)

アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する前記酵素が、脂肪アルコール形成性アシル - C o A レダクターゼ (F A R) を含む、項目10に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 2)

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種コード核酸をさらに含む、項目1に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 3)

前記第一級アルコールが、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする前記外因性核酸を欠く微生物と比較して、少なくとも10%多いレベルの量で生産される、請求項1に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 4)

実質的に嫌気性の培養基をさらに含む、項目1に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 5)

前記第一級アルコールが、4 ~ 24 個の間の炭素原子を有するアルコールを含む、項目1に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 6)

4 ~ 24 個の間の炭素原子を有する前記アルコールが、ブタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ドデカノール、テトラデカノールまたはヘキサデカノールから選択される、項目15に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 7)

第一級アルコールを生産するために十分な量で発現される、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路をコードする外因性核酸とアシル還元経路をコードする外因性核酸とを含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする外因性核酸を含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼをコードする1つ以上の外因性核酸を含む、天然に存在しない微生物。

(項目 1 8)

前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路をコードする前記外因性核酸が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、項目17に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 1 9)

前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路をコードする前記外因性核酸が、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A

デヒドロゲナーゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 0)

アシル還元経路をコードする前記 1 つ以上の外因性核酸が、2 つの外因性核酸を含む、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 1)

アシル還元経路をコードする 1 つの外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼをコードし、およびアシル還元経路をコードする第二の外因性核酸が、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする、項目 2 0 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 2)

アシル還元経路をコードする前記 1 つ以上の外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を含む酵素をコードする、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 3)

アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を含む前記酵素が、脂肪アルコール形成性アシル - C o A レダクターゼ (F A R) を含む、項目 2 2 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 4)

前記外因性核酸の少なくとも 1 つが、異種コード核酸をさらに含む、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 5)

前記第一級アルコールが、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路をコードする前記外因性核酸およびアシル還元経路をコードする外因性核酸を欠く微生物と比較して、少なくとも 1 0 % 多いレベルの量で生産される、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 6)

実質的に嫌気性の培養基をさらに含む、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 7)

前記第一級アルコールが、4 ~ 2 4 個の間の炭素原子を有するアルコールを含む、項目 1 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 8)

4 ~ 2 4 個の間の炭素原子を有する前記アルコールが、ブタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール (n a n a n o l)、デカノール、ドデカノール、テトラデカノールまたはヘキサデカノールから選択される、項目 2 7 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 2 9)

第一級アルコールを生産するための方法であって、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現される、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とを有する天然に存在しない微生物を、実質的に嫌気性の条件下で、前記第一級アルコールを生産するために十分な期間にわたって培養することを含み、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、方法。

(項目 3 0)

前記微生物が、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記微生物が、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記微生物が、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記 4 つの外因性核酸が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記 4 つの外因性核酸が、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記微生物が、アシル還元経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 6)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アルコールデヒドロゲナーゼを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 8)

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 9)

アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する前記酵素が、脂肪アルコール形成性アシル - C o A レダクターゼ (F A R) を含む、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、異種コード核酸をさらに含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記第一級アルコールが、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする前記外因性核酸を欠く微生物と比較して、少なくとも 1 0 % 多いレベルの量で生産される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記第一級アルコールが、4 ~ 2 4 個の間の炭素原子を有するアルコールを含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 4 3)

2 ~ 2 4 個の間の炭素原子を有する前記アルコールが、ブタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール (n a n a n o l)、デカノール、ドデカノール、テトラデカノールまたはヘキサデカノールから選択される、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記第一級アルコールを単離することをさらに含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 4 5)

1 つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物であって、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、酵素 (前記酵素は、前記遺伝子破壊が前記酵素の活性を低下させたときに、前記天然に存在しない微生物の増殖に長鎖アルコール (L C A) 生産を連動させるものである) をコードする遺伝子において生じ、それによって前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記天然に存在しない微生物に L C A の生産を付与するものである、天然に存在しない微生物。

(項目 4 6)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目 4 5 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 4 7)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記 1 つ以上の遺伝子の欠失を含む、項目 4 5 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 4 8)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、アセトアルデヒド - C o A デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする、項目 4 5 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 4 9)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、フマル酸レダクターゼ、フマラーゼ、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、項目 4 8 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5 0)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、N A D (P) トランスヒドロゲナーゼ、および A T P シンターゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、項目 4 9 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5 1)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、表 I における設計 I ~ X X I によってもたらされる、項目 4 5 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5 2)

L C A を生産するための方法であって、1 つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物を培養することを含み、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、酵素（前記酵素は、前記遺伝子破壊が前記酵素の活性を低下させたときに、前記微生物の増殖に L C A 生産を連動させるものである）をコードする遺伝子において生じ、それによって、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が前記微生物に L C A の生産を付与するものである、方法。

(項目 5 3)

前記培養が、実質的に嫌気性の培養基において行われる、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記 1 つ以上の遺伝子の欠失を含む、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、アセトアルデヒド - C o A デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、フマル酸レダクターゼ、フマラーゼ、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、N A D (P) トランスヒドロゲナーゼ、および A T P シンターゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、表 I における設計 I ~ X X I によってもたらされる、項目 5 2 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5 9)

1 つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない真核生物であって、前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼおよびミトコンドリ

アエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする遺伝子において生じ、前記1つ以上の遺伝子破壊が、前記生物のサイトゾルにおける長鎖アルコールの生産を付与する、天然に存在しない真核生物。

(項目60)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目59に記載の生物。

(項目61)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目59に記載の生物。

(項目62)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、YLR044C、YLR134W、YGR087C、PDC3、YNL071W、YER178W、YBR221C、YGR193C、YFL018C、YBR145W、YGL256W、YOL086C、YMR303、YMR083W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL168Wからなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目59に記載の生物。

(項目63)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目59に記載の生物。

(項目64)

株が、微好気性培養基中に存在する、項目59に記載の生物。

(項目65)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、前記1つ以上の遺伝子の欠失を含む、項目59に記載の生物。

(項目66)

サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部NADHデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部NADHデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする1つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、項目59に記載の生物。

(項目67)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、YOL126C、YDL022W、YOL059W、YIL155C、YMR145C、YDL085W、およびYML120Cからなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目66に記載の生物。

(項目68)

アセチル-CoAシンセターゼ(AMP形成性)、ADP依存性酢酸-CoAリガーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸:NADPオキシドレダクターゼ、およびピルビン酸ギ酸リアーゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をサイトゾル内にさらに含む、項目59に記載の生物。

(項目69)

サイトゾルトランスヒドロゲナーゼまたはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をさらに含む、項目68に記載の生物。

(項目70)

1つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない真核生物であって、前記1つ以上の遺伝子破壊が、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、サイトゾルアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリアアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする遺伝子において生じ、前記1つ以上の遺伝子破壊が、前記生物のミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産をもたらすものである、天然に存在しない真核生物。

(項目71)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目70に記載の生物。

(項目72)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目70に記載の生物。

(項目73)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、*Y L R 0 4 4 C*、*Y L R 1 3 4 W*、*Y G R 0 8 7 C*、*P D C 3*、*Y B R 1 4 5 W*、*Y G L 2 5 6 W*、*Y O L 0 8 6 C*、*Y M R 3 0 3*、*Y M R 0 8 3 W*、*Y P L 0 8 8 W*、*Y A L 0 6 1 W*、*Y M R 3 1 8 C*、*Y C R 1 0 5 W*、および *Y D L 1 6 8 W* からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 7 0 に記載の生物。

(項目 7 4)

リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部 *N A D H* デヒドロゲナーゼおよび内部 *N A D H* デヒドロゲナーゼによって触媒されるグリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトルからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、項目 7 0 に記載の生物。

(項目 7 5)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、*Y O L 1 2 6 C*、*Y D L 0 2 2 W*、*Y O L 0 5 9 W*、*Y I L 1 5 5 C*、*Y M R 1 4 5 C*、*Y D L 0 8 5 W*、および *Y M L 1 2 0 C* からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 7 4 に記載の生物。

(項目 7 6)

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸：*N A D P* オキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸 *C o A* リガーゼ、および *A M P* 形成性アセチル *C o A* シンセターゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 7 0 に記載の生物。

(項目 7 7)

サイトゾルからミトコンドリアへの *N A D H* の輸送のための増強された *N A D H* 輸送シャトルシステムをさらに含む、項目 7 6 に記載の生物。

(項目 7 8)

トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、およびピルビン酸オキシダーゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 7 6 に記載の生物。

(項目 7 9)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目 7 0 に記載の生物。

(項目 8 0)

株が、微好気性培養基中に存在する、項目 7 0 に記載の生物。

(項目 8 1)

酵母または真菌である、項目 5 9 または 7 0 のいずれか一項に記載の生物。

(項目 8 2)

前記酵母が、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* および *S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e* を含む *S a c c h a r o m y c e s* 種、*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s* および *K l u y v e r o m y c e s m a r x i a n u s* を含む *K l u y v e r o m y c e s* 種、ならびに *P i c h i a p a s t o r i s* を含む *P i c h i a* 種からなる群より選択される、項目 8 1 に記載の生物。

(項目 8 3)

前記酵母が、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* である、項目 8 2 に記載の生物。

(項目 8 4)

前記真菌が、*A s p e r g i l l u s t e r r e u s* および *A s p e r g i l l u s n i g e r* を含む *A s p e r g i l l u s* 種、ならびに *R h i z o p u s a r r h i z u s* および *R h i z o p u s o r y z a e* を含む *R h i z o p u s* 種からなる群より選択される、項目 8 1 に記載の生物。

(項目 8 5)

項目 5 9 に記載の天然に存在しない真核生物を培養することを含む、長鎖アルコールの生産方法。

(項目 8 6)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、Y L R 0 4 4 C、Y L R 1 3 4 W、Y G R 0 8 7 C、P D C 3、Y N L 0 7 1 W、Y E R 1 7 8 W、Y B R 2 2 1 C、Y G R 1 9 3 C、Y F L 0 1 8 C、Y B R 1 4 5 W、Y G L 2 5 6 W、Y Q L 0 8 6 C、Y M R 3 0 3、Y M R 0 8 3 W、Y P L 0 8 8 W、Y A L 0 6 1 W、Y M R 3 1 8 C、Y C R 1 0 5 W、および Y D L 1 6 8 W からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 9)

株が、実質的に嫌気性の培地において培養される、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 0)

株が、微好気性培地において培養される、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、前記 1 つ以上の遺伝子の欠失を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 2)

サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部 N A D H デヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部 N A D H デヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、請求項 8 5 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、Y O L 1 2 6 C、Y D L 0 2 2 W、Y O L 0 5 9 W、Y I L 1 5 5 C、Y M R 1 4 5 C、Y D L 0 8 5 W、および Y M L 1 2 0 C からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

アセチル - C o A シンセターゼ (A M P 形成性)、A D P 依存性酢酸 - C o A リガーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸 : N A D P オキシドレダクターゼ、およびピルビン酸ギ酸リアーゼからなる群より選択される酵素 ; またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をサイトゾル内にさらに含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 5)

サイトゾルトランスヒドロゲナーゼまたはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をさらに含む、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

項目 7 0 に記載の天然に存在しない真核生物を培養することを含む、長鎖アルコールの生産方法。

(項目 9 7)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目 9 6 に記載の生物。

(項目 9 8)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目 9 6 に記載の生物。

(項目 9 9)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、Y L R 0 4 4 C、Y L R 1 3 4 W、Y G R 0 8 7 C、P D C 3、Y B R 1 4 5 W、Y G L 2 5 6 W、Y O L 0 8 6 C、Y M R 3 0 3、Y M R 0 8 3 W、Y P L 0 8 8 W、Y A L 0 6 1 W、Y M R 3 1 8 C、Y C R 1 0 5 W、および Y D L 1 6 8 W からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部 N A D H デヒドロゲナーゼおよび内部 N A D H デヒドロゲナーゼによって触媒されるグリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトルからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、項

目 9 6 に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、Y O L 1 2 6 C、Y D L 0 2 2 W、Y O L 0 5 9 W、Y I L 1 5 5 C、Y M R 1 4 5 C、Y D L 0 8 5 W、および Y M L 1 2 0 C からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸：N A D P オキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸 C o A リガーゼ、および A M P 形成性アセチル C o A シンターゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

サイトゾルからミトコンドリアへの N A D H の輸送のための強化された N A D H 輸送シャトルシステムをさらに含む、項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、およびピルビン酸オキシダーゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記生物が、酵母または真菌である、項目 8 5 または 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記酵母が、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e および S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e を含む S a c c h a r o m y c e s 種、K l u y v e r o m y c e s l a c t i s および K l u y v e r o m y c e s m a r x i a n u s を含む K l u y v e r o m y c e s 種、ならびに P i c h i a p a s t o r i s を含む P i c h i a 種からなる群より選択される、項目 1 0 5 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記酵母が、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e である、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記真菌が、A s p e r g i l l u s t e r r e u s および A s p e r g i l l u s n i g e r を含む A s p e r g i l l u s 種、ならびに R h i z o p u s a r r h i z u s および R h i z o p u s o r y z a e を含む R h i z o p u s 種からなる群より選択される、項目 1 0 5 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

株が、実質的に嫌気性の培地において培養される、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 1 1 0)

株が、微好気性培地において培養される、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

脂肪アシル - C o A を生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含むマロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路を有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

(項目 1 1 2)

脂肪酸エステルまたはワックスを生成するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とワックスエステルシンターゼとを有する微生物

を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

(項目 1 1 3)

脂肪酸エステルまたはワックスを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアルコールアセチルトランスフェラーゼとを有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。