

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7705243号  
(P7705243)

(45)発行日 令和7年7月9日(2025.7.9)

(24)登録日 令和7年7月1日(2025.7.1)

|                        |                               |          |                       |         |
|------------------------|-------------------------------|----------|-----------------------|---------|
| (51)国際特許分類             |                               | F I      |                       |         |
| C 1 2 N                | 9/16 (2006.01)                | C 1 2 N  | 9/16                  | Z Z N A |
| C 1 2 N                | 1/15 (2006.01)                | C 1 2 N  | 1/15                  |         |
| C 1 2 N                | 1/19 (2006.01)                | C 1 2 N  | 1/19                  |         |
| C 1 2 N                | 1/21 (2006.01)                | C 1 2 N  | 1/21                  |         |
| C 1 2 N                | 5/10 (2006.01)                | C 1 2 N  | 5/10                  |         |
| 請求項の数 13 (全96頁) 最終頁に続く |                               |          |                       |         |
| (21)出願番号               | 特願2020-502555(P2020-502555)   | (73)特許権者 | 510199890             |         |
| (86)(22)出願日            | 平成30年4月3日(2018.4.3)           |          | ジェノマティカ, インコーポレイテッド   |         |
| (65)公表番号               | 特表2020-515293(P2020-515293 A) |          | アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 |         |
| (43)公表日                | 令和2年5月28日(2020.5.28)          |          | 2 1, サン ディエゴ, ネクサス セン |         |
| (86)国際出願番号             | PCT/US2018/025970             | (74)代理人  | 100102978             |         |
| (87)国際公開番号             | WO2018/187389                 |          | 弁理士 清水 初志             |         |
| (87)国際公開日              | 平成30年10月11日(2018.10.11)       | (74)代理人  | 100160923             |         |
| 審査請求日                  | 令和3年3月8日(2021.3.8)            |          | 弁理士 山口 裕孝             |         |
| 審判番号                   | 不服2022-20216(P2022-20216/J 1) | (74)代理人  | 100119507             |         |
| 審判請求日                  | 令和4年12月13日(2022.12.13)        |          | 弁理士 刑部 俊              |         |
| (31)優先権主張番号            | 62/481,078                    | (74)代理人  | 100142929             |         |
| (32)優先日                | 平成29年4月3日(2017.4.3)           |          | 弁理士 井上 隆一             |         |
| (33)優先権主張国・地域又は機関      |                               | (74)代理人  | 100148699             |         |
|                        | 最終頁に続く                        |          | 弁理士 佐藤 利光             |         |
|                        |                               |          | 最終頁に続く                |         |

(54)【発明の名称】 中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有するチオエステラーゼ変種

(57)【特許請求の範囲】  
【請求項1】

SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、操作チオエステラーゼ変種であって、

該操作チオエステラーゼ変種が、P3K, D4M, S6R, T14G, T14R, V15L, V15W, V17A, V17C, P22R, D37P, T44G, V45S, V50W, S54R, S56C, S56K, T64P, T64R, T67L, L73V, L91M, C102I, V110L, I129V, G137C, R158Q, L176V, Y178P, P186G, D196V, D198W, K203R, Q213R, T217R, V225L, Q227G, G236T, T244M, T244R, S254G, A256C, E258T, E258V, S278K, V282S, L292F, A297T, A297V, I298C, I298V, V299L, N300L, N300W, A302T, I316R, T321R, および S322Kからなる群から選択される置換変異を有するか、または該操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, S

SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 または SEQ ID NO:59 のアミノ酸配列を有し、

該操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1を有する酵素と比較して、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された触媒活性、選択性および/または溶解性を有する、操作チオエステラーゼ変種。

【請求項 2】

C8脂肪酸誘導体またはC10脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、請求項1記載の操作チオエステラーゼ変種。

【請求項 3】

(i) SEQ ID NO:1を有するチオエステラーゼと比較して、全体として増加した実効正電荷を有する、あるいは

(ii) SEQ ID NO:4を有する変種チオエステラーゼと比較して、全体として増加した実効正電荷を有する、あるいは

(iii) SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、またはSEQ ID NO:46のアミノ酸配列を有する、あるいは

(iv) SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する、あるいは

(v) SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、またはSEQ ID NO:51のアミノ酸配列を有する、あるいは

(vi) 改良された溶解性を有する、あるいは

(vii) SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する、あるいは

(viii) SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する、あるいは

(ix) SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、またはSEQ ID NO:59のアミノ酸配列を有する、あるいは

(x) 操作チオエステラーゼ変種が、C10脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、

請求項1記載の操作チオエステラーゼ変種。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか一項記載の操作チオエステラーゼ変種を含む組換え微生物細胞。

【請求項 5】

第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する生化学経路をコードする1つまたは複数の異種遺伝子をさらに含む、請求項4記載の組換え微生物細胞であって、

第2の脂肪酸誘導体が、第1の脂肪酸誘導体よりも高い最小阻止濃度(MIC)を有し、

第2の脂肪酸誘導体の存在が、第1の脂肪酸誘導体のMICを増加させ、かつ、

(i) 該第1の脂肪酸誘導体が、脂肪酸であり、該第2の脂肪酸誘導体が、脂肪酸アルキルエステル、脂肪酸メチルエステル、または脂肪酸エチルエステルであり、前記生化学経路が、エステルシンターゼを含むか、もしくはエステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンターゼを含むか、または、

(ii) 該第1の脂肪酸誘導体が、脂肪アルコールであり、該第2の脂肪酸誘導体が、脂肪アルコール酢酸エステルであり、前記生化学経路が、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含むか、もしくはカルボン酸レダクターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含む、

請求項4記載の組換え微生物細胞。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

- a. カルボン酸レダクターゼ、
- b. カルボン酸レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ、
- c. カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、
- d. カルボン酸レダクターゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、
- e. エステルシンターゼ、
- f. エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンセターゼ、
- g. アシル-CoAレダクターゼ、
- h. アシル-CoAレダクターゼおよびアシル-CoAシンセターゼ、
- i. アシル-CoAレダクターゼおよびアルコールO-アセチルトランスフェラーゼ、 10
- j. アシル-CoAレダクターゼ、アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ、およびアシル-CoAシンセターゼ、
- k. O-メチルトランスフェラーゼ、
- l. アシル-ACPレダクターゼ、
- m. アシル-ACPレダクターゼおよびアルデヒドデカルボニラーゼ、
- n. アシル-ACPレダクターゼおよびアルデヒド酸化的デホルミラーゼ、
- o. アシル-ACPレダクターゼおよびアルコールO-アセチルトランスフェラーゼ、
- p. アシル-ACPレダクターゼ、アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、
- q. OleAタンパク質、 20
- r. OleA、OleC、およびOleDタンパク質、
- s. OleAタンパク質および脂肪酸アシル-CoAシンセターゼ、または
- t. OleA、OleC、およびOleDタンパク質ならびに脂肪酸アシル-CoAシンセターゼをさらに含む、請求項4記載の組換え微生物細胞。

#### 【請求項7】

中鎖脂肪酸誘導体を商業的力価で生産するための方法であって、請求項5または6記載の組換え微生物細胞を炭素源の存在下で中鎖脂肪酸誘導体の生産に適した条件で培養する工程を含む、方法。

#### 【請求項8】

前記組換え微生物細胞が、エシェリキア属 (*Escherichia*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、ザイモナス属 (*Zymomonas*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、フミコラ属 (*Humicola*)、リゾムコール属 (*Rhizomucor*)、クルイペロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフトラ属 (*Myceliophthora*)、マリノバクター属 (*Marinobacter*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ファネロカエテ属 (*Phanerochaete*)、ヒラタケ属 (*Pleurotus*)、ハウロクタケ属 (*Trametes*)、クリソスポリウム属 (*Chrysosporium*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、ステノトロホモナス属 (*Stenotrophomonas*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、またはストレプトミセス属 (*Streptomyces*) を含む属由来である、請求項7記載の方法。 30 40

#### 【請求項9】

前記組換え微生物細胞が、シネココッカス (*Synechococcus*)、またはシネコシステイス (*Synechocystis*) を含む属由来である、請求項7記載の方法。

#### 【請求項10】

中鎖脂肪酸誘導体を培養培地から回収する段階、または中鎖脂肪酸誘導体を組換え微生物細胞から単離する工程をさらに含む、請求項7記載の方法。

#### 【請求項11】

前記生化学経路が、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンセターゼを含み、前記組換え微生物細胞が、中鎖脂肪酸エステルを生産する、請求項7記載の方法。 50

## 【請求項 12】

前記中鎖脂肪酸エステルが、中鎖脂肪酸メチルエステルおよび／または中鎖脂肪酸エチルエステルである、請求項11記載の方法。

## 【請求項 13】

操作チオエステラーゼ変種であって、該操作チオエステラーゼ変種が、T44I、I111T、Q114K、R132W、A162E、M165T、V185A、S197N、Q213H、S278T、A297D、N300K、およびG301Cからなる群から選択される置換変異を有し、該操作チオエステラーゼ変種が前記置換変異以外はSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有し、かつ、  
該操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1を有する酵素と比較して、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された触媒活性、選択性および／または溶解性を有する、操作チオ  
エステラーゼ変種。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2017年4月3日に提出された米国仮特許出願USSN 62/481,078の恩典を主張する。

## 【0002】

## 分野

本開示は、中鎖長脂肪酸および脂肪酸誘導体の生産に有用な分子ツールに関する。したがって、本開示は、微生物に、中鎖長脂肪酸および脂肪酸誘導体に対する耐性を付与する遺伝子に関する。本開示は、さらに、例えば、8炭素および10炭素の脂肪酸および脂肪酸誘導体を含む、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性および／または選択性を有する新規な操作チオエステラーゼ変種ならびにそれをコードするポリヌクレオチドに関する。したがって、本開示は、操作チオエステラーゼ変種およびそれをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞、ならびに関係する細胞培養物にも関する。さらに、操作チオエステラーゼ変種および生物学的に生産された中鎖脂肪酸誘導体の組成物を発現している宿主細胞を採用することにより中鎖脂肪酸誘導体を生産する方法が、包含される。

20

## 【背景技術】

## 【0003】

## 背景

中鎖脂肪酸(MCFA)由来産物を生産することに大きな関心がもたれている。中鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸誘導体は、工業に、例えば、バイオ燃料、潤滑剤およびグリース、金属加工液、コーティング剤および接着剤、化粧品およびパーソナルケア製品、香料、食品栄養学、医薬品、プラスチックおよびゴムならびに化学工業のための他の供給原料として、数多く応用されている。

## 【0004】

工業におけるそれらの価値に加えて、中鎖脂肪酸は、栄養補助食品および栄養補給食品として価値のある用途に供されている(例えば、Stig Bengmark (2013) *Nutrients* 5(1): 162-207 (非特許文献1) 参照)。実際に、中鎖脂肪酸およびその誘導体は、抗菌性を示し(例えば、Nobmann et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;128(3):440-445 (非特許文献2); B W Petschow, et al., (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(2):302-306 (非特許文献3) 参照)、体脂肪の蓄積を抑制し、メタボリックシンドロームを予防し(例えば、Takeuchi H., et al. (2008) *Asia Pac J Clin Nutr.* 17 Suppl 1:320-3 (非特許文献4); Koji Nagao (2010) *Pharmacologic al Research* 61:208-212 (非特許文献5)). Omura Y., et al. (2011) *Acupunct Ele ctrother Res.* 36(1-2):19-64 (非特許文献6) 参照)、臨床的に意味のある濃度で抗けいれん効果を有する(例えば、Chang et al., (2013) *Neuropharmacology* 2013; 69: 105-14 (非特許文献7); Wlaz et al., (2015) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 57: 110-16 (非特許文献8) 参照)。

40

50

## 【 0 0 0 5 】

数多くの有用な用途を考えると、中鎖脂肪酸の需要が過去数年にわたり上昇傾向であったのは、驚くにはあたらない。残念ながら、中鎖脂肪酸の供給は、植物（パーム油）または化学合成からの、より長鎖の遊離脂肪酸（FFA）産物の生産と常に結び付いており、中鎖長の鎖は、総脂肪酸アシル種の20%未満に相当するショルダーとして生産される（例えば、Kostik, V. et al. (2013) J. Hyg. Eng. Des. 4:112-116（非特許文献9）を参照されたい）。これは、中鎖脂肪酸の供給を非常に変化しやすく、不安定にする。したがって、信頼でき、安定で、継続できるこれらの化合物の供給をもたらすことができる方法が当技術分野において必要である。

## 【 0 0 0 6 】

現在の中鎖脂肪酸の供給源の代替は、微生物発酵などの生物系を使用するそれらの生産である。しかし、生物系による遊離脂肪酸の生産は、2つの大きな難題を示す。第1に、これは、宿主生物により生産されるアルキルチオエステル分子に作用するチオエステラーゼに依存することが多い。中鎖アルキルチオエステルに活性な、利用可能なチオエステラーゼは、最適以下の触媒活性を有するか、またはその特異性が広すぎて一連のアルキルチオエステル鎖長に作用するかのいずれかである。第2の中鎖脂肪酸族化合物は、微生物細胞に高度に毒性であることが多く、その生産を高レベルで妨げる。追加的に、中鎖アシル化合物の毒性は、高活性チオエステラーゼの選択および操作を不利にする可能性がある。したがって、生物系が中鎖脂肪酸を代替供給するためには、中鎖アルキルチオエステラーゼに対してより高い活性および選択性である改良されたチオエステラーゼを有する生物系であって、中鎖脂肪酸族化合物に対する改良された耐性を示す生物系が必要である。

## 【 0 0 0 7 】

幸いにも、以下の開示から明らかなように、本発明は、これらおよび他の必要性に応えるものである。

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 文献 】 Stig Bengmark (2013) Nutrients 5(1): 162-207

【 文献 】 Nobmann et al. International Journal of Food Microbiology. 2009;128 (3):440-445

【 文献 】 B W Petschow, et al., (1996) Antimicrob. Agents Chemother. 40(2):302-306

【 文献 】 Takeuchi H., et al. (2008) Asia Pac J Clin Nutr. 17 Suppl 1:320-3

【 文献 】 Koji Nagao (2010) Pharmacological Research 61:208-212

【 文献 】 Omura Y., et al. (2011) Acupunct Electrother Res. 36(1-2):19-64

【 文献 】 Chang et al., (2013) Neuropharmacology 2013; 69: 105-14

【 文献 】 Wlaz et al., (2015) Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2015; 57: 110-16

【 文献 】 Kostik, V. et al. (2013) J. Hyg. Eng. Des. 4:112-116

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 9 】

## 概要

本開示の一局面は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作チオエステラーゼ変種を提供する。したがって、一態様では、本開示は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作チオエステラーゼ変種を提供する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種が、C8脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、請求項1記載の操作チオエステラーゼ変種。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185、186、196、197、198、

10

20

30

40

50

203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する。操作チオエステラーゼの一態様では、少なくとも1つの置換変異は、(a)アミノ酸位置3のリジン；(b)アミノ酸位置4のメチオニン；(c)アミノ酸位置6のアルギニン；(d)アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e)アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f)アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g)アミノ酸位置22のアルギニン；(h)アミノ酸位置37のプロリン；(i)アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j)位置45のセリン；(k)アミノ酸位置50のトリプトファン；(l)アミノ酸位置54のアルギニン；(m)アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n)アミノ酸位置64のアルギニンまたはプロリン；(o)アミノ酸位置67のロイシン；(p)位置73のバリン；(q)アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r)アミノ酸位置91のメチオニン；(s)アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t)アミノ酸位置102のイソロイシン；(u)アミノ酸位置110のロイシン；(v)位置111のトレオニン；(w)位置114のリジン；(x)アミノ酸位置129のバリン；(y)アミノ酸位置132のトリプトファン；(z)アミノ酸位置137のシステイン；(aa)アミノ酸位置158のグルタミン；(bb)アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc)アミノ酸位置176のバリン；(dd)アミノ酸位置178のプロリン；(ee)アミノ酸位置185のアラニン；(ff)アミノ酸位置186のグリシン；(gg)アミノ酸位置196のバリン；(hh)アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii)アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj)アミノ酸位置203のアルギニン；(kk)アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll)アミノ酸位置217のアルギニン；(mm)アミノ酸位置225のロイシン；(nn)アミノ酸位置227のグリシン；(oo)アミノ酸位置236のトレオニン；(pp)アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq)アミノ酸位置254のグリシン；(rr)アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss)アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt)アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu)アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv)アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww)アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx)アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy)アミノ酸位置299のロイシン；(zz)アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa)アミノ酸位置301のシステイン；(bbb)アミノ酸位置302のトレオニン；(ccc)アミノ酸位置316のアルギニン；(ddd)アミノ酸位置321のアルギニン；および(eee)アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである。

#### 【0010】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59より選択されるメンバーである。

#### 【0011】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1を有するチオエステラーゼと比較して、全体として増加した実効正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、変種SEQ ID NO:4を有するチオエステラーゼと比較して、全体として増加した実

10

20

30

40

50

効正電荷を有する。

【0012】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、およびSEQ ID NO:46より選択される。

【0013】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである。

【0014】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、改良された溶解性を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する。

【0015】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである。

【0016】

一態様では、変種チオエステラーゼは、C10脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する。一態様では、変種チオエステラーゼは、C8脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する。

【0017】

一局面では、本開示は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する生化学経路をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む組換え宿主細胞であって、第2の脂肪酸誘導体が、第1の脂肪酸誘導体よりも高い最小阻止濃度（MIC）を有し、第2の脂肪酸誘導体の存在が、第1の脂肪酸誘導体のMICを増加させる、組換え宿主細胞を提供する。

【0018】

一態様では、生化学経路は、カルボン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、カルボン酸レダクターゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、エステルシンターゼ、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシルCoAシンセターゼ、アシルCoAレダクターゼ、アシルCoAレダクターゼおよびアシルCoAシンセターゼ、アシルCoAレダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、アシルCoAレダクターゼ、アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、およびアシルCoAシンセターゼ、O-メチルトランスフェラーゼ、アシルACPLレダクターゼ、アシルACPLレダクターゼおよびアルデヒドデカルボニラーゼ、アシルACPLレダクターゼおよびアルデヒド酸化的デホルミラーゼ、アシルACPLレダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、アシルACPLレダクターゼ、アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、OleAタンパク質、OleA、OleC、およびOleDタンパク質、OleAタンパク質および脂肪酸アシルCoAシンセターゼ、またはOleA、OleC、およびOleDタンパク質ならびに脂肪酸アシルCoAシンセターゼのうちの1つを含む。

【0019】

ある態様では、第1の脂肪酸誘導体は、脂肪酸であり、第2の脂肪酸誘導体は、脂肪酸アルキルエステルであり、生化学経路は、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシン

10

20

30

40

50

セターゼを含む。

【0020】

一態様では、脂肪酸アルキルエステルは、脂肪酸メチルエステルまたは脂肪酸エチルエステルである。

【0021】

一態様では、第1の脂肪酸誘導体は、脂肪アルコールであり、第2の脂肪酸誘導体は、脂肪アルコール酢酸エステルであり、生化学経路は、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含む。

【0022】

一態様では、第1の脂肪酸誘導体および第2の脂肪酸誘導体は、中鎖脂肪酸誘導体である。

10

【0023】

一態様では、組換え宿主細胞は、操作チオエステラーゼ変種をさらに含む。

【0024】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185、186、196、197、198、203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する変種チオエステラーゼからなる群より選択されるメンバーである。

20

【0025】

一態様では、少なくとも1つの置換変異は、(a)アミノ酸位置3のリジン；(b)アミノ酸位置4のメチオニン；(c)アミノ酸位置6のアルギニン；(d)アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e)アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f)アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g)アミノ酸位置22のアルギニン；(h)アミノ酸位置37のプロリン；(i)アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j)位置45のセリン；(k)アミノ酸位置50のトリプトファン；(l)アミノ酸位置54のアルギニン；(m)アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n)アミノ酸位置64のアルギニンまたはプロリン；(o)アミノ酸位置67のロイシン；(p)位置73のバリン；(q)アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r)アミノ酸位置91のメチオニン；(s)アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t)アミノ酸位置102のイソロイシン；(u)アミノ酸位置110のロイシン；(v)位置111のトレオニン；(w)位置114のリジン；(x)アミノ酸位置129のバリン；(y)アミノ酸位置132のトリプトファン；(z)アミノ酸位置137のシステイン；(aa)アミノ酸位置158のグルタミン；(bb)アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc)アミノ酸位置176のバリン；(dd)アミノ酸位置178のプロリン；(ee)アミノ酸位置185のアラニン；(ff)アミノ酸位置186のグリシン；(gg)アミノ酸位置196のバリン；(hh)アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii)アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj)アミノ酸位置203のアルギニン；(kk)アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll)アミノ酸位置217のアルギニン；(mm)アミノ酸位置225のロイシン；(nn)アミノ酸位置227のグリシン；(oo)アミノ酸位置236のトレオニン；(pp)アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq)アミノ酸位置254のグリシン；(rr)アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss)アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt)アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu)アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv)アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww)アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx)アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy)アミノ酸位置299のロイシン；(zz)アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa)アミノ酸位置301のシステイン；(bbb)アミノ酸位置302のトレオニン

30

40

50

; (ccc) アミノ酸位置316のアルギニン; (ddd) アミノ酸位置321のアルギニン; および (eee) アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである。

【0026】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである。

10

【0027】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:4と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、およびSEQ ID NO:46からなる群より選択されるメンバーである。

20

【0028】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである。

30

【0029】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、改良された溶解性を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである。

40

【0030】

別の局面では、本開示は、操作チオエステラーゼ変種を含む組換え宿主細胞を炭素源の存在下で中鎖脂肪酸誘導体の生産に適した条件で培養することを含む、中鎖脂肪酸誘導体を商業的力価で生産するための方法であって、組換え宿主細胞が、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する生化学経路をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、第2の脂肪酸誘導体が、第1の脂肪酸誘導体よりも高い最小阻止濃度(MIC)を有し、第2の脂肪酸誘導体の存在が、第1の脂肪酸誘導体のMICを増加させる方法を提供する。

【0031】

一態様では、第1の脂肪酸誘導体は、中鎖脂肪酸であり、第2の脂肪酸誘導体は、中鎖脂肪酸アルキルエステルであり、生化学経路は、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンセターゼを含む。

50

## 【 0 0 3 2 】

一態様では、脂肪酸アルキルエステルは、中鎖脂肪酸メチルエステルまたは中鎖脂肪酸エチルエステルである。

## 【 0 0 3 3 】

一態様では、第1の脂肪酸誘導体は、中鎖脂肪アルコールであり、第2の脂肪酸誘導体は、中鎖脂肪アルコール酢酸エステルであり、生化学経路は、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含む。

## 【 0 0 3 4 】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185、186、196、197、198、203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する。一態様では、少なくとも1つの置換変異は、(a) アミノ酸位置3のリジン；(b) アミノ酸位置4のメチオニン；(c) アミノ酸位置6のアルギニン；(d) アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e) アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f) アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g) アミノ酸位置22のアルギニン；(h) アミノ酸位置37のプロリン；(i) アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j) 位置45のセリン；(k) アミノ酸位置50のトリプトファン；(l) アミノ酸位置54のアルギニン；(m) アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n) アミノ酸位置64のアルギニンまたはプロリン；(o) アミノ酸位置67のロイシン；(p) 位置73のバリン；(q) アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r) アミノ酸位置91のメチオニン；(s) アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t) アミノ酸位置102のイソロイシン；(u) アミノ酸位置110のロイシン；(v) 位置111のトレオニン；(w) 位置114のリジン；(x) アミノ酸位置129のバリン；(y) アミノ酸位置132のトリプトファン；(z) アミノ酸位置137のシステイン；(aa) アミノ酸位置158のグルタミン；(bb) アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc) アミノ酸位置176のバリン；(dd) アミノ酸位置178のプロリン；(ee) アミノ酸位置185のアラニン；(ff) アミノ酸位置186のグリシン；(gg) アミノ酸位置196のバリン；(hh) アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii) アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj) アミノ酸位置203のアルギニン；(kk) アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll) アミノ酸位置217のアルギニン；(mm) アミノ酸位置225のロイシン；(nn) アミノ酸位置227のグリシン；(oo) アミノ酸位置236のトレオニン；(pp) アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq) アミノ酸位置254のグリシン；(rr) アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss) アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt) アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu) アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv) アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww) アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx) アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy) アミノ酸位置299のロイシン；(zz) アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa) アミノ酸位置301のシステイン；(bbb) アミノ酸位置302のトレオニン；(ccc) アミノ酸位置316のアルギニン；(ddd) アミノ酸位置321のアルギニン；および(eee) アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである。

## 【 0 0 3 5 】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、S

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである。

【0036】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:1と比較して、増加した表面正電荷を有する。

10

【0037】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:4と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、およびSEQ ID NO:46からなる群より選択されるメンバーである。

20

【0038】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである。

【0039】

一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、改良された溶解性を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する。一態様では、操作チオエステラーゼ変種は、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである。

30

【0040】

別の局面では、本開示は、少なくとも3.6の、C8脂肪酸誘導体のC10脂肪酸誘導体に対する比(C8/C10)を有する中鎖脂肪酸誘導体の組成物を提供する。一態様では、C8脂肪酸誘導体のC10脂肪酸誘導体に対する比は、7.7である。

[本発明1001]

中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1002]

C8脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、本発明1001の操作チオエステラーゼ変種。

40

[本発明1003]

SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185、186、196、197、198、203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する、本発明1001の操作チオエステラーゼ変種。

50

[本発明1004]

少なくとも1つの置換変異が、(a) アミノ酸位置3のリジン；(b) アミノ酸位置4のメチオニン；(c) アミノ酸位置6のアルギニン；(d) アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e) アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f) アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g) アミノ酸位置22のアルギニン；(h) アミノ酸位置37のプロリン；(i) アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j) 位置45のセリン；(k) アミノ酸位置50のトリプトファン；(l) アミノ酸位置54のアルギニン；(m) アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n) アミノ酸位置64のアルギニンまたはプロリン；(o) アミノ酸位置67のロイシン；(p) 位置73のバリン；(q) アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r) アミノ酸位置91のメチオニン；(s) アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t) アミノ酸位置102のイソロイシン；(u) アミノ酸位置110のロイシン；(v) 位置111のトレオニン；(w) 位置114のリジン；(x) アミノ酸位置129のバリン；(y) アミノ酸位置132のトリプトファン；(z) アミノ酸位置137のシステイン；(aa) アミノ酸位置158のグルタミン；(bb) アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc) アミノ酸位置176のバリン；(dd) アミノ酸位置178のプロリン；(ee) アミノ酸位置185のアラニン；(ff) アミノ酸位置186のグリシン；(gg) アミノ酸位置196のバリン；(hh) アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii) アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj) アミノ酸位置203のアルギニン；(kk) アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll) アミノ酸位置217のアルギニン；(mm) アミノ酸位置225のロイシン；(nn) アミノ酸位置227のグリシン；(oo) アミノ酸位置236のトレオニン；(pp) アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq) アミノ酸位置254のグリシン；(rr) アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss) アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt) アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu) アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv) アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww) アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx) アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy) アミノ酸位置299のロイシン；(zz) アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa) アミノ酸位置301のシステイン；(bbb) アミノ酸位置302のトレオニン；(ccc) アミノ酸位置316のアルギニン；(ddd) アミノ酸位置321のアルギニン；および(eee) アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである、本発明1003の操作チオエステラーゼ変種。

10

20

30

[本発明1005]

変種チオエステラーゼが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1004の操作チオエステラーゼ変種。

40

[本発明1006]

SEQ ID NO:1を有するチオエステラーゼと比較して、全体として増加した実効正電荷を有する、本発明1005の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1007]

SEQ ID NO:4を有する変種チオエステラーゼと比較して、全体として増加した実効正電

50

荷を有する、本発明1006の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1008]

SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、およびSEQ ID NO:46からなる群より選択されるメンバーである、本発明1007の操作チオエステラーゼ変種。

10

[本発明1009]

SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1006の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1010]

SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである、本発明1009の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1011]

改良された溶解性を有する、本発明1005の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1012]

SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する、本発明1011の操作チオエステラーゼ変種。

20

[本発明1013]

SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する、本発明1012の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1014]

SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1016の操作チオエステラーゼ変種。

[本発明1015]

変種チオエステラーゼが、C10脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、本発明1001の変種チオエステラーゼ酵素。

30

[本発明1016]

第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する生化学経路をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含む組換え宿主細胞であって、

第2の脂肪酸誘導体が、第1の脂肪酸誘導体よりも高い最小阻止濃度（MIC）を有し、第2の脂肪酸誘導体の存在が、第1の脂肪酸誘導体のMICを増加させる、組換え宿主細胞。

[本発明1017]

生化学経路が、

a. カルボン酸レダクターゼ、

b. カルボン酸レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ、

c. カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、

d. カルボン酸レダクターゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、

e. エステルシンターゼ、

f. エステルシンターゼおよび脂肪酸アシルCoAシンセターゼ、

g. アシルCoAレダクターゼ、

h. アシルCoAレダクターゼおよびアシルCoAシンセターゼ、

i. アシルCoAレダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、

j. アシルCoAレダクターゼ、アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、およびアシルC

40

50

oAシンセターゼ、

k. O-メチルトランスフェラーゼ、

l. アシルACPレダクターゼ、

m. アシルACPレダクターゼおよびアルデヒドデカルボニラーゼ、

n. アシルACPレダクターゼおよびアルデヒド酸化的デホルミラーゼ、

o. アシルACPレダクターゼおよびアルコールO-アセチルトランスフェラーゼ、

p. アシルACPレダクターゼ、アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ、

q. OleAタンパク質、

r. OleA、OleC、およびOleDタンパク質、

s. OleAタンパク質および脂肪酸アシルCoAシンセターゼ、または

t. OleA、OleC、およびOleDタンパク質ならびに脂肪酸アシルCoAシンセターゼ

のうちの1つを含む、本発明1016の組換え宿主細胞。

[本発明1018]

第1の脂肪酸誘導体が、脂肪酸であり、第2の脂肪酸誘導体が、脂肪酸アルキルエステルであり、

生化学経路が、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンセターゼを含む、

本発明1017の組換え宿主細胞。

[本発明1019]

脂肪酸アルキルエステルが、脂肪酸メチルエステルまたは脂肪酸エチルエステルである、

本発明1018の組換え宿主細胞。

[本発明1020]

第1の脂肪酸誘導体が、脂肪アルコールであり、第2の脂肪酸誘導体が、脂肪アルコール酢酸エステルであり、

生化学経路が、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含む、

本発明1017の組換え宿主細胞。

[本発明1021]

第1の脂肪酸誘導体および第2の脂肪酸誘導体が、中鎖脂肪酸誘導体である、

本発明1016の組換え宿主細胞。

[本発明1021]

操作チオエステラーゼ変種をさらに含む、

本発明1016の組換え宿主細胞。

[本発明1022]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185、186、196、197、198、203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する変種チオエステラーゼからなる群より選択されるメンバーである、

本発明1023の組換え宿主細胞。

[本発明1023]

少なくとも1つの置換変異が、(a) アミノ酸位置3のリジン；(b) アミノ酸位置4のメチオニン；(c) アミノ酸位置6のアルギニン；(d) アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e) アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f) アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g) アミノ酸位置22のアルギニン；(h) アミノ酸位置37のプロリン；(i) アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j) 位置45のセリン；(k) アミノ酸位置50のトリプトファン；(l) アミノ酸位置54のアルギニン；(m) アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n) アミノ酸位置64のアルギニンまたは

10

20

30

40

50

プロリン；(o) アミノ酸位置67のロイシン；(p) 位置73のバリン；(q) アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r) アミノ酸位置91のメチオニン；(s) アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t) アミノ酸位置102のイソロイシン；(u) アミノ酸位置110のロイシン；(v) 位置111のトレオニン；(w) 位置114のリジン；(x) アミノ酸位置129のバリン；(y) アミノ酸位置132のトリプトファン；(z) アミノ酸位置137のシステイン；(aa) アミノ酸位置158のグルタミン；(bb) アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc) アミノ酸位置176のバリン；(dd) アミノ酸位置178のプロリン；(ee) アミノ酸位置185のアラニン；(ff) アミノ酸位置186のグリシン；(gg) アミノ酸位置196のバリン；(hh) アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii) アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj) アミノ酸位置203のアルギニン；(kk) アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll) アミノ酸位置217のアルギニン；(mm) アミノ酸位置225のロイシン；(nn) アミノ酸位置227のグリシン；(oo) アミノ酸位置236のトレオニン；(pp) アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq) アミノ酸位置254のグリシン；(rr) アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss) アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt) アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu) アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv) アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww) アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx) アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy) アミノ酸位置299のロイシン；(zz) アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa) アミノ酸位置301のシステイン；(bbb) アミノ酸位置302のトレオニン；(ccc) アミノ酸位置316のアルギニン；(ddd) アミノ酸位置321のアルギニン；および(eee) アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである、本発明1022の組換え細胞。

10

20

[本発明1024]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1023の組換え宿主細胞。

30

[本発明1025]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1024の組換え宿主細胞。

40

[本発明1026]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:4と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1025の組換え宿主細胞。

[本発明1027]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1026の組換え宿主細胞。

50

Q ID NO:45、およびSEQ ID NO:46からなる群より選択されるメンバーである、本発明1026の組換え宿主細胞。

[本発明1028]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1025の組換え宿主細胞。

[本発明1029]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである、本発明1028の組換え宿主細胞。

[本発明1030]

操作チオエステラーゼ変種が、改良された溶解性を有する、本発明1024の組換え宿主細胞。

[本発明1031]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する、本発明1030の組換え宿主細胞。

[本発明1032]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する、本発明1031の組換え宿主細胞。

[本発明1033]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1032の組換え宿主細胞。

[本発明1034]

操作チオエステラーゼ変種を含む組換え宿主細胞を炭素源の存在下で中鎖脂肪酸誘導体の生産に適した条件で培養する工程を含む、中鎖脂肪酸誘導体を商業的力価で生産するための方法であって、

組換え宿主細胞が、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する生化学経路をコードする1つまたは複数の異種遺伝子を含み、

第2の脂肪酸誘導体が、第1の脂肪酸誘導体よりも高い最小阻止濃度（MIC）を有し、

第2の脂肪酸誘導体の存在が、第1の脂肪酸誘導体のMICを増加させる、

方法。

[本発明1035]

第1の脂肪酸誘導体が、中鎖脂肪酸であり、第2の脂肪酸誘導体が、中鎖脂肪酸アルキルエステルであり、

生化学経路が、エステルシンターゼおよび脂肪酸アシル-CoAシンセターゼを含む、本発明1034の方法。

[本発明1036]

脂肪酸アルキルエステルが、中鎖脂肪酸メチルエステルまたは中鎖脂肪酸エチルエステルである、

本発明1035の方法。

[本発明1037]

第1の脂肪酸誘導体が、中鎖脂肪アルコールであり、第2の脂肪酸誘導体が、中鎖脂肪アルコール酢酸エステルであり、

生化学経路が、カルボン酸レダクターゼおよびアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼを含む、

本発明1035の方法。

[本発明1038]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1と少なくとも90%の配列同一性、ならびに3、4、6、14、15、17、22、37、44、45、50、54、56、64、67、73、76、91、99、102、110、111、114、129、132、137、158、162、165、176、178、185

10

20

30

40

50

、186、196、197、198、203、213、217、225、227、236、244、254、256、258、278、282、292、297、298、299、300、301、302、316、321、および322からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの置換変異を有するアミノ酸配列を有する、本発明1034の方法。

[本発明1039]

少なくとも1つの置換変異が、(a)アミノ酸位置3のリジン；(b)アミノ酸位置4のメチオニン；(c)アミノ酸位置6のアルギニン；(d)アミノ酸位置14のグリシンまたはアルギニン；(e)アミノ酸位置15のロイシンまたはトリプトファン；(f)アミノ酸位置17のアラニンまたはシステイン；(g)アミノ酸位置22のアルギニン；(h)アミノ酸位置37のプロリン；(i)アミノ酸位置44のグリシンまたはイソロイシン；(j)位置45のセリン；(k)アミノ酸位置50のトリプトファン；(l)アミノ酸位置54のアルギニン；(m)アミノ酸位置56のリジンまたはシステイン；(n)アミノ酸位置64のアルギニンまたはプロリン；(o)アミノ酸位置67のロイシン；(p)位置73のバリン；(q)アミノ酸位置76のフェニルアラニンまたはロイシンまたはチロシン；(r)アミノ酸位置91のメチオニン；(s)アミノ酸位置99のリジンまたはプロリン；(t)アミノ酸位置102のイソロイシン；(u)アミノ酸位置110のロイシン；(v)位置111のトレオニン；(w)位置114のリジン；(x)アミノ酸位置129のバリン；(y)アミノ酸位置132のトリプトファン；(z)アミノ酸位置137のシステイン；(aa)アミノ酸位置158のグルタミン；(bb)アミノ酸位置162のグルタミン酸；(cc)アミノ酸位置176のバリン；(dd)アミノ酸位置178のプロリン；(ee)アミノ酸位置185のアラニン；(ff)アミノ酸位置186のグリシン；(gg)アミノ酸位置196のバリン；(hh)アミノ酸位置197のアスパラギン；(ii)アミノ酸位置198のトリプトファン；(jj)アミノ酸位置203のアルギニン；(kk)アミノ酸位置213のヒスチジンまたはアルギニン；(ll)アミノ酸位置217のアルギニン；(mm)アミノ酸位置225のロイシン；(nn)アミノ酸位置227のグリシン；(oo)アミノ酸位置236のトレオニン；(pp)アミノ酸位置244のメチオニンまたはアルギニン；(qq)アミノ酸位置254のグリシン；(rr)アミノ酸位置256のシステインまたはアルギニン；(ss)アミノ酸位置258のトレオニンまたはバリン；(tt)アミノ酸位置278のリジンまたはバリン；(uu)アミノ酸位置282のセリンまたはバリン；(vv)アミノ酸位置292のフェニルアラニン；(ww)アミノ酸位置297のトレオニンまたはアスパラギン酸またはバリン；(xx)アミノ酸位置298のバリンまたはシステイン；(yy)アミノ酸位置299のロイシン；(zz)アミノ酸位置300のリジンまたはトリプトファンまたはロイシン；(aaa)アミノ酸位置301のシステイン；(bbb)アミノ酸位置302のトレオニン；(ccc)アミノ酸位置316のアルギニン；(ddd)アミノ酸位置321のアルギニン；および(eee)アミノ酸位置322のリジンからなる群より選択されるメンバーである、本発明1036の方法。

[本発明1038]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、

本発明1037の方法。

[本発明1039]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:1と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1038の方法。

[本発明1040]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:4と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1039の方法。

[本発明1041]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、およびSEQ ID NO:46からなる群より選択されるメンバーである、本発明1040の方法。

10

[本発明1042]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:15と比較して、増加した表面正電荷を有する、本発明1039の方法。

[本発明1043]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50およびSEQ ID NO:51からなる群より選択されるメンバーである、本発明1042の方法。

20

[本発明1044]

操作チオエステラーゼ変種が、改良された溶解性を有する、本発明1038の方法。

[本発明1045]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:49と比較して、改良された溶解性を有する、本発明1044の方法。

[本発明1046]

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:49のアミノ酸2～40に短縮型変異を有する、本発明1045の方法。

[本発明1047]

30

操作チオエステラーゼ変種が、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58およびSEQ ID NO:59からなる群より選択されるメンバーである、本発明1046の方法。

[本発明1048]

少なくとも3.6の、C8脂肪酸誘導体のC10脂肪酸誘導体に対する比(C8/C10)を有する、中鎖脂肪酸誘導体の組成物。

[本発明1049]

C8脂肪酸誘導体のC10脂肪酸誘導体に対する比が、7.7である、本発明1048の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0041】

40

【図1】異なるC8脂肪族化合物についての最小阻止濃度(MIC)曲線を図示する。

【図2】異なる中鎖脂肪族化合物の分配係数(logP<sub>wo</sub>)を図示する。

【図3】酢酸オクタールの存在下での1-オクタノールの毒性からの防御を図示する。1-オクタノールに曝露されたとき、大腸菌(E. coli)細胞の生存率は、5時間曝露後に完全に失われた。しかし、50g/L(大腸菌細胞に対する無毒性濃度)の酢酸オクタールも添加した場合、細胞生存率の減少は、最大10g/Lの1-オクタノールの存在下で20%未満であった。

【図4】中鎖脂肪アルコールの生産およびそれらの脂肪酢酸エステルへのアセチル化のための経路を図示する。R: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[式中、n=1、2、3、4または5]; FFA: 遊離脂肪酸; FALD: 脂肪アルデヒド; FALC: 脂肪アルコール; FACE: 脂肪アルコール酢酸エステル; ACP: アシルキャリアータンパク質; AAR: アシル-ACPレダクターゼ; ADH: ア

50

ルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ；TE：チオエステラーゼ；ACR：アシル-CoAレダクターゼ；CAR：カルボキシル酸レダクターゼ；AAT：o-アルコールアセチルトランスフェラーゼ。

【図5A】アルコールアセチルトランスフェラーゼの発現による中鎖脂肪アルコール（FALC）化合物の、改良された耐性および生産を示す、異なる尺度を図示する。図5Aは、FALC生産株（sRG.674）が炭素源としてグルコースを有する最少塩培地上で増殖できなかったことを図示する。対照的に、sJN.209株におけるo-アルコールアセチルトランスフェラーゼ（AAT）の発現と同じ培地上で、増殖阻害はなかった。

【図5B】アルコールアセチルトランスフェラーゼの発現による中鎖脂肪アルコール（FALC）化合物の、改良された耐性および生産を示す、異なる尺度を図示する。図5Bは、FALC生産株（sRG.674）およびAAT発現株sJN.209により生産される総脂肪種（FAS）のレベルを図示する。

10

【図5C】アルコールアセチルトランスフェラーゼの発現による中鎖脂肪アルコール（FALC）化合物の、改良された耐性および生産を示す、異なる尺度を図示する。図5Cは、FALC生産株（sRG.674）により生産される脂肪種のレベルおよび組成の、AAT発現株sJN.209との比較を図示する。

【図6】遊離脂肪酸のエステル化のための経路を図示する。R：CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> [式中、n = 1、2、3、4または5]；FFA：遊離脂肪酸；FAEE：脂肪酸エチルエステル；TE：チオエステラーゼ；ES：エステルシンターゼ。

【図7A】中鎖アルキルエステル生合成経路を発現している株による改良された生存率および中鎖脂肪酸誘導体の生産を、中鎖長脂肪酸生合成経路だけを発現している株と比較して示す異なる尺度を図示する。sRS.786株は、中鎖長チオエステラーゼ（chFatB2）を発現するように操作されており、遊離脂肪酸（FFA）だけを生産する。Stpay.179株は、sRS.786と同質遺伝子的であり、脂肪酸アシルCoAシンセターゼおよびエステルシンターゼも発現し、培地中に短鎖アルコール（例えば、メタノール、エタノールなど）が与えられると中鎖長脂肪アルキルエステルを生産する。株sRS.786およびStpay.179を、炭素源としてグルコースを有する最少塩培地中で増殖させた。追加的に、発酵運転の経過中にエタノールを供給してアルコール濃度を約2g/Lに維持した。図7A、FFA単独を生産する株（sRS.786）は、IPTGを添加した約10時間後に増殖およびグルコース消費を止めて、中鎖長アシル-ACPチオエステラーゼの発現を誘導した。対照的に、エステル化経路を発現していたStpay.179株は、IPTG誘導後に増殖を続けることができた。

20

30

【図7B】図7B、sRS.786株は、IPTGを添加した約10時間後に中鎖脂肪酸種（FAS）の生産を止めて、中鎖長アシル-ACPチオエステラーゼの発現を誘導し、最終的にC8 + C10を約5gだけ生産した。対照的に、Stpay.179株は、発酵運転全体にわたり増殖およびFASの生産を続け、最終的に84g/kgを超える総脂肪酸種を生産した。

【図7C】図7C、エステル化経路を発現していたStpay.179株は、増殖し、84g/kgを超える力価の総脂肪酸種を生産することができ、総脂肪酸種の93%は、C8-C10 FFAであった。

【図8】プラスミドpIR.108を図示する。

【図9】実施例6に開示されるSEQ ID NO:1のモデルを構築するために使用された構造ベースの配列アライメントを図示する。

40

【図10】SEQ ID NO:1の3D構造のための最終的な完全長モデルを図示する。表面残基をボールおよびスティックとして示す。

【図11】多様なFatB2短縮化の溶解性を評価するためのウエスタンブロット（1 = 全細胞画分、2 = 可溶性画分）。

【図12】実施例8の条件で培養した場合のsRG.825およびsDH.377株による中鎖長脂肪アルコール酢酸エステルの生産の特徴的な最終産物の組成を図示する。

【図13】実施例11の条件で培養した場合のsAZ918株による中鎖長脂肪酸エチルエステル生産の特徴的な最終産物の組成を図示する。

【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 0 4 2 】

## 詳細な説明

## 定義

要素を説明する状況で本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される「1つの(a)」および「1つの(an)」および「その(the)」ならびに類似の指示物などの単数につく冠詞は、本明細書に特に示されないかぎり、または文脈によってはっきりと否定されないかぎり、単数および複数の両方を含むと解釈されるべきである。したがって、例えば、「1つの宿主細胞」への言及は、2つ以上のこのような宿主細胞を含み、「1つの核酸配列」への言及は、1つまたは複数の核酸配列を含み、「1つの酵素」への言及は、1つまたは複数の酵素を含み、他についても同様である。

10

## 【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される、「約」は、当業者によって理解されており、それが使用される文脈に応じてある程度変動し得る。「約」という用語が使用される文脈を考慮して本用語が当業者に明らかではなく使用される場合、「約」は、特定の語の、最大プラスマイナス10%を意味する。

## 【 0 0 4 4 】

当業者によって理解されるように、任意および全ての目的のために、本明細書に開示される全ての範囲は、また、任意および全ての可能性のあるその下位範囲および下位範囲の組み合わせも包含する。さらに、当業者によって理解されるように、範囲は、各個別のメンバーを含む。したがって、例えば、1~3つの原子を有する基は、1、2、または3つの原子を有する基を表す。同様に、1~5つの原子を有する基は、1、2、3、4、または5つの原子を有する基を表すなどである。

20

## 【 0 0 4 5 】

特に定義されないかぎり、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。特に、本開示は、組換え遺伝学、有機化学、発酵学、および生化学の分野における常用の技術を利用する。分子生物学および遺伝学における一般用語を開示する基礎テキストには、例えば、Lackie, Dictionary of Cell and Molecular Biology, Elsevier (5th ed. 2013)が挙げられる。生化学における一般的な方法および一般用語を開示する基礎テキストには、例えば、Lehninger Principles of Biochemistry Sixth edition, David L. Nelson and Michael M. Cox eds. W.H. Freeman (2012)が挙げられる。発酵学の一般的な方法および一般用語を開示する基礎テキストには、例えば、Principles of Fermentation Technology, 3rd Edition by Peter F Stanbury, Allan Whitaker and Stephen J Hall. Butterworth-Heinemann (2016)が挙げられる。有機化学の一般的な方法および一般用語を開示する基礎テキストには、例えば、Favre, Henri A. and Powell, Warren H. Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Name 2013. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2013; Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques, Stephane Caron ed., John Wiley and Sons Inc. (2011); Organic Chemistry, 9th Edition - Francis Carey and Robert Giuliano, McGraw Hill (2013)が挙げられる。

30

40

## 【 0 0 4 6 】

本明細書の全体を通して、配列アクセッション番号は、米国国立衛生研究所によって維持されているNCBI(国立バイオテクノロジー情報センター)によって提供されるデータベース(本明細書において「NCBIアクセッション番号」または代替的に「GenBankアクセッション番号」または代替的に単に「アクセッション番号」として特定される)、ならびにスイスバイオインフォマティクス研究所によって提供されるUniProt Knowledgebase(UniProtKB)およびSwiss-Protデータベース(本明細書において「UniProtKBアクセッション番号」として特定される)から得られたものである。

## 【 0 0 4 7 】

酵素分類(EC)番号は、国際生化学分子生物学連合(IUBMB)の命名委員会によって

50

確立されたものであり、その説明は、ワールドワイドウェブ上のIUBMB酵素命名ウェブサイトから入手可能である。EC番号は、酵素が触媒する反応に応じて当該酵素を分類する。例えば、チオエステラーゼの酵素活性は、E.C. 3.1.2.1～3.1.2.27および3.1.2.-に分類される。特定の分類は、異なる基質に対する異なるチオエステラーゼの活性に基づく。

【0048】

例えば、いくつかの例示的な態様では、アシル-アシルキャリアータンパク質チオエステル（アシル-ACP）およびアシル-コエンザイムAチオエステル（アシル-CoA）などのC6-C18アルキルチオエステルのチオエステル結合の加水分解を触媒するチオエステラーゼは、E.C. 3.1.2.-から3.1.2.14に分類される。チオエステラーゼは、大部分の原核生物中ならびに大部分の植物および藻類の葉緑体中に存在する。チオエステラーゼの機能性は大部分の原核生物において種ごとに保存されている。したがって、異なる微生物種は、E.C. 3.1.2.1～3.1.2.27および3.1.2.-に分類されるものと同じチオエステラーゼ酵素活性を発揮することができる。

10

【0049】

本明細書に使用される「脂肪酸」という用語は、式 $\text{RCOOH}$  [式中、Rは、少なくとも4つの炭素、典型的には約4～約28個の炭素原子を有する脂肪族基である]を有する脂肪族カルボン酸を表す。脂肪族R基は、飽和または不飽和、分枝または非分枝であることができる。不飽和「脂肪酸」は、一不飽和または多価不飽和であり得る。

【0050】

本明細書に使用される1種または複数種の「脂肪酸」は、脂肪酸生合成過程を経由して、もしくは脂肪酸ベータ酸化の逆行を経由して、細胞内で生産される、またはそれらを細胞に供給することができる。当技術分野において周知のように、脂肪酸生合成は、一般的に、アシル-ACPのマロニル-CoA依存性合成であるのに対し、ベータ酸化の逆行は、結果としてアシル-CoAを生じる。細胞に供給された脂肪酸は、アシル-CoAに変換される。

20

【0051】

脂肪酸の生合成および分解は、原核生物、単細胞真核生物、高等真核生物、および古細菌を含む全ての生物形態で起こる。本明細書に開示されるツールおよび方法は、アルキルチオエステルを自然に生産する任意の生物において脂肪酸合成、分解、または供給のうち任意の1つまたは複数により誘導体化される中鎖脂肪酸誘導体の生産に有用である。

【0052】

本明細書に使用される「中鎖脂肪酸」または同様な意味合いで「中鎖長脂肪酸」という用語は、6～10の炭素鎖長を有する脂肪酸を表す。したがって、いくつかの例示的な態様では、「中鎖脂肪酸」は、6炭素の炭素鎖長、7炭素の炭素鎖長、8炭素の炭素鎖長、9炭素の炭素鎖長、または10炭素の炭素鎖長を有する脂肪酸である。

30

【0053】

本明細書に使用される「脂肪酸誘導体」という用語は、脂肪酸から誘導体化されて製造された産物を表す。したがって、「脂肪酸誘導体」は、上に定義される「脂肪酸」および「中鎖脂肪酸」を含む。一般に、「脂肪酸誘導体」には、アシル-ACPまたはアシル-ACP誘導体を含むマロニル-CoA由来化合物が含まれる。「脂肪酸誘導体」には、また、アシル-CoAまたはアシル-CoA誘導体などのマロニル-CoA由来化合物が含まれる。したがって、「脂肪酸誘導体」には、チオエステラーゼ反応を含む代謝経路から得られる分子/化合物が含まれる。例示的な脂肪酸誘導体には、脂肪酸、脂肪酸エステル（例えば、ワックス、脂肪酸エステル、脂肪酸メチルエステル（FAME）、脂肪酸エチルエステル（FAEE））、脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）、脂肪アミン、脂肪アルデヒド、脂肪アルコール、炭化水素、例えば、アルカン、アルケンなど、ケトン、末端オレフィン、内部オレフィン、3-ヒドロキシ脂肪酸誘導体、二官能性脂肪酸誘導体（例えば、 $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸、1,3 脂肪ジオール、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジオール、 $\alpha$ ,  $\omega$ -3-ヒドロキシトリオール、 $\omega$ -ヒドロキシFAME、 $\omega$ -OH FAEEなど）、および上記脂肪酸誘導体の各々の不飽和化合物を含む不飽和脂肪酸誘導体が挙げられる。

40

【0054】

50

本明細書において使用される「脂肪酸誘導体組成物」という表現は、脂肪酸誘導体の組成物、例えば、生物によって生産される脂肪酸組成物を表す。「脂肪酸誘導体組成物」は、単一の脂肪酸誘導体種を含む場合または脂肪酸誘導体種の混合物を含む場合がある。いくつかの例示的な態様では、脂肪酸誘導体の混合物は、脂肪酸誘導体産物（例えば、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコール、脂肪アルコール酢酸エステル、脂肪アルデヒド、脂肪アミン、二官能性脂肪酸誘導体など）のうち1種よりも多くを含む。他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体の混合物は、異なる鎖長、飽和度および/または分枝特性を有する脂肪酸エステル（または別の脂肪酸誘導体）の混合物を含む。他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体の混合物は、脂肪酸誘導体の1種、例えば、中鎖脂肪酸誘導体組成物を主に含む。なお他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体の混合物は、1種を超える脂肪酸誘導体産物、例えば、異なる鎖長、飽和度および/または分枝特性を有する脂肪酸誘導体の混合物を含む。なお他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体の混合物は、脂肪エステルおよびベータ-ヒドロキシエステルの混合物を含む。なお他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体組成物は、脂肪アルコールおよび脂肪アルデヒドの混合物を含む。なお他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体組成物は、FAMEおよび/またはFAEEの混合物、特に中鎖FAMEおよび/またはFAEEの混合物を含む。なお他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体組成物は、脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）の混合物、特に中鎖脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）の混合物を含む。

10

**【0055】**

本明細書に使用される用語「ヌクレオチド」は、当技術分野において公知の慣例的な意味を取る。天然のリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドモノマーを表すことに加えて、「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド類似体、およびアミノ修飾ヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチドを包含する。加えて、「ヌクレオチド」は、非天然類似体構造を含む。したがって、例えば、それぞれ塩基を含有するペプチド核酸の個別のユニットは、本明細書においてヌクレオチドと呼ばれる場合がある。

20

**【0056】**

「ポリヌクレオチド」という用語は、典型的にはホスホジエステル結合したリボヌクレオチド（RNA）またはデオキシリボヌクレオチド（DNA）のポリマーであって、1本鎖または2本鎖であることができ、天然および/または非天然および/または改変ヌクレオチドを含有する場合がある、ポリマーを表す。「ポリヌクレオチド」、「核酸配列」、および「ヌクレオチド配列」という用語は、任意の長さの、RNAまたはDNAのいずれかの、ヌクレオチドのポリマー形態を表すために、本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、分子の一次構造を表し、したがって、1本鎖、2本鎖、3本鎖、4本鎖、部分的2本鎖、分枝、ヘアピン型、環状、施錠コンフォメーション（padlocked conformation）などのポリヌクレオチドを含む。これらの用語は、同等物として、限定されないものの、メチル化ポリヌクレオチドおよび/またはキャップ付きポリヌクレオチドなどのヌクレオチド類似体および修飾ポリヌクレオチドから作られたRNAまたはDNAのいずれかの類似体を含む。ポリヌクレオチドは、プラスミド、ウイルス、染色体、EST、cDNA、mRNA、およびrRNAを非限定的に含む任意の形態であることができ、合成、組換え、エクスピボ生成、またはその組み合わせを含む任意の公知の方法により、および当技術分野において公知の任意の精製方法を利用して、調製される場合がある。

30

40

**【0057】**

本明細書に使用される「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に使用されて、典型的には、12以上のアミノ酸長であるアミノ酸残基のポリマーを表す。12アミノ酸長未満のポリペプチドは、本明細書において「ペプチド」と呼ばれる。本用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的的化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然のアミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーにあてはまる。「組換えポリペプチド」という用語は、一般的に、発現されるタンパク質をコードするDNAまたはRNAが適切な発現ベクターに挿入され、それが今度は宿主細胞を形質転換してポリペプチドを生産するために使用される、組換え技法により生産されるポリペプ

50

チドを表す。いくつかの例示的な態様では、発現されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするDNAまたはRNAは、相同組換えまたは当技術分野において周知の他の手段により宿主染色体に挿入され、それで、宿主細胞を形質転換してペプチドまたはポリペプチドを生産するために使用される。同様に、「組換えポリヌクレオチド」または「組換え核酸」または「組換えDNA」という用語は、当業者に公知の組換え技法により生産される（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 4<sup>th</sup> Edition (Cold Spring Harbor, N.Y. 2012)またはCurrent Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)およびSupplements 1-115(1987-2016)に記載される方法を参照されたい）。

#### 【 0 0 5 8 】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と似た方法で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を表す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によりコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合している炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを表す。このような類似体は、修飾R基（例えば、ノルロイシン）または修飾ペプチド主鎖を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。自然にコードされるアミノ酸は、20種の一般的アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）ならびにピロリジンおよびセレノシステインである。いくつかの例示的な態様では、下の表に示される一文字コードは、20種の一般的天然アミノ酸の特定のメンバーを表すために使用される。一文字アミノ酸コードは、当技術分野において周知である（例えば、Lehninger、前記を参照されたい）。

| アミノ酸     | 一文字コード | アミノ酸    | 一文字コード |
|----------|--------|---------|--------|
| グリシン     | G      | プロリン    | P      |
| アラニン     | A      | バリン     | V      |
| ロイシン     | L      | イソロイシン  | I      |
| メチオニン    | M      | システイン   | C      |
| フェニルアラニン | F      | チロシン    | Y      |
| トリプトファン  | W      | ヒスチジン   | H      |
| リジン      | K      | アルギニン   | R      |
| グルタミン    | Q      | アスパラギン  | N      |
| グルタミン酸   | E      | アスパラギン酸 | D      |
| セリン      | S      | トレオニン   | T      |

#### 【 0 0 5 9 】

2つのヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に言及する場合、2つの配列間の「配列同一パーセンテージ」は、最適にアライメントした2つの配列を比較ウィンドウにわたって比較することにより決定され、その際、2つの配列の最適なアライメントのために、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列部分は、参照配列（付加も欠失も含まない）と比較して、付加または欠失（すなわちギャップ）を含む場合がある。「配列同一パーセンテージ」は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に存在する位置数を決定して、マッチした位置の数をもたらすこと、マッチした位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で割ること、および結果に100をかけて配列同一パーセンテージをもたらすことによって計算される。

#### 【 0 0 6 0 】

したがって、2つ以上の核酸配列またはペプチドまたはポリペプチドに関連する「同一パーセント」、または同様な意味合いで「配列同一パーセント」という表現は、例えば、BLASTまたはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを使用してデフォルトのパラメーターを用いて測定したときに（例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215(3):403-410）および/もしくはncbi.nlm.nih.gov/BLAST/のNCBIウェブサイト参照されたい）または手作業のアライメントおよび目視検査により、同じである、または同じであるヌクレオチドもしくはアミノ酸を特定のパーセンテージで有する（例えば、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって比較し、最大対応のためにアライメントした場合に、特定の領域にわたって、約50%の同一性、好ましくは55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはより高い同一性）2つ以上の配列または部分配列を表す。2つの核酸配列またはアミノ酸配列間の配列同一パーセントは、また、例えば、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み入れられているNeedlemanおよびWunschのアルゴリズムを使用して、Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれかならびにギャップ加重16、14、12、10、8、6、または4および長さ加重1、2、3、4、5、または6を使用して、決定することができる（Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453）。2つのヌクレオチド配列間の配列同一パーセントは、また、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMP行列ならびにギャップ加重40、50、60、70、または80および長さ加重1、2、3、4、5、または6を使用して決定することができる。当業者は、最初の配列同一性の計算を行い、アルゴリズムのパラメーターを相応に調整することができる。分子が特許請求の範囲の相同性の限度内にあるかどうかを判定するためにどのパラメーターを適用すべきか実施者が分かっていない場合に使用され得るパラメーターのセットは、ギャップペナルティー12、ギャップ伸長ペナルティー4およびフレームシフトギャップペナルティー5を有するBlossum 62スコアリング行列である。配列アラインメントの追加的な方法は、バイオテクノロジーの技術分野において公知である（例えば、Rose nberg (2005) BMC Bioinformatics 6:278; Altschul et al. (2005) FEBS J. 272(20):5101-5109を参照されたい）。

#### 【0061】

2つ以上の核酸配列またはアミノ酸配列が、上記のようにアライメントおよび分析され、特定の領域にわたって約50%の同一性、好ましくは55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはより高い同一性を共有すると分かった場合、それらは、「実質的に同一」とであると言われる。2つの核酸配列またはポリペプチド配列は、上記のように最大の対応のためにアライメントした場合にこれら2つの配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の配列がそれぞれ同じならば、「同一」とであると言われる。この定義は、また、試験配列の相補体を表す、またはそれに適用され得る。同一性は、典型的には、少なくとも約25アミノ酸長またはヌクレオチド長以上である領域にわたって、より好ましくは50~100アミノ酸長もしくはヌクレオチド長である領域にわたって、または所与の配列の全長にわたって、計算される。

#### 【0062】

「低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または超高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズする」という表現は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載するものである。ハイブリダイゼーション反応を行うための案内は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6に見出すことができる。水性および非水性方法は、引用された参考文献に記載されており、いずれの方法も使用することができる。本明細書において参照される特異的ハイブリダイゼーション条件は、以下の通りである：（1）低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件 -- 約45 の6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）に続いて、少なくとも50 の0.2×SSC、0.1% SDS中で2回の洗浄（低ストリンジェンシー条件について洗浄温度を55 に上げることができる）；（2）中ストリンジ

エンシーハイブリダイゼーション条件 -- 約45 の6×SSCに続いて、60 の0.2×SSC、0.1% SDS中で1回または複数回の洗浄；（3）高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件 -- 約45 の6×SSCに続いて、65 の0.2×SSC、0.1% SDS中で1回または複数回の洗浄；および（4）超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件 -- 65 の0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDSに続いて、65 の0.2×SSC、1% SDS中で1回または複数回の洗浄。特に述べないかぎり、超高ストリンジェンシー条件(4)が、好ましい条件である。

【0063】

本明細書に使用される「内因性」という用語は、細胞内から生産される物質、例えば、核酸、タンパク質などを表す。したがって、「内因性」ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、細胞によって生産されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを表す。いくつかの例示的な態様では、「内因性」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、親細胞（または宿主細胞）のゲノムによりコードされる。他の例示的な態様では、「内因性」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、親細胞（または宿主細胞）により保有される自律複製プラスミドによりコードされる。いくつかの例示的な態様では、「内因性」遺伝子は、細胞が本来、自然界から単離されたときに細胞中に存在した遺伝子であり、すなわち、当該遺伝子は「細胞にとってネイティブ」である。他の例示的な態様では、「内因性」遺伝子は、組換え技法により、例えば、制御配列およびコード配列の関係を改変することによって改変されている。したがって、「異種」遺伝子は、いくつかの例示的な態様では、宿主細胞にとって「内因性」であり得る。

【0064】

対照的に、「外因性」ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、または他の物質（例えば、脂肪酸誘導体、小分子化合物など）は、親細胞によって生産されない結果、細胞外から細胞、細胞培養物またはアッセイに添加されるポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは他の物質を表す。

【0065】

本明細書に使用される「ネイティブな」という用語は、自然界から単離された核酸、タンパク質、ポリペプチドもしくはその断片の形態、または意図的に導入された変異を有しない核酸、タンパク質、ポリペプチドもしくはその断片を表す。

【0066】

本明細書に使用される、ポリペプチドの「断片」という用語は、2アミノ酸残基から、全アミノ酸配列マイナス1アミノ酸残基までのサイズ範囲の完全長ポリペプチドまたはタンパク質のより短い一部分を表す。本開示のある特定の態様では、断片は、ポリペプチドまたはタンパク質のドメイン（例えば、基質結合ドメインまたは触媒ドメイン）の全アミノ酸配列を表す。

【0067】

「変異誘発」という用語は、生物の遺伝情報が安定的に変更されて「変異体」または「変種」を生産する工程を表す。変異型核酸配列を生産するためのタンパク質コード核酸配列の変異誘発により、変異型タンパク質が生産される。変異誘発は、非コード核酸配列の変更も表す。いくつかの例示的な態様では、非コード核酸配列中の変異は、改変されたタンパク質活性をもたらす。

【0068】

したがって、本明細書に使用される「変異」は、遺伝子の核酸位置またはポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸位置（残基）における永続的な変更を表す。実際に、「変異」という用語は、ポリヌクレオチドの文脈では、対照または参照ポリヌクレオチド配列を基準とするポリヌクレオチド配列の変更をもたらす、ポリヌクレオチド配列への修飾を表す。いくつかの例示的な態様では、変異型ポリヌクレオチド配列は、例えば、コードされるアミノ酸配列を変更しない、発現目的のコドン最適化に関する改変を表す。他の例示的な態様では、ポリヌクレオチド配列中の変異は、コードされるアミノ酸配列の修飾をもたらすようにコドン修飾する。したがって、中鎖脂肪酸誘導体を生産する改良された能

10

20

30

40

50

力を有する操作チオエステラーゼ変種をコードするポリヌクレオチドは、対照チオエステラーゼをコードするポリヌクレオチドと比較して少なくとも1つの変異を有する。

【0069】

同様に、タンパク質に関連して、「変異」または「変異された」という用語は、対照または参照タンパク質配列を基準とするタンパク質配列中に変更をもたらす、アミノ酸配列への修飾を表す。変異は、別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置換、または1つもしくは複数のアミノ酸残基の挿入もしくは欠失を表すことができる。いくつかの例示的な態様では、「変異」は、非天然アミノ酸または化学修飾アミノ酸残基によるアミノ酸の置換である。他の例示的な態様では、「変異」は、前駆配列と比べた配列もしくは部分配列の短縮化（例えば、欠失もしくは中断）または1つもしくは別の末端からの欠失による配列短縮である。他の例示的な態様では、変異は、タンパク質内部またはタンパク質のいずれかの末端でのアミノ酸または部分配列の付加（例えば、前駆タンパク質配列中の2つの隣接アミノ酸の間に挿入される、ストレッチ中の2つ以上のアミノ酸）であり、それにより、タンパク質の長さが増加（または伸長）する。変異は、例えば、ランダム変異誘発、部位特異的変異誘発、オリゴヌクレオチド指定変異誘発、遺伝子シャフリング、定向進化技法、コンビナトリアル変異誘発、化学合成、部位飽和変異誘発などを含む当業者に公知の多数の方法により、ポリヌクレオチドに導入することができる。

10

【0070】

本明細書に使用される「変異体」または同様な意味合いで「変種」という用語は、少なくとも1つの変異を含むポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を表す。したがって、中鎖脂肪酸誘導体を生産する改良された能力を有する操作チオエステラーゼ変種は、対照チオエステラーゼと比較してそのポリペプチド配列中に少なくとも1つの変異を有する。

20

【0071】

本明細書に使用される、「操作チオエステラーゼ変種」という用語は、SEQ ID NO:1と比較して少なくとも1つの変異を有する変異体または変種チオエステラーゼを表し、その際、チオエステラーゼ変種は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する。

【0072】

本明細書に使用される「遺伝子」という用語は、核酸配列、例えば、RNA産物またはタンパク質産物のいずれかをコードするDNA配列、およびRNA産物またはタンパク質産物の発現に影響する、機能的に連結される核酸配列（例えば、発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、翻訳制御配列など）を表す。「遺伝子産物」という用語は、特定の遺伝子から発現されるRNA、例えば、tRNA、mRNAおよび/またはタンパク質のいずれかを表す。

30

【0073】

遺伝子に関して本明細書に使用される「発現」または「発現される」という用語は、遺伝子の1種または複数種の転写産物および/または翻訳産物の生産を表す。例示的な態様では、細胞におけるDNA分子の発現レベルは、細胞内に存在する対応するmRNAの量または細胞によって生産されるDNAによってコードされるタンパク質の量のいずれかに基づき決定される。「発現遺伝子」という用語は、メッセンジャーRNA (mRNA) に転写され次にタンパク質に翻訳される遺伝子、ならびに他の種類のRNA、例えば、タンパク質に翻訳されない転移RNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、および調節RNAに転写される遺伝子を表す。

40

【0074】

細胞系または無細胞系における核酸分子の発現レベルは、「発現制御配列」または同様な意味合いで「調節配列」によって影響される。「発現制御配列」または「調節配列」は、当技術分野において公知であり、それらには、例えば、宿主細胞中でポリヌクレオチド配列の発現を提供するプロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写終結因子、RNAの安定性に影響するヌクレオチド配列、配列内リボソーム進入部位 (IRES) などが含まれる。例示的な態様では、「発現制御配列」は、転写に関与する細胞性タンパク

50

質と特異的に相互作用する（例えば、Maniatis et al., Science, 236: 1237-1245 (1987); Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)を参照されたい）。例示的な方法では、発現制御配列は、ポリヌクレオチド配列と機能的に連結される。「機能的に連結される」により、適切な分子（例えば、転写活性化因子タンパク質）が発現制御配列と接触したときにポリヌクレオチド配列の発現が可能になるように、ポリヌクレオチド配列および発現制御配列が機能的に接続されることが意味される。例示的な態様では、機能的に連結されるプロモーターは、転写および翻訳の方向に関して、選択されたポリヌクレオチド配列の上流に位置する。いくつかの例示的な態様では、機能的に連結されるエンハンサーは、選択されたポリヌクレオチドの上流、内部、または下流に位置することができる。

10

#### 【0075】

一般的には、「最小阻止濃度」（MIC）は、一晚インキュベーション後に微生物の可視的増殖を阻害する、抗菌物質の最低濃度である。MICは、固体増殖培地のプレート、または液体希釈法（broth dilution method）で決定することができる。例えば、液体希釈によりMICを同定するために、漸減する濃度の薬物を含有する液体培地のウェル中で同量の細菌が培養される。抗生物質の最小阻止濃度は、細菌が増殖しなかった最終ウェルの濃度と、細菌を増殖させた、より低い次の量との間にある。本明細書で使用される「最小阻止濃度」または「MIC」という表現は、対照と比べて、24時間のインキュベーション期間中に微生物培養物の増殖の50%低下をもたらす化合物濃度を表す。ある態様では、潜在的有毒化合物、例えばオクタノールの「最小阻止濃度」は、細胞、例えば、大腸菌細胞の培養物を、種々の濃度の潜在的有毒化合物中で増殖させ、次に、潜在的有毒化合物の存在下で24時間の期間にわたって培養物の増殖がどれほど大きく起こったかを決定することにより測定される。例示的な態様では、培養物の増殖は、培養物中の合計細胞数の尺度として、24時間増殖後に溶解培養物から総タンパク質を測定することによって測定される。

20

#### 【0076】

本明細書に使用される、タンパク質/ポリペプチド、例えば、操作チオエステラーゼ変種の「修飾された活性」または「改変されたレベルの活性」は、適切な対照タンパク質、例えば、対応する親タンパク質または対応する野生型タンパク質の特徴と比較してタンパク質/ポリペプチドの活性における1つまたは複数の特徴の差異を表す。したがって、例示的な態様では、対応する対照タンパク質と比較して「修飾された活性」を有するタンパク質の活性における差異は、組換え宿主細胞における修飾タンパク質の活性を測定し、その他の点で同質遺伝子的な宿主細胞における対応する対照タンパク質の同じ活性の尺度と比較することによって決定される。修飾された活性は、例えば、タンパク質の構造変化（例えば、例えば、基質特異性の変化、観察される速度パラメーターの変化、溶解性の変化などをもたらす、タンパク質のヌクレオチドコード配列への変更などの、一次構造の変化）；タンパク質の安定性の変化（例えば、タンパク質分解の増加または減少）などの結果であることができる。いくつかの例示的な態様では、「修飾された活性」を有するポリペプチドは、本明細書開示の変異体または操作TE変種である。

30

#### 【0077】

例示的な態様では、本明細書開示のポリペプチドは、例えば、「改良されたレベルの活性」である、「修飾された活性」を有する。本明細書に使用される「改良されたレベルの活性」という表現は、同条件の対応する対照ポリペプチドの生化学的および/または生物学的機能のレベルと比較して高いレベルの生化学的または生物学的機能（例えば、DNA結合活性または酵素活性）を有するポリペプチドを表す。改良された活性の程度は、約10%以上、約20%以上、約50%以上、約75%以上、約100%以上、約200%以上、約500%以上、約1000%以上、またはその中の任意の範囲であることができる。

40

#### 【0078】

したがって、「改良された活性」は、ポリペプチドの改良された触媒活性または改良された触媒効率を表す場合があり、その際、触媒効率は、例えば、ポリペプチドのこのような酵素によって触媒される反応の反応速度における増加を表す。触媒活性/触媒効率は、

50

例えば、 $V_{max}$ （反応が進行できる最大速度）、 $K_m$ （ミカエリス定数）、 $k_{cat}$ （酵素1分子あたりで1秒あたりに代謝回転する基質分子数）などの、反応の1つもしくは複数の速度パラメーター（尺度もしくは計算値）または $k_{cat}/K_m$ （酵素効率の尺度）などの、これらのパラメーター間の任意の比を改良することにより、改良することができる。したがって、ポリペプチドの「改良された触媒活性」または「改良された触媒効率」は、いくつかの方法で測定することができる。例えば、「改良された活性」は、力価（濃度：g/L、もしくはmg/L、もしくはg/Kg）の増加、組成（生産される特定の脂肪酸種/総脂肪酸誘導体（FAS）の量）の変化、分子成分の改良された比（例えば、C8/C10含量もしくはC10/C12含量など）、または改良された活性の酵素を発現している組換え細胞によって生産される産物のFOC（対照に対する倍率、下記参照）の増加として測定される場合がある。

10

#### 【0079】

したがって、本明細書に使用される「中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する」または「中鎖長脂肪酸誘導体化合物の生産のための改良された活性を有する」または「中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する」または「中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する」という表現は、適切な対照ポリペプチド/タンパク質と同条件で比較したときに、中鎖脂肪酸誘導体種（6～10炭素長のアルキル鎖を有する脂肪酸および脂肪酸誘導体）の生産増加に導く、ポリペプチド/タンパク質の「改良された活性」、例えば「改良された触媒活性」を表す。

#### 【0080】

20

いくつかの例示的な態様では、「中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する」または同様な意味合いで「中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する」ポリペプチド/タンパク質は、特定鎖長の中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する。したがって、例えば、本明細書に使用される「C8脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する」という表現は、8炭素の脂肪酸誘導体の生産増加（例えば、%C8 FAS、C8/C10比の増加などとして測定される）に導く、「改良された触媒活性」または「改良された活性」を有するポリペプチド/タンパク質を表す。

#### 【0081】

同様に、いくつかの例示的な態様では、「中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する」または同様な意味合いで「中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する」ポリペプチド/タンパク質は、「C10脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性」を有する。したがって、このようなポリペプチド/タンパク質は、10炭素脂肪酸誘導体の生産増加（例えば、%C10 FAS、C10/C12比の増加などとして測定される）に導く、「改良された活性」を有する。

30

#### 【0082】

本明細書に使用される「対照に対する倍率」または同様な意味合いで「FOC」という表現は、操作チオエステラーゼ変種を含む細胞の測定された特定のメトリックの、適切な対照細胞、例えば、操作変異を有しない対照チオエステラーゼを含む同質遺伝子の宿主細胞において測定された同じメトリックに対する比を表す。したがって、一般的に、FOCは、変種のメトリックA/対照のメトリックAと等しい（いくつかの例示的な態様では、%C8のFOCは、適切な対照、例えば、特定の変異を含有するように操作されなかったチオエステラーゼを含む同質遺伝子的対照の%C8と比較した、操作チオエステラーゼ変種を含む細胞によって生産される%C8を意味する。したがって、例示的な態様では、%C8のFOCが1.1である操作チオエステラーゼ変種を含む組換え細胞は、対照チオエステラーゼを含む同質遺伝子的対照の%C8と比較した、操作チオエステラーゼ変種を含む細胞によって生産される8炭素の脂肪酸誘導体のパーセントにおける10%の改良（増加）を示す。

40

#### 【0083】

「対照」試料、例えば、「対照」ヌクレオチド配列、「対照」ポリペプチド配列、「対照」細胞など、または値は、試験試料と比較するための参照、通常は公知の参照として役立つ試料を表す。例えば、例示的な態様では、試験試料が、操作チオエステラーゼ変種に

50

よって作られた脂肪酸誘導体組成物を含むのに対し、対照試料は、対応するまたは指定の非修飾 / 非変種チオエステラーゼ（例えば、SEQ ID NO:1）によって作られる脂肪酸誘導体組成物を含む。専門家は、任意の数のパラメーターの評価のために対照を設計できることを認識している。さらに、当業者は、所与の状況でどの対照に価値があり、対照値との比較に基づきデータを解析できることを理解している。

【0084】

本明細書に使用される「組換え」という用語は、遺伝子修飾ポリヌクレオチド、ポリペプチド、細胞、組織、または生物を表す。「組換え」という用語は、第1世代の遺伝子修飾ポリヌクレオチド、ポリペプチド、細胞、組織、または生物、および遺伝子修飾を有する遺伝子修飾ポリヌクレオチド、ポリペプチド、細胞、組織、または生物の後代に等しくあてはまる。

10

【0085】

細胞に関して使用される場合の「組換え」という用語は、細胞が異種核酸もしくはタンパク質の導入により修飾されている、またはネイティブな核酸もしくはタンパク質の変化によって修飾されていること、あるいは細胞がそのように修飾された細胞から派生し、かつ派生した細胞が当該修飾を含むことを示す。したがって、例えば、「組換え細胞」または同様な意味合いで「組換え宿主細胞」は、ネイティブな（非組み換え）形態の細胞内に見られない遺伝子を発現するように修飾される場合、またはネイティブな遺伝子を異常発現するように修飾される場合があり、例えば、ネイティブな遺伝子は、過剰発現、過小発現される場合もしくは全く発現されない場合がある。例示的な態様では、「組換え細胞」または「組換え宿主細胞」は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作チオエステラーゼ変種などの、異種チオエステラーゼを発現するように操作されている。組換え細胞は、細菌、ウイルスまたは真菌などの微生物に由来することができる。加えて、組換え細胞は、植物または動物細胞に由来することができる。例示的な態様では、「組換え宿主細胞」または「組換え細胞」は、脂肪酸、脂肪エステル（例えば、ワックス、脂肪酸エステル、脂肪エステル、脂肪酸メチルエステル（FAME）、脂肪酸エチルエステル（FAEE）、脂肪アルコール酢酸エステル（FAce）、脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、炭化水素、脂肪アミン、末端オレフィン、内部オレフィン、ケトン、二官能性脂肪酸誘導体（例えば、オメガ-ヒドロキシ脂肪酸、オメガ-ヒドロキシジオール、オメガ-ヒドロキシFAME、オメガ-ヒドロキシFAEE）などを含むが、それに限定されない1種または複数種の脂肪酸誘導体を生産するために使用される。したがって、いくつかの例示的な態様では、「組換え宿主細胞」は、「生産宿主」または同様な意味合いで「生産宿主細胞」である。いくつかの例示的な態様では、組換え細胞は、1種または複数種のポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは、脂肪酸生合成酵素活性を有するポリペプチドをコードし、その際、組換え細胞は、炭素源の存在下でポリヌクレオチドを発現させるために有効な条件で培養したときに脂肪酸誘導体組成物を生産する。

20

30

【0086】

ポリヌクレオチドに関連して使用される場合、「組換え」または同様な意味合いで「異種」という用語は、ポリヌクレオチドが、ネイティブもしくは天然形態のポリヌクレオチドと比較して修飾されている、または天然変種のポリヌクレオチドと比較して修飾されていることを示す。例示的な態様では、組換えポリヌクレオチド（または組換えポリヌクレオチドのコピーもしくは相補体）は、その天然形態と異なるようにヒトの手によって操作されたポリヌクレオチドである。したがって、例示的な態様では、組換えポリヌクレオチドは、ネイティブな遺伝子の変異形態またはネイティブな遺伝子の天然変種の変異形態であり、その際、変異は、意図的なヒトの操作によって作製され、例えば、変異原性オリゴヌクレオチドを使用する飽和変異誘発、UV放射線または変異原性化学物質の使用などにより作製される。このような組換えポリヌクレオチドは、ネイティブまたは天然変種形態の遺伝子と比べて1つまたは複数の点変異、欠失および / または挿入を含む場合がある。同様に、第2のポリヌクレオチド（例えば、コード配列）と機能的に連結されるプロモーターを含むポリヌクレオチドは、「組換え」ポリヌクレオチドである。したがって、組換え

40

50

ポリヌクレオチドは、自然界に見られないポリヌクレオチドの組み合わせを含む。組換えタンパク質（前記）は、典型的には、組換えポリヌクレオチドから発現された組換えタンパク質であり、組換え細胞、組織、および生物は、組換え配列（ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド）を含むものである。

【0087】

本明細書に使用される「微生物」という用語は、一般的に顕微鏡レベルの生物を表す。微生物は、原核性または真核性であることができる。例示的な原核微生物には、例えば、細菌、古細菌、シアノバクテリアなどが含まれる。例示的な細菌は、大腸菌（*Escherichia coli*）である。例示的な真核微生物には、例えば、酵母、原生動物、藻類などが含まれる。例示的な態様では、「組換え微生物」は、遺伝的に改変され、それにより、異種核酸配列および／または異種タンパク質を発現または包含する微生物である。

10

【0088】

「生産宿主」または同様な意味合いで「生産宿主細胞」は、産物を生産するために使用される細胞である。本明細書開示の「生産宿主」は、典型的には、選択された遺伝子を発現もしくは過剰発現するように、または選択された遺伝子の発現減弱を有するように修飾されている。したがって、「生産宿主」または「生産宿主細胞」は、「組換え宿主」または同様な意味合いで「組換え宿主細胞」である。生産宿主の非限定的な例には、植物、動物、ヒト、細菌、酵母、シアノバクテリア、藻類、および／または糸状菌細胞が含まれる。例示的な「生産宿主」は、組換え大腸菌細胞である。

【0089】

20

本明細書に使用される「アシル-ACP」は、アシル鎖のカルボニル炭素とアシルキャリアータンパク質（ACP）のホスホパンテティニル部分のスルフヒドリル基との間に形成される、アシルチオエステルを表す。いくつかの例示的な態様では、アシル-ACPは、完全飽和アシル-ACPの合成中間体である。他の例示的な態様では、アシル-ACPは、不飽和アシル-ACPの合成中間体である。いくつかの例示的な態様では、アシル-ACPのアシル基の炭素鎖は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28個の炭素を有する。他の例示的な態様では、アシル-ACPのアシル基の炭素鎖は、中鎖長の鎖であり、6、7、8、9、10、11、または12個の炭素を有する。他の例示的な態様では、アシル-ACPのアシル基の炭素鎖は、8炭素長である。なお他の例示的な態様では、アシル-ACPのアシル基の炭素鎖は、10炭素長である。これらのアシル-ACPのそれぞれは、例えば、チオエステラーゼ、例えば、アシル-ACPを脂肪酸誘導体に変換する操作チオエステラーゼ変種などの酵素に対する基質である。

30

【0090】

本明細書に使用される「脂肪酸誘導体生合成経路」という表現は、脂肪酸誘導体を生産する生化学経路を表す。「脂肪酸誘導体生合成経路」を含む酵素は、したがって、本明細書において「脂肪酸誘導体生合成ポリペプチド」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体酵素」と称される。前記のように、「脂肪酸誘導体」という用語は、チオエステラーゼ反応を含む生化学経路から誘導される分子／化合物を含む。したがって、チオエステラーゼ酵素（例えば、チオエステラーゼ活性EC 3.1.1.14を有する酵素）は、「脂肪酸誘導体生合成ペプチド」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体酵素」である。チオエステラーゼに加えて、脂肪酸誘導体生合成経路は、所望の特徴を有する脂肪酸誘導体を生産するための追加的な酵素を含む場合がある。したがって、「脂肪酸誘導体酵素」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体生合成ポリペプチド」という用語は、まとめておよび個別に、発現または過剰発現されて脂肪酸誘導体を生産し得る酵素を表す。「脂肪酸誘導体酵素」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体生合成ポリペプチド」の非限定的な例には、例えば、脂肪酸シンセターゼ、チオエステラーゼ、アシル-CoAシンセターゼ、アシル-CoAレダクターゼ、アシルACPレダクターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルコールO-アシルトランスフェラーゼ、脂肪アルコール形成アシル-CoAレダクターゼ、脂肪酸デカルボキシラーゼ、脂肪アルデヒドデカルボニラーゼおよび／または酸化的デホルミラーゼ（oxidative deformylase）、カルボン酸レダクターゼ、脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラー

40

50

ぜ、エステルシンターゼなどが含まれる。「脂肪酸誘導体酵素」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体生合成ポリペプチド」は、基質を脂肪酸誘導体に変換する。例示的な態様では、脂肪酸誘導体酵素に対する適切な基質は、脂肪酸誘導体酵素により異なる第2の脂肪酸誘導体に変換される第1の脂肪酸誘導体であり得る。

【0091】

本明細書に使用される「培養物」という用語は、生存細胞を含む液体培地を表す。一態様では、培養物は、事前に定められた培地中で、制御された条件で増殖している細胞、例えば、選択された炭素源および窒素を含む液体培地中で増殖した組換え宿主細胞培養物を含む。「培養すること」または「培養」は、宿主細胞（例えば、組換え宿主細胞）の集団を液体または固体培地中で、適切な条件で増殖させることを表す。ある特定の態様では、培養することは、基質の最終産物への生物変換を表す。培養培地は、周知であり、このような培養培地の個別の成分は、商業的供給源、例えば、Difco（商標）培地およびBBL（商標）培地から入手可能である。非限定一例では、液体栄養培地は、10g/L ペプトンおよび10g/L 酵母エキスを含むYP培地のように、複合した窒素源、塩源、および炭素源を含む「富栄養培地」である。

10

【0092】

本明細書に使用される「力価」という用語は、単位体積の宿主細胞培養物あたりに生産される脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体の量を表す。力価は、特定の脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体、または例えば、所与の組換え宿主細胞培養物によって生産される飽和および不飽和中鎖脂肪酸誘導体の混合物もしくは脂肪酸誘導体組成物などの、異なる鎖長もしくは異なる機能性の脂肪酸誘導体の組み合わせの量を表し得る。

20

【0093】

本明細書に使用される1つまたは複数の「商業的力価」という表現は、市販の産物を経済的に実現可能にする、単位体積の宿主細胞培養物あたりに生産される脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体の量を表す。典型的には、商業的力価は、約10g/L（または同様な意味合いで10g/Kg）～約200g/L以上の範囲内である。したがって、商業的力価は、10g/L以上、20g/L以上、30g/L以上、40g/L以上、50g/L以上、60g/L以上、70g/L以上、80g/L以上、90g/L以上、100g/L以上、110g/L以上、120g/L以上、130g/L以上、140g/L以上、150g/L以上、160g/L以上、170g/L以上、180g/L以上、190g/L以上、200g/L以上である。

30

【0094】

本明細書に使用される、「宿主細胞」によって生産される「脂肪酸誘導体の収率」、例えば、中鎖脂肪酸誘導体または他の化合物の収率は、宿主細胞において投入炭素源が産物（すなわち、中鎖脂肪酸誘導体）に変換される効率を表す。したがって、「脂肪酸誘導体の収率」という表現は、所与の量の炭素基質から生産される産物の量を表す。収率パーセントは、理論的収率（炭素またはエネルギーの損失なしに理想的な条件で合成される産物）に対するパーセントである。したがって、収率パーセント＝（産物の質量／理論的収率の質量）×100である。収率は、特定の中鎖脂肪酸誘導体または脂肪酸誘導体の組み合わせを表す場合がある。

【0095】

40

本明細書に使用される「生産性」という用語は、単位体積の宿主細胞培養物あたり、単位時間あたりに生産される中鎖脂肪酸誘導体、例えば、6-炭素脂肪酸誘導体、8-炭素脂肪酸誘導体、10-炭素脂肪酸誘導体などの量を表す。生産性は、所与の宿主細胞培養物によって生産される特定の8および/もしくは10炭素脂肪酸誘導体、または脂肪酸誘導体もしくは他の化合物の組み合わせを表し得る。したがって、例示的な態様では、例えば、大腸菌などの組換え宿主細胞における操作チオエステラーゼ変種の発現は、対応する対照チオエステラーゼまたは他の適切な対照を発現している組換え宿主細胞と比較した、8および/もしくは10炭素脂肪酸誘導体ならびに/または他の化合物の生産性の増加をもたらす。本明細書に使用される「総脂肪種」および「総脂肪酸産物」および「総脂肪酸誘導体」という用語は、宿主細胞、例えば、操作チオエステラーゼ変種を発現する宿主細胞によって

50

生産される脂肪酸誘導体の量（力価）に関連して本明細書において互換的に使用される場合がある。総脂肪種などは、水素炎イオン化検出器装備ガスクロマトグラフィー（GC-FID）によって評価することができる。総脂肪酸誘導体分析に言及する場合、同じ用語が、例えば、総脂肪エステル、総脂肪アルコール、総脂肪アルデヒド、総脂肪アミン、および総遊離脂肪酸を意味するために使用される場合がある。特に、同じ用語が、総脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪アルコール酢酸エステルを意味するために使用される場合がある。

【0096】

本明細書に使用される「炭素源」という用語は、原核細胞または単純真核細胞の増殖のための炭素源として使用するのに適した基質または化合物を表す。炭素源は、非限定的に、ポリマー、糖質、酸、アルコール、アルデヒド、ケトン、アミノ酸、ペプチド、および気体（例えば、COおよびCO<sub>2</sub>）を含む、様々な形態であることができる。例示的な炭素源には、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、キシロース、およびアラビノースなどの単糖；フルクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖などのオリゴ糖；デンプン、セルロース、ペクチン、およびキシランなどの多糖；スクロース、マルトース、セロビオース、およびツラノースなどの二糖；ヘミセルロース、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース材料および変種；飽和もしくは不飽和脂肪酸、コハク酸エステル、乳酸エステル、および酢酸エステル；エタノール、メタノール、およびグリセロールなどのアルコール、またはその混合物が挙げられるが、それに限定されない。炭素源は、グルコースなどの光合成産物であることもできる。ある特定の態様では、炭素源は、バイオマスである。他の態様では、炭素源は、グルコースである。他の態様では、炭素源は、スクロースである。他の態様では、炭素源は、グリセロールである。他の態様では、炭素源は、単純炭素源である。他の態様では、炭素源は、再生可能な炭素源である。他の例では、炭素源は、天然ガスまたはメタン、エタン、プロパンなどの天然ガス成分である。

【0097】

本明細書に使用される、「バイオマス」という用語は、炭素源が由来する任意の生物学的物質を表す。いくつかの態様では、バイオマスは、生物変換に適した炭素源に加工される。他の態様では、バイオマスは、炭素源へのさらなる加工を必要としない。炭素源は、中鎖脂肪酸誘導体を含む組成物に変換することができる。

【0098】

バイオマスの例示的な供給源は、植物材料または植生、例えば、トウモロコシ、サトウキビ、スイッチグラス、コメ、コムギ、広葉樹、針葉樹、ヤシ、アサなどに由来する植物材料または植生である。バイオマスの別の例示的な供給源は、動物材料（例えば、牛糞肥料）などの代謝性廃棄物である。バイオマスのさらなる例示的な供給源には、藻類ならびに大型藻類およびケルプなどの海洋性植物が挙げられる。バイオマスには、非限定的に、グリセロール、発酵廃棄物、エンシレージ、藁、木材、パルプ、汚水、ごみ、セルロース一般廃棄物、自治体固形廃棄物、油脂化学廃棄物、および残飯（例えば、石けん、油および脂肪酸）を含む、工業、農業、林業、および家庭からの廃棄物も含まれる。「バイオマス」という用語は、また、糖質（例えば、単糖、二糖、または多糖）などの炭素源を表すことができる。

【0099】

産物（中鎖脂肪酸誘導体など）に関して本明細書に使用される「単離されている」という用語は、細胞成分、細胞培養培地、または化学もしくは合成前駆体から分離された産物を表す。本明細書開示の方法により生産された中鎖脂肪酸誘導体は、発酵ブロスおよび細胞質中で比較的混和性の可能性がある。したがって、例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体は、細胞外で有機相中に集まり、それにより、「単離されている」。

【0100】

本明細書に使用される「精製する」、「精製された」、または「精製」という用語は、例えば、単離または分離による、分子の環境からの当該分子の取り出しまたは単離を意味

10

20

30

40

50

する。「実質的に精製された」分子は、それが関連する他の成分を少なくとも約60%有しない(例えば、少なくとも約65%有しない、少なくとも約70%有しない、少なくとも約75%有しない、少なくとも約80%有しない、少なくとも約85%有しない、少なくとも約90%有しない、少なくとも約95%有しない、少なくとも約96%有しない、少なくとも約97%有しない、少なくとも約98%有しない、少なくとも約99%有しない)。本明細書に使用されるように、これらの用語は、試料からの混入物の除去も表す。例えば、混入物の除去は、試料中の中鎖脂肪酸誘導体または他の化合物のパーセンテージの増加をもたらすことができる。例えば、中鎖脂肪酸誘導体または他の化合物が組換え宿主細胞中で生産される場合、中鎖脂肪酸誘導体または他の化合物は、宿主細胞が溶解されたならば、タンパク質、核酸、および他の細胞成分などの宿主細胞バイオマスまたはその成分の除去によって精製することができる。精製後、試料中の中鎖脂肪酸誘導体または他の化合物を含むマロニル-CoA由来化合物のパーセンテージが増加する。「精製する」、「精製される」、および「精製」という用語は、絶対的な純度を必要としない相対的な用語である。したがって、例えば、中鎖脂肪酸誘導体が組換え宿主細胞において生産される場合、中鎖脂肪酸誘導体は、実質的に他の細胞成分(例えば、核酸、ポリペプチド、脂質、糖質、または他の炭化水素)から実質的に分離される。

10

#### 【0101】

本明細書に使用される、「減弱する」という用語は、弱める、低減する、または減らすことを意味する。例えば、ポリペプチドの活性は、例えば、ポリペプチド構造を修飾してその活性を低減することにより(例えば、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を修飾することにより)減弱することができる。

20

#### 【0102】

##### I. 緒言

上記のように、中鎖脂肪酸(MCFA)誘導体および中鎖脂肪酸(MCFA)由来産物に非常に大きな関心が寄せられている。MCFAは、その多数の好都合な特性が評価されている。実際に、MCFAは、例えば、界面活性剤、接着剤、乳化剤、食用油、香味料、芳香剤、モノマー、ポリマー、天然物農薬および抗菌薬などの、再生可能成分および生分解性成分として使用されている。

#### 【0103】

それらの多数の使用が理由で、工業的な用途および栄養補給食品の用途における中鎖脂肪酸誘導体化合物の需要は、過去数年にわたり上昇傾向にあり、増加し続けている。しかし、残念なことに、中鎖脂肪酸誘導体の供給は、植物または化学合成からの、他のより長鎖の遊離脂肪酸産物の生産と大きく結び付いており、したがって、供給は極めて変化しやすく不安定である。

30

#### 【0104】

したがって、当技術分野において必要なものは、MCFAおよびその誘導体のための確固とした安定なサプライチェーンを提供できる材料および方法である。幸いにも、本開示は、中鎖脂肪酸誘導体のための確固とした、選択的で安定なサプライチェーンを支援するために必要なツールおよび方法を提供し、それで、この必要性および他の必要性に対応するものである。

40

#### 【0105】

##### II. 中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作チオエステラーゼ変種A. 一般的な方法

本開示は、組換え遺伝学の分野における常用の技法を利用する。分子生物学および遺伝学における一般的な方法および用語を開示している基礎的なテキストには、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 4th edition (Cold Spring Harbor, N.Y. 2012); Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)およびSupplements 1-115 (1987-2016)が挙げられる。本開示は、生化学の分野における常用の技法も利用する。生化学における一般的な方法および用語を開示している基礎的なテキストには

50

、例えば、Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition, David L. Nelson and Michael M. Cox eds. W.H. Freeman (2012)が挙げられる。本開示は、工業発酵における常用の技法も利用する。発酵における一般的な方法および用語を開示している基礎的なテキストには、例えば、Principles of Fermentation Technology, 3rd Edition by Peter F. Stanbury, Allan Whitaker and Stephen J. Hall. Butterworth-Heinemann (2016); Fermentation Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, Arnold L. Demain and A.R. Allman eds. CRC Press (2007)が挙げられる。本開示は、有機化学の分野における常用の技法も利用する。有機化学における一般的な方法および用語を開示している基礎的なテキストには、例えば、Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques, Stephane Caron ed., John Wiley and Sons Inc. (2011); The Synthetic Organic Chemist's Companion, Michael C. Pirrung, John Wiley and Sons Inc. (2007); Organic Chemistry, 9th Edition - Francis Carey and Robert Giuliano, McGraw Hill (2013)が挙げられる。

10

#### 【0106】

核酸について、サイズは、キロ塩基 (kb) または塩基対 (bp) のいずれかで示される。推定値は、典型的には、アガロースもしくはアクリルアミドゲル電気泳動、配列決定された核酸、または公開されたDNA配列から得られる。タンパク質について、サイズは、キロダルトン (kDa) またはアミノ酸残基数で示される。タンパク質のサイズは、ゲル電気泳動、配列決定されたタンパク質、得られたアミノ酸配列、または公開されたタンパク質配列から推定される。

20

#### 【0107】

市販されていないオリゴヌクレオチドは、例えば、Beaucage & Caruthers, Tetrahedron Letts. 22:1859-1862 (1981)によって最初に記載された固相ホスホロアミダイトリエステル法により、Van Devanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984)に記載された自動合成機を使用して、化学合成することができる。オリゴヌクレオチドの精製は、例えば、本来のアクリルアミドゲル電気泳動またはPearson & Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983)に記載されたような陰イオン交換HPLCのいずれかによる。

#### 【0108】

クローニングされた遺伝子および合成オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、Wallace et al., Gene 16:21-26 (1981)の二本鎖テンプレートを配列決定するための連鎖終止反応法 (chain termination method) を使用してクローニングした後に検証することができる。

30

#### 【0109】

### B. チオエステラーゼ

#### 1. 全般

チオエステラーゼまたはチオールエステルヒドロラーゼは、チオエステルの、酸およびチオールへの加水分解を触媒する。チオエステラーゼ (TE) は、異なる基質に対するその活性に基づきEC 3.1.2.1からEC 3.1.2.27に分類され、多くが未分類 (EC 3.1.2.-) のままである (例えば、Cantu, D.C., et al. (2010) Protein Science 19:1281-1295を参照されたい)。TEは、多様な供給源から得ることができる。例示的なTEには、植物TE (例えば、Voelker and Davies, J. Bact., Vol., 176, No. 23, pp. 7320-27, 1994、米国特許第5,667,997号、および同第5,455,167号を参照されたい)、細菌TE (例えば、米国特許第9,175,234号を参照されたい) ; シアノバクテリアTE、ならびに藻類、哺乳動物、昆虫、および真菌起源が挙げられる。

40

#### 【0110】

特に、EC番号3.1.2.14に分類されるアシル-アシルキャリアータンパク質 (ACP) チオエステラーゼ (TE) は、アシル-ACPのチオエステル結合を選択的に加水分解し、遊離脂肪酸 (FFA) およびACPを放出する。したがって、アシル-ACPチオエステラーゼは、アル

50

キルチオエステルのそれらの加水分解産物の結果として生じる脂肪酸誘導体の炭素鎖長を決定するのに重要な役割を果たす。

【 0 1 1 1 】

クフェア フーケリアナ ( *Cuphea hookeriana* ) 由来FatB2チオエステラーゼ ( ChFat B2 ) は、例示的なアシル-ACPチオエステラーゼである。ChFatB2は、本来、中鎖長脂肪酸誘導体に対して高い選択性を有する。しかし、この植物酵素は、工業用微生物である大腸菌などの微生物に発現された場合に低い活性を有する。本明細書に詳細に開示されるように、微生物において中鎖長脂肪酸を生産する能力が低いことは、それが低い活性であること、C8およびC10に対する選択性が不十分なこと、および溶解性に乏しいことの結果である。

10

【 0 1 1 2 】

クフェア フーケリアナ由来野生型ChFatB2のポリペプチド/タンパク質配列は、GenBankアクセッション番号AAC49269を有する ( 例えば、Dehesh, K., et al. (1996) The Plant Journal 9(2):167-72を参照されたい)。本明細書開示のChFatB2ポリペプチドのアミノ酸配列は、細菌細胞質中での活性型酵素の生産を容易にするために、野生型タンパク質のN末端の植物移行リーダー配列を含む最初の88アミノ酸が除去されてメチオニン ( M ) に置換されている野生型配列を含む。したがって、野生型 ( wt ) ChFatB2としての本明細書開示の野生型ChFatB2チオエステラーゼのアミノ酸配列を、下にSEQ ID NO:1として示す。

MLPDWSRLLTAITTVFVKSKRPDMHDRKSKRPDMLVDSFGLESTVQDGLVFRQSFS  
IRSYEIGTDRTASIELTMNHLQETSLNHCKSTGILLDGFGRTEMCKRDLIWVVIKMQ  
IKVNRYPAWGDTVEINTRFSRLGKIGMGRDWLISDCNTGEILVRATSAYAMMNQKT  
RRLSKLPYEVHQEIVPLFVDSPVIEDSDLKVHKFKVKTGDSIQKGLTPGWNDLVDVNQ  
HVSINVKYIGWILESMPTVEVLETQELCSLALEYRRECGRDSVLESVTAMDPSKVGVR  
SQYQHLLRLEDGTAIVNGATEWRPKNAGANGAISTGKTSNGNSVS (SEQ ID NO:1)

20

【 0 1 1 3 】

SEQ ID NO:1の活性は、飽和8炭素 ( 8:0 ) および飽和10炭素 ( 10:0 ) のACP基質 ( 例えば、Dehesh, K., et al. (1996)、前記を参照されたい) に特異的なことが公知である。しかし、残念なことに、SEQ ID NO:1によって保有される中鎖長脂肪酸誘導体生産能力は、中鎖脂肪酸誘導体の大規模生産には不十分である。したがって、中鎖脂肪酸誘導体の安定的で信頼性のある供給の必要性に対応して、例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を生産するように、SEQ ID NO:1は改変される。

30

【 0 1 1 4 】

したがって、例示的な態様では、本開示は、SEQ ID NO:1を有する酵素と比較して、例えば、中鎖脂肪酸メチルエステル ( FAME ) および中鎖脂肪酸エチルエステル ( FAEE ) などの中鎖脂肪エステル、中鎖脂肪アルコール酢酸エステル ( FACE)、中鎖脂肪アミン、中鎖脂肪アルデヒド、中鎖脂肪アルコール、中鎖炭化水素、中鎖脂肪ケトン、中鎖アルカン、中鎖末端オレフィン、中鎖内部オレフィン、中鎖ヒドロキシ脂肪酸誘導体、中鎖二官能性脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪二酸、中鎖脂肪ジオール、不飽和中鎖脂肪酸誘導体などの、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種ポリペプチドを提供する。

40

【 0 1 1 5 】

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する、SEQ ID NO:1の操作TE変種 ( 例えば、SEQ ID NO:16 ~ SEQ ID NO: 46 ) は、非変種 / 非操作対照チオエステラーゼ、例えば、SEQ ID NO:1と比較して、増加した実効表面正電荷を有する。

50

## 【 0 1 1 6 】

## 2. 中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作チオエステラーゼ変種についてのアッセイ

例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種が、操作TE変種を含む細菌株（すなわち、試験株）によって生産される中鎖脂肪酸誘導体（例えば、遊離脂肪酸（FFA）、脂肪酸エチルエステル、FAEE、脂肪アルコール（FALC）、脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）など）を測定すること、およびこれらの中鎖脂肪酸誘導体を、対照TEを含むことを除き試験株と同質遺伝子的である適切な対照試験株によって生産される中鎖脂肪酸誘導体（例えば、FFA、FAEE、FALC、FACEなど）の測定値と比較することによって同定される。

10

## 【 0 1 1 7 】

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の総力価が測定され、試験株と対照株との間で比較される。いくつかの例示的な態様では、試験株によって生産される特定の中鎖脂肪酸誘導体（例えばC8脂肪酸誘導体）を含む中鎖脂肪酸誘導体の総力価のパーセントが測定され、対照TE（例えば、SEQ ID NO:1）を含むことを除き試験株と同質遺伝子的である適切な対照株によって生産される特定の中鎖脂肪酸誘導体を含む中鎖脂肪酸誘導体の総力価のパーセントと比較される。

## 【 0 1 1 8 】

例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体をアッセイするために水素炎イオン化検出器装備ガスクロマトグラフィー（GC-FID）が使用される。GC-FIDは、当技術分野において公知である（例えば、Adlard, E. R.; Handley, Alan J. (2001). Gas chromatographic techniques and applications. London: Sheffield Academicを参照されたい）。しかし、定量および分析に適した任意の方法、例えば、質量分析（MS）、ガスクロマトグラフィー-質量分析（GC-MS）、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）、薄層クロマトグラフィー（TLC）などが使用され得る。

20

## 【 0 1 1 9 】

## C. 操作チオエステラーゼ変種を製造する方法

操作TE変種は、当技術分野において公知の任意の方法によって調製することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、前記を参照されたい）。したがって、例示的な態様では、操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列を調製するために変異誘発が使用され、次に中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性について操作TE変種をスクリーニングすることができる。他の例示的な態様では、次に中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性についてスクリーニングすることができる操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列の化学合成によって調製される（例えば、M.H. Caruthers et al. (1987) Methods in Enzymology Volume 154, Pages 287-313; Beaucage, S.L. and Iyer, R.P. (1992) Tetrahedron 48(12):2223-2311を参照されたい）。

30

## 【 0 1 2 0 】

変異誘発方法は、当技術分野において周知である。中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を調製するための例示的な変異誘発技法には、例えば、部位飽和変異誘発（例えば、Chronopoulou EG1, Labrou NE. Curr. Protoc. Protein Sci. 2011 Feb; Chapter 26:Unit 26.6, John Wiley and Sons, Inc; Steffens, D.L. and Williams., J.G.K (2007) J Biomol Tech. 18(3): 147-149; Siloto, R.M.P and Weselake, R.J. (2012) Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 1(3):181-189を参照されたい）が挙げられる。

40

## 【 0 1 2 1 】

中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を調製するための別の例示的な変異誘発技法には、トランスファーPCR（tPCR）が挙げられる。例えば、Er ijman A., et al. (2011) J. Struct. Biol. 175(2):171-7を参照されたい。

## 【 0 1 2 2 】

50

他の例示的な変異誘発技法には、例えば、エラープローンポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が挙げられる（例えば、Leung et al. (1989) Technique 1:11-15；およびCaldwell et al. (1992) PCR Methods Applic. 2:28-33を参照されたい）。

【0123】

中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を調製するための別の例示的な変異誘発技法には、オリゴヌクレオチド特異的な変異誘発を使用して、関心対象の任意のクローニングされたDNAに部位特異的な変異を作製することが挙げられる（例えば、Reidhaar-Olson et al. (1988) Science 241:53-57を参照されたい）。

【0124】

上記の方法などの合成または変異誘発の任意の方法の結果として生じる変異誘発ポリヌクレオチドが、次に、適切なベクター中にクローニングされ、変異誘発ポリヌクレオチドによってコードされる、被作用ポリペプチドの活性が、上に開示されるように評価される。

【0125】

当業者は、本明細書開示のプロトコルおよび手順を改変することができること、ならびにこのような改変が、本開示の変形によることを認識している。例えば、方法の段階がある特定の順序で記載されている場合、これらの段階の順序は、改変され、かつ/または平行してもしくは順次に行われることができる。

【0126】

### III. 宿主細胞および宿主細胞培養物

本開示を考慮して、当業者は、本明細書において考えられる態様のいずれかが、開示される操作TE変種をコードする1つまたは複数の核酸配列の導入を介して遺伝子修飾することができる任意の宿主細胞または微生物を用いて実施され得ると認識している。したがって、本明細書開示の組換え微生物は、宿主細胞として機能し、かつ中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを、宿主細胞における操作TE変種ポリペプチドの発現を容易にする、機能的に連結される調節配列と一緒に含む1つまたは複数のポリヌクレオチド配列を含む。

【0127】

適切な宿主細胞を提供する例示的な微生物には、非限定的に、エシェリキア属（*Escherichia*）、バチルス属（*Bacillus*）、ラクトバチルス属（*Lactobacillus*）、ザイモモナス属（*Zymomonas*）、ロドコッカス属（*Rhodococcus*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、アスペルギルス属（*Aspergillus*）、トリコデルマ属（*Trichoderma*）、ニューロスポラ属（*Neurospora*）、フザリウム属（*Fusarium*）、フミコラ属（*Humicola*）、リゾムコール属（*Rhizomucor*）、クルイペロミセス属（*Kluyveromyces*）、ピキア属（*Pichia*）、ムコール属（*Mucor*）、ミセリオフトラ属（*Myceliophthora*）、マリノバクター属（*Marinobacter*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、ファネロカエテ属（*Phanerochaete*）、ヒラタケ属（*Pleurotus*）、ハウロクタケ属（*Trametes*）、クリソスポリウム属（*Chrysosporium*）、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）、ステノトロホモナス属（*Stenotrophomonas*）、シゾサッカロミセス属（*Schizosaccharomyces*）、ヤロウイア属（*Yarrowia*）、またはストレプトミセス属（*Streptomyces*）の細胞が挙げられる。いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、グラム陽性細菌細胞である。他の例示的な態様では、宿主細胞は、グラム陰性細菌細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は、大腸菌細胞である。他の例示的な態様では、宿主細胞は、バチルス レンツス（*Bacillus lentus*）細胞、バチルス プレビス（*Bacillus brevis*）細胞、バチルス ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）細胞、バチルス リケノホルミス（*Bacillus licheniformis*）細胞、バチルス アルカロフィルス（*Bacillus alkalophilus*）細胞、バチルス コアグラルス（*Bacillus coagulans*）細胞、バチルス サーキュランス（*Bacillus circulans*）細胞、バチルス プミリス（*Bacillus pumilis*）細胞、バチルス チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）細胞、バチルス クラウジイ（*Bacillus clausii*）細胞、バチルス メガテリウム（*Bacillus megaterium*）細胞、枯草菌（*Bacillus subtilis*）細胞、またはバチルス アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）

10

20

30

40

50

細胞である。

【 0 1 2 8 】

なお他の例示的な態様では、宿主細胞は、トリコデルマ コニンギー (*Trichoderma koningii*) 細胞、トリコデルマ ビリデ (*Trichoderma viride*) 細胞、トリコデルマ リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 細胞、トリコデルマ ロンギブラキアツム (*Trichoderma longibrachiatum*) 細胞、アスペルギルス アワモリ (*Aspergillus awamori*) 細胞、アスペルギルス フミガテス (*Aspergillus fumigates*) 細胞、アスペルギルス フェチダス (*Aspergillus foetidus*) 細胞、アスペルギルス ニジュランス (*Aspergillus nidulans*) 細胞、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) 細胞、アスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 細胞、フミコラ インソレンス (*Humicola insolens*) 細胞、フミ  
10  
コラ ラヌギノーゼ (*Humicola lanuginosa*) 細胞、ロドコッカス オパカス (*Rhodococcus opacus*) 細胞、リゾムコール ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) 細胞、またはムコール ミケイ (*Mucor michei*) 細胞である。なお他の例示的な他の態様では、宿主細胞は、ストレプトミセス リビダンス (*Streptomyces lividans*) 細胞またはストレプトミセス ムリヌス (*Streptomyces murinus*) 細胞である。さらに他の態様では、宿主細胞は、アクチノミセス (*Actinomycetes*) 細胞である。いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である。

【 0 1 2 9 】

なお他の例示的な態様では、宿主細胞は、真核植物、藻類、シアノバクテリア、緑色硫黄細菌、緑色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌、紅色非硫黄細菌、極限環境微生物、酵母、真菌  
20  
、その操作生物、または合成生物の細胞である。いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、パニクム ビルガツムス (*Panicum virgatum*)、ミスカンタス ギガンテウス (*Miscanthus giganteus*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ボトリオコッカス ブラウニー (*Botryococcus braunii*)、カラミドモナス ラインハルディー (*Chlamydomonas reinhardtii*)、ドナリエラ サリナ (*Dunaliella salina*)、サーモシネココッカス エロンガツス (*Thermosynechococcus elongatus*)、シネココッカス エロンガツス (*Synechococcus elongatus*)、シネココッカス スピーシーズ (*Synechococcus* sp.)、シネコシスティス スピーシーズ (*Synechocystis* sp.)、クロロビウム テピヅム (*Chlorobium tepidum*)、クロロフレクサス オーランティカス (*Chloroflexus auranticus*)、クロマトウム ビノスム (*Chromatium vinosum*)、ロドスピリルム ルブルム (*Rhodospirillum rubrum*)、ロドバクター カプスラタス (*Rhodobacter capsulatus*)、ロドシュードモナス パルスリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、クロストリジウム ルジュンダリー (*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム サーモセルム (*Clostridium thermocellum*)、またはペンシリウム クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) 由来の細胞である。いくつかの他の例示的な態様では、宿主細胞は、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス セレビスエ、ヤロウイア リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、シゾサッカロミセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、シュードモナス フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) またはザイモナス モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来の細胞である。なおさらに例示的な態様では、宿主細胞  
30  
40  
は、シネココッカス スピーシーズ PCC 7002、シネココッカス スピーシーズ PCC 7942、またはシネコシスティス スピーシーズ PCC 6803 の細胞である。いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、CHO細胞、COS細胞、VERO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、Cv1細胞、MDCK細胞、293細胞、3T3細胞、またはPC12細胞である。いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、大腸菌細胞である。いくつかの例示的な態様では、大腸菌細胞は、B株、C株、K株、またはW株の大腸菌細胞である。

【 0 1 3 0 】

いくつかの例示的な態様では、宿主細胞は、どの他の異種酵素およびどのネイティブな酵素経路が宿主細胞中に存在するかに応じて、宿主細胞ごとに互換的に使用することができる任意の遺伝子操作および遺伝子改変を含む。例示的な一態様では、宿主細胞は、fadE

10

20

30

40

50

および/またはfhuA欠失を任意で含む。他の例示的な態様では、宿主細胞は、任意で、200mg/Lを超える脂肪酸誘導体、1000mg/Lを超える脂肪酸誘導体、1200mg/Lを超える脂肪酸誘導体、1700mg/Lを超える脂肪酸誘導体、2000mg/Lを超える脂肪酸誘導体、または3000mg/Lを超える脂肪酸誘導体を生産する能力を有するように操作される。上記の任意で操作された株は、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する有用な操作TE変種の同定および特徴付けのために、ならびに中鎖脂肪酸誘導体を生産する改良された能力を有する操作TE変種を発現している場合は、中鎖脂肪酸誘導体の選択的生産のために有用である。

#### 【0131】

本明細書下記に詳細に論じられるように、いくつかの例示的な態様では、操作TE変種ポリペプチドを発現するために使用される宿主細胞または宿主微生物は、例えば、脂肪エステル、脂肪アルコール、脂肪アルコール酢酸エステル、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、脂肪アミン、脂肪アルデヒド、二官能性脂肪酸誘導体、二酸、アルカン、アルケンまたはオレフィン、ケトンなどの1種または複数種の特定の脂肪酸誘導体の生産を増加させることができる酵素活性を有する遺伝子をさらに発現する。

#### 【0132】

例えば、entD遺伝子は、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼをコードする。ネイティブな大腸菌entD、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼの過剰発現は、CarBなどのカルボン酸レダクターゼを発現している細胞への任意の遺伝子修飾である。それは、アポ-CarBからホロ-CarBへのCarBの改良された活性化をできるようにし、それにより、ホロ-CarBによる遊離脂肪酸から脂肪アルデヒドへの改良された変換を可能にし、それを次に脂肪アルデヒドレダクターゼにより脂肪アルコールに変換できるからである。例えば、米国特許第9,340,801号を参照されたい。

#### 【0133】

例示的な態様では、操作TE変種ポリペプチドを発現させるために使用される宿主細胞または宿主微生物は、脂肪エステルの生産のためのエステルシンターゼ活性(E.C. 2.3.1.75)をさらに発現する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、脂肪アルコールの生産のためのアシル-ACPレダクターゼ(AAR)(E.C. 1.2.1.80)活性および/またはアルコールデヒドロゲナーゼ活性(E.C. 1.1.1.1.)および/または脂肪アルコールアシル-CoAレダクターゼ(FAR)(E.C. 1.1.1.\*)活性および/またはカルボン酸レダクターゼ(CAR)(E.C. 1.2.99.6)活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、脂肪アルデヒドの生産のためのアシル-ACPレダクターゼ(AAR)(E.C. 1.2.1.80)活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、アルカンおよびアルケンの生産のためのアシル-ACPレダクターゼ(AAR)(E.C. 1.2.1.80)活性およびデカルボニラーゼまたは脂肪アルデヒド酸化的脱ホルミル化活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、脂肪アルコールの生産のためのアシル-CoAレダクターゼ(E.C. 1.2.1.50)活性、およびアシル-CoAシンセターゼ(FadD)(E.C. 2.3.1.86)活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、脂肪エステルの生産のためのエステルシンターゼ活性(E.C. 2.3.1.75)およびアシル-CoAシンセターゼ(FadD)(E.C. 2.3.1.86)活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、ケトンの生産のためのOleA活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、内部オレフィンの生産のためのOleBCD活性を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、脂肪アルコールの生産のためのアシル-ACPレダクターゼ(AAR)(E.C. 1.2.1.80)活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性(E.C. 1.1.1.1.)を有する。別の例示的な態様では、宿主細胞は、末端オレフィンを製造するためのデカルボキシラーゼ活性を有する。微生物および微生物細胞における酵素活性の発現は、例えば、以下の米国特許第9,133,406号；同第9,340,801号；同第9,200,299号；同第9,068,201号；同第8,999,686号；同第8,658,404号；同第8,597,922号；同第8,535,916号；同第8,530,221号；同第8,372,610号；同第8,323,924号；同第8,313,934号；同第8,283,143号；同第8,268,599号；同第8,183,028号；同第8,110,670号；同第8,110,093号；および同第8,097,439号によって教示されている。

10

20

30

40

50

## 【0134】

いくつかの例示的な態様では、操作TE変種ポリペプチドを発現させるために使用される宿主細胞または微生物は、例えば、脂肪エステル、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、脂肪アルコール、脂肪アルコール酢酸エステル、脂肪アミン、脂肪アミド、脂肪アルデヒド、二官能性脂肪酸誘導体、二酸、などの1種または複数種の特定の脂肪酸誘導体を生産するために、上方調節または過剰発現されているある特定のネイティブな酵素活性を含む。

## 【0135】

いくつかの例示的な態様では、組換え宿主細胞は、中鎖脂肪酸メチルエステル (FAME) または中鎖脂肪酸エチルエステル (FAEE) などの中鎖脂肪エステル、中鎖脂肪アルコール酢酸エステル (FACE)、中鎖脂肪アルコール (FALC)、中鎖脂肪アミン、中鎖脂肪アルデヒド、中鎖二官能性脂肪酸誘導体、中鎖二酸、中鎖アルカン、中鎖オレフィンなどを生産する。

10

## 【0136】

中鎖脂肪酸誘導体は、典型的には、培養培地から回収され、かつ/または宿主細胞から単離される。例示的な態様では、脂肪酸誘導体は、培養培地 (細胞外) から回収される。別の例示的な態様では、脂肪酸誘導体は、宿主細胞 (細胞内) から単離される。別の例示的な態様では、脂肪酸誘導体または非脂肪酸化合物は、培養培地から回収され、宿主細胞から単離される。

## 【0137】

特定の脂肪酸誘導体の分布ならびに脂肪酸誘導体組成物の成分の鎖長および飽和度を決定するために、宿主細胞によって生産される脂肪酸誘導体組成物は、当技術分野において公知の方法、例えば、水素炎イオン化検出器装備ガスクロマトグラフィー (GC FID) を使用して分析することができる。同様に、当技術分野において周知の方法により他の化合物を分析することができる。

20

## 【0138】

## IV. 組換え宿主細胞および培養物を製造する方法

当技術分野において公知の任意の方法を使用して宿主細胞を操作して、脂肪酸誘導体および/もしくは脂肪酸誘導体組成物または他の化合物を生産することができる。例示的な方法は、変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または本明細書開示の他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、例えば、発現ベクターの使用を含む。当業者は、多種多様なウイルスおよび非ウイルスベクターを本明細書開示の方法に使用できることを認識している。

30

## 【0139】

いくつかの例示的な態様では、変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド (または遺伝子) 配列は、変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列に機能的に連結されるプロモーターを含む組換えベクターにより宿主細胞に提供される。いくつかの例示的な態様では、プロモーターは、発生調節的、オルガネラ特異的、組織特異的、誘導性、構成的、または細胞特異的プロモーターである。いくつかの例示的な態様では、プロモーターは、ラクトースまたはイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) の添加により誘導可能である。

40

## 【0140】

変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が調製および単離された後、様々な方法が、発現カセット、ベクターおよび他のDNA構築物を構築するために使用され得る。変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または他の脂肪酸生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットは、多種多様な方法で構築することができる。専門家は、発現構築物をうまく形質転換し、選択し、宿主細胞において増やすために、発現構築物/ベクター上に存在しなければならない遺伝要素を十分に分かっている。変異体または操作TE変種をコードするポリ

50

ヌクレオチド配列などのポリヌクレオチド配列の操作のための技法、例えば、発現ベクター中に核酸配列をサブクローニングすること、標識プローブ、DNAハイブリダイゼーションなどは、一般的に、例えば、Sambrook, et al., 前記; Current Protocols in Molecular Biology, 前記に記載されている。

#### 【0141】

異種DNA配列、例えばプロモーター配列に連結される、変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:16～SEQ NO:46など）および/または他の脂肪酸生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA構築物を、多種多様なベクターに挿入することができる。いくつかの例示的な態様では、選ばれたベクターは、細菌、例えば大腸菌の形質転換に有用な発現ベクターである。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、コスミド、人工染色体、核酸断片などであり得る。このようなベクターは、当業者に周知の組換えDNA技法の使用によって容易に構築される（例えば、Sambrook et al., 前記を参照されたい）。変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、次に、標的宿主細胞に形質移入/形質転換される場合がある。うまく形質転換された細胞は、次に、当技術分野において周知の方法により適切なマーカー遺伝子の存在に基づき選択される。

10

#### 【0142】

いくつかの組換えベクターは、細菌および他の微生物の安定形質転換/形質移入に使用するために当業者に利用可能である（例えば、Sambrook, et al., 前記を参照されたい）。適切なベクターは、当業者によって容易に選ばれる。例示的な態様では、公知のベクターは、変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を生み出すために使用される。

20

#### 【0143】

典型的には、形質転換ベクターは、1つもしくは複数の変異体もしくは操作TE変種をコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチド配列ならびに/または例えば、プロモーター配列、および選択マーカーと機能的に連結される他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。このような形質転換ベクターは、また、典型的には、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終結部位、および/または必要に応じてポリアデニル化シグナルを含む。

#### 【0144】

したがって、変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に加えて、本明細書開示のように調製される発現構築物は、追加的な要素を含む場合がある。例示的な態様では、変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物は、また、異種タンパク質の発現が高まり得るようにエンハンサー配列を含む。当技術分野において公知のように、エンハンサーは、典型的には、転写開始部位に対して5'側に見られ、それらは、しばしば、コード配列の5'または3'側のいずれかに、前進方向または逆行方向に挿入されることができる。

30

#### 【0145】

上述のように、形質転換/発現ベクターは、典型的には、形質転換体の容易な同定を可能にするための選択マーカー遺伝子および/またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を含む。例示的な選択マーカー遺伝子には、抗生物質耐性（例えば、カナマイシン、アンピシリンなどに対する耐性）をコードする遺伝子が挙げられるが、それに限定されない。例示的なスクリーニング可能マーカーには、組換えタンパク質のC末端に導入されたアミノ酸6つのヒスチジンタグが挙げられる。

40

#### 【0146】

例示的な態様では、選択マーカー遺伝子またはスクリーニング可能マーカー遺伝子が、対象となる特定の遺伝子として、またはそれに加えて採用されて、形質転換体を同定する能力を提供または増強する。数多くの選択マーカー遺伝子が、当技術分野において公知で

50

ある（例えば、Sambrook et al、前記を参照されたい）。

【0147】

いくつかの例示的な態様では、発現ベクターは、さらに、発現される異種核酸のコード配列と繋がった配列を含み、それらは、最初の翻訳産物から翻訳後に除去される。例示的な一態様では、翻訳後に除去される配列は、細胞内膜または細胞外膜中へのまたはそれを通過するタンパク質の輸送を促進し、それにより、細胞内および/または細胞外の区画へのタンパク質の輸送を促進する。例示的な態様では、翻訳後に除去される配列は、新生タンパク質を細胞内タンパク質分解から保護する。例示的な一態様では、選択されたコード配列と一緒に、上流およびそのリーディングフレーム中にリーダーペプチド配列をコードする核酸セグメントが、宿主細胞におけるコード配列の組換え発現に使用される。

10

【0148】

別の例示的な態様では、発現構築物は、細菌複製起点、例えば、ColE1起点を含む。さらに別の例示的な態様では、発現構築物/ベクターは、細菌選択マーカー、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、ハイグロマイシン、ネオマイシンまたはクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む。

【0149】

当技術分野において周知のように、発現構築物は、典型的には、ベクター構築を容易にするための制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。例示的な制限エンドヌクレアーゼ認識部位には、例えば、制限エンドヌクレアーゼNotI、AatII、SacII、PmeI HindIII、PstI、EcoRI、およびBamHIのための認識部位が挙げられるが、それに限定されない。

20

【0150】

DNA構築物、変異体または操作TE変種を機能的にコードするポリヌクレオチド配列および/または異種DNA配列、例えば、プロモーター配列、マーカー配列に連結される他の脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；精製部分；ポリヌクレオチド配列と機能的にカップリングされた分泌配列；標的化配列などは、細胞を形質転換し、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する組換え宿主細胞を生産するために使用される。変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を用いた形質転換のための例示的な宿主細胞は、上記第III節に詳細に論じられている。

【0151】

30

適切な形質転換技法が、専門家によって容易に選ばれる。当業者に利用可能な例示的な形質転換/形質移入方法には、例えば、エレクトロポレーション、塩化カルシウム形質転換などが挙げられ、このような方法は、専門家に周知である（例えば、Sambrook、前記を参照されたい）。したがって、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームおよび機能的に連結される調節配列を含むポリヌクレオチド配列は、組換え宿主細胞の染色体に組み込まれる、組換え宿主細胞に内在する1つもしくは複数のプラスミド発現システムに組み入れられる、またはその両方であることができる。

【0152】

本明細書開示の発現ベクターは、典型的には、変異体もしくは操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列および/または脂肪酸誘導体生合成経路ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を宿主細胞におけるポリヌクレオチド配列の発現に適した形態で含む。当業者に認識されるように、発現ベクターの設計は、例えば、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のポリペプチドの発現レベルなどの要因に依存することができる。

40

【0153】

V. 組換え宿主細胞の評価

例示的な態様では、操作TE変種ポリペプチドの活性は、組換え宿主細胞を培養することおよび組換え宿主細胞によって生産される、例えば、脂肪酸誘導体組成物（例えば、中鎖脂肪エステル、中鎖脂肪アルコール、中鎖脂肪アルデヒドなど）または他の化合物の特徴を測定することによって決定される。例示的な態様では、脂肪酸誘導体または他の化合物の組成、力価、収率および/または生産性が分析される。

50

## 【0154】

中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有することについて、操作TE変種ポリペプチドおよびその断片を、常用の方法を使用してアッセイすることができる（例えば、本明細書下記の実施例4を参照されたい）。

## 【0155】

## IV. 組換え宿主細胞から得られる産物

組換え宿主細胞により中鎖脂肪酸誘導体の生産を増加させるための戦略は、例えば、生産宿主におけるネイティブな脂肪酸生合成遺伝子の過剰発現および/または同じもしくは異なる生物由来の異種脂肪酸生合成遺伝子の発現によって、脂肪酸生合成経路を経由する流動を増加させることを含む。

10

## 【0156】

したがって、例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する組換え宿主細胞は、操作TE変種に加えて、1種または複数種の「脂肪酸誘導体生合成ポリペプチド」または同様な意味合いで「脂肪酸誘導体酵素」をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド配列を含むように操作される。微生物を使用して脂肪酸誘導体化合物（例えば、脂肪酸エステル、アルカン、オレフィン、脂肪ケトン、脂肪アルコール、脂肪アルコール酢酸エステルなど）を生産して、バイオマス由来糖を所望の産物に変換するための脂肪酸誘導体生合成経路の代謝操作は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第9,133,406号；同第9,340,801号；同第9,200,299号；同第9,068,201号；同第8,999,686号；同第8,658,404号；同第8,597,922号；同第8,535,916号；同第8,530,221号；同第8,372,610号；同第8,323,924号；同第8,313,934号；同第8,283,143号；同第8,268,599号；同第8,183,028号；同第8,110,670号；同第8,110,093号；および同第8,097,439号を参照されたい。代謝的に操作された株は、工業規模のバイオリアクター中で培養することができ、結果として生じた産物を、従来の化学工学技法および生化学工学技法を使用して精製することができる。

20

## 【0157】

当技術分野において周知のように、チオエステラーゼは、アルキルチオエステルの遊離脂肪酸（FFA）への加水分解を触媒する。したがって、チオエステラーゼは、脂肪酸および脂肪酸誘導体のアシル鎖長分布を決定することに役割を果たす（例えば、Dehesh (1996) 前記、PNAS (1995) 92(23): 10639-10643を参照されたい）。したがって、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する組換え宿主細胞は、典型的には、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む（例えば、SEQ ID NO:3、および表7に示される変種）。いくつかの例示的な態様では、このような組換え宿主細胞は、操作TE変種を含まない適切な対照宿主細胞、例えば、操作TE変種の代わりに対照チオエステラーゼ（例えば、SEQ ID NO:1）を有する同質遺伝子の対照宿主細胞と比較して、増加した量の中鎖脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪アルコール、中鎖脂肪酸、FAEE、FAME、FACEなどを提供する。

30

## 【0158】

したがって、いくつかの態様では、脂肪酸を含む脂肪酸誘導体組成物は、操作TE変種を含む組換え宿主細胞を炭素源の存在下でチオエステラーゼを発現するために有効な条件で培養することによって生産される。

40

## 【0159】

いくつかの態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞を、TEを発現するために有効な条件で培養することによって生産される脂肪酸誘導体の実質的に全てが、細胞外で生産される。したがって、いくつかの例示的な態様では、生産される脂肪酸誘導体は、培養培地から回収される。いくつかの例示的な態様では、回収される脂肪酸誘導体組成物は、特定の脂肪酸誘導体の分布ならびに脂肪酸誘導体組成物の成分の鎖長および飽和度を決定および定量するために、当技術分野において公知の任意の適切な方法、例えば、GC FIDを使用して分析される。

## 【0160】

50

他の態様では、組換え宿主細胞は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する変異体または操作TE変種をコードするポリヌクレオチド配列、および他の脂肪酸誘導体生合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする1種または複数種の追加的なポリヌクレオチドを含む。したがって、いくつかの態様では、操作TE変種の作用によって生産される第1の中鎖脂肪酸誘導体（例えば、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪アルコールなど）は、1種または複数種の脂肪酸誘導体生合成酵素によって、第2の脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸エステル、中鎖脂肪アルデヒド、中鎖脂肪アルコール酢酸エステル、炭化水素、例えば、直鎖アルカン、直鎖アルケンなどに変換される。

#### 【0161】

表1は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞において発現されることができて、中鎖脂肪酸誘導体の生産を容易にする例示的な脂肪酸誘導体生合成ポリペプチドの一覧を提供するものである。

#### 【0162】

（表1）脂肪酸誘導体酵素の遺伝子名称

| 遺伝子名称                     | ソース生物                                              | 酵素名                                                  | アクセション#             | EC番号              | 例示的用途               |
|---------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| <b>1. 脂肪酸生産増加/生成物生産増加</b> |                                                    |                                                      |                     |                   |                     |
| accA                      | 大腸菌( <i>E. coli</i> )、ラクトコッカス( <i>Lactococci</i> ) | アセチル-CoAカルボキシラーゼ、サブユニットA (カルボキシルトランスフェラーゼアルファ)       | AAC73296, NP_414727 | 6.4.1.2           | マロニル-CoA生産を増加       |
| accB                      | 大腸菌、ラクトコッカス                                        | アセチル-CoAカルボキシラーゼ、サブユニットB (BCCP: ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質) | NP_417721           | 6.4.1.2           | マロニル-CoA生産を増加       |
| accC                      | 大腸菌、ラクトコッカス                                        | アセチル-CoAカルボキシラーゼ、サブユニットC (ビオチンカルボキシラーゼ)              | NP_417722           | 6.4.1.2, 6.3.4.14 | マロニル-CoA生産を増加       |
| accD                      | 大腸菌、ラクトコッカス                                        | アセチル-CoAカルボキシラーゼ、サブユニットD (カルボキシルトランスフェラーゼベータ)        | NP_416819           | 6.4.1.2           | マロニル-CoA生産を増加       |
| fadD                      | 大腸菌 W3110                                          | アシル-CoAシンセターゼ                                        | AP_002424           | 2.3.1.86, 6.2.1.3 | 脂肪酸生産を増加            |
| fabA                      | 大腸菌 K12                                            | $\beta$ -ヒドロキシデカノイルチオエステルデヒドラーゼ/イソメラーゼ               | NP_415474           | 4.2.1.60          | 脂肪酸アシル-ACP/CoA生産を増加 |
| fabB                      | 大腸菌                                                | 3-オキソアシル-[アシルキャリア-タンパク質]シンセターゼI                      | BAA16180            | 2.3.1.41          | 脂肪酸アシル-ACP/CoA生産を増加 |
| fabD                      | 大腸菌 K12                                            | [アシルキャリア-タンパク質]S-マロニルトランスフェラーゼ                       | AAC74176            | 2.3.1.39          | 脂肪酸アシル-ACP/CoA生産を増加 |
| fabF                      | 大腸菌 K12                                            | 3-オキソアシル-[アシルキャリア-タンパク質]シンセターゼII                     | AAC74179            | 2.3.1.179         | 脂肪酸アシル-ACP/CoA生産を増加 |
| fabG                      | 大腸菌 K12                                            | 3-オキソアシル-[アシルキャリアタンパク質]レダクターゼ                        | AAC74177            | 1.1.1.100         | 脂肪酸アシル-ACP/CoA生産を増加 |

10

20

30

40

50

|                   |                                                                                       |                                                              |                       |                                   |                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| fabH              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | 3-オキソアシル-[アシル-<br>キャリア-タンパク質]<br>シンセターゼIII                   | AAC74175              | 2.3.1.180                         | 脂肪酸アシル-ACP/CoA<br>生産を増加 |
| fabI              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | エノイル-[アシル-キャリア-<br>タンパク質]レダクターゼ                              | NP_415804             | 1.3.1.9                           | 脂肪酸アシル-ACP/CoA<br>生産を増加 |
| fabR              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | 転写抑制因子                                                       | NP_418398             | なし                                | 不飽和脂肪酸生産を<br>モジュレーション   |
| fabV              | ビブリオ コレラ<br>( <i>Vibrio cholerae</i> )                                                | エノイル-[アシル-キャリア-<br>タンパク質]レダクターゼ                              | YP_001217283          | 1.3.1.9                           | 脂肪酸アシル-ACP/CoA<br>生産を増加 |
| fabZ              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | (3R)-ヒドロキシ<br>ミリストルアシルキャリア<br>タンパク質デヒドラターゼ                   | NP_414722             | 4.2.1.-                           | 脂肪酸アシル-ACP/CoA<br>生産を増加 |
| fadE              | 大腸菌 <i>K13</i>                                                                        | アシル-CoA<br>デヒドロゲナーゼ                                          | AAC73325              | 1.3.99.3,<br>1.3.99.-             | 脂肪酸分解を低減                |
| fadD              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | アシル-CoAシンセターゼ                                                | NP_416319             | 6.2.1.3                           | 脂肪酸分解を低減                |
| fadA              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | 3-ケトアシル-CoA<br>チオラーゼ                                         | YP_02627              | 2.3.1.16                          | 脂肪酸分解を低減                |
| fadB              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | エノイル-CoA<br>ヒドラターゼ、3-OH<br>アシル-CoAエピメラーゼ/<br>デヒドロゲナーゼ        | NP_418288             | 4.2.1.17,<br>5.1.2.3,<br>1.1.1.35 | 脂肪酸分解を低減                |
| fadR              | 大腸菌                                                                                   | 転写調節タンパク質                                                    | NP_415705             | なし                                | 脂肪酸分解を遮断または反転           |
| <b>2. 鎖長制御</b>    |                                                                                       |                                                              |                       |                                   |                         |
| fatB1             | ウンベルラリア<br>カリフォルニカ<br>( <i>Umbellularia<br/>californica</i> )                         | チオエステラーゼ                                                     | Q41635                | 3.1.2.14                          | C12:0 鎖長                |
| fatB2             | クフェア フークリアナ                                                                           | チオエステラーゼ                                                     | AAC49269              | 3.1.2.14                          | C8:0~C10:0 鎖長           |
| <b>3. 飽和レベル制御</b> |                                                                                       |                                                              |                       |                                   |                         |
| Sfa               | 大腸菌                                                                                   | fabAの抑制因子                                                    | AAN79592,<br>AAC44390 | なし                                | モノ不飽和脂肪酸を増加             |
| fabA              | 大腸菌 <i>K12</i>                                                                        | $\beta$ -ヒドロキシデカノイル<br>チオエステル<br>デヒドラターゼ/<br>イソメラーゼ          | NP_415474             | 4.2.1.60                          | 不飽和脂肪酸を生産               |
| GnsA              | 大腸菌                                                                                   | secGヌル変異の抑制因子                                                | ABD18647.1            | なし                                | 不飽和脂肪酸エステルを増加           |
| GnsB              | 大腸菌                                                                                   | secGヌル変異の抑制因子                                                | AAC74076.1            | なし                                | 不飽和脂肪酸エステルを増加           |
| fabB              | 大腸菌                                                                                   | 3-オキソアシル-[アシル-<br>キャリア-タンパク質]<br>シンセターゼI                     | BAA16180              | 2.3.1.41                          | 不飽和脂肪酸生産を<br>モジュレーション   |
| des               | 枯草菌                                                                                   | D5脂肪酸アシル<br>デサチュラーゼ                                          | O34653                | 1.14.19                           | 不飽和脂肪酸生産を<br>モジュレーション   |
| <b>4. エステル生産</b>  |                                                                                       |                                                              |                       |                                   |                         |
|                   | リムノバクター属<br>( <i>Limnobacter</i> sp.)<br>MED 105                                      | エステルシンターゼ                                                    | ZP_01915978           | 2.3.1.75                          | エステル生産                  |
| AT3G51970         | シロイヌナズナ                                                                               | 長鎖アルコール0-脂肪-<br>アシルトランスフェラーゼ                                 | NP_190765             | 2.3.1.26                          | エステル生産                  |
| ELO1              | ピキア アンガスタ<br>( <i>Pichia angusta</i> )                                                | 脂肪酸エロンガーゼ                                                    | BAD98251              | 2.3.1.-                           | 非常に長い鎖長の脂肪酸を生産          |
| plsC              | サッカロミセス<br>セレビシア                                                                      | アシル<br>トランスフェラーゼ                                             | AAA16514              | 2.3.1.51                          | エステル生産                  |
| DAGAT/DG<br>AT    | シロイヌナズナ                                                                               | ジアシルグリセロール<br>アシルトランスフェラーゼ                                   | AAF19262              | 2.3.1.20                          | エステル生産                  |
| hWS               | ホモ サビエンス                                                                              | アシル-CoAワックスアルコー<br>ルアシルトランスフェラーゼ                             | AAX48018              | 2.3.1.20                          | エステル生産                  |
| aft1              | アシネトバクター属<br>( <i>Acinetobacter</i> sp.)<br>ADP1                                      | 二官能性ワックスエステル<br>シンターゼ/アシル-CoA:<br>ジアシルグリセロール<br>アシルトランスフェラーゼ | AAO17391              | 2.3.1.20                          | エステル生産                  |
| ES9               | マリノバクター ハイドロ<br>カルボノクラスティカス<br>( <i>Marinobacter<br/>hydrocarbonoclastic<br/>us</i> ) | ワックス<br>エステルシンターゼ                                            | ABO21021              | 2.3.1.20                          | エステル生産                  |

10

20

30

40

50

|                  |                                                                       |                                   |              |                       |                                          |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------|------------------------------------------|
| mWS              | ホホバ ( <i>Simmondsia chinensis</i> )                                   | ワックスエステル<br>シンターゼ                 | AAD38041     | 2.3.1.-               | エステル生産                                   |
| 5. 脂肪アルコールアウトプット |                                                                       |                                   |              |                       |                                          |
| BmFAR            | カイコ<br>( <i>Bombyxmori</i> )                                          | FAR (脂肪アルコール形成<br>アシル-CoAレダクターゼ)  | BAC79425     | 1.2.1.50,<br>1.2.1.84 | アシル-CoAから<br>脂肪アルコールへ変換                  |
| Acr1             | アシネトバクター属<br><i>ADP1</i>                                              | アシル-CoAレダクターゼ                     | YP_047869    | 1.2.1.42,<br>1.2.1.50 | 脂肪酸アシル-CoAから<br>脂肪アルデヒドへ還元               |
| AdhE2            | クロストリジウム<br>アセトブチリウム<br>( <i>Clostridium acetobutylicum</i> )         | アシル-CoAレダクターゼ                     | AAK09379     | 1.2.1.84              | 脂肪酸アシル-CoAから<br>脂肪アルコールへ変換               |
| Ald              | クロストリジウム<br>ベイジェリンキ<br>( <i>Clostridium beijerinckii</i> )            | アシル-CoAレダクターゼ                     | AAT66436     | 1.2.1.80              | 脂肪酸アシル-CoAから<br>脂肪アルデヒドへ還元               |
| EutE             | サルモネラ<br>ティフィムリウム<br>( <i>Salmonella typhimurium</i> )                | アシル-CoAレダクターゼ                     | AAA80209     | 1.2.1.80              | 脂肪酸アシル-CoAから<br>脂肪アルデヒドへ還元               |
| yqhD             | 大腸菌 <i>W3110</i>                                                      | アルコール<br>デヒドロゲナーゼ                 | AP_003562    | 1.1.1.-               | 脂肪アルデヒドから<br>脂肪アルコールへ還元;<br>脂肪アルコール生産を増加 |
| alrA             | アシネトバクター属<br><i>ADP1</i>                                              | アルコール<br>デヒドロゲナーゼ                 | CAG70252     | 1.1.1.-               | 脂肪アルデヒドから<br>脂肪アルコールへ還元                  |
| GTNG_1865        | ゲオバチルス サーマ<br>デニトリフィカンス<br>( <i>Geobacillus thermophilus</i> ) NG80-2 | 長鎖アルデヒド<br>デヒドロゲナーゼ               | YP_001125970 | 1.2.1.3               | 脂肪アルデヒドから<br>脂肪アルコールへ還元                  |
| AAR              | シネコッカス<br>エロンガツス                                                      | アシル-ACPレダクターゼ                     | YP_400611    | 1.2.1.42              | 脂肪酸アシル-ACP/CoAから<br>脂肪アルデヒドへ還元           |
| carB             | マイコバクテリウム<br>スメグマチス<br>( <i>Mycobacterium smegmatis</i> )             | カルボン酸<br>レダクターゼタンパク質              | YP_889972    | 6.2.1.3,<br>1.2.1.42  | 脂肪酸から<br>脂肪アルデヒドへ還元                      |
| FadD             | 大腸菌 <i>K12</i>                                                        | アシル-CoAシンセターゼ                     | NP_416319    | 6.2.1.3               | 脂肪酸から<br>脂肪酸アシル-CoAへ活性化                  |
| atoB             | エルウィニア<br>カロトボーラ<br>( <i>Erwinia carotovora</i> )                     | アセチル-CoAアセチル<br>トランスフェラーゼ         | YP_049388    | 2.3.1.9               | ブタノールの生産                                 |
| hbd              | ブチリビブリオ<br>フィブリソルベンス<br>( <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> )          | ベーター<br>ヒドロキシブチリル-<br>CoAデヒドロゲナーゼ | BAD51424     | 1.1.1.157             | ブタノールの生産                                 |
| CPE0095          | クロストリジウム<br>パーフリンジェンス<br>( <i>Clostridium perfringens</i> )           | クロトナーゼブチリル-<br>CoAデヒドロゲナーゼ        | BAB79801     | 4.2.1.55              | ブタノールの生産                                 |
| bcd              | クロストリジウム<br>ベイジェリンキ                                                   | ブチリル-CoA<br>デヒドロゲナーゼ              | AAM14583     | 1.3.99.2              | ブタノールの生産                                 |
| ALDH             | クロストリジウム<br>ベイジェリンキ                                                   | 補酵素A-アシル化<br>アルデヒド<br>デヒドロゲナーゼ    | AAT66436     | 1.2.1.3               | ブタノールの生産                                 |
| AdhE             | 大腸菌 <i>CFT073</i>                                                     | アルデヒド-アルコール<br>デヒドロゲナーゼ           | AAN80172     | 1.1.1.1,<br>1.2.1.10  | ブタノールの生産                                 |

10

20

30

40

50

| 6. 脂肪アルコールアセチルエステルアウトプット |                                                                             |                          |            |                       |          |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|----------|
| Atf1                     | サッカロミセス<br>セレビスシア                                                           | アルコール0-アセチル<br>トランスフェラーゼ | P40353     | 2.3.1.84              | 酢酸アルキル生産 |
| acr1                     | アシネトバクター属<br><i>ADP1</i>                                                    | アシル-CoAレダクターゼ            | YP_047869  | 1.2.1.42,<br>1.2.1.50 | 酢酸アルキル生産 |
| yqhD                     | 大腸菌 <i>K12</i>                                                              | アルコール<br>デヒドロゲナーゼ        | AP_003562  | 1.1.-.-               | 酢酸アルキル生産 |
| AAT                      | フラガリア x<br>アナナッサ<br>( <i>Fragaria x</i><br><i>ananassa</i> )                | アルコール0-アシル<br>トランスフェラーゼ  | AAG13130   | 2.3.1.84              | 酢酸アルキル生産 |
| FaAAT2                   | フラガリア x<br>アナナッサ                                                            | アルコール0-アシル<br>トランスフェラーゼ  | AEM43830.1 | 2.3.1.84              | 酢酸アルキル生産 |
| SAAT                     | フラガリア x アナナッサ<br>cv.エルサンタ<br>( <i>F. x ananassa</i> cv.<br><i>Elsanta</i> ) | アルコール0-アシル<br>トランスフェラーゼ  | AAG13130.1 | 2.3.1.84              | 酢酸アルキル生産 |
| PhcFAT                   | ペチュニア<br>( <i>Petunia</i> )                                                 | アルコール0-アシル<br>トランスフェラーゼ  | ABG75942.1 | 2.3.1.84              | 酢酸アルキル生産 |
|                          |                                                                             |                          |            |                       |          |

10

20

30

40

50

|                  |                                                                                               |                                                  |                   |          |             |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|----------|-------------|
| 7. 末端オレフィンアウトプット |                                                                                               |                                                  |                   |          |             |
| OleT             | ジェオトガリコカス属<br>( <i>Jeotgalicoccus</i> sp.)                                                    | 脂肪酸<br>デカルボキシラーゼ                                 | HQ709266          | 1.11.2.4 | 脂肪酸を脱炭酸     |
| 8. 生成物輸送         |                                                                                               |                                                  |                   |          |             |
| AtMRP5           | シロイヌナズナ                                                                                       | シロイヌナズナ<br>多剤耐性関連                                | NP_171908         | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AmiS2            | ロドコカス属                                                                                        | ABCトランスポーター<br>AmiS2                             | JC5491            | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AtPGP1           | シロイヌナズナ                                                                                       | シロイヌナズナp糖<br>タンパク質1                              | NP_181228         | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AcrA             | キャンディデイトス<br>プロトクラミジア<br>アモエボフィリア<br>( <i>CandidatusProtochlamydia amoebophila</i> )<br>UWE25 | 推定多剤排出輸送<br>タンパク質acrA                            | CAF23274          | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AcrB             | キャンディデイトス<br>プロトクラミジア<br>アモエボフィリア<br>UWE25                                                    | 考えられる多剤排出輸送<br>タンパク質、acrB                        | CAF23275          | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| TolC             | フランシセラ<br>ソラレンシス亜属<br>ノビシダ<br>( <i>Francisellatularensis</i><br><i>subsp. novicida</i> )      | 外膜タンパク質<br>[細胞エンベロープ<br>生物発生                     | ABD59001          | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AcrE             | シゲラ ソネイ<br>( <i>Shigella sonnei</i> )<br>Ss046                                                | 膜貫通タンパク質は、<br>隔膜形成および<br>細胞膜透過性に<br>影響を及ぼす       | YP_312213         | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| AcrF             | 大腸菌                                                                                           | アクリフラビン<br>耐性タンパク質F                              | P24181            | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| tll1619          | サーモシネココカス<br>エロンガツス<br>( <i>Thermosynechococcus elongatus</i> ) [BP-1]                        | 多剤排出<br>トランスポーター                                 | NP_682409.1       | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| tll0139          | サーモシネココカス<br>エロンガツス [BP-1]                                                                    | 多剤排出<br>トランスポーター                                 | NP_680930.1       | なし       | 生成物輸送量を改変   |
| 9. 発酵            |                                                                                               |                                                  |                   |          |             |
| umuD             | シゲラ ソネイ<br>Ss046                                                                              | DNAポリメラーゼV,<br>サブユニット                            | YP_310132         | 3.4.21.- | アウトプット効率を増加 |
| umuC             | 大腸菌                                                                                           | DNAポリメラーゼV,<br>サブユニット                            | ABC42261          | 2.7.7.7  | アウトプット効率を増加 |
| pntA, pntB       | シゲラ フレキシネリ<br>( <i>Shigella flexneri</i> )                                                    | NADH:NADPHトランス<br>ヒドロゲナーゼ (アルファ<br>およびベータサブユニット) | P07001,<br>P0AB70 | 1.6.1.2  | アウトプット効率を増加 |
| 10. その他          |                                                                                               |                                                  |                   |          |             |
| fabK             | 肺炎レンサ球菌<br>( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )                                                | trans-2-エノイル-ACP<br>レダクターゼII                     | AAF98273          | 1.3.1.9  | 脂肪酸生合成に寄与   |
| fabL             | バチルス<br>リケニフォルミス<br>( <i>Bacillus licheniformis</i> )<br>DSM 13                               | エノイル-(アシル<br>キャリアタンパク質)<br>レダクターゼ                | AAU39821          | 1.3.1.9  | 脂肪酸生合成に寄与   |
| fabM             | ストレプトコカス<br>ミュータンス<br>( <i>Streptococcus mutans</i> )                                         | trans-2, cis-3-<br>デセノイル-ACP<br>イソメラーゼ           | DAA05501          | 4.2.1.17 | 脂肪酸生合成に寄与   |

## 【0163】

## 中鎖脂肪酸誘導体の生産

上述のように、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、操作TE変種を含まない適切な対照宿主細胞、例えば、対照TE (SEQ ID NO:1など) を有する同質遺伝子の対照宿主細胞と比較して、増加した量の中鎖脂肪酸を生産する。

## 【0164】

下に詳細に述べられる他の例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、特定の種類の脂肪酸誘導体の

生産を容易にする追加的な脂肪酸誘導体生合成ポリペプチドをさらに含む。

【0165】

脂肪アルデヒドの生産

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、カルボン酸レダクターゼ（「CAR」）活性をさらに含むことで、組換え宿主細胞は、脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコールを合成する。例えば、9,340,801を参照されたい。

【0166】

したがって、いくつかの例示的な態様では、脂肪アルデヒドは、脂肪アルデヒド生合成活性、例えば、カルボン酸レダクターゼ（CAR）活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組換え宿主細胞において発現または過剰発現させることによって生産される。例示的なカルボン酸レダクターゼ（CAR）ポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチドには、例えば、FadD9（EC 6.2.1.-、UniProtKB Q50631、GenBank NP\_217106）、CarA（GenBank ABK75684）、CarB（GenBank YP889972）ならびに例えば、米国特許第8,097,439号および同第9,340,801号に開示される関連ポリペプチドが挙げられる。

【0167】

いくつかの例示的な態様では、組換え宿主細胞によって生産される脂肪アルデヒドは、次に、脂肪アルコールまたは炭化水素に変換される。したがって、いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、アシル-CoAレダクターゼ（「FAR」または「ACR」）活性をさらに含むことで、組換え宿主細胞は、脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコールを合成する（例えば、米国特許第8,658,404号、同第8,268,599号、米国特許出願公開第2015/0361454号を参照されたい）。

【0168】

いくつかの態様では、組換え宿主細胞によって生産される脂肪アルデヒドは、ネイティブまたは異種脂肪アルコール生合成ポリペプチド、例えば、アルデヒドレダクターゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼなどの活性を経て脂肪アルコールに変換される（例えば、米国特許出願公開第2011/0250663号を参照されたい）。したがって、いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、アルデヒドレダクターゼ活性または同様な意味合いで、アルコールデヒドロゲナーゼ活性（EC 1.1.1.1）をさらに含むことで、組換え宿主細胞は、脂肪アルコールを合成する。例示的な脂肪アルコール生合成遺伝子には、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、例えば、アセニトバクター スピーシーズ（*Acenitobacter* sp.）M-1のAlrAまたはAlrAホモログ；および内因性大腸菌アルコールデヒドロゲナーゼ、例えば、DkgA（NP.sub.--417485）、DkgB（NP.sub.--414743）、YjgB、（AAC77226）、YdjL（AAC74846）、YdjJ（NP.sub.--416288）、AdhP（NP.sub.--415995）、YhdH（NP.sub.--417719）、YahK（NP.sub.--414859）、YphC（AAC75598）、およびYqhD（Q46856）が挙げられるが、それに限定されない。

【0169】

脂肪アミンの生産

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含み、脂肪アルデヒドを生産する組換え宿主細胞（例えば、本明細書上に開示のもの）は、脂肪アルデヒドを脂肪アミンに変換するアミノトランスフェラーゼまたはアミンデヒドロゲナーゼ活性を有する異種生合成酵素を含むようにさらに改変される（例えば、PCT公報番号WO2015/085271を参照されたい）。

【0170】

脂肪アルコールの生産

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞が、脂肪アルコール生合成活性を有するポリペ

10

20

30

40

50

チドをコードするポリヌクレオチドをさらに含むことで、脂肪アルコールが組換え宿主細胞によって生産される。したがって、例示的な態様では、中鎖脂肪アルコールを含む、例えば、オクタノールを含む組成物は、炭素源の存在下で中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種および脂肪アルコール生合成酵素を発現するために有効な条件で組換え宿主細胞を培養することによって生産される。

【0171】

したがって、いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞が、カルボン酸レダクターゼ (CAR) 活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性をさらに含むことで、組換え宿主細胞は、中鎖脂肪アルコール、例えば、オクタノールを合成する (例えば、米国特許第9,340,801号を参照されたい)。

10

【0172】

いくつかの例示的な態様では、宿主細胞中に存在するアルデヒドレダクターゼ/アルコールデヒドロゲナーゼなどのネイティブな脂肪アルデヒド生合成ポリペプチドは、中鎖脂肪アルデヒドを中鎖脂肪アルコールに変換する。他の例示的な態様では、ネイティブな脂肪アルデヒドレダクターゼ/アルコールデヒドロゲナーゼは、中鎖脂肪アルデヒドを中鎖脂肪アルコールに変換するために過剰発現される。他の例示的な態様では、異種アルデヒドレダクターゼ/アルコールデヒドロゲナーゼが、組換え宿主細胞に導入され、中鎖脂肪アルデヒドを中鎖脂肪アルコールに変換するために発現または過剰発現される。中鎖脂肪アルデヒドを中鎖脂肪アルコールに変換するために有用な、例示的なアルデヒドレダクターゼ/アルコールデヒドロゲナーゼポリペプチドは、本明細書の上記および国際公開公報第2007/136762号; 同第2010/062480号; 米国特許第8,110,670号; 同第9,068,201号に開示される。

20

【0173】

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、カルボン酸レダクターゼ (EC 6.2.1.3またはEC 1.2.1.42) 活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含み、それにより、組換え宿主細胞は、単純炭素源を有する発酵プロセス中で増殖されると1,3脂肪ジオールを生産する。他の例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、カルボン酸レダクターゼ (EC 6.2.1.3またはEC 1.2.1.42) 活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドおよびアルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.) 活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含み、その際、組換え宿主細胞は、単純炭素源を有する発酵プロセス中で増殖されると、中鎖1,3 脂肪ジオールなどの1,3脂肪ジオールを生産する (例えば、国際公開公報第2016/011430号を参照されたい)。

30

【0174】

脂肪アルコール酢酸エステルの生産

いくつかの態様では、細胞において生産された、またはいくつかの態様では細胞に供給された脂肪アルコールは、組換え細胞によってさらに加工されて脂肪アルコール酢酸エステル (FACE) を提供する。例示的な態様では、アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.8.1.14) 酵素は、脂肪アルコールを脂肪アルコール酢酸エステル (FACE) に加工する。例えば、Gabriel M Rodriguez, et al. (2014) Nature Chemical Biology 10, 259-265; Jyun-Liang Lin and Ian Wheeldon (2014) PLoS One. 2014; 9(8): PMCID: PMC4122449を参照されたい。

40

【0175】

例示的なアルコールO-アセチルトランスフェラーゼは、酵母Aft1、例えば、GenBankアクセッション番号AY242062; GenBankアクセッション番号AY242063である。例えば、Kevin J. Verstrepen K.J., et al (2003) Appl Environ Microbiol. 2003 Sep; 69(9): 5228-5237を参照されたい。

【0176】

50

例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコールを生産するために十分なカルボン酸レダクターゼ活性（EC 1.2.99.6）をさらに含み、脂肪アルコールを脂肪アルコール酢酸エステルに変換する脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ活性をさらに含む。

【0177】

さらなる例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらすカルボン酸レダクターゼ活性（EC 1.2.99.6）をさらに含み、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よりも高いMICを有する。

10

【0178】

さらなる例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらすカルボン酸レダクターゼ活性（EC 1.2.99.6）をさらに含み、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よりも高いLogPを有する。

【0179】

さらなる例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらすカルボン酸レダクターゼ活性（EC 1.2.99.6）をさらに含み、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体の存在は、第1の脂肪酸誘導体のMICにおける増加をもたらす。

20

【0180】

さらなる例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらすカルボン酸レダクターゼ活性（EC 1.2.99.6）をさらに含み、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換する脂肪アルコールO-アセチルトランスフェラーゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よりも毒性が低い。

【0181】

30

#### 脂肪エステルの生産

いくつかの態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞が、脂肪エステル生合成活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含むことで、中鎖脂肪エステルが、組換え宿主細胞によって生産される。

【0182】

本明細書に使用される、「脂肪エステル」または同様な意味合いで「脂肪酸エステル」という用語は、脂肪酸から作られた任意のエステルを表す。例示的な態様では、脂肪エステルは、「A側」および「B側」を含有する。本明細書に使用される、エステルの「A側」は、エステルのカルボキシレート酸素と結合した炭素鎖を表す。本明細書に使用されるエステルの「B側」は、エステルの親カルボキシレートを含有炭素鎖を表す。脂肪エステルが脂肪酸誘導体生合成経路から得られる態様では、A側は、アルコールにより付与され、B側は、脂肪酸またはアルキルチオエステルにより付与される。

40

【0183】

任意のアルコールを使用して脂肪エステルのA側を形成することができる。例示的な態様では、アルコールは、脂肪酸誘導体生合成経路から得られる。他の例示的な態様では、アルコールは、非脂肪酸誘導体生合成経路を経て生産され、例えば、アルコールは、外因的に与えられ、例えば、アルコールは、発酵プロセス中に供給される。

【0184】

A側またはB側を含む炭素鎖は、任意の長さであることができる。しかし、中鎖脂肪酸誘

50

導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む脂肪酸誘導体生合成経路が脂肪酸エステルのA側および/またはB側のいずれかを提供する例示的な態様では、A側および/またはB側は、中鎖脂肪酸誘導体であり、したがって、6、7、8、9または10炭素長の炭素鎖長を有する。したがって、例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む脂肪酸誘導体生合成経路は、エステルのA側を提供し、したがって、脂肪エステルのA側は、6、7、8、9または10炭素長である。他の例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む脂肪酸生合成経路は、エステルのB側を提供し、したがって、脂肪エステルのB側は、6、7、8、9または10炭素長である。

【0185】

10

例示的な一態様では、脂肪エステルは、脂肪酸メチルエステル、例えば、オクタン酸メチルであり、その際、B側は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む脂肪酸生合成経路によって与えられ、エステルのA側は、1炭素長である。したがって、例示的な態様では、脂肪酸エステルは、オクタン酸メチルである。例示的な一態様では、A側は、脂肪酸O-メチルトランスフェラーゼ (FAMT) (EC 2.1.1.15) 酵素の作用により与えられる (例えば、Applied and Environmental Microbiology 77(22): 8052-8061を参照されたい)。

【0186】

別の例示的な態様では、脂肪エステルは、脂肪酸エチルエステルであり、その際、B側は、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む脂肪酸生合成経路により与えられ、エステルのA側は、2炭素長である。

20

【0187】

例示的な一態様では、A側は直鎖である。別の例示的な態様では、A側は、分枝鎖である。例示的な一態様では、B側は、直鎖である。別の例示的な態様では、B側は、分枝鎖である。分枝鎖は、1つまたは複数の分枝点を有することができる。例示的な一態様では、A側は飽和である。別の例示的な態様では、A側は不飽和である。例示的な一態様では、B側は飽和である。別の例示的な態様では、B側は不飽和である。

【0188】

例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、エステルシンターゼ活性 (EC 3.1.1.67) を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。エステルシンターゼは、当技術分野において公知である。例えば、国際公開公報第2011/038134号を参照されたい。

30

【0189】

いくつかの例示的な態様では、脂肪酸エステルは、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種、ならびにアシル-CoAシンセターゼ (fadD) 酵素およびエステルシンターゼ酵素を含む組換え宿主細胞によって生産される (例えば、国際公開公報第2011/038134号; 同第2007/136762号; 米国特許第8,110,670号を参照されたい)。

【0190】

例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体を生産する改良された能力を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、脂肪エステル (FAMEまたはFAEEなど) を生産するために十分なエステルシンターゼ活性 (EC 3.1.1.67) をさらに含む。

40

【0191】

さらなる態様では、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらす改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換するエステルシンターゼ活性をさらに含む。

【0192】

さらなる態様では、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらす改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換するエステルシンターゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よ

50

りも高いMICを有する。

【0193】

さらなる態様では、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらす改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換するエステルシンターゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よりも高い分配係数(LogP)を有する。

【0194】

さらなる態様では、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらす、改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換するエステルシンターゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体の存在は、第1の脂肪酸誘導体のMICにおける増加をもたらす。

10

【0195】

さらなる態様では、第1の脂肪酸誘導体の生産をもたらす、改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、第1の脂肪酸誘導体を第2の脂肪酸誘導体に変換するエステルシンターゼ活性をさらに含み、その際、第2の脂肪酸誘導体は、第1の脂肪酸誘導体よりも毒性が低い。

【0196】

炭化水素の生産

いくつかの態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、脂肪アルデヒド生合成活性を有するポリペプチド、例えば、アシル-ACPLレダクターゼポリペプチド(EC 6.4.1.2)を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および炭化水素生合成活性を有するポリペプチド、例えば、デカルボニラーゼ(EC 4.1.99.5)、酸化デホルミラーゼ、または脂肪酸デカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、したがって、組換え宿主細胞は、炭化水素の増強した生産を示す(例えば、米国特許出願公開第2011/0124071号を参照されたい)。したがって、例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞は、炭化水素、例えば、アルカンまたはアルケン(例えば、末端オレフィンもしくは内部オレフィン)またはケトンを生産する。

20

【0197】

いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を含む組換え宿主細胞によって生産される脂肪アルデヒドは、炭素原子を1つ除去する脱カルボニルによって変換されて、炭化水素を形成する(例えば、米国特許第8,110,670号および国際公開公報第2009/140695号を参照されたい)。

30

【0198】

他の例示的な態様では、組換え宿主細胞によって生産される脂肪酸は、炭素原子を1つ除去する脱炭酸により変換されて、末端オレフィンを形成する。したがって、いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を発現することに加えて、組換え細胞は、例えば、米国特許第8,597,922号に開示されるデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドなどの、炭化水素生合成ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに発現または過剰発現する。

40

【0199】

他の例示的な態様では、アルキルチオエステル中間体は、酵素的脱炭酸縮合によって変換されて内部オレフィンまたはケトンを形成する。したがって、いくつかの例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を発現することに加えて、組換え細胞は、炭化水素生合成ポリペプチド、例えば、OleA活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに発現または過剰発現し、それにより、ケトンを生産する(例えば、米国特許第9,200,299号を参照されたい)。他の例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を発現することに加えて、組換え細胞は、炭化水素生合成ポリペプチド、例えば、OleCDまたはOleBCDを、OleA活性を有するポリペプチドと一緒にコードするポリヌクレオチドをさらに発

50

現または過剰発現し、それにより、内部オレフィンが生産される（例えば、米国特許第9,200,299号を参照されたい）。

#### 【0200】

いくつかの例示的な炭化水素生合成ポリペプチドを下の表2に示す。

#### 【0201】

（表2）例示的な炭化水素生合成ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

| タンパク質名                          | 配列                                                               |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| デカルボニラーゼ (ADC)<br>または酸化的デホルミラーゼ | シネコッカス エロンガツス PCC7942 YP.sub.--400610<br>(Synpcc7942.sub.--1593) |
| アシル-ACPレダクターゼ (AAR)             | シネコッカス エロンガツス PCC7942 YP_400611<br>(Synpcc7942_1594)             |
| デカルボニラーゼ (ADC)<br>または酸化的デホルミラーゼ | プロクロロコッカス マリヌス<br>(Prochlorococcus marius) CCMP1986 PMM0532      |
| アシル-ACPレダクターゼ (AAR)             | プロクロロコッカス マリヌス CCMP1986 PMM0533<br>(NP_892651)                   |

10

#### 【0202】

#### オメガ ( $\omega$ )-ヒドロキシル化脂肪酸誘導体の生産

20

いくつかの態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、 $\omega$ -ヒドロキシラーゼ活性 (EC 1.14.15.3) を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。例示的な態様では、修飾 $\omega$ -ヒドロキシラーゼは、修飾チトクロムP450モノオキシゲナーゼ (P450) 酵素活性を有し、炭化水素鎖の $\omega$ 位のヒドロキシル化をインビボで効率的に触媒する。したがって、組換え微生物は、発酵プロセス中で再生可能な供給原料由来の炭素源の存在下で増殖したとき、中鎖オメガ-ヒドロキシル化 ( $\omega$ -ヒドロキシル化) 脂肪酸誘導体をインビボで生産する（例えば、PCT出願公開WO2014/201474を参照されたい）。

#### 【0203】

他の例示的な態様では、中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種に加えて、組換え宿主細胞は、alkAなどのアルカンヒドロキシラーゼ、CYP153A-レダクターゼまたはCYP153A-レダクターゼ雑種融合ポリペプチド変種（例えば、国際公開公報第2015/195697号を参照されたい）をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、その結果、組換え宿主細胞は、AlkA、CYP153などのアルカンヒドロキシラーゼまたはCYP153A-レダクターゼ雑種融合ポリペプチド変種および中鎖脂肪酸誘導体の生産のための改良された活性を有する操作TE変種を発現するために有効な条件下で炭素源を含有する培地中で培養したときに、 $\omega$ -ヒドロキシル化脂肪酸、 $\omega$ -ヒドロキシル化脂肪エステル、 $\alpha$ ,  $\omega$ -二酸、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジエステル、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジオールおよびそれから誘導される化学物質、例えばマクロラクトンおよび大環状ケトンを含む、オメガ-ヒドロキシル化 ( $\omega$ -ヒドロキシル化) 脂肪酸誘導体および二官能性脂肪酸誘導体ならびにその組成物を生産する。

30

40

#### 【0204】

#### V. 組換え宿主細胞の培養および発酵

本明細書に使用される発酵は、組換え宿主細胞による、有機物の標的物質への変換を広く表す。例えば、これは、炭素源を含む培地中での組換え宿主細胞の培養物を増やすことによる、組換え宿主細胞による炭素源の、例えば、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸エステル、中鎖脂肪アルコール、中鎖脂肪アルコール酢酸エステルなどの脂肪酸誘導体への変換を含む。例えば、脂肪酸、脂肪エステル、脂肪アルコール、脂肪アルコール酢酸エステルなどの標的物質の生産に許容的な条件は、宿主細胞に脂肪酸誘導体組成物などの所望の産物を生産させる任意の条件である。適切な条件には、例えば、典型的な発酵条件が挙げられる。例えば、Principles of Fermentation Technology, 3rd Edition (2016)、前記; Fer

50

mentation Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, (2007)、前記を参照されたい。

#### 【0205】

発酵条件は、温度範囲、pHレベル、通気レベル、供給速度および培地組成を非限定的に含む、当技術分野において周知の多数のパラメーターを含むことができる。これらの条件のそれぞれは、個別におよび組み合わせで、宿主細胞を増殖させる。発酵は、好気、嫌気、またはその変形（微好気など）であることができる。例示的な培地には、ブロス（液体）またはゲル（固体）が含まれる。一般的に、培地は、宿主細胞によって直接代謝されることができる炭素源（例えば、再生可能な供給原料由来の単純炭素源）を含む。加えて、培地中に酵素を使用して、中鎖脂肪酸誘導体を生産するための動員（例えば、発酵可能な糖へのデンプンまたはセルロースの脱重合）に続く、炭素源の代謝を容易にすることができる。

10

#### 【0206】

小規模生産のために、中鎖脂肪酸誘導体組成物を生産するように操作された宿主細胞は、例えば、約100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L、500  $\mu$ L、1mL、5mL、10mL、15mL、25mL、50mL、75mL、100mL、500mL、1L、2L、5L、または10Lのバッチ中で増殖させ；発酵させ；特異的酵素活性（例えば、チオエステラーゼ（TE）、カルボン酸レダクターゼ（CAR）、アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）、脂肪酸アシルCoA/ACPレダクターゼ（FAR）、アシル-CoAレダクターゼ（ACR）、アセチルCoAカルボキシラーゼ（ACC）および/またはアシルACP/CoAレダクターゼ（AAR）酵素活性）を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどの、所望のポリヌクレオチド配列を発現するように誘導することができる。大規模生産のために、約10L、100L、1000L、10,000L、100,000L、1,000,000Lまたはそれ以上の体積のバッチを有する培養で操作宿主細胞を増殖させ；発酵させ、任意の所望のポリヌクレオチド配列を発現するように誘導することができる。

20

#### 【0207】

本明細書開示の脂肪酸誘導体組成物は、組換え宿主細胞培養物の細胞外環境でしばしば見ることができ、培養培地から容易に単離することができる。中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸エステル、中鎖脂肪アルデヒド、中鎖脂肪ケトン、中鎖脂肪アルコール、中鎖脂肪アルコール酢酸エステルなどの中鎖脂肪酸誘導体は、組換え宿主細胞によって分泌される、組換え宿主細胞培養物の細胞外環境中に輸送される、または細胞外環境中に受動的に移動する場合がある。中鎖脂肪酸誘導体組成物は、遠心分離を非限定的に含む当技術分野において公知の常用の方法を使用して、組換え宿主細胞培養物から単離される場合がある。

30

#### 【0208】

生産宿主細胞として使用するために適した例示的な微生物には、例えば、細菌、シアノバクテリア、酵母、藻類、糸状菌などが挙げられる。脂肪酸誘導体組成物を生産するために、生産宿主細胞（または同様な意味合いで宿主細胞）は、非操作またはネイティブな宿主細胞と比べて改変されている、例えば、上述のようにおよび例えば米国特許出願公開第2015/0064782号に開示されるように操作された、脂肪酸生合成経路を含むように操作されている。修飾脂肪酸生合成経路を含むように操作された生産宿主は、グルコースまたは他の再生可能な供給原料を脂肪酸誘導体に効率的に変換することができる。様々な化合物の生産のための高密度発酵のためのプロトコルおよび手順が、確立されている（例えば、米国特許第8,372,610号；同第8,323,924号；同第8,313,934号；同第8,283,143号；同第8,268,599号；同第8,183,028号；同第8,110,670号；同第8,110,093号；および同第8,097,439号を参照されたい）。

40

#### 【0209】

いくつかの例示的な態様では、生産宿主細胞は、約20g/L～約900g/Lの炭素源（例えば、単純炭素源）の初濃度を含む培養培地（例えば発酵培地）中で培養される。他の態様では、培養培地は、約2g/L～約10g/L；約10g/L～約20g/L；約20g/L～約30g/L；約30g/L～約40g/L；または約40g/L～約50g/Lの炭素源初濃度を含む。いくつかの態様で

50

は、培養培地中に利用可能な炭素源のレベルは、発酵の進行中に監視することができる。いくつかの態様では、この方法は、培地中の炭素源の初期レベルが約0.5g/L未満である場合に、追加の炭素源を培養培地に添加することをさらに含む。

#### 【0210】

いくつかの例示的な態様では、追加の炭素源は、培地中の炭素源のレベルが、約0.4g/L未満、約0.3g/L未満、約0.2g/L未満、または約0.1g/L未満である場合に、培養培地に添加される。いくつかの態様では、追加の炭素源は、約1g/L～約25g/Lの炭素源レベルを維持するために添加される。いくつかの態様では、追加の炭素源は、約2g/L以上（例えば、約2g/L以上、約3g/L以上、約4g/L以上）の炭素源レベルを維持するために添加される。ある特定の態様では、追加の炭素源は、約5g/L以下（例えば、約5g/L以下、約4g/L以下、約3g/L以下）の炭素源レベルを維持するために添加される。いくつかの態様では、追加の炭素源は、約2g/Lから約5g/L、約5g/Lから約10g/L、または約10g/Lから約25g/Lの炭素源レベルを維持するために添加される。

10

#### 【0211】

例示的な一態様では、発酵のための炭素源は、再生可能な供給原料に由来する。いくつかの態様では、炭素源は、グルコースである。他の態様では、炭素源は、グリセロールである。他の可能な炭素源には、フルクトース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、デンプン、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、キシラン、スクロース、マルトース、セロピオース、ツラノース、酢酸、エタン、エタノール、メタン、メタノール、ギ酸、および一酸化炭素；セルロース材料および変種、例えばヘミセルロース、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウム；飽和もしくは不飽和脂肪酸、コハク酸エステル、乳酸エステルおよび酢酸エステル；アルコール、例えばエタノール、メタノール、およびグリセロール、またはその混合物が含まれるが、それに限定されない。一態様では、炭素源は、トウモロコシ、サトウキビ、モロコシ、テンサイ、スイッチグラス、エンシレージ、藁、木材、パルプ、汚水、ごみ、セルロース一般廃棄物、煙灰（flu-gas）、合成ガス、または二酸化炭素に由来する。単純炭素源は、光合成産物、例えばグルコースまたはスクロースであることもできる。一態様では、炭素源は、グリセロール、煙灰、もしくは合成ガスなどの廃棄物；またはバイオマスなどの有機物の再編成；または天然ガスもしくはメタン、またはこれらの物質の合成ガスへの再編成；または光合成的に固定された二酸化炭素由来であり、例えば、中鎖脂肪酸誘導体は、光合成増殖している組換えシアノバクテリアまたは藻類によって、炭素源としてCO<sub>2</sub>を使用して生産され得る。いくつかの例示的な態様では、炭素源は、バイオマスに由来する。バイオマスの例示的な供給源は、トウモロコシ、サトウキビ、またはスイッチグラスなどの植物材料または植生である。バイオマスの別の例示的な供給源は、動物性物質（例えば、牛糞肥料）などの代謝廃棄物である。バイオマスのさらなる例示的な供給源には、藻類および他の海洋性植物が含まれる。バイオマスは、また、発酵廃棄物、エンシレージ、藁、木材、汚水、ごみ、セルロース一般廃棄物、自治体固形廃棄物、および残飯を非限定的に含む工業、農業、林業、および家庭からの廃棄物を含む。

20

30

#### 【0212】

いくつかの例示的な態様では、脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸エステル、中鎖脂肪酸アルコールなどは、濃度約0.5g/L～約40g/Lで生産される。いくつかの態様では、脂肪酸誘導体は、濃度約1g/L以上（例えば、約1g/L以上、約10g/L以上、約20g/L以上、約50g/L以上、約100g/L以上）で生産される。いくつかの態様では、脂肪酸誘導体は、濃度約1g/L～約170g/L、約1g/L～約10g/L、約40g/L～約170g/L、約100g/L～約170g/L、約10g/L～約100g/L、約1g/L～約40g/L、約40g/L～約100g/L、または約1g/L～約100g/Lで生産される。

40

#### 【0213】

他の例示的な態様では、脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体は、約25mg/L、約50mg/L、約75mg/L、約100mg/L、約125mg/L、約150mg/L、約175mg/L、約200mg/L、約225mg/L、約250mg/L、約275mg/L、約300mg/L、約325mg/L、約350

50

mg/L、約375mg/L、約400mg/L、約425mg/L、約450mg/L、約475mg/L、約500mg/L、約525mg/L、約550mg/L、約575mg/L、約600mg/L、約625mg/L、約650mg/L、約675mg/L、約700mg/L、約725mg/L、約750mg/L、約775mg/L、約800mg/L、約825mg/L、約850mg/L、約875mg/L、約900mg/L、約925mg/L、約950mg/L、約975mg/L、約1000mg/L、約1050mg/L、約1075mg/L、約1100mg/L、約1125mg/L、約1150mg/L、約1175mg/L、約1200mg/L、約1225mg/L、約1250mg/L、約1275mg/L、約1300mg/L、約1325mg/L、約1350mg/L、約1375mg/L、約1400mg/L、約1425mg/L、約1450mg/L、約1475mg/L、約1500mg/L、約1525mg/L、約1550mg/L、約1575mg/L、約1600mg/L、約1625mg/L、約1650mg/L、約1675mg/L、約1700mg/L、約1725mg/L、約1750mg/L、約1775mg/L、約1800mg/L、約1825mg/L、約1850mg/L、約1875mg/L、約1900mg/L、約1925mg/L、約1950mg/L、約1975mg/L、約2000mg/L (2g/L)、3g/L、5g/L、10g/L、20g/L、30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/Lまたは前記値の任意の2つによって結ばれる範囲の力価で生産される。他の態様では、脂肪酸誘導体または他の化合物は、100g/Lよりも大きい、200g/Lよりも大きい、または300g/Lよりも大きい力価で生産される。例示的な態様では、本明細書開示の方法により組換え宿主細胞によって生産される脂肪酸誘導体または他の化合物の力価は、5g/L～200g/L、10g/L～150g/L、20g/L～120g/Lおよび30g/L～100g/Lである。力価は、所与の組換え宿主細胞培養物によって生産される特定の脂肪酸誘導体もしくは脂肪酸誘導体の組み合わせまたは別の化合物もしくは他の化合物の組み合わせを表し得る。例示的な態様では、大腸菌などの組換え宿主細胞における操作TE変種の発現は、対応する野生型ポリペプチドを発現している組換え宿主細胞と比較して高い力価の生産をもたらす。一態様では、より高い力価は、少なくとも約5g/L～約200g/Lの範囲である。

#### 【0214】

他の例示的な態様では、本開示の方法により脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体を生産するように操作された宿主細胞は、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約11%、少なくとも約12%、少なくとも約13%、少なくとも約14%、少なくとも約15%、少なくとも約16%、少なくとも約17%、少なくとも約18%、少なくとも約19%、少なくとも約20%、少なくとも約21%、少なくとも約22%、少なくとも約23%、少なくとも約24%、少なくとも約25%、少なくとも約26%、少なくとも約27%、少なくとも約28%、少なくとも約29%、もしくは少なくとも約30%、または前記値の任意の2つによって結ばれる範囲の収率を有する。他の態様では、1種もしくは複数種の脂肪酸誘導体または他の化合物は、約30%よりも大きい、約35%よりも大きい、約40%よりも大きい、約45%よりも大きい、約50%よりも大きい、約55%よりも大きい、約60%よりも大きい、約65%よりも大きい、約70%よりも大きい、約75%よりも大きい、約80%よりも大きい、約85%よりも大きい、約90%よりも大きい収率で生産される。代替的または追加的に、収率は、約30%以下、約27%以下、約25%以下、または約22%以下である。別の態様では、収率は、約50%以下、約45%以下、または約35%以下である。別の態様では、収率は、約95%以下、または90%以下、または85%以下、または80%以下、または75%以下、または70%以下、または65%以下、または60%以下、または55%以下、または50%以下である。したがって、収率は、上記終点のうちの任意の2つにより結ばれることができる。例えば、本明細書開示の方法により組換え宿主細胞によって生産される中鎖脂肪酸誘導体、例えば、8および/または10炭素脂肪酸誘導体の収率は、約5%～約15%、約10%～約25%、約10%～約22%、約15%～約27%、約18%～約22%、約20%～約28%、約20%～約30%、約30%～約40%、約40%～約50%、約50%～約60%、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約90%、約90%～約100%、約100%～約200%、約200%～約300%、約300%～約400%、約400%～約500%、約500%～約600%、約600%～約700%、または約700%～約800%であることができる。収率は、特定の中鎖脂肪酸誘導体または

10

20

30

40

50

脂肪酸誘導体の組み合わせを表し得る。一態様では、より高い収率は、理論的収率の約10%～約800%の範囲である。加えて、収率は、使用される供給原料にも依存する。

【0215】

いくつかの例示的な態様では、本開示の方法により脂肪酸誘導体、例えば、中鎖脂肪酸誘導体を生産するように操作された宿主細胞の生産性は、少なくとも100mg/L/時間、少なくとも200mg/L/時間、少なくとも300mg/L/時間、少なくとも400mg/L/時間、少なくとも500mg/L/時間、少なくとも600mg/L/時間、少なくとも700mg/L/時間、少なくとも800mg/L/時間、少なくとも900mg/L/時間、少なくとも1000mg/L/時間、少なくとも1100mg/L/時間、少なくとも1200mg/L/時間、少なくとも1300mg/L/時間、少なくとも1400mg/L/時間、少なくとも1500mg/L/時間、少なくとも1600mg/L/時間、少なくとも1700mg/L/時間、少なくとも1800mg/L/時間、少なくとも1900mg/L/時間、少なくとも2000mg/L/時間、少なくとも2100mg/L/時間、少なくとも2200mg/L/時間、少なくとも2300mg/L/時間、少なくとも2400mg/L/時間、2500mg/L/時間、または10g/L/時間（細胞質量に依存する）という高さである。例えば、本開示の方法により組換え宿主細胞によって生産される1種もしくは複数種の脂肪酸誘導体または他の化合物を含むマロニル-CoA由来化合物の生産性は、500mg/L/時間～2500mg/L/時間、または700mg/L/時間から2000mg/L/時間であり得る。生産性は、所与の宿主細胞培養物によって生産される特定の8炭素および/もしくは10炭素の脂肪酸誘導体または脂肪酸誘導体の組み合わせまたは他の化合物を表し得る。例えば、対応する野生型ポリペプチドを発現している組換え宿主細胞と比較して、大腸菌などの組換え宿主細胞における操作TE変種の発現は、8炭素および/もしくは10炭素の脂肪酸誘導体または他の化合物の生産性の増加をもたらす。例示的な態様では、より高い生産性は、約0.3g/L/h～約3g/L/h、約10g/L/h、約100g/L/h、約1000g/L/hの範囲である。

【0216】

VI. 単離

上述のような組換え宿主細胞を利用して生産される、本明細書開示の中鎖脂肪酸誘導体を含む生物産物、例えば、組成物は、典型的には、当技術分野において公知の方法により発酵ブロスから単離される。例示的な態様では、組換え宿主細胞を利用して生産される本明細書開示の中鎖脂肪酸誘導体を含む組成物は、上に記載されており、重力沈降、遠心分離、またはデカンテーションにより発酵ブロスから単離される。

【0217】

VII. 中鎖脂肪酸誘導体の組成物および製剤

上に詳細に記載される組換え宿主細胞を利用して生産される生物産物、例えば、中鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸誘導体を含む組成物は、再生可能な供給源（例えば、再生可能な供給原料から得られる単純炭素源）から生産され、このことから、新しい物質組成物である。これらの新しい生物産物は、デュアルカーボン-同位体フィンガープリンティングまたは<sup>14</sup>C年代決定に基づき石油化学炭素由来の有機化合物と識別することができる。追加的に、特定起源の生物起源炭素（例えば、グルコース vs. グリセロール）を、当技術分野において公知のデュアルカーボン-同位体フィンガープリンティングによって決定することができる（例えば、米国特許第7,169,588号、WO2016/011430A1なども参照されたい）。

【0218】

さらに、下に示すように、生物産物の組成物は、生物から生産される天然脂肪酸誘導体の独特の組成を規定する。中鎖脂肪酸誘導体において異常に高いこれらの独特な組成物は、これらの貴重な中鎖長産物の新規で独特の供給源を提供する。

【0219】

以下の実施例は、本発明を限定するのではなく、本発明を例示するために提供される。

【実施例】

【0220】

以下の具体例は、本開示を例証することを意図しており、特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 2 1 】

## 実施例1

以下の実施例は、中鎖長脂肪酸誘導体化合物に対する化学修飾が、中鎖脂肪酸誘導体化合物に対する微生物が経験する毒性を、未修飾の中鎖長脂肪酸誘導体化合物の存在下で成長させたときの微生物が経験する毒性と比べて減少させることを例証する。

## 【 0 2 2 2 】

本明細書上記で考察した通り、生体システム（例えば、微生物細胞の発酵）を使用した中鎖長脂肪酸誘導体化合物の生産は、中鎖長脂肪酸 / 脂肪族化合物の選択的生産のための望ましい経路である。残念ながら、中鎖脂肪酸誘導体化合物は、微生物細胞に対して非常に有毒であり得、この毒性は、中鎖長脂肪酸誘導体化合物の、商業規模での、発酵を介した生産に対する障壁である。

10

## 【 0 2 2 3 】

この実施例では、修飾か非修飾かという点だけが異なる関連化合物について、各化合物の最小阻止濃度（MIC）（培養物の50%を殺傷するのに十分な化合物の濃度）を決定することによって毒性を評価した。より低い毒性（すなわち、比較的高いMIC）を有する化合物は、発酵によって生産しやすい化合物である。

## 【 0 2 2 4 】

大腸菌細胞培養物を、これらの化合物の様々な濃度で成長させ、そして、成長の24時間後の溶解培養物からの総タンパク質を測定することによって、培養物中の細胞総数の尺度としてそれらの成長を決定した。

20

## 【 0 2 2 5 】

特に、大腸菌細胞培養物を、オクタノール、オクタン酸、オクタン酸メチルおよび酢酸オクチルの存在下で成長させた。結果を図1に示す。

## 【 0 2 2 6 】

図1で分かるように、中鎖酸であるオクタン酸および中鎖アルコールであるオクタノールは、1~5g/LのMICを有する。一方、これらの中鎖アルコールおよび酸のエステルである酢酸オクチルおよびオクタン酸メチル、オクタン酸エチル（示さず）は、対応する未修飾のアルコールおよび酸よりも10~100倍高いMICを有する。したがって、大腸菌は、未修飾の化合物と比較して、10~100倍高い濃度の化学修飾された化合物に耐容性を示すことができる。

30

## 【 0 2 2 7 】

したがって、上記実施例は、中鎖脂肪アルコールおよび酸のエステルが、産業用発酵プロセスによって高濃度で生産されかつ耐容され得ることを実証している。さらに、上記実施例は、所与の鎖長の脂肪族化合物の毒性を、毒性分子に関連する官能基を修飾することによってまたはその分子量をわずかに増加させることによって、大幅に減少させることができることを実証している。

## 【 0 2 2 8 】

## 実施例2

以下の実施例は、中鎖脂肪酸誘導体化合物の毒性が分配係数（LogP）に相関していることを例証する。

40

## 【 0 2 2 9 】

実施例1に示す通り、中鎖脂肪アルコールのエステルおよび中鎖脂肪酸のエステルは、対応する中鎖脂肪アルコールおよび中鎖脂肪酸よりも毒性が低い（より高いMICを有する）。

## 【 0 2 3 0 】

多くの水溶性化合物は、低い分配係数（LogP）を有する。LogPは、水とオクタノールとの間の化合物の分配の尺度である（例えば、酢酸、乳酸、ピルビン酸、1,3 プロパンジオール、アミノ酸などの低いLogPを有する化合物が、微生物、例えば、大腸菌によって高濃度で生産されかつ耐容され得ることを参照のこと）。したがって、より疎水性が低く（または同等により親水性が高く）、それ故より低いLogPを有する化合物は、毒性がより低

50

いだろうと結論付けることができる。これが本当かどうかを評価するために、本発明者等は、図1に開示される化合物（すなわち、オクタノール、オクタン酸、酢酸オクチルおよびオクタン酸メチル）のlogPを測定した。

【0231】

驚いたことに、図2が示す通り、中鎖脂肪族化合物について、LogPの関数としての毒性は、期待に反するものである。すなわち、低いlogPを有する化合物であるオクタノールおよびオクタン酸は、高い毒性（すなわち、低いMIC）を有する。高いlogPを有する化合物である酢酸オクチル、オクタン酸メチルおよびオクタン酸エチル（ethyl octanoate）は、より低い毒性（高いMIC）を有する。

【0232】

したがって、この実施例は、低いLogPを有する毒性の中鎖脂肪族化合物からより高いlogP<sub>W0</sub>を有する化合物への修飾が、大腸菌などの産業用微生物に毒性である中鎖脂肪族化合物の毒性を減少させるための有用な方法であることを実証している。

【0233】

実施例3

以下の実施例は、毒性の中鎖脂肪族化合物から、それらのより毒性の低い誘導体への変換を触媒する新規生化学経路の発現が、微生物を、毒性の化合物に通じる経路に耐容性に行うことができ、かつ、微生物がその誘導体を高レベルで生産できることを例証する。

【0234】

上記実施例1および2で考察した通り、脂肪アルコールおよび脂肪酸などの中鎖脂肪酸誘導体化合物は、宿主細胞に毒性であるが、それらのわずかにより高い分子量誘導体および高いlogP誘導体はそうではない。したがって本発明者等は、より毒性である化合物を、より毒性の低い化合物へインビボで生化学的に変換することによって、微生物において細胞を殺傷することなしにより毒性の化合物を生産することができると判断した。より毒性の低い化合物が、その後、高レベルで生産されかつ耐容され得る。これらのより毒性の低い化合物は、一旦生産されると、単離してそのまま使用することもできるし、単離して化学的に変換して、より毒性の化合物に戻すこともできる。

【0235】

以下に示す通り、細胞を操作して、毒性の中鎖脂肪酸誘導体の官能基を、例えば、短鎖の酸またはアルコールでエステル化するなどして修飾することは、エステル化されていない化合物に対する細胞の毒性応答を排除し、そして、操作された細胞が、毒性の化合物に通じる高生産性生化学経路の発現から生存することを可能にする。これは、これらの中鎖長脂肪酸誘導体をそれらの阻害レベルを優に上回る濃度で生産する新規でかつ選択的なプロセスを可能にする。

【0236】

その上、中鎖脂肪酸および/または中鎖脂肪アルコールをエステル化によって修飾してエステル化された中鎖脂肪酸および/またはエステル化された中鎖脂肪アルコールを提供することは、生合成経路において抽出剤として作用することによって中鎖中間体の毒性をさらに減少させる。

【0237】

抽出剤としてのエステル化された中鎖脂肪酸誘導体

図3に、酢酸オクチルの存在が細胞を1-オクタノール毒性から保護することができるかどうかを試験するように設計された実験の結果を示す。図3から明らかなように、0.5グラム/リットル（g/L）の濃度の1-オクタノールに5時間曝露した後、大腸菌細胞の生存率は完全に失われた。しかしながら、興味深いことに、50g/L（大腸菌細胞に非毒性の濃度）の酢酸オクチルも加えた場合、細胞生存率は、細胞を0.5g/Lの濃度の1-オクタノールに曝露したときも、さらには1g/Lの濃度の1-オクタノールに曝露したときであっても、対照レベルの100%で維持された。細胞を10g/Lの濃度の1-オクタノール（1-オクタノールに対して観察されたMICを優に超える）に曝露したとき、生存率は、20%未満減少した。

【0238】

10

20

30

40

50

脂肪アルコールアセチルトランスフェラーゼを発現させることによる中鎖脂肪アルコールに対する耐容性の改変

上で考察して示した通り、微生物による中鎖（C6～C10）脂肪アルコールの生産は、それらの毒性によって制限される。これらの中鎖脂肪酸誘導体化合物に対する耐容性を増加させる遺伝メカニズムおよび生化学メカニズムを同定するために、多大な労力が注がれてきた（例えば、Lennen and Pflefer, 2013; Royce et al., 2015; Tan, et al., 2016; Tan, et al., 2017を参照のこと）。しかしながら、これまでのところ、商業用レベル（例えば、約10g/l～200g/lの間の濃度またはより高い濃度）の生産を可能にする解決策は見いだされていない。

#### 【0239】

実施例1において、本発明者等は、中鎖脂肪アルコール酢酸エステルは、培養培地に加えられると、対応する中鎖長脂肪アルコールよりも毒性が低いことを実証した。下記の実験において、本発明者等は、細胞内で中鎖長脂肪アルコールを生産する経路の発現が、細胞毒性であること、その結果として、不十分な細胞成長およびこれらの細胞による限定された中鎖アルコール生産をもたらすことを実証する。本発明者等はさらに、中鎖アルコールをアルコール酢酸エステルへと変換する生化学経路を発現するように同じ株をさらに操作したときに、細胞は、十分に成長して、有意な量の脂肪アルコール酢酸エステルを生産することを示す。したがって、細胞において合成された中鎖長脂肪アルコールからそれらの酢酸アルコールへの生化学変換は、中間体中鎖脂肪アルコールの毒性を排除し、高レベルの脂肪アルコール酢酸エステルの生産を可能にする。これは、中鎖長アルコール-O-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が、細胞内で生産された中鎖脂肪アルコールに対する耐性を付与することをさらに実証している（図4）。

#### 【0240】

脂肪アルコールを様々な生化学経路を通じて生産するように細胞を操作することができる（例えば、図4を参照のこと）。これらの生化学経路としては、細胞内で脂肪酸チオエステルを加水分解して脂肪酸を生産するチオエステラーゼ（TE）（例えば、PCT/US1998/011697、米国特許9,765,368、PCT/US2010/04049を参照のこと）、脂肪酸から脂肪アルデヒドへのATPおよびNAD(P)H還元を触媒するカルボン酸レダクターゼ、および脂肪アルデヒドから脂肪アルコールへのNAD(P)H依存性還元を触媒するアルコールデヒドロゲナーゼ（ほとんどの細胞は、細胞内でこの反応を触媒する十分なアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するが、これらのまたは類似の酵素の過剰発現は、脂肪アルデヒドが蓄積しないことを保証することができることに留意されたい。例えば、WO 2010/062480を参照のこと）を含む経路が挙げられるが、これらに限定されない。脂肪アルコールを生産するように改変することができる他の経路としては、脂肪酸アシルチオエステル（例えば、Kim et al, 2015を参照のこと）から脂肪アルデヒドへの還元を触媒する脂肪酸アシルレダクターゼが挙げられる。

#### 【0241】

脂肪アルコールのアセチル化は、例えば、アルコールのアセチル補酵素A(CoA)依存性アセチル化を触媒するアルコール-O-アセチルトランスフェラーゼ（EC 2.3.1.84）の発現によって達成することができる（図4）。アルコールアセチルトランスフェラーゼ（AAT）は、多様であり、そして、植物AAT（例えば、イチゴSAATまたはFaAAT2、ペチュニアPhcFATB2など）、酵母ATF（サッカロミセス セレビスエ ATF1）（例えば、PCT/US2014/053587を参照のこと）などのファミリーから適切なAATを選択することができる。非限定例として、ここで、本発明者等は、脂肪アルコールを生産するように操作された大腸菌細胞においてS.セレビスエ ATF1を発現する効果を示す。

#### 【0242】

アセチル化経路を発現することに有益性があったかどうかを判断するために、中鎖脂肪アルコールの生合成のための経路を発現する株の生存率を、（毒性）中鎖脂肪アルコールを、脂肪アルコール酢酸エステル（より低い毒性）へと変換するであろうATFを発現する同質遺伝子株の生存率と比較した。この評価において、sRG.674株は、生産された総脂肪

10

20

30

40

50

種（FAS）の85～90%が8または10個の炭素鎖長のもの（C8+C10脂肪アルコール（C8+C10 FALC））である脂肪アルコール種を生産する。sJN.209株は、脂肪アルコール（FALC）経路を発現するプラスミドに*S.セレビシエ* *atf1*遺伝子が付加された以外は、sRG.674と同質遺伝子的である。

#### 【0243】

（表3）中鎖脂肪アルコール（FALC）または脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）を生産する株

| 株の名称    | 説明       | 発現される経路酵素                        |
|---------|----------|----------------------------------|
| sRG.674 | FALC 生産体 | 操作チオエステラーゼ変種<br>CarB, AlrA       |
| sJN.209 | FACE 生産体 | 操作チオエステラーゼ変種<br>CarB, AlrA, ATF1 |

10

#### 【0244】

sRG.674株およびsJN.209株を、5Lのバイオリアクター内、実施例9および10に記載の通り、最大消費速度で供給される炭素源としてグルコースを含有した最少塩培地を使用して成長させた（図5）。FALC経路の発現および中鎖化合物の生産を誘導するIPTGの添加前であっても、FALC生産株（sRG.674）は成長できなかった（図5A）。理論に束縛されるものではないが、FALC生産株の成長不全は、中鎖FALC合成に關与する酵素の低レベルの構成的発現ならびに阻止濃度のC8およびC10 FALCの早期生産に起因し得ると考えられる。一方、sJN.209株ではAATの発現によって、この成長阻害が観察されず、代わりに、全72時間発酵で完全成長および脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）の生産が観察された。

20

#### 【0245】

生産された脂肪種のレベルおよび組成の比較（図5Bおよび図5C）は、中鎖長脂肪アルコールをより毒性の低い化合物である脂肪アルコール酢酸エステルへと変換することによって一過性であるが高レベルの中鎖長脂肪アルコール生産を細胞において可能にする、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の強力な能力をさらに実証する。

#### 【0246】

中鎖遊離脂肪酸に対する耐容性のための改変

30

中鎖脂肪アルコールと同様に、中鎖遊離脂肪酸は、微生物細胞に毒性である（例えば、図1を参照のこと）。ここで、本発明者等は、遊離脂肪酸を脂肪酸メチルエステル（FAME）または脂肪酸エチルエステル（FAEE）などのより毒性の低いアルキルエステルへ変換する能力を備えた細胞を提供することによって、そのような化合物の生産を大きく改善することができることを示す。

#### 【0247】

中鎖FFAのエステル化は、補酵素A（CoA）およびアデノシン三リン酸（ATP）依存性のアシル補酵素A（アシル-CoA）合成を触媒する脂肪酸アシルCoAシンセターゼ（例えば、大腸菌由来のFadDなど）の発現、ならびに、アシル-CoA（脂肪酸アシル-CoAシンセターゼの産物またはβ酸化もしくは逆行β酸化経路における中間体）などのチオエステルのアルコール分解を触媒するエステルシンターゼの発現を通じて達成することができる（図6）。

40

#### 【0248】

中鎖FFAのエステル化はまた、中鎖長アシルACP（アルキルチオエステルでもある）の直接アルコール分解を触媒する中鎖長選択的エステルシンターゼ（例えば、実施例?）の発現を通じて達成することもできる。

#### 【0249】

エステル合成経路を発現する有益性は、中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼを発現するように操作された株とアシルCoAシンセターゼおよびエステルシンターゼも発現した同質遺伝子株とを生存率および生産される中鎖脂肪酸誘導体について比較することによって実証された。

50

## 【0250】

中鎖長チオエステラーゼ（SEQ ID NO:49）を発現するようにsRS.786株を操作し、この株は、大部分がC8およびC10 FFAであるFFAを生産する（図7C）。Stpay.179株は、sRS.786と同質遺伝子であるが、脂肪酸アシルCoAシンセターゼおよびエステルシンターゼも発現する。Stpay.179は、培地中に、例えば、メタノール、エタノールなどの短鎖アルコールを与えたときに、中鎖長脂肪アルキルエステルを生産する（図7C）。

## 【0251】

（表4）中鎖脂肪酸（FFA）または脂肪アルキルエステルを生産する株

| 株の名称      | 説明         | 発現される経路酵素                                   |
|-----------|------------|---------------------------------------------|
| sRS.786   | FFA 生産体    | 操作チオエステラーゼ変種                                |
| Stpay.179 | 脂肪アルキルエステル | 操作チオエステラーゼ変種、<br>アシルCoAシンセターゼ、<br>エステルシンターゼ |

10

## 【0252】

sRS.786株およびStpay.179株を、5Lのバイオリアクター流加培養で、下記実施例11および12の通り、14/g/hの速度で供給される炭素源としてグルコースを含有した最少塩培地を使用して成長させた。加えて、エタノール（図7）またはメタノール（示さず）のいずれかを発酵過程に供給し、アルコールの濃度を2g/L前後に維持した。

20

## 【0253】

FFAだけを生産する株（sRS.786）は、中鎖長アシル-ACPチオエステラーゼ（SEQ ID NO:49）の発現を誘導するIPTGの添加のおよそ10時間後に成長およびグルコース消費を停止し、C8+C10 FFAを約5g生産した。一方、エステル化経路を発現したStpay.179株は成長でき、84g/kgを超える力価の総脂肪酸種を生産できたが、その93%は、C8～C10 FFAであった（図7Bおよび図7C）。エステル合成に補充されるアルコールとしてエタノールまたはメタノールを使用したときに、同様の結果が観察された。

## 【0254】

これらのデータは、毒性の細胞内中鎖遊離脂肪酸から、より毒性の低いアルキルエステル（例えば、脂肪酸メチルエステルまたは脂肪酸エチルエステル）への変換を触媒するエステル合成経路の発現が、高レベルの中鎖長脂肪酸誘導体の生産を可能にすることを実証している。これらのデータはさらに、エステル合成経路の発現が、その毒性を排除することによって高レベルの中鎖長選択的チオエステラーゼ発現を可能にすることを示す。

30

## 【0255】

## 実施例4

以下の実施例は、単一のアミノ酸置換を含有し、かつ、中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された活性および/または選択性を有する、操作チオエステラーゼ変種を例証する。

## 【0256】

生物学を使用した中鎖（C6～C10）長脂肪酸誘導体の生産は、現在のところ、利用可能なチオエステラーゼ（TE）の活性および選択性によって一部制限されている。利用可能な最も活性でかつ選択的なTEの1つは、SEQ ID NO:1によって記載されるアミノ酸配列を有する酵素であるクフェア フーケリアナのチオエステラーゼchFatB2である。

40

## 【0257】

しかし、残念ながら、天然に見いだされるこの酵素は、多くの制限を有する。この酵素は、微生物において可溶性タンパク質として十分に発現されず、その比活性は低く、そして、C8チオエステルよりもC10チオエステルの加水分解に、より選択的である。改善された活性、選択性および溶解性を有する新たなTEを作製するために、本発明者等は、幅広い操作努力を行って、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する新規の操作TE変種をもたらすことができるSEQ ID NO:1中のアミノ酸置換を同定した。中鎖脂肪酸

50

誘導体の生産について改善された活性を有するそのようなTE変種は、その中鎖脂肪酸誘導体の生産についての活性の改善を、改善された触媒活性、改善された選択性および/または改善された溶解性のいずれか1以上を通じて達成し得る。

【0258】

SEQ ID NO:1は、328のアミノ酸(6560の可能な単一アミノ酸変種)を有するが、合理的な酵素操作努力を支援できる三次元結晶構造が報告されていない。本発明者等は、まず、親配列SEQ ID NO:1のものと比較して酵素活性および/または中鎖長選択性の大幅な増加を示す操作TE変種をもたらすであろう、SEQ ID NO:1への単一変異を同定および操作するための努力を行った。

【0259】

そのような変異を評価するために、選択された単一アミノ酸置換を有する新規の操作TEをコードする遺伝子を大腸菌において発現させ、TE依存性の脂肪酸誘導体生産を支援する条件下で成長させた。次いで、その株によって生産された中鎖脂肪酸誘導体の量および組成を、定量化し、SEQ ID NO:1を有する酵素を発現した以外は同一である対照株によって生産された中鎖脂肪酸誘導体の量および組成と比較した。

【0260】

天然には遊離脂肪酸を生産しない大腸菌は、異種のTEを発現するように操作したときに遊離脂肪酸を生産することができ、そして、これらの脂肪酸の量および組成は、発現されるTEの活性および選択性と直接関連する(例えば、上記のYuan et al., (1995);国際特許出願公報WO2007136762;国際特許出願公報WO2008119082を参照のこと)。

【0261】

上記実施例1~3で考察した通り、中鎖長脂肪酸および中鎖長脂肪アルコールの生産は、大腸菌などの微生物に毒性である。操作TEを評価するために使用される宿主大腸菌が、潜在的に毒性レベルの中鎖長脂肪酸を生産する操作TEに耐容性となることができるようにするために、使用される大腸菌をまた、操作された細胞によって生産される脂肪アルコール酢酸エステルレベルおよび組成が、発現されるTEの活性および選択性と直接関連するように、中鎖長脂肪酸から脂肪アルコール酢酸エステルへの変換に影響を及ぼすことによって中鎖長脂肪酸に耐容性の細胞を増加させる遺伝子を発現するように操作した。

【0262】

対照評価株の生成

大腸菌における最適な翻訳のためにSEQ ID NO:1のポリペプチドをコードする遺伝子を合成し、これはSEQ ID NO:60の通り示される。この遺伝子を、カナマイシンに対する耐性を付与するpACYC系プラスミド(Genbank Accession X06403)に、その遺伝子がイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)の存在下で誘導されるPtrcプロモーター(例えば、Camsund et al. Journal of Biological Engineering 2014, 8:4を参照のこと)の転写制御下となるようにクローニングした。得られたプラスミドpIR.108(図8)を、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されており(例えば、国際特許出願公報WO2010062480を参照のこと)かつ上記実施例3に記載され遊離脂肪酸(FFA)から脂肪アルコール酢酸エステル(FACE)への生化学変換と一緒に影響を及ぼす遺伝子carB、alrAおよびaftA1を発現するPtrc制御オペロンを保有している、MG1655に由来する大腸菌に形質転換した。

【0263】

高い活性および特異性を有する操作TEを効果的に試験できるようにするために、各々が異なる脂肪酸誘導体生産能を有する、すなわち、脂肪酸経路を通過する異なるレベルの炭素フラックスを支援するように操作された、数種の対照評価株を使用した(表5)。さらに、いくつかの場合には、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する新規の操作TE変種をSEQ ID NO:1の代わりに対照TEとして使用して、高度に活性な改善された操作TEバリエーションを同定した。例えば、単一のアミノ酸置換を有するTEを、適度の脂肪酸フラックスを有するように操作された株において発現されるSEQ ID NO:1と比較した。新規の高度に活性なTE変種が開発されたら、適度の脂肪酸フラックスの株において発現さ

10

20

30

40

50

れるSEQ ID NO:1はもはや、対照として十分に作用しなかった。代わりに、複数のアミノ酸置換を有する、高い脂肪酸能を有する株において発現される、新規の高度に活性な操作TE変種を対照として使用した。まとめると、本発明者等は、新規の操作TE変種の評価を支援する5つの異なるTEおよび株を使用して、各TE変種の性能改善を最良に定量および同定できるようにした。様々な脂肪酸誘導体生産能を備えた対照基礎株の一覧を表5に示す。表6は、野生型配列（SEQ ID NO:1）と比べた対照TEの性能を示す。

【0264】

（表5）異なる脂肪酸誘導体生産能を備えた対照基礎株の説明

|                        | 対照母体の株   |          |          |          |          |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                        | sAZ303   | sJN.032  | sven.449 | sAZ746   | sCB.243  |
| FAS<br>生合成能*<br>(mg/L) | 200-1000 | 200-1200 | 200-1700 | 200-2000 | 200-3000 |

10

下記の“操作TE変種の相対性能の定量化”のHTPスクリーニングにおけるFAS力価（mg/L）の範囲は、各株において操作されたアルキルチオエステルに対するフラックスのレベルに依存する。

【0265】

（表6）対照の操作チオエステラーゼ変種および野生型配列（SEQ ID NO:1）と比べたそれらの性能

20

| 対照 TE                | 総FASのFOC | 総FASに対する<br>C8 FAS %のFOC | %C8/%C10 FOC |
|----------------------|----------|--------------------------|--------------|
| SEQ ID NO:1<br>(野生型) | 1.0      | 1.0                      | 1.0          |
| SEQ ID NO:4          | 1.42     | 1.22                     | 1.78         |
| SEQ ID NO:9          | 1.87     | 1.25                     | 2.04         |
| SEQ ID NO:15         | 1.54     | 1.45                     | 3.48         |
| SEQ ID NO:49         | 2.79     | 1.53                     | 2.07         |
| SEQ ID NO:55         | 2.23     | 2.90                     | 25.43        |

30

【0266】

SEQ ID NO:1と比較して改善された活性を備えた操作TEの同定

表7に記載の操作TEを発現する株を各々、中鎖脂肪酸の生産に影響を及ぼすその固有の操作TEをコードする遺伝子ならびに中鎖脂肪酸から中鎖脂肪アルコール酢酸エステルへの変換に影響を及ぼすCarB、AlrAおよびAft1をコードする遺伝子の発現をもたらす条件下で成長させた。得られた脂肪酸由来産物を抽出し、定量化し、次いで、同じ条件下で成長させたSEQ ID NO:1（表6）を発現する対照評価株1によって生産される脂肪酸誘導体産物と比較した。成長に関するおよび得られた脂肪酸誘導体の分析に関する詳細な方法を以下に記載する。

40

【0267】

表7は、（1）活性、すなわち、培養物によって生産される総脂肪酸由来産物、（2）C8選択性、すなわち、培養物によって生産される総FASに対する%C8 FAS、および（3）性能が対照に対する倍率（FOC）として報告される、C10産物と比較したC8産物に対する選択性（%C8 FAS/%C10 FAS）について、改善された性能を有する操作TEを記載する。

50

表7に示される単一の変異体は、SEQ ID NO:1に相対的である。したがって、例えば、P3Kは、SEQ ID NO:1のアミノ酸位置3における置換変異（プロリンからリジン）を示している。

【 0 2 6 8 】

（表7）総FASを生産する能力、総FASに対する% C8 FAS、および/または% C8 FAS / % C10 FASが改善された、操作チオエステラーゼ変種  
FOC:対照に対する倍率

| SEQ ID NO: | 総FASのFOC | 総FASに対する<br>C8 FAS %の<br>FOC | 総FASに対する<br>C10 FAS %の<br>FOC | % C8/% C10<br>FOC | 対照 TE       | スクリーニング<br>株 |
|------------|----------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------|--------------|
| P3K        | 0.77     | 1.07                         | 0.90                          | 1.19              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| D4M        | 1.22     | 1.10                         | 0.86                          | 1.28              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| S6R        | 0.82     | 1.02                         | 0.97                          | 1.04              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T14G       | 0.81     | 1.02                         | 0.97                          | 1.05              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T14R       | 1.18     | 1.05                         | 0.93                          | 1.13              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V15L       | 0.81     | 1.05                         | 0.92                          | 1.13              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V15W       | 1.20     | 1.06                         | 0.92                          | 1.14              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V17A       | 0.79     | 1.02                         | 0.97                          | 1.05              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V17C       | 1.26     | 1.08                         | 0.89                          | 1.22              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| P22R       | 0.79     | 1.02                         | 0.96                          | 1.06              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| D37P       | 0.78     | 1.01                         | 0.98                          | 1.03              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T44G       | 0.90     | 1.05                         | 0.93                          | 1.13              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T44I       | 0.83     | 1.09                         | 0.87                          | 1.26              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V45S       | 0.66     | 1.03                         | 0.95                          | 1.09              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V50W       | 0.91     | 1.05                         | 0.92                          | 1.13              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| S54R       | 0.84     | 1.10                         | 0.83                          | 1.33              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| S56C       | 1.23     | 0.90                         | 1.15                          | 0.78              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| S56K       | 1.10     | 1.07                         | 0.89                          | 1.21              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T64P       | 1.14     | 1.05                         | 0.94                          | 1.11              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T64R       | 0.84     | 0.96                         | 1.06                          | 0.91              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| T67L       | 0.98     | 1.08                         | 0.88                          | 1.22              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| L73V       | 0.79     | 1.06                         | 0.90                          | 1.18              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| H76F       | 0.82     | 1.10                         | 0.82                          | 1.33              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| H76L       | 1.42     | 1.10                         | 0.86                          | 1.28              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| H76Y       | 0.65     | 1.10                         | 0.85                          | 1.29              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| L91M       | 0.90     | 0.96                         | 1.06                          | 0.91              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| L99K       | 0.96     | 1.06                         | 0.90                          | 1.18              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| L99P       | 1.01     | 1.07                         | 0.90                          | 1.19              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| C102I      | 0.80     | 1.03                         | 0.95                          | 1.09              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| V110L      | 0.81     | 1.08                         | 0.88                          | 1.22              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| I111T      | 0.94     | 0.82                         | 1.24                          | 0.66              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| Q114K      | 1.06     | 1.06                         | 0.91                          | 1.16              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| I129V      | 0.79     | 0.98                         | 1.03                          | 0.95              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| R132W      | 1.43     | 1.05                         | 0.92                          | 1.14              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| G137C      | 0.94     | 1.08                         | 0.93                          | 1.22              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| R158Q      | 0.79     | 1.03                         | 0.96                          | 1.07              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| A162E      | 0.90     | 1.07                         | 0.89                          | 1.21              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| M165T      | 1.20     | 1.04                         | 0.95                          | 1.09              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| L176V      | 1.06     | 0.99                         | 1.01                          | 0.99              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |
| Y178P      | 1.21     | 1.00                         | 1.01                          | 1.00              | SEQ ID NO:1 | sAZ303       |

10

20

30

40

50

|             |      |      |      |      |             |        |
|-------------|------|------|------|------|-------------|--------|
| V185A       | 0.88 | 1.10 | 0.86 | 1.28 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| P186G       | 0.93 | 1.07 | 0.89 | 1.20 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| D196V       | 1.09 | 1.07 | 0.89 | 1.20 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| S197N       | 1.10 | 1.03 | 0.95 | 1.08 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| D198W       | 0.77 | 1.09 | 0.85 | 1.28 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| K203R       | 0.82 | 1.07 | 0.88 | 1.22 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| Q213H       | 0.94 | 1.04 | 0.95 | 1.10 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| Q213R       | 0.99 | 1.04 | 0.94 | 1.11 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| T217R       | 0.80 | 1.04 | 0.93 | 1.12 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| V225L       | 0.69 | 1.08 | 0.85 | 1.27 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| Q227G       | 0.94 | 0.95 | 1.07 | 0.89 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| G236T       | 1.04 | 1.05 | 0.93 | 1.12 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| T244M       | 0.67 | 0.94 | 1.06 | 0.88 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| T244R       | 0.79 | 1.05 | 0.92 | 1.14 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| S254G       | 0.80 | 0.99 | 1.02 | 0.96 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| A256C       | 0.83 | 1.01 | 0.98 | 1.03 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| E258T       | 0.41 | 1.08 | 0.79 | 1.37 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| E258V       | 0.52 | 1.07 | 0.84 | 1.27 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| S278K       | 0.83 | 1.03 | 0.94 | 1.10 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| S278T       | 1.10 | 1.05 | 0.93 | 1.13 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| V282S       | 0.79 | 1.01 | 0.99 | 1.02 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| V282V       | 0.97 | 0.99 | 1.01 | 0.98 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| L292F       | 0.73 | 1.05 | 0.92 | 1.14 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| A297D       | 0.88 | 1.09 | 0.87 | 1.26 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| A297T       | 1.01 | 1.05 | 0.93 | 1.13 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| A297V       | 1.16 | 0.98 | 1.03 | 0.95 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| I298C       | 0.49 | 1.02 | 0.90 | 1.14 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| I298V       | 0.88 | 1.07 | 0.90 | 1.19 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| V299L       | 1.02 | 1.07 | 0.89 | 1.19 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| N300K       | 0.73 | 1.29 | 0.60 | 2.15 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| N300L       | 1.15 | 1.07 | 0.90 | 1.18 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| N300W       | 0.95 | 1.16 | 0.76 | 1.52 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| G301C       | 0.45 | 0.86 | 1.19 | 0.72 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| A302T       | 0.85 | 0.94 | 1.08 | 0.87 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| I316R       | 1.04 | 1.00 | 1.01 | 0.99 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| T321R       | 1.00 | 0.99 | 1.01 | 0.97 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| S322K       | 0.79 | 1.01 | 0.99 | 1.02 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:2 | 1.96 | 1.03 | 0.96 | 1.06 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:3 | 1.85 | 1.03 | 0.96 | 1.08 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:4 | 1.42 | 1.22 | 0.69 | 1.78 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:5 | 1.85 | 1.06 | 0.91 | 1.16 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:6 | 1.82 | 1.04 | 0.94 | 1.11 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:7 | 1.27 | 1.18 | 0.76 | 1.54 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:8 | 1.80 | 1.05 | 0.94 | 1.11 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |
| SEQ ID NO:9 | 1.87 | 1.25 | 0.61 | 2.04 | SEQ ID NO:1 | sAZ303 |

10

20

30

40

50

|              |      |      |      |       |              |          |
|--------------|------|------|------|-------|--------------|----------|
| SEQ ID NO:10 | 0.82 | 1.16 | 0.80 | 1.45  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:11 | 0.94 | 1.15 | 0.87 | 1.27  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:12 | 0.77 | 1.18 | 0.91 | 1.17  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:13 | 0.37 | 1.36 | 0.32 | 4.17  | SEQ ID NO:9  | sven.449 |
| SEQ ID NO:14 | 0.42 | 1.31 | 0.41 | 3.18  | SEQ ID NO:9  | sven.449 |
| SEQ ID NO:15 | 0.83 | 1.17 | 0.68 | 1.70  | SEQ ID NO:9  | sven.449 |
| SEQ ID NO:16 | 0.81 | 1.35 | 0.00 | -     | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:17 | 1.15 | 1.25 | 1.22 | 1.03  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:18 | 1.27 | 1.24 | 0.61 | 2.03  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:19 | 1.27 | 1.24 | 2.69 | 0.46  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:20 | 1.15 | 1.24 | 0.51 | 2.45  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:21 | 1.00 | 1.21 | 0.56 | 2.16  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:22 | 0.83 | 1.19 | 1.71 | 0.70  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:23 | 1.28 | 1.19 | 0.62 | 1.93  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:24 | 1.15 | 1.19 | 0.62 | 1.92  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:25 | 1.25 | 1.19 | 1.29 | 0.92  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:26 | 1.03 | 1.19 | 0.00 | -     | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:27 | 1.23 | 1.18 | 0.00 | -     | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:28 | 1.01 | 1.18 | 1.53 | 0.77  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:29 | 1.06 | 1.18 | 1.02 | 1.16  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:30 | 1.09 | 1.17 | 0.78 | 1.50  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:31 | 1.12 | 1.16 | 1.76 | 0.66  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:32 | 0.94 | 1.16 | 1.02 | 1.14  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:33 | 1.20 | 1.16 | 0.98 | 1.18  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:34 | 1.21 | 1.15 | 1.00 | 1.15  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:35 | 1.10 | 1.15 | 0.61 | 1.88  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:36 | 1.23 | 1.14 | 0.62 | 1.83  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:37 | 0.87 | 1.14 | 0.80 | 1.41  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:38 | 1.38 | 1.13 | 0.48 | 2.37  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:39 | 0.95 | 1.12 | 0.98 | 1.15  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:40 | 1.16 | 1.12 | 0.84 | 1.33  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:41 | 0.73 | 1.12 | 2.69 | 0.42  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:42 | 0.97 | 1.11 | 0.82 | 1.35  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:43 | 0.75 | 1.11 | 1.02 | 1.09  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:44 | 0.98 | 1.11 | 0.48 | 2.32  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:45 | 0.97 | 1.11 | 0.97 | 1.14  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:46 | 1.05 | 1.11 | 2.26 | 0.49  | SEQ ID NO:4  | sJN.032  |
| SEQ ID NO:47 | 0.75 | 1.07 | 0.77 | 0.66  | SEQ ID NO:15 | sAZ746   |
| SEQ ID NO:48 | 1.74 | 1.09 | 0.71 | 0.72  | SEQ ID NO:15 | sAZ746   |
| SEQ ID NO:49 | 1.81 | 1.05 | 0.83 | 0.59  | SEQ ID NO:15 | sAZ746   |
| SEQ ID NO:50 | 1.79 | 1.10 | 0.67 | 0.78  | SEQ ID NO:15 | sAZ746   |
| SEQ ID NO:51 | 1.60 | 1.05 | 0.85 | 0.58  | SEQ ID NO:15 | sAZ746   |
| SEQ ID NO:52 | 1.00 | 1.60 | 0.52 | 3.10  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:53 | 1.00 | 1.40 | 0.27 | 5.20  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:54 | 1.10 | 1.70 | 0.53 | 3.20  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:55 | 0.80 | 1.90 | 0.15 | 12.30 | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:56 | 0.90 | 1.60 | 0.19 | 8.40  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:57 | 1.10 | 1.80 | 0.60 | 3.00  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:58 | 1.00 | 1.30 | 0.15 | 8.60  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:59 | 1.00 | 1.50 | 0.24 | 6.20  | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |

10

20

30

40

## 【 0 2 6 9 】

## 操作TE変種の相対性能の定量化

操作TE変種各々の性能を定量化するために、変種を発現する細胞の培養物を、下記の通り、TE、CarB、AlrAおよびAtf1の発現を支援する条件下で成長させ、得られた脂肪酸誘導体を抽出し、水素炎イオン化型検出器を備えたガスクロマトグラフィー（GC/FID）によって定量化した。

## 【 0 2 7 0 】

得られた脂肪酸誘導体（脂肪酸、脂肪アルコールおよび脂肪アルコール酢酸エステル）の組成および量を決定し、次いで、対照TEを発現する対照評価株によって同一条件下で生

50

産される脂肪酸誘導体と比較した。簡潔に述べると、各株の単一コロニーを、適切な抗生物質を含有するLuria Bertani培地 200 $\mu$ Lを含有する96ウェルプレート中のウェルに植菌した。この培養物40 $\mu$ Lを使用して、96ディープウェルプレート中の同じ培地360 $\mu$ Lに植菌し、これを32 で4時間振盪した。この培養物40 $\mu$ Lを使用して、最終96ディープウェルプレート中の生産培地（表8） 360 $\mu$ Lに植菌した。これらの培養物にヘキサデカン60 $\mu$ Lを重ねし、32 で2時間振盪し、IPTGを加えて（1mMまで）、TE、CarB、AlrAおよびAtf1の発現を誘導し、そして、振盪を追加で20時間継続し、その後、培養物を下記の通り評価した。

【 0 2 7 1 】

（表 8 ） 生産培地

| 成分                                 | 容量        |
|------------------------------------|-----------|
| 滅菌水                                | 669.05 mL |
| 1M CaCl <sub>2</sub>               | 0.1 mL    |
| 50% グルコース (0.5 g/L)                | 70 mL     |
| 5X 塩 1/2 N (2.5 g/L)               | 200 mL    |
| NH <sub>4</sub> Cl (100 g/L, 100X) | 2.5 mL    |
| 2M Bis-Tris, pH 7.0                | 50 mL     |
| 10% Triton                         | 1.25 mL   |
| TM2 (イオンなしの微量元素)                   | 3 mL      |
| 10 g/L クエン酸第二鉄                     | 1 mL      |
| 1M MgSO <sub>4</sub>               | 1 mL      |
| チアミン (10 mg/mL)                    | 0.1 mL    |
| カナマイシン (50 mg/mL)                  | 1 mL      |
| スペクチノマイシン (100 mg/mL)              | 1 mL      |
| 合計                                 | 1000      |

【 0 2 7 2 】

脂肪酸誘導体（FAS）のサンプル調製および定量化

酢酸ブチル400 $\mu$ L（内部分析標準として500mg/L ウンデカノールを含有する）を各ウェルに加え、プレートを熱密封し、2000rpmで15分間振盪し、室温にて4500rpmで10分間遠心分離し、そして、上部有機層100 $\mu$ Lを、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド（BSTFA）100 $\mu$ Lを含有する96ウェルプレートに移した（例えば、Stalling DL, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1968 May 23;31(4):616-22を参照のこと）。プレートを密封し、水素炎イオン化型検出器を備えたガスクロマトグラフィー（GC-FID）によって評価した。

【 0 2 7 3 】

操作TE変種を発現する株に対する「内部プレート対照」として、対照評価株を各プレートに含めた。操作TE変種の相対性能を決定するために、脂肪酸誘導体（発現されたTEおよび下流変換酵素CarB、AlrAおよびAtf1の作用から生じる産物:脂肪酸、脂肪アルデヒド、脂肪アルコール、ならびに脂肪アルコール酢酸エステル）または特定の脂肪酸誘導体（特

定の鎖長、すなわち、C8またはC10など)の総量を定量化し、次いで、同じプレートに由来する対照に対する倍率(FOC)として報告される対照評価株についての同じパラメーターと比較した。例えば、変異体Aの抽出物において同定された全ての脂肪酸種の総力価を加算して、それを内部対照評価株の総FAS力価で割ることによって、変異体Aの総FAS力価のFOCを決定した。対照に対して改善された活性を有する操作TE変種は、報告されるパラメーターについて1.0を超えるFOCを示すと考えられる。変異体Aの抽出物において同定されたC8鎖長の全ての脂肪酸種の総濃度を加算して、それを内部対照評価株について同定されたC8鎖長の全ての脂肪酸種の総濃度で割ることによって、変異体Aの総C8 FASのFOCを決定した。単一のアミノ酸置換を含有する操作チオエステラーゼ変種について、ヒットを同定するために使用される一次測定基準(primary metrics)は、以下であった:(a)総FASの改善されたFOC、(b)総FASに対する% C8 FASの改善されたFOC、およびまたは(c)改善された% C8/% C10。

10

【0274】

表7(上記)に示される変異は、驚いたことに、大幅に、(a)総FASのFOCを改善し;かつ(b)総FASに対する% C8 FASのFOCを改善する能力を有すると同定された。したがって、表7に列挙される変異を含有する操作チオエステラーゼ(TE)変種は、脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する新規の操作TE変種を表す。特に、表7に示される操作TE変種は、C8およびまたはC10脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する新規TE変種を表す。

【0275】

20

#### 実施例5

中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する新しいTEを生み出す複数のアミノ酸置換を含有するようにTE変種を操作した。変種は、ネイティブチオエステラーゼ酵素(SEQ ID NO:1)に対しておよび単一アミノ酸置換を有する操作TE変種に対して、改善された活性および選択性を有していた(実施例4、表7)。

【0276】

実施例4と同様に、複数のアミノ酸置換を有する操作TE変種をコードする遺伝子を合成して、IPTGの存在下で成長させたときにそれらの発現に影響を及ぼす発現ベクターにクローニングした。これらを、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されており(例えば、WO2010062480を参照のこと)かつ上記実施例3に記載され遊離脂肪酸(FFA)から脂肪アルコール酢酸エステル(FACE)への生化学変換と一緒に影響を及ぼす遺伝子carB、alrAおよびaftA1を発現するPtrc制御オペロンを保有している、MG1655に由来する大腸菌株に形質転換した。複数のアミノ酸置換を有する操作TEを、TEが発現される以外は同一であった特定の対照評価株と比較した。

30

【0277】

表7は、複数のアミノ酸置換を有し、かつ、列記された対照評価株およびTEと比較して中鎖脂肪酸誘導体(FAS)の生産についての活性の改善および中鎖長脂肪酸誘導体(SEQ ID NO: 2~SEQ ID NO: 15)を生産するための選択性の改善を示す、新規の操作TEを列記する。したがって、新規の操作TEは、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼであるので、新規の操作TE、それらの個々の変異およびそれらの変異の固有の組み合わせは各々、中鎖長脂肪酸誘導体の生産のための有用なツールである。

40

【0278】

#### 実施例6

以下の実施例は、表面電荷の増加および中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する操作TE変種を例証する。三次元モデリングを使用して、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼ変種/変異体を操作した。

【0279】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:1は、大腸菌において過剰発現されたとき毒性であるように思われる。理論に束縛されるものではないが、SEQ ID NO:1は、細胞内で高い

50

濃度では不安定であるかまたは簡単に凝集し得ると考えられる。それ故、そのタンパク質の潜在的な毒性を低減させるために、三次元モデルをコンピューターで構築し、これを使用してSEQ ID NO:1の表面への電荷を改変した。

#### 【0280】

この実施例では、他のアシル-ACPチオエステラーゼのx線結晶構造をテンプレート化することによって、SEQ ID NO:1の三次元分子モデルをコンピューターで構築した。このモデルに基づいて、正味の表面電荷を変化させると予測されたSEQ ID NO:1酵素の特定の残基を同定した。特に、酵素表面上、負に荷電した残基(AspまたはGlu)を正に荷電した残基(ArgまたはHis)に変異させ、それによって、正味の表面電荷を+15から+25へと修飾した。表7に示されるように、増加した表面電荷を有する得られた操作TE変種は、より高い百分率のC8脂肪酸誘導体を生産する。したがって、操作TE変種は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する。

10

#### 【0281】

SEQ ID NO:1チオエステラーゼの3-Dモデリング。SEQ ID NO:1の実験3D構造は入手不可であったので、この酵素のホモロジーに基づく3Dモデルを、以下の工程1~5に開示するようにコンピューターで構築した。

#### 【0282】

##### (1) 公知の構造の相同のチオエステラーゼの同定

タンパク質データバンク(PDB)は、生体高分子の構造データの唯一のワールドワイドアーカイブである(Berman, H.M. et al, Nucl. Acids Res. (2000) 28 (1): 235-242を参照のこと)。PDBタンパク質データバンクは、ワールドワイドウェブ上のrcsb.org/pdb/home/home.doで利用可能である。PDBデータバンクを使用して、チオエステラーゼの3つの解明されたx線結晶構造を同定した。特に、同定されたチオエステラーゼの3つの解明された構造は、(1)タンパク質データバンク同定番号(PDB ID:2ESS)を有するバクテロイデス シータイオタオミクロン(*Bacteroides thetaiotaomicron*)由来のアシル-ACPチオエステラーゼ、(2)ラクトバシラス プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)由来のオレオイルチオエステラーゼ(PDB ID:2OWN)、および(3)スピロソマ リングアレ(*Spirosoma linguale*)由来のアシル-ACPチオエステラーゼ(PDB ID: 4GAK)であった。全体がSEQ ID NO:1に対して約25%の配列同一性を示すこれらの構造を、テンプレートとして使用した。

20

30

#### 【0283】

##### (2) テンプレート構造に対する問い合わせ配列の整列

PDBにおいて同定されたチオエステラーゼの3つの解明された3D構造(2ESS、2OWNおよび4GAK)およびそれらの配列を、ワールドワイドウェブ上のprodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.phpで利用可能なPROMALS3D多重配列および構造整列サーバー(例えば、J.Pei and N.V.Grishin (2007) Bioinformatics. 23(7): 802-808; J. Pei et al., (2008) Nucl. Acids Res. 36 (7): 2295-2300を参照のこと)で整列させた。2ESS、2OWNおよび4GAKの配列および構造を整列させた後、SEQ ID NO:1の問い合わせ配列を、MMFFTバージョン7を使用して既存の構造に基づく配列整列に整列させた(例えば、Kato, K., et al. (2013) Mol. Biol. Evol. Apr; 30(4): 772-780を参照のこと)。ソフトウェアは、ワールドワイドウェブ上のmafft.cbrc.jp/alignment/softwareで利用可能である。PDBにおいて同定されたSEQ ID NO:1およびアシル-ACPチオエステラーゼ(2ESS、2OWNおよび4GAK)の整列を図9に示す。

40

#### 【0284】

##### (3) SEQ ID NO:1チオエステラーゼのホモロジー3D構造モデルの構築

MODELLERソフトウェア(例えば、B. Webb, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32, 2014を参照のこと)によって、3つのテンプレート2ESS、2OWNおよび4GAK全てならびに上記の工程2に記載した構造に基づく整列を使用して、アミノ酸37~310のホモロジーモデルを構築した。さらなる構造精密化をMODELLER

50

内蔵精密化モードによって実施した。VTFM最適化およびMD精密化モジュールを用いて全てのデフォルトパラメーターで精密化を実施した。MODELLERソフトウェアおよびダウンロードに関する情報は、ワールドワイドウェブ上のsalilab.org/modellerで利用可能である。

#### 【0285】

##### (4) N末端ドメインおよびC末端ドメインのアブイニシオモデルの構築

図9に示されるように、これらの実験において使用されるSEQ ID NO:1チオエステラーゼは、テンプレートx線結晶構造に含まれないN末端残基およびC末端残基（N末端にある36アミノ酸およびC末端にある18アミノ酸）を有する。したがって、これらの部分に対するホモロジーに基づくモデルを構築するための適切なテンプレートがない。したがって、N末端とC末端の両方に対するアブイニシオモデル（例えば、J. Lee et al., (2009) Ab Initio Protein Structure Prediction pgs. 3-25 In: From Protein Structure to Function with Bioinformatics, D.J. Rigden (ed.) Springerを参照のこと）を、ROBETTAサーバー（例えば、Kim, D.E., et al. (2004) Nucleic Acids Res. Jul 1; 32(Web Server issue):W526-W531を参照のこと;ワールドワイドウェブ上のrosetta.orgで利用可能）によって構築した。

#### 【0286】

##### (5) SEQ ID NO:1チオエステラーゼおよび操作TE変種についての完全長モデルの構築

3つのテンプレートを使用したMODELLERソフトウェアを使用して完全長モデルを作成した：主要部分ホモロジーモデル、N末端アブイニシオモデルおよびC末端アブイニシオモデル。

#### 【0287】

野生型対照に対してアミノ酸置換P3K、L176V、D196V、K203R、V282S（SEQ ID NO:4）を有する改善された操作TE変種は、改善された中鎖長脂肪酸誘導体生産能を実証した（実施例5、表7）。それ故、実質的には5つの変種残基を置換し、MODELLER内蔵精密化モードで構造精密化を再度実施することによって、SEQ ID NO:1のモデルをSEQ ID NO:4に再モデリングした。次いで、表面残基を最終モデルに基づいて定義した（図10）。

#### 【0288】

モデル化表面電荷の増加を有する操作TE変種の作製

上記のSEQ ID NO:4についての3D構造モデルに基づき、SEQ ID NO:4の表面に負電荷を与えるように12のアスパラギン酸（D）およびグルタミン酸（E）残基をモデル化した。次いで、実施例4および5に記載の通り、これらの12残基の様々な正の置換から負の置換を有する操作TE変種をコードする遺伝子を合成し、対照TE（SEQ ID NO:4）と比較して改善された中鎖長脂肪酸誘導体の生産について評価した。

#### 【0289】

表7は、SEQ ID NO:4と比較してモデル化表面電荷の増加をもたらすアミノ酸置換を有するならびに中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する、一連の操作TE変種（SEQ ID NO:16～SEQ ID NO:46）を記載している。したがって、表7にSEQ ID NO:16～SEQ ID NO:46の通り列挙されたTEは、中鎖長脂肪酸誘導体の生産に有用な新規の操作TE変種である。さらに、モデル化表面電荷を増加させるアミノ酸置換を有する操作変種TEは、改変されたモデル化表面電荷の増加を有さないTEと比較して改善された中鎖長脂肪酸誘導体の生産に有用である。

#### 【0290】

モデル化表面電荷の増加を有する複数の操作された変異ならびに中鎖長脂肪酸誘導体の生産についての活性および/または選択性を増加させる複数の操作された変異を含有する、新規チオエステラーゼの作製

上記の通り3-Dモデリングによって同定されたチオエステラーゼ表面電荷を増加させると予測され、改善された中鎖長脂肪酸誘導体の生産をもたらしたアミノ酸置換（表7）を、中鎖脂肪酸誘導体の生産についての活性がその対応する対照に対して改善された（実施例6、表7）、SEQ ID NO:15を有する操作TE変種と組み合わせた。

10

20

30

40

50

## 【0291】

実施例5と同様に、複数のアミノ酸置換を有する操作TE変種をコードする遺伝子を合成して、IPTGの存在下で成長させたときにそれらの発現に影響を及ぼす発現ベクターにクローニングした。これらを、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されており（例えば、WO2010062480を参照のこと）かつ上記実施例3に記載され遊離脂肪酸（FFA）から脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）への生化学変換と一緒に影響を及ぼす遺伝子carB、alrAおよびaftA1を発現するPtrc制御オペロンを保有している、MG1655に由来する大腸菌株に形質転換した。複数のアミノ酸置換を有する操作TEを、発現されたTEが対照TE SEQ ID NO:15であったことが唯一の違いである対照評価株と比較した。表7は、対照（SEQ ID NO:15）に対して改善された脂肪酸誘導体の生産活性を有するこの実施例に由来する、一連の操作TE変種（SEQ ID NO:47～SEQ ID NO:51）を記載している。表7に列記されるTEは、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼであるので、中鎖長脂肪酸誘導体の生産に有用な新規の操作TE変種である。

10

## 【0292】

## 実施例7

以下の実施例は、N末端の短縮、溶解性の増加および中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する、操作TE変種を例証する。

## 【0293】

植物のFatB様チオエステラーゼは、それらの小胞体から色素体への移行を媒介するシグナルペプチドを有する。これらの酵素は、シグナルペプチドのプロセッシング後に残るN末端疎水性領域を含有することが知られている。この領域は、チラコイド膜へのチオエステラーゼの会合に関与すると考えられている。大腸菌などの微生物において発現されたとき、上記の野生型（SEQ ID NO:1）および新規の操作TE変種は、不溶性であり、細胞溶解および遠心分離時に膜ペレットと会合する。低い酵素溶解性は、その酵素の多くが、膜と会合し得るかまたは折りたたみ不良を起こし不活性となることを示唆した。

20

## 【0294】

中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善された溶解性および活性を有する新規の操作TE変種を作製するために、SEQ ID NO:49を有するポリペプチドを、この酵素の不十分な溶解性の原因となっている疑いがある重要な疎水性残基を保有するようにモデル化された領域であるアミノ酸2とアミノ酸40との間に短縮を有するように操作した。次いで、これらの操作TE変種の溶解性および活性を、アミノ酸2とアミノ酸40との間に短縮を有さない同じアミノ酸配列の対照TEと比較して評価した。

30

## 【0295】

アミノ酸2とアミノ酸40との間に短縮を有する操作TE変種の溶解性の評価

SEQ ID NO:49のアミノ酸2とアミノ酸40との間に欠失を有する操作TE変種をコードする遺伝子を合成し、中コピー数のpACYC系発現プラスミド（Gen Bank Accession X06403）中のPtrcプロモーターの制御下にクローニングした。次いで、これらのプラスミドを大腸菌に形質転換し、対照TE（SEQ ID NO:49）の発現を指令するプラスミドを担持する同一株と比較して溶解性が増加されたTE変種の発現を指令するそれらの能力を評価した。アミノ酸2とアミノ酸40との間に短縮を有する操作TE変種を発現する株と対照TE（SEQ ID NO:49）を発現する株との間の唯一の違いは、発現されるTEの配列であった。対照および短縮型TEを発現する得られた株を各々、実施例4に記載の通り、96ウェルプレート中、TEをコードする遺伝子の発現をもたらす条件下で成長させた。遠心分離によって細胞を収集し、25mM NaCl、5mM EDTAおよび1mg/mLのリゾチームを含有する50mM Tris-HCl（pH7.8）50μLに再懸濁した。試料を25、1500rpmでインキュベートした。20分後、1mg/mLのDNase I溶液10μLおよび1M MgSO<sub>4</sub> 10μLを各試料に加えた。次いで、試料を1500rpmでさらに20分間振盪した。得られた全細胞溶解物（WCL）を4500rpmで10分間遠心分離し、不溶性画分（ペレット）と可溶性画分（上清）を分離した。

40

## 【0296】

TEのC末端に向けられる抗体を使用したウエスタンブロットを用いて、WCLの可溶性画

50

分における対照および操作TE短縮型変種の存在を追跡した。図11に示されるように、対照ポリペプチド（SEQ ID NO:49を有するチオエステラーゼ）は、WCL中に視認できるが（このことは、このポリペプチドが宿主細胞中で発現されることを示している）、可溶性画分中には存在せず、このことは、低い溶解性を示している。一方、操作された短縮型TE変種は、WCLと可溶性画分の両方に見いだされ、TE変種は全て、可溶性画分中のTEの存在の有意な増加を示している。

#### 【0297】

このことは、微生物において発現されたときに不溶性であるSEQ ID NO:1などの植物のFatB様チオエステラーゼの溶解性を、酵素のN末端が短縮されている操作された変種を発現することによって改善できることを実証している。それはさらに、操作された短縮型変種が、対照TE（SEQ ID NO:49）などのこの短縮を有さないTEと比較して、大腸菌において発現させたときに増加された溶解性を有することを示す。

10

#### 【0298】

成長および脂肪酸誘導体の生産

不十分に可溶性の中鎖長TEの溶解性の増加は、細胞中に存在するより活性な中鎖長TEをもたらす、ひいては、中鎖脂肪酸の生産の増加をもたらすはずである。

#### 【0299】

操作TE短縮型変種の相対活性を評価するために、各酵素をベクターに、該遺伝子が実施例4に記載の通りイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）の存在下で誘導されるPtrcプロモーター（Camsund et al.、上記）の転写制御下となるようにクローニングした。これらを、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されておりかつ遊離脂肪酸（FFA）から脂肪アルコール酢酸エステル（FACE）への生化学変換のための遺伝子carB、alrAおよびaftA1（実施例3に記載される）を発現するPtrc制御オペロンを保有している、MG1655に由来する大腸菌母体株に形質転換した。操作された大腸菌母体を、脂肪酸誘導体の高い生産能について、これらのより可溶性の操作TE変種の期待される高い活性に適応させるように設計した。

20

#### 【0300】

操作された短縮型チオエステラーゼ各々の性能を、対照TE（SEQ ID NO:49）を発現する対照評価株と比較した。操作された短縮型TE変種を発現する評価株と対照TE（SEQ ID NO:49）を発現する対照評価株との間の唯一の違いは、発現されるTEをコードする遺伝子の配列であった。その株の各々を中鎖脂肪アルコール酢酸エステルの生産のために成長させ、そして、得られた中鎖脂肪酸由来産物を実施例4に記載の通り抽出および定量化した。

30

#### 【0301】

得られた脂肪酸誘導体産物を対照評価株（SEQ ID NO:49を発現する）によって生産される産物と実施例4に記載の通り比較することによって、操作された短縮型TE変種各々の活性を評価した。

#### 【0302】

表7は、（1）溶解性（図11）および（2）中鎖脂肪酸誘導体の生産についての活性の改善された性能を有する、操作された短縮型TE変種（SEQ ID NO:52～SEQ ID NO:59）を列記し、性能は、内部対照に対する倍率（FOC）として報告される。したがって、短縮型変異体は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼ変種である。

40

#### 【0303】

増加された溶解性を有する操作された短縮型TE変種の改善された活性をさらに実証するために、SEQ ID NO:55およびSEQ ID NO:56を発現する株を、実施例9に記載の通り5Lのバイオリアクター内で成長させ、同じ条件下で成長させたTE SEQ ID NO:49を発現する対照評価株と比較した。表9は、72時間の時点での対照に対する倍率（FOC）として報告されるこれらの株の性能を記載している。SEQ ID NO:55およびSEQ ID NO:56は共に、このより大きな規模で改善された活性（FAS FOC）および選択性（%C8 FAS、および%C8/%C10 FOC）を示す。

50

## 【 0 3 0 4 】

(表9) 5Lのバイオリアクター内で成長させたときに中鎖長脂肪酸誘導体の生産について改善されたインピボ活性を示す操作された短縮型TE変種

| SEQ ID NO:   | FAS FOC | %C8 FAS FOC | %C8/%C10 FOC | テンプレート | 対照 TE        | スクリーニング株 |
|--------------|---------|-------------|--------------|--------|--------------|----------|
| SEQ ID NO:49 | 1.0     | 1.0         | 1.0          | pAZ338 | -            | sCB.243  |
| SEQ ID NO:55 | 1.4     | 1.3         | 2.1          | pAZ338 | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |
| SEQ ID NO:56 | 1.3     | 1.3         | 2.0          | pAZ338 | SEQ ID NO:49 | sCB.243  |

10

## 【 0 3 0 5 】

## 実施例8

以下の実施例は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する遺伝子改変された微生物を使用して脂肪酸誘導体を生産するために使用できるプロセスを例証する。このプロセスによって生産される脂肪酸誘導体の組成は、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪アルコール、中鎖脂肪アルコール酢酸エステル (FACE)、中鎖脂肪酸メチルエステル (FAME)、中鎖脂肪酸エチルエステル (FAEE)、さらには他の中鎖脂肪酸エステルも含むが、これらに限定されない。

20

## 【 0 3 0 6 】

## シード培養増大物の生成

選択された操作された大腸菌株の凍結細胞バンクバイアルを使用して、適切な抗生物質を含有する125mLのバッフル付き振盪フラスコ中のLB培地20mLに植菌した。この振盪フラスコを、オービタルシェーカー内32℃でおよそ6時間インキュベートし、次いで、培地 (1% v/v) 1.25mLを、500mLのバッフル付きエルレンマイヤー振盪フラスコ中の、最小一晚シード培地 (2g/L NH<sub>4</sub>Cl、0.5g/L NaCl、0.3g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgSO<sub>4</sub>、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、20g/L グルコース、1mL/Lの微量ミネラル溶液 (2g/LのZnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O、2g/LのCaCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、2g/LのNa<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、1.9g/LのCuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、0.5g/LのH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、および10mL/Lの濃HCl)、10mg/Lのクエン酸第二鉄、100mMのBis-Tris緩衝液 (pH 7.0)、および適切な抗生物質) 125mLに移し、振盪器上にて32℃で一晩インキュベートした。

30

## 【 0 3 0 7 】

## バイオリアクター培養プロトコル

上記の一晚シード培養物75mL (5% v/v) を使用して、最初は滅菌済みバイオリアクター発酵培地1.5Lを含有する、5LのBiostat Aplusバイオリアクター (Sartorius BBI) に植菌した。この培地は、2g/LのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5g/Lの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2.2g/LのMgSO<sub>4</sub>七水和物、10g/Lの滅菌濾過グルコース、80mg/L クエン酸第二鉄、1mL/Lの先に記載した微量ミネラル溶液、0.25mL/Lのビタミン溶液 (0.42g/Lのリボフラビン、5.4g/Lのパントテン酸、6g/Lのナイアシン、1.4g/Lのピリドキシン、0.06g/Lのビオチン、および0.04g/Lの葉酸)、1g/L NaCl、1g/L クエン酸、140mg/L CaCl<sub>2</sub>二水和物、10mg/L ZnCl<sub>2</sub>、および適切な抗生物質から構成した。28% w/vアンモニア水を使用して培養物のpHを6.9~7.2の間に、具体的な生成物に応じて培養温度を33~35℃に、通気速度を0.75lpm (0.5 v/v/m) に、そして、DOコントローラーおよび酸素補給に連結された攪拌ループを利用して溶存酸素分圧を30%飽和に維持した。シリコーンエマルジョン系消泡剤 (Dow Corning 1430) の自動添加によって、泡の形成を制御した。

40

## 【 0 3 0 8 】

約50% w/wグルコース (600g/L) から構成される栄養補給を、初期培地中のグルコースが完全に枯渇したら (植菌のおよそ7時間後) 開始し、必要に応じて、DOスタットコントローラー戦略を使用して10g/l/hの速度で供給した (各供給ショットは、継

50

続期間1時間であった)。イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を終濃度1mMまで添加することによって、中鎖脂肪酸誘導体の生産に關与する遺伝子を誘導した。バイオリアクターの実行を約72時間の経過発酵時間で停止した。発酵プロセス全体を通して発酵プロセスの試料をタンクに入れた。

#### 【0309】

##### ブロス組成の分析

発酵ブロスの試料中に存在する脂肪酸誘導体を抽出し、従来のGC-FIDを使用して単回実行で分離した。この目的のために、均一な発酵ブロス試料の各々0.5mLを、15mLのファルコンチューブに分割した。試料の質量を記録し、内部標準 (C11 FAMEまたはC9/C11/C15 FALC) が500ppmの酢酸ブチル5.0mLをブロスに加えて、10倍抽出を達成した。試料を2500rpmで30分間機械的に振盪し、4500rpmにて25 で10分間遠心分離した。抽出物50  $\mu$ l (上部層) をGCバイアルに移し、50  $\mu$ lのBSTFA w/10% TCMSで誘導体化し、続いて、約15秒間ボルテックスした。次いで、Agilent DB1カラム10m  $\times$  180  $\mu$ m  $\times$  0.2  $\mu$ mを使用した従来のGC-FIDシステムに試料を流し、抽出された試料中に存在する全ての脂肪酸誘導体を分離した。各脂肪酸誘導体の濃度をg/Kgで報告する。

#### 【0310】

##### 実施例9

以下の実施例は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有する遺伝子改変された微生物を使用して中鎖脂肪アルコール酢酸エステルを生産するために使用することができるプロセスを例証する。このプロセスによって生産される脂肪酸誘導体の組成は、6~12個の炭素のアシル鎖を有する、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪アルコールおよび中鎖脂肪アルコール酢酸エステル (FACE) を含み得る。5Lのバイオリアクター内での中鎖脂肪アルコール酢酸エステルの生産を実施例8に記載の通り実施した。

#### 【0311】

この実施例では、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されておりかつ中鎖脂肪酸誘導体の高い生産能を保有しているMG1655に由来する大腸菌株を使用した。これらの株は、中鎖脂肪酸の生産について改善された活性を有する操作チオエステラーゼ、ならびに遊離脂肪酸 (FFA) から脂肪アルコール酢酸エステル (FACE) への生化学変換のための遺伝子carB、alrAおよびaftA1 (実施例3に記載される) を発現するオペロンを含有した。SEQ ID NO:9を有する操作されたチオエステラーゼをsRG.825株において発現させた一方で、SEQ ID NO:49を有する操作されたチオエステラーゼをsDH.377株において発現させた。操作されたチオエステラーゼをコードする遺伝子、carB、alrAおよびaftA1は全て、約24時間の経過発酵時間でバイオリアクターヘイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加することによって活性化された誘導性 (Ptrc) プロモーターの転写制御下にあった。バイオリアクターの実行を、約72時間の経過発酵時間で停止し、発酵ブロスを収集し、上記の実施例8の通り分析した。結果を表10および図12に示す。

#### 【0312】

(表10) 中鎖脂肪アルコール酢酸エステルまたは脂肪酸アルキルエステルの生産について操作された代表的な株によって生産される総脂肪酸種 (FAS) 濃度

| 株       | 総 FAS (g/Kg) | ブロス中の脂肪酸誘導体     |
|---------|--------------|-----------------|
| sRG.825 | 65           | 中鎖脂肪アルコール酢酸エステル |
| sDH.377 | 60           | 中鎖脂肪アルコール酢酸エステル |
| sAZ918  | 60           | 中鎖脂肪酸エチルエステル    |

#### 【0313】

##### 実施例10

以下の実施例は、脂肪酸誘導体を生産する能力が改善された遺伝子改変された微生物を使用して中鎖脂肪アルコールを生産するために使用することができるプロセスを例証する。このプロセスによって生産される脂肪酸誘導体の組成は、6~12個の炭素のアシル鎖を

有する脂肪酸、脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコールを含み得る。5Lのバイオリアクター内での中鎖脂肪アルコールの生産を、実施例8に記載の通り、染色体から遺伝子EntDを過剰発現するように操作されておりかつ中鎖チオエステラーゼならびに遊離脂肪酸（FFA）から脂肪アルコール（FALC）への生化学変換のための遺伝子carBおよびalrAを発現するオペロンを含有する大腸菌株を使用して実施した。チオエステラーゼをコードする遺伝子、carBおよびalrAは全て、約7時間の経過発酵時間でバイオリアクターヘイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加することによって活性化された誘導性（Ptrc）プロモーターの転写制御下にあった。中鎖脂肪アルコールは、大腸菌に対して非常に有毒であり、それ故、5Lのバイオリアクター内での生産の間のこれらの化合物の蓄積は、阻止濃度（1g/L未満、実施例3を参照のこと）に達した後すぐに成長および生産を停止させた。

10

#### 【0314】

##### 実施例11

以下の実施例は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼ変種を含む遺伝子改変された微生物を使用して中鎖脂肪酸アルキルエステルを生産するためのプロセスを例証する。このプロセスによって生産される脂肪酸誘導体の組成は、6～12個の炭素のアシル鎖を有する、中鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸メチルエステル（FAME）および/または中鎖脂肪酸エチルエステル（FAEE）を含み得る。

#### 【0315】

この実施例は、中鎖脂肪酸誘導体の高い生産能を保有するように操作されたMG1655に由来する大腸菌株（sAZ918）を使用した、脂肪酸エチルエステル（FAEE）の生産を例証する。この株は、中鎖脂肪酸（SEQ ID NO:49）の生産について改善された活性を有する操作チオエステラーゼならびに遊離脂肪酸（FFA）から脂肪酸アルキルエステル（FAMEまたはFAEE）への生化学変換のためのアシルCoAシンセターゼおよびエステルシンターゼ（実施例3に記載される）を発現するオペロンを含有した。操作チオエステラーゼ、アシルCoAシンセターゼおよびエステルシンターゼは全て、イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）の添加によって活性化された誘導性（Ptrc）プロモーターの転写制御下にあった。

20

#### 【0316】

5Lのバイオリアクター内での中鎖脂肪酸エチルエステルの生産を、実施例8に記載の通りではあるがエタノールを栄養補給に添加して実施した。5Lのバイオリアクターにシード培養物を植菌した後、47.5% w/wグルコースおよび50mL/Lエタノールから構成される栄養補給を、初期培地中のグルコースが完全に枯渇したら（植菌のおよそ7時間後）開始し、要求に応じて、pHスタットコントローラストラテジーを使用して10g/L/hの速度で供給した（各供給ショットは、継続期間1時間であった）。バイオフィルムが溶存酸素プローブを被覆して間違えて低いシグナル読み出しをもたらさないように、このパラメーター値が達成されたら最小攪拌速度を1200rpmに固定した。残留濃度が10g/L未満に低下したら、培養物に追加のエタノールを加えた。約24時間の経過発酵時間でIPTGを終濃度1mMまで添加することによって、株のオクタン酸エチル生産経路が誘導された。バイオリアクターの実行を約72時間の経過発酵時間で停止した。発酵ブロスを集し、上記の実施例8の通り分析した。

30

#### 【0317】

結果を図13に示す。

40

#### 【0318】

##### 実施例12

以下の実施例は、中鎖脂肪酸誘導体の生産について改善された活性を有するチオエステラーゼを含む遺伝子改変された微生物を使用した中鎖脂肪酸の生産のためのプロセスを例証する。このプロセスによって生産される脂肪酸の組成は、6～12個の炭素のアシル鎖を有する中鎖脂肪酸を含む。この実施例では、5Lのバイオリアクター内での中鎖脂肪酸の生産を、実施例8に記載の通り、約13時間の経過発酵時間でバイオリアクターヘイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加することによって活性化される誘導性（Ptrc）プロモーターの転写制御下、中鎖チオエステラーゼを過剰発現するように操作された大腸菌株を

50

使用して実施した。中鎖脂肪酸は、大腸菌に対して非常に有毒であり、それ故、5Lのバイオリアクター内での生産の間のこれらの化合物の蓄積は、阻止濃度（5g/L未満、実施例3を参照のこと）に達した後すぐに成長および生産を停止させた。

【0319】

付録A：配列

SEQ ID NO:1

```
1   MLPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMHDRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71  ETLMNHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRV   PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMNQKT    RRLSKLPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHKFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS
```

10

SEQ ID NO:2

```
1   MLPDWSRLLT   AITTVFASKSK   RPDMHDRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGRDRTASI
71  ETLMNHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRV   PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMNQKT    RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLCLEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS
```

20

SEQ ID NO:3

```
1   MLKPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMHDRKSK   RPDMLVPSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71  ETLMNHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRV   PAWGDVEVN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMNQKT    RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHKFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS
```

30

SEQ ID NO:4

```
1   MLKPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMHDRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71  ETLMNHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRV   PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMNQKT    RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS
```

SEQ ID NO:5

```
1   MLPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMHDRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71  ETLMNHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVL   IKMQIKVNRV   PAWGDVEVN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMNQKT    RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVK
```

40

50

## SEQ ID NO:6

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNOKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEDSDLK  
VHKFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GVRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVK

## SEQ ID NO:7

1 MLPDWRRLLT AITTLFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNOKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIEYSDLK  
VHKFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GVRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGATSTGK TKNGNSVK

## SEQ ID NO:8

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNOKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEYSDLK  
VHKFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNGHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GVRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

## SEQ ID NO:9

1 MLPDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGPDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNOKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIEYSDLK  
VHREFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

## SEQ ID NO:10

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGPDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNOKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIEYSDLK  
VHREFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

10

20

30

40

50

**SEQ ID NO:11**

1 ML**K**DWSRLLT AITTVFV**K**SK RPD**M**HDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSF**C**IRSY  
EIGTDR**T**ASI  
71 ETL**M**NHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**LE MCKRDLIW**V**L IKMQIKV**N**RY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLG**K**IG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAM**M**NQKT RRLSK**V**PYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK  
VH**R**FKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDP**S**KV  
281 G**V**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:12**

1 M**L**PDWSRLLT AITTVF**C**KSK RPD**M**HDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSF**S**IRSY  
EIG**P**DR**T**ASI  
71 ETL**M**NHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIW**V**L IKMQIKV**N**RY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLG**K**IG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAM**M**NQKT RRLSK**V**PYEV HQEIV**G**LFVD SPVIE**V**SDLK  
VH**R**FKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDP**S**KV  
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:13**

1 M**L**PDWSRLLT AIT**R**VFV**K**SK RPD**M**HDRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY  
EIG**P**DR**T**ASI  
71 ETL**M**N**L**LQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIW**V**V IKMQIKV**N**RY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLG**K**IG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAM**M**NQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**V**SDLK  
VH**R**FKVKTGD  
211 SI**H**KGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDP**S**KV  
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIV**W** GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNG**K**SVS

**SEQ ID NO:14**

1 M**L**PD**M**WSRLLT AITTVF**C**KSK RPD**M**HDRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY  
EIG**P**DR**T**ASI  
71 ETL**M**NHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIW**V**V IKMQIKV**N**RY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLG**K**IG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAM**M**NQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**D**SDLK  
VH**R**FKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDP**S**KV  
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIV**W** GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNG**K**SVS

**SEQ ID NO:15**

1 M**L**PDWSRLLT AITTVF**A**KSK RPD**M**HDRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY  
EIG**P**DR**L**ASI  
71 ETL**M**NHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIW**V**V IKMQIKV**N**RY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLG**K**IG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAM**M**NQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**V**SDLK  
VH**R**FKVKTGD  
211 SI**H**KGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDP**S**KV

10

20

30

40

50

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGKSVS

**SEQ ID NO:16**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDHMHDRKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO:17**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:18**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYRV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILV SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

20

**SEQ ID NO:19**

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

30

**SEQ ID NO:20**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV

40

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:21**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGD~~T~~VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO:22**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGD~~T~~VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GVRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:23**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGD~~T~~VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRHSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

20

**SEQ ID NO:24**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGD~~T~~VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYRV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

30

**SEQ ID NO:25**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGD~~T~~VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGH  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV

40

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:26**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDIVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTHVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO:27**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPHMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDIVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:28**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDIVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

20

**SEQ ID NO:29**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDIVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLHTQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

30

**SEQ ID NO:30**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDIVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

40

**SEQ ID NO:31**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRVY PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHREFKVKTGH  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:32**

1 MLKRWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRVY PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHREFKVKTGR  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:33**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRVY PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHREFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRHSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:34**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRVY PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHREFKVKTGR  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTHVLETQ ELCSLALEYR RECGRHSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:35**

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRVY PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHREFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV

10

20

30

40

50

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:36**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO:37**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLRDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:38**

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

20

**SEQ ID NO:39**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTERVLETQ ELCSLALEYR RECGRHSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

30

**SEQ ID NO:40**

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV

40

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:41**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
Y PAWGDTVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLHTQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO:42**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
Y PAWGDTVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEHGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:43**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDRMHDRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
Y PAWGDTVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

20

**SEQ ID NO:44**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
Y PAWGDTVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYRV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLRDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

30

**SEQ ID NO:45**

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS  
EIGTDRTASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNR  
Y PAWGDTVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTHVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE  
SVTAMDPSKV

40

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

SEQ ID NO:46

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKS**K** RPRMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGTDR**T**ASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGGFGRT**L**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGR**R**SVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

10

SEQ ID NO:47

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**SK RPHMHDRKSK RPDMLV**H**SFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIG**P**DR**L**ASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGGFGRT**K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I**A**P**LFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNGNSVS

SEQ ID NO:48

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**SK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIG**P**DR**L**ASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGGFGRT**K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I**A**P**LFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNGNSVS

20

SEQ ID NO:49

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**SK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIG**P**DR**L**ASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGGFGRT**K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I**A**P**LFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNGNSVS

30

SEQ ID NO:50

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**SK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIG**P**DR**L**ASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGGFGRT**K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I**A**P**LFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV

40

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

**SEQ ID NO:51**

1 MLPDWSRLLT AITTVFAKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY  
EIGPDRLASI  
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDVEIN  
TRFSRLGKIG  
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKLPYEV HQEIAPLFVD SPVIEVSDLK  
VHRFKVKTGD  
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE  
SVTAMDPSKV  
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

10

**SEQ ID NO: 52**

1 MTTVFAKSKR PHMDHRKSKR PDMLVDSFGL ESGVQDGLVF RQSFSIRSIE IGPDRLASIE  
TLMNHLQETS  
71 LNHCKSTGIL LDGFGRTKEM CKRDLIWVVI KMQIKVNRYP AWGDVEINT RFSRLGKIGM  
GRDWLISDCN  
141 TGEILVRATS AYAMNQKTR RLSKLPYEVH QEIAPLFVDS PVIEVSDLKV HRFKVKTGDS  
IHKGLTPGWN  
211 DLDVNQHVS VYIGWILRS MPTEVLETQE LCSLALEYRR ECGRDSVLES VTAMDPSKVG  
SRSQYQHLLR  
281 LEDGTAIVNG ATEWRPKNAG ANGARSTGKT SNGNSVS

**SEQ ID NO: 53**

1 MFAKSKRPHM HDRKSKRPDM LVDSFGLESG VQDGLVFRQS FSIRSIEIGP DRLASIEITLM  
NHLQETSLNH  
71 CKSTGILLDG FGRTKEMCKR DLIWVVIKMQ IKVNRYPAWG DTVEINTRFS RLKIGMGRD  
WLISDCNTGE  
141 ILVRATSAYA MMNQKTRRLS KLPYEVHQEI APLFVDSPVI EVSDLKVHRF KVKTGDSIHK  
GLTPGWNDLD  
211 VNQHVS NVKY IGWILRSMPT EVLETQELCS LALEYRRECGR RDSVLESVTA MDPSKVGSRS  
YQHLLRLED  
281 GTAIVNGATE WRPKNAGANG ARSTGKTSNG NSVS

20

**SEQ ID NO: 54**

1 MAKSKRPHM DRKSKRPDML VDSFGLESGV QDGLVFRQSF SIRSIEIGPD RLASIEITLMN  
HLQETSLNHC  
71 KSTGILLDGF GRTKEMCKRD LIWVVIKMQI KVNRYPAWG TVEINTRFSR LGKIGMGRDW  
LISDCNTGEI  
141 LVRATSAYAM MNQKTRRLSK LPYEVHQEI APLFVDSPVIE VSDLKVHRFK VKTGDSIHKG  
LTPGWNDLDV  
211 NQHVS NVKYI GWILRSMPT VLETQELCSL ALEYRRECGR DSVLESVTAM DPSKVGSRSQ  
YQHLLRLEDG  
281 TAIVNGATEW RPKNAGANGA RSTGKTSNGN SVS

30

**SEQ ID NO: 55**

1 MHDKSKRPD MLVDSFGLES GVQDGLVFRQ SFSIRSIEIG PDRLASIEITL MNHLQETSLN  
HCKSTGILLD  
71 GFGRTKEMCK RDLIWVVIKM QIKVNRYPAW GDTVEINTRF SRLGKIGMGR DWLISDCNTG  
EILVRATSAY  
141 AMNQKTRRL SKLPYEVHQE IAPLFVDSPV IEVSDLKVHR FKVKTGDSIH KGLTPGWNDL  
DVNQHVS NVK  
211 YIGWILRSMP TEVLETQELC SLALEYRREC GRDSVLESVT AMDPSKVGSR SQYQHLLRLE  
DGTAIVNGAT  
281 EWRPKNAGAN GARSTGKTSN GNSVS

40

## SEQ ID NO: 56

1 MRPDMLVDSF GLESGVQDGL VFRQSFSIRS YEIGPDRLAS IETLMNHLQE TSLNHCKSTG  
ILLDGFGRTK  
71 EMCKRDLIWV VIKMQIKVNR YPAWGDIVEI NTRFSRLGKI GMGRDWLISD CNTGEILVRA  
TSAYAMMNQK  
141 TRRLSKLPYE VHQEIAPLFV DSPVIEVSDL KVHRFKVKTG DSIHKGLTPG WNDLDVNQHV  
SNVKYIGWIL  
211 RSMPTLEVLET QELCSLALEY RRECGRDSVL ESVTAMDPSK VGSRSQYQHL LRLEDGTAIV  
NGATEWRPKN  
281 AGANGARSTG KTSNGNSVS

## SEQ ID NO: 57

1 MDMLVDSFGL ESGVQDGLVF RQSFSIRSIE IGPDRLASIE TLMNHLQETS LNHCKSTGIL  
LDGFGRTKEM  
71 CKRDLIWVVI KMQIKVNRYP AWGDIVEINT RFSRLGKIGM GRDWLISDCN TGEILVRATS  
AYAMMNQKTR  
141 RLSKLPYEVH QEIAPLFVDS PVIEVSDLKV HRFKVKTGDS IHKGLTPGWN DLDVNQHVS  
VKYIGWILRS  
211 MPTEVLETQE LCSLALEYRR ECGRDSVLES VTAMDPSKVG SRSQYQHLLR LEDGTAIVNG  
ATEWRPKNAG  
281 ANGARSTGKT SNGNSVS

10

## SEQ ID NO: 58

1 MLVDSFGLES GVQDGLVFRQ SFSIRSIEIG PDRLASIETL MNHLQETSLN HCKSTGILLD  
GFGRTKEMCK  
71 RDLIWVVIKM QIKVNRYPAW GDTVEINTRF SRLGKIGMGR DWLISDCNTG EILVRATSAY  
AMMNQKTRRL  
141 SKLPYEVHQE IAPLFVDSPI IEVSDLKVHR FKVKTGDSIH KGLTPGWNDL DVNQHVS  
YIGWILRSMP  
211 EVLETQELC SLALEYRREC GRDSVLESVT AMDPSKVGSR SQYQHLLRLE DGTAIVNGAT  
EWRPKNAGAN  
281 GARSTGKTSN GNSVS

20

## SEQ ID NO: 59

1 MVDSFGLES VQDGLVFRQS FSIRSIEIGP DRLASIETLM NHLQETSLNH CKSTGILLDG  
FGRTKEMCKR  
71 DLIWVVIKMQ IKVNRYPAWG DTVEINTRFS RLGKIGMGRD WLISDCNTGE ILVRATSAYA  
MMNQKTRRLS  
141 KLPYEVHQEI APLFVDSPVI EVSDLKVHRF KVKTGDSIHK GLTPGWNDLD VNQHVS  
IGWILRSMP  
211 EVLETQELCS LALEYRRECG RDSVLESVTA MDPSKVGSR SQYQHLLRLED GTAI  
WRPKNAGANG  
281 ARSTGKTSNG NSVS

30

## SEQ ID NO:60

1 ATGCTCCCG ATTGGTCCCG CCTGCTGACA GCTATCACCA CGGTGTTTGT TAAGTCGAAA CGGCCGGACA TGCATGATAG  
81 AAAAGCAAG CGACCAGACA TGTTAGTCGA TTCTTTCGGA TTGGAGAGTA CTGTACAAGA TGGCCTTGTT TTCGTCAGT  
161 CATTCTCCAT ACGCAGCTAT GAAATTGGTA CAGACCGTAC CGCGTCGATC GAGACGCTGA TGAACCACTT CCAGGAAACC  
241 TCTCTGAATC ATTGCAAAAG TACTGGCATT TTACTGGATG GTTTTGGGCG CACATTGGAA ATGTGTAAC GGGACCTTAT  
321 CTGGGTGTGCT ATAAAGATGC AAATTAAGT GAACCGTTAC CCTGCCTGGG GAGATACCGT AGAGATCAAT ACCCGCTTTT  
401 CAAGACTGGG CAAAATTGGT ATGGGCCGAG ACTGGCTCAT AAGCGATTGC AACACTGGTG AAATCTTAGT TCGTGCAACA  
481 TCCGCTTATG CGATGATGAA TCAGAAGACC CGCCGGCTGT CGAAATTGCC GTACGAGGTG CACCAAGAAA TTGTCCTACT  
561 TTTCTGTTGAT TCTCCGGTAA TCGAAGACAG TGATCTGAAA GTGCATAAGT TTAAAGTCAA AACGGGGGAC AGCATTGAGA  
641 AGGGATTAAC CCCCGGCTGG AACGATCTGG ATGTAAATCA GCACGTGTCA AACGTAAAT ATATAGGTTG GATTCTGGAG  
721 TCCATGCCTA CTGAAGTCTT GGAGACACAA GAATTGTGTT CGCTTGCCCT GGAATACCGT CGCGAGTGC GGGCTGACTC  
801 TGTTTTAGAA AGCGTGACGG CAATGGACCC GAGTAAAGTA GGCCTTCGCT CACAGTATCA ACATCTGCTC AGATTGGAGG  
881 ACGGTACCGC GATTGTGAAT GGAGCTACTG AATGGCGACC AAAGAACGCC GGCGCAAATG GTGCGATATC CACAGGGAAA  
961 ACGAGCAACG GCAATTCGGT CTCTTAA

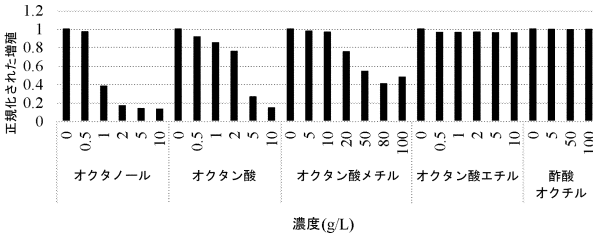
40

【 0 3 2 0 】

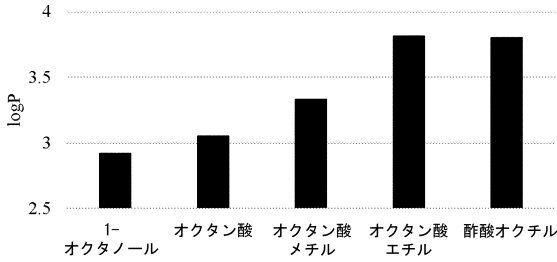
当業者に明かなように、本開示の精神および趣旨から逸脱しなければ、上記の局面および態様の様々な修飾および変形を行うことができる。

【図面】

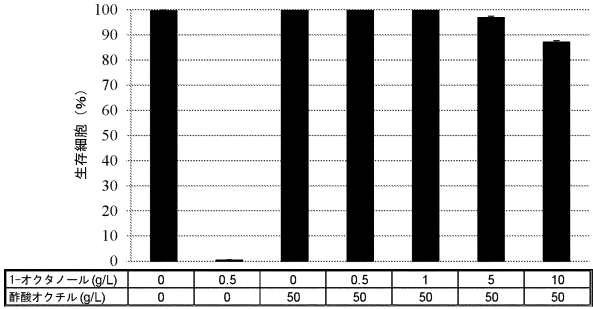
【図 1】



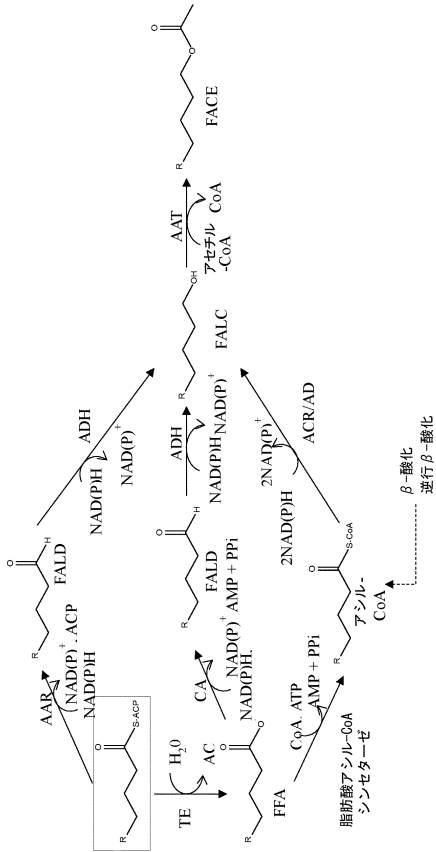
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

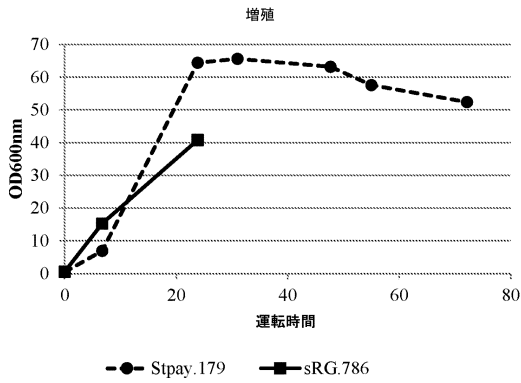
30

40

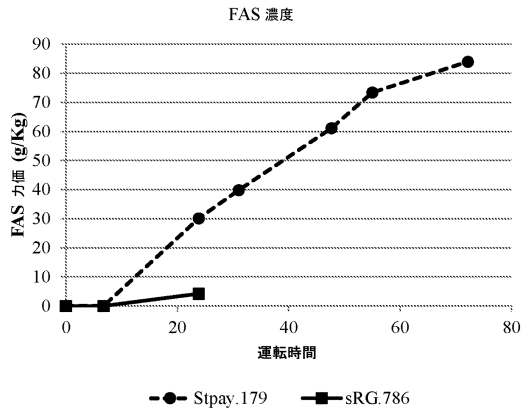
50



【 図 7 A 】

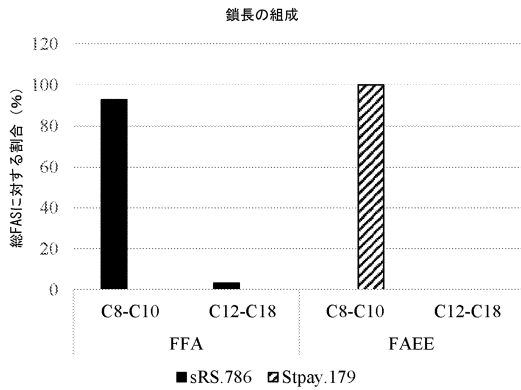


【 図 7 B 】

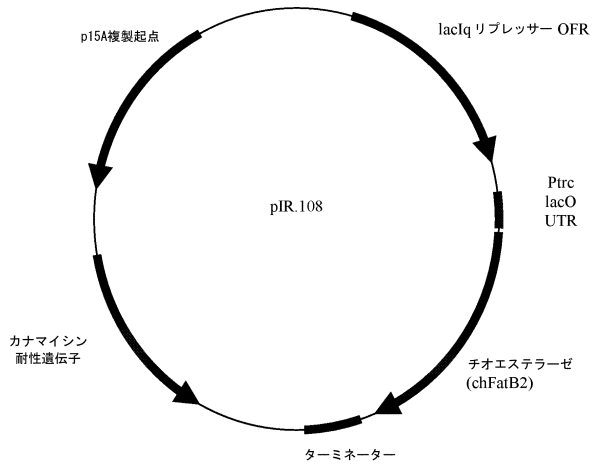


10

【 図 7 C 】



【 図 8 】



20

30

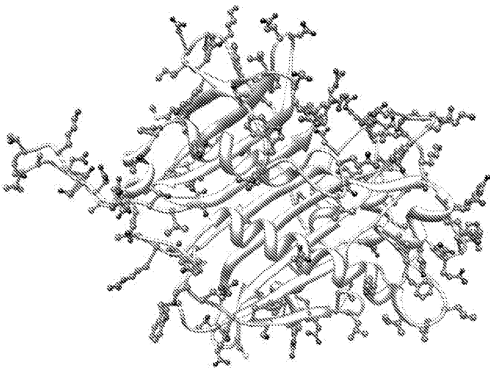
40

50

【図 9】

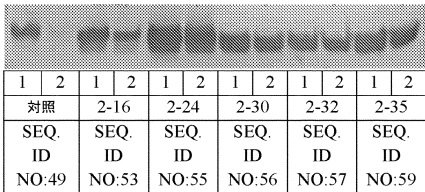


【図 10】

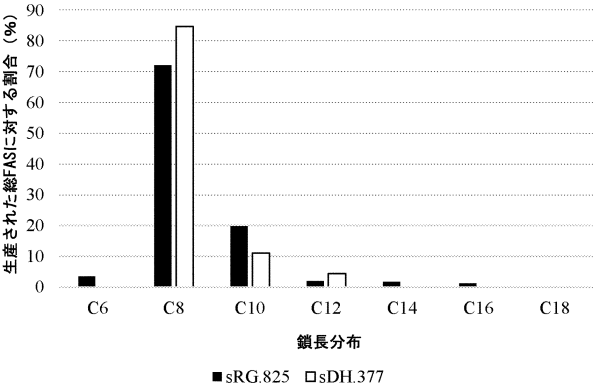


10

【図 11】



【図 12】

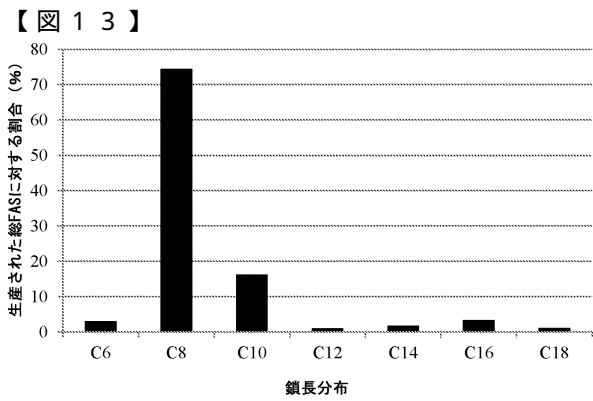


20

30

40

50



10

【配列表】  
0007705243000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 15/55 (2006.01)  
C 1 2 P 7/64 (2022.01)

## F I

C 1 2 N 15/55  
C 1 2 P 7/64

米国(US)

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バウティスタ アンジェリカ ザバラ  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 バク ミン スン  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 ラモス - ソリス アルマ イッツェル  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 トレス ダ コスタ ベルナルド モウラ  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 バーロージアン バーナズ  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 トリンブル ドナルド イー .  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 ボボヴァ エマニュエラ  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 フ シジュン  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

(72)発明者 デ カルデイレ スティーブン ブラレー  
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ゲートウェイ ブール  
バード 6 0 0

## 合議体

審判長 上條 肇

審判官 深草 亜子

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 1 8 1 1 2 ( J P , A )

特表 2 0 1 6 - 5 0 8 7 1 7 ( J P , A )

特開 2 0 1 5 - 1 2 3 0 6 2 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 2 0 8 8 3 ( U S , A 1 )

---

特開 2 0 1 5 - 0 9 1 2 2 8 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 2 / 0 8 7 9 8 2 ( W O , A 2 )

国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 4 9 6 8 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 1 / 0 3 8 1 3 4 ( W O , A 1 )

Nucleic Acids Research, 1982, Vol. 10, No. 20, pp. 6487-6500

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N, C12P

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

Uniprot/GeneSeq