

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 7 月 26 日 (2021.7.26)

【公表番号】特表 2020-524493 (P2020-524493A)

【公表日】令和 2 年 8 月 20 日 (2020.8.20)

【年通号数】公開・登録公報 2020-033

【出願番号】特願 2019-567368 (P2019-567368)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 4 0 B 50/06 (2006.01)

C 4 0 B 40/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/31 Z N A

C 4 0 B 50/06

C 4 0 B 40/02

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 6 月 4 日 (2021.6.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

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

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

c) 遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数の *Saccharopolyspora* 微生物を提供することによって、後続の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株に存在する前記遺伝的バリエーション

から選択される、ステップと；

d) 前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーの個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

e) S a c c h a r o p o l y s p o r a 微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップ c) ~ d) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行する H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーの少なくとも 2 つの個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株を含む新しい H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法。

【請求項 2】

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

【請求項 3】

ステップ c) で組み合わせられる少なくとも 1 つの遺伝的バリエーションが、コードする D N A モジュールの繰り返しセグメントを含有するゲノム領域にない、請求項 1 または 2 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 4】

ステップ (c) における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む前記後続の複数の S a c c h a r o p o l y s p o r a 微生物が、

1) 前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーに属する個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株にプラスミドを導入するステップであって、前記プラスミドは、選択マーカー、対抗選択マーカー、基準 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有する D N A 断片およびプラスミド主鎖配列を含み、前記 D N A 断片は、前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーにも属する別の個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；

2) 前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づく組込み事象によって S a c c h a r o p o l y s p o r a 株について選択するステップと；

3) 前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有する S a c c h a r o p o l y s p o r a 株について選択するステップと

によって產生され、好ましくは、前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まず、好ましくは、前記選択が、組み込まれた前記プラスミドの複製なしで実施される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 5】

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、プロモータスワップ微生物株ライブラリー、S N P スワップ微生物株ライブラリー、開始 / 停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータスワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物 / 発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのライブラリーを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 6】

前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、
a) 前記最初の H T P 遺伝子設計微生物株ライブラリーの完全コンビナトリアル S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたはそのサブセットである；

b) 前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーのサブセットである；

c) 先行する H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル微生物株ライブラリーまたはそのサブセットである；あるいは

d) 先行する H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーのサブセットである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 7】

前記ゲノムを攪乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、トランスポゾン変異誘発、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つの方法を利用することを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 8】

前記ステップ a) における前記最初の複数の S a c c h a r o p o l y s p o r a 微生物が、

a) 産生 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む；または

b) S_1 G e n₁ で表される産生株微生物および S_n G e n_n で表されるこれらに由来する後続の任意の数の微生物世代を含み、n は世代の数に対応する、
請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 9】

前記ステップ c) が、プロトプラスト融合技法を使用することによって前記遺伝的バリエーションを迅速に統合することを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 10】

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、

a) プロモータースワップ微生物株ライブラリーであって、好ましくは、前記プロモータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号 1 ～ 69 および 172 ～ 175 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つのプロモーターを含む、プロモータースワップ微生物株ライブラリー；

b) S N P スワップ微生物株ライブラリー；

c) ターミネータースワップ微生物株ライブラリーであって、好ましくは、前記ターミネータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号 70 ～ 80 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つのターミネーターを含む、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー；

d) トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリーであって、好ましくは、前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、機能喪失型 (L o F) トランスポゾンおよび / または機能獲得型 (G o F) トランスポゾンを含み、好ましくは、前記 G o F トランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび / または対抗選択マーカを含む、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー；

e) リボソーム結合部位微生物株ライブラリーを含み、好ましくは、前記リボソーム結合部位微生物株ライブラリーが、配列番号 97 ～ 127 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つのリボソーム結合部位 (R B S) を含む、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー；あるいは

f) 抗代謝産物 / 発酵産物耐性ライブラリーであって、好ましくは、前記抗代謝産物 /

発酵産物耐性ライブラリーが、Saccharopolyspora中でのスピノシン合成に
関与する分子に対して耐性のSaccharopolyspora株を含む、抗代謝
産物 / 発酵産物耐性ライブラリー

を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 1 1】

前記 S N P スワップ微生物株ライブラリーが、

a) 参照 Saccharopolyspora株および第 2 の Saccharopolyspora株を提供するステップであって、前記第 2 の Saccharopolyspora株は、前記参照 Saccharopolyspora株内に存在しない一塩基多型、DNA 挿入、および DNA 欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

b) 前記参照 Saccharopolyspora株または前記第 2 の Saccharopolyspora株のいずれかのゲノムを攪乱することによって、複数の個々の Saccharopolyspora株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の Saccharopolyspora株を含む最初の S N P スワップ Saccharopolyspora株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記参照 Saccharopolyspora株と前記第 2 の Saccharopolyspora株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと

を含む方法によって生成される、請求項 5 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法によって生成される Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各 Saccharopolyspora株は、

a) 前記宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターであって、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号 1 ~ 6 9 からなる群から選択される配列を有する、プロモーター；

b) 前記宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターであって、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記ターミネーターは、配列番号 7 0 ~ 8 0 からなる群から選択される配列を有する、ターミネーター；

c) 前記宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位であって、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号 9 7 ~ 1 2 7 からなる群から選択される配列を有する、リボソーム結合部位；

d) 配列番号 1 2 8 ~ 1 3 1 からなる群から選択される配列を有するトランスポゾンであって、各株中の前記トランスポゾンは、異なるゲノム遺伝子座にある、トランスポゾン；あるいは

e)

1) スピノシン合成経路に関与する分子、

2) S A M / メチオニン経路に関与する分子、

3) リシン産生経路に関与する分子、

4) トリプトファン経路に関与する分子、

5) トレオニン経路に関与する分子、

6) アセチル - C o A 産生経路に関与する分子、ならびに / または

7) デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子

に対する前記株の耐性をもたらす遺伝的バリエーション

を含む、Saccharopolyspora株ライブラリー。

【請求項 1 3】

前記最初の Saccharopolyspora微生物が、産生 Saccharopo

l y s p o r a株であり、獲得されるべき所望の表現型が、改善された表現型性能であり、好ましくは、

a) 後続ライブラリーの S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能が、前記産生 S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加または少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップc) ~ d)を繰り返す；

b) 前記改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される；または

c) 前記改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくは、前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、HMG-CoA還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ-メチルメチオニン、チアリシン、アルファ-ケトピタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、5-フオロインドール、ベータ-ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択され、好ましくは、前記スピノシンが、スピノシンA、スピノシンD、スピノシンJ、スピノシンL、またはこれらの組合せである、請求項1~12のいずれか一項に記載のゲノム操作のHTP方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

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

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

所望の表現型を獲得するために S a c c h a r o p o l y s p o r a s p . 微生物を進化させるゲノム操作のハイスループット（HTP）方法であって、

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

b. 前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーの個々の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株を、前記所望の表現型についてスクリー

ニングおよび選択するステップと；

c. 遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む後続の複数の *Saccharopolyspora* 微生物を提供することによって、後続の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株に存在する前記遺伝的バリエーションから選択される、ステップと；

d. 前記後続の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

e. *Saccharopolyspora* 微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップ c) ~ d) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行する HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを宿す個々の *Saccharopolyspora* 株を含む新しい HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが創製される、ステップとを含む、方法。

(項目 2)

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

(項目 3)

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

(項目 4)

ステップ (c) における遺伝的バリエーションのユニークな組合せをそれぞれ含む前記後続の複数の *Saccharopolyspora* 微生物が、

1) 前記最初の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーに属する個々の *Saccharopolyspora* 株にプラスミドを導入するステップであって、前記プラスミドは、選択マーカー、対抗選択マーカー、基準 *Saccharopolyspora* 株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有する DNA 断片およびプラスミド主鎖配列を含み、前記 DNA 断片は、前記最初の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーにも属する別の個々の *Saccharopolyspora* 株に由来する遺伝的バリエーションを有する、ステップと；

2) 前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づく組込み事象によって *Saccharopolyspora* 株について選択するステップと；

3) 前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有する *Saccharopolyspora* 株について選択するステップとによって産生される、項目 1 に記載のゲノム操作の HTP 方法。

(項目 5)

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

(項目 6)

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

(項目 7)

前記最初の HTP 遺伝子設計 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、SNP スワップ微生物株ライブラリー、開始/停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータ

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

(項目8)

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

(項目9)

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

。

(項目10)

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

(項目11)

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

(項目12)

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

(項目13)

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

(項目14)

前記最初の複数のSaccharopolyspora微生物が、S₁Gen₁で表される産生株微生物およびS_nGen_nで表されるこれらに由来する後続の任意の数の微生物世代を含む、項目1に記載のゲノム操作のHTP方法。

(項目15)

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

(項目16)

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

(項目17)

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

(項目 1 8)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、S N P スワップ微生物株ライブラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 1 9)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、ターミネータースワップ微生物株ライブラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 0)

前記ターミネータースワップ微生物株ライブラリーが、配列番号 7 0 ~ 8 0 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つのターミネーターを含む、項目 1 9 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 1)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 2)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、機能喪失型 (L o F) トランスポゾンおよび / または機能獲得型 (G o F) トランスポゾンを含む、項目 2 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 3)

前記 G o F トランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび / または対抗選択マーカーを含む、項目 2 2 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 4)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、リボソーム結合部位微生物株ライブラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 5)

リボソーム結合部位微生物株ライブラリーが、配列番号 9 7 ~ 1 2 7 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つリボソーム結合部位 (R B S) を含む、項目 2 4 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 6)

前記最初の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーまたは前記後続の H T P 遺伝子設計 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーが、抗代謝産物 / 発酵産物耐性ライブラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 7)

前記抗代謝産物 / 発酵産物耐性ライブラリーが、S a c c h a r o p o l y s p o r a 中でのスピノシン合成に關与する分子に対して耐性の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株を含む、項目 2 6 に記載のゲノム操作の H T P 方法。

(項目 2 8)

S N P スワップ S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリーを生成するための方法であって、

a . 参照 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株および第 2 の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株を提供するステップであって、前記第 2 の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株は、前記参照 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株内に存在しない一塩基多型

、DNA挿入、およびDNA欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

b．前記参照Saccharopolyspora株または前記第2のSaccharopolyspora株のいずれかのゲノムを攪乱することによって、複数の個々のSaccharopolyspora株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のSaccharopolyspora株を含む最初のSNPスワップSaccharopolyspora株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記参照Saccharopolyspora株と前記第2のSaccharopolyspora株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと

を含む、方法。

(項目29)

前記参照Saccharopolyspora株の前記ゲノムが攪乱されて、前記第2のSaccharopolyspora株内に見出される前記同定された一塩基多型、DNA挿入、またはDNA欠失の1つまたは複数が付加される、項目28に記載のSNPスワップSaccharopolyspora株ライブラリーを生成するための方法。

(項目30)

前記第2のSaccharopolyspora株の前記ゲノムが攪乱されて、前記参照Saccharopolyspora株内に見出されない前記同定された一塩基多型、DNA挿入、またはDNA欠失の1つまたは複数が除去される、項目28に記載のSNPスワップSaccharopolyspora株ライブラリーを生成するための方法。

(項目31)

結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のSaccharopolyspora株が、前記参照Saccharopolyspora株と前記第2のSaccharopolyspora株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンピナトリアルライブラリーと一緒に含む、項目28に記載のSNPスワップSaccharopolyspora株ライブラリーを生成するための方法

。

(項目32)

結果として生じるユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のSaccharopolyspora株が、前記参照Saccharopolyspora株と前記第2のSaccharopolyspora株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンピナトリアルライブラリーのサブセットと一緒に含む、項目28に記載のSNPスワップSaccharopolyspora株ライブラリーを生成するための方法。

(項目33)

産生Saccharopolyspora株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、

a．親系統Saccharopolyspora株およびそれに由来する産生Saccharopolyspora株を提供するステップであって、前記産生Saccharopolyspora株は、前記親系統Saccharopolyspora株内に存在しない一塩基多型、DNA挿入、およびDNA欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

b．前記親系統Saccharopolyspora株または前記産生Saccharopolyspora株のいずれかのゲノムを攪乱することによって、最初のSaccharopolyspora株ライブラリーを創製するステップであって、前記最初のライブラリー中の各株は、前記親系統Saccharopolyspora株と前記産生Saccharopolyspora株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

c. 参照 *Saccharopolyspora* 株に対する表現型性能改善について前記最初の SNP スワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株に存在する前記バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の微生物を提供することによって、後続の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照 *Saccharopolyspora* 株に対する表現型性能改善について前記後続の株ライブラリーの個々の株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. 前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、*Saccharopolyspora* 株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目 34)

前記最初の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、前記親系統 *Saccharopolyspora* 株と前記産生 *Saccharopolyspora* 株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのすべてを含む完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 35)

前記最初の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、参照親系統 *Saccharopolyspora* 株と前記産生 *Saccharopolyspora* 株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのサブセットを含む完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 36)

前記後続の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 37)

前記後続の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 38)

前記後続の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 39)

前記後続の *Saccharopolyspora* 株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 33 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 40)

前記親系統 *Saccharopolyspora* 株の前記ゲノムが攪乱されて、前記産

生 Saccharopolyspora 株内に見出される前記同定された一塩基多型、DNA 挿入、または DNA 欠失の 1 つまたは複数が付加される、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 41)

前記産生 Saccharopolyspora 株の前記ゲノムが攪乱されて、前記親系統 Saccharopolyspora 株内に見出されない前記同定された一塩基多型、DNA 挿入、または DNA 欠失の 1 つまたは複数が除去される、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 42)

前記ゲノムを攪乱することが、ランダム変異誘発、標的とした配列挿入、標的とした配列欠失、標的とした配列置き換え、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つの方法を利用することを含む、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 43)

後続ライブラリーの Saccharopolyspora 株の前記表現型性能が、前記産生 Saccharopolyspora 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 10 % の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 44)

後続ライブラリーの Saccharopolyspora 株の前記表現型性能が、前記産生 Saccharopolyspora 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 倍の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 45)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 46)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 33 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 47)

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、HMG - CoA 還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ - メチルメチオニン、チアリシン、アルファ - ケトピタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、5 - フオロインドール、ベータ - ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目 46 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 48)

前記スピノシンが、スピノシン A、スピノシン D、スピノシン J、スピノシン L、またはこれらの組合せである、項目 46 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 49)

前記同定された遺伝的バリエーションが、プロモータースワップライブラリー由来の人

工プロモータースワップ遺伝的バリエーションをさらに含む、項目33に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目50)

前記最初の Saccharopolyspora 株のライブラリー、または後続の Saccharopolyspora 株のライブラリーのいずれかの少なくとも1つの微生物株のゲノムを操作して、内在性 Saccharopolyspora 標的遺伝子に作動可能に連結したプロモーターラダー由来の1つまたは複数のプロモーターを含ませるステップをさらに含む、項目33に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目51)

前記株ライブラリーが、プロモータースワップ微生物株ライブラリー、SNPスワップ微生物株ライブラリー、開始/停止コドン微生物株ライブラリー、最適化配列微生物株ライブラリー、ターミネータースワップ微生物株ライブラリー、トランスポゾン変異誘発微生物株多様性ライブラリー、リボソーム結合部位微生物株ライブラリー、抗代謝産物/発酵産物耐性ライブラリー、終結挿入微生物株ライブラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも1つのライブラリーを含む、項目33に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目52)

前記株ライブラリーが、

1) 配列番号1~69から選択される配列を有する少なくとも1つのプロモーターを含むプロモータースワップ微生物株ライブラリー；

2) 配列番号70~80から選択される配列を有する少なくとも1つのターミネーターを含むターミネータースワップ微生物株ライブラリー；および

3) 配列番号97~127から選択される配列を有する少なくとも1つのリボソーム結合部位(RBS)を含むRBSライブラリー

からなる群から選択される少なくとも1つのライブラリーを含む、項目51に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目53)

プロモータースワップ Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法であって、

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

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

を含む、方法。

(項目54)

前記複数のプロモーターの少なくとも1つが、配列番号1~69から選択される配列を有するプロモーターを含む、項目53に記載のプロモータースワップ Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目55)

産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法であって、

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

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

c. 参照 *Saccharopolyspora* 株に対する表現型性能改善について前記最初のプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株をスクリーニングおよび選択することによって、前記表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも2つの個々の *Saccharopolyspora* 株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の *Saccharopolyspora* 微生物を提供することによって、後続のプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーを創製するステップと；

e. 参照 *E. coli* 株に対する所望の前記表現型性能改善について前記後続のプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. 前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、*Saccharopolyspora* 株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を1回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、*Saccharopolyspora* 株の新しいプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの少なくとも2つの個々の *Saccharopolyspora* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

(項目56)

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

(項目57)

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

(項目58)

前記後続のプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、前記最初のプロモータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目55に記載の産生 *Sa*

c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目59)

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

(項目60)

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

(項目61)

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

(項目62)

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

(項目63)

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

(項目64)

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

(項目65)

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

(項目66)

前記スピノシンが、スピノシンA、スピノシンD、スピノシンJ、スピノシンL、またはこれらの組合せである、項目65に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株

の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目67)

前記プロモーターラダーが、配列番号1～69から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも1つのプロモーターを含む、項目55に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目68)

ターミネータースワップSaccharopolyspora株ライブラリーを生成するための方法であって、

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

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

を含む、方法。

(項目69)

産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法であって、

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

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

c. 参照Saccharopolyspora株に対する表現型性能改善について前記最初のターミネータースワップSaccharopolyspora株ライブラリーの個々のSaccharopolyspora株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも2つの個々のSaccharopolyspora株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のSaccharopolyspora微生物を提供することによって、後続のターミネータースワップSaccharopolyspora株ライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照Saccharopolyspora株に対する表現型性能改善について前記後続のターミネータースワップSaccharopolyspora株ライブラリーの個々のSaccharopolyspora株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. 前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、*Saccharopolyspora* 株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目 70)

前記後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 71)

前記後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 72)

前記後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、先行するターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 73)

前記後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、先行するターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 74)

後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能が、前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 10 % の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 75)

後続のターミネータースワップ *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能が、前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 倍の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 76)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 77)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 69 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 78)

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

(項目 79)

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

(項目 80)

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

(項目 81)

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

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

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

(項目 82)

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

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

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

h a r o p o l y s p o r a株に内在する前記標的遺伝子の1つに作動可能に連結した前記RBSラダー由来のRBSの1つまたは複数を含む、ステップと；

c．参照S a c c h a r o p o l y s p o r a株に対する表現型性能改善について前記最初のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d．前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも2つの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株に存在する前記遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のS a c c h a r o p o l y s p o r a株を提供することによって、後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーを創製するステップと；

e．前記参照S a c c h a r o p o l y s p o r a株に対する表現型性能改善について前記後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f．前記産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能と比較して、S a c c h a r o p o l y s p o r a株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップd)～e)を1回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、新しい微生物株のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも2つの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目83)

前記後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、前記最初のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目82に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目84)

前記後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、前記最初のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目82に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目85)

前記後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、先行するRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目82に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目86)

前記後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、先行するRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目82に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目87)

後続のRBS S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーのS a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能が、前記産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップd)～e)を繰り返す、項目82に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 8 8)

後続の R B S *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能が、前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 倍の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 8 2 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 8 9)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 8 2 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 9 0)

ステップ f) の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 8 2 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 9 1)

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、HMG - CoA 還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ - メチルメチオニン、チアリシン、アルファ - ケトピタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、5 - フオロインドール、ベータ - ヒドロキシノルパリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目 9 0 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 9 2)

前記スピノシンが、スピノシン A、スピノシン D、スピノシン J、スピノシン L、またはこれらの組合せである、項目 9 1 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 9 3)

前記 R B S ラダーが、配列番号 9 7 ~ 1 2 7 から選択されるヌクレオチド配列を有する少なくとも 1 つの R B S を含む、項目 8 2 に記載の産生 *Saccharopolyspora* 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 9 4)

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

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

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

(項目 9 5)

c) 前記基準 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 つの増大を呈する後続の *Saccharopolyspora* 株ライブラリーについて選択するステップをさらに含む、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記トランスポゾンが、前記 *Saccharopolyspora* 株のゲノムへの前記トランスポゾンの *in vivo* 転位を可能にするトランスポゾンおよびトランスポサージタンパク質の複合体を使用して、前記基準 *Saccharopolyspora* 株に導入される、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記トランスポサージタンパク質が、E Z - T n 5 トランスポソームシステムに由来する、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記トランスポゾンが、機能喪失型 (L o F) トランスポゾンまたは機能獲得型 (G o F) トランスポゾンである、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記 G o F トランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび / または対抗選択マーカーを含む、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

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

a . トランスポゾン変異誘発により基準 *Saccharopolyspora* 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の *Saccharopolyspora* 株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の *Saccharopolyspora* 株を含む最初のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、1 つまたは複数のトランスポゾンを含む、ステップと ;

b . 参照 *Saccharopolyspora* 株に対する表現型性能改善について前記最初のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと ;

c . 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の *Saccharopolyspora* 株を提供することによって、後続のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーを創製するステップと ;

d . 前記参照 *Saccharopolyspora* 株に対する表現型性能改善について前記後続のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの個々の *Saccharopolyspora* 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと ;

e . 前記産生 *Saccharopolyspora* 株の前記表現型性能と比較して、*Saccharopolyspora* 株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ c) ~ d) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の *Saccharopolyspora* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

(項目 1 0 1)

前記後続のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発 *Saccharopolyspora* 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 1 0 0 に記載の産生 *Sacch*

saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目102)

前記後続のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーが、前記最初のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目103)

前記後続のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目104)

前記後続のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーが、先行するトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目105)

後続のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーのSaccharopolyspora株の前記表現型性能が、前記産生Saccharopolyspora株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップc)~d)を繰り返す、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目106)

後続のトランスポゾン変異誘発Saccharopolyspora株ライブラリーのSaccharopolyspora株の前記表現型性能が、前記産生Saccharopolyspora株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップc)~d)を繰り返す、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目107)

ステップe)の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目108)

ステップe)の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目100に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目109)

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、HMG-COA還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ-メチルメチオニン、チアリシン、アルファ-ケトピタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、5-フオロインドール、ベータ-ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目108に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目110)

前記スピノシンが、スピノシンA、スピノシンD、スピノシンJ、スピノシンL、またはこれらの組合せである、項目109に記載の産生Saccharopolyspora

株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 1 1 1)

前記トランスポゾンが、機能喪失型 (LoF) トランスポゾンまたは機能獲得型 (GoF) トランスポゾンを含む、項目 1 0 0 に記載の産生 Saccharopolyspora 株の表現型性能を改善するための方法。

(項目 1 1 2)

前記 GoF トランスポゾンが、可溶性タグ、プロモーターおよび / または対抗選択マーカーを含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

抗代謝産物 / 発酵産物耐性 Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法であって、

a) 所定の代謝産物および / または発酵産物に対して耐性の Saccharopolyspora 株について選択することによって、複数の個々の Saccharopolyspora 株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々の Saccharopolyspora 株を含む最初の Saccharopolyspora 株ライブラリーを創製するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションの少なくとも 1 つは、前記所定の代謝産物および / または発酵産物に対して耐性をもたらす、ステップと；

b) 前記所定の代謝産物および / または前記発酵産物に対して耐性の Saccharopolyspora 株を収集して、前記抗代謝産物 / 発酵産物耐性 Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するステップとを含む、方法。

(項目 1 1 4)

前記所定の代謝産物および / または発酵産物が、スピノシン合成経路に関与する分子、SAM / メチオニン経路に関与する分子、リシン産生経路に関与する分子、トリプトファン経路に関与する分子、トレオニン経路に関与する分子、アセチル - CoA 産生経路に関与する分子、ならびにデノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子からなる群から選択される、項目 1 1 3 に記載の抗代謝産物 / 発酵産物耐性 Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 1 1 5)

1) 前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであって、必要に応じて、各株が、約 50 μ g / ml ~ 約 2 mg / ml のスピノシン J / L に対して耐性であり；

2) 前記 SAM / メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ - メチルメチオニン (aMM) またはノルロイシンであって、必要に応じて、各株が、約 1 mM ~ 約 5 mM のアルファ - メチルメチオニン (aMM) に対して耐性であり；

3) 前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ - ケトピタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；

4) 前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは 5 - フオロインドールであり；

5) 前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベータ - ヒドロキシノルバリンであり；

6) 前記アセチル - CoA 産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；

7) 前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、項目 1 1 4 に記載の抗代謝産物 / 発酵産物耐性 Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 1 1 6)

b) 前記基準 Saccharopolyspora 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 つの増大を呈する後続の Saccharopolyspora 株ライブラリーについて選択するステップをさらに含む、項目 1 1 3 に記載の抗代謝産物 / 発酵産物耐性 Saccharopolyspora 株ライブラリーを生成するための方法。

s p o r a株ライブラリーを生成するための方法。

(項目117)

前記後続のS a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーにおける各株が、スピノシンの合成の増大を呈する、項目116に記載の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーを生成するための方法。

(項目118)

産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法であって、

a)複数の個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株の各株内で見出されたユニークな遺伝的バリエーションを有する前記複数の個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株を含む最初の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーを提供するステップであって、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、1つまたは複数の遺伝的バリエーションを含み、前記遺伝的バリエーションは、所定の代謝産物または発酵産物に対する耐性をもたらす、ステップと；

b)参照S a c c h a r o p o l y s p o r a株に対する表現型性能改善について前記最初の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

c)前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも2つの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株に存在する前記遺伝的バリエーション由来のユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数のS a c c h a r o p o l y s p o r a株を提供することによって、後続の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーを創製するステップと；

d)前記参照S a c c h a r o p o l y s p o r a株に対する表現型性能改善について前記後続の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

e)前記産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記表現型性能と比較して、S a c c h a r o p o l y s p o r a株が、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップc)~d)を1回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しい抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも2つの個々のS a c c h a r o p o l y s p o r a株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

(項目119)

前記後続の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目118に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目120)

前記後続の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、前記最初の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目118に記載の産生S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能を改善するための方法。

(項目121)

前記後続の抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライブラリーが、先行する抗代謝産物/発酵産物耐性S a c c h a r o p o l y s p o r a株ライ

ブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目118に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目122)

前記後続の抗代謝産物/発酵産物耐性Saccharopolyspora株ライブラリーが、先行する抗代謝産物/発酵産物耐性Saccharopolyspora株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目118に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目123)

後続の抗代謝産物/発酵産物耐性Saccharopolyspora株ライブラリーのSaccharopolyspora株の前記表現型性能が、前記産生Saccharopolyspora株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップc)~d)を繰り返す、項目118に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目124)

後続の抗代謝産物/発酵産物耐性Saccharopolyspora株ライブラリーのSaccharopolyspora株の前記表現型性能が、前記産生Saccharopolyspora株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップc)~d)を繰り返す、項目118に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目125)

ステップe)の改善された表現型性能が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目118に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目126)

ステップe)の改善された表現型性能が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目125に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目127)

前記目的の産物が、スピノシン、スピノサド、スピネトラム、ゲニステイン、コリンオキシダーゼ、クマジン化合物、エリスロマイシン、イベルメクチンアグリコン、HMG-COA還元酵素阻害剤、カルボン酸異性体、アルファ-メチルメチオニン、チアリシン、アルファ-ケトピタレート、アスパルテートヒドキシメート、アザセリン、5-フオロインドール、ベータ-ヒドロキシノルバリン、セルレニン、プリン、ピリミジン、およびこれらの類似体からなる群から選択される、項目126に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目128)

前記スピノシンが、スピノシンA、スピノシンD、スピノシンJ、スピノシンL、またはこれらの組合せである、項目127に記載の産生Saccharopolyspora株の表現型性能を改善するための方法。

(項目129)

Saccharopolyspora宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含むSaccharopolyspora宿主細胞であって、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号1~69からなる群から選択される配列を有する、Saccharopolyspora宿主細胞

。

(項目130)

前記内在性遺伝子が、前記Saccharopolyspora宿主細胞におけるスピ

ノシンの合成に関与する、項目129に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目131)

前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Saccharopolyspora株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目129に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目132)

Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Saccharopolyspora株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを含み、前記プロモーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号1～69からなる群から選択される配列を有する、Saccharopolyspora株ライブラリー。

(項目133)

Saccharopolyspora宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含むSaccharopolyspora宿主細胞であって、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記プロモーターは、配列番号70～80からなる群から選択される配列を有する、Saccharopolyspora宿主細胞。

(項目134)

前記内在性遺伝子が、前記Saccharopolyspora宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項目133に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目135)

前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記プロモーターを有さない参照Saccharopolyspora株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目133に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目136)

Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Saccharopolyspora株は、宿主細胞の内在性遺伝子に連結したターミネーターを含み、前記ターミネーターは、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記ターミネーターは、配列番号70～80からなる群から選択される配列を有する、Saccharopolyspora株ライブラリー。

(項目137)

Saccharopolyspora宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含むSaccharopolyspora宿主細胞であって、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号97～127からなる群から選択される配列を有する、Saccharopolyspora宿主細胞。

(項目138)

前記内在性遺伝子が、前記Saccharopolyspora宿主細胞におけるスピノシンの合成に関与する、項目137に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目139)

前記内在性遺伝子に作動可能に連結した前記RBSを有さない参照Saccharopolyspora株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目137に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目140)

Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Saccharopolyspora株は、宿主細胞の内在性遺伝子に作動可能に連結したリボソーム結合部位を含み、前記リボソーム結合部位は、前記内在性遺伝子にとって異種であり、前記リボソーム結合部位は、配列番号97～127からなる群から選択され

る配列を有する、Saccharopolyspora株ライブラリー。

(項目141)

トランスポゾンを含むSaccharopolyspora宿主細胞であって、Saccharopolyspora宿主細胞は、前記トランスポゾンなしの参照Saccharopolyspora株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、Saccharopolyspora宿主細胞。

(項目142)

前記トランスポゾンが、機能喪失型(L o F)トランスポゾンまたは機能獲得型(G o F)トランスポゾンである、項目141に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目143)

前記機能獲得型(G o F)トランスポゾンが、プロモーター、対抗選択マーカ、および/または可溶性タグを含む、項目142に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目144)

前記トランスポゾンが、配列番号128～131からなる群から選択される配列を含む、項目141に記載のSaccharopolyspora宿主細胞。

(項目145)

Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Saccharopolyspora株は、配列番号128～131からなる群から選択される配列を有するトランスポゾンを含み、各株中の前記トランスポゾンは、異なるゲノム遺伝子座にある、Saccharopolyspora株ライブラリー。

(項目146)

Saccharopolyspora株ライブラリーであって、前記ライブラリー中の各Saccharopolyspora株は、

1)スピノシン合成経路に関与する分子、

2)SAM/メチオニン経路に関与する分子、

3)リシン産生経路に関与する分子、

4)トリプトファン経路に関与する分子、

5)トレオニン経路に関与する分子、

6)アセチル-CoA産生経路に関与する分子、ならびに/または

7)デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する分子

に対する前記株の耐性をもたらす遺伝的バリエーションを含む、Saccharopolyspora株ライブラリー。

(項目147)

1)前記スピノシン合成経路に関与する前記分子が、スピノシンであり；

2)前記SAM/メチオニン経路に関与する前記分子が、アルファ-メチルメチオニン(aMM)またはノルロイシンであり；

3)前記リシン産生経路に関与する前記分子が、チアリシンまたはアルファ-ケトピタレートおよびアスパルテートヒドキシメートの混合物であり；

4)前記トリプトファン経路に関与する前記分子が、アザセリンまたは5-フオロインドールであり；

5)前記トレオニン経路に関与する前記分子が、ベータ-ヒドロキシノルバリンであり；

6)前記アセチル-CoA産生経路に関与する前記分子が、セルレニンであり；

7)前記デノボまたはサルベージプリンおよびピリミジン経路に関与する前記分子が、プリンまたはピリミジン類似体である、

項目146に記載のSaccharopolyspora株ライブラリー。

(項目148)

前記分子が、スピノシンJ/Lであり、各株が、約50μg/ml～約2mg/mlのスピノシンJ/Lに対して耐性である、項目147に記載のSaccharopolys

p o r a株ライブラリー。

(項目149)

前記分子が、アルファ - メチルメチオニン (a M M) であり、各株が、約 1 m M ~ 約 5 m M の a M M に対して耐性である、項目 1 4 7 に記載の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株ライブラリー。

(項目150)

レポーター遺伝子を含む S a c c h a r o p o l y s p o r a 株であって、前記レポーター遺伝子は、

a) 緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、S a c c h a r o p o l y s p o r a 中での発現のためにコドン最適化されており

;

b) 緑色蛍光レポータータンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、S a c c h a r o p o l y s p o r a 中での発現のためにコドン最適化されており

;

c) ベータ - グルクロニダーゼ (g u s A) タンパク質をコードする遺伝子であって、必要に応じて前記遺伝子は、S a c c h a r o p o l y s p o r a 中での発現のためにコドン最適化されている、

からなる群から選択される、S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目151)

a) 前記緑色蛍光レポータータンパク質が、配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列を有し ;

b) 赤色蛍光レポータータンパク質が、配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列を有し ;

c) 前記 g u s A タンパク質が、配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を有する、

項目 1 5 0 に記載の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目152)

a) 前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号 8 1 の配列を有し ;

b) 前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号 8 2 の配列を有し ;

c) 前記 g u s A タンパク質をコードする前記遺伝子が、配列番号 8 3 の配列を有する、項目 1 5 0 に記載の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目153)

前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、互いに異なる、項目 1 5 0 に記載の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目154)

前記株が、前記緑色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子、および前記赤色蛍光レポータータンパク質をコードする前記遺伝子の両方を含み、前記緑色蛍光レポータータンパク質および前記赤色蛍光レポータータンパク質の蛍光励起および発光スペクトルが、前記 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株の内在性の蛍光と異なる、項目 1 5 0 に記載の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目155)

S a c c h a r o p o l y s p o r a 株のゲノム中の 1 つまたは複数の中立の組込み部位に組み込まれた DNA 断片を含む S a c c h a r o p o l y s p o r a 株であって、前記中立の組込み部位は、配列番号 1 3 2 ~ 1 4 2 から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号 1 3 2 ~ 1 4 2 のいずれか 1 つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、S a c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項目156)

前記組み込まれた DNA 断片なしの参照 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株の表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を有する、項目 1 5 5 に記載の S a

c c h a r o p o l y s p o r a 株。

(項 目 1 5 7)

前記組み込まれたDNA断片なしの参照S a c c h a r o p o l y s p o r a株の表現型性能と比較して、所望のレベルの改善されたスピノシン産生を有する、項目156に記載のS a c c h a r o p o l y s p o r a株。

(項 目 1 5 8)

前記組み込まれたDNA断片が、レポータータンパク質をコードする配列を含む、項目155に記載のS a c c h a r o p o l y s p o r a株。

(項 目 1 5 9)

前記組み込まれたDNA断片が、トランスポゾンを含む、項目155に記載のS a c c h a r o p o l y s p o r a株。

(項 目 1 6 0)

前記組み込まれたDNA断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位 (a t t B) を含む、項目155に記載のS a c c h a r o p o l y s p o r a株。

(項 目 1 6 1)

S a c c h a r o p o l y s p o r a株のゲノムにDNA断片を組み込む方法であって、前記DNA断片は、前記S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記ゲノム中の中立の組み込み部位に組み込まれ、前記中立の組み込み部位は、配列番号132～142から選択される配列を有するゲノム断片内、または配列番号132～142のいずれか1つと相同のゲノム断片内の位置の群から選択される、方法。

(項 目 1 6 2)

前記DNA断片が、その対応するインテグラーゼによって認識され得る結合部位 (a t t B) を含む、項目161に記載のS a c c h a r o p o l y s p o r a株のゲノムにDNA断片を組み込む方法。

(項 目 1 6 3)

少なくとも2つの親S a c c h a r o p o l y s p o r a株に由来する遺伝子変異を迅速に統合するための方法であって、

(1) 少なくとも2つの親S a c c h a r o p o l y s p o r a株を提供するステップであって、各株は、他の株に存在しないユニークなゲノム変異を含む、ステップと；

(2) 前記親株のそれぞれからプロトプラストを調製するステップと；

(3) 前記親株由来の前記プロトプラストを融合して、2つの親S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記ゲノムを含む融合プロトプラストを産生するステップであって、各親株の前記ゲノムの間の相同組換えが起こる、ステップと

(4) ステップ (3) で産生した前記融合プロトプラストからS a c c h a r o p o l y s p o r a細胞を回収するステップと；

(5) 第1の親S a c c h a r o p o l y s p o r a株の前記ユニークなゲノム変異を含むS a c c h a r o p o l y s p o r a細胞について選択するステップと；

(6) 第2の親株の前記ユニークなゲノム変異の存在について、ステップ (5) で得られた前記S a c c h a r o p o l y s p o r a細胞をジェノタイピングするステップとを含み、

それによって、2つの親S a c c h a r o p o l y s p o r a株に由来する前記ユニークなゲノム変異を含む新しいS a c c h a r o p o l y s p o r a株を得る、方法。

(項 目 1 6 4)

前記ユニークなゲノム変異の一方が、選択可能マーカーに連結されるが、他方のユニークなゲノム変異が、いかなる選択可能マーカーにも連結されない、項目163に記載の方法。

(項 目 1 6 5)

ステップ (3) において、前記選択可能マーカーに連結された前記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラスト：前記選択可能マーカーに連結されない前

記ユニークなゲノム変異をもともと含有する前記株のプロトプラストの比が、1：1未満である、項目164に記載の方法。

(項目166)

前記比が、約1：10～約1：100、またはそれ未満である、項目165に記載の方法。

(項目167)

ステップ(4)において、プロトプラスト細胞が、寒天のオーバーレイを使用せずに浸透圧的に安定化された培地に蒔かれる、項目163に記載の方法。

(項目168)

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

(項目169)

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

(項目170)

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

(項目171)

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

(項目172)

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

(項目173)

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

(項目174)

前記R2YE培地が、0.5Mのソルビトールおよび0.5Mのマンノースを含む、項目173に記載の方法。

(項目175)

Saccharopolyspora株における標的化ゲノム編集の方法であって、
a) 選択マーカー、対抗選択マーカー、編集される前記Saccharopolyspora株のゲノム遺伝子座に対する相同性を有するDNA断片、およびプラスミド主鎖配列を含むプラスミドを基準Saccharopolyspora株に導入するステップと；
b) 前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて組込み事象を有するSaccharopolyspora株について選択するステップと；
c) 前記対抗選択マーカー遺伝子の非存在に基づきループアウトされた前記プラスミド主鎖を有するSaccharopolyspora株について選択するステップであって、前記対抗選択マーカーは、sacB遺伝子またはpheS遺伝子である、ステップとを含む、方法。

(項目176)

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

(項目177)

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

(項目178)

前記sacB遺伝子が、Saccharopolyspora spinosaのため

にコドン最適化されている、項目 175 に記載の方法。

(項目 179)

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

(項目 180)

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

(項目 181)

前記 *pheS* 遺伝子が、配列番号 147 または配列番号 148 によってコードされるアミノ酸に対して 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目 180 に記載の方法。

(項目 182)

ドナー微生物細胞から遺伝物質を *Saccharopolyspora* 微生物のレシピエント細胞に移入させる方法であって、

1) 必要に応じて、レシピエント細胞を、後期指数期または静止期まで継代培養するステップと；

2) 必要に応じて、ドナー細胞を中期指数期まで継代培養するステップと；

3) ドナーおよびレシピエント細胞を組み合わせるステップと；

4) ドナーおよびレシピエント細胞の混合物をコンジュゲーション培地に蒔くステップと；

5) プレートインキュベーションして、細胞をコンジュゲートさせるステップと；

6) ドナー細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；

7) 非組込みレシピエント細胞に対して抗生物質選択を適用するステップと；

8) さらにプレートインキュベーションして、組み込まれたレシピエント細胞を成長させるステップを含む、方法。

(項目 183)

前記ドナー微生物細胞が、*E. coli* 細胞である、項目 182 に記載の方法。

(項目 184)

以下の条件の少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つまたはそれよりも多くが利用される、項目 182 に記載の方法：

1) レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；

2) ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約 30 の温度でコンジュゲートされる；

3) レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約 48 時間継代培養される；

4) コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約 1 : 0.6 ~ 1 : 1.0 である；

5) 前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約 15 ~ 24 時間後に前記混合物に送達される；

6) 前記レシピエント細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約 40 ~ 48 時間後に前記混合物に送達される；

7) ドナーおよびレシピエント細胞の混合物が蒔かれた前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約 3 時間 ~ 10 時間乾燥される；

8) 前記コンジュゲーション培地は、少なくとも約 3 g / L のグルコースを含む；

9) ドナー細胞の濃度は、約 OD₆₀₀ = 0.1 ~ 0.6 である；

10) レシピエント細胞の濃度は、約 OD₅₄₀ = 5.0 ~ 15.0 である。

(項目 185)

前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約 50 ~ 約 150 μg / ml である、項目 184 に記載の方法。

(項目 186)

前記ドナー細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、ナリジクス酸であり、その濃度が、約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ である、項目 185 に記載の方法。

(項目 187)

前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アブラマイシンであり、その濃度が、約 $50 \sim 250 \mu\text{g}/\text{ml}$ である、項目 184 に記載の方法。

(項目 188)

前記レシピエント細胞に対する選択のための前記抗生物質薬が、アブラマイシンであり、その濃度が、約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ である、項目 187 に記載の方法。

(項目 189)

ハイスループットプロセスで実施される、項目 182 に記載の方法。

(項目 190)

48 ウェルの Q - t r a y 上で実施される、項目 189 に記載の方法。

(項目 191)

前記ハイスループットプロセスが、自動化されている、項目 189 に記載の方法。

(項目 192)

ドナー細胞およびレシピエント細胞の前記混合物が、液体混合物であり、前記液体混合物のアンブル体積が、ロッキング動作を伴う前記培地に蒔かれ、前記液体混合物が、前記培地の全面積にわたって分散する、項目 191 に記載の方法。

(項目 193)

前記ドナー細胞によって提供された組み込まれた DNA を有するレシピエント細胞の後続の播種のために、酵母ピンによるコロニーピッキングによって接合完了体を移入する自動化プロセスを含む、項目 191 に記載の方法。

(項目 194)

前記コロニーピッキングが、ディッピング動作または撈拌動作のいずれかで実施される、項目 193 に記載の方法。

(項目 195)

コンジュゲートする培地が、約 $3 \sim 10 \text{ g}/\text{L}$ のグルコースを含む改変 I S P 4 培地である、項目 184 に記載の方法。

(項目 196)

前記混合物中のドナー細胞またはレシピエント細胞の総数が、約 $5 \times 10^6 \sim 9 \times 10^6$ である、項目 184 に記載の方法。

(項目 197)

以下の条件の少なくとも 4 つで実施される、項目 182 に記載の方法：

- 1) レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に洗浄される；
- 2) ドナー細胞およびレシピエント細胞は、約 30°C の温度でコンジュゲートされる；
- 3) レシピエント細胞は、コンジュゲートする前に少なくとも約 48 時間継代培養される；
- 4) コンジュゲーションのためのドナー細胞：レシピエント細胞の比は、約 $1 : 0.8$ である；

5) 前記ドナー細胞に対する選択のための抗生物質薬は、前記ドナー細胞および前記レシピエント細胞が混合された約 20 時間後に前記混合物に送達される；

6) 前記混合物中の前記ドナー細胞の量または前記レシピエント細胞の量は、約 7×10^6 である；ならびに

7) 前記コンジュゲーション培地は、約 $6 \text{ g}/\text{L}$ のグルコースを含む。

(項目 198)

S a c c h a r o p o l y s p o r a 株における標的化ゲノム編集の方法であって、標的としたゲノム遺伝子座で遺伝的バリエーションを含有する無傷の S a c c h a r o p o l y s p o r a 株をもたらし、

a) プラスミドを S a c c h a r o p o l y s p o r a 株に導入するステップであって、前記プラスミドは、

i . 選択マーカー、

i i . 対抗選択マーカー、

i i i . 標的遺伝子座で前記 *Saccharopolyspora* ゲノムに組み込まれる遺伝的バリエーションを含有する DNA 断片であって、所望の遺伝的バリエーションに隣接する前記標的ゲノム遺伝子座に対する相同アームを有する DNA 断片、および

i v . プラスミド主鎖配列を含む、ステップと；

b) 前記ゲノム中の前記選択マーカーの存在に基づいて、最初の相同組換えを受け、前記標的遺伝子座に組み込まれた前記遺伝的バリエーションを有する *Saccharopolyspora* 株について選択するステップと；

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

(項目 1 9 9)

前記プラスミドが、温度感受性レプリコンを含まない、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 0)

前記プラスミドが、複製起点を含まない、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 1)

前記選択ステップ (c) が、前記組み込まれたプラスミドの複製なしで実施される、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 2)

前記プラスミドが、単一相同組換えベクターである、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 3)

前記プラスミドが、二重相同組換えベクターである、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 4)

前記対抗選択マーカーが、*sacB* 遺伝子または *pheS* 遺伝子である、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 5)

前記 *sacB* 遺伝子または *pheS* 遺伝子が、*Saccharopolyspora spinosa* のためにコドン最適化されている、項目 2 0 4 に記載の方法。

(項目 2 0 6)

前記 *sacB* 遺伝子が、配列番号 1 4 6 によってコードされるアミノ酸配列に対して 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目 2 0 5 に記載の方法。

(項目 2 0 7)

前記 *pheS* 遺伝子が、配列番号 1 4 7 または配列番号 1 4 8 によってコードされるアミノ酸に対して 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、項目 2 0 5 に記載の方法。

(項目 2 0 8)

前記プラスミドが、形質転換によって前記 *Saccharopolyspora* 株に導入される、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 0 9)

前記形質転換が、プロトプラスト形質転換である、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 1 0)

前記プラスミドが、コンジュゲーションによって前記 *Saccharopolyspora* 株に導入され、前記 *Saccharopolyspora* 株が、レシビエント細胞であり、前記プラスミドを含むドナー細胞が、前記 *Saccharopolyspora* 株に前記プラスミドを移入する、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 1 1)

前記コンジュゲーションが、前記プラスミドを含む E . c o l i ドナー細胞に基づく、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 1 2)

前記標的遺伝子座が、前記 S a c c h a r o p o l y s p o r a 株中の目的の化合物の産生に関連する遺伝子座である、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 1 3)

結果として生じる S a c c h a r o p o l y s p o r a 株が、前記ゲノム編集なしの対照株と比較して、目的の化合物の産生の増加を有する、項目 1 9 8 に記載の方法。

(項目 2 1 4)

前記目的の化合物が、スピノシンである、項目 2 1 2 または項目 2 1 3 に記載の方法。

(項目 2 1 5)

ハイスループット手順として実施される、項目 1 9 8 に記載の方法。