

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6230594号
(P6230594)

(45) 発行日 平成29年11月15日 (2017.11.15)

(24) 登録日 平成29年10月27日 (2017.10.27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 7/04 (2006.01)

C 1 2 P 7/04

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

請求項の数 54 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-504688 (P2015-504688)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月2日 (2013.4.2)
 (65) 公表番号 特表2015-512645 (P2015-512645A)
 (43) 公表日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/035040
 (87) 国際公開番号 W02013/152052
 (87) 国際公開日 平成25年10月10日 (2013.10.10)
 審査請求日 平成28年2月24日 (2016.2.24)
 (31) 優先権主張番号 61/619,309
 (32) 優先日 平成24年4月2日 (2012.4.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 514258384
 アールイージー ライフ サイエンスズ
 リミテッド ライアビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国 アイオワ州 エームズ
 サウス ベル アベニュー 416
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CAR酵素、および改良された脂肪アルコール産生方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO : 7に記載のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸変異を含む変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) ポリペプチドであって、該少なくとも1つのアミノ酸変異が、S3R、D18R、D18L、D18T、D18P、E20V、E20S、E20R、S22R、S22N、S22G、L80R、R87G、R87E、V191S、F288R、F288S、F288G、Q473L、Q473W、Q473Y、Q473I、Q473H、A535S、D750A、R827C、R827A、I870L、R873S、V926A、V926E、S927K、S927G、M930K、M930RおよびL1128Wからなる群より選択され、組換え宿主細胞における該変異型CARポリペプチドの発現が、対応する野生型ポリペプチドを発現する宿主細胞と比較してより高い力価の脂肪アルコール組成物をもたらす、変異型CARポリペプチド。

【請求項 2】

CARポリペプチドがCarBポリペプチドである、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3】

突然変異A535Sを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 4】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473IおよびA535Sを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 5】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 6】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 7】

変異型ポリペプチドが突然変異S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 8】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 9】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 10】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、S927KおよびM930Rを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 11】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、M930KおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 12】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、V926A、S927KおよびM930Rを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 13】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535SおよびR827Cを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 14】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827CおよびM930Rを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 15】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870L、S927GおよびM930Rを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 16】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870LおよびS927Gを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 17】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、V926AおよびS927Gを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 18】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870LおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 19】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 20】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 21】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 22】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、I870L、S927Gおよ

10

20

30

40

50

びM930Kを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 3】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473I、A535S、I870L、M930Kを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 4】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 5】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927GおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

10

【請求項 2 6】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870LおよびS927Gを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 7】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 8】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

20

【請求項 2 9】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、V926E、S927GおよびM930Rを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 0】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、V926AおよびL1128Wを含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 1】

SEQ ID NO : 7に記載のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、該少なくとも1つのアミノ酸変異がS3R、D18R、D18L、D18T、D18P、E20V、E20S、E20R、S22R、S22N、S22G、L80R、R87G、R87E、V191S、F288R、F288S、F288G、Q473L、Q473W、Q473Y、Q473I、Q473H、A535S、D750A、R827C、R827A、I870L、R873S、V926A、V926E、S927K、S927G、M930K、M930RおよびL1128Wからなる群より選択される、変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) 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組換え宿主細胞であって、該組換え宿主細胞が、炭素源を含有する培地中で、該変異型CARポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞よりも高い力価または収量で脂肪アルコール組成物を産生する、組換え宿主細胞。

30

【請求項 3 2】

SEQ ID NO : 7が前記対応する野生型CARポリペプチドである、請求項31記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 3】

チオエステラーゼ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、請求項31記載の組換え宿主細胞。

40

【請求項 3 4】

FabBポリペプチドおよびFadR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、請求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 5】

前記組換え宿主細胞が、該組換え宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の力価よりも少なくとも3倍高い力価を有する、請求項31記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 6】

50

30g/L ~ 250g/Lの力価を有する、請求項35記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 7】

90g/L ~ 120g/Lの力価を有する、請求項36記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 8】

前記組換え宿主細胞が10% ~ 40%までの収量を有する、請求項31記載の組換え宿主細胞

。

【請求項 3 9】

請求項31記載の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

【請求項 4 0】

前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する細胞培養物の産生能よりも少なくとも3 10
倍高い産生能を有する、請求項39記載の細胞培養物。

【請求項 4 1】

産生能が0.7mg/L/hr ~ 3g/L/hrの範囲である、請求項40記載の細胞培養物。

【請求項 4 2】

培養培地が脂肪アルコール組成物を含む、請求項41記載の細胞培養物。

【請求項 4 3】

前記脂肪アルコール組成物が細胞外環境に分泌される、請求項42記載の細胞培養物。

【請求項 4 4】

前記脂肪アルコール組成物がC6、C8、C10、C12、C13、C14、C15、C16、C17、またはC18
脂肪アルコールのうち1つまたは複数を含む、請求項43記載の細胞培養物。 20

【請求項 4 5】

前記脂肪アルコール組成物がC10:1、C12:1、C14:1、C16:1、またはC18:1不飽和脂肪ア
ルコールを含む、請求項43記載の細胞培養物。

【請求項 4 6】

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを含む、請求項43記載の細胞
培養物。

【請求項 4 7】

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを3:1の比で含む、請求項46
記載の細胞培養物。

【請求項 4 8】

前記脂肪アルコール組成物が不飽和脂肪アルコールを含む、請求項43記載の細胞培養物

。

【請求項 4 9】

前記脂肪アルコール組成物が、脂肪アルコールの還元末端からC₇ ~ C₈の間の炭素鎖にお
ける7番目の位置に二重結合を有する該脂肪アルコールを含む、請求項48記載の細胞培養
物。

【請求項 5 0】

前記脂肪アルコール組成物が飽和脂肪アルコールを含む、請求項43記載の細胞培養物。

【請求項 5 1】

前記脂肪アルコール組成物が分枝鎖脂肪アルコールを含む、請求項43記載の細胞培養物 40

。

【請求項 5 2】

脂肪アルデヒドレダクターゼ (AlrA) をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請
求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項 5 3】

請求項52記載の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

【請求項 5 4】

脂肪アルコール組成物を高い力価、収量または産生能で製造する方法であって、

(a) 請求項31記載の組換え宿主細胞を遺伝子工学的に作製する段階；

(b) 炭素源を含む培地中で該組換え宿主細胞を培養する段階；および

(c) 該培地から該脂肪アルコール組成物を単離する段階を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み入れられる、2012年4月2日に提出された米国仮出願第61/619,309号の恩典を主張する。

【0002】

配列表

10

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、EFS-Webを介してASCII形式で提出されている配列表を含む。2013年4月2日に作成されたASCIIコピーの名称はLS00039PCT_SL.txtであり、サイズは89,038バイトである。

【0003】

開示の分野

本開示は、組換え宿主細胞における改良された脂肪アルコール産生のための変異型カルボン酸レダクターゼ(CAR)酵素に関する。本開示は、変異型CAR核酸およびポリペプチド、ならびに組換え宿主細胞および細胞培養物にさらにに関する。さらに、脂肪アルコール組成物を製造する方法を包含する。

【背景技術】

20

【0004】

開示の背景

脂肪アルコールは、産業用生化学製品の重要なカテゴリーを成している。これらの分子およびそれらの誘導体には、界面活性剤、潤滑剤、可塑剤、溶媒、乳化剤、軟化剤、増粘剤、香味剤、芳香剤および燃料などの、数多くの用途がある。産業界では、脂肪アルコールは、ココナッツ油、ヤシ油、パーム核油、獣脂およびラードなどの天然源から生成される脂肪酸の接触水素添加を介して、または石油化学原料から生成される α -オレフィンの化学的水和によって、産生される。天然源に由来する脂肪アルコールの鎖長はさまざまである。脂肪アルコールの鎖長は、個々の用途に対して重要である。自然界では、脂肪アルコールは、アシル-ACPまたはアシル-CoA分子に対応する第一級アルコールに還元することのできる酵素によっても作製される(例えば、米国特許公開第20100105955号(特許文献1)、同第20100105963号(特許文献2)および同第20110250663号(特許文献3)を参照。これらは参照により本明細書に組み入れられる)。

30

【0005】

脂肪アルコールを産生するための現行の技術は、無機触媒を介して、脂肪酸に対応する第一級アルコールへ還元することを必要とするが、これは費用がかかり、時間がかかる上に煩雑である。この工程に用いられる脂肪酸は、天然源に由来する(例えば、植物性および動物性の油および脂肪、前記)。脂肪アルコールの α -オレフィンへの脱水を化学触媒作用によって実現することもできる。しかし、この手法は再生不能である上、高い作業コストおよび環境的に有害な化学廃棄物を伴う。このため、脂肪アルコールを産生するための方法の改良が必要であり、本開示はこの要求に応えるものである。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許公開第20100105955号

【特許文献2】米国特許公開第20100105963号

【特許文献3】米国特許公開第20110250663号

【発明の概要】

【0007】

概要

50

本開示の1つの局面は、SEQ ID NO : 7に対して少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) ポリペプチドであって、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128の群から選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの突然変異を有するように遺伝子操作された、変異型CARポリペプチドを提供する。本明細書において、組換え宿主細胞における変異型CARポリペプチドの発現は、対応する野生型ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と比較してより高い力価の脂肪アルコール組成物をもたらす。関連した1つの局面において、CARポリペプチドはCarBポリペプチドである。もう1つの関連した局面において、変異型CARポリペプチドは、位置S3R、D18R、D18L、D18T、D18P、E20V、E20S、E20R、S22R、S22N、S22G、L80R、R87G、R87E、V191S、F288R、F288S、F288G、Q473L、Q473W、Q473Y、Q473I、Q473H、A535S、D750A、R827C、R827A、I870L、R873S、V926A、V926E、S927K、S927G、M930K、M930Rおよび/またはL1128Wに突然変異を含む。関連した1つの局面において、CARポリペプチドは、突然変異A535S ; または突然変異E20R、F288G、Q473IおよびA535S ; または突然変異E20R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927G ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927G ; または突然変異S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128W ; またはE20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128W ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930KおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、S927KおよびM930R ; または突然変異D18R、E20R、288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、M930KおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、V926A、S927KおよびM930R ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535SおよびR827C ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827CおよびM930R ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870L、S927GおよびM930R ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870LおよびS927G ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、V926AおよびS927G ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870LおよびL1128W ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927G、M930KおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、I870L、S927GおよびM930K ; または突然変異E20R、F288G、Q473I、A535S、I870L、M930K ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、S927G、M930KおよびL1128W ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927GおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870LおよびS927G ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128W ; または突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930RおよびL1128W ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、V926E、S927GおよびM930R ; または突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、V926AおよびL1128W ; またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 0 0 8 】

本開示のもう1つの局面は、SEQ ID NO : 7に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128を含むアミノ酸位置に少なくとも1つの突然変異を有する変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) 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宿主細胞であって、遺伝子操作された該宿主細胞が、炭素源を含有する培地中で、変異型CARポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞よりも高い力価または収量で脂肪アルコール組成物を産生し、かつSEQ ID NO : 7が該対応する野生型CARポリペプチドである、宿主細胞を提供する。関連した1つの局面において、組換え宿主細胞は、チオエステラーゼ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。もう1つの関連した局面において、組換え宿主細胞は、FabBポリペプチドおよびFadR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。もう1つの関連した局面において、本開示は、脂肪アルデヒドレダクターゼ (AlrA) をコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞およびそれを含有する細胞培養物を提供する。

【0009】

本開示のもう1つの局面は、組換え宿主細胞を提供し、ここで、遺伝子操作された該宿主細胞が、該遺伝子操作された宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の力価よりも少なくとも3倍高い力価を有する。1つの関連した局面において、遺伝子操作された宿主細胞は、約30g/L～約250g/Lの力価を有する。もう1つの関連した局面において、遺伝子操作された宿主細胞は、約90g/L～約120g/Lの力価を有する。

10

【0010】

本開示のもう1つの局面は、組換え宿主細胞を提供し、ここで、遺伝子操作された該宿主細胞が、該遺伝子操作された宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の収量よりも少なくとも3倍多い収量を有する。1つの関連した局面において、遺伝子操作された宿主細胞は約10%～約40%までの収量を有する。

【0011】

本開示は、本明細書に記載の組換え宿主細胞を含む細胞培養物をさらに包含する。関連した1つの局面において、細胞培養物は、対応する野生型CARポリペプチドを発現する細胞培養物の産生能よりも少なくとも約3倍高い産生能を有する。もう1つの関連した局面において、産生能は約0.7mg/L/hr～約3g/L/hrの範囲にわたる。もう1つの関連した局面において、培養培地は脂肪アルコール組成物を含む。脂肪アルコール組成物は細胞外に産生される。脂肪アルコール組成物は、C6、C8、C10、C12、C13、C14、C15、C16、C17、もしくはC18脂肪アルコール；またはC10:1、C12:1、C14:1、C16:1、もしくはC18:1不飽和脂肪アルコールのうちの1つまたは複数を含む。もう1つの関連した局面において、脂肪アルコール組成物はC12およびC14脂肪アルコールを含む。またもう1つの関連した局面において、脂肪アルコール組成物はC12およびC14脂肪アルコールを約3:1の比で含む。さらにもう1つの関連した局面において、脂肪アルコール組成物は不飽和脂肪アルコールを包含する。加えて、脂肪アルコール組成物は、脂肪アルコールの還元末端からC7～C8の間の炭素鎖における7番目の位置に二重結合を有する該脂肪アルコールも含みうる。もう1つの局面において、脂肪アルコール組成物は飽和脂肪アルコールを含む。もう1つの局面において、脂肪アルコール組成物は分枝鎖脂肪アルコールを含む。

20

30

【0012】

本開示はさらに、脂肪アルコール組成物を高い力価、収量または産生能で製造する方法であって、組換え宿主細胞を遺伝子工学的に作製する段階；炭素源を含む培地中で組換え宿主細胞を培養する段階；および任意で、培地から脂肪アルコール組成物を単離する段階を含む、方法を意図する。

[本発明1001]

SEQ ID NO: 7に対して少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) ポリペプチドであって、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128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つの突然変異を有するように遺伝子操作された、変異型CARポリペプチド。

40

[本発明1002]

組換え宿主細胞における前記変異型CARポリペプチドの発現が、対応する野生型ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と比較してより高い力価の脂肪アルコール組成物をもたらす、本発明1001の変異型CARポリペプチド。

[本発明1003]

CARポリペプチドがCarBポリペプチドである、本発明1001の変異型CARポリペプチド。

[本発明1004]

50

S3R、D18R、D18L、D18T、D18P、E20V、E20S、E20R、S22R、S22N、S22G、L80R、R87G、R87E、V191S、F288R、F288S、F288G、Q473L、Q473W、Q473Y、Q473I、Q473H、A535S、D750A、R827C、R827A、I870L、R873S、V926A、V926E、S927K、S927G、M930K、M930RおよびL1128Wからなる群より選択される突然変異を含む、本発明1001の変異型CARポリペプチド。

[本発明1005]

突然変異A535Sを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1006]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473IおよびA535Sを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1007]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1008]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1009]

変異型ポリペプチドが突然変異S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1010]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1011]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1012]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、S927KおよびM930Rを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1013]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、M930KおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1014]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、V926A、S927KおよびM930Rを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1015]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535SおよびR827Cを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1016]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827CおよびM930Rを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1017]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870L、S927GおよびM930Rを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1018]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870LおよびS927Gを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1019]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、V926AおよびS927Gを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1020]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870Lおよ

10

20

30

40

50

びL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1021]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1022]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1023]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1024]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、I870L、S927GおよびM930Kを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1025]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473I、A535S、I870L、M930Kを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1026]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1027]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927GおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1028]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870LおよびS927Gを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1029]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1030]

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1031]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、V926E、S927GおよびM930Rを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1032]

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、V926AおよびL1128Wを含む、本発明1004の変異型CARポリペプチド。

[本発明1033]

SEQ ID NO : 7に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128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つの突然変異を有する変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) 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組換え宿主細胞であって、遺伝子操作された該宿主細胞が、炭素源を含有する培地中で、該変異型CARポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞よりも高い力価または収量で脂肪アルコール組成物を産生する、組換え宿主細胞。

[本発明1034]

SEQ ID NO : 7が前記対応する野生型CARポリペプチドである、本発明1033の組換え宿主細胞。

[本発明1035]

10

20

30

40

50

チオエステラーゼ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、本発明1033の組換え宿主細胞。

[本発明1036]

FabBポリペプチドおよびFadR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、本発明1035の組換え宿主細胞。

[本発明1037]

前記遺伝子操作された宿主細胞が、該遺伝子操作された宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の力価よりも少なくとも3倍高い力価を有する、本発明1033～1036のいずれかの組換え宿主細胞。

[本発明1038]

約30g/L～約250g/Lの力価を有する、本発明1037の組換え宿主細胞。

[本発明1039]

約90g/L～約120g/Lの力価を有する、本発明1038の組換え宿主細胞。

[本発明1040]

前記遺伝子操作された宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の収量よりも少なくとも3倍多い収量を有する、本発明1033～1036のいずれかの組換え宿主細胞。

[本発明1041]

前記遺伝子操作された宿主細胞が約10%～約40%までの収量を有する、本発明1040の組換え宿主細胞。

[本発明1042]

本発明1033～1036のいずれかの組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

[本発明1043]

前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する細胞培養物の産生能よりも少なくとも3倍高い産生能を有する、本発明1042の細胞培養物。

[本発明1044]

産生能が約0.7mg/L/hr～約3g/L/hrの範囲である、本発明1043の細胞培養物。

[本発明1045]

培養培地が脂肪アルコール組成物を含む、本発明1044の細胞培養物。

[本発明1046]

前記脂肪アルコール組成物が細胞外に産生される、本発明1033～1045のいずれかの組換え宿主細胞。

[本発明1047]

前記脂肪アルコール組成物がC₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、またはC₁₈脂肪アルコールのうち1つまたは複数を含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1048]

前記脂肪アルコール組成物がC₁₀:1、C₁₂:1、C₁₄:1、C₁₆:1、またはC₁₈:1不飽和脂肪アルコールを含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1049]

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1050]

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを約3:1の比で含む、本発明1049の細胞培養物。

[本発明1051]

前記脂肪アルコール組成物が不飽和脂肪アルコールを含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1052]

前記脂肪アルコール組成物が、脂肪アルコールの還元末端からC₇～C₈の間の炭素鎖における7番目の位置に二重結合を有する該脂肪アルコールを含む、本発明1051の細胞培養物。

。

10

20

30

40

50

[本発明1053]

前記脂肪アルコール組成物が飽和脂肪アルコールを含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1054]

前記脂肪アルコール組成物が分枝鎖脂肪アルコールを含む、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1055]

脂肪アルデヒドレダクターゼ (AlrA) をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、本発明1035の組換え宿主細胞。

[本発明1056]

本発明1055の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

[本発明1057]

脂肪アルコール組成物を高い力価、収量または産生能で製造する方法であって、

(a) 本発明1001～1041のいずれかの組換え宿主細胞を遺伝子工学的に作製する段階；

(b) 炭素源を含む培地中で該組換え宿主細胞を培養する段階；および

(c) 任意で、該培地から該脂肪アルコール組成物を単離する段階

を含む、方法。

【図面の簡単な説明】【0013】

本開示は、好ましい態様を例示するのに役立つ添付の図面と併せて読むと、最も良く理解される。しかし、本開示が、添付の図面中に開示された具体的な態様に限定されないことが理解される。

【図1】組換え宿主細胞における脂肪酸誘導体の前駆体としてのアシルCoAの産生に用いるための、例示的な生合成経路の図式的概観である。このサイクルは、マロニル-ACPとアセチル-CoAとの縮合によって惹起される。

【図2】例示的な脂肪酸生合成サイクルの図式的概観であり、ここではマロニル-ACPが、(マロニル-CoA:ACPトランスアシラーゼ；fabDによって触媒される)マロニル-CoAのマロニル-ACPへのアシル基転移によって生成され、続いて β -ケトアシル-ACPシンターゼIII (fabH) がマロニル-ACPのアセチル-CoAとの縮合を惹起する。伸長サイクルは、 β -ケトアシル-ACPシンターゼI (fabB) および β -ケトアシル-ACPシンターゼII (fabF) によって触媒される、 β -ケト-アシル-ACPを生成するためのマロニル-ACPとアシル-ACPとの縮合から始まり、続いて β -ケト-アシル-ACPがNADPH依存性 β -ケトアシル-ACPレダクターゼ (fabG) によって還元されて β -ヒドロキシ-アシル-ACPが生成され、これが β -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラターゼ (fabAまたはfabZ) によって脱水されてtrans-2-エノイル-アシル-ACPとなる。FabAはまた、trans-2-エノイル-アシル-ACPをcis-3-エノイル-アシル-ACPに異性化することもでき、これは、fabIを迂回してfabBによって用いられ(典型的には最長C16の長さの脂肪族鎖の場合)、 β -ケト-アシル-ACPを生成することができる。各サイクルにおける最終段階は、trans-2-エノイル-アシル-ACPをアシル-ACPに変換するNADHまたはNADPH依存性エノイル-ACPレダクターゼ (fabI) によって触媒される。本明細書に記載の方法において、脂肪酸合成の終結は、アシル-ACPからのアシル基のチオエステラーゼ除去によって起こり、遊離脂肪酸 (FFA) が放出される。チオエステラーゼ (例えば、tesA) は、スルフヒドリル結合を介してアシル鎖とACPとの間に存在するチオエステル結合を加水分解する。

【図3】アセチル-CoAカルボキシラーゼ (accABCD) 酵素複合体の構造および機能を図示している。ピオチンカルボキシラーゼはaccC遺伝子によってコードされ、一方、ピオチンカルボキシルキャリアータンパク質 (BCCP) はaccB遺伝子によってコードされる。カルボキシルトランスフェラーゼ活性に関与する2つのサブユニットは、accA遺伝子およびaccD遺伝子によってコードされる。BCCPに共有結合したピオチンは、カルボン酸部分を保有している。birA遺伝子 (図示せず) は、ホロ-accBをピオチン化する。

【図4】アシル-ACPから出発する脂肪アルコールの生成のための例示的な生合成経路の図式的概観を提示しており、ここで脂肪アルデヒドの生成は、アシル-ACPレダクターゼ (AAR)、またはチオエステラーゼとカルボン酸レダクターゼ (Car) との酵素活性によって触

10

20

30

40

50

媒される。脂肪アルデヒドはアルデヒドレダクターゼ（アルコールデヒドロゲナーゼとも称される）によって脂肪アルコールに変換される。この経路は脂肪アシルCoAシンテターゼ（fadD）を含まない。

【図5】fadE遺伝子が減弱している（すなわち、欠失している）MG1655大腸菌株による脂肪酸誘導体（総脂肪種）の産生を、大腸菌MG1655による脂肪酸誘導体の産生と比較して図示している。図5に提示したデータは、fadE遺伝子の減弱が脂肪酸誘導体の産生に影響を及ぼさなかったことを示している。

【図6A】図に示す菌株のそれぞれにプラスミドpCL-WT TRC WT TesAを形質転換により導入し、FA2培地中での発酵を導入から集菌まで20時間かけて32で行った場合の、二重反復プレートスクリーニングに由来する、「総脂肪種」の産生に関するデータを示している

10

【図6B】図に示す菌株のそれぞれにプラスミドpCL-WT TRC WT TesAを形質転換により導入し、FA2培地中での発酵を導入から集菌まで20時間かけて37で行った場合の、二重反復プレートスクリーニングに由来する、「総脂肪種」の産生に関するデータを示している。

【図7】図7Aおよび7Bは、FAB138の前方に組み込まれたcat-loxP-T5プロモーターの略図（7A）；およびiT5_138の略図（7B）を含む、iFAB138座位の概略図を提示している。cat-loxP-T5プロモーター領域の両側にホモロジーのための50塩基対が示されている、FAB138の前方に組み込まれたcat-loxP-T5プロモーターの配列はSEQ ID NO:1として提示されており、両側にホモロジーのための50塩基対を有するiT5_138プロモーター領域の配列はSEQ ID NO:2として提示されている。

20

【図8】rph遺伝子およびilvG遺伝子の修復による影響を示している。EG149（rph⁻ ilvG⁻）およびV668（EG149 rph⁺ ilvG⁺）を、D191から得たpCL-tesA（P_{TRC}-'tesAを含むpCL1920プラスミド）で形質転換した。この図は、EG149菌株におけるrph遺伝子およびilvG遺伝子の修復により、rph遺伝子およびilvG遺伝子が修復されなかったV668菌株におけるよりも高レベルのFFA産生が可能になることを示している。

【図9】菌株LC535（トランスポゾンヒット68F11）のyijP遺伝子におけるトランスポゾンカセット挿入の概略図である。トランスポゾンカセットの内部にあるプロモーターを示しており、これらは隣接遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性がある。

【図10】菌株V324におけるCarB60による遊離脂肪酸の脂肪アルコールへの変換を示している。この図は、染色体由来のCarB60を発現する細胞（濃色のバー）が、CarB（淡色のバー）と比較して、C12およびC14遊離脂肪酸のより多くの割合を脂肪アルコールに変換することを示している。

30

【図11】染色体由来のCarB60を発現する細胞が、CarBと比較して、C12およびC14遊離脂肪酸のより多くの割合を脂肪アルコールに変換することを示している。

【図12】組み合わせライブラリー突然変異体の発酵後の脂肪アルコールの産生を示している。

【図13】産生プラスミドのcarB変異体（carB1およびCarB2）による、振盪フラスコ発酵後の脂肪アルコールの産生を示している。

【図14】単一コピー組込みcarB変異体（icarB1 icarB2、icarB3およびicarB4）による、振盪フラスコ発酵後の脂肪アルコールの産生を示している。

40

【図15】振盪フラスコ発酵によって検証した、改良されたCarB変異体に関する二重プラスミドスクリーニング系の結果を示している。

【図16】バイオリアクターにおける改良された脂肪アルコール産生のための新規CarB変異体を示している。

【発明を実施するための形態】

【0014】

詳細な説明

全体的概観

本開示は、新規変異型カルボン酸レダクターゼ（CAR）酵素、ならびにそれらの核酸配

50

列およびタンパク質配列を提供する。本開示は、脂肪アルコールの産生のための変異型CAR酵素を含む組換え宿主細胞および細胞培養物をさらに範囲に含む。発酵性糖またはバイオマスからの脂肪アルコールの産生が商業的に実現可能であるためには、生成物の効率的な変換および回収のために工程を最適化しなければならない。本開示は、遺伝子操作された変異型酵素および遺伝子操作された組換え宿主細胞を用いる改良された脂肪アルコール産生のための組成物および方法を提供することによって、この需要に応える。宿主細胞は、発酵工程を用いて高力価の脂肪アルコールの産生をもたらす生体触媒としての役割を果たす。そのため、本開示はさらに、精製脂肪酸の触媒変換が不要となるように特定鎖長の脂肪アルコールおよび α -オレフィンを直接的に産生する、光合成性かつ従属栄養性の宿主細胞を作製するための方法も提供する。この新たな方法は、生成物の品質および費用の上での利点をもたらす。

10

【0015】

より具体的には、脂肪アルコールの産生、分解および/または分泌のための生合成経路に関与する1つまたは複数の遺伝子の発現を改変することにより、所望の脂肪アルコール組成物の産生を強化しうる可能性がある。本開示は、遺伝子操作されていないかまたは天然の宿主細胞に比して強化された脂肪アルコール生合成をもたらすように遺伝子操作された組換え宿主細胞（例えば、菌株改良）を提供する。本開示はまた、本開示の組換え宿主細胞、方法および組成物において有用なポリヌクレオチドも提供する。しかし、そのようなポリヌクレオチドに対する絶対的な配列同一性は必要でないことは認識されるであろう。例えば、ある特定のポリヌクレオチド配列に変化を加えて、コードされるポリペプチドを活性に関して評価することができる。そのような変化には、典型的には、保存的突然変異およびサイレント突然変異（例えば、コドン最適化）が含まれる。改変されたまたは突然変異したポリヌクレオチド（すなわち、突然変異体）およびコードされる変異型ポリペプチドは、当技術分野において公知の方法を用いて、所望の機能、例えば、触媒活性の増大、安定性の増大または阻害の低下（例えば、フィードバック阻害の低下）を非限定的に含む、親ポリペプチドと比較して改良された機能に関してスクリーニングすることができる。

20

【0016】

本開示は、本明細書に記載の脂肪酸生合成経路のさまざまな段階（すなわち、反応）に関与する酵素活性を酵素分類（EC）番号に従って特定し、そのようなEC番号によって分類される例示的なポリペプチド（すなわち、酵素）、およびそのようなポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチドを提供する。アクセッション番号および/または配列識別子番号（SEQ ID NO）によって特定されるそのような例示的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、本明細書に記載の組換え宿主細胞を得る目的で親宿主細胞における脂肪酸経路を操作するために有用である。しかし、本明細書に記載のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは例示的であって非限定的であることが理解される必要がある。当業者は、本明細書に記載の例示的なポリペプチドの相同体の配列を、データベース（例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) によって提供されているEntrezデータベース、Swiss Institute of Bioinformaticsによって提供されているExPasyデータベース、Technical University of Braunschweigによって提供されているBRENDAデータベース、ならびにBioinformatics Center of Kyoto UniversityおよびUniversity of Tokyoによって提供されているKEGGデータベース、これらはすべてWorld Wide Web上で利用可能である）を用いて利用可能である。

30

40

【0017】

種々の宿主細胞を、本明細書に記載したもののような脂肪アルコール生合成酵素を含有するように改変して、脂肪アルコール組成物の産生に適した組換え宿主細胞を生じさせることができる。種々の細胞が、本明細書で提供される組換え宿主細胞における使用に適した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遺伝物質の供給源をもたらすことが理解される必要がある。

【0018】

50

定義

別に定義する場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本開示が属する当技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似または同等の他の方法および材料を本開示の実施に用いることができるが、好ましい材料および方法は本明細書に記載されている。本開示の記載および添付の特許請求の範囲では、以下の用語を以下に述べる定義に従って用いるものとする。

【 0 0 1 9 】

アクセッション番号：本記載を通じて、配列アクセッション番号は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health, U.S.A.) によって管理されているNCBI (National Center for Biotechnology Information) によって提供されるデータベースから（これらは本明細書では「NCBIアクセッション番号」として、または代替的には「GenBankアクセッション番号」として識別される）、ならびにSwiss Institute of Bioinformaticsによって提供されるUniProt Knowledgebase (UniProtKB) およびSwiss-Protデータベースから（これらは本明細書では「UniProtKBアクセッション番号」として識別される）得た。

10

【 0 0 2 0 】

酵素分類 (EC) 番号：EC番号は、国際生化学分子生物学連合 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (IUBMB) の命名委員会によって確立されており、その記述はWorld Wide WebのIUBMB酵素命名ウェブサイトで利用可能である。EC番号は、触媒する反応に応じて酵素を分類する。

20

【 0 0 2 1 】

本明細書で用いる場合、「ヌクレオチド」という用語は、複素環塩基、糖、および1つまたは複数のリン酸基からなるポリヌクレオチドのモノマー単位のことを指す。天然の塩基（グアニン (G)、アデニン (A)、シトシン (C)、チミン (T) およびウラシル (U)）は、典型的にはプリンまたはピリミジンの誘導体であるが、天然および非天然の塩基類似体も含まれることが理解されるべきである。天然の糖は、ペントース（五炭糖）デオキシリボース（DNAを形成する）またはリボース（RNAを形成する）であるが、天然および非天然の糖類似体も含まれることが理解されるべきである。核酸は、典型的にはリン酸結合を介して連結して核酸またはポリヌクレオチドを形成するが、多くの他の結合も当技術分野において公知である（例えば、ホスホロチオエート、ボラのホスフェートなど）。

30

【 0 0 2 2 】

本明細書で用いる場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、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) の重合体のことを指し、それらは一本鎖でも二本鎖でもよく、非天然または改変ヌクレオチドを含むこともできる。「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、本明細書において、RNAまたはDNAのいずれかである任意の長さの重合型のヌクレオチドを指す目的で互換的に用いられる。これらの用語は分子の一次構造を指しており、それ故、二本鎖および一本鎖のDNA、ならびに二本鎖および一本鎖のRNAを含む。これらの用語は、同等のものとして、メチル化および/またはキャッピングされたポリヌクレオチドなどの、ただしそれらに限定はされないヌクレオチド類似体および修飾ポリヌクレオチドでできた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、任意の形態にあってよい。

40

【 0 0 2 3 】

本明細書で用いる場合、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の重合体を指す目的で互換的に用いられる。「組換えポリペプチド」という用語は、組換え手法によって産生されるポリペプチドのことを指し、ここでは概して、発現させるタンパク質をコードするDNAまたはRNAを適した発現ベクター中に挿入し、続いてそれを、該ポリペプチドを産生させる目的で宿主細胞を形質転換するために用いる。

【 0 0 2 4 】

本明細書で用いる場合、「ホモログ」および「相同な」という用語は、対応するポリヌ

50

クレオチド配列またはポリペプチド配列に対して少なくとも約50%同一である配列を含むポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことを指す。好ましくは、相同なポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、対応するアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも約99%の相同性を有するポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有する。本明細書で用いる場合、配列「相同性」および配列「同一性」という用語は、互換的に用いられる。

【0025】

当業者は、2つまたはそれ以上の配列の間の相同性を決定するための方法を熟知しているであろう。手短に述べると、2つの配列間の「相同性」の計算は、以下のように行うことができる。配列を、最適な比較のために整列させる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のために非相同配列を無視することができる。好ましい態様において、比較のために整列させる第1の配列の長さは、第2の配列の長さの少なくとも約30%、好ましくは少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約50%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、さらにより好ましくは少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または約100%である。続いて、第1および第2の配列の対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合には、その分子はその位置で同一である。2つの配列間の%相同性は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列が共通に持つ同一な位置の数の関数である。

【0026】

2つの配列間での配列の比較および%相同性の決定は、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215(3): 403-410 (1990)) などの数学的アルゴリズムを用いて実現することができる。2つのアミノ酸配列間の%相同性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunschのアルゴリズムを用い、Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6または4のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を用いて決定することもできる (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970))。また、2つのヌクレオチド配列間の%相同性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いNWSgapdna.CMP行列、ならびに40、50、60、70または80のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を用いて決定することもできる。当業者は、初期の相同性計算を行い、それに応じてアルゴリズムパラメーターを調整することができる。好ましいパラメーターのセット（および、分子が添付の特許請求の範囲の相同性の限度内にあるか否かを判定するためにどのパラメーターを適用すべきかを実施者が分かっていない場合に用いるべきセット）では、Blossum 62スコアリング行列を、ギャップペナルティ12、ギャップ延長ペナルティ4およびフレームシフトギャップペナルティ5で用いる。配列アラインメントのそのほかの方法は、バイオテクノロジーの技術分野で公知である（例えば、Rosenberg, BMC Bioinformatics, 6: 278 (2005); Altschul, et al., FEBS J., 272(20): 5101-5109 (2005)を参照）。

【0027】

本明細書で用いる場合、「低ストリンジェントな、中ストリンジェントな、高ストリンジェントなまたは超高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する条件を述べている。ハイブリダイゼーション反応を行うための手引きは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6.に見ることができる。この参考文献には水性および非水性の方法が記載されており、いずれの方法を用いることもできる。本明細書において言及する具体的なハイブリダイゼーション条件は、以下の通りである：1) 低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件--6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC)、

約45 の後に、0.2×SSC、0.1% SDS中、少なくとも50 で2回洗浄（低ストリンジェントな条件の場合、洗浄の温度は55 まで上げることができる）；2）中ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件--6×SSC、約45 の後に、0.2×SSC、0.1% SDS中、60 での1回または複数回の洗浄；3）高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件--6×SSC、約45 の後に、0.2×SSC、0.1% SDS中、65 での1回または複数回の洗浄；および4）超高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件--0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDS、65 の後に、0.2×SSC、1% SDS、65 での1回または複数回の洗浄。別に指定する場合を除き、超高ストリンジェントな条件（4）が好ましい条件である。

【0028】

「内因性」ポリペプチドとは、組換え細胞が遺伝子工学的に操作されて作製される（すなわち「由来する」）親微生物細胞（「宿主細胞」とも称する）のゲノムによってコードされる、ポリペプチドのことを指す。

10

【0029】

「外来性」ポリペプチドとは、親微生物細胞のゲノムによってはコードされないポリペプチドのことを指す。変異型（すなわち、突然変異型）ポリペプチドは、外来性ポリペプチドの一例である。

【0030】

「異種」という用語は、一般に、異なる種に由来するか、または異なる生物に由来することを意味する。本明細書で用いる場合、これは、特定の生物内に天然では存在しないヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のことを指す。異種発現とは、タンパク質またはポリペプチドが、そのタンパク質を通常は発現しない細胞に実験的に追加されることを意味する。そのため、異種とは、移入されるタンパク質が、レシピエントとは異なる細胞型または異なる種に元々は由来するという事実を指す。例えば、植物細胞にとって内因性のポリヌクレオチド配列を、組換え法を用いて細菌宿主細胞に導入することができ、その場合、植物ポリヌクレオチドは組換え細菌宿主細胞における異種ポリヌクレオチドである。

20

【0031】

本明細書で用いる場合、ポリペプチドの「断片」という用語は、完全長ポリペプチドまたはタンパク質のより短い部分のことを指し、そのサイズは、4アミノ酸残基から、アミノ酸配列全体マイナス1アミノ酸残基までの範囲にわたる。本開示のある態様において、断片とは、ポリペプチドまたはタンパク質のあるドメイン（例えば、基質結合ドメインまたは触媒ドメイン）のアミノ酸配列全体のことを指す。

30

【0032】

本明細書で用いる場合、「突然変異誘発」という用語は、生物の遺伝情報を安定的な様式で変化させる工程のことを指す。核酸配列をコードするタンパク質の突然変異誘発により、突然変異型タンパク質が生じる。また、突然変異誘発とは、タンパク質活性の改変をもたらす非コード性核酸配列の変化のことも指す。

【0033】

本明細書で用いる場合、「遺伝子」という用語は、RNA産物またはタンパク質産物のいずれかをコードする核酸配列、ならびに、そのRNAもしくはタンパク質の発現に影響を及ぼす機能的に連結された核酸配列（例えば、そのような配列には、プロモーター配列またはエンハンサー配列が非限定的に含まれる）またはそのRNAもしくはタンパク質に影響を及ぼす配列をコードする機能的に連結された核酸配列（例えば、そのような配列には、リボソーム結合部位または翻訳制御配列が非限定的に含まれる）のことを指す。

40

【0034】

発現制御配列は当技術分野において公知であり、これには例えば、宿主細胞におけるポリヌクレオチド配列の発現をもたらす、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、配列内リボソーム進入部位（IRES）などが含まれる。発現制御配列は、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する（Maniatis et al., Science, 236: 1237-1245 (1987)）。例示的な発現制御配列は、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Ca

50

lif. (1990)に記載されている。

【0035】

本開示の方法において、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ている。「機能的に連結された」という用語は、適切な分子（例えば、転写活性化タンパク質）が発現制御配列に結合した時に遺伝子発現を可能にするような様式で、ポリヌクレオチド配列と該発現制御配列が接続されていることを意味する。機能的に連結されたプロモーターは、転写および翻訳の方向の観点では、選択されたポリヌクレオチド配列の上流に位置する。機能的に連結されたエンハンサーは、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。

【0036】

本明細書で用いる場合、「ベクター」という用語は、それに連結された別の核酸、すなわちポリヌクレオチド配列を輸送しうる核酸分子のことを指す。有用なベクターの一種は、エピソード（すなわち、染色体外での複製が可能な核酸）である。有用なベクターは、それに連結された核酸の自律複製および/または発現を可能にするものである。機能的に連結された遺伝子の発現を導くことができるベクターを、本明細書では「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA手法において有用な発現ベクターは、ベクター形態では染色体に結合していない環状二本鎖DNAループ全般を指す「プラスミド」の形態にあることが多い。プラスミドはベクターの最も一般的に用いられる形態であることから、「プラスミド」および「ベクター」という用語は本明細書において互換的に用いられる。しかし、同等の機能を果たす他の形態の発現ベクター、および当技術分野において今後公知となる他の形態の発現ベクターも同じく含まれる。いくつかの態様において、組換えベクターは、（a）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた発現制御配列；（b）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた選択マーカー；（c）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついたマーカー配列；（d）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた精製部分；（e）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた分泌配列；および（f）ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついたターゲティング配列、を含む少なくとも1つの配列を含む。本明細書に記載の発現ベクターは、本明細書に記載の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。当業者には、発現ベクターの設計が、形質転換させようとする宿主細胞の選択、所望のポリペプチドの発現レベルなどの要因に依存しうることが理解されるであろう。本明細書に記載の発現ベクターは、本明細書に述べるようなポリヌクレオチド配列によってコードされる、融合ポリペプチドを含むポリペプチドを産生させるために宿主細胞に導入することができる。

【0037】

原核生物、例えば大腸菌（*E. coli*）におけるポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、融合または非融合ポリペプチドのいずれかの発現を導く構成性または誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、その中にコードされているポリペプチド、通常は組換えポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に、いくつかのアミノ酸を付加する。そのような融合ベクターは、典型的には、以下の3つの目的の1つまたは複数に役立つ：（1）組換えポリペプチドの発現を増大させること；（2）組換えポリペプチドの溶解性を高めること；および（3）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することによって、組換えポリペプチドの精製を助けること。多くの場合、融合発現ベクターでは、融合部分と組換えポリペプチドの接合部にタンパク質分解切断部位が導入されている。これにより、融合ポリペプチドの精製後に、融合部分からの組換えポリペプチドの分離が可能になる。ある態様において、本開示のポリヌクレオチド配列は、バクテリオファージT5由来のプロモーターと機能的に連結されている。ある態様において、宿主細胞は酵母細胞であり、発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*（*S. cerevisiae*）における発現のためのベクターの例には、pYepSec1（Baldari et al., EMBO J., 6: 229-234 (1987)）、pMFa（Kurjan et al., Cell, 30: 933-943 (1982)）、pJRY88（Schultz et al., Gene, 54: 113-123 (1987)）、pYES2（Invitrogen Corp., San Diego, CA）、およびpicZ（Invitrogen Corp., San Diego, CA）が

10

20

30

40

50

含まれる。他の態様において、宿主細胞は昆虫細胞であり、発現ベクターはバキュロウイルス発現ベクターである。培養昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）におけるタンパク質の発現のために利用しうるバキュロウイルスベクターには、例えば、pAc系列（Smith et al., Mol Cell Biol, 3: 2156-2165 (1983)）およびpVL系列（Lucklow et al., Virology, 170: 31-39 (1989)）が含まれる。さらにもう1つの態様において、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列を、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞において発現させることもできる。原核細胞および真核細胞のいずれについても他の適した発現系が当技術分野において周知である；例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)を参照されたい。

【0038】

本明細書で用いる場合、「アシル-CoA」とは、アルキル鎖のカルボニル炭素と補酵素A（CoA）の4'-ホスホパンテチオニル部分のスルフヒドリル基との間に形成され、式R-C(O)S-CoAを有するアシルチオエステルのことを指し、式中、Rは少なくとも4個の炭素原子を有する任意のアルキル基のことである。

【0039】

本明細書で用いる場合、「アシル-ACP」とは、アルキ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）のホスホパンテチ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のことを指す。ホスホパンテチニル部分は、ホスホパンテチニルトランスフェラーゼの1つであるホロ-アシルキャリアータンパク質シンターゼ（ACPS）の作用により、ACP上の保存されているセリン残基に翻訳後に連結される。いくつかの態様において、アシル-ACPは完全飽和アシル-ACPの合成における中間体である。他の態様において、アシル-ACPは不飽和アシル-ACPの合成における中間体である。いくつかの態様において、炭素鎖は約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26個の炭素を有すると考えられる。これらのアシル-ACPはそれぞれ、それらを脂肪酸誘導体に変換する酵素の基質である。

【0040】

本明細書で用いる場合、「脂肪酸またはその誘導体」という用語は、「脂肪酸」または「脂肪酸誘導体」を意味する。「脂肪酸」という用語は、式RCOOHを有するカルボン酸を意味する。Rは脂肪族基、好ましくはアルキル基を表す。Rは約4～約22個の炭素原子を含むことができる。脂肪酸は飽和、一不飽和または多不飽和であってよい。好ましい態様において、脂肪酸は脂肪酸生合成経路から作られる。「脂肪酸誘導体」という用語は、産生宿主生物の脂肪酸生合成経路から部分的に作られた生成物を意味する。「脂肪酸誘導体」には、アシル-ACPまたはアシル-ACP誘導体から部分的に作られた生成物も含まれる。例示的な脂肪酸誘導体には、例えば、アシル-CoA、脂肪アルデヒド、短鎖および長鎖アルコール、炭化水素およびエステル（例えば、蠟、脂肪酸エステルまたは脂肪エステル）が含まれる。

【0041】

本明細書で用いる場合、「脂肪酸生合成経路」という用語は、脂肪酸誘導体、例えば、脂肪アルコールを生成する生合成経路を意味する。脂肪酸生合成経路は、脂肪酸を生成するように遺伝子操作することのできる脂肪酸シンターゼを含み、いくつかの態様においては、所望の特性を有する脂肪アルコールなどの脂肪酸誘導体を生成するためのさらなる酵素とともに発現させることができる。

【0042】

本明細書で用いる場合、「脂肪アルデヒド」とは、カルボニル基（C=O）を特徴とする式RCHOを有するアルデヒドを意味する。いくつかの態様において、脂肪アルデヒドは、脂肪アルコールから作られる任意のアルデヒドである。ある態様において、R基は、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、または少なくとも19炭素長である。代替的または追加的に、R基は、20もしくはそれ未満、19もしくはそれ未満、18もしくはそれ未満、17もしくはそ

10

20

30

40

50

れ未満、16もしくはそれ未満、15もしくはそれ未満、14もしくはそれ未満、13もしくはそれ未満、12もしくはそれ未満、11もしくはそれ未満、10もしくはそれ未満、9もしくはそれ未満、8もしくはそれ未満、7もしくはそれ未満、または6もしくはそれ未満の炭素長である。したがって、R基は、上記の終点の任意の2つを境界とするR基を有しうる。例えば、R基は、6～16炭素長、10～14炭素長、または12～18炭素長でありうる。いくつかの態様において、脂肪アルデヒドはC₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、C₂₀、C₂₁、C₂₂、C₂₃、C₂₄、C₂₅、またはC₂₆脂肪アルデヒドである。ある態様において、脂肪アルデヒドは、C₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、またはC₁₈脂肪アルデヒドである。

【0043】

本明細書で用いる場合、「脂肪アルコール」は、式ROHを有するアルコールを意味する。いくつかの態様において、R基は、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、または少なくとも19炭素長である。代替的または追加的に、R基は、20もしくはそれ未満、19もしくはそれ未満、18もしくはそれ未満、17もしくはそれ未満、16もしくはそれ未満、15もしくはそれ未満、14もしくはそれ未満、13もしくはそれ未満、12もしくはそれ未満、11もしくはそれ未満、10もしくはそれ未満、9もしくはそれ未満、8もしくはそれ未満、7もしくはそれ未満、または6もしくはそれ未満の炭素長である。したがって、R基は、上記の終点の任意の2つを境界とするR基を有しうる。例えば、R基は、6～16炭素長、10～14炭素長、または12～18炭素長でありうる。いくつかの態様において、脂肪アルコールは、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、C₂₀、C₂₁、C₂₂、C₂₃、C₂₄、C₂₅、またはC₂₆脂肪アルコールである。ある態様において、脂肪アルコールは、C₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、またはC₁₈脂肪アルコールである。

【0044】

本明細書で称する「脂肪アルコール組成物」は、組換え宿主細胞によって産生され、典型的には脂肪アルコールの混合物を含む。場合によっては、混合物は、複数の種類の生成物（例えば、脂肪アルコールおよび脂肪酸）を含む。他の場合には、脂肪酸誘導体組成物は、例えば、さまざまな鎖長と飽和特性または分枝特性とを有する脂肪アルコールの混合物を含みうる。さらに別の場合には、脂肪アルコール組成物は、複数の種類の生成物と、さまざまな鎖長と飽和特性または分枝特性とを有する生成物との両方の混合物を含む。

【0045】

脂肪アルデヒドを産生するように遺伝子操作された宿主細胞は、典型的には、脂肪アルデヒドのいくつかを脂肪アルコールに変換する。脂肪アルコールを産生する宿主細胞が、エステルシンターゼをコードするポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作されると、蠟エステルが産生される。1つの態様において、脂肪アルコールは脂肪酸生合成経路から作られる。一例として、アシル-ACPは、チオエステラーゼ（例えば、大腸菌TesA）の作用を介して脂肪酸に変換することができ、それはカルボン酸レダクターゼ（例えば、大腸菌CarB）の作用を介して脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコールに変換される。脂肪アルデヒドの脂肪アルコールへの変換は、例えば、脂肪アルコール生合成ポリペプチドの作用を介してさらに促進させることができる。いくつかの態様においては、脂肪アルコール生合成ポリペプチドをコードする遺伝子を、宿主細胞において発現または過剰発現させる。ある態様において、脂肪アルコール生合成ポリペプチドは、アルデヒドレダクターゼ活性またはアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する。本開示に従って有用なアルコールデヒドロゲナーゼポリペプチドの例には、アシネトバクター属種M-1（*Acinetobacter* sp. M-1）のAlrA（SEQ ID NO：3）またはAlrAホモログ、例えばAlrAadp1（SEQ ID NO：4）など、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YjgB（AAC77226）（SEQ ID NO：5）、DkgA（NP_417485）、DkgB（NP_417473）、YdjL（AAC74846）、YdjJ（NP_416288）、A dhP（NP_415995）、YhdH（NP_417719）、YahK（NP_414859）、YphC（AAC75598）、YqhD（446856）およびYbbO [AAC73595.1] などが非限定的に含まれる。そのほかの例は、国際特

10

20

30

40

50

許出願公開WO2007/136762、WO2008/119082およびWO2010/062480に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。ある態様において、脂肪アルコール生合成ポリペプチドはアルデヒドレダクターゼ活性またはアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する (EC 1.1.1.1)。

【0046】

本明細書で用いる場合、「アルコールデヒドロゲナーゼ」という用語は、脂肪アルデヒドのアルコール (例えば、脂肪アルコール) への変換を触媒しうるポリペプチドのことを指す。当業者は、ある種のアルコールデヒドロゲナーゼは他の反応も触媒しうることを理解していると考えられ、これらの非特異的アルコールデヒドロゲナーゼも「アルコールデヒドロゲナーゼ」の範囲に含まれる。脂肪酸、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールのR基は直鎖であっても分枝鎖であってもよい。分枝鎖は複数の分枝点を有してもよく、環状分枝を含んでもよい。いくつかの態様において、分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールは、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、C₂₀、C₂₁、C₂₂、C₂₃、C₂₄、C₂₅、またはC₂₆分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールである。特定の態様において、分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールは、C₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇またはC₁₈分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールである。ある態様において、分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールのヒドロキシル基は、第一級 (C₁) 位置にある。ある態様において、分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールは、イソ-脂肪酸、イソ-脂肪アルデヒドもしくはイソ-脂肪アルコール、またはアンテイソ (antesio) -脂肪酸、アンテイソ-脂肪アルデヒドまたはアンテイソ-脂肪アルコールである。例示的な態様において、分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールは、イソ-C_{7:0}、イソ-C_{8:0}、イソ-C_{9:0}、イソ-C_{10:0}、イソ-C_{11:0}、イソ-C_{12:0}、イソ-C_{13:0}、イソ-C_{14:0}、イソ-C_{15:0}、イソ-C_{16:0}、イソ-C_{17:0}、イソ-C_{18:0}、イソ-C_{19:0}、アンテイソ-C_{7:0}、アンテイソ-C_{8:0}、アンテイソ-C_{9:0}、アンテイソ-C_{10:0}、アンテイソ-C_{11:0}、アンテイソ-C_{12:0}、アンテイソ-C_{13:0}、アンテイソ-C_{14:0}、アンテイソ-C_{15:0}、アンテイソ-C_{16:0}、アンテイソ-C_{17:0}、アンテイソ-C_{18:0}、アンテイソ-C_{19:0}分枝脂肪酸、分枝脂肪アルデヒドまたは分枝脂肪アルコールから選択される。分枝もしくは非分枝脂肪酸、分枝もしくは非分枝脂肪アルデヒド、または分枝もしくは非分枝脂肪アルコールのR基は、飽和性でも不飽和性でもよい。不飽和性である場合には、R基は1つまたは複数の不飽和点を有しうる。いくつかの態様において、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールは、一不飽和脂肪酸、一不飽和脂肪アルデヒドまたは一不飽和脂肪アルコールである。ある態様において、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールは、C_{6:1}、C_{7:1}、C_{8:1}、C_{9:1}、C_{10:1}、C_{11:1}、C_{12:1}、C_{13:1}、C_{14:1}、C_{15:1}、C_{16:1}、C_{17:1}、C_{18:1}、C_{19:1}、C_{20:1}、C_{21:1}、C_{22:1}、C_{23:1}、C_{24:1}、C_{25:1}、またはC_{26:1}不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールである。ある好ましい態様において、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールは、C_{10:1}、C_{12:1}、C_{14:1}、C_{16:1}またはC_{18:1}である。さらに他の態様において、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールは、-7位置で不飽和である。ある態様において、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪アルデヒドまたは不飽和脂肪アルコールは、シス二重結合を含む。

【0047】

本明細書で用いる場合、組換えまたは遺伝子操作された「宿主細胞」とは、例えば、脂肪アルコールを産生するように改変された宿主細胞のことである。いくつかの態様において、組換え宿主細胞は1つまたは複数のポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは脂肪アルデヒドおよび/または脂肪アルコール生合成酵素活性を有するポリペプチドをコードし、ここで該組換え宿主細胞は、炭素源の存在下で、ポリヌクレオチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、脂肪アルコール組成物を産生する。

【0048】

本明細書で用いる場合、「クローン」という用語は、典型的には、単一の共通の祖先の

子孫でありかつ該祖先と本質的に遺伝的に同一である、細胞または細胞群、例えば、単一の細菌細胞から生じたクローン化された細菌コロニーの細菌のことを指す。

【0049】

本明細書で用いる場合、「培養物」という用語は、典型的には、生細胞を含む液体培地のことを指す。1つの態様において、培養物は、制御された条件下で所定の培地中で再生する細胞、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させた組換え宿主細胞の培養物が含まれる。「培養する」または「培養」は、微生物細胞の集団を、液体培地または固体培地中で、適した条件下で増殖させることを指す。特定の態様において、培養するとは、基質の最終産物への発酵性生物変換のことを指す。培養培地は周知であり、そのような培地の個々の構成成分は、例えば、Difco（商標）およびBBL（商標）の商標として、販売元から入手可能である。1つの非限定的な例では、水性栄養培地は、窒素、塩および炭素の複合的な供給源を含む「富栄養培地」、例えば、そのような培地当たり10 g/Lのペプトンおよび10g/Lの酵母エキスを含有するYP培地などである。宿主細胞は、例えば、それぞれが参照により本明細書に明示的に組み入れられる米国特許第5,000,000号；第5,028,539号；第5,424,202号；第5,482,846号；第5,602,030号およびWO2010127318号に記載に記載された方法に従って、炭素を効率的に同化し、セルロース系材料を炭素源として用いるようにさらに遺伝子操作することができる。加えて、スクロースを炭素源として用いるようなインペルターゼを発現するように宿主細胞を遺伝子操作することもできる。

【0050】

本明細書で用いる場合、「前記異種ヌクレオチド配列を発現するのに有効な条件下」という用語は、宿主細胞が所望の脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールを産生することを可能にする任意の条件を意味する。適した条件には、例えば、発酵条件が含まれる。

【0051】

本明細書で用いる場合、組換え宿主細胞におけるタンパク質、例えば酵素の「改変された」または「変更されたレベルの」活性とは、親または天然宿主細胞を基準として測定した、活性における1つまたは複数の特性の差異のことを指す。典型的には、活性の差異は、改変された活性を有する組換え宿主細胞と、対応する野生型宿主細胞との間で測定される（例えば、野生型宿主細胞に対する組換え宿主細胞の培養物の比較）。活性の改変は、例えば、組換え宿主細胞によって発現されるタンパク質の量の改変（例えば、タンパク質をコードするDNA配列のコピー数の増加もしくは減少、タンパク質をコードするmRNA転写物の数の増加もしくは減少、および/またはmRNAからのタンパク質のタンパク質翻訳の量の増加もしくは減少の結果として）；タンパク質の構造の変化（例えば、一次構造に対する変化、例えば、基質特異性の変化、観察される速度論的パラメーターの変化をもたらすタンパク質のコード配列に対する変化など）；および、タンパク質安定性の変化（例えば、タンパク質の分解の増加もしくは減少）の結果でありうる。いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に記載のいずれかのポリペプチドの突然変異体または変異体である。場合によっては、本明細書に記載のポリペプチドのコード配列は、特定の宿主細胞における発現のためにコドンが最適化される。例えば、大腸菌における発現のために、1つまたは複数のコドンを、例えば、Grosjean et al., Gene 18:199-209 (1982)に記載されたように最適化することができる。

【0052】

「調節配列」という用語は、本明細書で用いる場合、典型的には、タンパク質をコードするDNA配列と機能的に連結された、該タンパク質の発現を最終的に制御するDNAの塩基の配列のことを指す。調節配列の例には、RNAプロモーター配列、転写因子結合配列、転写終結配列、転写のモジュレーター（エンハンサーエレメントなど）、RNA安定性に影響を及ぼすヌクレオチド配列、および翻訳調節配列（例えば、リボソーム結合部位（例えば、原核生物におけるShine-Dalgarno配列、または真核生物におけるKozak配列）、開始コドン、終止コドンなど）が非限定的に含まれる。

【0053】

本明細書で用いる場合、「前記ヌクレオチド配列の発現が野生型ヌクレオチド配列に比

10

20

30

40

50

して改変されている」という語句は、内因性ヌクレオチド配列の発現および／もしくは活性、または、異種もしくは非天然ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現および／もしくは活性のレベルの上昇または低下を意味する。本明細書で用いる場合、「過剰発現する」という用語は、細胞においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、同じ条件下で対応する野生型細胞において通常発現されるよりも高い濃度で発現されること、または発現されるようにすることを意味する。

【 0 0 5 4 】

「変更されたレベルの発現」および「改変されたレベルの発現」という用語は互換的に用いられ、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは炭化水素が、遺伝子操作された宿主細胞において、同じ条件下での対応する野生型細胞におけるその濃度と比較して異なる濃度で存在することを意味する。

10

【 0 0 5 5 】

本明細書で用いる場合、「力価」という用語は、宿主細胞培養物の単位容積当たりで産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの数量のことを指す。本明細書に記載の組成物および方法の任意の局面において、脂肪アルコールは、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350mg/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、または前記の値の任意の2つを境界とする範囲の力価で産生される。他の態様において、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールは、100g/Lを上回る、200g/Lを上回る、300g/Lを上回る、またはそれ以上、例えば500g/L、700g/L、1000g/L、1200g/L、1500g/Lまたは2000g/Lなどの力価で産生される。本開示の方法による組換え宿主細胞によって産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの好ましい力価は、5g/L～200g/L、10g/L～150g/L、20g/L～120g/L、および30g/L～100g/Lである。

20

30

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いる場合、「宿主細胞によって産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの収量」という用語は、投入炭素源が宿主細胞において生成物（すなわち、脂肪アルコールまたは脂肪アルデヒド）に変換される効率のことを指す。本開示の方法により脂肪アルコールおよび／または脂肪アルデヒドを産生するように遺伝子操作された宿主細胞は、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%、少なくとも20%、少なくとも21%、少なくとも22%、少なくとも23%、少なくとも24%、少なくとも25%、少なくとも26%、少なくとも27%、少なくとも28%、少なくとも29%、または少なくとも30%、または前記の値の任意の2つを境界とする範囲の収量を有する。他の態様において、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールは、30%を上回る、40%を上回る、50%を上回る、60%を上回る、70%を上回る、80%を上回る、90%を上回る、またはそれ以上の収量で産生される。代替的または追加的に、収量は、約30%もしくはそれ未満、約27%もしくはそれ未満、約25%もしくはそれ未満、または約22%もしくはそれ未満である。したがって、収量は上記の終点の任意の2つを境界とすることができる。例えば、本開示の方法による組換え宿主細胞によって産生される

40

50

脂肪アルコールまたは脂肪アルデヒドの収量は、5%～15%、10%～25%、10%～22%、15%～27%、18%～22%、20%～28%、または20%～30%でありうる。本開示の方法による組換え宿主細胞によって産生される脂肪アルコールの好ましい収量は、10%～30%である。

【0057】

本明細書で用いる場合、「産生能」という用語は、宿主細胞培養物の単位容積当たり・単位時間あたりに産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの数量のことを指す。本明細書に記載の組成物および方法の任意の局面において、組換え宿主細胞によって産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの産生能は、少なくとも100mg/L/時、少なくとも200mg/L/時 (hour₀)、少なくとも300mg/L/時、少なくとも400mg/L/時、少なくとも500mg/L/時、少なくとも600mg/L/時、少なくとも700mg/L/時、少なくとも800mg/L/時、少なくとも900mg/L/時、少なくとも1000mg/L/時、少なくとも1100mg/L/時、少なくとも1200mg/L/時、少なくとも1300mg/L/時、少なくとも1400mg/L/時、少なくとも1500mg/L/時、少なくとも1600mg/L/時、少なくとも1700mg/L/時、少なくとも1800mg/L/時、少なくとも1900mg/L/時、少なくとも2000mg/L/時、少なくとも2100mg/L/時、少なくとも2200mg/L/時、少なくとも2300mg/L/時、少なくとも2400mg/L/時または少なくとも2500mg/L/時である。代替的または追加的に、産生能は、2500mg/L/時もしくはそれ未満、2000mg/L/OD₆₀₀もしくはそれ未満、1500mg/L/OD₆₀₀もしくはそれ未満、1200mg/L/時もしくはそれ未満、1000mg/L/時もしくはそれ未満、800mg/L/時もしくはそれ未満、または600mg/L/時もしくはそれ未満である。したがって、産生能は上記の終点の任意の2つを境界とすることができる。例えば、産生能は3～30mg/L/時 (hour₀)、6～20mg/L/時、または15～30mg/L/時である。本開示の方法による組換え宿主細胞によって産生される脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールの好ましい産生能は、500mg/L/時～2500mg/L/時、または700mg/L/時～2000mg/L/時から選択される。

【0058】

「総脂肪種」および「総脂肪酸生成物」という用語は、国際特許出願公開WO2008/119082に記載されたようなGC-FIDによって評価される、試料中に存在する脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、遊離脂肪酸および脂肪エステルの総量を指して、本明細書において互換的に用いる。試料は、状況に応じて、これらの化合物の1つ、2つ、3つまたは4つを含むうる。

【0059】

本明細書で用いる場合、「グルコース利用率」という用語は、グラム数/リットル/時 (g/L/hr) として報告される、培養物によって単位時間あたりに用いられるグルコースの量のことを指す。

【0060】

本明細書で用いる場合、「炭素源」という用語は、原核細胞または単純な真核細胞の増殖のための炭素の供給源として用いるのに適した基質または化合物のことを指す。炭素源は、重合体、炭水化物、酸、アルコール、アルデヒド、ケトン、アミノ酸、ペプチドおよび気体 (例えば、COおよびCO₂) を非限定的に含む、さまざまな形態をとりうる。例示的な炭素源には、単糖類、例えばグルコース、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；オリゴ糖類、例えばフルクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖など；多糖類、例えばデンプン、セルロース、ペクチンおよびキシランなど；二糖類、例えばスクロース、マルトース、セロビオースおよびツラノースなど；セルロース系材料および異形物、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など；飽和または不飽和脂肪酸、コハク酸塩、乳酸塩および酢酸塩；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など、またはそれらの混合物が非限定的に含まれる。また、炭素源が、光合成の生成物、例えばグルコースなどであってもよい。ある好ましい態様において、炭素源はバイオマスである。他の好ましい態様において、炭素源はグルコースである。他の好ましい態様において、炭素源はスクロースである。

【0061】

本明細書で用いる場合、「バイオマス」という用語は、炭素源の由来となる任意の生体物質のことを指す。いくつかの態様において、バイオマスは処理されて、生物変換に適した炭素源となる。他の態様において、バイオマスは炭素源にするためのさらなる処理を必要としない。炭素源は、バイオ燃料に変換することができる。例示的なバイオマス源には、植物体または草木、例えばトウモロコシ、サトウキビまたはアメリカクサキビなどがある。もう1つの例示的なバイオマス源は、代謝廃棄産物、例えば動物性物質（例えば、牛糞肥料）などである。さらに例示的なバイオマス源には、藻類および他の海洋植物が含まれる。バイオマスにはまた、発酵廃棄物、エンシレージ、わら、木材、廃水、ゴミ、セルロース系都市廃棄物、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も含まれる。「バイオマス」という用語はまた、炭水化物（例えば、単糖類、二糖類または多糖類）などの炭素源のことも指すことができる。

10

【0062】

本明細書で用いる場合、生成物（脂肪酸およびその誘導体など）に関する「単離された」という用語は、細胞構成成分、細胞培養培地、または化学前駆体もしくは合成前駆体から単離された生成物のことを指す。本明細書に記載の方法によって産生される脂肪酸およびその誘導体は、発酵プロセス中、さらには細胞質中で比較的不混和性でありうる。このため、脂肪酸およびその誘導体は、細胞内または細胞外のいずれかで有機相に収集することができる。

【0063】

20

本明細書で用いる場合、「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、分子のその環境からの除去または単離を意味する。「実質的に精製された」分子は、それらに付随する他の構成成分を少なくとも約60%含まない（例えば、少なくとも約70%含まない、少なくとも約75%含まない、少なくとも約85%含まない、少なくとも約90%含まない、少なくとも約95%含まない、少なくとも約97%含まない、少なくとも約99%含まない）。本明細書で用いる場合、これらの用語はまた、試料からの混入物の除去のことも指す。例えば、混入物の除去は、試料中の脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコール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、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールが組換え宿主細胞において産生される場合、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールは、組換え宿主細胞タンパク質の除去によって精製することができる。精製後に、試料中の脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールのパーセンテージは増加する。「精製する」、「精製された」、および「精製」という用語は、完全に純粋であることを必要としない相対的な用語である。したがって、例えば、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールが組換え宿主細胞において産生される場合、精製された脂肪アルデヒドまたは精製された脂肪アルコールは、他の細胞構成成分（例えば、核酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物、または他の炭化水素）から実質的に分離された脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールである。

30

【0064】

菌株改良

脂肪アルコールの力価、収量および/または産生能に関する非常に高い目標を達成するために、産生宿主細胞にいくつかの改変を加えた。FadRは、脂肪酸分解経路および脂肪酸生合成経路に関与する重要な調節因子である（Cronan et al., Mol Microbiol, 29(4): 937-943 (1998)）。大腸菌のACS酵素FadDおよび脂肪酸輸送タンパク質FadLは、脂肪酸取り込み系の必須の構成成分である。FadLは細菌細胞内への脂肪酸の輸送を媒介し、FadDはアシル-CoAエステルの形成を媒介する。他の炭素源が利用できない場合には、外来性の脂肪酸が細菌によって取り込まれてアシル-CoAエステルに変換され、これは、転写因子FadRと結合して、脂肪酸の輸送（FadL）、活性化（FadD）および β -酸化（FadA、FadB、FadEおよびFadH）を担うタンパク質をコードするfad遺伝子の発現を抑制することができる。代替的な炭素源が利用できる場合には、細菌は脂肪酸をアシル-ACPとして合成し、これは、リン脂質合成には用いられるが β -酸化の基質ではない。したがって、アシル-CoAおよび

40

50

アシル-ACPはいずれも、異なる最終産物をもたらさしめる、脂肪酸の独立した供給源である (Caviglia et al., J Biol. Chem., 279(12): 1163-1169 (2004))。米国仮出願第61/470,989号は、対応する野生型宿主細胞におけるFadRポリペプチドの発現レベルと比較してFadRポリペプチドの発現レベルが変更されるように遺伝子操作された宿主細胞における、脂肪酸誘導体の改良された産生方法を記載している。

【0065】

大腸菌などの宿主細胞における脂肪酸生合成の律速因子に関して、当技術分野では見解が対立している。脂肪酸生合成を経由する流れを増大させる1つのアプローチは、経路内のさまざまな酵素を遺伝子操作することである (図1および2)。アセチル-CoAカルボキシラーゼ (acc) 複合体 (図3) および脂肪酸生合成 (fab) 経路を介したアセチル-CoAからのアシル-ACPの供給は、脂肪アルコールの産生の速度を制限する可能性がある。実施例2に詳述している1つの例示的なアプローチでは、コリネバクテリウム・グルタミクムaccABCD (±birA) の過剰発現の影響により、そのような遺伝子改変が大腸菌におけるアセチル-coAおよびマロニル-CoAの増加を導きうることが実証された。脂肪酸生合成を経由する流れの速度が低いことについて考えられる1つの理由は、前駆体、すなわちアセチル-CoA、特にマロニル-CoA、および脂肪酸生合成のための主な前駆体の供給が限られていることである。実施例3では、マロニル-CoAのアシル-ACPへの変換のための生合成経路における酵素をコードするfabオペロンの構築、および大腸菌宿主細胞の染色体への組み込みについて述べている。実施例4に詳述しているさらにもう1つのアプローチでは、大腸菌宿主細胞におけるrph遺伝子およびilvG遺伝子の突然変異により、より多くの遊離脂肪酸 (FFA) 産生がもたらされ、それがひいてはより多くの脂肪アルコール産生につながったことが示された。さらなるもう1つのアプローチでは、力価または収量を増大させる有益な突然変異を見いだすために、トランスポゾン突然変異誘発およびハイスループットスクリーニングを行った。実施例5では、yijP遺伝子におけるトランスポゾン挿入により、振盪フラスコ発酵および流加発酵における脂肪アルコール収量をどの程度改善できるかを述べている。

【0066】

カルボン酸レダクターゼ (CAR)

アシル-ACPの遊離脂肪酸 (FFA) への変換を触媒するチオエステラーゼ、および遊離脂肪酸を脂肪アルデヒドに変換するカルボン酸レダクターゼ (CAR) を発現させることによって、脂肪アルコールを産生するように組換え宿主細胞を遺伝子操作した。宿主細胞 (例えば、大腸菌) に存在する天然 (内因性) アルデヒドレダクターゼは、脂肪アルデヒドを脂肪アルコールに変換することができる。例示的なチオエステラーゼは、例えば米国特許公開第20100154293号に記載されており、これは参照により本明細書に明示的に組み入れられる。CarBは、例示的なカルボン酸レダクターゼであり、脂肪アルコール生成経路における重要な酵素の1つである。WO2010/062480号は、NRRL 5646 CARアミノ酸配列 (GenpeptアクセッションAAR91681) (SEQ ID NO: 6) をクエリー配列として用いるBLAST検索、および、およそ20個の相同配列の同定におけるその使用について記載している。

【0067】

「カルボン酸レダクターゼ」、「CAR」、および「脂肪アルデヒド生合成ポリペプチド」という用語は、本明細書において互換的に用いられる。本開示の実施に当たっては、カルボン酸レダクターゼポリペプチドをコードする遺伝子を、宿主細胞において発現または過剰発現させる。いくつかの態様において、CarBポリペプチドはSEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を有する。他の態様において、CarBポリペプチドはSEQ ID NO: 7の変異体または突然変異体である。ある態様において、CarBポリペプチドは、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、細菌細胞、または他の任意の生物に由来する。いくつかの態様において、細菌細胞は、スメグマ菌 (Mycobacterium smegmatis)、マイコバクテリウム・アブセサス (Mycobacterium abscessus)、マイコバクテリウム・アビウム (Mycobacterium avium)、マイコバクテリウム・ボビス (Mycobacterium bovis)、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、癩菌 (Mycobacterium leprae)、マイコバクテリウム・マリヌム (Mycobacterium marinum) およびマイコバクテリウム・ウルセランス

(*Mycobacterium ulcerans*) からなる群より選択されるマイコバクテリウムである。他の態様において、細菌細胞は、ノカルジア (*Nocardia*) 属種、例えば、ノカルジア (*Nocardia*) NRRL 5646、ノカルジア・ファルシニカ (*Nocardia farcinica*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、サリニスポラ・アレニコラ (*Salinispora arenicola*) またはクラビバクター・ミシガネンシス (*Clavibacter michiganensis*) に由来する。他の態様において、CarBポリペプチドは、SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一なアミノ酸配列を有する、CarBの相同体である。SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するCarBポリペプチドの実体は特に限定されず、当業者は本明細書に記載の方法を用いて、大腸菌MG1655由来CarBの相同体を容易に同定し、その機能を決定することができる。他の態様において、CarBポリペプチドは、SEQ ID NO: 7のアミノ酸番号3、12、20、28、46、74、103、191、288、473、827、926、927、930または1128に突然変異を含む。例示的な突然変異は表10に詳述されている。ポリペプチドの好ましい断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能（例えば、酵素活性）の一部またはすべてを保っている。いくつかの態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能の少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約98%またはそれ以上を保っている。他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能の約100%を保っている。生物活性に影響を及ぼさずにどのアミノ酸残基を置換し、挿入し、または欠失させることができるかを判定する上での手引きは、当技術分野において周知のコンピュータプログラム、例えば、LASERGENE（商標）ソフトウェア（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて見いだすことができる。

【0068】

さらに他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して増大した生物学的機能を示す。例えば、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して、酵素活性の点で少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%または少なくとも約90%の改善を呈しうる。他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して、酵素活性の点で少なくとも約100%（例えば、少なくとも約200%または少なくとも約500%）の改善を呈する。本明細書に記載のポリペプチドが、ポリペプチドの機能に実質的な影響を及ぼさないさらなる保存的または非必須のアミノ酸置換を有してもよいことは理解されよう。ある特定の置換が許容される（すなわち、DNA結合または酵素活性といった所望の生物学的機能に有害な影響を及ぼさない）か否かは、Bowie et al. (Science, 247: 1306-1310 (1990)) に記載されたようにして判定することができる。

【0069】

本開示の方法および変異型酵素の結果として、CarBポリペプチドの改変された発現レベルを有する遺伝子操作された宿主細胞によって産生される脂肪酸またはその誘導体の力価、収量および/または産生能のうち1つまたは複数が、対応する野生型宿主細胞のものに比して増加する。C12およびC14脂肪酸の脂肪アルコールへの最大限の変換を可能にするためには、CarBが十分な活性で発現されなければならない。改良された組換え宿主細胞は、例えば、大腸菌染色体から発現されるCAR酵素を有すると考えられる。実施例6に示されているように、該染色体からCarB酵素を発現する細胞は、元のCarBに比してカルボン酸レダクターゼ活性が高く、より多くのC12およびC14脂肪酸を脂肪アルコールに変換することができる。CarBは大きな遺伝子（3.5kb）であり、プラスミドのサイズもかなり大きくなることから、菌株開発の際に新たな遺伝子を調べるためにpCLプラスミドを用いることは困難であった。CarBの活性を高めるためのアプローチには、その溶解性、安定性、発現および/または機能性を高めることが含まれる。1つの例示的なアプローチでは、CarBのN末端にヒスチジン6個およびトロンピン切断部位を含有する融合タンパク質を作製する。この

酵素は、N末端にさらに60ヌクレオチドがある点でCarBとは異なり、CarB60と名付けられている。CarBまたはCarB60をpTRCプロモーターの制御下で大腸菌染色体から発現させると、CarB60を含有する細胞では総細胞カルボン酸レダクターゼ活性が増大し、より多くのC12およびC14遊離脂肪酸（FFA）が脂肪アルコールに変換される。当業者は、これが、実施例6に例示されているように（上記）、C12およびC14遊離脂肪酸（FFA）の脂肪アルコールへのより多くの変換を達成することを目的とする分子工学の一例であることを理解するであろう。類似のアプローチも本明細書の範囲に含まれる（実施例7参照）。

【0070】

ホスホパンテイトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）（EC 2.7.8.7）は、CoAから基質への4'-ホスホパンテイトインの転移を触媒する。ノカルジアCar、CarBおよびそのいくつかの相同体は、4'-ホスホパンテイトイン（PPT）の付着部位と推定されるものを含んでいる（He et al., Appl. Environ. Microbiol., 70(3): 1874-1881 (2004)）。本開示のいくつかの態様においては、PPTアーゼを、遺伝子操作された宿主細胞において発現または過剰発現させる。ある態様においては、PPTアーゼは大腸菌MG1655由来のEntD（SEQ ID NO: 8）である。いくつかの態様においては、チオエステラーゼおよびカルボン酸レダクターゼを、遺伝子操作された宿主細胞において発現または過剰発現させる。ある態様においては、チオエステラーゼはtesAであり、カルボン酸レダクターゼはcarBである。他の態様においては、チオエステラーゼ、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を、遺伝子操作された宿主細胞において発現または過剰発現させる。ある態様においては、チオエステラーゼはtesAであり、カルボン酸レダクターゼはcarBであり、アルコールデヒドロゲナーゼは、アシネトバクター・バイリイ（*Acinetobacter baylyi*）ADP1由来のalrAadp1（GenPeptアクセッション番号CAG70248.1）（SEQ ID NO: 4）である。さらなる他の態様においては、チオエステラーゼ、カルボン酸レダクターゼ、PPTアーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを、遺伝子操作された宿主細胞において発現または過剰発現させる。ある態様においては、チオエステラーゼはtesAであり、カルボン酸レダクターゼはcarBであり、PPTアーゼはentDであり、アルコールデヒドロゲナーゼはalrAadp1である。さらに別の態様においては、チオエステラーゼ、CAR、PPTアーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼのうち1つまたは複数を発現する改変された宿主細胞は、1つまたは複数の菌株改良も有する。例示的な菌株改良には、アセチル-CoAカルボキシラーゼポリペプチドの発現もしくは過剰発現、FadRポリペプチドの過剰発現、異種iFABオペロンの発現もしくは過剰発現、またはyijP遺伝子もしくは別の遺伝子へのトランスポゾン挿入、または類似の類似のアプローチが非限定的に含まれる。本開示はまた、本明細書に記載の方法のいずれかによって産生された脂肪アルコール組成物も提供する。本明細書に記載の方法のいずれかによって産生された脂肪アルコール組成物は、他の化合物（例えば、ポリマー、界面活性剤、プラスチック、繊維、溶媒、接着剤など）の製造のための出発材料、またはパーソナルケア（personal care）用添加物として、直接用いることができる。これらの化合物を、他の生成物を作るための以後の反応、例えば、水素添加、触媒分解（例えば、水素添加、熱分解またはその両方を介するもの）のための原料として用いることもできる。

【0071】

突然変異体または変異体

いくつかの態様においては、組換え宿主細胞において発現されるポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかの突然変異体または変異体である。「突然変異型」および「変異体」という用語は、本明細書で用いる場合、野生型ポリペプチドとは少なくとも1つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドのことを指す。例えば、突然変異体は、以下の保存的アミノ酸置換のうち1つまたは複数を含みうる：脂肪族アミノ酸、例えばアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンなどの、別の脂肪族アミノ酸による置き換え；セリンのトレオニンによる置き換え；トレオニンのセリンによる置き換え；酸性残基、例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸などの、別の酸性残基による置き換え；アミド基を保有する残基、例えばアスパラギンおよびグルタミンなどの、アミド基を保有する別の残基による置き換え；塩基性残基、例えばリジンおよびアルギニンなど

の、別の塩基性残基との交換；ならびに、芳香族残基、例えばフェニルアラニンおよびチロシンなどの、別の芳香族残基による置き換え。いくつかの態様において、突然変異型ポリペプチドは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100個、またはそれ以上のアミノ酸置換、付加、挿入または欠失を有する。ポリペプチドの好ましい断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能（例えば、酵素活性）の一部またはすべてを保っている。いくつかの態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能の少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または少なくとも約98%、またはそれ以上を保っている。他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドの生物学的機能の約100%を保っている。生物活性に影響を及ぼさずにどのアミノ酸残基を置換し、挿入し、または欠失させることができるかを判定する上での手引きは、当技術分野において周知のコンピュータプログラム、例えば、LASERGENE（商標）ソフトウェア（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて見いだすことができる。

【0072】

さらに他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して増大した生物学的機能を示す。例えば、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して、酵素活性の点で少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%の改善を呈しうる。他の態様において、断片または突然変異体は、対応する野生型ポリペプチドと比較して、酵素活性の点で少なくとも100%（例えば、少なくとも200%または少なくとも500%）の改善を呈する。本明細書に記載のポリペプチドが、ポリペプチドの機能に実質的な影響を及ぼさないさらなる保存的または非必須のアミノ酸置換を有してもよいことは理解されよう。ある特定の置換が許容される（すなわち、カルボン酸レダクターゼ活性といった所望の生物学的機能に有害な影響を及ぼさない）か否かは、Bowie et al. (Science, 247: 1306-1310 (1990)) に記載されたようにして判定することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられたもののことである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。変異体は天然に存在してもよく、またはインビトロで作製してもよい。特に、そのような変異体は、部位指定突然変異誘発、ランダム化学的突然変異誘発、エキソヌクレアーゼIII削除手順、または標準的なクローニング手法といった遺伝子工学の手法を用いて作製することができる。または、そのような変異体、断片、類似体または誘導体を、化学的な合成または修飾の手順を用いて作製することもできる。

【0073】

変異体の作製方法は当技術分野において周知である。これらには、産業用または研究室での用途における価値を高める特性を有するポリペプチドをコードする核酸を作製するために、天然の分離物から得られた核酸配列を改変する手順が含まれる。そのような手順では、天然の分離物から得られた配列とは1つまたは複数のヌクレオチドが異なる多数の変異体配列を作製し、特徴づけを行う。典型的には、これらのヌクレオチドの違いによって、天然の分離物の核酸によってコードされるポリペプチドとのアミノ酸変化がもたらされる。例えば、変異体は、ランダム突然変異誘発および部位指定突然変異誘発を用いることによって調製することができる。ランダム突然変異誘発および部位指定突然変異誘発は、例えば、Arnold, Ciirr. Opin. Biotech, 4: 450-455 (1993)に記載されている。ランダム突然変異誘発は、エラープロードPCR（例えば、Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)；およびCaldwell et al., PCR Methods Applic, 2: 28-33 (1992)を参照）。エラ

10

20

30

40

50

ーブローンPCRでは、PCR産物の全長にわたって高い点突然変異率が得られるように、DNAポリメラーゼのコピー忠実度 (copying fidelity) が低くなる条件下でPCRを行う。手短に述べると、そのような手法では、突然変異させようとする核酸 (例えば、カルボン酸レダクターゼ酵素をコードするポリヌクレオチド配列) を、PCRプライマー、反応緩衝液、MgCl₂、MnCl₂、Taqポリメラーゼ、およびPCR産物の全長にわたって高い点突然変異率を得るのに適した濃度のdNTPと混合する。例えば、反応は、20fmolの突然変異させようとする核酸、30pmolの各PCRプライマー、50mM KCl、10mM Tris HCl (pH 8.3)、0.01%ゼラチン、7mM MgCl₂、0.5mM MnCl₂、5単位のTaqポリメラーゼ、0.2mM dGTP、0.2mM dATP、1mM dCTP、および1mM dTTPを含む反応緩衝液を用いて行うことができる。PCRは、94 で1分、45 で1分、および72 で1分を30サイクルとして行うことができる。しかし、これらのパラメーターを適宜変更しうることは理解されるであろう。続いて、突然変異させた核酸を適切なベクター中にクローニングし、突然変異させた核酸によってコードされるポリペプチドの活性を評価する (実施例7参照)。部位指定突然変異誘発は、クローニングされた関心対象の任意のDNA中に部位特異的突然変異を生じさせるためにオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発を用いて達成することができる。オリゴヌクレオチド突然変異誘発は、例えば、Reidhaar-Olson et al., Science, 241 : 53-57 (1988)に記載されている。手短に述べると、そのような手順では、クローニングされたDNA中に導入しようとする1つまたは複数の突然変異を保有する複数の二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、突然変異させようとするクローニングされたDNA (例えば、CARポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列) 中に挿入する。突然変異したDNAを含有するクローンを回収し、それらがコードするポリペプチドの活性を評価する。変異体を作製するためのもう1つの方法は、アセンブリPCRである。アセンブリPCRでは、小さなDNA断片の混合物からのPCR産物のアセンブリが行われる。同一のバイアル内で多数の異なるPCR反応が並行して起こり、ある反応の産物が別の反応の産物をプライミングする。アセンブリPCRは、例えば、米国特許第5,965,408号に記載されている。変異体を作製するさらにもう1つの方法は、セクシャル (sexual) PCR突然変異誘発である。セクシャルPCR突然変異誘発では、DNA分子のランダム断片化の結果として、異なっているが類縁性の高いDNA配列のDNA分子間で、配列相同性に基つき、強制的な相同組換えがインビトロで起こる。これに続いて、PCR反応におけるプライマー伸長により、交差組換え (crossover) の固定が行われる。セクシャルPCR突然変異誘発は、例えば、Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 91: 10747-10751 (1994)に記載されている。

【 0 0 7 4 】

変異体を、インビボ突然変異誘発によって作製することもできる。いくつかの態様においては、DNA修復経路の1つまたは複数に突然変異を保持する大腸菌株などの細菌株において配列を増幅させることにより、核酸配列中にランダム突然変異を生じさせる。そのような「ミューテーター (mutator)」菌株は、野生型菌株よりも高いランダム突然変異率を有する。これらの菌株の1つでDNA配列 (例えばCARポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列) を増幅させることにより、最終的には、DNA内にランダム突然変異が生じることになる。インビボ突然変異誘発における使用に適したミューテーター菌株は、例えば、国際特許出願公開WO 91/16427に記載されている。また、変異体を、カセット突然変異誘発を用いて作製することもできる。カセット突然変異誘発では、二本鎖DNA分子の小さな領域を、天然配列とは異なる合成オリゴヌクレオチド「カセット」で置き換える。オリゴヌクレオチドは、多くの場合、完全および/または部分的にランダム化された天然配列を含有する。また、リカーシブ・アンサンブル (recursive ensemble) 突然変異誘発を、変異体を作製するために用いることもできる。リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発は、表現型が関連している突然変異体の多様な集団 (メンバーのアミノ酸配列が異なっている) を作製するために開発されたタンパク質工学 (すなわち、タンパク質突然変異誘発) のためのアルゴリズムである。この方法では、フィードバック機構を用いて、連続した複数回のコンビナトリアルカセット突然変異誘発を制御する。リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発は、例えば、Arkin et al, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 89: 7811-7815

10

20

30

40

50

(1992)に記載されている。いくつかの態様においては、エクスポネンシャル・アンサンブル (exponential ensemble) 突然変異誘発を用いて変異体が作製される。エクスポネンシャル・アンサンブル突然変異誘発は、ユニークかつ機能的な突然変異体のパーセンテージが高いコンピナトリアルライブラリーを作製するための工程であり、この工程では、少数の残基群を並行してランダム化することにより、変更された各位置で機能的タンパク質をもたらすアミノ酸を同定する。エクスポネンシャル・アンサンブル突然変異誘発は、例えば、Delegrave et al., Biotech. Res, 11: 1548-1552 (1993)に記載されている。いくつかの態様においては、シャフリング (shuffling) 手順を用いて変異体が作製され、この手順では、例えば、米国特許第5,965,408号および第5,939,250号に記載されているように、別個のポリペプチドをコードする複数の核酸の部分融合させて、キメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列を作製する。

10

【0075】

挿入突然変異誘発は、1つまたは複数の塩基の挿入によるDNAの突然変異誘発である。挿入突然変異は、ウイルスもしくはトランスポゾンによって媒介されて天然に起こることもあれば、または、例えばトランスポゾン突然変異誘発によって、研究室において研究目的で人工的に作製することもできる。外因性DNAが宿主のDNAに組み込まれる場合、その結果としての突然変異の重大性は、DNAが挿入される宿主ゲノム中の位置に全面的に依存する。例えば、トランスポゾンが必須の遺伝子の中央部、プロモーター領域内、またはリプレッサー領域もしくはエンハンサー領域に挿入された場合には、重大な影響が顕在化する可能性がある。脂肪アルコールの力価または収量を増大させる有益な突然変異を見いだすために、トランスポゾン突然変異誘発およびハイスループットスクリーニングを行った。本開示は、(a) SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むカルボン酸レダクターゼをコードするポリヌクレオチド配列、および(b) カルボン酸レダクターゼ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、を含む組換え宿主細胞であって、脂肪アルデヒドまたは脂肪アルコールを産生することのできる組換え宿主細胞を提供する。

20

【0076】

宿主細胞の遺伝子操作

いくつかの態様においては、ポリヌクレオチド (または遺伝子) 配列が、ポリヌクレオチド配列と機能的に連結したプロモーターを含む組換えベクターにより、宿主細胞に与えられる。ある態様において、プロモーターは、発生段階調節性の (developmentally-regulated)、オルガネラ特異的な、組織特異的な、誘導性の、構成性の、または細胞特異的なプロモーターである。いくつかの態様において、組換えベクターは、(a) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた発現制御配列；(b) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた選択マーカー；(c) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついたマーカー配列；(d) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた精製部分；(e) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついた分泌配列；および(f) ポリヌクレオチド配列と機能的に結びついたターゲティング配列、を含む。本明細書に記載の発現ベクターは、本明細書に記載の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。当業者には、発現ベクターの設計が、形質転換させようとする宿主細胞の選択、所望のポリペプチドの発現レベルなどの要因に依存しうることが理解されるであろう。本明細書に記載のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、例えば融合ポリペプチドを産生させるために、本明細書に記載の発現ベクターは宿主細胞に導入することができる。原核生物、例えば大腸菌 (E. coli) におけるポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、融合または非融合ポリペプチドのいずれかの発現を導く構成性または誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、その中にコードされているポリペプチド、通常は組換えポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に、いくつかのアミノ酸を付加する。そのような融合ベクターは、典型的には、以下の3つの目的の1つまたは複数に役立つ：(1) 組換えポリペプチドの発現を

30

40

50

増大させること；(2)組換えポリペプチドの溶解性を高めること；および(3)アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することによって、組換えポリペプチドの精製を助けること。多くの場合、融合発現ベクターでは、融合部分と組換えポリペプチドの接合部にタンパク質分解切断部位が導入されている。これにより、融合ポリペプチドの精製後に、融合部分からの組換えポリペプチドの分離が可能になる。そのような酵素およびそれらのコグネイト認識配列の例には、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼが含まれる。例示的な融合発現ベクターには、pGEX (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N J; Smith et al., Gene, 67: 31-40 (1988))、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)、およびpRITS (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N. J.) が含まれ、これらはそれぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質またはプロテインAを標的組換えポリペプチドと融合させるものである。

10

【0077】

誘導性の非融合大腸菌発現ベクターの例には、pTrc (Amann et al., Gene (1988) 69:301-315) およびpET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が含まれる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依拠する。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、共発現させたウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gn1) によって媒介されるT7 gn10-lac融合プロモーターからの転写に依拠する。このウイルスポリメラーゼは、宿主菌株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) により、lacUV 5プロモーターの転写制御下にあるT7 gn1遺伝子を保有する常在性プロファージから供給される。原核細胞および真核細胞の両者に適した発現系は、当技術分野において周知である；例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)を参照されたい。誘導性の非融合大腸菌発現ベクターの例には、pTrc (Amann et al., Gene, 69: 301-315 (1988)) およびPET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, pp. 60-89 (1990)) が含まれる。ある態様において、本開示のポリヌクレオチド配列は、バクテリオファージT5に由来するプロモーターと機能的に連結されている。1つの態様において、宿主細胞は酵母細胞である。この態様において、発現ベクターは酵母発現ベクターである。ベクターは、外来性核酸 (例えば、DNA) を宿主細胞に導入するための、当技術分野で認知された種々の手法を介して原核細胞または真核細胞に導入することができる。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションのために適した方法は、例えば、Sambrook et al. (前記) に見いだすことができる。細菌細胞の安定的な形質転換に関しては、用いる発現ベクターおよび形質転換手法によっては、発現ベクターを取り込んで複製する細胞の割合はわずかに過ぎないことが知られている。いくつかの態様においては、これらの形質転換体の同定および選択のために、選択マーカー (例えば、抗生物質に対する耐性) をコードする遺伝子を、関心対象の遺伝子とともに宿主細胞に導入する。選択マーカーには、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、またはテトラサイクリンなど、ただしこれらには限定されない薬物に対する耐性を付与するものが含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、本明細書に記載のポリペプチドをコードするベクターと同一ベクター上で宿主細胞中に導入することができ、または別個のベクター上で導入することもできる。導入された核酸によって安定的に形質転換された細胞は、適切な選択薬の存在下における増殖によって同定することができる。

20

30

40

【0078】

組換え宿主細胞による脂肪アルコール組成物の産生

組換え宿主細胞による脂肪アルコールの産生を増加させるための戦略には、遺伝子操作された産生宿主における、天然脂肪酸生合成遺伝子の過剰発現および異なる生物由来の外因性脂肪酸生合成遺伝子の発現による、脂肪酸生合成経路を経由する流れの増大が含まれる。産生を最大限にするために、脂肪アルコール生合成経路において重要性のある酵素、例えばCARの活性の強化、ならびに宿主細胞の増殖および産生能を最適化するための他の

50

戦略を採用することもできる。いくつかの態様において、組換え宿主細胞は、脂肪アルコール生合成活性（すなわち、脂肪アルコール生合成ポリペプチドまたは脂肪アルコール生合成酵素）を有するポリペプチド（酵素）をコードするポリヌクレオチドを含み、組換え宿主細胞によって脂肪アルコールが産生される。脂肪アルコールを含む組成物（脂肪アルコール組成物）は、組換え宿主細胞を、炭素源の存在下で、脂肪アルコール生合成酵素を発現させるために有効な条件下で培養することによって産生される。いくつかの態様において、脂肪アルコール組成物は脂肪アルコールを含むが、しかしながら、脂肪アルコール組成物が他の脂肪酸誘導体を含んでもよい。典型的には、脂肪アルコール組成物は、組換え宿主細胞の細胞外環境、すなわち細胞培養培地から回収される。1つのアプローチでは、アシル-ACPの遊離脂肪酸（FFA）への変換を触媒するチオエステラーゼ、および遊離脂肪酸を脂肪アルデヒドに変換するカルボン酸レダクターゼ（CAR）を発現させることによって、脂肪アルコールを産生するように組換え宿主細胞を遺伝子操作した。宿主細胞（例えば、大腸菌）に存在する天然（内因性）アルデヒドレダクターゼは、脂肪アルデヒドを脂肪アルコールに変換することができる。いくつかの態様において、脂肪アルコールは、脂肪アルデヒドを脂肪アルコールに変換する脂肪アルコー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、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産生される。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ（本明細書ではアルデヒドレダクターゼとも称する。例えば、EC 1.1.1.1）を、本開示の実施に際して用いてもよい。本明細書で用いる場合、「アルコールデヒドロゲナーゼ」という用語は、脂肪アルデヒドのアルコール（例えば、脂肪アルコール）への変換を触媒しうるポリペプチドのことを指す。当業者は、ある種のアルコールデヒドロゲナーゼは他の反応も触媒しうることを理解していると考えられ、これらの非特異的アルコールデヒドロゲナーゼも「アルコールデヒドロゲナーゼ」の範囲に含まれる。本開示に従って有用なアルコールデヒドロゲナーゼポリペプチドの例には、AlrAadp1（SEQ ID NO：4）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YjgB（AAC77226）（SEQ ID NO：5）、DkgA（NP_417485）、DkgB（NP_414743）、YdjL（AAC74846）、YdjJ（NP_416288）、AdhP（NP_415995）、YhdH（NP_417719）、YahK（NP_414859）、YphC（AAC75598）、YqhD（446856）およびYbb0 [AAC73595.1] などが非限定的に含まれる。そのほかの例は、国際特許出願公開WO2007/136762、WO2008/119082およびWO2010/062480に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。ある態様において、脂肪アルコール生合成ポリペプチドはアルデヒドレダクターゼ活性またはアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する（EC 1.1.1.1）。もう1つのアプローチでは、脂肪アルコール形成アシル-CoAレダクターゼ、または脂肪アシル-チオエステル基質（例えば、脂肪アシル-CoAまたは脂肪アシル-ACP）を脂肪アルコールに変換する脂肪アシルレダクターゼ（FAR）を発現させることによって、脂肪アルコールを産生するように組換え宿主細胞を遺伝子操作した。いくつかの態様において、脂肪アルコールは、脂肪アルコール形成アシル-CoAレダクターゼ（FAR）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産生される。この態様に従って有用なFARポリペプチドの例は、PCT公開WO2010/062480に記載されており、これは参照により本明細書に明示的に組み入れられる。

【0079】

脂肪アルコールを、脂肪アシル-ACPおよび脂肪アシル-CoA中間体を利用するアシル-CoA依存性経路、ならびに脂肪アシル-ACP中間体を利用するが脂肪アシル-CoA中間体は利用しないアシル-CoA非依存的経路を介して産生させることもできる。特定の態様において、過剰発現される遺伝子によってコードされる酵素は、脂肪酸シンターゼ、アシル-ACPチオエステラーゼ、脂肪アシル-CoAシンターゼ、およびアセチル-CoAカルボキシラーゼから選択される。いくつかの態様において、過剰発現される遺伝子によってコードされるタンパク質は、宿主細胞にとって内因性である。他の態様において、過剰発現される遺伝子によってコードされるタンパク質は、宿主細胞にとって異種である。脂肪アルコールはまた、さまざまなアシル-ACP分子またはアシル-CoA分子を対応する第一級アルコールに還元するこ

10

20

30

40

50

とのできる酵素により、天然にも作られる。参照により本明細書に明示的に組み入れられる、米国特許公開第20100105963号および第20110206630号ならびに米国特許第8097439号も参照されたい。本明細書で用いる場合、組換え宿主細胞または遺伝子操作された宿主細胞とは、例えば、新たな遺伝因子の人為的導入、および/または宿主細胞内に天然に存在する遺伝因子の人為的改変によって、対応する野生型宿主細胞に比して遺伝子構造が変更された宿主細胞のことを指す。そのような組換え宿主細胞の子孫も、これらの新たな、および/または改変された遺伝因子を含有する。本明細書に記載の本開示の諸局面の任意のものにおいて、宿主細胞は、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞（例えば、カンジダ属種（*Candida* sp.）などの糸状菌、またはサッカロミセス属種（*Saccharomyces* sp.）などの出芽酵母）、藻類細胞および細菌細胞からなる群より選択されうる。1つの好ましい態様において、組換え宿主細胞は組換え微生物細胞である。微生物細胞である宿主細胞の例には、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*）、ヒューミコーラ属（*Humicola*）、リゾムコール（*Rhizomucor*）、クリペロミセス属（*Kluyveromyces*）、ピキア属（*Pichia*）、ムコール属（*Mucor*）、ミセリオフトラ属（*Myceliophthora*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、ファネロカエテ属（*Phanerochaete*）、プレウロタス属（*Pleurotus*）、トラメテス属（*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*）に由来する細胞が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、宿主細胞はグラム陽性細菌細胞である。他の態様において、宿主細胞はグラム陰性細菌細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は大腸菌細胞である。他の態様において、宿主細胞は、バチルス・レンタス（*Bacillus lentus*）細胞、バチルス・ブレビス（*Bacillus brevis*）細胞、バチルス・ステアロサーモフィラス（*Bacillus stearothermophilus*）細胞、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）細胞、バチルス・アルカロフィラス（*Bacillus alkalophilus*）細胞、バチルス・コアギュランス（*Bacillus coagulans*）細胞、バチルス・サーキュランス（*Bacillus circulans*）細胞、バチルス・プミルス（*Bacillus pumilis*）細胞、バチルス・チューリンゲンシス（*Bacillus thuringiensis*）細胞、バチルス・クラウジ（*Bacillus clausii*）細胞、バチルス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）細胞、バチルス・サブティリス（*Bacillus subtilis*）細胞、またはバチルス・アミロリクエファシエンシス（*Bacillus amyloliquefaciens*）細胞である。他の態様において、宿主細胞は、トリコデルマ・コニンギ（*Trichoderma koningii*）細胞、トリコデルマ・ピリデ（*Trichoderma viride*）細胞、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）細胞、トリコデルマ・ロンギブラキアタム（*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・フミガータス（*Aspergillus fumigatus*）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・ニディランシス（*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、ヒューミコーラ・インソレンシス（*Humicola insolens*）細胞、ヒューミコーラ・ラヌギノサ（*Humicola lanuginosa*）細胞、ロドコッカス・オパクス（*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・ミエヘイ（*Mucor miehei*）細胞である。

【0080】

さらに他の態様において、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。さらに他の態様において、宿主細胞はアクチノミセス（*Actinomycetes*）細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞はサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）細胞である。他の態様において、宿主細胞は、真核植物、藻類、ラン色細菌、

10

20

30

40

50

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、好極限性細菌、酵母、真菌、それらの遺伝子操作された生物、または合成生物に由来する細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は、光依存性であるかまたは炭素を固定する。いくつかの態様において、宿主細胞は、光依存性であるかまたは炭素を固定する。いくつかの態様において、宿主細胞は独立栄養活性を有する。いくつかの態様において、宿主細胞は、光の存在下などにおいて光独立栄養活性を有する。いくつかの態様において、宿主細胞は、光の非存在下において従属栄養性または混合栄養性である。ある態様において、宿主細胞は、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、パニカム・ウィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミスカンサス・ギガンテス (*Miscanthus giganteus*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ボツリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*)、クラミドモナス・レインハルディ (*Chlamydomonas reinhardtii*)、ドナリエナ・サリナ (*Dunaliella salina*)、シネココッカス (*Synechococcus*) 属種PCC7002、シネココッカス属種PCC7942、シネコシステイス (*Synechocystis*) 属種PCC6803、サーモシネココッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongatus*) BP-1、クロロビウム・テピダム (*Chlorobium tepidum*)、クロロフレクサス・オウランティアカス (*Chloroflexus auranticus*)、クロマチウム・ピノサム (*Chromatium vinosum*)、ロドスピリラム・ラブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、ロドバクター・カプスラータ (*Rhodobacter capsulatus*)、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、クロストリジウム・リュングダーリイ (*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレピシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、またはザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) に由来する細胞である。

【0081】

遺伝子操作された宿主細胞の培養および発酵

本明細書で用いる場合、発酵とは、組換え宿主細胞の培養物を炭素源を含む培地中で繁殖させることによる、宿主細胞による有機材料の標的物質への変換、例えば、組換え宿主細胞による炭素源の脂肪酸またはその誘導体への変換のことを広く指す。本明細書で用いる場合、産生を許容する条件とは、宿主細胞が所望の生成物、例えば脂肪酸または脂肪酸誘導体などを産生することを可能にする、あらゆる条件のことを意味する。同様に、ベクターのポリヌクレオチド配列が発現される条件とは、宿主細胞がポリペプチドを合成することを可能にする、あらゆる条件のことを意味する。適した条件には、例えば、発酵条件が含まれる。発酵条件は、温度範囲、通気レベル、供給速度および培地組成を非限定的に含む多くのパラメーターを含みうる。これらの条件のそれぞれは、個々に、または組み合わされて、宿主細胞が増殖することを可能にする。発酵は、好気性、嫌気性、またはそれらの変形物（微好気性など）であってよい。例示的な培養培地には、ブロスまたはゲルが含まれる。一般に、培地は、宿主細胞によって直接代謝されうる炭素源を含む。加えて、炭素源の動態化（例えば、デンプンまたはセルロースの発酵性糖への解重合）およびその後の代謝を促進するために、培地中に酵素を用いることもできる。小規模産生のためには、遺伝子操作された宿主細胞を、例えば約100mL、500mL、1L、2L、5Lまたは10Lバッチ中で増殖させ、発酵させて、所望のポリヌクレオチド配列、例えばCARポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列などを発現するように誘導することができる。大規模産生のためには、遺伝子操作された宿主細胞を、約10L、100L、1000L、10,000L、100,000L、1,000,000Lまたはそれ以上のバッチ中で増殖させ、発酵させて、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。または、大規模流加発酵を実施することもできる。

【0082】

脂肪アルコール組成物

本明細書に記載の脂肪アルコール組成物は、組換え宿主細胞培養物の細胞外環境において認められ、培養培地から容易に単離することができる。脂肪アルコール組成物は組換え

宿主細胞によって分泌され、組換え宿主細胞培養物の細胞外環境に輸送されるか、または細胞外環境に受動的に移行する。脂肪アルコール組成物は、当技術分野において公知の慣行的な方法を用いて、組換え宿主細胞培養物から単離される。本開示は、1つまたは複数の脂肪アルデヒドおよび/または脂肪アルコールを含む、遺伝子操作された宿主細胞または組換え宿主細胞によって産生される組成物（バイオ生成物（bioproduct））を提供する。特定の鎖長および飽和度を有する脂肪アルコール構成成分が、培養された、遺伝子操作された宿主細胞または組換え宿主細胞によって産生されるバイオ生成物の大半を構成しているものの、該組成物は通常、鎖長および/または飽和度に関してさまざまである脂肪アルデヒドおよび/または脂肪アルコールの混合物を含む。本明細書で用いる場合、現代炭素分率（fraction of modern carbon）すなわちfMという用語は、米国国立標準技術研究所（National Institute of Standards and Technology（NIST））標準物質（Standard Reference Material（SRM））4990Bおよび4990C、それぞれシュウ酸標準品H0xIおよびH0xIIとして知られるもの、によって定義されるものと同じ意味を有する。基本的定義はH0xIの $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 同位体比の0.95倍に相当する（西暦1950年を基準とする）。これは、減衰補正された産業革命前の木とおおむね等しい。現在の生体生物圏（植物材料）については、fMはおよそ1.1である。

【0083】

生物的に産生された有機化合物、特に本明細書における脂肪酸生合成経路を用いて生物的に産生された脂肪アルデヒドおよびアルコールを含むバイオ生成物（例えば、本開示に従って産生された脂肪アルデヒドおよびアルコール）は、これまで再生可能資源から産生されたことはなく、したがって新規な組成物である。これらの新たなバイオ生成物は、石油化学炭素由来の有機化合物とは、二核種炭素同位体フィンガープリント法（dual carbon-isotopic fingerprinting）または ^{14}C 年代測定法（ ^{14}C dating）に基づいて区別することができる。さらに、生物起源炭素の具体的な供給源（例えば、グルコースとグリセロールとの対比）を、二核種炭素同位体フィンガープリント法によって決定することもできる（例えば、米国特許第7,169,588号を参照されたい。これは参照により本明細書に組み込まれる）。バイオ生成物を石油ベースの有機化合物と区別しうることは、これらの材料の流通下でのトラッキングに有益である。例えば、生物学に基づく炭素同位体プロファイルと石油ベースの炭素同位体プロファイルの両方を含む有機化合物または化学物質は、石油ベースの材料だけでできた有機化合物および化学物質と区別することができる。それ故に、本明細書におけるバイオ生成物は、そのユニークな炭素同位体プロファイルに基づいて、流通下で追跡またはトラッキングすることができる。バイオ生成物は、各燃料中の安定炭素同位体比（ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ）を比較することによって、石油ベースの有機化合物と区別することができる。所与のバイオ生成物における $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比は、二酸化炭素が固定された時点の大気中の二酸化炭素における $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比の結果である。それはまた、厳密な代謝経路も反映する。地域的変動も起こる。石油、 C_3 植物（広葉植物）、 C_4 植物（イネ科草本）、および海洋炭酸塩はすべて、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ および対応する ^{13}C 値の点で有意差を示す。さらに、 C_3 植物および C_4 植物の脂質物質は、代謝経路の結果として、同じ植物の炭水化物成分から誘導される材料とは異なる分析結果を示す。測定精度内で、 ^{13}C は同位体分別効果に起因する大きな変動を示し、バイオ生成物に関して最も重要なのは光合成機構である。植物における炭素同位体比の違いの主因は、植物における光合成炭素代謝の経路の違い、特に一次カルボキシル化（すなわち、大気 CO_2 の初期固定）時に起こる反応の違いと密接に関連している。草木の二大クラスは、 C_3 （またはカルビン・ベンソン）光合成回路が組み込まれているものと、 C_4 （またはハッチ・スラック）光合成回路が組み込まれているものである。 C_3 植物では、一次 CO_2 固定またはカルボキシル化反応にリブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ酵素が関与し、最初の安定生成物は3-炭素化合物である。広葉樹および針葉樹などの C_3 植物は、温帯気候帯において優勢である。 C_4 植物では、もう1つの酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼが関与するさらなるカルボキシル化反応が、一次カルボキシル化反応である。最初の安定炭素化合物は4-炭素酸であり、それが後に脱炭酸される。そのようにして放出された CO_2 は、 C_3 回路によって再び固定される。 C_4 植

10

20

30

40

50

物の例には、暖地型牧草、トウモロコシ、およびサトウキビがある。 C_4 植物および C_3 植物はいずれも、ある範囲の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 同位体比を示すが、典型的な値は、 C_4 植物については約-7～約-13パーミル、 C_3 植物については約-19～約-27パーミルである（例えば、Stuiver et al, Radiocarbon 19:355 (1977)を参照）。石炭および石油は一般に後者の範囲に含まれる。 ^{13}C 測定尺度は、元はピーディー（Pee Dee）ベレムナイト（PDB）石灰石によって設定されたゼロ点によって定義されたものであり、ここでの値は、この材料からの千分の一偏位（parts per thousand deviations）で与えられる。「 ^{13}C 」値は、千分率（パーミル）で表されて‰と略記され、以下のように計算される：

$$^{13}\text{C}(\text{‰}) = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{試料}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{標準物質}}] / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{標準物質}} \times 1000$$

PDB標準物質（reference material；RM）が枯渇したことから、IAEA、USGS、NIST、および他の選ばれた国際的同位体研究所の協同で、一連の代替RMが開発されている。PDBからのパーミル偏位の表記が ^{13}C である。測定は、 CO_2 に対して、高精度安定同位体比質量分析（high precision stable ratio mass spectrometry）（IRMS）により、質量44、45および46の分子イオンに関して行われる。本明細書に記載の組成物は、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生されたバイオ生成物を含み、これには例えば、脂肪アルデヒドおよびアルコール生成物が含まれる。具体的には、バイオ生成物は、約-28もしくはそれ以上、約-27もしくはそれ以上、-20もしくはそれ以上、-18もしくはそれ以上、-15もしくはそれ以上、-13もしくはそれ以上、-10もしくはそれ以上、または-8もしくはそれ以上の ^{13}C を有することができる。例えば、バイオ生成物は、約-30～約-15、約-27～約-19、約-25～約-21、約-15～約-5、約-13～約-7、または約-13～約-10の ^{13}C を有することができる。別の場合には、バイオ生成物は、約-10、-11、-12、または-12.3の ^{13}C を有することができる。バイオ生成物は、本明細書における本開示に従って產生されたバイオ生成物を含め、各化合物における ^{14}C の量を比較することによって、石油ベースの有機化合物と区別することもできる。 ^{14}C は5730年という核半減期を有するので、「古い（older）」炭素を含有する石油ベース燃料を、「新しい（newer）」炭素を含有するバイオ生成物と区別することができる（例えば、Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle and H. P. van Leeuwen, Eds., 1 of Vol. I of the IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc.) 3-74, (1992)を参照）。

【0084】

放射性炭素年代測定法における基本的仮定は、大気中の ^{14}C 濃度の不変性が生体における ^{14}C の不変性をもたらすというものである。しかし、1950年以降の大気圏内核実験および1850年以降の化石燃料の燃焼により、 ^{14}C はもう1つの地球化学的時間特性（geochemical time characteristic）を獲得した。大気 CO_2 における（したがって生体生物圏（living biosphere）における）その濃度は、1960年代中頃の核実験のピーク時にはおよそ2倍になった。それ以後は、7～10年というおよそ緩和「半減期」で、約 1.2×10^{-12} という定常状態宇宙線起源（大気）ベースライン同位対比（ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ）へと徐々に戻りつつある（この後者の半減期は文字通りに解釈してはならない；そうではなくて、核時代の幕開け以降の大気および生物圏 ^{14}C の変動を追跡するには、詳細な大気核投入/減衰関数（atmospheric nuclear input/decay function）を用いなければならない）。近年の生物圏炭素の年代測定（annual dating）に裏づけを与えるのは、この後者の生物圏 ^{14}C 時間特性である。 ^{14}C は加速器質量分析（AMS）によって測定することができ、その結果は「現代炭素分率」（ f_M ）という単位で与えられる。 f_M は、米国国立標準技術研究所（National Institute of Standards and Technology（NIST））標準物質（Standard Reference Material（SRM））4990Bおよび4990Cによって定義される。本明細書で用いる場合、現代炭素分率（ f_M ）は、米国国立標準技術研究所（NIST）標準物質（SRM）4990Bおよび4990C、それぞれシュウ酸標準品H0xIおよびH0xIIとして知られるものによって定義されるのと同じ意味を有する。基本的定義はH0xIの $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 同位体比の0.95倍に相当する（西暦1950年を基準とする）。これは、減衰補正された産業革命前の木にほぼ等しい。現在の生体生物圏（植物材料）については、 f_M はおよそ1.1である。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載の組成物は、少なくとも約1の f_M^{14C} を有しうるバイオ生成物を含む。例えば、バイオ生成物は、少なくとも約1.01の f_M^{14C} 、約1～約1.5の f_M^{14C} 、約1.04～約1.18の f_M^{14C} 、または約1.111～約1.124の f_M^{14C} を有しうる。 14C のもう1つの測定値は、現代炭素パーセント (percent of modern carbon) (pMC) として知られている。 14C 年代値を用いる考古学者または地質学者にとっては、西暦1950年が「0年前 (zero years old)」に相当する。これはまた、100pMCも表す。熱核兵器のピークであった1963年に、大気中の「爆弾由来炭素 (bomb carbon)」は、正常レベルのほぼ2倍に達した。その出現以降、大気圏内でのその分布は概算されており、西暦1950年以降に生きる植物および動物については100pMCを上回る値を示す。これは時間の経過とともに徐々に減少しており、現在の値は107.5pMC付近である。これは、トウモロコシなどの新鮮なバイオマス材料が107.5pMCに近い 14C 特性を与えると考えられることを意味する。石油ベースの化合物はpMC値がゼロであると考えられる。化石炭素を現代炭素と混合すると、現代pMC含有量の希釈が起こることになる。107.5pMCが現代バイオマス材料の 14C 含有量を表し、0pMCが石油ベース生成物の 14C 含有量を表すと仮定すると、その材料について測定されるpMC値は、この2種類の構成成分の比率を反映することになる。例えば、現代の大豆に100%由来する材料は、107.5pMCに近い放射性炭素特性を与えると考えられる。この材料を石油ベース生成物で50%希釈したとすると、放射性炭素特性は約54pMCになると考えられる。生物学に基づく炭素含有量は、「100%」を107.5pMCに割り当て、「0%」を0pMCに割り当てることによって導き出される。例えば、99pMCと測定される試料は、93%の生物学に基づく炭素含有量換算値を与えることになる。この値は、生物学に基づく炭素結果平均値と呼ばれ、分析される材料内のすべての構成成分が現代生物材料または石油ベース材料のいずれかに由来すると仮定している。本明細書に述べたような1つまたは複数の脂肪アルデヒドまたはアルコールを含むバイオ生成物は、少なくとも約50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100のpMCを有することができる。別の場合には、本明細書に記載のバイオ生成物は、約50～約100；約60～約100；約70～約100；約80～約100；約85～約100；約87～約98；または約90～約95のpMCを有することができる。さらに別の場合には、本明細書に記載のバイオ生成物は、約90、91、92、93、94、または94.2のpMCを有することができる。

【 0 0 8 6 】

組換え宿主細胞によって産生された脂肪アルコール組成物のスクリーニング

条件が発現を可能とするのに十分であるかを判定するためには、異種遺伝子または改変された天然遺伝子を含む組換え宿主細胞を、例えば、約4、8、12、24、36または48時間にわたって培養する。培養中および/または培養後に、試料を集菌して分析することにより、脂肪アルコール産生レベル (力価、収量または産生能) が、改変されていない野生型親細胞のものとは異なるか否かを判定することができる。例えば、宿主細胞を増殖させた培地を、所望の生成物の存在について調べることができる。ある生成物の存在について調べる場合には、例えば、TLC、HPLC、GC/FID、GC/MS、LC/MS、MSなど、ただしこれらには限定されないアッセイを用いることができる。組換え宿主細胞菌株は、改変された脂肪アルコールまたは脂肪種の産生レベルに関するスクリーニングの目的で、プレートまたは振盪フラスコ内の少容量 (0.001L～1L) 培地中で培養することができる。候補菌株すなわち「ヒット」が小規模で同定されたら、脂肪アルコールまたは脂肪種の正確な産生レベルを決定するために、これらの菌株を、バイオリアクター、タンクおよびパイロットプラントにおけるより大きな容量 (1L～1000L) の培地中で培養する。これらの大容量培養条件は、所望の脂肪アルコールまたは脂肪種の産生を得るための培養条件を最適化するために当業者によって用いられる。

【 0 0 8 7 】

脂肪アルデヒドおよび脂肪アルコール組成物の有用性

アルデヒドは、多くの特殊化学物質を産生するために用いられる。例えば、アルデヒドは、ポリマー、樹脂 (例えば、ベークライト)、染料、香味剤、可塑剤、香料、医薬品および他の化学物質を産生するために用いられ、溶媒、保存料、または消毒薬として用いら

10

20

30

40

50

れるものもある。加えて、ビタミンおよびホルモンなどのある種の天然化合物および合成化合物はアルデヒドであり、多くの糖類はアルデヒド基を含有する。脂肪アルデヒドは、化学的または酵素的還元によって脂肪アルコールに変換することができる。脂肪アルコールは多くの商業用途を有する。全世界での脂肪アルコールおよびその誘導体の年間売上高は10億米ドルを超える。短鎖（shorter chain）脂肪アルコールは、化粧品産業および食品産業において、乳化剤、軟化剤、および増粘剤として用いられる。脂肪アルコールは、その両親媒性ゆえに、パーソナルケア用品および家事用品、例えば洗剤などに役立つ非イオン界面活性剤として作用する。また、脂肪アルコールは、蠟、ゴム、樹脂、医薬軟膏およびローション、潤滑油添加物、繊維用帯電防止剤および表面処理剤、可塑剤、化粧品、工業用溶媒、ならびに脂肪用の溶媒として使用される。本開示はまた、本明細書に記載の方法のいずれかによって産生された脂肪アルコールを含む界面活性剤組成物または洗剤組成物も提供する。当業者は、界面活性剤組成物または洗剤組成物の意図する目的に応じて、異なる脂肪アルコールを産生して用いることができることを理解するであろう。例えば、本明細書に記載の脂肪アルコールが、界面活性剤または洗剤の産生のための原料として用いられる場合、当業者は、脂肪アルコール原料の特性が、産生される界面活性剤または洗剤組成物の特性に影響を及ぼすことを理解するであろう。それ故に、原料として用いるための特定の脂肪アルコールを産生することにより、界面活性剤または洗剤組成物の特性を選択することができる。本明細書に記載の脂肪アルコールベースの界面活性剤および／または洗剤組成物は、当技術分野において周知の他の界面活性剤および／または洗剤と混合することができる。いくつかの態様において、混合物は、重量比で少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、または前記の値の任意の2つを境界とする範囲の脂肪アルコールを含むことができる。他の例では、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22炭素長である炭素鎖を含む脂肪アルコールを、重量比で少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または前記の値の任意の2つを境界とする範囲で含む界面活性剤または洗剤組成物を製造することができる。そのような界面活性剤または洗剤組成物は、非微生物源由来のマイクロエマルジョンまたは界面活性剤または洗剤などの少なくとも1つの添加物も含むことができ、それらは脂肪アルコールとの重量比で少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または前記の値のいずれか2つを境界とする範囲の量で存在しうる。以下の実施例によって、本開示をさらに例示する。これらの実施例は例示の目的で提示されるのにすぎない。決して、これらの実施例を、本開示の範囲または内容を限定するものと解釈してはならない。

【実施例】

【0088】

実施例1

産生宿主の改変 アシル-CoAデヒドロゲナーゼの減弱化

本実施例では、脂肪酸分解酵素の発現が減弱化されている、遺伝子操作された宿主細胞の構築について述べる。Datsenko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000)によって記載されたLambda Red (Red-Driven Integrationとしても知られる)系に以下の改変を加えた上で用いて、大腸菌MG1655 (大腸菌K株の1つ)のfadE遺伝子を欠失させた。

【0089】

以下の2つのプライマーを、fadEの欠失を作製するために用いた：

Del-fadE-

F5'-AAAAACAGCAACAATGTGAGCTTTGTTGTAATTATATTGTAAACATATTGATTCC
GGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO: 9);および

Del-fadE-

R5'-AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTTCCTGTA
GGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 10)

。

【 0 0 9 0 】

Del-fadE-FプライマーおよびDel-fadE-Rプライマーを用いて、PCRにより、プラスミドpKD13 (Datsenko et al., 前記によって記載) からカナマイシン耐性 (KmR) カセットを増幅した。続いて、このPCR産物を用いて、あらかじめアラビノースで3~4時間誘導した、pKD46 (Datsenko et al., 前記に記載) を含有するエレクトロコンピテント大腸菌MG1655細胞を形質転換させた。super optimal broth with catabolite repression (SOC) 培地中で37℃で3時間増殖させた後に、細胞を、50 μg/mLのカナマイシンを含有するLuria寒天プレートに播いた。37℃で終夜培養した後に、耐性コロニーを同定して単離した。fadE遺伝子の破壊は、大腸菌fadE遺伝子に隣接するように設計したプライマーfadE-L2およびfadE-R1を用いるPCR増幅によって確認した。

【 0 0 9 1 】

fadE欠失確認プライマーは以下とした：

fadE-L2 5'-CGGGCAGGTGCTATGACCAGGAC (SEQ ID NO: 11);および

fadE-R1 5'-CGCGGCGTTGACCGGCAGCCTGG (SEQ ID NO: 12)

。

【 0 0 9 2 】

fadE欠失を確認した後に、単一のコロニーを用い、Datsenko et al., 前記によって記載されたようにpCP20プラスミドを用いて、KmRマーカを除去した。fadE遺伝子が欠失したKmRマーカが除去された、得られたMG1655大腸菌株を、大腸菌MG1655 fadEまたは大腸菌MG 1655 D1と名付けた。fadE遺伝子が欠失したMG1655大腸菌株による脂肪酸誘導体(「総脂肪酸種」)の産生を、大腸菌MG1655による脂肪酸誘導体の産生と比較した。細胞を、産生プラスミドpDG109 (pCL1920_P_{TRC}-carBopt_12H08_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR) で形質転換し、グルコース最小培地中で発酵させた。図5に提示されたデータは、fadE遺伝子の欠失が脂肪酸誘導体の産生に影響を及ぼさなかったことを示している。

【 0 0 9 3 】

実施例2

脂肪酸合成経路を経由する流れの増大 アセチルCoAカルボキシラーゼ媒介性

脂肪酸生合成のための主な前駆体はマロニル-CoAおよびアセチル-CoAである(図1)。これらの前駆体は大腸菌における脂肪酸生合成の速度を制限することが示唆されている(図2)。本実施例では、合成accオペロン[コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum) accABCD(±birA)]を過剰発現させ、この遺伝子改変が、大腸菌におけるアセチル-coAおよびマロニル-CoAの産生の増大をもたらした。1つのアプローチでは、マロニル-CoAレベルを上昇させる目的で、コリネバクテリウム・グルタミカム(C. glutamicum)由来のアセチル-CoAカルボキシラーゼ酵素複合体を大腸菌で過剰発現させた。アセチル-CoAカルボキシラーゼ(acc)は、4つの別個のサブユニット、accA、accB、accCおよびaccDからなる(図3)。C. glutamicum accの利点は、2つのサブユニットが、融合タンパク質accCBおよびaccDAとしてそれぞれ発現されることであり、これにより、その均衡のとれた発現が容易になる。さらに、accBサブユニットをビオチン化するC. glutamicum birA(図3)も過剰発現させた。実施例3では、acc遺伝子とfabオペロン全体との共

10

20

30

40

50

発現について述べる。

【 0 0 9 4 】

実施例3

脂肪酸合成経路を経由する流れの増大 iFAB

脂肪酸誘導体の産生：

組換え宿主細胞における脂肪酸合成経路を経由する流れを増大させるための戦略には、大腸菌における、天然の大腸菌脂肪酸生合成遺伝子の過剰発現および異なる生物由来の外因性の脂肪酸生合成遺伝子の発現の両方が含まれる。本研究では、異なる生物由来の脂肪酸生合成遺伝子を、大腸菌DV2のゲノム中で組み合わせた。iFAB 130～145を含む16種の菌株を評価した。iFAB 130～145の詳細な構造は、以下のiFABの表1に提示されている。

10

【 0 0 9 5 】

(表1) iFAB 130～145に認められる構成要素

略号	詳しい説明
St_fabD	ネズミチフス菌(<i>Salmonella typhimurium</i>) fabD遺伝子
nSt_fabH	天然RBSを有するネズミチフス菌fabH遺伝子
sSt_fabH	合成RBSを有するネズミチフス菌fabH遺伝子
Cac_fabF	クロストリジウム・アセトブチリカム(<i>Clostridium acetobutylicum</i>) (ATCC824) fabF遺伝子
St_fabG	ネズミチフス菌fabG遺伝子
St_fabA	ネズミチフス菌fabA遺伝子
St_fabZ	ネズミチフス菌fabZ遺伝子
BS_fabI	枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>) fabI遺伝子
BS_FabL	枯草菌fabL遺伝子
Vc_FabV	コレラ菌(<i>Vibrio cholerae</i>) fabV遺伝子
Ec_FabI	大腸菌FabI遺伝子

20

【 0 0 9 6 】

各「iFAB」は、さまざまなfab遺伝子を以下の順に含んでいた：1) エノイル-ACPレダクターゼ (BS_fabI、BS_FabL、Vc_FabV、またはEc_FabI)；2) b-ケトアシル-ACPシンテターゼIII (St_fabH)；3) マロニル-CoA-ACPトランスアシラーゼ (St_fabD)；4) b-ケトアシル-ACPレダクターゼ (St_fabG)；5) 3-ヒドロキシ-アシル-ACPデヒドラターゼ (St_fabAまたはSt_fabZ)；6) b-ケトアシル-ACPシンテターゼII (Cac_fabF)。St_fabAが、trans-2,cis-3-デセノイル-ACPイソメラーゼ活性も有すること(参照)、ならびにCac_fabFがb-ケトアシル-ACPシンテターゼII活性およびb-ケトアシル-ACPシンテターゼI活性を有することに留意されたい(Zhu et al., BMC Microbiology 9: 119 (2009))。iFAB 130～145の具体的な組成については、以下の表2を参照されたい。FAB138の前方に組み込まれたcat-loxP-T5プロモーターの略図(7A)；およびiT5_138の略図(7B)を含む、iFAB138座位の概略図を提供する図7AおよびBも参照されたい。

30

【 0 0 9 7 】

(表2) iFAB 130～145の組成

ifab	BS fabI	BS fabL	Vc fabV	Ec fabI	nSt fabH	sSt fabH	St fabD	St fabG	St fabA	St fabZ	Cac fabF
ifab130	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
ifab131	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab132	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab133	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab134	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
ifab135	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab136	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab137	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab138	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
ifab139	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab140	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab141	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab142	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
ifab143	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
ifab144	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
ifab145	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1

【 0 0 9 8 】

プラスミドpCL_{P_{trc}}-tesAを菌株のそれぞれに形質転換により導入し、FA2培地中で、導入から集菌まで20時間かけて32 および37 の両方で発酵させた。二重反復プレートスクリーニングに由来する総脂肪種の産生に関するデータを図6Aおよび6Bに示している。このライブラリースクリーニングにより、最も優れた構築物はiFAB138を有するDV2であると判定された。このiFAB138構築物を菌株D178に移入して、菌株EG149を作製した。この菌株をさらなる遺伝子操作のために用いた。EG149のゲノム中のiFAB138の配列は、SEQ ID NO : 13として提示されている。表3は、本明細書に記載の発現構築物を含有するプラスミドを以下に述べるように導入したいいくつかの大腸菌株の遺伝的特徴づけを提示している。これらの菌株およびプラスミドを、本開示のある態様の組換え宿主細胞、培養物および方法を実証するために用いた。表3における遺伝子の名称は、当業者に公知の標準的な名称である。

【 0 0 9 9 】

(表3) 大腸菌株の遺伝的特徴づけ

菌株	遺伝的特徴づけ
DV2	MG1655 F ⁻ , λ ⁻ , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1, ΔfhuA::FRT, ΔfadE::FRT
DV2.1	DV2 fabB::fabB[A329V]
D178	DV2.1 entD::FRT P _{T5} -entD
EG149	D178 ΔinsH-11::P _{LACUV5} -iFAB138
V642	EG149 rph ⁺
SL313	V642 lacIZ::P _{AI} -tesA/pDG109
V668	V642 ilvG ⁺
LC397	V668 lacIZ::P _{TRC} -tesA(var) kan
SL571	V668 lacIZ::P _{TRC} -tesA(var) FRT
LC942	SL571 attTn7::P _{TRC} -tesA(var)
DG16	LC942/pLC56
V940	LC397/pV171.1
D851	SL571 yijP::Tn5-cat/pV171.1

プラスミド : pDG109、pLC56およびpV171.1は、carBおよびtesAのさまざまな発現を伴うpCL_{P_{trc}}-carB_{-tesA}-alr_{-fabB}-fadRオペロンである。iFAB138はSEQ ID NO : 13である。

【 0 1 0 0 】

実施例4

rphおよびilvGの突然変異を修復することによって、遊離脂肪酸(FFA)生成物の量を増加させる

この菌株においてilvGおよびrph突然変異を修復した結果、FFAがより多く産生された。菌株D178、EG149およびV668(表3)を、pCL_{P_{trc}}-tesAで形質転換した。FA2培地中での発

酵を32℃で40時間行って、pCL_P_{trc}_tesAを有する菌株D178、EG149、およびV668のFFA産生を比較した。rphおよびilvG突然変異の修復は、pCL_P_{trc}_tesAを有する基準菌株と比べてFFA産生の116%の増加をもたらした。図8に見られるように、V668/pCL_P_{trc}_tesAは、D178/pCL_P_{trc}_tesAまたはEG149/pCL_P_{trc}_tesA対照よりも多くのFFAを産生する。FFAはLS9生成物の前駆体であるため、FFA産生の増加は、新たな菌株がLS9生成物をより高レベルで産生しうることの優れた指標となる。発酵および抽出は、以下に例示する標準的なFALC発酵プロトコールに従って行った。

【0101】

選択した大腸菌株の凍結細胞保存バイアルを用いて、スペクチノマイシン抗生物質を濃度115 µg/mLで含有する125mLのバッフル付き振盪フラスコ内の、20mLのLBブロスに播種した。この振盪フラスコを、巡回式振盪機にて32℃でおよそ6時間培養し、続いて該培地の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内の、125mLの低P FA2播種 (low P FA2 seed) 培地 (2g/L NH₄Cl、0.5g/L NaCl、3g/L KH₂PO₄、0.25g/L MgSO₄・7H₂O、0.015g/L mM CaCl₂・2H₂O、30g/Lグルコース、1mL/Lの微量ミネラル溶液 (2g/LのZnCl₂・4H₂O、2g/LのCaCl₂・6H₂O、2g/LのNa₂MoO₄・2H₂O、1.9g/LのCuSO₄・5H₂O、0.5g/LのH₃BO₃、および10mL/Lの濃塩酸)、10mg/Lのクエン酸第二鉄、100mMのBis-Tris緩衝液 (pH 7.0)、および115 µg/mLのスペクチノマイシン) 中に移し、振盪機上にて32℃で終夜培養した。この低P FA2播種培養物の100mLを用いて、1.9Lの滅菌F1バイオリアクター発酵培地を最初に含有する5LのBiostat Aplusバイオリアクター (Sartorius BBI) に播種した。この培地は、最初は、3.5g/LのKH₂PO₄、0.5g/Lの(NH₄)₂SO₄、0.5g/LのMgSO₄七水和物、10g/Lの濾過滅菌グルコース、80mg/Lクエン酸第二鉄、5g/Lカザミノ酸、10mL/Lの濾過滅菌微量ミネラル溶液、1.25mL/Lの濾過滅菌ビタミン溶液 (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のピオチン、および0.04g/Lの葉酸)、および播種培地に利用したのと同じ濃度のスペクチノマイシンで構成される。培養物のpHは28% w/vアンモニア水を用いて6.9に維持し、温度は33℃、通気速度は1 lpm (0.5 v/v/m)、溶存酸素圧は、DO制御装置および酸素補給と縦続接続された攪拌ループを利用して飽和度30%とした。発泡は、シリコーンエマルジョンを基剤とする消泡剤 (Dow Corning 1410) の自動添加によって抑制した。

【0102】

初期培地中のグルコースがほぼ枯渇した時点 (播種からおよそ4~6時間後) で、名目上の発酵容積が2Lであることを基準にして、3.9g/L MgSO₄七水和物および600g/Lグルコースで構成された栄養供給を10~12g/L/hrという一定の最大グルコース供給速度に達するまで0.3 hr⁻¹の指数関数的な供給速度で開始した。バイオリアクターにおける脂肪アルコールの産生は、培養物のODが5AUに達した時点 (播種からおよそ3~4時間後) で、1M IPTG原液を最終濃度1mMとなるように添加することによって誘導した。それ以後、バイオリアクターからの試料採取を1日2回行い、播種からおよそ72時間後に集菌した。0.5mLの十分混合した発酵ブロスの試料を15mLコニカルチューブ (VWR) に移し、5mLの酢酸ブチルと十分に混合した。混合のためにチューブを数回逆さにし、続いておよそ2分間激しくボルテックス処理した。続いて、有機層と水層を分離するためにチューブを5分間遠心分離し、有機層の一部分をガスクロマトグラフィー分析のためにガラスバイアルに移した。

【0103】

実施例5

トランスポゾン突然変異誘発による脂肪アルコール産生の増大 yijP

大腸菌による脂肪アルコールの産生の力価、収量、産生能を改善するために、トランスポゾン突然変異誘発およびハイスループットスクリーニングを実施し、有益な突然変異のシークエンシングを行った。yijP菌株におけるトランスポゾン挿入は、振盪フラスコ発酵および流加発酵のいずれにおいても、該菌株の脂肪アルコール収量を改善することが示された。SL313菌株は脂肪アルコールを産生する。この菌株の遺伝子型を表3に提示している。続いて、脂肪アルコールの産生を測定するために、トランスポゾンクローンをハイスループットスクリーニングに供した。手短に述べると、コロニーを選び取り、LBを含有する

ディープウェルプレートに入れて、終夜増殖させ、新たなLBに播種して、3時間増殖させ、新たなFA2.1培地に播種して、16時間増殖させ、続いて酢酸ブチルを用いて抽出した。粗抽出物をBSTFA (N,O-ビス[トリメチルシリル]トリフルオロアセトアミド) で誘導体化した後に、GC/FIDを用いて分析した。pDG109プラスミドの選択を維持するために、すべての培地にスペクチノマイシン (100mg/L) を含めた。対照菌株SL313と同程度に総脂肪種を産生するが対照よりも脂肪アルコール種のパーセンテージが高くかつ遊離脂肪酸のパーセンテージが低いクローンを選ぶことにより、ヒットを選択した。菌株68F11がヒットとして同定され、これを、FA2.1培地を用いる振盪フラスコ発酵で検証した。トランスポゾンヒット68F11と対照菌株SL313との比較により、68F11は対照よりも高いパーセンテージで脂肪アルコール種を産生する一方で、両方の菌株とも総脂肪種は同程度の力価で産生することが示された。LC535と名付けられたヒット68F11の単一コロニーについて、トランスポゾン挿入の場所を同定するためにシーケンシングを行った。手短に述べると、キットZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (商標) (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を製造元の説明書に従って用いて、10mLの終夜LB培養物からゲノムDNAを精製した。精製されたゲノムDNAのシーケンシングを、トランスポゾンの内部にあるプライマーを用いて、トランスポゾンから外側に向かって行った：

DG150 5'-GCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTG-3'

(SEQ ID NO:14)

DG131 5'-GAGCCAATATGCGAGAACACCCGAGAA-3' (SEQ ID NO:15)

。

【0104】

菌株LC535は、yijP遺伝子中にトランスポゾン挿入を有することが明らかにされた (図18)。yijPは、機能が不明である、保存されている内膜タンパク質をコードする。yijP遺伝子はオペロン内にあり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするppc遺伝子、および機能不明なDNA結合性転写調節因子と予想されるものをコードするyijO遺伝子とともに共転写される。トランスポゾンの内部にあるプロモーターが、yijP、ppcおよびyijOの転写のレベルおよびタイミングに影響を及ぼしている可能性が高く、隣接遺伝子frwD、pflC、pflD、およびargEに対しても影響を及ぼしている可能性がある。トランスポゾンカセットの内部にあるプロモーターは図18に示されており、これが隣接遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性がある。菌株LC535を異なった2日での流加発酵にて評価した。いずれの発酵によっても、LC535が脂肪アルコールを対照SL313よりも高い収量で産生したことが実証され、改善度は炭素投入量に基づく絶対的収量で1.3~1.9%であった。yijPトランスポゾンカセットを、脂肪アルコールを菌株SL313よりも高い収量で産生する別の菌株V940においてさらに評価した。yijP::Tn5-catカセットを、菌株LC535から、以下のプライマーを用いて増幅した：

LC277 5'-

CGCTGAACGTATTGCAGGCCGAGTTGCTGCACCGCTCCCGCCAGGCAG-3'

(SEQ ID NO:16)

LC278 5'-

GGAATTGCCACGGTGCGGCAGGCTCCATACGCGAGGCCAGGTTATCCAACG-3'

(SEQ ID NO:17)

。

【0105】

この直鎖状DNAをエレクトロポレーションによって菌株SL571に導入し、lambda red組換え系を用いて染色体に組み込んだ。トランスポゾン領域の外側にあるプライマーを用いて、コロニーをスクリーニングした：

DG407 5'-AATCACCAGCACTAAAGTGC GCGGTTTCGTTACCCG-3' (SEQ ID NO: 18)

DG408 5'-ATCTGCCGTGGATTGCAGAGTCTATTCAGCTACG-3' (SEQ ID NO: 19)

。

【 0 1 0 6 】

正しいyijPトランスポゾンカセット（図9）を有するコロニーを、産生プラスミドpV171.1で形質転換して、菌株D851を作製した。D851（V940 yijP::Tn5-cat）を、yijPトランスポゾンカセットを含まない同質遺伝子菌株V940と比較して、振盪フラスコ発酵にて試験した。この発酵の結果から、yijPトランスポゾンカセットにより、V940菌株に比して、D851菌株においてより高いパーセンテージの脂肪アルコール産生がもたらされ、総脂肪種はV940対照菌株と同程度の力価で産生されることが示された。菌株D851を、異なった2日での流加発酵にて評価した。これらの発酵によるデータは表4に示されており、これは、5リットル流加発酵では、yijP::Tn5-catトランスポゾン挿入を有する菌株において総脂肪種（「FAS」）収量が増加したこと、および%脂肪アルコール（「FALC」）が増加したことを示している。「脂肪種」はFALCおよびFFAを含む。

【 0 1 0 7 】

（表4）FASおよびFALCの力価および収量に対するyijPトランスポゾン挿入の効果

菌株	FAS 力価	FAS 収量	% FALC	FALC 収量
V940	68 g/L	18.70%	95.00%	17.80%
D851	70 g/L	19.40%	96.10%	18.60%
V940	64 g/L	18.40%	91.90%	16.90%
D851	67 g/L	19.00%	94.00%	17.80%

【 0 1 0 8 】

タンク発酵法：

タンクでの脂肪酸エステル産生について評価するために、所望の菌株のグリセロールバイアルを用いて振盪フラスコ内の20mL LB+スペクチノマイシンに播種し、32 °Cでおよそ6時間培養した。4mLのLB培養物を用いて125mLの低PFA播種培地（以下）に播種し、これをして32 °Cの振盪機にて終夜培養した。50mLの終夜培養物を用いて1Lのタンク培地に播種した。タンクを、pH 7.2および30.5 °CでpH固定条件下、最大供給速度16g/L/hr（グルコースまたはメタノール）で動作させた。

【 0 1 0 9 】

（表5）低P FA播種培地

構成成分	濃度
NH4Cl	2 g/L
NaCl	0.5 g/L
KH2PO4	1 g/L
MgSO4-7H2O	0.25 g/L
CaCl2-2H2O	0.015 g/L
グルコース	20 g/L
TM2 微量ミネラル溶液	1 mL/L
クエン酸第二鉄	10 mg/L
Bis Tris 緩衝液 (pH 7.0)	100 mM
スペクチノマイシン	115 mg/L

【 0 1 1 0 】

(表6) タンク培地

構成成分	濃度
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
クエン酸第二鉄	0.034 g/L
TM2 微量ミネラル溶液	10 mL/L
カザミノ酸	5 g/L
滅菌後添加物	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 g/L
微量ビタミン溶液	1.25 mL/L
グルコース	5 g/L
接種物	50 mL/L

10

【 0 1 1 1 】

実施例6

CarBへのN末端60bp融合タグの付加 (CarB60)

タンパク質の溶解性、安定性、発現または機能性を高めるためには、多くの手段がある。CarBの溶解性を高めるための1つのアプローチでは、融合タグを該遺伝子の前にクローニングすることができる。CarBの発現を増加させるもう1つのアプローチでは、該遺伝子のプロモーターまたはリボソーム結合部位 (RBS) を変更することができる。本検討では、N末端60bp融合タグの付加によって、carB (SEQ ID NO: 7) を改変した。改変されたタンパク質 (本明細書では「CarB60」と称する) を作製するために、carBをまず、pET15bベクター中に、以下のプライマーを用いてクローニングした：

20

5'-GCAATTCATATGACGAGCGATGTTCACGA-3' (SEQ ID NO:20);および

5'-CCGCTCGAGTAAATCAGACCGAACTCGCG (SEQ ID NO:21)

。

【 0 1 1 2 】

pET15b-carB構築物は、carB遺伝子上流に隣接する60ヌクレオチドを含んでいた：

5'-

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG
CCAT (SEQ ID NO:22)

。

【 0 1 1 3 】

融合タグ型のcarBをcarB60と再命名した。続いて、pET15b_carB60を制限酵素NcoIおよびHindIIIを用いて消化して、同じ酵素で切断したpCL1920由来ベクターOP80中にサブクローニングした。このプラスミドを菌株V324 (MG1655 fadE::FRT fhuA::FRT fabB::A32 9V entD::T5-entD lacIZ::P_{TRC}-TetA) に形質転換により導入して、FALC産生について評価した。菌株を標準的な手順に従って発酵させて (以下に概要を示す)、総脂肪種力価および総脂肪アルコール力価を定量した。図10は、CarB60により脂肪アルコール力価が増大することを示しており、それ故、マルチコピープラスミドから発現させた場合にCarB60酵素はCarBよりも高い全細胞活性を有する。

40

【 0 1 1 4 】

産生菌株における脂肪アルコールの産生について評価するために、形質転換体を、抗生物質 (100mg/L) を加えた2mlのLBブロス中において37 °Cで増殖させた。終夜増殖させた後に、40μlの培養物を、抗生物質を加えた2mlの新たなLBに移した。3時間の増殖後に、2mlの培養物を、20μlの微量ミネラル溶液、10μg/Lクエン酸第二鉄、1μg/Lチアミン、およ

50

び抗生物質を加えた、3%グルコースを有する20mlのM9培地（FA2培地）を含有する125mLフラスコに移した。培養物のOD₆₀₀が1.0に達した時点で、1mMのIPTGを各フラスコに添加した。37℃で20時間増殖させた後、各フラスコから400μlの試料を回収し、400μlの酢酸ブチルによって脂肪アルコールを抽出した。改善されたCarB活性の機序をさらに解明するために、'TesA（MG1655 fadE::FRT fhuA::FRT fabB::A329V entD::P_{T5}-entD）を含まない菌株D178からCarB60を精製した。手短に述べると、pCL1920_carB60を、脂肪アルコールの産生用に遺伝子操作された菌株D178に形質転換により導入し、スペクチノマイシン（100μg/ml）を加えたFA-2培地中で37℃で発酵を実施した。培養物のOD₆₀₀が1.6に達した時点で、1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）によって細胞を誘導し、37℃でさらに23時間培養した。CarB60の精製のために、細胞を4℃、4,500rpmで20分間遠心分離することにより回収した。細胞ペースト（10g）を12mlのBugBuster MasterMix（Novagen）およびプロテアーゼインヒビターカクテル溶液中に懸濁させた。細胞をフレンチプレスによって破碎し、得られたホモジネートを、細胞片を除去するために10,000rpmで遠心分離した。得られた混合物にNi-NTAを添加し、懸濁液を回転振盪機にて4℃、100rpmで1時間回旋させた。スラリーをカラムに注ぎ入れ、フロースルーを収集した。Ni-NTA樹脂を、300mM NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0中の10mMイミダゾールで洗浄し、300mM NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0中の20mMイミダゾールでさらに洗浄した。CarB60タンパク質を、300mM NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0中の250mMイミダゾールによって溶出させ、SDS-PAGEによって分析した。このタンパク質を50リン酸ナトリウム緩衝液pH 7.5中の20%（v/v）グリセロールに対して透析したところ、培養物1リットル当たりおよそ10mgのCarB60が得られた。タンパク質を急速凍結し、必要時まで-80℃で貯蔵した。

【0115】

CarB60タンパク質は、マルチコピープラスミドから大量に発現された。さらなるSDS-PAGE分析により、CarB60はCarBよりも高発現されたことが示された。CarB60の発現レベルがより高いことから、大腸菌染色体に組み込まれたcarB60遺伝子は、同じ場所にあるcarB遺伝子よりも多くのタンパク質を産生することが示唆された。この仮説を検証するために、carB60遺伝子は大腸菌染色体に組み込んだ。手短に述べると、carB60遺伝子をまず、pCL_carB60から、順方向プライマー：

5'-ACGGATCCCCGGAATGCGCAACGCAATTAATGTaAGTTAGCGC-3'（SEQ ID NO:23）
；および逆方向プライマー：

5'-TGCGTCATCGCCATTGAATTCCTAAATCAGACCGAACTCGCGCAGG-3'（SEQ ID NO:24）

を用いて増幅した。

【0116】

第2のPCR産物は、ベクターpAH56から、順方向プライマー：

5'-ATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'（SEQ ID NO:25）

；および逆方向プライマー：

5'-AATGGCGATGACGCATCCTCACG-3'（SEQ ID NO:26）

を用いて増幅した。

【0117】

この断片は、カナマイシン耐性カセット、attP部位、およびR6k複製起点を含む。2つのPCR産物をInFusionキット（Clontech）を用いて連結して、プラスミドpSL116-126を作製した。組み込まれた形態の'TesA12H08およびヘルパープラスミドpINTを含む脂肪アルコール産生菌株を、carB60遺伝子を含むpSL116-126またはcarB遺伝子を含むプラスミドF27のいずれかで形質転換した。これらの菌株を、上記のように、振盪フラスコ発酵のための標準的な手順に従ってFA2培地中で発酵させた。脂肪アルコールおよび脂肪酸エステルを特徴づけかつ定量するために、フレイムイオン化（「FID」）検出と連結したガスクロ

マトグラフィー（「GC」）を用いた。粗抽出物をBSTFA（N,O-ビス[トリメチルシリル]トリフルオロアセトアミド）で誘導体化した後に、GC/FIDを用いて分析した。定量は、上記のGC法を用いてさまざまな濃度の適切な基準参照を注入することによって行い、かつまた、ガスクロマトグラフィー（GC）、質量分析（MS）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、液体クロマトグラフィー（LC）、フレイムイオン化検出器と連結したGC（GC-FID）、GC-MS、およびLC-MSを含むが、これに限定されないアッセイ法を用いることができる。ポリペプチドの発現を試験する場合には、ウエスタンブロット法およびドットブロット法などの手法を用いる。

【0118】

20時間後の発酵の結果を図11に示している。2つの菌株の総脂肪産生力価は同程度である（2.4g/Lの総脂肪種）が、組み込まれたCarB60は、N末端タグを有さないCarBと比較して、より多くの割合のC12およびC14鎖長の遊離脂肪酸を脂肪アルコールに変換する。これらのデータは、CarB60を発現する細胞が、より高い全細胞カルボン酸レダクターゼ活性を有し、かつより多くのFFAを脂肪アルコールに変換できることを示唆する。したがって、carB60は染色体に組み込まれた場合、carB遺伝子を進化させて改良carB変異体を同定するための所望の活性をもたらす、改良されたcarBテンプレートとなる。

【0119】

実施例7

CarB突然変異体の作製

CarB酵素は、ある特定の処理条件下において脂肪アルコールの産生の律速段階である。脂肪アルコールを経済的に産生するために、CarB酵素の活性を高めるための取り組みを行った。

【0120】

エラーブローンPCRライブラリーのスクリーニング：

エラーブローンPCRを用いるランダム突然変異誘発を、DNAポリメラーゼのコピー忠実度が低い条件下で行った。遊離脂肪酸の脂肪アルコールへの変換を増大させる有益な突然変異を見いだすために、突然変異誘発させた核酸をベクター中にクローニングし、エラーブローンPCRおよびその後ハイスループットスクリーニングを行った（以下に詳述する）。重要な残基を他のアミノ酸へとさらに突然変異させた。いくつかの単一のアミノ酸突然変異および突然変異の組み合わせが、脂肪アルコールに変換される脂肪種の割合を増加させた。手短に述べると、Genemorph IIキット（Stratagene）を用いるエラーブローンPCRによって、carB60opt遺伝子中にランダム突然変異を誘発した。クローニングを容易にするために、突然変異はcarB60optの2つのドメインの一方のみに別々に誘発した。ライブラリー1はcarB60optの先頭の759残基を含み、これはプライマー：

HZ117 5'-ACGGAAAGGAGCTAGCACATGGGCAGCAGCCATCATCAT-3'

(SEQ ID NO:27); および

DG264 5'-GTAAAGGATGGACGGCGGTCACCCGCC-3' (SEQ ID NO:28)

を用いるエラーブローンPCRによって作製した。ライブラリー1用のベクターは、酵素NheI およびPshAIで消化したプラスミドpDG115とした。ライブラリー2はcarB60optの末尾の435残基を含み、これはプライマー：

DG263 5'-CACGGCGGGTGACCGCCGTCCATCC-3' (SEQ ID NO:29); および

HZ118 5'-TTAATTCCGGGGATCCCTAAATCAGACCGAACTCGCGCAGGTC-3'

(SEQ ID NO:30)

を用いるエラーブローンPCRによって作製した。

【0121】

ライブラリー2用のベクターは、酵素PshAIおよびBamHIで消化したプラスミドpDG115と

した。エラープローンインサートを、InFusion Advantage (Clontech) を用いてベクター中にクローニングして、クローニング用菌株NEB Turbo (New England Biolabs) によって継代した。続いて、ライブラリーを菌株EG442 (EG149 Tn7::P_{TRC}-ABR lacI_Z::P_{T50}-ABR) に形質転換により導入した。続いて、エラープローンcarB60optクローンを、脂肪アルコールの産生を測定するためにハイスループットスクリーニングに供した。手短に述べると、コロニーを選び取り、LBを含有するディープウェルプレートに入れて、終夜増殖させ、新たなLBに播種して3時間増殖させ、新たなFA-2.1培地に播種して、16時間増殖させ、続いて酢酸ブチルを用いて抽出した。粗抽出物をBSTFA (N,O-ビス[トリメチルシリル]トリフルオロアセトアミド) で誘導体化し、標準的なGC/FID法を用いて分析した。pDG115プラスミドの選択を維持するために、すべての培地にスペクチノマイシン (100mg/L) を含めた。対照菌株と比較してより小さな総遊離脂肪酸力価およびより大きな総脂肪アルコール力価を生じたクローンを選ぶことにより、ヒットを選択した。異なる発酵スクリーニングに由来するヒットを比較するために、標準化遊離脂肪酸パーセンテージNORM FFA = 突然変異体の%FFA / 対照の%FFA (式中、「%FFA」とは、総遊離脂肪酸種力価を総脂肪種力価によって除算したものである) を計算することにより、遊離脂肪酸の脂肪アルコールへの変換を標準化した。ヒットを、以下に述べるような振盪フラスコ発酵を用いるさらなる検証に供した。

【 0 1 2 2 】

有益な突然変異を同定するために、ヒットのシークエンシングを行った。シークエンシングは、プライマー
SL59 5'- CAGCCGTTTATTGCCGACTGGATG-3' (SEQ ID NO:31); および

EG479 5'- CTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCGTTC-3' (SEQ ID NO:32)

を用いるcarB60opt遺伝子全体のコロニーPCRによって行い、carB60opt酵素の内部にあるプライマーを用いてシークエンシングを行った。

【 0 1 2 3 】

CarB60opt酵素を改善させた有益な突然変異を表7に示している。標準化遊離脂肪酸 (NORM FFA) の列は酵素の改善を示しており、値が小さいほど優れた改善であることを示す。

「ウェル番号」は、この突然変異が見いだされた一次スクリーニングウェルを示している。残基番号はすべて、60bpタグを含まないCarBタンパク質配列を基準としている。「タグ:」という表示が先頭に付された突然変異は、60 bp/20残基N末端タグにおける突然変異を示している。

【 0 1 2 4 】

(表7) エラープローンスクリーニングで同定されたCarB酵素における有益な突然変異 (タグ突然変異は除く)

ウェル番号	Norm FFA	ミスセンス突然変異	サイレント突然変異
131B08	70.50%	L799M V810F S927R M1062L A1158V F1170I	CCG1116CCT
20C07	71.80%	A535S	
65B02	74.70%	M930R	ACC867ACA
54B10	76.30%	L80Q T231M F288L A418T V530M A541V G677D P712A	
67E1	78.20%	D750G R827C D986G G1026D P1149S	GCA1031GCT GTC1073GTT
65C03	78.90%	V926A	ATT941ATA
12C10	80.30%	V46I	
66E08	80.10%	V926A	
70F02	80.90%	D750G R827C D986G G1026D P1149S	GCA1031GCT GTC1073GTT
07D01	82.40%	E20K V191A	
66G09	82.40%	R827C L1128S	ACG780ACA CTG923TTG
25H02	83.50%	F288S	
06C01	85.10%	V46I	06C01
05D02	85.20%	T396S	CCG477CCT
124E03	86.00%	R827C L1128S	ACG780ACA CTG923TTG
17A04	86.20%	A574T	GCA237GCT ACC676ACT GCC529GCT
132C08	87.00%	M1062T R1080H	TTG830TTA TAC834TAT
72C09	87.30%	P809L M1062V	
10F02	87.70%	E636K	
71H03	88.10%	R827C L1128S	ACG780ACA CTG923TTG
38G04	88.90%	D143E A612T	GCA181GCG
42F08	90.20%	T90M	CTG186CTT
66C04	90.30%	L1128S	
18C03	90.40%	Q473L	
12E02	90.60%	D19N S22N R87H L416S	CCG167CCA
28B09	91.10%	E28K H212N Q473L	CCG122CCA ACG178ACA CTG283TTG CTG340CTA ACC401ACT GCA681GCG
103E09	92.20%	E936K P1134R	CGT829CGG CTG1007CTA
03E09	93.20%	M259I	
74G11	93.80%	I870V S927I S985I I1164F	GTG1000GTC
46C01	95.60%	D18V D292N	

10

20

【 0 1 2 5 】

飽和突然変異誘発（Combo 1および2ライブラリーを作製）：

エラーブローンPCRの後に脂肪アルコールの産生に有益であると考えられたアミノ酸位置を、さらなる突然変異誘発に供した。縮重ヌクレオチドNNKまたはNNSを含むプライマーを用いて、これらの位置を他のアミノ酸に突然変異させた。得られた「飽和突然変異誘発ライブラリー」を、エラーブローンライブラリーに関して上述したようにスクリーニングし、脂肪アルコール変換をさらに改善するヒット（親の「対照」菌株と比較して、総遊離脂肪酸力価がより小さく総脂肪アルコール力価がより大きいもの）を同定した。脂肪アルコールの産生を改善する9つの異なる位置における単一のアミノ酸／コドン変化を表8に示している。ヒットを、本明細書に述べたような振盪フラスコ発酵を用いるさらなる検証に供した。

30

【 0 1 2 6 】

（表8）アミノ酸飽和突然変異誘発で同定されたCarB酵素における有益な突然変異

野生型アミノ酸	野生型コドン	突然変異型アミノ酸	突然変異型コドン	Norm FFA
E20	GAG	F	TTC	92.20%
		L	CTG	94.50%
		L	TTG	96.20%
		R	CGC	86.50%
		S	TCG	87.40%
		V	GTG	86.00%
		V	GTC	85.30%
		Y	TAC	88.80%
V191	GTC	A	GCC	88.70%
		S	AGT	98.00%
F288	TTT	G	GGG	70.30%
		R	AGG	77.20%
		S	TCT	85.60%
		S	AGC	79.60%
Q473	CAA	A	GCG	89.50%
		F	TTC	89.10%
		H	CAC	84.10%
		I	ATC	77.20%
		K	AAG	90.30%
		L	CTA	90.10%
		M	ATG	89.00%
		R	AGG	88.00%
		V	GTG	89.20%
		W	TGG	84.50%
		Y	TAC	86.00%
A535	GCC	A	TCC	71.80%
R827	CGC	A	GCC	93.20%
		C	TGT	87.90%
		C	TGC	83.20%
V926	GTT	A	GCT	78.10%
		A	GCG	66.30%
		A	GCC	69.50%
		E	GAG	65.80%
		G	GGC	78.60%
S927	AGC	G	GGG	77.60%
		G	GGT	79.30%
		I	ATC	90.80%
		K	AAG	70.70%
		V	GTG	87.90%
M930	ATG	K	AAG	82.30%
		R	CGG	73.80%
		R	AGG	69.80%
L1128	TTG	A	GCG	92.70%
		G	GGG	89.70%
		K	AAG	94.80%
		M	ATG	95.80%
		P	CCG	98.40%
		R	AGG	90.90%
		R	CGG	88.50%
		S	TCG	88.90%
		T	ACG	96.30%
		V	GTG	93.90%
		W	TGG	78.80%
		Y	TAC	87.90%

10

20

30

【 0 1 2 7 】

40

次に、脂肪アルコールの産生のために有益と考えられるアミノ酸置換を組み合わせた。PCRを用いて、さまざまな所望の突然変異を含むcarBopt遺伝子の部分を増幅し、それらの部分をPCRベースの方法を用いて一緒に連結させた (Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. 1989)。carBopt遺伝子は60bp N末端タグを含めずにスクリーニングした。この組み合わせライブラリーで組み合わせた突然変異を表9に示している。

【 0 1 2 8 】

(表9) 第1の組み合わせライブラリーからのCarB突然変異

突然変異	コドン
E20V	GTG
E20S	TCG
E20R	CGC
V191S	AGT
F288R	AGG
F288S	AGC
F288G	GGG
Q473L	CTG
Q473W	TGG
Q473Y	TAC
Q473I	ATC
Q473H	CAC
A535S	TCC

10

【 0 1 2 9 】

スクリーニングを容易にするために、得られたCarB組み合わせライブラリーを、続いて菌株V668の染色体のlacZ座位に組み込んだ。この座位でのcarBopt遺伝子の配列はSEQ ID NO: 7として提示されている。菌株V668の遺伝子型は、MG1655 (fadE::FRT fhuA::FRT fabB::A329V entD::T5-entD insH-11::P_{lacUV5} fab138 rph+ ilvG+) である (表3 および図16に示されている)。続いて、これらの菌株を、TesAと、ホスホパンテテイン付着部位を破壊する触媒的に不活性なCarB酵素であるCarB [S693A] と、遊離脂肪酸の産生を増加させる他の遺伝子とを含むプラスミドpVA3で、形質転換した。組み合わせライブラリーを、エラープローンライブラリーに関して上述したようにスクリーニングした。lacZ領域にcarB opt (A535S) が組み込まれかつpVA3を含むV668を、対照として用いた。脂肪アルコールの産生を増加させたヒットを選択し、実施例5に記載したような振盪フラスコ発酵を用いるさらなる検証に供した。CarBの組み合わせ突然変異体を発現する組換え宿主細胞の振盪フラスコ発酵後の脂肪アルコール産生のパーセンテージの改善を、図12に示している。

20

30

【 0 1 3 0 】

組み込まれたCarBの組み合わせ突然変異体を、組み込まれたcarBのヒットから、以下のプライマーを用いてPCRにより増幅した：

EG58 5'- GCACTCGACCGGAATTATCG (SEQ ID NO:33); および

EG626 5'- GCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAG (SEQ ID NO:34)

。

【 0 1 3 1 】

これらのインサートを、以下のプライマーを用いて再び増幅した：

DG243 5'- GAGGAATAAACCATGACGAGCGATGTTACGACGCGACCGACGGC

(SEQ ID NO:35); および

DG210 5'- CTAAATCAGACCGAACTCGCGCAGG (SEQ ID NO:36)

。

【 0 1 3 2 】

プールしたcarB突然変異体を、InFusionクローニングを用いて産生プラスミドpV869中にクローニングし、これを以下のプライマーを用いてPCR増幅した：

40

DG228 5'-CATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCGATAC(SEQ ID NO:37);および
DG318 5'-TGACCTGCGCGAGTTCGGTCTGATTTAG (SEQ ID NO:38)

。

【 0 1 3 3 】

振盪フラスコ発酵プラスミドスクリーニングで最も優れた機能を示したcarB突然変異体 (carB2; 表11) をVA101と命名し、carBopt [A535S] を保持する対照菌株をVA82と命名した。図13参照。

【 0 1 3 4 】

脂肪アルコールの産生のために有益と考えられたcarBの還元ドメインにおけるアミノ酸置換を、最も優れたcarB-L組み合わせライブラリーヒットの1つである「carB3」と組み合わせた(表11)。PCRを用いて、還元ドメイン内にさまざまな所望の突然変異を含むcarBopt遺伝子の部分を増幅し、それらの部分をSOE PCRを用いて一緒に連結した。この組み合わせライブラリーで組み合わせさせた突然変異を表10に示している。

【 0 1 3 5 】

(表10) 第2の組み合わせライブラリーからのCarB突然変異

突然変異	コドン
R827C	TGC
R827A	GCA
V926A	GCG
V926E	GAG
S927K	AAG
S927G	GGG
M930K	AAG
M930R	AGG
L1128W	TGG

【 0 1 3 6 】

この組み合わせライブラリーを、エラープローンライブラリーに関して上述したようにスクリーニングした。lacZ領域にcarB3が組み込まれかつpVA3を含むV668を、対照として用いた。脂肪アルコールの産生の増加を示したヒットを選択し、上記のように振盪フラスコ発酵を用いるさらなる検証に供した。さらなるCarB組み合わせ突然変異(carB4)を用いて脂肪アルコール産生のパーセンテージの改善を示す振盪フラスコ発酵の結果を、表11に示している。低コピーCarB変異体の相対変換効率のグラフ図は図14に提示されている。表11に報告されている結果は、同一条件下で実施したバイオリアクター試験に由来する。

【 0 1 3 7 】

(表11) CAR変異体

名称	突然変異	菌株	タンクデータ	注記
carB	なし=野生型 (E20 V191 F288 Q473)			タンパク質はSEQ ID NO:7である
carB60	なし+タグ	V324		
carB1	A535S	V940	83% FALC; C12/C14=3.4	12H08染色体TEのコピーを1つ有する
carB2	E20R, F288G, Q473I, A535S	LH375	97% FALC; C12/C14=3.6	12H08染色体TEのコピーを2つ有する
carB2	E20R, F288G, Q473I, A535S	LH346	96% FALC; C12/C14=3.7	12H08染色体TEのコピーを1つ有する
carB3	E20R, F288G, Q473H, A535S	L組み合わせライブラリー	現在までバイオリアクターでの試験例なし	
carB4	E20R, F288G, Q473H, A535S, R827A, S927G	R組み合わせライブラリー (VA-219)	97% FALC; C12/C14=3.9	12H08染色体TEのコピーを2つ有する
carA	なし	米国特許公開第20100105963号を参照		タンパク質はSEQ ID NO:39である
FadD9	なし	米国特許公開第20100105963号を参照		タンパク質はSEQ ID NO:40である

CarA、FadD9、CarB、およびCarB60のDNA配列は、本明細書において、それぞれSEQ ID NO : 41、42、43および44として提示されている。

【 0 1 3 8 】

飽和突然変異誘発による、CarB酵素におけるさらなる有益な突然変異の同定：

後に二重プラスミドスクリーニング系を開発し、FALC産生に関してCarB4を上回る改良されたCarB変異体を同定するための検証を行った。この二重プラスミド系は以下の基準を満たした：1) 突然変異型クローンが、CarB活性を上回る脂肪酸の流れをもたらすための高いFA力価を生じること。これは、基準菌株（染色体TEのコピーを2つ有するV668）を、触媒的に不活性なCarB酵素であるCarB [S693A] を有するFALCオペロンを保持するプラスミド（pLYC4、pCL1920_P_{TRC}-carDead_tesA_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR）で形質転換して、遊離脂肪酸の産生を強化することによって実現される；2) 好ましくは9kbよりも小さなcarB突然変異体テンプレート有するスクリーニング用プラスミドが飽和突然変異誘発手順に適用可能であり、かつpLYC4による発現に互換性があること；3) CarB活性のダイナミックレンジが調整可能であること。これは、CarB4発現レベルを調整するために、比較的弱いプロモーター（P_{TRC1}）と代替的な開始コドン（GTGまたはTTG）を組み合わせることによって達成される。3) 優れたプラスミド安定性、プラスミド安定性を維持するために毒素/抗毒素モジュール（ccdBAオペロン）を導入した。

【 0 1 3 9 】

手短に述べると、In-Fusion HDクローニング法（Clontech）を用いて、4つの部分（P_{TRC1}、ATG/TTG/GTG開始コドン有するcarB4、ccdAB有するrrnB T1T2終結因子、およびpACYCDuet-1ベクター）を等モル比で混合することによって、4つの部分からスクリーニング用プラスミドpBZ1（pACYCDuet-1_P_{TRC1}-carB4GTG_rrnBter_ccdAB）を構築した。これらの部分（1~4）は、以下のプライマー対：（1）P_{TRC1} 順方向プライマー

5'-CGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCAAATCCGGCTCGTATAATGTGTG-3' (SEQ ID NO:45)

および逆方向プライマー

5'-GGTTTATTCCTCCTTATTTAATCGATACAT-3' (SEQ ID NO:46)

により、pVA232（pCL1920_P_{TRC}-carB4_tesA_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR）プラスミドをテンプレートとして用いてPCR増幅した。（1）ATG/TTG/GTG開始コドン有するcarB4 順方向プライマー

carB4 ATG

5'-ATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCATGGGCACGAGCGATGTTTCACGACGCGAC-3' (SEQ ID NO:47); carB4 GTG

5'-ATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCCTGGGCACGAGCGATGTTTCACGACGCGAC-3' (SEQ ID NO:48); および carB4 TTG 5'-

ATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCTTGGGCACGAGCGATGTTTCACGACGC GAC-3' (SEQ ID NO:49)

; ならびに逆方向プライマー carB4 rev

5'-TTCTAAATCAGACCGAACTCGCGCAG-3' (SEQ ID NO:50)

により、pVA232プラスミドをテンプレートとして用いた。（3）ccdAB有するrrnB T1T2終結因子 順方向プライマーrrnB T1T2 term

5'-CTGCGCGAGTTCGGTCTGATTTAGAATTCCTCGAGGATGGTAGTGTGG-3' (SEQ ID NO:51)

および逆方向プライマーccdAB rev

5'-CAGTCGACATACGAAACGGGAATGCGG-3' (SEQ ID NO:52)

により、プラスミドpAH008（pV171_ccdBAオペロン）を用いた。（4）pACYCDuet-1ベクター骨格 順方向プライマーpACYCベクターfor

5'

CCGCATTCCCGTTTCGTATGTCGACTGAAACCTCAGGCATTGAGAAGCACACGGTC-
3' (SEQ ID NO:53)

および逆方向プライマーpACYCベクターrev

5'-

CTCATTTTCAGAATATTTGCCAGAACCGTTAATTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAG-3'
(SEQ ID NO:54)

を用いた。

10

【 0 1 4 0 】

上記の菌株においてpBZ1プラスミドをpLYC4と共発現させ、振盪フラスコ発酵およびディープウェルプレート発酵によって検証した。発酵条件は、実施例5に記載したようないずれの発酵プラットフォームにおいても、CarB4_GTGテンプレートが再現性をもってほぼ65%のFALC変換を有するように最適化した。振盪フラスコ発酵に関する結果は図15に示している。

【 0 1 4 1 】

改良されたCarB変異体における突然変異を含むさらなる部位 (18、19、22、28、80、87、90、143、212、231、259、292、396、416、418、530、541、574、612、636、677、712、750、799、809、810、870、936、985、986、1026、1062、1080、1134、1149、1158、1161、1170) (表7) を、完全飽和突然変異誘発に供した。縮重ヌクレオチドNNKまたはNNSを含むプライマーを用いて、PCRベースの方法により、これらの位置を他のアミノ酸に突然変異させた (Sawano and Miyawaki 2000, Nucl. Acids Res. 28: e78)。飽和ライブラリーは、pBZ1 (pACYCDuet-1_P_{TRC1}-carB4GTG_rrnBter_ccd AB) プラスミドテンプレートをを用いて構築した。突然変異型クローンを、NEB Turbo (New England Biolab) クローニング用菌株に形質転換により導入し、プラスミドを単離してプールした。続いて、プールしたプラスミドを、プラスミドpLYC4を保持するV668ベースの菌株に形質転換により導入し、形質転換体を、抗生物質 (100mg/Lスペクチノマイシンおよび34mg/Lクロラムフェニコール) を加えたLB寒天プレート上で選択した。

20

【 0 1 4 2 】

続いて、飽和ライブラリーに由来するCarB変異体を、脂肪アルコールの産生に関してスクリーニングした。実施例5に記載したような改変ディープウェルプレート発酵プロトコールに従い、単一のコロニーを選び取り96ウェルプレートに直接入れた。対照菌株と比較してより小さな総遊離脂肪酸力価およびより大きな総脂肪アルコール力価を生じたクローンを選ぶことにより、ヒットを選択した。異なる発酵バッチに由来するヒットを比較するために、標準化遊離脂肪酸のパーセンテージを計算することにより、遊離脂肪酸の脂肪アルコールへの変換を標準化した。実施例5に記載したようなNORM FFA (%) もヒットの検証に用いた。NORM FFA (%) = 突然変異体の%FFA / 対照の%FFAであり、式中、「%FFA」は、総遊離脂肪酸種力価を総脂肪種力価によって除算したものである。ヒットを、実施例5に述べたような振盪フラスコ発酵を用いるさらなる検証に供した。標準化遊離脂肪酸 (NORM FFA) の列は酵素の改善を示しており、値が小さいほど優れた改善であることを示す。「ヒットID」は、より低値のNORM FFA表現型が見いだされた一次スクリーニングプレートウェルの位置を示している。ヒットの突然変異は、pBZ1プラスミドを含む「ヒット」から、突然変異型carB遺伝子特異的プライマー (BZ1 for

30

40

5'-GGATCTCGACGCTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO:55)

およびBZ12_ccdABユニークプライマー

5'-TCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTG-3' (SEQ ID NO:56)

) を用いて増幅したPCR産物をシーケンシングすることによって同定した。NORM FFA値および検証したヒットにおいて同定された突然変異を表12にまとめている。

50

【 0 1 4 3 】

(表 1 2) アミノ酸飽和突然変異誘発で同定された、CarB4酵素における有益な突然変異

野生型アミノ酸	野生型コドン	ヒットID(アミノ酸)	突然変異型コドン	NORM FFA(%)
D18	GAT	P10H5(R)	AGG	75.5
		P6B4(L)	CTG	83.6
		P4H11(T)	ACG	80.8
		P8D11(P)	CCG	81.8
S22	AGC	P1F3(R)	AGG	57.7
		P2G9(R)	AGG	55.7
		P2A7(N)	AAC	90
		P8D7(G)	GGG	82.1
L80	CTG	P8H11(R)	AGG	87.4
R87	CGT	P7D7(G)	GGG	85.2
		P5D12(E)	GAG	89.4
D750	GAT	P8F11(A)	GCG	87.6
I870	ATT	P3A12(L)	CTG	76.6

10

【 0 1 4 4 】

完全コンビナトリアル突然変異誘発によるCarB酵素の新規変異体の同定

20

完全コンビナトリアルライブラリーを、以下のアミノ酸残基を含むように構築した：18 D、18R、22S、22R、473H、473I、827R、827C、870I、870L、926V、926A、926E、927S、927K、927G、930M、930K、930R、1128Lおよび1128W。PCRベースの方法によってライブラリーを構築するために(Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. 1989)、天然コドンおよび突然変異型コドンをすべての位置に含むプライマーを設計した。CarB2、CarB3、およびCarB4で保存されている有益な突然変異(20R、288G、および535S)は変化させず、このため、carB2GTGをpBZ1中にクローニングしたもの(改変pBZ1_P_{TRC1}_carB2GTG_ccdAB)をPCRテンプレートとして用いた。ライブラリー構築は、PCR断片をアセンブルして、上記のコンビナトリアル突然変異を含むCarB ORFとすることによって完了した。続いて、突然変異型CarB ORFを、In-Fusion法(Clontech)を用いて、pBZ1 30 骨格中にクローニングした。In-Fusion産物を沈降させ、プラスミドpLYC4を保持するスクリーニング用菌株へエレクトロポレーションにより直接導入した。ライブラリーのスクリーニング、ディープウェルプレートおよび振盪フラスコ発酵は、実施例5に記載した通りに実施した。特定のコンビナトリアル突然変異を有するCarB突然変異体の活性(CarB2、100%によって標準化したNORM FFA)を、表13にまとめている。CarB2、CarB4、およびCarB5(CarB4-S22R)を対照として含めている。NORM FFAの列はCarB酵素の改善を示しており、値が小さいほど優れた改善を示している。対照(CarB2)に対する改善倍率(X-FIOC)も示している。列記した突然変異はすべて、CarB wtのポリペプチド配列(SEQ ID NO:7)を基準としている。例えば、CarB1はA535S突然変異を有し、CarBDead(触媒的に不活性なCarB酵素)は、ホスホパンテテイン付着部位を破壊するS693A突然変異を保持する。 40

【 0 1 4 5 】

バイオリクターにおける脂肪アルコール産生の改良のための新規CarB変異体

表13に列記した新規CarB変異体を同定した目的は、それらを脂肪アルコール産生の改良に用いることである。表13の一番上のCarB変異体(P06B6 S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930R、L1128W)は、位置3に自然突然変異(野生型AGCからAGAへ)を保持する。P06B6 CarB変異体、すなわちCarB7(位置3はAGAによりアミノ酸R S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930R、L1128W)およびCarB8(位置3はAGCにより野生型アミノ酸S E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930R、L1128W)の両方を作製し、低コピー数の脂肪アルコール産生プラスミド骨格pCL1920中にクローニングして、CarBのみが異なる以下の脂肪アルコールオペロンを得た。最大限 50

に発現させるために、すべてのCarB変異体（CarB2、CarB7、およびcarB8）で、翻訳開始コドン（GTG）をATGに戻した。

pCL1920_P_{TRC}_carB2_tesA_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR

pCL1920_P_{TRC}_carB7_tesA_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR

pCL1920_P_{TRC}_carB8_tesA_alrAadp1_fabB[A329G]_fadR

【 0 1 4 6 】

上記のプラスミドを、染色体TEのコピーを1つ有するV668ベースの菌株に形質転換により導入し、得られた菌株を、実施例4に記載したようにバイオリアクターにてスクリーニングした。CarB2に比してのCarB7およびCarB8の改善度（バイオリアクター発酵産物における%脂肪アルコールにより測定）を図16に示した。活性の順序は、CarB7 > CarB8 > CarB2である。CarB7の位置3の突然変異（AGCからAGA R希少コドンへ）はCarB8よりも高い活性をもたらし、さらに、総可溶性タンパク質のSDS-PAGE分析により、CarB8およびCarB2よりもCarB7が高発現していることが明らかになった。CarB2およびCarB8の発現レベルは同程度であった。このことは、実施例6に記載したCarB60データと整合しており、位置3のAGAR希少コドン突然変異およびCarB60のN末端でのタグはいずれもCarB発現を改善することができる。宿主菌株を遺伝子操作することおよび/または脂肪アルコール産生オペロンの他の構成要素を遺伝子操作することのいずれかによって遊離脂肪酸の流れが増大した菌株において、CarB7およびCarB8はCarB2よりも優れた機能を示すであろうことが理解される。

【 0 1 4 7 】

（表13）二重プラスミド系におけるコンビナトリアルライブラリーから同定されたCarB変異体のまとめ

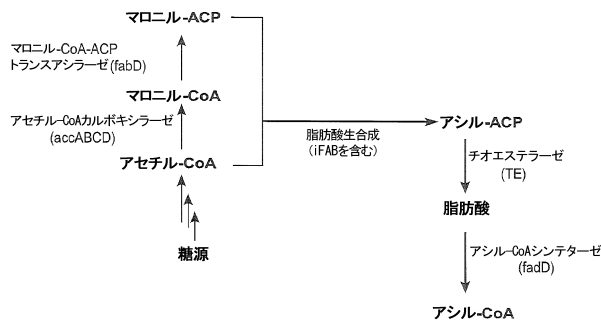
突然変異体	NORM FFA (%)	X-FIOC	突然変異
P06B6	16.5	6.06	S3R, E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R873S, S927G, M930R, L1128W
P13A3	23.9	4.18	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, S927G, M930K, L1128W
P02A2	26.5	3.77	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, V926E, S927K, M930R
P05H3	26.7	3.75	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, V926E, M930K, L1128W
P10F10	31.9	3.13	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827C, V926A, S927K, M930R
P01C12	34.2	2.92	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827C
P03B1	36.9	2.71	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, M930R
P06E4	36.9	2.71	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, I870L, S927G, M930R
P14C6	37.4	2.67	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, I870L, S927G
P05F10	40.4	2.48	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, I870L, V926A, S927G
P06C8	40.8	2.45	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827C, I870L, L1128W
P15E4	40.8	2.45	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827C, I870L, S927G, L1128W
P05H7	40.9	2.44	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, I870L, S927G, L1128W
P15A6	41	2.44	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, I870L, S927G, M930K, L1128W
P08F5	41.2	2.43	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, I870L, S927G, M930K
P14C7	41.3	2.42	E20R, F288G, Q473I, A535S, I870L, M930K
P16H10	42.1	2.38	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, S927G, M930K, L1128W
P16A1	44.1	2.27	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, S927G, L1128W
P14H4	44.2	2.26	E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, , R827C, I870L, S927G
P15C1	46.5	2.15	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, R827C, I870L, S927G, L1128W
P16E5	47.2	2.12	D18R, E20R, S22R, F288G, Q473I, A535S, S927G, M930R, L1128W
P15A3	47.2	2.12	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, V926E, S927G, M930R
P05A2	52.4	1.91	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827C, I870L, V926A, L1128W
CarB2	100	1	E20R, F288G, Q473I, A535S
CarB4	77.8	1.29	E20R, F288G, Q473H, A535S, R827A, S927G
CarB5	48.9	2.04	E20R, S22R, F288G, Q473H, A535S, R827A, S927G
CarB1	ND		A535S
CarB 野生型	ND		SEQ ID NO:7
CarBDead	ND		S693A

【 0 1 4 8 】

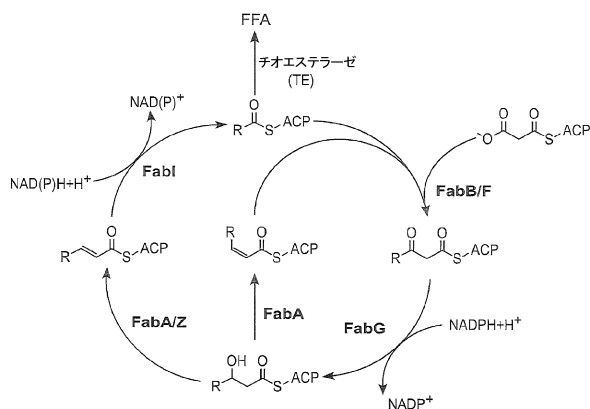
本明細書に記載されたすべての方法は、本明細書において別様に示されない限り、または文脈によって別様に明確に否定されない限り、任意の適した順序で行うことができる。本明細書において提供されるいずれかおよびすべての実施例または例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は、単に本開示をより良く説明することのみを目的としており、別様に主張されない限り、本開示の範囲に制限を課すものではない。本明細書中におけるいかなる言葉も、添付の特許請求の範囲に記載されていないいかなる要素が本開示の実施に必須であることを示すものと解釈されるべきではない。本明細書で用いた専門用語は、特定の態様を記載することのみを目的としており、限定を意図したものではないことが理解されよう。本開示の好ましい態様は本明細書に記載されている。これらの好ましい態様の变形物は、前述の説明を読むことにより、当業者には明らかになるであろう。発明者らは当業者がそのような变形物を適宜採用することを予期しており、また発明者らは、本開示が本明細書において具体的に記載されたのとは別様に実施されることも意図している。したがって、本開示は、適用される法律によって許容される、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載された主題のすべての改変物および同等物を含む。さらに、本明細書において別様に示されない限り、または文脈によって別様に明確に否定されない限り、そのすべての可能な变形物における上述の要素の任意の組み合わせが、本開示に包含される。

10

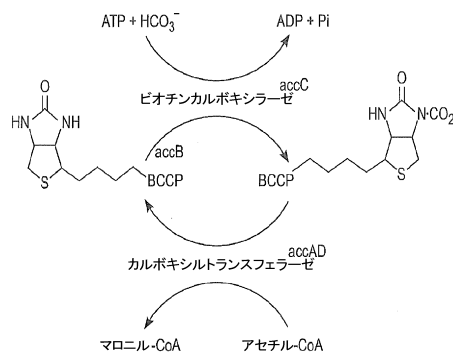
【 図 1 】



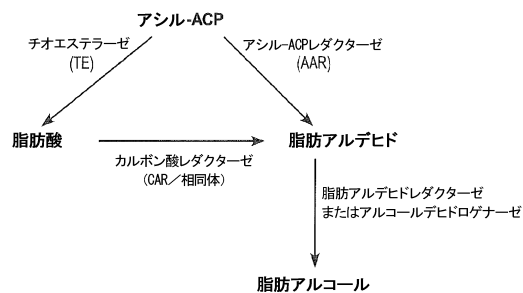
【 図 2 】



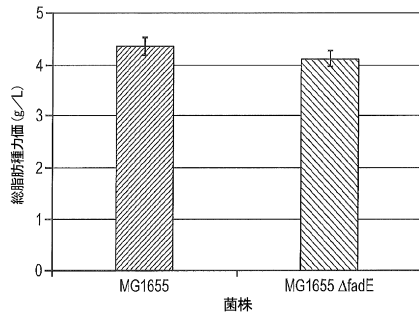
【 図 3 】



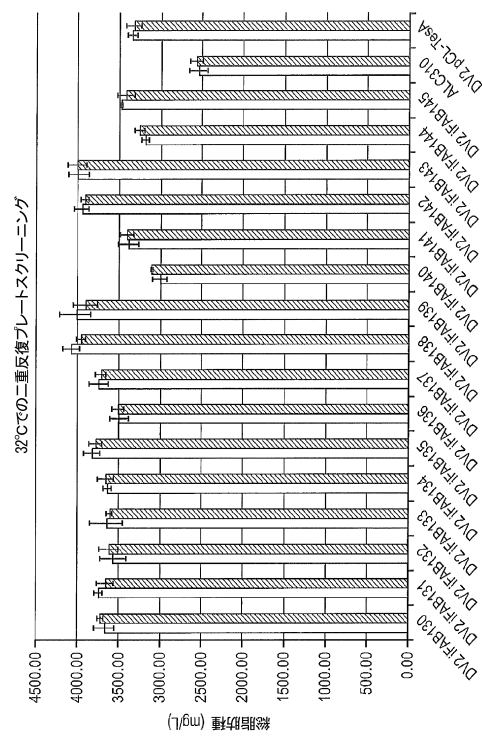
【 図 4 】



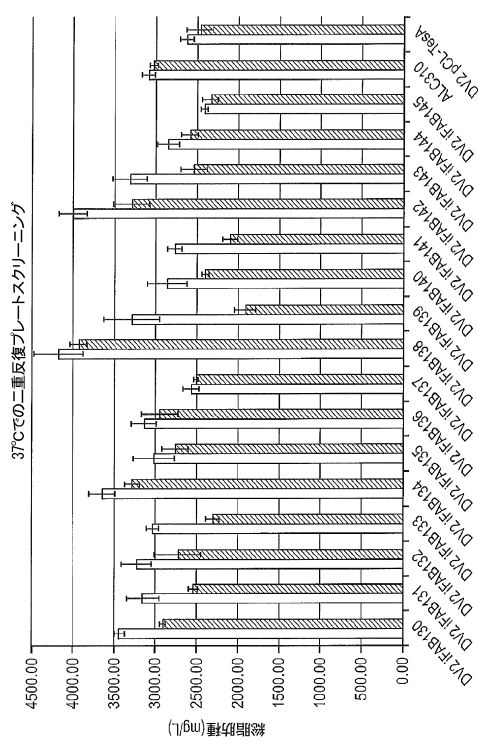
【図 5】



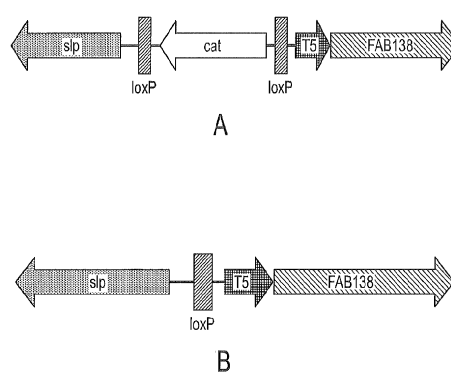
【図 6 A】



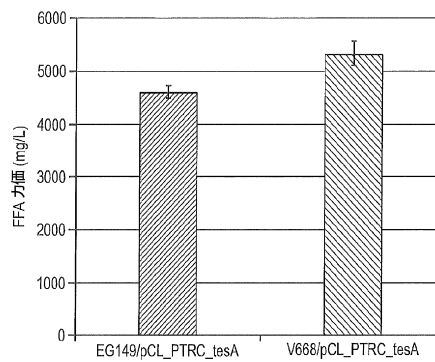
【図 6 B】



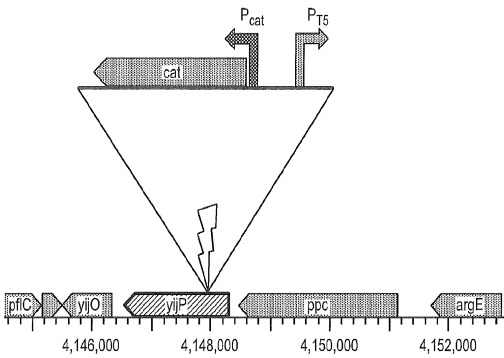
【図 7】



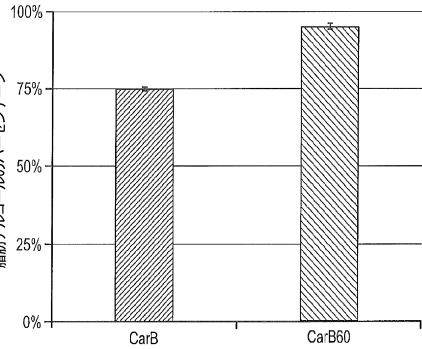
【図 8】



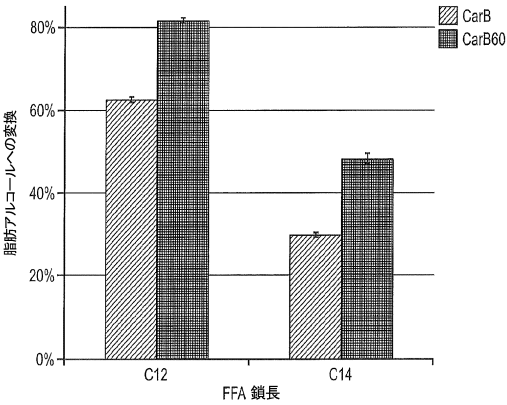
【図 9】



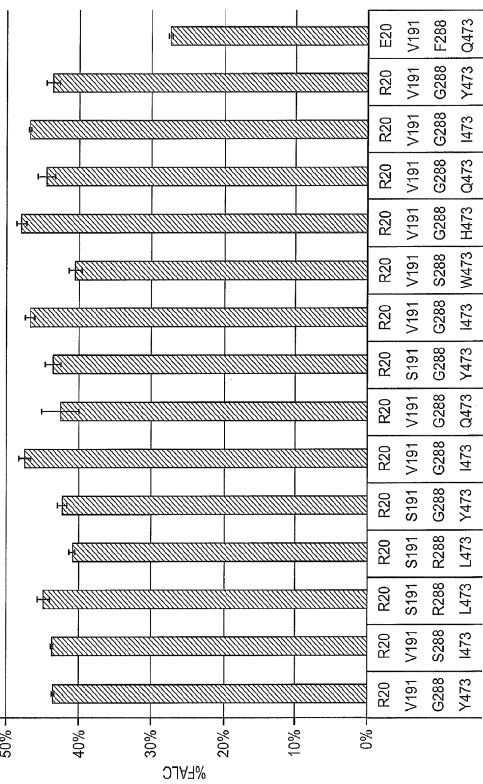
【図 10】



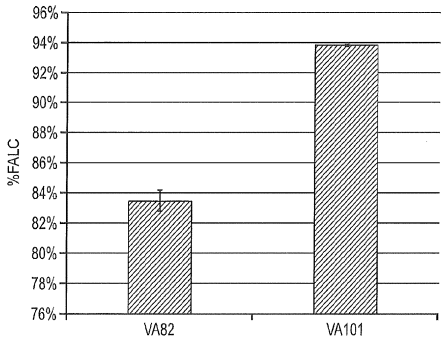
【図 11】



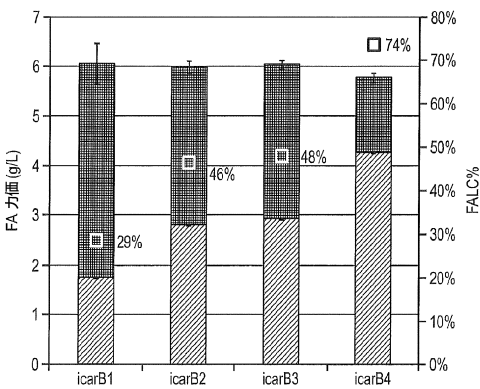
【図 12】



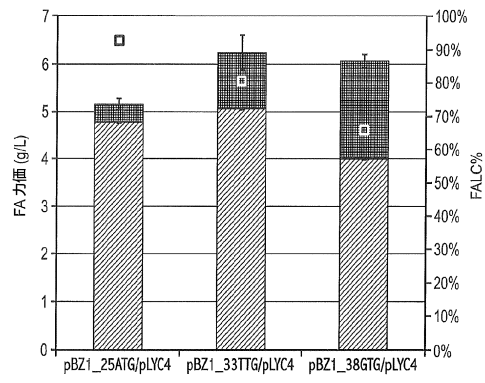
【図 13】



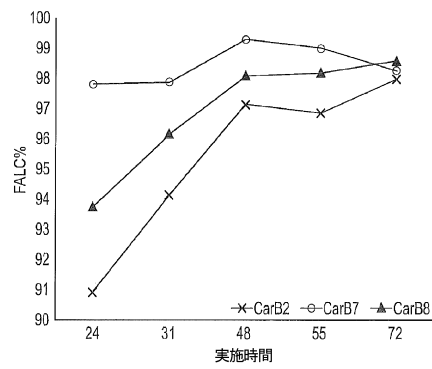
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【配列表】

0006230594000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
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
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16
C 1 2 N	9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(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 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 グリーンフィールド デレク エル.

アメリカ合衆国 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 クラーク エリザベス ジェイ.

アメリカ合衆国 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 グローバン イーライ エス.

アメリカ合衆国 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 アルラガッダ ヴィクランス

アメリカ合衆国 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 リー スンウォン

アメリカ合衆国 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 リ シュエチ

アメリカ合衆国 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 チーハオ

アメリカ合衆国 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 チュ パオロン

アメリカ合衆国 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

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0298612(US, A1)

特表2012-506715(JP, A)

国際公開第2011/047101(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d