

【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_oA非依存性FAS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_oA非依存性脂肪酸合成(FAS)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_oA非依存性FAS経路が、ケトアシル-C_oAアシルトランスフェラーゼまたはケトアシル-C_oAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C_oAデヒドロゲナーゼ、エノイル-C_oAヒドラターゼおよびエノイル-C_oAレダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル-C_oA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_oA非依存性FAS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_oA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～XXXI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 (AMP 形成性)、ADP 依存性酢酸 - C o A リガーゼ、アシル化アセトアルデヒドヒドロゲナーゼ、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、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 NADH デヒドロゲナーゼおよび内部 NADH 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 : NADP 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ヒドロゲナーゼ、酢酸 C o A リガーゼ、および AMP 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 NADH の輸送のための増強された NADH 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、*Saccharomyces cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* を含む *Saccharomyces* 種、*Kluyveromyces lactis* および *Kluyveromyces marxianus* を含む *Kluyveromyces* 種、ならびに *Pichia pastoris* を含む *Pichia* 種からなる群より選択され、そして前記真菌は *Aspergillus terreus* および *Aspergillus niger* を含む *Aspergillus* 種、ならびに *Rhizopus arrhizus* および *Rhizopus oryzae* を含む *Rhizopus* 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 FAS 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 (FAS) 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 FAS 経路が、ケトイアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトイアシル - 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 2 6】

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】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

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_oA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10)

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_oA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11)

アシル-C_oA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_oAレダクターゼ(FAR)を含む、項目10に記載の天然に存在しない微生物。

(項目12)

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13)

前記第一級アルコールが、マロニル-C_oA非依存性FAS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14)

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15)

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16)

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17)

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_oA非依存性脂肪酸合成(FAS)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_oA非依存性FAS経路が、ケトアシル-C_oAアシルトランスフェラーゼまたはケトアシル-C_oAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C_oAデヒドロゲナーゼ、エノイル-C_oAヒドラターゼおよびエノイル-C_oA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_oA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18)

前記マロニル-C_oA非依存性FAS経路をコードする前記外因性核酸が、ケトアシル-C_oAアシルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C_oAデヒドロゲナーゼ、エノイル-C_oAヒドラターゼおよびエノイル-C_oA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19)

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

デヒドロゲナーゼおよびエノイル - C o A レダクターを含む、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 (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 10 % 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 レダクターを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクター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32)

前記微生物が、マロニル-C_oA非依存性FAS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29に記載の方法。

(項目33)

前記4つの外因性核酸が、ケトアシル-C_oAアシルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C_oAデヒドロゲナーゼ、エノイル-C_oAヒドラターゼおよびエノイル-C_oAレダクターゼをコードする、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記4つの外因性核酸が、ケトアシル-C_oAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-C_oAデヒドロゲナーゼ、エノイル-C_oAヒドラターゼおよびエノイル-C_oAレダクターゼをコードする、項目32に記載の方法。

(項目35)

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29に記載の方法。

(項目36)

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_oAレダクターゼを含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

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35に記載の方法。

(項目38)

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_oA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35に記載の方法。

(項目39)

アシル-C_oA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_oAレダクターゼ(FAR)を含む、項目38に記載の方法。

(項目40)

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29に記載の方法。

(項目41)

前記第一級アルコールが、マロニル-C_oA非依存性FAS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、項目29に記載の方法。

(項目42)

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29に記載の方法。

(項目43)

2~24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(nananol)、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42に記載の方法。

(項目44)

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29に記載の方法。

(項目45)

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。

(項目46)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目45に記載の天然に存在しない微生物。

(項目47)

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45に記載の天然に存在しない微生物。

(項目48)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、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、項目45に記載の天然に存在しない微生物。

(項目49)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、ピルビン酸ギ酸リーゼ、ホスホトランスマセチラーゼ、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48に記載の天然に存在しない微生物。

(項目50)

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、項目49に記載の天然に存在しない微生物。

(項目51)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、表Iにおける設計I～XXIによってもたらされる、項目45に記載の天然に存在しない微生物。

(項目52)

LCA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微生物にLCAの生産を付与するものである、方法。

(項目53)

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52に記載の方法。

(項目54)

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52に記載の方法。

(項目55)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、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、項目54に記載の方法。

(項目56)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、ピルビン酸ギ酸リーゼ、ホスホトランスマセチラーゼ、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55に記載の方法。

(項目57)

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、項目56に記載の方法。

(項目58)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、表Iにおける設計I～XXIによってもたらされる、項目52に記載の天然に存在しない微生物。

(項目59)

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、PD
C3、YNL071W、YER178W、YBR221C、YGR193C、YFL01
8C、YBR145W、YGL256W、YOL086C、YMR303、YMR083
W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL
168W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、YLR044C、YLR134W、YGR087C、PD
C3、YBR145W、YGL256W、YOL086C、YMR303、YMR083
W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL
168W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 70 に記載の生物。

(項目 74)

リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部 NADH デヒドロゲナーゼおよび内部 NADH 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 70 に記
載の生物。

(項目 75)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、YOL126C、YDL022W、YOL059W、YI
L155C、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 74 に記載の生物。

(項目 76)

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、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 CoA リガーゼ、およ
びAMP 形成性アセチル CoA 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 70 に記
載の生物。

(項目 77)

サイトゾルからミトコンドリアへの NADH の輸送のための増強された NADH 輸送シャ
トルシステムをさらに含む、項目 76 に記載の生物。

(項目 78)

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 76 に記載の生物。

(項目 79)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目 70 に記載の生物。

(項目 80)

株が、微好気性培養基中に存在する、項目 70 に記載の生物。

(項目 81)

酵母または真菌である、項目 59 または 70 のいずれか一項に記載の生物。

(項目 82)

前記酵母が、*Saccharomyces cerevisiae* および *Schizos
accharomyces pombe* を含む *Saccharomyces* 種、*Kluy
veromyces lactis* および *Kluyveromyces marxi
anus* を含む *Kluyveromyces* 種、ならびに *Pichia pastoris* を
含む *Pichia* 種からなる群より選択される、項目 81 に記載の生物。

(項目 83)

前記酵母が、*Saccharomyces cerevisiae* である、項目 82 に記
載の生物。

(項目 84)

前記真菌が、*Aspergillus terreus* および *Aspergillus
niger* を含む *Aspergillus* 種、ならびに *Rhizopus arrhiz
us* および *Rhizopus oryzae* を含む *Rhizopus* 種からなる群より選
択される、項目 81 に記載の生物。

(項目 85)

項目 59 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 86)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目85に記載の方法。

(項目87)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目85に記載の方法。

(項目88)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、YLR044C、YLR134W、YGR087C、PD
C3、YNL071W、YER178W、YBR221C、YGR193C、YFL01
8C、YBR145W、YGL256W、YQL086C、YMR303、YMR083
W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL
168W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85に記載の方法。

(項目89)

株が、実質的に嫌気性の培地において培養される、項目85に記載の方法。

(項目90)

株が、微好気性培地において培養される、項目85に記載の方法。

(項目91)

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85に記載の方法。

(項目92)

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85に記載の方法。

(項目93)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、YOL126C、YDL022W、YOL059W、YI
L155C、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92に記載の方法。

(項目94)

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、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85に記載の方法。

(項目95)

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94に記載の方法。

(項目96)

項目70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97)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目96に記載の生物。

(項目98)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目96に記載の生物。

(項目99)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、YLR044C、YLR134W、YGR087C、PD
C3、YBR145W、YGL256W、YOL086C、YMR303、YMR083
W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL
168W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96に記載の方法。

(項目100)

サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部NADHデヒドロゲナーゼおよび内部NAD
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、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 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：NADP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CoAリガーゼ、およびAMP形成性アセチルCoA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 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NADHの輸送のための強化されたNADH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、*Saccharomyces cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* を含む *Saccharomyces* 種、*Kluyveromyces lactis* および *Kluyveromyces marxianus* を含む *Kluyveromyces* 種、ならびに *Pichia pastoris* を含む *Pichia* 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、*Saccharomyces cerevisiae* である、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記真菌が、*Aspergillus terreus* および *Aspergillus niger* を含む *Aspergillus* 種、ならびに *Rhizopus arrhizus* および *Rhizopus oryzae* を含む *Rhizopus* 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-CoAを生産するために十分な量で発現されるマロニル-CoA非依存性FAS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-CoA非依存性脂肪酸合成(FAS)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-CoA非依存性FAS経路が、ケトアシル-CoAアシルトランスフェラーゼまたはケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、エノイル-CoAヒドラターゼおよびエノイル-CoA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-CoA非依存性FAS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-CoA非依存性脂肪酸合成(FAS)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113)

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。