

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5755884号
(P5755884)

(45) 発行日 平成27年7月29日 (2015. 7. 29)

(24) 登録日 平成27年6月5日 (2015. 6. 5)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 P 7/04 (2006. 01)

C 1 2 P 7/04

請求項の数 15 (全 108 頁)

(21) 出願番号 特願2010-549897 (P2010-549897)
 (86) (22) 出願日 平成21年3月5日 (2009. 3. 5)
 (65) 公表番号 特表2011-512848 (P2011-512848A)
 (43) 公表日 平成23年4月28日 (2011. 4. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/036242
 (87) 国際公開番号 W02009/111672
 (87) 国際公開日 平成21年9月11日 (2009. 9. 11)
 審査請求日 平成24年2月20日 (2012. 2. 20)
 (31) 優先権主張番号 61/034, 146
 (32) 優先日 平成20年3月5日 (2008. 3. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/090, 171
 (32) 優先日 平成20年8月19日 (2008. 8. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510199890
 ジェノマティカ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サン ディエゴ, ウォーターリ
 ッジ サークル 10520
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 サン, ジュン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 29, サン ディエゴ, プリン グレ
 ン ウェイ 8274

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第一級アルコールを産生する生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする外因性核酸およびアシル還元経路酵素をコードする外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とを有する、天然に存在しない微生物であって、前記第一級アルコールが、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ドデカノール、テトラデカノールおよびヘキサデカノールからなる群より選択され、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、天然に存在しない微生物。

【請求項 2】

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

【請求項 3】

前記外因性核酸は、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 4】

前記外因性核酸は、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 5】

アシル還元経路酵素をコードする前記外因性核酸は、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 6】

アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する前記酵素は、脂肪酸形成性アシル - C o A レダクターゼ (F A R) である、請求項 5 に記載の天然に存在しない微生物。

10

【請求項 7】

前記外因性核酸の少なくとも 1 つはさらに、異種コード核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 8】

嫌気性の培養基をさらに含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 9】

第一級アルコールを生産するための方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない微生物を、嫌気性の条件下で、前記第一級アルコールを生産するために十分な期間にわたって培養することを含む、方法。

20

【請求項 10】

前記第一級アルコールを単離することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

脂肪アシル - C o A を生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする外因性核酸を含むマロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路を有する、天然に存在しない微生物であって、前記脂肪アシル - C o A の脂肪酸鎖が 6 - 10、12、14 または 16 炭素原子を有し、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路が、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

30

【請求項 12】

前記外因性核酸は、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、請求項 11 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 13】

前記外因性核酸は、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼをコードする、請求項 11 に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 14】

前記外因性核酸の少なくとも 1 つはさらに、異種コード核酸を含む、請求項 11 に記載の天然に存在しない微生物。

40

【請求項 15】

嫌気性の培養基をさらに含む、請求項 11 に記載の天然に存在しない微生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般には生合成プロセスに関し、およびより具体的には第一級アルコール生合成能を有する生物に関する。

【背景技術】

【0002】

50

第一級アルコールは、様々なバイオ燃料および特殊化学物質を含む様々な工業用途を有する化合物の品種である。第一級アルコールは、ポリマーおよび界面活性剤をはじめとする多数のさらなる工業製品を製造するために使用することもできる。例えば、高級第一級アルコール（ $C_4 \sim C_{20}$ ）およびそれらのエトキシラートは、洗濯粉および液、食器洗浄液ならびに硬質表面用洗浄剤などの多くの消費者洗剤、清浄用品およびパーソナルケア製品において界面活性剤として世界中で使用されている。それらはまた、様々な工業化学物質の製造におよび潤滑油添加剤に使用される。オクタノールおよびヘキサノールなどの長鎖第一級アルコールは、有用な感覚刺激特性を有し、長く香水および着香剤として利用されてきた。より短鎖（ $C_4 \sim C_8$ ）の高級第一級アルコール（例えば、ブタノール）は、ペイント、塗料および接着剤用途に使用されるアクリラートなどの誘導体の生産のために化学物質中間体として使用される。

10

【0003】

第一級アルコールは、例えば、脂肪酸の水素化、末端オレフィンのヒドロホルミル化、 n -パラフィンの部分酸化およびエチレンの A_1 触媒重合から、現在、生産されている。残念なことに、石油系直鎖炭化水素（ n -パラフィン）の酸化からの直接的な第一級アルコールの生産は、商業的に成功する見込みがない。これは、非現実的である。 n -パラフィンの酸化は、主として第二級アルコール、第三級アルコールもしくはケトンまたはこれらの化合物の混合物を生成するが、高い第一級アルコール収量を生じさせないからである。加えて、現在公知の第一級アルコール生産方法は、石油の熱分解によって生産される比較的高価である供給原料、特にエチレンに限定されるという欠点を有する。さらに、現在の方法は、幾つかの段階および幾つかの触媒タイプを必要とする。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

微生物による LCA 生産は、脂肪酸合成、その後のアシル還元段階を含む。大部分の細胞において見出される一般的脂肪酸生合成経路が、 LCA および他の脂肪酸誘導体の生産のため研究されてきた。有意に高い理論上の生成物およびエネルギー収量を伴う LCA 生産のためのより効率的な生合成経路をもたらしするために果たすことができる多くの改良が現在存在する。

【0005】

30

それ故、工業用の第一級アルコールの商業的な量を有効に生産するために代替手段が求められている。本発明は、この要求を満たし、関連した利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一部の態様において、本明細書に開示する実施形態は、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル- CoA 非依存性 FAS 経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を有する、マロニル- CoA 非依存性脂肪酸合成（ FAS ）経路とアシル還元経路とを有する、微生物（*microbial organism*）を有し、前記マロニル- CoA 非依存性 FAS 経路が、ケトアシル- CoA アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル- CoA チオラーゼ、3-ヒドロキシアシル- CoA デヒドロゲナーゼ、エノイル- CoA ヒドラターゼおよびエノイル- CoA レダクターゼを有し、前記アシル還元経路が、アシル- CoA レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを有する、天然に存在しない微生物に関する。

40

【0007】

他の態様において、本明細書に開示する実施形態は、第一級アルコールを生産する方法に関する。この方法は、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現するマロニル- CoA 非依存性 FAS 経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を有する、マロニル- CoA 非依存性脂肪酸合成（ FAS ）経路とアシル還元経路とを有する、天然に存在しない微生物を、実質的に嫌気性の条件下、第一級アルコールを生産するために十分な期間、培養することを含み、前記マロニル- CoA 非依存性 FAS 経路は、ケト

50

アシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを有し、前記アシル還元経路は、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを有する。

【 0 0 0 8 】

一部の態様において、本明細書に開示する実施形態は、酵素をコードする遺伝子において発生する1つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物に関し、この酵素は、長鎖アルコール (L C A) 生産をこの天然に存在しない微生物の増殖に連動させる (c o u p l e) ものである。他の実施形態では、同じ破壊戦略を用いて非増殖期中に L C A 生産を遂行することができる。前記1つ以上の遺伝子破壊は、前記酵素の活性を低下させ、それによって、遺伝子破壊は、天然に存在しない微生物に L C A の生産をもたらす。

10

【 0 0 0 9 】

他の態様において、本明細書に開示する実施形態は、1つ以上の遺伝子破壊を有する天然に存在しない微生物の培養を含む L C A の生産方法に関する。前記1つ以上の遺伝子破壊は、生物における L C A 生産をもたらす酵素をコードする遺伝子において発生する。

【 0 0 1 0 】

一部の態様において、本明細書に開示する実施形態は、1つ以上の遺伝子破壊を含む、天然に存在しない真核生物に関する。前記1つ以上の遺伝子破壊は、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼおよびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼなどの酵素をコードする遺伝子において発生する。これらの破壊は、前記生物のサイトゾルにおける長鎖アルコールの生産をもたらす。

20

【 0 0 1 1 】

一部の態様において、本明細書に開示する実施形態は、1つ以上の遺伝子破壊を含む、天然に存在しない真核生物に関する。前記1つ以上の遺伝子破壊は、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼなどの酵素をコードする遺伝子において発生する。これらの破壊により、生物のミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産がもたらされる。

【 0 0 1 2 】

30

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

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

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

40

(項目 2)

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

(項目 3)

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

(項目 4)

マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をそれぞれがコードする4つの外因性核酸を含

50

む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 5)

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

(項目 6)

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

(項目 7)

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

(項目 8)

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

(項目 9)

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

(項目 10)

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

(項目 11)

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

(項目 12)

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

(項目 13)

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

(項目 14)

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

(項目 15)

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

(項目 16)

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

(項目 17)

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

10

20

30

40

50

の外因性核酸を含む、天然に存在しない微生物。

(項目 18)

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

(項目 19)

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

10

(項目 20)

アシル還元経路をコードする前記 1 つ以上の外因性核酸が、2 つの外因性核酸を含む、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 21)

アシル還元経路をコードする 1 つの外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼをコードし、およびアシル還元経路をコードする第二の外因性核酸が、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする、項目 20 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 22)

アシル還元経路をコードする前記 1 つ以上の外因性核酸が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を含む酵素をコードする、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

20

(項目 23)

アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を含む前記酵素が、脂肪アルコール形成性アシル - C o A レダクターゼ (F A R) を含む、項目 22 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 24)

前記外因性核酸の少なくとも 1 つが、異種コード核酸をさらに含む、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 25)

前記第一級アルコールが、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路をコードする前記外因性核酸およびアシル還元経路をコードする外因性核酸を欠く微生物と比較して、少なくとも 10 % 多いレベルの量で生産される、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

30

(項目 26)

実質的に嫌気性の培養基をさらに含む、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 27)

前記第一級アルコールが、4 ~ 24 個の間の炭素原子を有するアルコールを含む、項目 17 に記載の天然に存在しない微生物。

(項目 28)

4 ~ 24 個の間の炭素原子を有する前記アルコールが、ブタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール (n a n a n o l)、デカノール、ドデカノール、テトラデカノールまたはヘキサデカノールから選択される、項目 27 に記載の天然に存在しない微生物。

40

(項目 29)

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

50

アシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、方法。

(項目 3 0)

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

(項目 3 1)

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

(項目 3 2)

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

(項目 3 3)

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

(項目 3 4)

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

(項目 3 5)

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

(項目 3 6)

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

(項目 3 7)

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

(項目 3 8)

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

(項目 3 9)

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

(項目 4 0)

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

(項目 4 1)

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

(項目 4 2)

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

(項目 4 3)

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

10

20

30

40

50

(項目 4 4)

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

(項目 4 5)

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

(項目 4 6)

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

10

(項目 4 7)

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

(項目 4 8)

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

(項目 4 9)

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

20

(項目 5 0)

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

(項目 5 1)

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

30

(項目 5 2)

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

(項目 5 3)

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

(項目 5 4)

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

40

(項目 5 5)

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

(項目 5 6)

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

(項目 5 7)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、N A D (P) トランスヒ

50

ドロゲナーゼ、およびATPシンターゼからなる群より選択されるコードされた酵素をさらに含む、項目56に記載の方法。

(項目58)

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

(項目59)

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

10

(項目60)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目59に記載の生物。

(項目61)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目59に記載の生物。

(項目62)

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

20

(項目63)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目59に記載の生物。

(項目64)

株が、微好気性培養基中に存在する、項目59に記載の生物。

(項目65)

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

(項目66)

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

30

(項目67)

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

(項目68)

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

40

(項目69)

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

(項目70)

1つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない真核生物であって、前記1つ以上の遺伝子破壊が、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコ

50

ールデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素をコードする遺伝子において生じ、前記1つ以上の遺伝子破壊が、前記生物のミトコンドリアにおける長鎖アルコールの生産をもたらすものである、天然に存在しない真核生物。

(項目71)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目70に記載の生物。

(項目72)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目70に記載の生物。

(項目73)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、Y L R 0 4 4 C、Y L R 1 3 4 W、Y G R 0 8 7 C、P D C 3、Y B R 1 4 5 W、Y G L 2 5 6 W、Y O L 0 8 6 C、Y M R 3 0 3、Y M R 0 8 3 W、Y P L 0 8 8 W、Y A L 0 6 1 W、Y M R 3 1 8 C、Y C R 1 0 5 W、およびY D L 1 6 8 Wからなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目70に記載の生物。

10

(項目74)

リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部NADHデヒドロゲナーゼおよび内部NADHデヒドロゲナーゼによって触媒されるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトルからなる群より選択される酵素をコードする1つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、項目70に記載の生物。

(項目75)

前記1つ以上の遺伝子破壊が、Y O L 1 2 6 C、Y D L 0 2 2 W、Y O L 0 5 9 W、Y I L 1 5 5 C、Y M R 1 4 5 C、Y D L 0 8 5 W、およびY M L 1 2 0 Cからなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目74に記載の生物。

20

(項目76)

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸：NADPオキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸CoAリガーゼ、およびAMP形成性アセチルCoAシンセターゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目70に記載の生物。

(項目77)

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

30

(項目78)

トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、およびピルビン酸オキシダーゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目76に記載の生物。

(項目79)

株が、実質的に嫌気性の培養基中に存在する、項目70に記載の生物。

(項目80)

株が、微好気性培養基中に存在する、項目70に記載の生物。

(項目81)

酵母または真菌である、項目59または70のいずれか一項に記載の生物。

40

(項目82)

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

(項目83)

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

50

(項目 8 4)

前記真菌が、*Aspergillus terreus* および *Aspergillus niger* を含む *Aspergillus* 種、ならびに *Rhizopus arrhizus* および *Rhizopus oryzae* を含む *Rhizopus* 種からなる群より選択される、項目 8 1 に記載の生物。

(項目 8 5)

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

(項目 8 6)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目 8 5 に記載の方法。

10

(項目 8 7)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 8)

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

(項目 8 9)

株が、実質的に嫌気性の培地において培養される、項目 8 5 に記載の方法。

20

(項目 9 0)

株が、微好気性培地において培養される、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 1)

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

(項目 9 2)

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

30

(項目 9 3)

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

(項目 9 4)

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

40

(項目 9 5)

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

(項目 9 6)

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

(項目 9 7)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動している、項目 9 6 に記載の生物。

(項目 9 8)

長鎖アルコールの生産が、増殖に連動していない、項目 9 6 に記載の生物。

50

(項目 99)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、*YLR044C*、*YLR134W*、*YGR087C*、*PDC3*、*YBR145W*、*YGL256W*、*YOL086C*、*YMR303*、*YMR083W*、*YPL088W*、*YAL061W*、*YMR318C*、*YCR105W*、および *YDL168W* からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 96 に記載の方法。

(項目 100)

サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部 *NADH* デヒドロゲナーゼおよび内部 *NADH* デヒドロゲナーゼによって触媒されるグリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトルからなる群より選択される酵素をコードする 1 つ以上の遺伝子破壊をさらに含む、項目 96 に記載の方法。

10

(項目 101)

前記 1 つ以上の遺伝子破壊が、*YOL126C*、*YDL022W*、*YOL059W*、*YIL155C*、*YMR145C*、*YDL085W*、および *YML120C* からなる群より選択される遺伝子におけるものである、項目 100 に記載の方法。

(項目 102)

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸：*NADP* オキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸 *CoA* リガーゼ、および *AMP* 形成性アセチル *CoA* シンセターゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 96 に記載の方法。

20

(項目 103)

サイトゾルからミトコンドリアへの *NADH* の輸送のための強化された *NADH* 輸送シャトルシステムをさらに含む、項目 102 に記載の方法。

(項目 104)

トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、およびピルビン酸オキシダーゼからなる群より選択される酵素；またはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸をミトコンドリア内にさらに含む、項目 102 に記載の方法。

(項目 105)

前記生物が、酵母または真菌である、項目 85 または 96 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 106)

前記酵母が、*Saccharomyces cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* を含む *Saccharomyces* 種、*Kluyveromyces lactis* および *Kluyveromyces marxianus* を含む *Kluyveromyces* 種、ならびに *Pichia pastoris* を含む *Pichia* 種からなる群より選択される、項目 105 に記載の方法。

30

(項目 107)

前記酵母が、*Saccharomyces cerevisiae* である、項目 106 に記載の方法。

(項目 108)

前記真菌が、*Aspergillus terreus* および *Aspergillus niger* を含む *Aspergillus* 種、ならびに *Rhizopus arrhizus* および *Rhizopus oryzae* を含む *Rhizopus* 種からなる群より選択される、項目 105 に記載の方法。

40

(項目 109)

株が、実質的に嫌気性の培地において培養される、項目 96 に記載の方法。

(項目 110)

株が、微好気性培地において培養される、項目 96 に記載の方法。

(項目 111)

脂肪アシル - *CoA* を生産するために十分な量で発現されるマロニル - *CoA* 非依存性 *FAS* 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含むマロニル - *CoA* 非依存性

50

脂肪酸合成 (FAS) 経路を有する微生物を含む、天然に存在しない微生物であって、前記マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路が、ケトアシル - CoA アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - CoA チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ、エノイル - CoA ヒドラターゼおよびエノイル - CoA レダクターゼを含む、天然に存在しない微生物。

(項目 112)

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

10

(項目 113)

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

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】図 1 は、LCA を生産するためのマロニル - CoA 非依存性脂肪酸合成および還元 (MI - LCA) 経路を示す図である。

【図 2】図 2 は、典型的な増殖非運動生産株に対する OptKnock 設計株の対比型仮説生産エンベロップを示す図である。OptKnock 株の可能性のある進化軌線は、高生産性表現型につながる。

【図 3】図 3 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 I の増殖運動 LCA 生産特性 (交互の点とダッシュでできた線) を示す図である。10 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

30

【図 4】図 4 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 II (交互の点とダッシュでできた線)、III ~ IV (破線) および V ~ XI (点線) の増殖運動 LCA 生産特性を示す図である。10 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

【図 5】図 5 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 XII (交互の点とダッシュでできた線) および XIII ~ XV (破線) の増殖運動 LCA 生産特性を示す図である。10 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

【図 6】図 6 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 XVI ~ XVII (交互の点とダッシュでできた線) および XVIII ~ XX (破線) の増殖運動 LCA 生産特性を示す図である。10 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

40

【図 7】図 7 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 I (交互の点とダッシュでできた線)、V (破線) および V_A (点線) の増殖運動 LCA 生産特性を示す図である。10 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。点 A は、設計 V_A に従って遺伝子工学で作り変えた株の最大増殖時のドデカノール生産速度を指し、および点 B は、増殖に必要な最低ドデカノール生産速度を指す。

【図 8】図 8 は、野生型 E. coli のもの (黒色) と比較して株設計 I (交互の点とダッシュでできた線)、XII (個々のダッシュが長い破線)、XII_A (個々のダッシュが短い破線) および XII_B (点線) の増殖運動 LCA 生産特性を示す図である。1

50

0 mmol / g DW / 時のグルコース取り込み速度を仮定している。点 A は、設計 X I I _ B に従って遺伝子工学で作り変えた株の最大増殖時のドデカノール生産速度を指し、および点 B は、増殖に必要な最低ドデカノール生産速度を指す。

【図 9 a】図 9 a は、ドデカノール生産のためのアセチル C o A の形成が A M P 形成性アセチル C o A シンセターゼに依存することによるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図 9 b】図 9 b は、アセチル C o A シンセターゼをサイトゾルにおけるアセチル C o A 生産に使用するシナリオでの *S . c e r e v i s s i a e* におけるドデカノールの生産についての増殖連動生産エンベロープを示す図である。黒色曲線は、好気性条件下での野生型ネットワークについての生産エンベロープを示し、濃灰色曲線は、突然変異体ネットワークについての増殖連動生産特性を示す。10 mmol / g D C W ・ 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

10

【図 10 a】図 10 a は、ドデカノール生産のためのアセチル C o A の形成が A D P 形成性酢酸 C o A リガーゼに依存することによるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素の付加を表す。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図 10 b】図 10 b は、酢酸 C o A リガーゼをサイトゾルにおけるアセチル C o A 生産に利用するシナリオでの *S . c e r e v i s s i a e* におけるドデカノールの生産についての増殖連動生産エンベロープを示す図である。黒色曲線は、好気性条件下での野生型ネットワークについての生産エンベロープを示す。薄灰色曲線は、酢酸 C o A リガーゼを付加した後の蓋然性の高い空間の増加を示し、濃灰色曲線は、酸素の存在下での突然変異体ネットワークについての増殖連動生産特性を示す。10 mmol / g D C W ・ 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

20

【図 11 a】図 11 a は、ドデカノール生産のためのアセチル C o A の形成がアシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼに依存することによるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素を示す。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図 11 b】図 11 b は、*S . c e r e v i s s i a e* におけるドデカノールの嫌気性生産についての増殖連動生産エンベロープを示す図である。黒色曲線は、野生型ネットワークについての生産能を示し、薄灰色曲線は、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをそのネットワークに付加したときの生産特性を示し、および濃灰色曲線は、その増加したネットワークからアルコールデヒドロゲナーゼを欠失させたときの増殖連動を示す。アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼが機能性であるときの理論最大値の増加に留意すること。10 mmol / g D C W ・ 時のグルコース取り込み速度を仮定している。

30

【図 12】図 12 は、アセチル C o A および N A D H 生産がサイトゾルピルビン酸デヒドロゲナーゼに依存することによるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。これは、異種サイトゾル酵素の導入（灰色で示す）によって、またはサイトゾルへの天然ミトコンドリア酵素の再ターゲティングによって遂行することができる。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

40

【図 13】図 13 は、アセチル C o A および N A D H 生産がサイトゾルピルビン酸：N A D P オキシドレダクターゼに依存することによるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。これは、サイトゾルへの異種酵素の導入（灰色で示す）によって遂行することができる。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図 14】図 14 は、サイトゾルへの異種ピルビン酸ギ酸リアーゼの導入（灰色で示す）によるサイトゾルにおけるドデカノールの形成を示す図である。点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図 15 a】図 15 a は、アセチル - C o A の形成にピルビン酸デヒドロゲナーゼを使用することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。点線矢印は

50

、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図15b】図15bは、*S. cerevisiae*ミトコンドリアにおけるドデカノールの生産についての増殖連動生産エンベロープを示す図である。黒色曲線は、嫌気性条件下での野生型ネットワークについての生産能を示し、および濃灰色曲線は、ピルビン酸デカルボキシラーゼをそのネットワークから欠失させたときの酸素不在状態での生産特性を示す。10 mmol / g DCW・時のグルコース取り込み速度を仮定している。

【図16】図16は、アセチルCoAの形成にピルビン酸：NADPオキシドレダクターゼを使用することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素を示し、および点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

10

【図17】図17は、アセチルCoAの形成にピルビン酸ギ酸リアーゼを使用することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素を示し、および点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図18】図18は、ミトコンドリアアシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼを付加することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素（単数または複数）を示し、および点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

【図19a】図19aは、アセチルCoAの形成にアセチルCoAシンセターゼを使用することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素（単数または複数）を示し、および点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

20

【図19b】図19bは、アセチル-CoAがミトコンドリアアセチル-CoAシンセターゼによって形成されるときに*S. cerevisiae*ミトコンドリアにおけるドデカノールの生産についての増殖連動生産エンベロープを示す図である。黒色曲線は、好気性条件下での野生型ネットワークについての生産エンベロープを示し、薄灰色曲線は、そのネットワークに欠失を与えたときの生産特性を示す。ペントースリン酸経路の酸化部分を通るフラックスを減少させると、増殖連動は、さらに増進し得る（濃灰色曲線）。10 mmol / g DCW・時のグルコース取り込み速度を仮定している。

【図20】図20は、アセチルCoAの形成に酢酸CoAリガーゼを使用することによるミトコンドリアにおけるドデカノールの形成を示す図である。灰色矢印は、異種酵素（単数または複数）を示し、および点線矢印は、この生産シナリオにおける炭素フラックスの大部分の流れを図示するものである。

30

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、1つには、マロニル-CoA非依存性脂肪酸合成および還元経路を用いて第一級アルコールを合成することができる組み換え微生物に関する。本発明の修飾微生物は、結果として生ずる第一級アルコールをさらなる操作または単離のために培養基または発酵ブロスに分泌することもできる。本発明の組み換え微生物は、商業的な量の、炭素原子数4(C4)と24(C24)の間またはそれ以上の異なる鎖長を有する様々な異なる第一級アルコールを生産するように遺伝子工学で作り変えることができる。本発明の修飾経路による第一級アルコールの生産は、十分に文献に記載されているマロニル-CoA依存性脂肪酸合成経路などの自然に発生する生合成経路によるより高い産物およびATP収量をもたらす結果となるので、特に有用である。マロニル-アシル担体タンパク質(マロニル-ACP)ではなくアセチル-CoAをC2延長単位として使用することにより、伸長サイクルに入るアセチル-CoAの単位フラックスあたり1個のATP分子が節約される。この伸長サイクルは、アシル-ACPではなくアシルCoAを生じさせる結果となり、ならびにオクタノールおよび他の第一級アルコールの生産のためのATP消費性アシル-CoAシンターゼ反応の必要を無くす。加えて、本発明の第一級アルコール生産性生物は、生合成プロセスを用いて化学製品の製造に低コストで再生可能な供給原料を転用するこ

40

50

とを可能にすることができる。

【0015】

1つの特別な実施形態において、本発明は、アシル - C o A 還元経路と連動した異種マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成経路を利用して、第一級アルコール種を形成する。これら2つの経路の連動により、炭素またはエネルギー源は、生合成伸長サイクルにおいてプライマーとしても延長単位としても使用されるアセチル - C o A に変換されることとなる。この伸長サイクルは、ケトアシル - C o A チオラーゼ（またはケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼ）、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含む。それぞれのサイクルが、その伸長サイクルに入るアシル - C o A 基質と比較して1個だけC2単位が延長されたアシル - C o A を形成する結果となる。第一級アルコールの炭素鎖長は、鎖長特異的エノイル - C o A レダクターゼ、ケトアシル - C o A チオラーゼおよび/またはアシル - C o A レダクターゼによって制御することができる。所望の鎖長を有するアシル - C o A 生成物を還元経路に送り込み、アシル - C o A レダクターゼとアルコールデヒドロゲナーゼの組み合わせまたは脂肪酸形成性アシル - C o A レダクターゼによって還元して所望の第一級アルコールを形成する。これらの還元段階は、例えば鎖長特異的アシル - C o A レダクターゼの使用により、もう1つの鎖長制御メカニズムとして役立つ。

10

【0016】

本明細書において用いられる場合、本発明の微生物または微生物に関して用いられるときの用語「天然に存在しない」は、その微生物が当該種の野生型株を含めて当該種の自然に発生する株において通常は見つけれられない少なくとも1つの遺伝子改変を有することを意味する。遺伝子改変としては、例えば、代謝性ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸欠失および/またはその微生物遺伝物質の他の機能破壊が挙げられる。そのような修飾は、例えば、当該種の非相同ポリペプチド、相同ポリペプチド、または非相同ポリペプチドと相同ポリペプチドの両方についてのコード領域およびその機能的フラグメントを含む。追加の修飾は、例えば、修飾により遺伝子またはオペロンの発現が改変される非コード調節領域を含む。例示的代謝性ポリペプチドとしては、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸生合成経路内の酵素およびアシル還元経路内の酵素が挙げられる。

20

【0017】

本明細書において用いられる場合、微生物に関して用いられるときの用語「単離された」は、当該微生物が自然界で見つけられる場合の少なくとも1つの成分が実質的に無い生物を意味すると解釈される。この用語は、それがその天然の環境において見つけられる場合の一部のまたはすべての成分から取り出される微生物を含む。この用語は、その微生物が天然に存在しない環境において見つけられる場合の一部のまたはすべての成分から取り出される微生物も含む。従って、単離された微生物は、それが自然界で見つけられる場合、またはそれが自然には存在しない環境で増殖される、保管されるもしくは生存させられる場合、他の物質から軽度または完全に分離されている。単離された微生物の具体的な例としては、軽度に純粋な微生物、実質的に純粋な微生物、および天然に存在しない培地で培養された微生物が挙げられる。

30

40

【0018】

本明細書において用いられる場合、用語「微生物の」、「微生物」または「微生物」は、古細菌、細菌または真核生物の領域内に含まれる微視的細胞として存在する任意の生物を意味すると解釈される。従って、この用語は、微視的サイズを有する原核もしくは真核細胞または生物を包含すると解釈され、すべての種の細菌、古細菌および真性細菌、ならびに真核微生物、例えば酵母および真菌を含む。この用語は、生化学物質の生産のために培養することができる任意の種の細胞培養物も含む。

【0019】

本明細書において用いられる場合、用語「第一級アルコール」は、第一級炭素原子に結合したヒドロキシルラジカルを有するアルコールを意味すると解釈される。この用語は、

50

酸化されて、同じ炭素原子数を有する対応するアルデヒドおよび酸を形成することができる基 - CH_2OH を有するアルコールを含む。アルコールは、一連のヒドロキシル化合物の任意のものを含み、それらのうちの最も単純なものは、飽和炭化水素から誘導され、一般式 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH}$ を有し、ならびにエタノールおよびメタノールを含む。例示的第一級アルコールとしては、ブタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール (nonanol)、デカノール、ドデカノール、テトラデカノール、およびヘキサデカノールが挙げられる。

【0020】

本明細書において用いられる場合、用語「CoA」または「補酵素A」は、活性酵素系を形成するために多くの酵素（アポ酵素）の活性にその存在が必要とされる、有機補因子または補欠分子団（酵素の非タンパク質部分）を意味すると解釈される。補酵素Aは、例えば、一定の縮合酵素において機能し、アセチルまたは他のアシル基転移の際にならびに脂肪酸合成および酸化の際に作用する。

10

【0021】

本明細書において用いられる場合、培養または増殖条件に関して用いられるときの用語「実質的に嫌気性の」は、酸素の量が、液体培地中の溶解酸素について飽和の約10%未満であることを意味すると解釈される。この用語は、酸素約1%未満の雰囲気で維持されている液体または固体培地の密閉チャンバも含むと解釈される。

【0022】

「外因性」は、それが本明細書において用いられる場合、当該分子または当該活性が宿主微生物に導入されることを意味すると解釈される。従って、この用語は、コード核酸の発現に関してそれが用いられる場合、コード核酸の発現可能な形態での微生物への導入を指す。生合成活性に関して用いられるとき、この用語は、宿主参照生物に導入される活性を指す。その源は、例えば、宿主微生物への導入後に当該活性を発現する同種または異種コード核酸であり得る。従って、用語「内因性」は、宿主中に存在する当該分子または活性を指す。類似して、コード核酸の発現に関して用いられるときのこの用語は、微生物中に含まれているコード核酸の発現を指す。用語「異種の」は、当該種以外の源に由来する分子または核酸を指し、これに対して「同種の」は、宿主微生物に由来する分子または活性を指す。従って、本発明のコード核酸の外因性発現は、異種または同種コード核酸のいずれかまたは両方を利用し得る。

20

30

【0023】

本明細書において用いられる場合、生化学物質の生産に関して用いられるときの「増殖に連動している」は、当該生化学物質の生合成が、微生物の増殖中に生産される産物であることを意味すると解釈される。生化学物質の生産に関して用いられるときの「増殖に連動していない」は、当該生化学物質の生合成が、微生物の非増殖基中に生産される産物であることを意味すると解釈される。生化学産物の生産は、場合により、その生物の増殖に必須であることがある。

【0024】

本明細書において用いられる場合、用語「代謝修飾」は、その自然に発生する状態から改変される生化学反応を指すと解釈される。代謝修飾としては、例えば、その反応に関与する酵素をコードする1つ以上の遺伝子の機能破壊による生化学反応活性の除去を挙げることができる。例示的代謝修飾のセットを表1に示す。そのような代謝修飾によって特徴づけられる個々の反応およびそれらの対応する遺伝子補体を *Escherichia coli* について表2に例示する。これらの反応に用いられる反応物および生成物を表3に例示する。

40

【0025】

本明細書において用いられる場合、用語「遺伝子破壊」またはその文法的同義語は、コードされた遺伝子産物を不活性にする遺伝子改変を意味すると解釈される。遺伝子改変は、例えば、全遺伝子の欠失、転写もしくは翻訳に必要な調節配列の欠失、切断した遺伝子産物を生じさせる結果となるまたはコードされた遺伝子産物を不活性化する様々な突然変

50

異戦略のいずれかによる遺伝子の一部の欠失であり得る。1つの特に有用な遺伝子破壊方法は、完全遺伝子欠失である。それは、本発明の天然に存在しない微生物における遺伝子復帰変異の発生を減少させるまたは無くすからである。用語「遺伝子破壊」は、野生型生物におけるその活性を基準にして所与の遺伝子産物の活性を低下させる遺伝子改変を意味するとも解釈される。活性のこの減弱は、例えば、切断した遺伝子産物を生じさせる結果となる遺伝子の一部分の欠失、またはコードされた遺伝子産物をその天然形より低い活性にする様々な突然変異戦略のうちのいずれか、より少ないもしくはより低効率の遺伝子発現をもたらすプロモーター配列の置換もしくは突然変異、遺伝子が通常の培養条件下ほど高度に発現されない条件下での生物の培養、または遺伝子の相補mRNA分子と相互作用し、その発現を改変するアンチセンスRNA分子の導入に起因し得る。

10

【0026】

本明細書において用いられる場合、生化学産物の増殖連動生産に関して用いられるときの用語「安定した」は、増殖と生化学合成との連動を喪失することなく5世代より長い間培養することができる微生物を指すと解釈される。一般に、安定した増殖連動生化学的生産は、10世代より長く、特に、安定した増殖連動生化学的生産は、約25世代より長く、およびさらに特に、安定した増殖連動生化学的生産は、無期限を含めて、50世代より長いであろう。例えば、1セットの代謝修飾の中のそれぞれの反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の破壊によって、生化学産物の安定した増殖連動生産を遂行することができる。多数の破壊を通して生化学産物の増殖連動生産の安定性を増強することができ、その結果、それぞれの破壊される活性について発生する多数の代償復帰変異の尤度を有意に低下させることができる。

20

【0027】

本明細書において例示する代謝修飾が、*Escherichia coli*および*Saccharomyces cerevisiae*遺伝子ならびにそれらの対応する代謝反応に関して説明されていることは、当業者には理解されるであろう。しかし、多種多様な生物の完全なゲノムシーケンシングおよびゲノミクス分野の高い技術レベルを考慮すれば、当業者は、本明細書に提供する技術およびガイダンスを本質的にすべての他の生物に容易に適用できるであろう。例えば、本明細書において例示する*Escherichia coli*代謝改変を、他の種の同じまたは類似した遺伝子破壊を組み込むことにより、他の種に容易に適用することができる。そのような破壊としては、例えば、種、一般には種ホモログの遺伝的改変、および詳細にはオーソログ、パラログまたは非オーソログ遺伝子置換を挙げることができる。

30

【0028】

本明細書において用いられる場合、用語「生産をもたらす」は、LCAの生産に使用できる代謝経路を欠く生物にばかりでなく、多少のLCA生産レベルを有し得る生物にもあてはまる。例えば、LCAを既に生成する生物は、1つ以上の遺伝子の破壊によってその生物にもたらされる生産向上からの恩恵を受けることができる。

【0029】

本明細書において用いられる場合、用語「真核生物」は、細胞質中の分化した細胞小器官と染色体に構成される遺伝物質を封入する膜結合核とを有する細胞タイプを有する任意の生物を指す。この用語は、真核微生物、例えば酵母および真菌を含むすべての真核生物を包含すると解釈される。この用語は、真核性の種が微生物である必要がない生化学製品の生産のために培養することができる任意の真核性の種の細胞培養物を含むとも解釈される。「真核微生物」、「微生物」または「微生物」は、真核生物界の領域内に含まれる微視的細胞として存在する任意の真核生物を意味すると解釈される。

40

【0030】

オーソログは、垂直系統によって関連づけられるおよび異なる生物において実質的に同じまたは同一の機能に責任を負う遺伝子（単数または複数）である。例えば、マウスエポキシドヒドラーゼおよびヒトエポキシドヒドラーゼは、エポキシドの加水分解の生物学的機能についてのオーソログとみなすことができる。遺伝子は、例えば、それらが相同であ

50

ることを示すために十分な量の配列類似性を共有するとき、垂直系統によって関連づけられ、または共通の祖先からの進化によって関連づけられる。遺伝子は、必ずしも配列類似性を共有しないが、一次配列類似性が特定できない程度に共通の祖先から進化したことを示す十分な量の三次元構造を共有する場合も、オーソログとみなすことができる。オーソログである遺伝子は、約25%から約100%アミノ酸配列同一性の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードする遺伝子も、それらの三次元構造も類似性を示す場合、垂直系統によって発生したとみなすことができる。組織プラスミノゲンアクチベーターおよびエラスターゼをはじめとする、酵素のセリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、共通の祖先から垂直系統によって発生したとみなされる。

10

【0031】

オーソログは、例えば進化により、構造または総合的活性の点で分岐した遺伝子またはそれらのコードされた遺伝子産物を含む。例えば、1つの種が、2つの機能を示す遺伝子産物をコードする場合、およびそのような機能が、二代目の種において異なる遺伝子に分けられている場合、これら3つの遺伝子およびそれらの対応する産物は、オーソログとみなされる。生化学産物の増殖連動生産の場合、破壊される代謝活性を保有するオーソログ遺伝子が、天然に存在しない微生物の構築のために選択されることがあることは、当業者には理解されるであろう。分離可能な活性を示すオーソログの例は、2つ以上の種の間でまたは単一の種の中で異なる活性が異なる遺伝子産物に分けられている場合である。具体的な例は、エラスターゼタンパク質分解およびプラスミノゲンタンパク質分解（セリンプロテアーゼ活性の2つのタイプ）の異なる分子へのプラスミノゲンアクチベーターおよびエラスターゼとしての分離である。第二の例は、マイコプラズマ5' - 3' エキソヌクレアーゼおよびショウジョウバエDNAポリメラーゼIII活性の分離である。初代の種からのDNAポリメラーゼは、二代目の種からのエキソヌクレアーゼまたはポリメラーゼのいずれかまたは両方とオーソログであるとみなすことができ、逆もまた同じである。

20

【0032】

対照的に、パラログは、例えば、重複、その後の進化的分岐によって関連づけられるホモログであり、同一ではないが類似したまたは共通の機能を有する。パラログは、例えば、同じ種から生ずるもしくは同じ種に由来することもあり、または異なる種から生ずるもしくは異なる種に由来することもある。例えば、ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ（エポキシドヒドロラーゼI）および可溶性エポキシドヒドロラーゼ（エポキシドヒドロラーゼII）は、同じ種において異なる反応を触媒し異なる機能を有する共通の祖先から共進化した2つの異なる酵素を表すので、パラログとみなすことができる。パラログは、互いに有意な配列類似性を有する同じ種からのタンパク質であり、これは、それらがホモログであること、または共通の祖先からの共進化によって関係づけられることを示唆している。パラログタンパク質ファミリーの群は、HipAホモログ、ルシフェラーゼ遺伝子、ペプチターゼなどを含む。

30

【0033】

非オーソログ遺伝子置換は、ある種からの非オーソログ遺伝子であって、異なる種における当該遺伝子機能を置換することができるものである。置換は、例えば、起原の種において、異なる種における当該機能と比較して実質的に同じまたは類似した機能を行うことができることを含む。一般に、非オーソログ遺伝子置換は、当該機能をコードする公知遺伝子に構造的に関連しているものとして識別できるが、それにもかかわらず、然程構造的関連はないが、機能的に類似した遺伝子およびそれらの対応する遺伝子産物は、この用語の、それが本明細書において用いられる場合の、意味に入るであろう。機能的類似性は、例えば、置換しようとする機能をコードする遺伝子と比較して非オーソログ遺伝子の活性部位または結合領域において少なくとも多少の構造的類似性を必要とする。従って、非オーソログ遺伝子は、例えば、パラログまたは非関連遺伝子を含む。

40

【0034】

従って、生化学産物の増殖連動生産を有する本発明の天然に存在しない微生物を特定し

50

構築する場合、代謝修飾の特定がオーソログの特定および破壊を含むという本明細書において提供する技術およびガイダンスの特定の種への適用は、当業者には理解されるであろう。類似したまたは実質的に類似した代謝反応を触媒する酵素をコードする当該微生物にパラログおよび/または非オーソログ遺伝子置換が存在する程度に、当業者は、これらの進化的に関連した遺伝子を破壊して、酵素活性のいずれの機能的重複も設計代謝修飾を妨げることがないようにすることができる。

【0035】

オーソログ、パラログおよび非オーソログ遺伝子置換は、当業者に周知の方法によって判定することができる。例えば、2つのポリペプチドの核酸またはアミノ酸配列の検査により、比較する配列間の配列同一性および類似性が明らかになるであろう。そのような類似性に基づいて、当業者は、その類似性が、それらのタンパク質が共通の祖先からの進化によって関連づけられることを示す十分な高さのものであるかどうかを決定することができる。当業者に周知のアルゴリズム、例えばAlign、BLAST、Clustal Wなどは、未処理配列類似性または同一性を比較および決定し、およびまた、重量またはスコアに割り当てることができる配列内のギャップの存在または有意性を決定する。そのようなアルゴリズムは、当該技術分野においても公知であり、ヌクレオチド配列類似性または同一性の決定に同様に適用することができる。統計的類似性、またはランダムポリペプチドにおいて類似したマッチを見つける機会、および決定されたマッチの有意性を算出するための周知の方法に基づいて、関連性を決定するために十分な類似性についてのパラメータをコンピュータ計算する。当業者は、所望する場合には、2つ以上の配列のコンピュータ比較を目視により最適化することもできる。関連遺伝子産物またはタンパク質は、高い類似性、例えば25%から100%の配列同一性を有すると予想することができる。関連のないタンパク質は、十分な大きさのデータベースをスキャンすると、偶然に発生することが予想されるのと本質的に同じである同一性を有し得る(約5%)。5%と24%の間の配列は、比較する配列が関連していると結論づけるために十分な相同性を表す場合もあり、表さない場合もある。データセットの大きさを考慮してそのようなマッチの有意性を判定する追加の統計解析を行って、これらの配列の関連性を決定することができる。

【0036】

BLASTアルゴリズムを用いて2つ以上の配列の関連性を決定するための例示的パラメータは、例えば、下に示すとおりであり得る。簡単に言うと、BLASTPのバージョン2.0.8(1999年1月5日)および次のパラメータを用いてアミノ酸配列アラインメントを行うことができる: Matrix: 0 BLOSUM62; gap open: 11; gap extension: 1; x_dropoff: 50; expect: 10.0; wordsize: 3; filter: on。核酸配列アラインメントは、BLASTNのバージョン2.0.6(1998年9月16日)および次のパラメータを用いて行うことができる: Match: 1; mismatch: -2; gap open: 5; gap extension: 2; x_dropoff: 50; expect: 10.0; wordsize: 11; filter: off。例えば、比較のストリンジェンシーを増加させるまたは減少させるために、および2つ以上の配列の関連性を決定するために、上のパラメータにどのような変更を加えることができるかは、当業者にはわかるであろう。

【0037】

本発明の天然に存在しない微生物は、安定した遺伝子改変を有するものであり得、これは、その改変を喪失することなく5世代より長い間培養することができる微生物を指す。一般に、安定した遺伝子改変は、10世代より長く持続する修飾を含み、特に、安定した修飾は、約25世代より長く持続し、およびさらに特に、安定した修飾は、無期限を含めて、50世代より長いであろう。

【0038】

本明細書において例示する代謝修飾をはじめとする遺伝子改変が、Euglena gracilis、E. coliおよびS. cerevisiae遺伝子ならびにそれらの

10

20

30

40

50

対応する代謝反応に関して説明されていることは、当業者には理解されるであろう。しかし、多種多様な生物の完全なゲノムシーケンシングおよびゲノミクス分野の高い技術レベルを考慮すれば、当業者は、本明細書に提供する技術およびガイダンスを本質的にすべての他の生物に容易に適用できるであろう。例えば、本明細書において例示する *E. coli* 代謝改変を、当該種以外の種からの同じまたは類似したコード核酸を組み込むことにより、他の種に容易に適用することができる。そのような遺伝子改変としては、例えば、一般には種ホモログの遺伝子改変、および詳細にはオーソログ、パラログまたは非オーソログ遺伝子置換が挙げられる。

【0039】

一部の実施形態において、本発明は、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル - CoA 非依存性 FAS 経路酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を有する、マロニル - CoA 非依存性脂肪酸合成 (FAS) 経路とアシル還元経路とを有する微生物を含み、前記マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路が、ケトアシル - CoA アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - CoA チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ、エノイル - CoA ヒドラターゼおよびエノイル - CoA レダクターゼを含み、前記アシル還元経路が、アシル - CoA レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む、天然に存在しない微生物を提供する。

【0040】

マロニル - CoA 非依存性脂肪酸合成は、*Euglena gracilis* などの光合成鞭毛虫によって使用される代謝プロセスである (Inui ら、*Euro. J. Biochem.* 96: 931 - 34 (1984))。これらの単細胞生物は、藻の特徴と原生動物の特徴の両方を示し、ならびに条件に依存して、生化学プロセスに光エネルギー (光合成) 利用することもでき、化学エネルギー (摂食) を利用することもできる。嫌気性条件下では、*E. gracilis* は、付随して ATP を生成しながらパラミロン、予備ベータ - 1, 2 - グルカン多糖類をワックスエステル (wax ester) に変換する (ワックスエステル発酵という名の現象) (Inui ら、上記文献、1982; Inui ら、*Agricultural and Biological Chemistry* 47: 2669 - 2671 (1983))。マロニル - CoA 非依存性経路による脂肪酸合成は、ATP の正味の増加をもたらす結果となるが、他の脂肪酸合成系は、ATP の正味の増加を支援することができない。好気性条件下でも ATP を生産することができる (Inui ら、*Archives Biochemistry and Biophysics* 237: 423 - 29 (1985))。

【0041】

酸素不在下では、アセチル - CoA は、酸素感受性ピルビン酸: NADP + オキシレダクターゼによってピルビン酸塩から生成され (Inui ら、上記文献、1984; Inui ら、上記文献、1985; Inui ら、*Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 292 - 98 (1990); Inui ら、*Journal of Biological Chemistry* 262: 9130 - 35 (1987))、ワックスエステルを形成するためのマロニル - CoA 非依存性脂肪酸合成によるグルコース酸化の末端電子受容体として役立つ (Inui ら、上記文献、1985))。*E. gracilis* は、異なるコンパートメントに位置する 4 つの脂肪酸合成系と嫌気性ワックスエステル発酵に関与するミトコンドリアマロニル - CoA 非依存性 FAS 系とを含む、脂肪酸合成の 5 つの異なる系を含有する (Hoffmeister ら、*Journal of Biological Chemistry* 280: 4329 - 38 (2005))。前記マロニル - CoA 非依存性 FAS 系が C8 ~ C18 脂肪酸を生産することは証明されている。脂肪酸は、アルコールに還元され、別の脂肪酸でエステル化され、サイトゾル内にワックスとして堆積される (Inui ら、*Febs Letters* 150: 89 - 93 (1982); Inui ら、*European Journal of Biochemistry* 142: 121 - 126 (1984))。このワックスは、暗所増殖細胞 (dark grown cells) における全脂質のおお

10

20

30

40

50

よそ50%を構成し得る(Rosenberg, A., Biochemistry 2: 1148(1963))。本発明の特に有用な実施形態は、本明細書に記載する修飾生成経路を用いて大量のアルコールを生産するために、嫌気性条件下でマロニル-CoA非依存性脂肪酸合成(FAS)系を活用する。

【0042】

前記マロニル-CoA非依存性脂肪酸合成経路は、脂肪酸酸化を逆にしたものに類似しており、およびミトコンドリアでの脂肪酸合成または当該技術分野において公知であるようなアシル・キャリア・タンパク質(ACP)非依存性脂肪酸合成と呼ばれる。マロニル-CoA依存性脂肪酸合成(ACP依存性脂肪酸合成としても公知; Smithら、Progress in Lipid Research 42: 289-317(2003); Whiteら、Annual Review of Biochemistry 74: 791-831(2005))と比較すると、幾つかの相違がある。第一に、アセチル-CoAがマロニル-ACPの代わりに延長単位として用いられる。マロニル-CoA非依存性経路における伸長基質としてのアセチル-CoAの利用は、アセチル-CoAをマロニル-CoAに変換するアセチル-CoAカルボキシラーゼ複合体(ACC)の必要を無くし、従って、伸長サイクルに入るアセチル-CoAの単位フラックスあたり1個のATP分子を節約する。第二に、伸長サイクルにおける中間体のすべてが、ACPではなくCoAに連結される。この伸長サイクルは、(i)ケトアシル-CoAアシルトランスフェラーゼ(またはケトアシル-CoAチオラーゼ、EC 2.3.1.16)、(ii)3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.35および1.1.1.211)、(iii)エノイル-CoAヒドラターゼ(EC 4.2.1.17および4.2.1.74)、および(iv)エノイル-CoAレダクターゼ(EC 1.3.1.44および1.3.1.38)を含み得る。第三に、伸長サイクルからの産物は、アシル-CoAであり、これは、アシル-CoAレダクターゼ、続いてデヒドロゲナーゼによってアルコール変換のために直接利用されることがあり、またはアシル-CoAを直接アルコールに変換する脂肪酸形成性アシル-CoAレダクターゼ(FAR)によって利用されることがある。従って、チオエステラーゼおよびアシル-CoAシンターゼは、第一級アルコールの生産に必要とされないが、マロニル-CoA依存性経路での場合は必要とされる。

【0043】

例えば、本発明の微生物は、図1に示すように、脂肪酸の還元と連動するマロニル-CoA非依存性脂肪酸合成経路を利用して、第一級アルコールを形成する。加えて、例えば、再生可能な供給原料をアセチル-CoAに変換するように、微生物を修飾することができる。本発明の生物学によって作られる経路では、アセチル-CoAを、上で説明した伸長サイクルにおいてプライマーとしても延長単位としても使用することができる。それぞれの伸長サイクルの最後に、伸長サイクルに入るアシル-CoAよりC2単位が1個長いアシル-CoAが形成される。上記合成経路を還元経路に連動させることにより、本発明の第一級アルコール産物は得られる。所望の第一級アルコールを形成するために長鎖特異的アシル-CoAレダクターゼ(EC 1.2.1.50)とアルコールデヒドロゲナーゼ(1.1.1.1)の組み合わせまたは脂肪酸アルコール形成性アシル-CoAレダクターゼ(FAR、EC 1.1.1)を使用する還元経路への所望の鎖長を有するアシル-CoAの連動が、特に有用である。鎖長特異的エノイル-CoAレダクターゼ、ケトアシル-CoAチオラーゼおよび/またはアシル-CoAレダクターゼによって第一級アルコールの炭素鎖長を制御することができる。

【0044】

上で説明した連動生成経路を有する本発明の微生物は、第一級アルコールを非常に高レベルで生産することができる。例えば、マロニル-CoA非依存性脂肪酸合成経路および付随するエネルギー特性を用いるオクタノールについての最大理論収量は、当該技術分野においてSimpheny(商標)として公知のインシリコ代謝モデリングシステムを用いて、予測E.coli代謝化学量論的ネットワークにマロニル-CoA非依存性脂

肪酸合成、アシル - CoA およびアルコールデヒドロゲナーゼを加えることによって算出された（例えば、2002年6月14日出願の米国特許出願番号10/173,547号、および2003年6月13日出願の国際特許出願番号PCT/US03/18838を参照のこと）。このモデルは、オクタノールの分泌がエネルギーを必要としないと仮定している。表4は、好気性条件と嫌気性条件の両方のもとでのオクタノールについての最大理論収量を示すものである。マロニル - CoA 非依存性脂肪酸生合成経路は、マロニル - CoA 依存性脂肪酸合成経路よりはるかにエネルギー効率がよく、ならびに好気性条件下でも嫌気性条件下でも0.5 mole オクタノール / (グルコース1 mole) の最大理論収量および2.125 mole / (グルコース1 mole) の最大ATP収量を可能にする。

【0045】

【表4】

表4: (1)マロニル-CoA非依存性脂肪酸合成およびアシル還元経路ならびに
(2)ACP依存性脂肪酸合成および経路を用いるオクタノールの最大理論収量の比較。

	マロニル-CoA非依存性脂肪酸生合成および還元経路		典型的な脂肪酸生合成および還元経路	
	嫌気性	好気性	嫌気性	好気性
オクタノール収量(mol/(グルコース1mol))	0.5	0.5	0.375	0.48
最大オクタノール収量での最大ATP収量(mol/(グルコース1mol))	2.125	2.125	0	0

本発明の天然に存在しない微生物は、本発明のターゲット第一級アルコールまたは第一級アルコールのターゲット混合物を生合成により生産するために代謝反応の組み合わせを利用する。第一級アルコールを生産するために十分な量でのマロニル - CoA 非依存性FAS経路の外因性発現を達成するように前記代謝反応の組み合わせを遺伝子操作することができる。前記天然に存在しない微生物は、マロニル - CoA 非依存性FAS経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を発現するであろう。一定の実施形態において、本発明の天然に存在しない微生物は、マロニル - CoA 非依存性FAS合成酵素の完全経路についての酵素の一部またはすべてをコードする、すべてを含めて1つより多くの核酸を外因的に発現するように、遺伝子工学で作り変えられるであろう。アシル還元用の酵素の一部またはすべても外因的に発現させることができる。外因的発現は、代謝利用可能な遺伝子産物を生産するために十分なレベルであるはずであり、ターゲット第一級アルコールまたはアルコールセットの生産をもたらす結果となるはずである。

【0046】

マロニル - CoA 非依存性FAS経路による炭素または他のエネルギー源からの第一級アルコールの形成のための生化学反応を図1に示す。マロニル - CoA 非依存性FAS経路は、アシル - CoA を生産する。アシル還元経路によりターゲット第一級アルコールを生産するためのこの中間生成物の併用も図1に示す。

【0047】

本発明を、一般には代謝反応、その反応物もしくは生成物に関して、または詳細には当該代謝反応、反応物もしくは生成物に関連したもしくはそれらを触媒する酵素をコードする1つ以上の核酸もしくは遺伝子に関して本明細書に記載する。本明細書において特に別様に述べられていない限り、反応への言及が、その反応の反応物および生成物への言及も構成することは、当業者には理解されるであろう。類似して、本明細書において特に別様に述べられていない限り、反応物または生成物への言及は、その反応への言及でもあり、これらの代謝成分のいずれかへの言及は、当該反応、反応物または生成物を触媒する酵素をコードする遺伝子（単数または複数）への言及でもある。同様に、代謝生化学、酵素学およびゲノミクスの周知分野を考慮すると、遺伝子またはコード核酸への本明細書における言及は、対応するコードされた酵素およびそれを触媒する反応ならびにその反応の反応

物および生成物への言及も構成する。

【0048】

Euglena gracilis 以外の微生物には、マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路によってアシル - CoA を合成する能力が一般にはない。さらに、本明細書に記載する酵素および例示する生化学的経路からアシル - CoA を生産するために必要な代謝酵素能力のすべてを有する生物は、知られていない。むしろ、マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路の酵素成分を有する微生物は、短、中および長鎖脂肪 - アシル - CoA 化合物をアセチル - CoA に分解するように作用する。マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路を有する *E. gracilis* は、この経路を利用して、アシルグリセロール、三価糖アルコール、リン脂質、ワックスエステルおよび / または脂肪酸を生産する。対照的に、本発明の天然に存在しない微生物は、マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路の産物としてアシル - CoA を生成し、この産物を好適な熱力学特性によってアシル還元経路に送り込む。本発明の天然に存在しない微生物を使用する産物合成は、第一級アルコールの生産に特に有用であるばかりでなく、それにより、アシル - CoA および / または第一級アルコールを中間反応物として使用する化合物のさらなる合成が可能にもなる。

10

【0049】

本発明の天然に存在しない第一級アルコール生産性微生物は、宿主微生物が、マロニル - CoA 非依存性脂肪酸生合成経路の完全生化学合成のための機能能力および本発明のアシル還元経路のための機能能力を確実に含むようにすることによって産生される。両方の経路についての完全な機能能力の確保は、その宿主微生物に第一級アルコール生合成能をもたらすであろう。マロニル - CoA 非依存性 FAS 経路に関与する酵素としては、ケトアシル - CoA アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - CoA チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ、エノイル - CoA ヒドラターゼおよびエノイル - CoA レダクターゼが挙げられる。アシル還元経路に関与する酵素としては、アシル - CoA レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ、またはレダクターゼとデヒドロゲナーゼの二重活性を有する酵素が挙げられる。

20

【0050】

本発明の天然に存在しない微生物は、マロニル - CoA 非依存性 FAS および / またはアシル還元経路に関与する酵素の 1 つ以上をコードする発現可能な核酸を導入することによって生産することができる。生合成のために選択される宿主微生物に依存して、これらの生合成経路の一部またはすべてのための核酸を発現させることができる。例えば、選択された宿主にマロニル - CoA 非依存性 FAS 経路における酵素のすべてが欠如している場合には、4 つの酵素ケトアシル - CoA アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - CoA チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ、エノイル - CoA ヒドラターゼおよびエノイル - CoA レダクターゼのそれぞれについての発現可能な核酸を後の外因性発現のためにその宿主に導入する。あるいは、例えば、選択された宿主に 4 つすべてよりは少ない上記酵素の欠如がある場合には、欠如している酵素をコードする核酸を発現させるだけでよい。例えば、宿主に 3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼおよびエノイル - CoA ヒドラターゼが欠如している場合、これら 2 つの酵素をコードする核酸の導入により、機能的に完全なマロニル - CoA 非依存性 FAS 経路を遺伝子工学で作ることができる。

30

40

【0051】

同様に、内因性宿主生合成機械がアシル還元経路について完全である場合には、遺伝子修飾は不必要である。しかし、宿主の能力にアシル - CoA レダクターゼおよび / またはアルコールデヒドロゲナーゼ活性のいずれかまたは両方が欠如している場合には、欠如している活性の外因性コード核酸の発現による導入が必要である。従って、選択された宿主微生物のマロニル - CoA 非依存性 FAS およびアシル還元経路成分に依存して、本発明の天然に存在しない微生物は、少なくとも 1 つの外因的に発現されたマロニル - CoA 非依存性 FAS 経路をコードする核酸と、6 つすべてまでのマロニル - CoA 非依存性 FAS およびアシル還元経路をコードする核酸を含むであろう。

50

【0052】

本明細書に提供する技術およびガイダンスを考慮すれば、発現可能な形態で導入するコード核酸の数が、選択された宿主微生物のマロニル - C o A 非依存性 F A S およびアシル還元経路欠如に匹敵するであろうことは、当業者には理解されるであろう。従って、本発明の天然に存在しない微生物は、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路、アシル還元経路、またはマロニル - C o A 非依存性 F A S とアシル還元生合成経路の両方を構成する上記酵素をコードするコード核酸 1、2、3、4、5 または 6 つを有する場合がある。一部の実施形態において、前記天然に存在しない微生物は、アシル - C o A および / または第一級アルコール生合成を助長するもしくは最適化するまたは他の有用な機能を宿主微生物にもたらす、他の遺伝子修飾も含む場合がある。1 つのそのような他の機能性としては、例えば、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路前駆体、例えばアセチル - C o A、 - ケトアシル - C o A、 - ヒドロキシアシル - C o A、 t r a n s - 2 - エノイル - C o A および / または脂肪アルデヒド、のうちの 1 つ以上の合成の増加を挙げることができる。

10

【0053】

一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない微生物は、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路によってアシル - C o A を合成する酵素能力を含有する、またはマロニル - C o A 非依存性 F A S および / もしくはアシル還元経路内の酵素的段階のうちの 1 つ以上を触媒する能力を有する、宿主から産生される。これらの特定の実施形態において、例えばマロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路反応を第一級アルコール生産に有効に向かわせるために、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路産物またはアシル還元経路産物の合成または蓄積を増加させることが有用であり得る。合成または蓄積増加は、例えば、上記マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路酵素のうちの 1 つ以上をコードする核酸の過発現によって遂行することができる。所望の経路酵素（単数または複数）の過発現は、例えば、内因性遺伝子（単数もしくは複数）の外因性発現によって、または異種遺伝子（単数もしくは複数）の外因性発現によって、行うことができる。従って、マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路酵素をコードする 1、2、3、4、5 または 6 つすべての核酸を過発現させることによって、自然に発生する生物を本発明の天然に存在しない第一級アルコール生産性微生物になるように産生させることが容易にできる。加えて、マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元生合成経路における酵素の活性を増加させる結果となる内因性遺伝子の突然変異誘発によって、天然に存在しない微生物を産生させることができる。

20

30

【0054】

特に有用な実施形態では、コード核酸の外因性発現を利用する。外因性発現は、使用者によって制御される所望の発現レベルを達成するために、発現および / または調節要素を注文に合わせて作る能力を宿主およびアプリケーションに付与する。しかし、他の実施形態では、例えば、負の調節エフェクターの除去、または誘導プロモーターもしくは他の調節要素に連結されているときにはその遺伝子のプロモーターの誘導により、内因性発現も利用することができる。例えば、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼおよびエノイル - C o A ヒドラターゼ活性に対応するマロニル - C o A 非依存性 F A S 活性を有する *E. coli* 遺伝子、*fadB* の活性化は、負のレギュレーター、*fadR* の遺伝子ノックアウトおよび異種ケトチオラーゼ (*Ralstonia eutropha* からの *phaA*; Sato ら、*Journal of Bioscience and Bioengineering* 103:38-44 (2007)) の共発現によって遂行することができる。従って、適切な誘導剤を供給することによって自然に発生する誘導プロモーターをアップレギュレートすることができ、または内因性遺伝子の調節領域を遺伝子工学で作り変えて誘導性調節要素を組み込むことができ、それによって、所望の時点での内因性遺伝子の発現増加の調節が可能となる。類似して、天然に存在しない微生物に導入される外因性遺伝子のための調節要素として誘導プロモーターを含めることができる。

40

【0055】

加えて、例えば、内因性酵素（単数または複数）が、所望のマロニル - C o A 非依存性

50

F A S 経路とは逆方向に働く場合、そのような活性を減弱するまたは除去するように遺伝子修飾を行うことができる。例えば、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路内で、ケトチオラーゼ、デヒドロゲナーゼ、およびエノイル - C o A ヒドラターゼ段階は、可逆的であり、これに対してエノイル - C o A レダクターゼ段階は、生理条件下で主として酸化力がある (H o f f m e i s t e r ら、J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 280:4329-4338(2005); C a m p b e l l , J . W . および J . E . C r o n a n , J r . , J B a c t e r i o l . 184:3759-3764(2002))。2 - エノイル - C o A 中間体の還元を遂行するために、遺伝子修飾を導入して逆酸化反応を減弱または除去することができる。

【0056】

マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路酵素のためのコード核酸源としては、例えば、コードされた遺伝子産物が当該反応を触媒できる任意の種を挙げることができる。そのような種は、古細菌および真性細菌をはじめとする細菌、ならびに酵母、植物、昆虫、動物および哺乳動物 (ヒトを含む) をはじめとする真核生物を含む (しかしこれらに限定されない)、原核生物と真核生物の両方を含む。例えば、第一級アルコール生合成生産を有する微生物を、本明細書では、E . c o l i 宿主に関して例示する。しかし、395の微生物ゲノムならびに様々な酵母、真菌、植物および哺乳動物ゲノムを含めて現在550を超える種について入手できる完全ゲノム配列 (これらの半分より多くがNCBIなどの公的データベースで入手できる) を用いる、例えば、公知遺伝子の相
20
同体、オーソログ、パラログおよび非オーソログ遺伝子置換、ならびに生物間の遺伝子改変の相互交換をはじめとする、類縁または遠縁種における1つ以上の遺伝子についての必要マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元生合成活性をコードする遺伝子の特定は、当該技術分野において常例的であり、周知である。従って、E . c o l i などの特定の生物に関して本明細書において説明する本発明の第一級アルコールの生合成を可能にする代謝改変を、同様に原核生物および真核生物を含む他の微生物に容易に適用できる。本明細書に提供する技術およびガイダンスを考慮すれば、ある生物において例示する代謝改変を他の生物に同等に適用できることは、当業者にはわかるであろう。

【0057】

代替マロニル - C o A 非依存性 F A S 成分酵素または経路が非類縁種に存在するときなどの一部の事例では、例えば、当該反応に代わる類似しているが同一でない代謝反応を触媒する非類縁種からのパラログ (単数または複数) の外因性発現によって、宿主種に第一級アルコール生合成をもたらすことができる。異なる生物間には代謝ネットワーク間の一定の相違が存在するので、異なる生物間で実際の遺伝子利用が異なることがあることは、当業者には理解されるであろう。しかし、本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、本発明の第一級アルコール産物を合成するであろう対象となる種内の微生物を構築するために、本明細書において例示するものへのコグネイト代謝改変を用いて、本発明の技術および方法をすべての微生物に適用することができることも、当業者には理解されるであろう。

【0058】

マロニル - C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路能力を宿主微生物に付与するための源として使用することができるコード核酸および種を下でさらに例示する。1つの例示的实施形態において、遺伝子 f a d A および f a d B は、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路の3つの成分活性、すなわち、ケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、およびエノイル - C o A ヒドラターゼ活性を示す多酵素複合体をコードする (N a k a h i g a s h i , K . および H . I n o k u c h i , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 18:4937(1990); Y a n g ら、J o u r n a l o f B a c t e r i o l o g y 173:7405-7406(1991); Y a n g ら、J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 265:10424-10429(1990); Y a n g ら、B i o c h e m i s t r y 30:6788-6795(1990))。f a d I および f a d J
40
50

遺伝子は、遺伝子 *fadA* および *fadB* をもたらす上記マロニル - CoA 非依存性 FAS の代わりに用いることができる類似の活性をコードする。これらの遺伝子は、嫌気性条件下で自然に発現される (*Compbell* および *Cronan*、上記文献、(2002))。上記 *fad* 遺伝子のそれぞれについての核酸配列は、当該技術分野において周知であり、以下のアクセッション番号を用いて Genbank などの公的データベースにおいて入手することができる。

fadA YP_026272.1 *Escherichia coli*
fadB NP_418288.1 *Escherichia coli*
fadI NP_416844.1 *Escherichia coli*
fadJ NP_416843.1 *Escherichia coli*
fadR NP_415705.1 *Escherichia coli*

10

ケトチオラーゼ段階についての他の例示的遺伝子としては、2つのアセチル - CoA 分子の可逆的縮合を触媒することができる *atoB* (*Sato*ら、上記文献、2007) およびそのホモログ *yqeF* が挙げられる。使用することができる非 *E. coli* 遺伝子としては、*R. eutropha* からの *phaA* (*Jenkins, L. S.* および *W. D. Nunn. Journal of Bacteriology* 169:42-52 (1987))、ならびに *Clostridium acetobutylicum* からの2つのケトチオラーゼ、*thiA* および *thiB* (*Winzer*ら、*Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2:531-541 (2000)) が挙げられる。これらの遺伝子についての配列は、以下の Genbank アクセッション番号で見つけることができる：

20

atoB NP_416728.1 *Escherichia coli*
yqeF NP_417321.2 *Escherichia coli*
phaA YP_725941 *Ralstonia eutropha*
thiA NP_349476.1 *Clostridium acetobutylicum*
thiB NP_149242.1 *Clostridium acetobutylicum*

3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ形質転換活性を付与するために使用することができる *E. coli* からの例示的遺伝子は、*paaH* (*Ismail*ら、*European Journal of Biochemistry* 270:3047-3054 (2003)) である。この活性を付与するために適用できる非 *E. coli* 遺伝子としては、*E. gracilis* からの *AAO72312.1* (*Winkler*ら、*Plant Physiology* 131:753-762 (2003))、*Pseudomonas putida* からの *paaC* (*Olivera*ら、*PNAS USA* 95:6419-6424 (1998))、*Pseudomonas fluorescens* からの *paaC* (*Di Gennaro*ら、*Archives of Microbiology* 188:117-125 (2007))、および *C. acetobutylicum* からの *hbd* (*Atsumi*ら、*Metabolic Engineering* (2007) および *Boynton*ら、*Journal of Bacteriology* 178:3015-3024 (1996)) が挙げられる。これらの例示的遺伝子のそれぞれについての配列を以下の Genbank アクセッション番号で見つけることができる：

30

paaH NP_415913.1 *Escherichia coli*
AAO72312.1 *Euglena gracilis*
paaC NP_745425.1 *Pseudomonas putida*
paaC ABF82235.1 *Pseudomonas fluorescens*
hbd NP_349314.1 *Clostridium acetobutylicum*

40

エノイル - CoA ヒドラターゼ段階をコードする例示的遺伝子としては、例えば、*ma*

50

oC (ParkおよびLee, Journal Bacteriology 185: 5391-5397 (2003)), paaF (Ismailら, European Journal of Biochemistry 270: 3047-3054 (2003)); ParkおよびLee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 335-346 (2004) ならびに ParkおよびYup, Biotechnol. Bioeng. 86: 681-686 (2004)), および paaG (Ismailら, European Journal of Biochemistry 270: 3047-3054 (2003); ParkおよびLee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 335-346 (2004) および ParkおよびYup, Biotechnol. Bioeng. 86: 681-686 (2004)) が挙げられる。この段階を触媒する遺伝子産物を生産するために使用することができる他の遺伝子、例えば、P. putida (Oliveraら, PNAS USA 95: 6419-6424 (1998)) および P. fluorescens (Di Gennaroら, Archives of Microbiology 188: 117-125 (2007)) からの paaA、paaB、および paaN が挙げられる。C. acetobutylicum からの crt の遺伝子産物も使用することができる (Atsumiら, Metabolic Engineering (2007) および Boyntonら, Journal of Bacteriology 178: 3015-3024 (1996))。これらの例示的遺伝子のそれぞれについての配列を以下の Genbank アクセッション番号で見つけることができる:

maoC NP_415905.1 Escherichia coli
paaF NP_415911.1 Escherichia coli
paaG NP_415912.1 Escherichia coli
paaA NP_745427.1 Pseudomonas putida
paaA ABF82233.1 Pseudomonas fluorescens
paaB NP_745426.1 Pseudomonas putida
paaB ABF82234.1 Pseudomonas fluorescens
paaN NP_745413.1 Pseudomonas putida
paaN ABF82246.1 Pseudomonas fluorescens
crt NP_349318.1 Clostridium acetobutylicum

エノイル-CoA レダクターゼ活性を付与するために本発明の天然に存在しない微生物に導入することができる例示的遺伝子は、E. gracilis からのミトコンドリアエノイル-CoA レダクターゼである (Hoffmeisterら、上記文献 (2005))。そのミトコンドリアターゲッティングリーダー配列の除去後にこの配列から得られる構築物を E. coli においてクローニングし、発現させた。膜をターゲットにするポリペプチドの可溶性形態での異種発現のためのこのアプローチは、原核生物において真核遺伝子、特に、遺伝子産物を特定の細胞内コンパートメントにターゲッティングすることができるリーダー配列を有するものを発現させることについて、当業者には周知である。原核生物 Treponema denticola からのこの遺伝子の近縁ホモログ、TD E0597 も、エノイル-CoA レダクターゼ活性を付与するために利用することができる (Tucci および Martin, FEMS Letters 581: 1561-1566 (2007))。C. acetobutylicum からの bcd によってコードされるブチリル-CoA デヒドロゲナーゼは、本発明の宿主微生物にエノイル-CoA レダクターゼ活性を付与するために使用することができるさらなる例示的酵素である (Atsumiら、Metabolic Engineering (2007) および Boyntonら、Journal of Bacteriology 178: 3015-3024 (1996))。あるいは、当該技術分野において周知の方法を用いて、この活性を示す E. coli 遺伝子を得ることができる (例えば、Mizugakiら、Chemical & Pharmaceutical Bulletin 30: 206-213

10

20

30

40

50

(1982)およびNishimakiら、Journal of Biochemistry 95:1315-1321(1984)参照)。上記例示的遺伝子のそれぞれの
 ついての配列を以下のGenbankアクセッション番号で見つけることができる：

TER Q5EU90.1 Euglena gracilis
 TDE0597 NP_971211.1 Treponema denticola
 bcd NP_349317.1 Clostridium acetobutylicum

少なくとも3つのミトコンドリアエノイル-CoAレダクターゼ酵素がE. gracilisに存在し、それらを本発明での使用に同様に利用することができる。それぞれのエ
 ノイル-CoAレダクターゼ酵素は、ユニークな鎖長選好を有し(Inuiら、European Journal of Biochemistry 142:121-126
 (1984))、これは、本発明の所望の第一級アルコール産物の鎖長の指図に特に有用
 である。ESTのELL00002199、ELL00002335、およびELL00
 002648(すべてにミトコンドリアtrans-2-エノイル-CoAレダクターゼ
 との注釈が付いている)を使用して、下でさらに詳細に説明するように、これらの追加の
 エノイル-CoAレダクターゼ遺伝子を単離することができる。

【0059】

当業者は、利用できる源からの公知配列を使用してクローニングすることにより、マロ
 ニル-CoA非依存性FAS経路またはアシル還元経路のいずれかまたはすべてをコード
 する核酸を得ることもできる。例えば、当該技術分野において周知の方法を用いて、マロ
 ニル-CoA非依存性FAS経路についてのコード核酸のいずれかまたはすべてをE. g
 racilisから容易に得ることができる。この経路は、この生物において十分に特性
 づけされているからである。配列がわかっているプローブを使用して、例えばE. gra
 cilis cDNAライブラリから、E. gracilisコード核酸を単離すること
 ができる。前記プローブは、公的に利用できる配列データベースTBESTDB(<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>)からの以下のEST配列
 からの全または部分DNA配列を用いて設計することができる。このプロセスから生ずる
 核酸を適切な発現ベクターに挿入し、E. coliまたは他の微生物に形質転換させて、
 本発明の第一級アルコール生産生物を産生させることができる。

ケトアシル-CoAアシルトランスフェラーゼ(またはケトアシル-CoAチオラーゼ)

ELL00002550
 ELL00002493
 ELL00000789

3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ

ELL00000206
 ELL00002419
 ELL00006286
 ELL00006656

エノイル-CoAヒドラターゼ

ELL00005926
 ELL00001952
 ELL00002235
 ELL00006206

エノイル-CoAレダクターゼ

ELL00002199
 ELL00002335
 ELL00002648

あるいは、上記EST配列を使用して、GenBankにおいてBLAST検索により
 相同ポリペプチドを特定することができる。結果として得られた相同ポリペプチドおよび

それらの対応する遺伝子配列により、本発明の第一級アルコール生産性生物を産生させる *E. coli* または他の微生物への形質転換のための追加のコード核酸が得られる。本発明の天然に存在しない生物における使用に利用できる例示的相同ポリペプチドおよび GenBank におけるそれらの遺伝子アクセッション番号を下に列挙する。

ケトアシル - CoA アシルトランスフェラーゼ (またはケトアシル - CoA チオラーゼ)

Y P__001530041 *Desulfococcus oleovorans*

H x d 3

Z P__02133627 *Desulfatibacillum alkenivorans* AK - 01

Z P__01860900 *Bacillus* 種 SG - 1

10

Y P__001511817 *Alkaliphilus oremlandii* O h I L A s

N P__781017 *Clostridium tetani* E 8 8

Y P__001646648 *Bacillus weihenstephanensis* K B A B 4

Y P__001322360 *Alkaliphilus metalliredigens* Q Y M F

Y P__001397054 *Clostridium kluyveri* D S M 5 5 5

N P__070026 *Archaeoglobus fulgidus* D S M 4 20 3 0 4

Y P__001585327 *Burkholderia multivorans* A T C C 1 7 6 1 6

3 - ヒドロキシアシル - CoA デヒドロゲナーゼ

A A 0 7 2 3 1 2 *Euglena gracilis*

X P__001655993 *Aedes aegypti*

N P__001011073 *Xenopus tropicalis*

N P__001003515 *Danio rerio*

X P__973042 *Tribolium castaneum*

X P__001638329 *Nematostella vectensis*

30

C A G 1 1 4 7 6 *Tetraodon nigroviridis*

X P__787188 *Strongylocentrotus purpuratus*

s

X P__001749481 *Monosiga brevicollis* M X 1

N P__509584 *Caenorhabditis elegans*

X P__572875 *Cryptococcus neoformans* var

エノイル - CoA ヒドラターゼ

X P__844077 *Trypanosoma hrucei*

X P__802711 *Trypanosoma cruzi* 株 CL Brener

X P__806421 *Trypanosoma cruzi* 株 CL Brener .

40

Y P__001669856 *Pseudomonas putida* G B - 1

Y P__641317 *Mycobacterium* 種 M C S

Y P__959434 *Marinobacter aquaeolei* V T 8

A B K 2 4 4 4 5 *Picea sitchensis*

X P__640315 *Dictyostelium discoideum*

Y P__633978 *Myxococcus xanthus* D K 1 6 2 2

Y P__467905 *Rhizobium etli* C F N 4 2

Y P__419997 *Magnetospirillum magneticum*

A M B - 1

Y P__001172441 *Pseudomonas stutzeri* A 1 5

50

0 1

エノイル - C o A レダクターゼ .

X P _ 6 4 2 1 1 8 D i c t y o s t e l i u m d i s c o i d e u m A X 4

X P _ 0 0 1 6 3 9 4 6 9 N e m a t o s t e l l a v e c t e n s i s

X P _ 0 0 1 6 4 8 2 2 0 A e d e s a e g y p t i

X P _ 9 7 4 4 2 8 T r i b o l i u m c a s t a n e u m

X P _ 5 3 5 3 3 4 C a n i s l u p u s f a m i l i a r i s (イヌ)

N P _ 0 0 1 0 1 6 3 7 1 X e n o p u s t r o p i c a l i s

X P _ 3 2 0 6 8 2 A n o p h e l e s g a m b i a e s t r . P E S T

Z P _ 0 1 6 4 5 6 9 9 S t e n o t r o p h o m o n a s m a l t o p h i l 10

i a

X P _ 0 0 1 6 7 9 4 4 9 C a e n o r h a b d i t i s b r i g g s a e A

F 1 6

Z P _ 0 1 4 4 3 6 0 1 R o s e o v a r i u s 種 H T C C 2 6 0 1

X P _ 3 9 5 1 3 0 A p i s m e l l i f e r a

X P _ 0 0 1 1 1 3 7 4 6 M a c a c a m u l a t t a

Z P _ 0 1 4 8 5 5 0 9 V i b r i o c h o l e r a e V 5 1

Z P _ 0 2 0 1 2 4 7 9 O p i t u t a c e a e b a c t e r i u m T A V 2

Z P _ 0 1 1 6 3 0 3 3 P h o t o b a c t e r i u m 種 S K A 3 4

Y P _ 2 6 7 4 6 3 C o l w e l l i a p s y c h r e r y t h r a e a 3 4 20

H

Z P _ 0 1 1 1 4 2 8 2 R e i n e k e a 種 M E D 2 9 7

Z P _ 0 1 7 3 2 8 2 4 F l a v o b a c t e r i a b a c t e r i u m B A L

3 8

前に説明したように、マロニル - C o A 非依存性伸長サイクル後、結果として得られるアシル - C o A を、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を示す単一の酵素または1対の酵素のいずれかによって還元して、第一級アルコールを生産することができる。アシル - C o A のその対応するアルデヒドへの還元を触媒するための酵素をコードする例示的遺伝子としては、脂肪アシル - C o A レダクターゼをコードする *Acinetobacter calcoaceticus* *acr1* (Reiser および Somerville, Journal of Bacteriology 179:2969-2975 (1997))、*Acinetobacter* 種 M-1 脂肪酸アシル - C o A レダクターゼ (Ishige ら、Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002))、および *Clostridium kluyveri* からの *sucD* 遺伝子 (Sohling および Gottschalk, Journal Bacteriology 178:871-880 1996)) が挙げられる。

30

acr1 Y P _ 0 4 7 8 6 9 . 1 *Acinetobacter calcoaceticus*

A A C 4 5 2 1 7 *Acinetobacter baylyi*

40

B A B 8 5 4 7 6 . 1 *Acinetobacter* 種、株 M-1*sucD* P 3 8 9 4 7 . 1 *Clostridium kluyveri*

アルデヒドのアルコールへの変換を触媒する酵素 (すなわち、アルコールデヒドロゲナーゼまたは等価にアルデヒドレダクターゼ) をコードする例示的遺伝子としては、C2 ~ C14 のための中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードする *alrA* (Tani ら、Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235 (2000))、*Saccharomyces cerevisiae* からの *ADH2* (Atsumi ら、Nature 451:86-89 (2008))、および C3 より長い分子に対する選好を有する *E. coli* からの *yqhD* (Sulzenbacher ら、Journal of Molecular Biology 342:489-502 (200

50

4)) が挙げられる。

alrA BAB12273.1 Acinetobacter 種、株 M-1
ADH2 NP_014032.1 Saccharomyces cerevisiae
yqhD NP_417484.1 Escherichia coli

あるいは、脂肪酸形成性アシル-CoAレダクターゼによって、またはアシル-CoAレダクターゼとアルコールデヒドロゲナーゼの二重活性を有する任意の他の酵素によって、脂肪アシル-CoAを一段階で還元することができる。例えば、ホホバ(Simmondsia chinensis) FARは、アルコール形成性脂肪アシル-CoAレダクターゼをコードし、E. coliにおけるその過発現は、FAR活性および脂肪アルコール蓄積を生じさせる結果となった(Metzら、Plant Physiology 122:635-644(2000))。狭い基質鎖長特異性を有するレダクターゼは、産物の鎖長についての追加の制御手段としての機能も果たす。追加の遺伝子候補としては、アセチル-CoAおよびブチリル-CoAをそれぞれエタノールおよびブタノールに還元することができる、E. coli adhE(Kesslerら、FEBS Letters 281:59-63(2000))ならびにC. acetobutylicum bdh Iおよびbdh II(Walterら、Journal of Bacteriology 174:7149-7158(1992))が挙げられる。

FAR AAD38039.1 Simmondsia chinensis
adhE NP_415757.1 Escherichia coli
bdh I NP_349892.1 Clostridium acetobutylicum
bdh II NP_349891.1 Clostridium acetobutylicum

加えて、マロニル-CoA非依存性FAS経路コード核酸について前に説明したように、還元段階のための酵素をコードするE. gracilis核酸配列を得て宿主に形質転換することができる。前に説明したように、TBESTDB(<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>)からの以下のEST配列からの全または部分DNA配列を用いて設計したプローブを使用して、E. gracilis cDNAライブラリからの単離を行うことができる。

【0060】

アルデヒドデヒドロゲナーゼ

ELL00002572

ELL00002581

ELL00000108

上の例示的コード核酸に加えて、本発明のマロニル-CoA非依存性FASおよび/またはアシル還元経路内のもの以外の核酸も、第一級アルコールのさらなる生産のために宿主生物に導入することができる。例えば、Ralstonia eutropha BktBおよびPhbB遺伝子は、-ケト-ヘキサノイル-CoAを形成するブチリル-CoAとアセチル-CoAの縮合、および-ケト-ヘキサノイル-CoAの3-ヒドロキシ-ヘキサノイル-CoAへの還元を触媒する(Fukuiら、Biomacromolecules 3:618-624(2002))。第一級アルコールの生産を増進させるために、これらの特異的酵素をコードする外因性DNA配列を対象となる生産宿主において発現させることができる。さらに、上で説明した酵素を指向進化させて、高い活性および高い基質特異性を有するこれらの酵素の改良変種を産生させることができる。類似のアプローチを本発明の第一級アルコール生産経路における任意のまたはすべての他の段階と共に用いて、例えば、酵素活性および/もしくは特異性を向上させることもでき、ならびに/または所定の鎖長(単数もしくは複数)の長鎖アルコールを生成することもできる。

【0061】

10

20

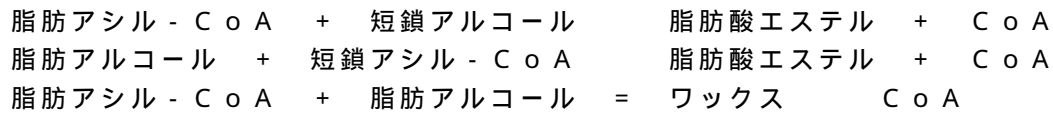
30

40

50

加えて、上で説明したように生成させた脂肪アシル - C o A および脂肪アルコールを様々な長さのエステルの生産に利用することができる。これらのエステルは、以下の反応式に示すように、1) 脂肪アシル - C o A と、短鎖アルコール、例えばメタノール、エタノール、プロパノールなど；2) 脂肪アルコールと、短鎖アシル - C o A、例えばホルミル - C o A、アセチル - C o A、およびプロピオニル - C o A など；3) 脂肪アシル - C o A と脂肪アルコールとで形成することができる。

【 0 0 6 2 】



10

脂肪（または長鎖）アルコールは、本明細書に記載する経路によって細胞内で合成することができる、または培地に添加し、遺伝子工学で作り変えられた微生物に取り込ませることができる。類似して、短鎖アルコールを培地に添加することができる、または内因的に生産することができる。エタノールは、*Escherichia coli* および *Saccharomyces cerevisiae* をはじめとする多くの微生物によって自然に生産される例示的短鎖アルコールである。例示的脂肪酸エステルとしては、脂肪酸メチルエステル（FAME）、脂肪酸エチルエステル（FAEE）、アセチルエステル、およびワックスが挙げられるが、これらに限定されない。そのような分子は、食品、パーソナルケア、塗料、界面活性剤およびバイオディーゼルをはじめとする広い用途を有する（Gerhard Knothe, *Energy & Fuels* 2008, 22, 1358 - 1364）。これに関連して、脂肪酸エステルは、エステル結合の両側の炭化水素鎖のサイズによってワックスとは区別される。ワックスは、エステル結合の両側に長鎖炭化水素を有し、これに対して脂肪酸エステルは、エステル結合の各側にそれぞれ1つの短鎖炭化水素と1つの長鎖炭化水素とを有する。

20

【 0 0 6 3 】

これらのエステルを生成する反応を、アシル - C o A : アルコールトランスアシラーゼ活性を有する酵素によって触媒することができる。脂肪酸エステルの形成を触媒するための例示的酵素としては、アシル - C o A : 脂肪アルコールアシルトランスフェラーゼ（ワックスエステルシンターゼ、WS、EC 2.3.1.75）およびアセチル - C o A : アルコールO - アセチルトランスフェラーゼ（EC 2.3.1.84）が挙げられる。これらの酵素をコードする例示的遺伝子としては、ワックスエステルシンターゼ（WS）活性とアシル - C o A : ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT）活性の両方を有する二機能性酵素をコードする *Acinetobacter* 種 ADP1 atfA (Kalscheuerら、*AJ Biol Chem* 2003, 278: 8075 - 8082.) ; ホホバ種子におけるワックスの蓄積に必要なWSをコードする *Simmondsia chinensis* 遺伝子 AAD38041 (Lardizabalら、*Plant Physiology* 2000, 122: 645 - 655.) ; 二機能性WS / DGAT 酵素をコードする *Alcanivorax borkumensis* atfA1 および atfA2 (Kalscheuerら、*J Bacteriol* 2007, 189: 918 - 928.) ; アルコールアセチルトランスフェラーゼをコードする *Fragaria x ananassa* AAT (Noichindaら、*Food Sci Technol Res* 1999, 5: 239 - 242.) ; アルコールアセチルトランスフェラーゼをコードするバラ属ハイブリッド栽培品種 AAT1 (Gutermanら、*Plant Mol Biol* 2006, 60: 555 - 563.) ; ならびにアルコールアセチルトランスフェラーゼをコードする *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 および ATF2 (Masonら、*Yeast* 2000, 16: 1287 - 1298) が挙げられる。

30

40

atfA Q8GGG1 *Acinetobacter* 種 ADP1
AAD38041 *Simmondsia chinensis*
atfA1 YP_694462 *Alcanivorax borkumensis*

50

i s S K 2
 a t f A 2 Y P _ 6 9 3 5 2 4 A l c a n i v o r a x b o r k u m e n s
 i s S K 2
 A A T A A G 1 3 1 3 0 F r a g a r i a x a n a n a s s a
 A A T 1 Q 5 I 6 B 5 パラハイブリッド栽培品種
 A T F 1 P 4 0 3 5 3 S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e
 A T F 2 P 5 3 2 9 6 S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e

例えば、細菌、酵母、真菌、または発酵プロセスに利用できる様々な他の微生物から宿主微生物を選択することができ、かつ細菌、酵母、真菌、または発酵プロセスに利用できる様々な他の微生物において天然に存在しない微生物を産生させることができる。例示的細菌としては、*E. coli*、*Rhodococcus opacus*、*Ralstonia eutropha*、*Klebsiella oxytoca*、*Anaerobiospirillum succiniciproducens*、*Actinobacillus succinogenes*、*Mannheimia succiniciproducens*、*Rhizobium etli*、*Bacillus subtilis*、*Corynebacterium glutamicum*、*Gluconobacter oxydans*、*Zymomonas mobilis*、*Lactococcus lactis*、*Lactobacillus plantarum*、*Streptomyces coelicolor*、*Clostridium acetobutylicum*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas putida*および*E. gracilis*から選択される種が挙げられる。例示的酵母または真菌としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus niger* and *Pichiopastoris*から選択される種が挙げられる。

【0064】

天然に存在しない第一級アルコール生産性宿主の構築方法および発現レベル試験方法は、例えば、当該技術分野において周知の組み換え方法および検出方法によって行うことができる。そのような方法は、例えば、*Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)*; *Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)*に記載されているのを見つけることができる。例えば、マロニル - CoA非依存性FASおよび/またはアシル還元経路における酵素をコードする核酸は、コンジュゲーション、エレクトロポレーション、化学的形質転換、形質導入、トランスフェクションおよび超音波形質転換をはじめとする（しかしこれらに限定されない）当該技術分野において周知の技術を用いて、宿主細胞に安定的にまたは一過的に導入することができる。*E. coli*または他の原核細胞における外因性発現については、例えば、ミトコンドリア遺伝子は、宿主細胞への形質転換前に除去することができるN末端ターゲティングシグナルをコードするであろう。酵母または他の真核細胞における外因性発現については、遺伝子を、ターゲティング配列の付加なしでサイトゾルにおいて発現させることができ、または代替的に、宿主生物において機能し得るミトコンドリアターゲティングシグナルを付加させてミトコンドリアにターゲティングすることができる。さらに、当該技術分野において周知の技術でのコドン最適化に遺伝子を付して、1つ以上のマロニル - CoA非依存性FASおよび/またはアシル還元経路遺伝子産物の最適な発現を達成することができる。

【0065】

宿主生物において機能し得る発現制御配列に作動可能に連結された1つ以上のマロニル

- C o A 非依存性 F A S および / またはアシル還元経路コード核酸を有するように発現ベクター（単数または複数）を構築することができる。本発明の微生物宿主生物における使用に適用することができる発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクターおよび人工染色体が挙げられる。例えば、抗生物質もしくは毒素に対する耐性を提供する、栄養要求性欠損を補足する、または培養基中にない重要な栄養素を供給する、選択マーカー遺伝子も含めることができる。発現制御配列としては、当該技術分野において周知である、構成的および誘導プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターおよびこれらに類するものを挙げることができる。コードする2つ以上の外因性核酸を共発現させようとするとき、両方の核酸を、例えば、単一の発現ベクターに挿入することができ、または別個の発現ベクターに挿入することができる。単一ベクター発現の場合、コード核酸を1つの共通の発現制御配列に動作可能に連結することができ、または異なる発現制御配列、例えば、1つの誘導プロモーターと1つの構成的プロモーターに連結させることができる。代謝または合成経路に関与する外因性 D N A 配列の形質転換は、当該技術分野において周知の方法を用いて確認されるであろう。

【0066】

当業者に周知の方法を用いて、第一級アルコール生産を検出および / またはモニターすることができる。例えば、第一級アルコールの最終産物および / または中間体、例えばアシル - C o A および有機酸を、H P L C、G C - M S および L C - M S によって分析することができる。例えば、S p h e r i s o r b 5 O D S 1 カラムと 7 0 % 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H = 7) および 3 0 % メタノールの移動相とを使用する H P L C によっ

【0067】

上に例示したような当該技術分野において周知の方法を用いて本発明の天然に存在しない微生物を構築して、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも1つの核酸を、第一級アルコール生産するために十分な量で、外因的に発現させる。本明細書に提供する教示およびガイダンスに従って、本発明の天然に存在しない微生物は、自然に発生する生物において合成され得るものより多くの生合成を達成することができる。一般に、例えばオクタノールの細胞内濃度は、約 5 4 μ g / L であり、デカノールは、約 1 4 8 μ g / L である。

【0068】

さらに下で説明するように、第一級アルコールの生合成を達成するための1つの例示的増殖条件は、嫌気性培養または発酵条件である。一定の実施形態において、本発明の天然に存在しない微生物は、嫌気性または実質的に嫌気性の条件下で維持する、培養するまたは発酵させることができる。簡単に言うと、嫌気性条件は、酸素が全く無い環境を指す。実質的に嫌気性の条件は、例えば、培地中の溶解酸素濃度が、飽和の 0 % と 1 0 % の間で

【0069】

本発明は、第一級アルコールの生産方法をさらに提供する。この方法は、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現される、マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、マロニル - C o A 非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とを有する天然に存在しない微生物を、実質的に嫌気性

の条件下で、前記第一級アルコールを生産するために十分な期間にわたって培養することを含み、前記マロニル - C o A 非依存性 F A S 経路は、ケトアシル - C o A アシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ、エノイル - C o A ヒドラターゼおよびエノイル - C o A レダクターゼを含み、前記アシル還元経路は、アシル - C o A レダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む。

【0070】

前に説明したいずれの天然に存在しない微生物も、培養して本発明の生合成産物を生産することができる。例えば、それらの第一級アルコール生産体を、その遺伝子工学で作られるターゲット第一級アルコールの生合成生産のために培養することができる。その第一級アルコールを単離することができ、または単離して多種多様な製品および手順においてさらに利用することができる。

10

【0071】

一部の実施形態において、培養条件は、嫌気性または実質的に嫌気性の増殖または維持条件を含む。例示的嫌気性条件は、前に説明したものであり、当該技術分野において周知である。発酵プロセスのための例示的嫌気性条件は、下で説明するものであり、当該技術分野において周知である。これらの条件のいずれも、天然に存在しない微生物、ならびに当該技術分野において周知の他の嫌気性条件と共に用いることができる。

【0072】

培養条件としては、例えば、液体培養手順ならびに発酵および他の大規模培養手順を挙げることができる。下の実施例においてさらに説明するように、本発明の生合成産物の特に有用な収量を嫌気性または実質的に嫌気性の培養条件下で得ることができる。例示的増殖手順としては、例えば、流加発酵および回分分離；流加発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離が挙げられる。これらのプロセスのすべてが当該技術分野において周知である。

20

【0073】

発酵手順は、第一級アルコールの商業的な量の生合成生産に特に有用である。一般に、および非連続培養手順でのように、第一級アルコールの連続および／または準連続生産は、指数期における増殖を持続するおよび／またはほぼ持続するために十分な栄養および培地で本発明の天然に存在しない第一級アルコール生産性生物を培養することを含むであろう。そのような条件下での連続培養を、例えば、1日、2、3、4、5、6または7日以上含むことができる。加えて、連続培養は、1週間、2、3、4または5週間以上、および数か月以下を含むことができる。あるいは、特定の用途に適する場合には、本発明の生物を数時間培養することができる。前記連続および／または準連続培養条件がこれらの例示期間の間のすべての時間間隔も含み得ることは理解されるはずである。

30

【0074】

発酵手順は、当該技術分野において周知である。簡単に言うと、本発明の第一級アルコール産物の生合成生産のための発酵は、例えば、流加発酵および回分分離；流加発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離で用いることができる。当該技術分野において周知の回分および連続発酵手順の例を下の実施例でさらに例示する。

40

【0075】

さらなる実施形態において、本発明の第一級アルコール生産性微生物は、再生可能な供給原料と、増殖のための炭素源としての炭素含有ガスとを利用する。これらの代替材料の供給原料としての利用は、環境的観点からおよび本発明の第一級アルコールなどのバイオプロセス由来の産物のより低い生産コストから利益を受けるので、特に有用である。

【0076】

本発明の修飾生物での発酵プロセスを含めて、本発明の第一級アルコール生産性生物の増殖に有用な再生可能な供給原料は、炭素または他のエネルギー源の補給物として細胞が利用できる任意の再生原料を含むことができる。一般に、再生可能な供給原料は、もみ殻などの十分に活用されない成分から多くの場合成る、バイオマスに由来する材料を含む、

50

生きている生物またはそれらの代謝副産物から得られる。再生可能な供給原料として使用するために特に育成されるおよび本発明の方法において有用な農産物としては、例えば、トウモロコシ、大豆および綿；亜麻仁および菜種；サトウキビおよびパーム油が挙げられる。従って、使用することができる再生可能な供給原料としては、本発明の第一級アルコール生産性生物が炭素源として活用できる農業物質および／または動物質から得られる数多くの炭水化物、脂肪およびタンパク質が挙げられる。

【0077】

持続可能にエネルギー源として利用できる植物由来のバイオマスとしては、例えば、草質および木質エネルギー作物、農産食品および飼料作物、農産物廃棄物および残渣、木材廃棄物および残渣、水生植物、ならびに都市廃棄物をはじめとする他の廃材が挙げられる（例えば、バイオマス源の150より多くの例示の種類を記載しているデータベースを含む、URL leere.energy.gov/biomass/information_resources.htmlを参照のこと）。本発明の方法において供給原料として使用することができるバイオマスの例示的タイプとしては、セルロース系バイオマス、ヘミセルロース系バイオマスおよびリグニン供給原料または供給原料の一部が挙げられる。そのようなバイオマス供給原料は、例えば、炭素源として有用な炭水化物基質、例えばグルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトースおよびデンプンを含む。本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、上に例示したものの以外の再生可能な供給原料およびバイオマスも多種多様な第一級アルコールの生産のために本発明の微生物を培養するために使用できることは、当業者には理解されるであろう。

【0078】

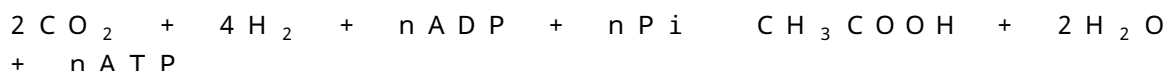
上に例示したもののなどの再生可能な供給原料に加えて、本発明の第一級アルコール生産性微生物を、その炭素源としてシンガスを用いる増殖用に修飾することもできる。この特定の実施形態では、第一級アルコール生産性生物において1つ以上のタンパク質または酵素を発現させて、シンガスまたは他の気体炭素源の利用のための代謝経路を提供する。

【0079】

シンガスまたは発生炉ガスとしても公知である合成ガスは、石炭の気化、および農産物および残渣をはじめとする、バイオマス材料などの炭質材料の気化の主生成物である。シンガスは、主として H_2 と CO の混合物であり、ならびに石炭、石油、天然ガス、バイオマスおよび有機廃棄物をはじめとする（しかしこれらに限定されない）任意の有機供給原料の気化から得ることができる。気化は、一般に、高燃料対酸素比のもとで行われる。大部分は H_2 および CO だが、シンガスは、より少ない量で CO_2 および他のガスを含むこともある。従って、合成ガスは、 CO および、その上、 CO_2 などの、費用効率のよい気体炭素源になる。

【0080】

Wood-Ljungdahl経路は、アセチル-CoAおよび他の産物、例えば酢酸塩への CO および H_2 の変換を触媒する。 CO およびシンガスを利用することができる生物は、Wood-Ljungdahl経路に包含される酵素と形質転換の同じ基本セットにより、 CO_2 および CO_2/H_2 混合物を利用する能力も一般に有する。微生物による酢酸塩への CO_2 の H_2 依存性変換は、同じ生物によって CO も用いられることがあることおよび同じ経路が関与することが明らかになるずっと以前から認知されていた。多くの酢酸生成細菌が CO_2 の存在下で増殖し、水素が存在する限り酢酸塩などの化合物を生産して必要還元等価物を補充することは証明されている（例えば、Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994) 参照）。これは、次の反応式によって要約することができる：



従って、Wood-Ljungdahl経路を有する天然に存在しない微生物は、アセチル-CoAおよび他の所望の産物の生産のためにも CO_2 と H_2 の混合物を利用すること

ができる。

【0081】

Wood - L j u n g d a h l 経路は、当該技術分野において周知であり、12の反応から成り、それらの反応を2つのブランチ：(1)メチルブランチおよび(2)カルボニルブランチに分けることができる。メチルブランチは、シンガスをメチル - テトラヒドロ葉酸塩(メチル - T H F)に変換するのに対して、カルボニルブランチは、メチル - T H Fをアセチル - C o Aに変換する。メチルブランチにおける反応は、次の酵素により順を追って触媒される：フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンセターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ。カルボニルブランチにおける反応は、次の酵素により順を追って触媒される：コバラミドコリノイド/鉄 - 硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチル - C o Aシンターゼ、アセチル - C o Aシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼ。マロニル - C o A非依存性F A Sおよび/またはアセチル還元経路のいずれかまたは両方を完了するために十分な数のコード核酸を導入するための上に提供した技術およびガイダンスに従って、宿主生物に不在のWood - L j u n g d a h l 経路をコードする遺伝子を少なくとも導入することに関しても同じ工学設計を行うことができることは、当業者には理解されるであろう。従って、修飾された生物が完全Wood - L j u n g d a h l 経路を含有するような、本発明の微生物への1つ以上のコード核酸の導入は、シンガス利用能力をもたらすであろう。

【0082】

本発明は、1つには、L C Aの増殖連動生産を有する細胞および生物の設計および産生にも関する。1つの実施形態において、本発明は、L C Aの最適な生産のための代謝設計を特定する*E s c h e r i c h i a c o l i*代謝のインシリコ化学量論的モデルに基づく最適化ベースのアプローチを利用する。二層プログラミングフレームワーク、O p t K n o c k、は、L C Aの増殖連動生産を共同でもたらす遺伝子破壊の多数のセットを予想する反復的アルゴリズムである。本明細書に記載する結果は、戦略的に配置された遺伝子欠失または遺伝子の機能破壊の組み合わせが、*E s c h e r i c h i a c o l i*および他の細胞もしくは微生物のL C A生産能力を有意に向上させることを示している。前記株設計戦略は、*E . c o l i*以外の生物が生産宿主として選ばれる場合にも、破壊に指定される遺伝子産物のサブセットの活性をその生物が生来欠く場合または低い活性を示す場合でさえ、同等に利用できる。これらの場合、選択された生産宿主に生来存在する遺伝子産物の酵素活性を除去または減少させるためにしか破壊を導入してはならない。インシリコ設計のためのL C Aの増殖連動生産は、設計された代謝遺伝子型を有する株の構築によって確認される。代謝経路が遺伝子工学で作り変えられたこれらの細胞または微生物を適応進化させて、増殖連動産物生産をさらに増加させることもできる。

【0083】

本発明は、1つには、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*代謝のインシリコ化学量論的モデルに基づく長鎖アルコール、つまりL C Aを生産する細胞および生物の設計および産生にも関する。例えば、非生産性増殖期、その後、非増殖生産期をもたらすことによる非増殖連動生産によってもL C Aを生産できることが当業者にはわかるであろう。本明細書に記載する結果は、遺伝子破壊または遺伝子の機能破壊の組み合わせが、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*のならびに真核生物および真核微生物の他の細胞のL C A生産能力を有意に向上させることを示している。前記株設計経路は、*S . c e r e v i s i a e*以外の真核微生物が生産宿主として選ばれる場合にも、破壊に指定される遺伝子産物のサブセットの活性をその生物が生来欠く場合または低い活性を示す場合でさえ、同等に適用できる。後者の場合、選ばれた生産宿主に生来存在する遺伝子産物の酵素活性を除去または減少させるために破壊を導入することができる。一部の実施形態において、インシリコで決定された代謝経路についてのL C Aの増殖連動生産は、設計された代謝遺伝子型を有する株の構築によって確認される。代謝経路が遺伝子工学

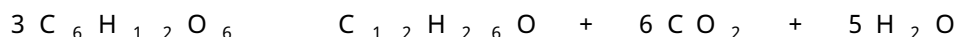
で作り変えられたこれらの細胞または生物を適応進化させて、増殖連動産物生産をさらに増加させることもできる。一部の実施形態では、遺伝子工学で作り変えられた細胞または生物に、特定の代謝経路を通るフラックスを増加させるために有益な遺伝子の追加のコピーを組み込むこともできる。あるいは、別の生物からの外因性遺伝子挿入を用いて、その宿主生物に存在しない機能性を持たせることができる。

【0084】

一部の実施形態において、設計されたLCA生産経路は、図1に示すように、脂肪酸の還元と連動するマロニル-CoA非依存性脂肪酸合成経路を利用して第一級アルコールを形成する。前記マロニル-CoA非依存性LCA生産経路(MI-LCA経路)は、マロニル-CoA非依存性脂肪酸合成段階およびアシル-CoA還元段階を含む。MI-LCA経路を有する遺伝子工学で作り変えた微生物は、グルコースおよびスクロースなどの低コストで再生可能な供給原料を解糖によってアセチル-CoAに変換するであろう。その後、アセチル-CoAは、ケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、エノイル-CoAヒドラターゼおよびエノイル-CoAレダクターゼを含む伸長サイクルにおいてプライマーとしても延長単位としても用いられる。それぞれの伸長サイクルの終わりに、その伸長サイクルに入るアシル-CoAよりC₂単位が1個長いアシル-CoAが形成される。その後、所望の鎖長を有するアシル-CoAが、アシル-CoAレダクターゼとアルコールデヒドロゲナーゼの組み合わせまたは脂肪アルコール形成性アシル-CoAレダクターゼによって還元されて、所望の第一級アルコールを形成する。鎖長特異的エノイル-CoAレダクターゼ、ケトアシル-CoAチオラーゼ、および/またはアシル-CoAレダクターゼによってそのLCAの炭素鎖長は制御することができる。

【0085】

前記MI-LCA経路は、LCA生産のための典型的なエネルギー集約的脂肪酸合成経路によるものより良好な産物およびATP収量という利点を有する。例えば、MI-LCA経路を用いるドデカノール(C₁₂)の最大理論収量は、好気性条件下でも嫌気性条件下でも消費されるグルコース1molにつき0.333molである：



加えて、MI-LCA経路のエネルギーおよびレドックス特性が、それを、OptKnockアルゴリズムを用いてLCA生産を増殖に連動させる株の産生に適するものにする(Burgard, A. P., P. Pharkya, and C. D. Maranas, Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng*, 2003. 84(6): p. 647-57; Pharkya, P., A. P. Burgard, and C. D. Maranas, Exploring the overproduction of amino acids using the bilevel optimization framework OptKnock. *Biotechnol Bioeng*, 2003. 84(7): p. 887-99; Pharkya, P., A. P. Burgard, and C. D. Maranas, OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems. *Genome Res*, 2004. 14(11): p. 2367-76)。結果として得られる増殖連動生産株は、本質的に安定しており、自己最適化性であり、回分、流加、および連続プロセス設計に適するであろう。

【0086】

一部の実施形態において、本発明は、LCA生産特性の向上を有する代謝的に改変された微生物株を発生させるためのコンピュータ計算と工学処理の統合プラットフォームに関する。このプラットフォームのコンピュータ計算コンポーネントによって特定された株を、LCAの生産増進をもたらす予測代謝改変の遺伝子操作により、実際の生産に移す。所

望の産物の生産をその微生物の最適増殖と連動させて、発酵中のこの産物の収量を最適化する。さらにもう1つの実施形態では、LCAの増殖連動生産を示す株をさらに適応進化させて産物の生合成をさらに増加させる。適応進化後の増殖連動産物生産レベルもこのシステムのコンピュータ計算コンポーネントによって予測することができ、この特定の実施形態では、産物レベル上昇は進化後にのみ実現する。

【0087】

一部の実施形態において、本発明は、1つ以上の遺伝子破壊を含む、天然に存在しない微生物を提供する。前記破壊は、酵素をコードする遺伝子において生じ、この酵素は、前記遺伝子破壊がその酵素の活性を低下させると前記生物の増殖にLCA生産を連動させるので、前記遺伝子破壊は、前記天然に存在しない微生物にLCAの安定した増殖連動生産をもたらす。

10

【0088】

特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の遺伝子破壊を含む、天然に存在しない真核生物を提供する。前記1つ以上の遺伝子破壊は、例えば、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼまたはミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼを含む酵素をコードする遺伝子において発生する。これらの遺伝子破壊は、前記生物のサイトゾルまたはミトコンドリアでの長鎖アルコールの生産をもたらす（下記参照）。

【0089】

20

さらに、本発明は、LCAの安定した増殖連動生産を有するそのような天然に存在しない微生物を生産する方法を提供する。LCA生産のために、例えば、この方法は、(a)細胞増殖中にLCA生産を必要とする代謝修飾1セットをインシリコで特定すること、および(b)LCA生産を必要とするその代謝修飾セットを含有するように微生物を遺伝子修飾することを含む。

【0090】

バイオプロセッシングについての1つの考慮事項は、回分発酵スキームを用いるのか、または連続発酵スキームを用いるのか、である。生産される産物の量に影響を及ぼすであろうこれら2つのスキームの間の1つの違いは、指数増殖期に加えて回分スキームについての準備、誘導および定常期の存在である。対照的に、連続プロセスは、一定した指数増殖状態で保たれ、適切に稼働されれば一回で何か月にもわたって操業し続けることができる。増殖関連および混合増殖関連産物形成の場合、その準備、誘導および定常期が省かれるため、連続プロセスのほうがはるかに高い生産性（すなわち、希釈率×細胞質量）をもたらす。例えば、次の合理的仮定：

30

Monod動力学（すなわち、 $\mu = \mu_m \cdot S / (K_s + S)$ ）

$\mu_m = 1.0 \text{ 時}^{-1}$

最終細胞濃度 / 初期細胞濃度 = 20

$t_{\text{準備}} + t_{\text{誘導}} + t_{\text{定常}} = 5 \text{ 時間}$

制限栄養の供給濃度 $\gg K_s$

を考慮して、連続プロセスからの生産性増加は8倍と概算された；Shulerら、Prentice Hall, Inc.: Upper Saddle River, NJ., 245-247。

40

【0091】

生産性の長所にもかかわらず、多数の理由のために連続プロセスよりはるかに多くの回分プロセスが稼働されている。第一に、非増殖関連産物形成（例えば、ペニシリン）の場合、回分システムの生産性は、連続プロセスのものを有意に上回ることがある。後者は、非常に低い希釈率で稼働させなければならないからである。次に、生産株は、それらの生化学的またはタンパク質生産能力を向上させるために、一般に、それらの遺伝物質に修飾を受けている。これらの特殊化された株は、それらの親の補体ほど急速に増殖しない可能性が高いが、ケモスタット（連続モードで稼働する発酵槽）を利用するものなどの連続プ

50

ロセスは、最速増殖細胞についての大きな選択圧をかける。所望の過剰生産表現型をもたらす組み換えDNAを含有するまたは点突然変異を有する細胞は、もとの低生産性親株への復帰突然変異を受けやすい。単一の遺伝子欠失を有する株が、野生型増殖表現型を回復する傾向がある代償突然変異を発現する可能性もある。より速く増殖する細胞は、通常、制限栄養についてそれらのより生産性の相対物と競合してそれらに勝り、その結果、生産性を劇的に低下させる。一方、回分プロセスは、それぞれのサイクルの最後に細胞を再使用しない、従って、その野生型の表現型に復帰変異する生産株の確率を低下させることで、利用できる世代の数を制限する。最後に、連続プロセスのほうが、装置故障および外来生物汚染などの潜在的な工学的障害のため、長期可動が難しい。そのような不首尾の結果も、回分培養でより連続プロセスのほうがはるかに顕著である。

10

【0092】

特殊化学物質および/またはタンパク質の少量生の場合、連続プロセスの生産性増加が、株の安定性および信頼性に関連したリスクに勝つことはめったにない。しかし、大量、増殖関連産物、例えばLCAの生産の場合、連続プロセスの生産性の増加は、回分プロセスと比較したとき、有意な経済的利得をもたらす結果となり得る。連続バイオプロセス稼働に付随する工学的障害は常に存在するが、指数増殖期中、負の選択圧を減少または回避してターゲット産物の生産に好適であるように代謝経路を変更する、代謝経路を遺伝子工学で作り変える戦略によって、株の安定性の問題を克服することができる。

【0093】

産物の増殖連動生産に好適である代謝改変を特定および設計するための1つのコンピュータ計算方法が、OptKnockコンピュータ計算フレームワークである、Burgardら、Biotechnol Bioeng, 84, 647-57 (2003)。OptKnockは、ターゲット産物を過剰生産する遺伝的に安定した微生物をもたらす結果となる遺伝子破壊戦略を示唆する代謝モデリングおよびシミュレーションプログラムである。具体的には、このフレームワークは、微生物の完全代謝および/または生化学的ネットワークを調査して、所望の生化学物質を細胞増殖の副産物になるように強いる遺伝子操作を示唆する。戦略的に配置された遺伝子欠失または他の機能的遺伝子破壊によって細胞増殖と生化学的生産を連動させることにより、バイオリアクターでの長い期間の後、遺伝子工学で作り変えられた株にかけられる増殖選択圧が、その強制的増殖連動生化学的生産の結果として性能の向上をもたらす。

20

30

【0094】

増殖連動生化学的生産の概念は、インシリコモデルを用いて算出される典型的な代謝ネットワークの生化学的生産エンベロップに関連して視覚化することができる。これらの限界は、制限基質（単数または複数）の取り込み速度（単数または複数）をそれらの実験測定値（単数または複数）に固定すること、ならびにそれぞれの達成可能な増殖レベルでの生化学的生産の最大および最小速度を算出することによって得られる。例外は存在するが、概して、所望の生化学物質の生産は、バイオマス形成と細胞内資源について直接競合する。従って、生化学的生産速度向上は、最大増殖速度を必然的に生じさせる結果となるだろう。図2に描くように、OptKnockによって示唆された破壊を、許容解範囲を制限して野生型株から代謝挙動を強制的に変化させるように設計する。所与の株についての実解範囲は、基質取り込み速度（単数または複数）が増加または減少するにつれて拡大または縮小するであろうが、それぞれの実験ポイントは、その算出解範囲内にあるはずである。これらのようなプロットは、株がそれらの性能限界のどれ程近くにあるのか、言い換えると、改善に利用できる余地がどれ程あるかの視覚化を可能にする。OptKnockフレームワークは、生化学的過剰生産のための有望な遺伝子破壊戦略を既に特定できおり(Burgard, A. P., P. Pharkya, and C. D. Maranas, Biotechnol Bioeng, 84(6): 647-657 (2003); Pharkya, P., A. P. Burgard, and C. D. Maranas, Biotechnol Bioeng, 84(7): 887-899 (2003))、代謝および調節モデリングフレームワークの将来の改善を当然包含する系統的フレームワーク

40

50

を確立する。

【0095】

最後に、遺伝子欠失を構成するとき、OptKnockによって選択された遺伝子は、ゲノムから完全に除去されることとなるので、設計した株がそれらの野生型状態に復帰変異する可能性は無視してよい。

【0096】

簡単に言うと、OptKnockは、細胞の代謝をモデリングするためのコンピュータ計算方法およびシステムを指すために本明細書において用いる用語である。OptKnockプログラムは、フラックス均衡解析(FBA)モデルに特定の制約を組み込むモデルおよび方法のフレームワークに関係する。これらの制約としては、例えば、定性的動態情報、定性的調節情報、および/またはDNAマイクロアレイ実験データが挙げられる。OptKnockは、例えば、フラックス均衡モデルによって得られるフラックス範囲を狭め、その後、遺伝子付加または破壊が存在する状態で代謝ネットワークの性能限界を精査することにより、様々な代謝の問題に対する解も推定する。OptKnockコンピュータ計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の有効な照会を可能するモデル式の作成を可能にし、結果として得られる混合整数線形計画問題の解法を提供する。本明細書においてOptKnockと呼ぶ代謝モデリングおよびシミュレート方法は、例えば、2002年1月10日出願の米国特許出願第10/043,440号に、および2002年1月10日出願の国際特許番号PCT/US02/00660に記載されている。

【0097】

物質の増殖連動生産に好適である代謝改変を特定および設計するためのもう1つのコンピュータ計算方法は、SimPheny(登録商標)と呼ばれる代謝モデリングおよびシミュレーションシステムである。このコンピュータ計算方法は、例えば、2002年6月14日出願の米国特許出願第10/173,547号に、および2003年6月13日出願の国際特許出願PCT/US03/18838に記載されている。

【0098】

SimPheny(登録商標)は、インシリコでネットワークモデルを生成するために使用することができる、および生体系の化学反応による質量、エネルギーまたは電荷のフラックスをシミュレートするために使用して、その系における化学反応の任意のおよびすべての可能な機能性を含む解空間を定義し、それによってその生態系についての許容活性の範囲を決定することができる、コンピュータ計算システムである。このアプローチは、制約に基づくモデリングと呼ばれる。解空間が、制約、例えば、含まれる反応の公知化学量論、ならびに反応による最大フラックスに関連した反応熱力学および容量の制約によって定義されるからである。これらの制約によって定義される空間を質問して、その生体系のまたはその生化学成分の表現型の能力および挙動を決定することができる。例えば、Schillingら、J. Theor. Biol. 203:229-248(2000); Schillingら、Biotech. Bioeng. 71:286-306(2000)およびSchillingら、Biotech. Prog. 15:288-295(1999)に記載されているものなどの解析方法、例えば、凸解析、線形計画、および極限経路の算出を用いて、そのような表現型の能力を決定することができる。

【0099】

上で説明したように、本発明に適用することができるコンピュータ計算プログラムにおいて用いられる、制約に基づく1つの方法は、フラックス均衡解析である。フラックス均衡解析は、定常状態条件で均衡するフラックスに基づくものであり、例えば、VarmaおよびPalsson, Biotech. Bioeng. 12:994-998(1994)に記載されているとおり行うことができる。フラックス均衡アプローチは、例えば、FellおよびSmall, J. Biochem. 138:781-786(1986)に記載されているように脂肪細胞代謝の、MajewskiおよびDomach, Biotech. Bioeng. 35:732-738(1990)に記載されているようにATP最大化条件下でのE. coliからの酢酸塩分泌の、またはVanrollegh

mら、*Biotech. Prog.* 12: 434 - 448 (1996)に記載されているように酵母によるエタノール分泌の、全身性をシミュレートするまたは予測するために、反応ネットワークに適用されている。加えて、このアプローチは、様々な単一炭素源での*S. cerevisiae*の増殖、ならびにEdwardsおよびPallson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5528 - 5533 (2000)、EdwardsおよびPallson, *J. Bio. Chem.* 274: 17410 - 17416 (1999)およびEdwardsら、*Nature Biotech.* 19: 125 - 130 (2001)に記載されているように*H. influenzae*の代謝を予想またはシミュレートするために用いることができる。

【0100】

10

解空間が定義されれば、それを解析して、様々な条件下で可能な解を決定することができる。生体系は順応性があり、多くの異なる方法で同じ結果に達することができるので、このコンピュータ計算アプローチは、生物学的現実との矛盾がない。生体系は、生きているすべての系が直面する基本的制約による拘束を受けた進化メカニズムによって設計される。従って、制約に基づくモデリング戦略は、これらの一般的な現実を包含する。さらに、制約をきつくすることによりネットワークモデルにさらなる制限を連続的に課することができることによって、解空間のサイズが減少され、その結果、生理的性能または表現型を予測することができる精度が向上する。

【0101】

20

本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、当業者は、代謝モデリングおよびシミュレーションのために様々なコンピュータ計算フレームワークを利用して、生化学製品の増殖連動生産を設計するおよび実行することができるであろう。そのような代謝モデリングおよびシミュレーション方法としては、例えば、*SimPheny*（登録商標）および*OptKnock*として上で例示したコンピュータ計算システムが挙げられる。本発明の例証の簡略化のために、モデリングおよびシミュレーションのための*OptKnock*コンピュータ計算フレームワークに関して方法および株を説明することにする。当業者は、*OptKnock*を用いる代謝改変の特定、設計および実行を、当該技術分野において周知の任意のそのような他の代謝モデリングおよびシミュレーションコンピュータ計算フレームワークおよび方法に適用する方法を知っているだろう。

【0102】

30

生化学製品の生産に増殖を連動させる細胞または生物の能力は、インシリコモデルを用いて算出される典型的な代謝ネットワークの生化学的生産の限界に関連して例証することができる。これらの限界は、限界基質（単数または複数）の取り込み速度（単数または複数）をそれらの実験測定値（単数または複数）に固定することならびにそれぞれの達成可能な増殖レベルでの生化学的生産の最大および最小速度を算出することによって得られる。図2に示すように、所望の生化学製品の生産は、一般に、バイオマス形成と細胞内資源について直接競合する。これらの状況のもとで、生化学的生産速度向上は、最大下増殖速度を必然的に生じさせる結果となるだろう。図2に描くように、*OptKnock*などの上記代謝モデリングおよびシミュレーションプログラムによって示唆された破壊を、許容解範囲を制限して野生型株から代謝挙動を強制的に変化させるように設計する。所与の株 40 についての実解範囲は、基質取り込み速度（単数または複数）が増加または減少するにつれて拡大または縮小するであろうが、それぞれの実験ポイントは、その算出解範囲内にあるだろう。これらのものなどのプロットは、設計された株がそれらの性能限界にどれ程近くにあるか（これは、改善に利用できる余地がどれ程あるかも示す）ということの正確な予測を可能にする。

【0103】

図2に示すような増殖連動生化学的生産をもたらす遺伝子破壊の位置を正確に示すために、*OptKnock*数学的フレームワークを本明細書において例示する。この手順は、物理化学的制約の規制を逐次的に課することによって細胞系を表示することができる、可能な表現型の範囲を狭くする制約に基づく代謝モデルに基づく、*Price*ら、*Nat R* 50

ev Microbiol, 2: 886 - 97 (2004)。上で説明したように、制約に基づくモデルおよびシミュレーションは、当該技術分野において周知であり、および一般に、特定の細胞目的物の最適化を発動して、ネットワーク化学量論に従って、可能性の高いフラックス分布を示唆する。

【0104】

簡単に言うと、1セット $N = \{1, \dots, N\}$ の代謝産物と1セット $M = \{1, \dots, M\}$ の代謝反応とを含む定常状態代謝ネットワークについての集合体反応フラックスとして定量される細胞目的物の最大化は、数学的に次のように表される：

【0105】

【数1】

以下
を最大化する $v_{cellular\ objective}$

$$\text{以下を条件とする } \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N$$

$$v_{substrate} = v_{substrate_uptake} \text{ mmol/gDW} \cdot \text{hr} \quad \forall i \in \{\text{制限基質(単数または複数)}\}$$

$$v_{atp} \geq v_{atp_main} \text{ mmol/gDW} \cdot \text{hr}$$

$$v_j \geq 0, \quad \forall j \in \{\text{不可逆反応}\}$$

この場合、 S_{ij} は、反応 j における代謝産物 i の化学量論係数であり、 v_j は、反応 j のフラックスであり、 $v_{substrate_uptake}$ は、制限基質（単数または複数）の仮のまたは測定された取り込み速度（単数または複数）を表し、および v_{atp_main} は、非増殖関連ATP維持要件である。速度は、内部フラックスと外部フラックスの両方を含む。この研究において、細胞目的物は、バイオマス形成に必要とされる比率での生合成前駆体のドレーンであると仮定されることが多い、*eidhardt, F. C. 2nd ed. 1996, Washington, D. C. : ASM Press. 2 v. (xx, 2822, lxxvi)*。これらのフラックスは、一般に、1 g DW・時（乾燥重量のグラム×時間）あたりで報告されるので、バイオマス形成は、生成されるバイオマスの g / g DW・時または 1 / 時として表される。

【0106】

遺伝子欠失の、およびそれによる反応削除のモデリングは、先ず、制約に基づくアプローチフレームワークへの2値変数の組み込みを用いる、Burgardら、*Biotechnol Bioeng*, 74: 364 - 375 (2001)、Burgardら、*Biotechnol Prog*, 17: 791 - 797 (2001)。これらの2値変数、

【0107】

【数2】

$$y_j = \begin{cases} \text{反応フラックス } v_j \text{ が活性である場合には、} 1 \\ \text{反応フラックス } v_j \text{ が活性でない場合には、} 0 \end{cases}, \quad \forall j \in M$$

は、反応 j が活性である場合には1の値およびそれが不活性である場合には0の値を取る。次の制約、

【0108】

【数3】

$$v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

は、変数 y_j が0に等しい場合にのみ反応フラックス v_j が0に設定されることを保証する。あるいは、 y_j が1に等しいとき、 v_j は、自由であって、下限 v_j^{\min} と上限 v_j^{\max}

j^{max} の間の任意の値を取る。ここで、 j^{min} および j^{max} は、上で説明したネットワーク制約に従ってすべての反応フラックスを、それぞれ、最小化および最大化することによって特定される、Mahadevanら、Metab Eng, 5:264-76(2003)。

【0109】

最適な遺伝子ノックアウトは、結果として得られるネットワークについての最適な増殖の解が対象となる化学物質を過剰生産するように活性反応のセット($y_j = 1$)を選択する二層最適化問題を解くことによって特定される。化学量論的には、この二層最適化問題は、図2で示される。数学的には、この二層最適化問題は、次の二層混合整数最適化問題として表される：

【0110】

【数4】

以下を最大化する $v_{chemical}$
 y_j

(OptKnock)

$$\left(\begin{array}{ll} \text{以下を} & \text{以下を} \\ \text{条件とする} & \text{最大化する} \\ v_j & v_{biomass} \\ \text{以下を条件とする} & \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\ & v_{substrate} = v_{substrate_uptake} \quad \forall i \in \{\text{制限基質(単数または複数)}\} \\ & v_{atp} \geq v_{atp_main} \\ v_{biomass} \geq v_{biomass}^{target} \end{array} \right)$$

$$v_j^{min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

$$\sum_{j \in M} (1 - y_j) = K$$

$$y_j \in \{0,1\}, \quad \forall j \in M$$

この場合、 $v_{chemical}$ は、所望のターゲット産物、例えばLCAまたは他の生化学製品の生産であり、およびKは、許容可能なノックアウトの数である。Kを0に等しいと設定することにより、完全ネットワークの最大バイオマスの解が返される一方で、Kを1に等しいと設定することにより、結果として得られるネットワークがその最大バイオマス収量を仮定して最大の過剰生産を伴うような、単一遺伝子ノックアウト($y_j = 0$)が特定されることに留意しなければならない。この最後の制約は、結果として得られるネットワークが最低バイオマス収量を満たすことを保証する。Burgardら、Biotechnol Bioeng, 84:647-57(2003)は、モデルの式および解の手順のより詳細な説明を提供している。IBM RS6000-270ワークステーションで環境をモデリングする、GAMS、Brookeら、GAMS Development Corporation(1998)経由で入手できるCplex 8.0、GAMS:The solver Manuals, 2003:GAMS Development Corporationを使用して、何百もの2値変数を含む問題をおおよそ数分から数時間で解くことができる。OptKnockフレームワークは、生化学的過剰生産のための有望な遺伝子破壊戦略を既に特定できており、Burgardら、Biotechnol Bioeng, 84:647-57(2003)、Pharkyaら、Biotechnol Bioeng, 84:887-899(2003)、代謝および調節モデリングフレームワークの将来の改善を当然包含する系統的フレームワークを確

10

20

30

40

50

立する。

【0111】

上で説明した二層OptKnock問題のいずれの解も、破壊すべき1セットの代謝反応をもたらすであろう。そのセットの中のそれぞれの反応または代謝修飾の除去によって、その生物の増殖期中にLCAを産物として得ることができる。これらの反応は公知であるので、二層OptKnock問題に対する解は、その反応セットの中のそれぞれの反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする関連遺伝子（単数または複数）ももたらすであろう。1セットの反応の特定およびそれぞれの反応に関与する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般に、酵素とコード遺伝子との関係を有する反応データベースとそれらの反応の相関によって遂行される自動プロセスである。

10

【0112】

特定されると、増殖連動LCA生産を達成するために破壊されることとなる反応のセットが、ターゲット細胞または生物において、そのセットの中のそれぞれの代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能破壊によって実行される。前に説明したように、この反応セットの機能破壊を達成するために特に有用な1つの手段は、それぞれのコード遺伝子の欠失によるものである。しかし、場合により、例えば、突然変異、調節領域、例えばプロモーター、もしくは調節因子のための結合部位の欠失を含む他の遺伝子異常によって、または多数の位置のいずれかでのコード配列のトランケーションによって、反応を破壊することが有益であることがある。遺伝子セットの完全に満たない欠失を生じさせるこれらの後者の異常は、例えば、産物連動の迅速な評価が望まれるとき、または遺伝子復帰変異が発生する可能性が低いとき、有用であり得る。

20

【0113】

破壊すべき反応のさらなるセット、またはLCA、もしくは他の生化学物質の増殖連動生産を生じさせることができる代謝修飾のさらなるセットをもたらす、上で説明した二層OptKnock問題に対する追加の生成解を特定するために、整数カットと呼ばれる最適化方法を実行することができる。この方法は、整数カットと呼ばれる追加の制約をそれぞれの反復時に組み込みながら、上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって行われる。整数カット制約は、産物の生合成を増殖に連動させる任意の前の反復において特定された反応のまさに同じセットをその解の手順が選択するのを有効に防止する。例えば、前に特定された増殖連動代謝修飾が、破壊に反応1、2および3を指定する場合には、次の制約が、同じ反応が後続の解において同時に考慮されることを防止する： $y_1 + y_2 + y_3 = 1$ 。この整数カット法は、当該技術分野において周知であり、例えば、参考文献、Burgardら、Biotechnol Prog, 17: 791-797 (2001)に記載されているのを見つけることができる。代謝モデリングおよびシミュレーションのためのOptKnockコンピュータ計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載するすべての方法と同様に、反復コンピュータ計算解析における重複を減少させる整数カット法も、例えばSimpHenyをはじめとする当該技術分野において周知の他のコンピュータ計算フレームワークと共に利用することができる。

30

【0114】

上の形態の制約は、前に特定されたセットを含む、より大きな反応セットの特定を除外する。例えば、さらなる反復における上記整数カット最適化法の利用は、破壊に反応1、2および3を指定する四重反応セットの特定を、これらの反応は前に特定されているので、除外する。産物の増殖連動生産をもたらすすべての可能な反応セットを確実に特定するために、整数カット法の改良法を利用した。

40

【0115】

簡単に言うと、この改良整数カット手順は、野生型ネットワークについての最適な増殖時の所望の生化学物質の最大生産を算出する反復「ゼロ」で開始する。このコンピュータ計算は、0に等しいKを有するOptKnockの解に対応する。次に、単一破壊を考え、2つのパラメータセット、objstore_{iter}およびystore_{iter,j}を導入して、それぞれの反復、iter、時に目的機能（chemical）および反

50

応オン - オフ情報 (y_j) をそれぞれ蓄積する。その後、OptKnock 情報に次の制約をそれぞれの反復時に逐次的に加える：

【 0 1 1 6 】

【 数 5 】

$$v_{chemical} \geq objstore_{iter} + \varepsilon - M \cdot \sum_{j \in ystore_{iter}, j=0} y_j$$

上の方程式において、 ε および M は、それぞれ、小さな数および大きな数である。一般に、 ε は、約 0.01 に設定することができ、 M は、約 1000 に設定することができる。しかし、これらの数より小さいおよび / または大きい数も用いることができる。 M は、その制約が、前に特定された破壊戦略についてしか拘束されないことを保証する一方で、 ε は、前に特定された戦略への破壊の追加が、最適な増殖時の生化学的生産の少なくとも ε の増加をもたらさなければならないことを保証する。このアプローチは、単一破壊が野生型株に対する改良に失敗すると必ず二重破壊に進む。いずれの二重破壊戦略も野生型株に改良を加えないときなどには三重破壊を考慮する。最終結果は、互いの破壊が少なくとも 1 つは異なる別個の破壊戦略の、最適増殖時の所望の生化学的生産として表される、ランク付けされたリストである。この最適化手順、ならびに破壊されると生化学物質の増殖連動生産をもたらす多種多様な反応セットの特定を、さらに下で、より詳細に例示する。本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、本明細書に例示する方法および代謝経路が遺伝子工学で作り変えられる設計が、任意の生化学物質への細胞または微生物増殖の連動に適用できることは、当業者には理解されるであろう。

【 0 1 1 7 】

上に例示した方法を用いて、本発明の方法は、特定された遺伝子改変を有するように遺伝子工学で作り変えられた細胞または微生物の増殖にターゲット生化学物質の生産を連動させる細胞および微生物の構築を可能にする。これに関して、微生物増殖に LCA の生産を強制的に連動させる代謝改変を特定した。特定された代謝改変を有する構築された微生物株は、指数増殖期中に高レベルの LCA を生産する。これらの株は、前に説明した負の選択圧を受けない連続発酵プロセスでの LCA の商業生産に有益に使用することができる。

【 0 1 1 8 】

従って、本発明の方法は、OptKnock から選択されたインシリコ法により特定される代謝修飾 1 セットを提供する。この代謝修飾セットは、例えば遺伝子欠失による破壊を含む、1 つ以上の代謝反応の機能破壊を含む場合がある。LCA 生産についての代謝修飾は、表 1 に列挙する代謝修飾のセットから選択することができる。

【 0 1 1 9 】

LCA の安定した増殖連動生産を有する天然に存在しない微生物を生産する方法も提供する。この方法は、(a) 指数増殖中に LCA 生産を必要とする代謝修飾 1 セットをインシリコで特定すること；(b) 産物生産を必要とする代謝修飾のセットを有するように微生物を遺伝子修飾し、その遺伝子修飾された生物を培養することを含む。培養は、産物生産を必要とする条件下でその遺伝子修飾生物を適応進化させることを含み得る。本発明の方法は、細菌、酵母および真菌、ならびに様々な他の細胞および微生物に適用することができる。例示的細菌としては、*E. coli*、*Anaerobiospirillum succiniciproducens*、*Actinobacillus succinogenes*、*Mannheimia succiniciproducens*、*Rhizobium etli*、*Bacillus subtilis*、*Corynebacterium glutamicum*、*Gluconobacter oxydans*、*Zymomonas mobilis*、*Lactococcus lactis*、*Lactobacillus plantarum*、*Streptomyces coelicolor*、*Clostridium acetobutylicum*、*Pseudomonas fluorescens*、および *Pseudomonas putida* から選択

される種が挙げられる。例示的真核生物としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus niger*、*Rhizopus arrhizus*、*Rhizopus oryzae*、および *Pichia pastoris* から選択される種が挙げられる。

【0120】

本発明の方法によって生産される微生物をさらに提供する。加えて、本発明は、LCAの増殖連動生産に関連した酵素をコードする1つ以上の遺伝子破壊を含む、およびこれらの産物の安定した増殖連動生産を示す、天然に存在しない微生物を提供する。本発明の天然に存在しない微生物は、酵素をコードする遺伝子において発生する1つ以上の遺伝子破壊を含み、この酵素は、前記遺伝子破壊がその酵素の活性を低下させると前記微生物の増殖にLCA生産を強制的に連動させるものであり、それによって、前記1つ以上の遺伝子破壊は、前記天然に存在しない微生物にLCAの安定した増殖連動生産をもたらす。

【0121】

前記天然に存在しない微生物は、表1に列挙する代謝修飾に含まれる1つ以上の遺伝子破壊を有し得る。前記1つ以上の遺伝子破壊は、欠失である場合がある。本発明の天然に存在しない微生物は、表1に列挙する代謝修飾を有する微生物の群から選択することができる。本発明の天然に存在しない微生物としては、細菌、酵母、真菌、または発酵プロセスに利用できる様々な他の微生物の任意のものが挙げられる。例示的細菌としては、*E. coli*、*A. succiniciproducens*、*A. succinogenes*、*M. succiniciproducens*、*R. etli*、*Bacillus subtilis*、*C. glutamicum*、*G. oxydans*、*Z. mobilis*、*L. lactis*、*L. plantarum*、*S. coelicolor*、*C. acetobutylicum*、*P. fluorescens*、および *P. putida* から選択される種が挙げられる。例示的真核生物としては、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*K. lactis*、*K. marxianus*、*A. terreus*、*A. niger*、*R. arrhizus*、*R. oryzae*、および *P. pastoris* から選択される種が挙げられる。

【0122】

増殖連動LCA生産を有する微生物を、*Escherichia coli* 遺伝的バックグラウンドに関して本明細書では例示する。しかし、395の微生物ゲノムならびに様々な酵母、真菌、植物および哺乳動物ゲノムを含めて、現在550を超える種について入手できる完全ゲノム配列（これらの半分より多くがNCBIなどの公的データベースで入手できる）を用いる、例えば、オーソログ、パラログおよび非オーソログ遺伝子置換をはじめとする1つ以上の遺伝子について代替種ホモログの特定、ならびに生物間の遺伝子改変の相互交換は、当該技術分野において常例的であり、周知である。従って、*Escherichia coli* などの特定の生物に関連して本明細書に記載するLCAの増殖連動生産を可能にする代謝改変を、他の微生物に容易に適用できる。本明細書に提供する技術およびガイダンスを考慮すれば、ある生物において例示する代謝改変を他の生物に同等に適用できることは、当業者にはわかるであろう。

【0123】

前に説明したように、相同体は、オーソログおよび/または非オーソログ遺伝子置換を含む場合がある。場合により、例えば、代替代謝経路が対象となる種に存在するとき、機能破壊を、例えば当該反応に取って代わる同一でないが類似した代謝反応を触媒するパラログの欠失によって、遂行することができる。異なる生物間での代謝ネットワーク間の一定の相違のため、異なる生物間で破壊される実際の遺伝子が異なり得ることは、当業者には理解されるであろう。しかし、本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、本発明の方法を、生物間のコグネイト代謝改変を特定するためにおよび増殖へのLCA生合成の連動を増進するであろう対象となる種の生物を構築するためにすべての生物に適

用できることも当業者には理解されるであろう。

【0124】

本明細書では、本発明を、一般には代謝反応、その反応物もしくは生成物に関して、または具体的には当該代謝反応、反応物もしくは生成物に関連した1つ以上の遺伝子に関して説明することとする。本明細書において別様にはっきりと述べられていない限り、反応への言及が、その反応の反応物および生成物への言及も構成することは、当業者には理解されるであろう。類似して、本明細書において別様にはっきりと述べられていない限り、反応物または生成物への言及は、その反応への言及でもあり、これらの代謝成分のいずれかへの言及は、当該反応、反応物または生成物を触媒する酵素をコードする遺伝子（単数または複数）への言及でもある。同様に、代謝生化学、酵素学およびゲノミクスの周知分野を考慮すれば、遺伝子への本明細書における言及は、対応するコードされた酵素およびそれを触媒する反応ならびにその反応の反応物および生成物への言及も構成する。前に説明したおよび下でさらに説明するように、LCAの増殖連動生産に關与する例示的反應、反応名、反応物、生成物、補因子、および反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を表2および3に示す。

10

【0125】

本発明は、LCAの増殖連動生産を有する天然に存在しない微生物を提供する。細胞の代謝経路を遺伝子改変することにより、その微生物の指数増殖期に製品生産を強制的に連動させる。遺伝子改変が、所望の産物をその増殖期中の産物にする。高レベルのLCA合成を生じさせる結果となる代謝改変または形質転換のセットをそれぞれ表1に例示する。セットの中のそれぞれの改変は、機能破壊されることとなる必要代謝反応に対応する。それぞれのセットの中のすべての反応の機能破壊は、遺伝子工学で作り変えられた株による増殖期中のLCAの生産を生じさせる結果となる。*Escherichia coli*における当該改変に対応する反応およびそれらをコードする可能性がある遺伝子（単数または複数）を表2に示す。様々な代謝産物、それらの略語および位置を表3に示す。

20

【0126】

例えば、表1に例示するそれぞれの株について、増殖連動LCA生産のために起こすことができる遺伝子改変をそれぞれの列に示す。これらの改変は、1つから6つ以上の反応についての機能破壊を含む。詳細には、天然に存在しない代謝遺伝子型を有する995の株を表1に例示する。これらの天然に存在しない改変のそれぞれが、適切な培養条件下で、その微生物の指数増殖期中に野生型株と比較して向上したレベルのLCA生産を生じさせる結果となる。適切な条件としては、例えば、下の実施例Iにおいてさらに例示するもの、例えば特定の炭素源もしくは反応物の利用率および/または適応進化、が挙げられる。

30

【0127】

本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、酵素反応を破壊するために、その反応に關与する1つ以上の酵素の触媒活性を破壊することが必要であることは、当業者には理解されるであろう。例えば、コード遺伝子の破壊またはコード遺伝子配列の1つ以上への遺伝子改変の組み込みをはじめとする様々な手段によって破壊を行うことができる。破壊のターゲットにされるコード遺伝子は、触媒活性に關与する酵素をコードする遺伝子の1つ、一部またはすべてであり得る。例えば、単一の酵素がターゲットの触媒活性に關与する場合、コードされた遺伝子産物の触媒活性を低下させるまたは破壊する遺伝子改変によって破壊を行うことができる。類似して、単一の酵素が、ヘテロマーのものを含めて多量体のものである場合、コードされた遺伝子産物の1つまたはすべてのサブユニットの機能を低下させるまたは破壊する遺伝子改変によって破壊を行うことができる。活性の破壊は、活性複合体を形成するための1つ以上のサブユニットの結合活性の喪失によって、多量体複合体の触媒サブユニットの破壊によって、または両方によって遂行することができる。多量体タンパク質会合および活性の他の機能をターゲットにして、本発明の代謝反応を破壊することもできる。そのような他の機能は、当業者には周知である。さらに、単一ポリペプチドまたは多量体複合体の機能の一部またはすべてを本発明に従って破壊

40

50

して、本発明の反応または代謝修飾に関与する1つ以上の酵素の触媒活性を低下させるまたは無効にすることができる。類似して、ターゲットとする反応を低下させさえすればまたは破壊しさえすれば、本発明の反応または代謝修飾に関与する酵素の一部またはすべてを破壊することができる。

【0128】

本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、共通の遺伝子によっておよび/または類似したまたは実質的に同じ活性を示すその遺伝子の1つ以上のオーソログによってコードされた反応を低下させるまたは除去することにより、酵素反応を破壊することができることも、当業者には理解されるであろう。共通遺伝子とすべてのオーソログの両方の減少が、ターゲット反応の任意の触媒活性の完全無効につながることもある。しかし、共通遺伝子または1つ以上のオーソログのいずれかの破壊が、増殖の産物生合成への運動を促進するために十分なターゲット反応の触媒活性の低下につながることもある。様々な代謝修飾についての触媒活性をコードする共通遺伝子とそれらのオーソログの両方を本明細書において例示する。ターゲット代謝反応の酵素をコードする遺伝子の一部またはすべての破壊を、本発明の方法において実施することができること、および本発明の天然に存在しない微生物に組み込んで増殖連動産物生産を達成することができることは、当業者には理解されるであろう。

【0129】

*Escherichia coli*におけるLCA生産の増加のために特定された設計を本明細書において下で説明する。OptKnockアルゴリズムによって、*Escherichia coli*代謝の化学量論的モデルに基づく設計が特定された。仮定条件は、(i) 10 mmol / g dw / 時のグルコース取り込み速度；(ii) 嫌気性または微好気性条件；および(iii) 3 mmol / g dw / 時の最小非増殖関連維持要件を含む。本発明の教示に従ってその生産を増殖に連動させることができる例示的長鎖アルコールとして、ドデカノール、 C_{12} 分子を選択した。グルコースを増殖基質であると仮定したが、前記戦略をグルコース、スクロース、キシロース、アラビノースまたはグリセロールをはじめとする任意の基質に適用できることは理解される。増殖連動LCA生産設計の完全セットを表1に列挙する。酵素名、それらの略語、および対応する反応化学量論を表2に列挙する。最後に、反応式中の略語に対応する代謝産物名を表3に列挙する。*E. coli*代謝の代謝モデルを用いてこれらの設計を特定し、表2に列挙する遺伝子名は、*E. coli*に特有のものであるが、これらの代謝経路を遺伝子工学で作り変える戦略を選択する方法およびまた設計それら自体を任意のLCA生産性生物に適用することができる。従って、これらの設計は、長鎖アルコールの増殖連動生産を可能にするためにその活性を除去しなければならない、減弱しなければならない、または最初から微生物に不在でなければならない酵素的形質転換体の本質的なリストである。

【0130】

設計の最終選択に優先順位をつけるための1つの基準は、ドデカノールの増殖連動収量であった。これを調査するために、(前の段落で説明したように)異なるバイオマス形成速度でドデカノール収量を先ず最大にし、その後、最小にすることによりそれぞれの戦略について生産コーンを構成した。突然変異体ネットワークのすべての可能な表現型の右端境界が単一の点である場合、それは、そのネットワークにおいて可能な最大バイオマス形成速度でその産物の独特の最適収量があることを含意する。他の場合、実現可能な表現型の右端境界が垂線であり、これは、最大バイオマスの点で、そのネットワークが、その垂線の最も下の点での最低量を含む算出範囲内のドデカノールの任意の量を作ることができることを意味する。そのような設計は、低位の優先順位となる。ここで、最高優先順位のOptKnock設計の短いリストを、表1の設計の部分集合を表す表Iに提供する。

【0131】

【表 1 - 1】

設計	酵素活性	略語	他の注記
XI	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キネラーゼ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ NAD(P)ホスホリン酸デヒドロゲナーゼ	ADHER LDH_D PFLi MDH IDH2	設計 V + THD2
XII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ホスホリン酸ピルビン酸キネラーゼおよび/または 酢酸キナーゼ	LDH_D LDH_D PTAr および/または ACKr	設計 I + PTAr および/または ACKr
XIII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ホスホリン酸ピルビン酸キネラーゼおよび/または 酢酸キナーゼ アマル酸ヒドロクタルゼ	ADHER LDH_D PTAr および/または ACKr FRD2	設計 XII + FRD2
XIV	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ホスホリン酸ピルビン酸キネラーゼおよび/または 酢酸キナーゼ アマルゼ	ADHER LDH_D PTAr および/または ACKr FUM	設計 XII + FUM
XV	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ホスホリン酸ピルビン酸キネラーゼおよび/または 酢酸キナーゼ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ADHER LDH_D PTAr および/または ACKr MDH	設計 XII + MDH
XVI	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ アマル酸ヒドロクタルゼ	ADHER LDH_D LDH_D FRD2	設計 I + FRD
XVII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ アマルゼ	ADHER LDH_D FUM	設計 I + FUM
XVIII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ADHER LDH_D MDH	設計 I + MDH
XIX	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ アマル酸ヒドロクタルゼ ATPシンターゼ	ADHER LDH_D FRD2 ATPS4r	設計 XVI + ATPS4r
XX	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ アマルゼ ATPシンターゼ	ADHER LDH_D FUM ATPS4r	設計 XVII + ATPS4r
XXI	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ アマル酸ヒドロクタルゼ ATPシンターゼ	ADHER LDH_D MDH ATPS4r	設計 XVIII + ATPS4r

表 I		略語	他の注記
設計	酵素活性		
I	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D	
II	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ	ADHcr LDH D PFLi	設計 I + PFL
III	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマル酸レタクターゼ	ADHcr LDH D PFLi FRD2	設計 II + FRD2
IV	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマルーゼ	ADHcr LDH D PFLi FUM	設計 II + FUM
V	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi MDH	設計 II + MDH
VI	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマル酸レタクターゼ グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi FRD2 GLUDy	設計 III + GLUDy
VII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマルーゼ グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi FUM GLUDy	設計 IV + GLUDy
VIII	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi MDH GLUDy	設計 V + GLUDy
IX	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマル酸レタクターゼ NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi FRD2 THD2	設計 III + THD2
X	アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ D-乳酸デヒドロゲナーゼ ピルビン酸キナーゼ アマルーゼ NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ	ADHcr LDH D PFLi FUM THD2	設計 IV + THD2

本書類におけるすべての増殖運動設計は、エタノールおよび乳酸塩の形成をそれぞれ減少させるために、アセチルアルデヒド - C o A デヒドロゲナーゼ (A D H E r) および乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H _ D) 活性の同時破壊を要する設計 I に基づく。0 . 2 0 L / 時の最大増殖速度を達成すると、0 . 1 4 m o l / m o l グルコースのドデカノール収量に達すると予測される (設計 I 、 図 3) 。設計 I I は、A D H E r 、 L D H _ D およびピルビン酸ギ酸リアーゼ (P H L i) の除去、減弱または不在を指定しており、図 4 に示

すように最大増殖時に 0.28 mol/mol グルコースのドデカノール収量をもたらすと予測される。増殖への LCA 生産のより緊密な連動は、図 4 の設計 I I I ~ V の解の範囲によって示されるように、フマル酸レダクターゼ (FRD2)、フマラーゼ (FUM)、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) 活性のさらなる破壊によって達成される。増殖への生産のさらにいっそう緊密な連動は、図 4 の設計 V I ~ X I の解の範囲で示されるように、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLUDy) または NADP トランスヒドロゲナーゼ (THD2) のさらなる破壊によって達成される。設計 V I ~ X I は、最低量の細胞増殖を可能にするために LCA の有意でない収量、具体的には 0.05 mol ドデカノール / mol グルコースを事実上必要とする。

【0132】

設計 X I I は、酢酸塩、エタノールおよび乳酸塩の生産をそれぞれ防止するまたは減少させるために、ADHER および LDH_D に加えてホスホトランスアセチラーゼ (PTAr) および / または酢酸キナーゼ (ACKr) の破壊を要する。図 5 に示すように、 10 mmol/g DW/時 のグルコース取り込み速度を仮定すると 0.16 L/時 の最大増殖速度に達するために 0.28 mol/mol のドデカノール収量を必要とする。設計 X I I I ~ X V の解の範囲によって示されるように、FRD2、FUM、または MDH のさらなる破壊によって、増殖への LCA 生産のより緊密な連動が達成される。図 6 に示すように、設計 X V I ~ X V I I I は、ADHER および LDH_D に加えて FRD2、FUM または MDH 活性の破壊が、設計 I と比較して、細胞増殖へのドデカノールのより緊密な連動をもたらす結果となることを明記する。設計 X I X ~ X X I における ATP シンターゼ活性のさらなる破壊は、図 6 に示すように、 0.13 L/時 の最大増殖速度で 0.30 mol/mol のドデカノール収量を生じさせる結果となると予測される。この活性の破壊は、微生物をエネルギー生成について強制的に MI - LCA 経路に依存させる。従って、設計 X I X ~ X X I では生物が列挙する活性を欠くと仮定するといずれの増殖を達成するにも 0.05 mol/mol の最低ドデカノール収量が必要とされる。

【0133】

以下の実施例において例証するように、設計 I ~ X X I によって列挙されるものに加えて一定の活性の破壊がさらにいっそう高い生産収量をもたらすことができることは理解される。設計 V_A は、アセトアルデヒド - CoA デヒドロゲナーゼ (ADHER)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH_D)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)、ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi)、L - アスパルターゼ (ASPT)、ピルビン酸キナーゼ (PYK)、グルコース 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy)、およびジヒドロキシアセトンホスホトランスフェラーゼ (DHAPT) の破壊を含む。MI - LCA 経路を追加すると、これらの活性の破壊を有する遺伝子工学で作り変えられた株は、 0.02 L/時 の最大増殖速度で 0.327 mol/mol グルコースの増殖連動ドデカノール収量を有すると予測される (図 7、点 A)。これは、 0.333 mol ドデカノール / mol グルコースの最大理論収量の 98% に相当する。そのような株の最大増殖速度は、野生型株のおおよそ 10% であると予測されるが、増殖には 0.09 mol/mol の最低ドデカノール収量が必要とされる (図 7、点 B)。これらの機能性の活性低下を有する組み換え株を一段階で構築することもでき、または後続の段階で例えば各段階で 2 ~ 3 の活性を破壊することによって構築することもできる。例えば、ADHER および LDH_D 活性をコードする遺伝子をまず除去することによって増殖連動 LCA 生産のために E.coli を遺伝子工学で作り変えることができ、これは、結果として設計 I になる。次に、MDH および PFLi 活性の原因となる遺伝子をさらに欠失させることによって設計 V を構成する。次に、ASPT、PYK、G6PDHy および DHAPT 活性をコードする遺伝子を欠失させることによって設計 V_A を構成する。最後に、破壊のために幾つかの活性 (すなわち、6 - ホスホグルコノールアセトナーゼ (PGL)、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (PGDHY)、または 2 - デヒドロ - 3 - デオキシ - ホスホグルコン酸アルドラーゼ (EDA)) を G6PDHy の代わりに用い、設計 V_A と同じ特徴を生じさせることができる。

10

20

30

40

50

【0134】

設計XII__Aは、アセトアルデヒド - CoAデヒドロゲナーゼ (ADHER)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH__D)、酢酸キナーゼ (ACKr) および/またはホスホトランスアセチラーゼ (PTAr)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP) (GLUDy)、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGDH)、およびグルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ (PGI) の破壊を含む。設計XII__Bは、アセトアルデヒド - CoAデヒドロゲナーゼ (ADHER)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH__D)、酢酸キナーゼ (ACKr) および/またはホスホトランスアセチラーゼ (PTAr)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP) (GLUDy)、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGDH)、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ (PGI)、およびPEP: PyrPTSによるD - グルコース輸送 (GLCpts) の破壊を含む。MI - LCA経路を加えると、設計XII__Bによって指定される活性を欠く遺伝子工学で作り変えられた株は、0.04 L/時の最大増殖速度で0.322 mol/mol グルコースの増殖連動ドデカノール収量を有すると予測される (図8、点A)。これは、0.333 molドデカノール/mol グルコースの最大理論収量の97%に相当する。そのような株の最大増殖速度は、野生型株のおおよそ20%であると予測されるが、増殖には0.05 mol/molの最低ドデカノール収量が必要とされる (図8、点B)。これらの機能性の活性低下を有する組み換え株を一段階で構築することもでき、または後続の段階で例えば各段階で追加の活性を除去することによって構築することもできる。例えば、ADHERおよびLDH__D活性をコードする遺伝子をまず除去することによって増殖連動LCA生産のためにE. coliを遺伝子工学で作り変えることができ、これは、結果として設計Iになる。次に、PTArおよびACKr活性をコードする遺伝子をさらに欠失させることによって設計XIIを構成する。次に、GLUDy、PGDHおよびPGI活性の原因となる遺伝子を欠失させることによって設計XII__Aを構成する。最後に、GLCpts活性に必須の遺伝子をさらに欠失させることによってXII__Bを構成する。

10

20

【0135】

従って、本発明は、天然に存在しない微生物であって、該生物の増殖にLCA生産を連動させる代謝修飾1セットを有する生物も提供し、前記代謝修飾のセットは、アセチルアルデヒド - CoAデヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼを含むタンパク質をコードする遺伝子のセットから選択される1つ以上の遺伝子の破壊を含む。

30

【0136】

本発明は、上で設計Iについて列挙した活性を欠く株であって、次の活性のうちの少なくとも1つをさらに欠く、設計II、XII、XVI、XVIIおよびXVIIIによって例示されるような株も提供する：ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTAr)、酢酸キナーゼ (ACKr)、フマル酸レダクターゼ (FRD2)、フマラーゼ (FUM)、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)。

【0137】

さらなる実施形態において、本発明は、上で設計IIについて列挙した活性を欠き、さらに次の活性のうちの少なくとも1つを欠く、設計III、IVおよびVによって例示されるような株を提供する：フマル酸レダクターゼ (FRD2)、フマラーゼ (FUM)、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)。

40

【0138】

尚、さらなる実施形態において、本発明は、上で設計III、IVまたはVについて列挙した活性を欠き、さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLUDy) 活性を欠く、設計VI、VIIおよびVIIIによって例示されるような株を提供する。

【0139】

本発明は、上で設計III、IVまたはVについて列挙した活性を欠き、さらに、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ (THD2) 活性を欠く、設計IX、XおよびXIによって例示されるような株も提供する。

【0140】

50

尚、さらなる実施形態において、本発明は、上で設計X I Iについて列挙した活性を欠き、さらに次の活性のうちの少なくとも1つを欠く、設計X I I I、X I VおよびX Vによって例示されるような株を提供する：フマル酸レダクターゼ (F R D 2)、フマラーゼ (F U M)、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (M D H)。

【 0 1 4 1 】

最後に、本発明は、上で設計X V I、X V I IおよびX V I I Iについて列挙した活性を欠き、さらにA T P シンターゼ (A T P S 4 r) 活性を欠く、設計X I X、X XおよびX X Iによって例示されるような株を提供する。

【 0 1 4 2 】

S . c e r e v i s i a eにおけるL C A生産を増加させるために特定された経路を本明細書において下で説明する。本明細書において下でさらに説明するO p t K n o c kアルゴリズムによって、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e代謝の化学量論的モデルに基づいて設計が特定された。仮定条件は、(i) 1 0 m m o l / g d w / 時のグルコース取り込み速度；(i i) 嫌気性または微好気性条件；および(i i i) 3 m m o l / g d w / 時の最小非増殖関連維持要件を含む。本発明の教示に従ってその生産を増殖に連動させることができる例示的長鎖アルコールとして、ドデカノール、C₁₂分子を選択した。グルコースを増殖基質であると仮定したが、前記方法をグルコース、スクロース、キシロース、アラビノースまたはグリセロールをはじめとする任意の基質に適用できることは理解される。S . c e r e v i s i a e代謝の代謝モデルを用いてこれらの設計を特定したが、遺伝子工学で作り変える代謝経路を選択する方法およびまた設計それら自体を任意のL C A生産性真核生物に適用することができる。従って、これらの設計は、長鎖アルコールの生産を可能にするためにその活性除去しなければならない、減弱しなければならない、またはその活性が最初から微生物に不在でなければならない酵素的形質転換体の本質的なリストである。

【 0 1 4 3 】

経路の最終選択に優先順位をつけるための1つの基準は、ドデカノールの収量である。これを調査するために、異なるバイオマス形成速度でドデカノール収量を先ず最大にし、その後、最小にすることによって経路のそれぞれのセットについて生産コーンを構成した。突然変異体ネットワークのすべての可能な表現型の右端境界が単一の点である場合、それは、そのネットワークにおいて可能な最大バイオマス形成速度でその産物の独特の最適収量があることを含意する。他の場合、実現可能な表現型の右端境界が垂線であり、これは、最大バイオマスの点で、そのネットワークが、その垂線の最も下の点での最低量を含む、算出範囲内のドデカノールの任意の量を作ることができることを意味する。そのような設計は、低位の優先順位となる。

【 0 1 4 4 】

本発明の生物は、本明細書において下でさらに詳述するような実質的に嫌気性の培養基または微好気性培養基において培養することができる。そのような生物は、一部の実施形態では完全な欠失を含むことがある1つ以上の遺伝子破壊、または完全遺伝子のフラグメントによってコードされた機能性部分の除去もしくは変更による破壊を有する。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態において、本発明は、サイトゾルにおいてL C Aを生産する天然に存在しない真核微生物を提供する。本明細書においてサイトゾルはミトコンドリアの外側の任意のコンパートメントを指すことに留意すること。そのような実施形態において、酵素をコードする真核生物における1つ以上の遺伝子破壊は、例えば、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼおよびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼを含む。これらの酵素をコードする例示的遺伝子としては、例えば、Y L R 0 4 4 C、Y L R 1 3 4 W、Y G R 0 8 7 C、P D C 3、Y N L 0 7 1 W、Y E R 1 7 8 W、Y B R 2 2 1 C、Y G R 1 9 3 C、Y F L 0 1 8 C、Y B R 1 4 5 W、Y G L 2 5 6 W、Y O L 0 8 6 C、Y M R 3 0 3、Y M R 0 8 3 W、Y P L 0 8 8 W、Y A L 0 6 1

W、YMR318C、YCR105W、およびYDL168Wが挙げられる。

【0146】

酵素をコードする他の遺伝子破壊は、例えば、同様に果たされ得るサイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部NADHデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部NADHデヒドロゲナーゼ(mitochondrial NADH dehydrogenase)を含む。後ろのほうのものの例示的遺伝子としては、例えば、YOL126C、YDL022W、YOL059W、YIL155C、YMR145C、YDL085W、およびYML120Cが挙げられる。

【0147】

これらの微生物は、例えばアセチル-CoAシンセターゼ(AMP-形成性)、ADP依存性酢酸-CoAリガーゼ、アシル化性アセトアルデヒド-CoAデヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸:NADPオキシドレダクターゼ、およびピルビン酸ギ酸リアーゼをはじめとする酵素をコードする外因性核酸またはそれらの対応する遺伝子調節領域もサイトゾルに含むことがある。サイトゾルトランスヒドロゲナーゼまたはその遺伝子調節領域をコードする外因性核酸も組み込むことができる。一部の実施形態において、これらの遺伝子産物は、サイトゾルにおいて天然に発現されることがあるが、他の実施形態では、それらを、例えば、同じ源からのもしくは他の生物からの遺伝子のコピーを追加することによって、または遺伝子調節領域を導入するまたは変更することによって、過発現させることができる。そのような遺伝子調節領域としては、例えば、遺伝子発現を増進させるための代替プロモーター、誘導プロモーター、変異プロモーターまたはエンハンサーが挙げられる。リプレッサーおよび/またはサイレンサーなどの負の調節要素の機能破壊も、遺伝子発現の増進に利用することができる。類似の修飾を翻訳調節領域に対して行ってポリペプチド合成を増進させることができ、それらの修飾としては、例えば、リボソーム結合部位の最適もしくはコンセンサス配列での置換、および/または二次構造の除去が挙げられる。

【0148】

これらの生物は、ドデカノール生産のためにアセチルCoA、ATPおよび還元等価物(NADH)の利用率を最大にする。アセチルCoAは、提案するMI-LCA経路によるLCAの生産のための主炭素前駆体である。マロニル-CoA非依存性経路によるドデカノールの形成を可能にする反応のすべてが、サイトゾルにおいて作動する。具体的には、ケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、エノイル-CoAヒドラターゼ、およびエノイル-CoAレダクターゼが適切な方向に作用してアシルCoAを形成し、その後、それが、アシルCoAレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼによって脂肪アルデヒドおよびドデカノールに還元される。

【0149】

サイトゾルにおけるMI-LCA経路の導入は、インシリコでは天然ピルビン酸デヒドロゲナーゼによる一切のフラックスを防止した。嫌気性条件下、および培地中のグルコース濃度が高い状態では、このミトコンドリア酵素の能力は非常に制限され、それを通る有意なフラックスはない。しかし、一部の実施形態では、この酵素を欠失または減弱させてLCA生産を増加させることができる。

【0150】

1つの実施形態において、サイトゾルにおけるLCA生産は、AMP形成性アセチル-CoAシンセターゼを用いる。サイトゾルにおけるドデカノール生産は、LCA生産の際に必要なとされる前駆体を供給するために天然細胞機械に依存する。解糖系によって生成されるピルビン酸塩フラックスの大部分は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびAMP形成性アセチル-CoAシンセターゼから成るピルビン酸デヒドロゲナーゼバイパスを経由してアセチルCoAの形成に向けられる(図9a)。このバイパスは、高いグルコース濃度で好気性条件下でさえそれを通る有意なフラックスを有すると報告されている(Pronkら、Yeast 12:1607-1633(1996))。

【0151】

酢酸塩をアセチル - C o A に変換するバイパスの最終段階は、A C S 1 および A C S 2 遺伝子によってコードされるアセチル - C o A シンセターゼによって触媒される。A C S 2 は、グルコースを用いて構成的に発現され、数あるコンパートメントの中でもサイトゾルに存在するので、一部の実施形態では、天然に存在しない真核生物を遺伝子工学で作製変えて A C S 2 を過発現させる。他の実施形態では、翻訳後修飾を受けない、および *S . cerevisiae* において A C S 1 または A C S 2 と比較して高い活性を有する、*Salmonella enterica* (Genbank id NP_807785.1) からの突然変異体 A C S (Shibara, Metab Eng. 9:160-168 (2007)) を、A C S 2 遺伝子の代わりに用いる。

10

【0152】

A M P 生成性アセチル C o A シンセターゼは、酢酸塩のそれぞれの分子のアセチル C o A への変換のために二 A T P 当量を用いる (C o A + 酢酸塩 + A T P → アセチル - C o A + P P i + A M P)。嫌気性条件下、エネルギーが、基質レベルリン酸化によってしか入手できないとき、A M P 形成性アセチル C o A シンセターゼによるドデカノールの生産は、エネルギー的に好適ではない。従って、そのエネルギー要求量を満たし、同時に酢酸塩のアセチル C o A への変換を増加させるために、細胞が少量の酸素を利用できるようにする。

【0153】

エタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼを破壊してアセチル - C o A および N A D H がエタノール生産に使用されることを防止することによって、ドデカノールの生産を向上させることができる。加えて、L C A の生産は、電子輸送呼吸鎖において N A D H が使用されることを防止することから恩恵を受ける。従って、一部の実施形態では、ミトコンドリア内部 N A D H デヒドロゲナーゼ、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトル (サイトゾル N A D H 結合グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼおよび膜結合グリセロール - 3 - リン酸: ユビキノンオキシドレダクターゼから成る) (Bakker ら、FEMS Microbiol. Rev. 25:15-37 (2001)) および外部 N A D H デヒドロゲナーゼの破壊を導入する。さらに、ドデカノール生産から N A D H をことによると引き離すことがあるサイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼも破壊する。これらの破壊を負わせた後の増殖連動生産エンベロープを図 9 b に濃灰色で示し、好気性条件下でのドデカノール生産の特徴と比較する。

20

30

【0154】

一部の実施形態において、前記天然に存在しない真核生物には、A D P 形成性酢酸 C o A リガーゼをコードする外因性遺伝子が組み込まれている。この実施形態において、サイトゾル中の A M P 形成性アセチル C o A シンセターゼは、A D P 形成性酢酸 C o A リガーゼによって置換される (C o A + 酢酸塩 + A T P → アセチル - C o A + P i + A D P) (図 10 a)。酢酸 C o A リガーゼを導入するための外因性遺伝子としては、例えば、*Pyrococcus furiosus* からの *acdA* および *acdB* が挙げられる (Glasmacher ら、Eur. J. Biochem. 244:561-567 (1997)) (Mai および Adams, J. Bacteriol. 178:5897-5903 (1996))。 (2 A T P 当量とは対照的に) アセチル C o A のそれぞれの分子の形成のために 1 当量の A T P を使用するこの酵素の導入は、エネルギー的に中立であるドデカノールの生産を可能にする。この実施形態では、少量の酸素または他の電子受容体呼吸を用いてエネルギーを生じさせて増殖を支援する。下でさらに説明するように、そのような少量の酸素を微好気性条件と呼ぶ。一部の実施形態では、エタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼを破壊して、エタノール形成を防止する。C o A リガーゼを組み込む実施形態では、次のロックアウトのうちの 1 つ以上を L C A 生産に導入することができる: サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部 N A D H デヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部 N A D H デヒドロゲナーゼ。これらの破壊を負わせた後の増殖連動生産を図 10 b に濃灰色で示す。黒色曲線は

40

50

、好気性条件下での野生型株についての生産エンベロップを示し、および薄灰色曲線は、そのネットワークを酢酸 - C o A リガーゼで増加させたときのエンベロップを示す。この酵素の導入後のドデカノールの最大理論収量の増加に留意すること。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態において、前記天然に存在しない真核生物には、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする外因性遺伝子が組み込まれている。ドデカノールプロセスのエネルギー特性の改善は、アセトアルデヒドのアセチル C o A への変換のためのアシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼの使用 (アセトアルデヒド + C o A + N A D アセチル - C o A + N A D H) によって果たすことができる (図 1 1 a)。この酵素を使用する利点は、(i) アセチル C o A の生産にエネルギーを一切費やさない点、および (i i) 形成されるアセチル C o A の分子ごとに N A D H の分子 1 個が形成される点である。従って、アセチル C o A の生産に必要とされる還元等価物も生成され得る。この酵素の導入は、嫌気性条件下で L C A の生産を可能にする。

【 0 1 5 6 】

アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼは、*Acetobacterium woodii* (Mai および Adams, J. Bacteriol. 178: 5897 - 5903 (1996))、*Clostridium kluyveri* (Seedorf ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 2128 - 2133 (2008)) ; Smith および Kaplan, Arch. Biochem. Biophys. 203: 663 - 675 (1980))、*Clostridium beijerinckii* (Yan ら、Appl. Environ. Microbiol. 56: 2591 - 2599 (1990)) をはじめとする幾つかの細菌において、および株 CF600 などの *Pseudomonas* の種 (Lei ら、Biochemistry 47: 6870 - 6882 (2008)) ; Manjasetty ら、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57: 582 - 585 (2001)) において報告されている。遺伝子の Genbank id を下の表 5 に示す。

【 0 1 5 7 】

【表 5】

表5

<i>Ald</i>	YP_001394464.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	<i>Pseudomonas</i> 種 CF600
<i>bphG</i>	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> 種
<i>mhpD</i>	NP_414884.1	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655

一部の実施形態において、上の株のそれぞれに追加の破壊を補足することができる。あるいは、増殖条件下で有意な活性を有することが知られていない一部の他の酵素が、適応進化またはランダム突然変異誘発のために活性になることがあり、ならびに破壊されることもある。

【 0 1 5 8 】

ドデカノール (または任意の L C A) の嫌気性増殖連動生産は、エタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼ活性を破壊することによって遂行することができる。アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼの、その好適なエネルギー特性での、導入は、天然アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびアセチル - C o A シンセターゼによる炭素フラックスを防止または減少させる。この生産エンベロップを図 1 1 b に示す。野生型 *S. cerevisiae* (黒色) ネットワークは、嫌気性条件下での増殖の副産物としてほんの少量のドデカノールを形成することができる。アシル化性デヒドロゲナーゼでこのネットワークを増加させると、このネットワークの理論最大収量の増加はあるが、増殖連動は観察されない (薄灰色の点線の曲線)。しかし、増加されたネットワークからのエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼの破壊は、ドデカノール生産がそのネットワークにおけ

る最大可能バイオマスで増殖に連動されることを示す（濃灰色曲線）。

【0159】

一部の実施形態において、前記天然に存在しない真核生物は、ドデカノール生産にサイトゾルピルビン酸デヒドロゲナーゼを用いる。M I - L C A 経路の前駆体を生成するためのサイトゾルピルビン酸デヒドロゲナーゼを図12に示す。そのような実施形態では、(i)ピルビン酸塩は、エネルギー消費を伴わずにサイトゾルにおいてアセチルC o Aに直接変換され、および(ii)細胞は、より多くの還元等価物を利用することができる。

【0160】

一部の実施形態では、天然ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼをサイトゾルに再びターゲティングするように、前記天然に存在しない真核生物を遺伝子工学で作り変える。他の実施形態では、異種サイトゾル酵素を前記生物に導入する。異なるコンパートメントへの酵素の再ターゲティングは、そのタンパク質のターゲティング配列を変更することによって遂行することができる(van LoonおよびYoung, EMBO J. 5:161-165(1986))。天然ピルビン酸デヒドロゲナーゼの破壊によって、サイトゾルピルビン酸デヒドロゲナーゼによるプロセッシングのために炭素フラックスの大部分をサイトゾルに導入することができる。これは、嫌気性条件下でのドデカノールの生産も可能にする。この増殖連動生産エンベロープは、図11bに示すものに類似している。このネットワークではアルコールデヒドロゲナーゼの代わりにピルビン酸デカルボキシラーゼを破壊して増殖連動を達成することに留意すること。

【0161】

一部の実施形態において、前記天然に存在しない真核生物は、サイトゾルピルビン酸:NAD Pオキシドレダクターゼを用いる。ピルビン酸:NAD Pオキシドレダクターゼは、図13に示すようにサイトゾルにおけるアセチルC o Aおよび還元等価物の生産を可能にする。この酵素の付加によって、そうでなければアセチルC o Aシンターゼによって必要とされたであろうエネルギーを消費することなく、アセチルC o Aを生産することができる。この酵素は、*Euglena gracilis*のミトコンドリアから精製されたものであり、酸素感受性である(Inuiら、Journal of Biochemistry 96:931-934(1984); Inuiら、Archives of Biochemistry and Biophysics 237:423-429(1985); Inuiら、Archives of Biochemistry and Biophysics 274:434-442(1989); Inuiら、Archives of Biochemistry and Biophysics 280:292-298(1990))。それは、ピルビン酸塩からアセチルC o Aを生成し、同時にNADPHを生産するために用いられる。対応する遺伝子は、pnoであり、そのGenbank idは、CAC37628.1である。ミトコンドリアターゲティング配列を除去することによって、それをサイトゾルにターゲティングすることができる。一部の実施形態では、トランスヒドロゲナーゼも付加する。この酵素を*E. coli*などの生物から外因性遺伝子として導入して、生成されたNADPHをNADHに変換することができる(Nissenら、Yeast 18:19-32(2001))。

【0162】

その低いATP必要量のため、この経路は、嫌気性条件下でさえエネルギー的に好適である。エタノール生産へのNADHおよびピルビン酸塩の利用を防止または減少させるために、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を破壊することができる。これは、図11bに示すものに類似したドデカノールの増殖連動生産につながる。

【0163】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、ピルビン酸ギ酸リアーゼを利用する。そのような実施形態では、図14に示すように、異種サイトゾルピルビン酸ギ酸リアーゼ(pf1)を用いて、アセチルC o AとNADHの両方を生成する。この酵素は、*E. coli*などの生物において典型的には嫌気性条件下で活性である。ピルビン酸塩のアセチルC o Aへの変換のためのエネルギー要求量の不足が、嫌気性条件下でのドデカ

10

20

30

40

50

ノール生産を可能にする。

【0164】

ピルビン酸塩のアセチルCoAへの変換は、ギ酸塩の生産によって遂行される。これは、天然ギ酸デヒドロゲナーゼによって代謝され、その結果、化学量論量の還元等価物の追加の生成をもたらす。この株設計を用いる一部の実施形態では、3つのピルビン酸デカルボキシラーゼ、PDC1、PDC5およびPDC6のうちの1つ以上を破壊することができる。ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする例示的遺伝子のGenbank idを下の表6に示す。

【0165】

【表6】

表6

<i>pflB</i>	NP_415423.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pfl</i>	YP_001588758.	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>pfl</i>	YP_001394497.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

このネットワークにおける異種ピルビン酸ギ酸リアーゼの導入と共にピルビン酸デカルボキシラーゼの破壊が、ドデカノールの増殖連動生産をもたらす。その生産曲線は、図11bに示すものに類似している。

【0166】

上で説明した天然に存在しない真核生物は、サイトゾルにおいてLCAを生産するが、ミトコンドリアにおいてLCAを生産することも可能である。ドデカノール生産の方への炭素フラックスの分配のための例示的設計を本明細書において下で詳述する。ミトコンドリアにおいてLCAを生産する生物は、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ、サイトゾルエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼなどの酵素をコードする遺伝子の1つ以上の破壊を含む。これらの遺伝子をコードする例示的遺伝子としては、例えば、YLR044C、YLR134W、YGR087C、PDC3、YBR145W、YGL256W、YOL086C、YMR303、YMR083W、YPL088W、YAL061W、YMR318C、YCR105W、およびYDL168Wが挙げられる。

【0167】

他の遺伝子破壊としては、サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、外部NADHデヒドロゲナーゼおよび内部NADHデヒドロゲナーゼによって触媒される、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトルなどの酵素をコードするものが挙げられる。後者の例示的遺伝子としては、例えば、YOL126C、YDL022W、YOL059W、YIL155C、YMR145C、YDL085W、およびYML120Cが挙げられる。

【0168】

ミトコンドリアにおいてLCAを生産する生物は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸:NADPオキシドレダクターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、酢酸CoAリアーゼ、およびAMP形成性アセチルCoAシンセターゼなどの酵素をコードする外因性核酸または上で説明したようなそれらの対応する遺伝子調節領域も含むことがある。加えて、そのような生物は、サイトゾルからミトコンドリアへのNADHの輸送のための増強されたNADH輸送シャトルシステムから恩恵を受ける。そのような生物に挿入することができる酵素をコードする他の外因性核酸としては、トランスヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼおよびピルビン酸オキシダーゼ(すべて、ミトコンドリアにおけるもの)、またはそれらの対応する遺伝子調節領域が挙げられる。

【0169】

1つの実施形態では、前記天然に存在しない真核生物においてミトコンドリアピルビン酸デカルボキシラーゼが用いられる。これは、図15aに示すようにアセチルCoAとNADHの両方を生産する天然ピルビン酸デヒドロゲナーゼである。この経路によるピルビ

10

20

30

40

50

ン酸塩のアセチルC o Aへの変換にはエネルギー要求量がないので、デカノールの生産は、例えば、嫌気性条件下でさえエネルギー的に好適である。

【0170】

ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼが*S. cerevisiae*において好気性条件においても嫌気性条件においても活性であることは公知である(Pronkら、*Yeast* 12:1607-1633(1996))。一部の実施形態において、この酵素をその天然形態でまたは異種形態で過発現される。より強いプロモーターを用いることにより、天然酵素を過発現させることができる。加えて、嫌気性条件下でのその活性を増加させる目的で突然変異を誘発することができる(Kimら、*J. Bacteriol.* 190:3851-3858(2008))。サイトゾルにおいて生成される還元等価物を、*S. cerevisiae*に存在するレドックスシャトルを使用することにより、ミトコンドリアにおけるドデカノール生産に利用することができる。これらのシャトルが呼吸条件下でのエネルギー生成のためにNADHをミトコンドリアに輸送すること(Overkampら、*J. Bacteriol.* 182:2823-2830(2000))に留意すること。増殖連動生産のために、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を破壊して、ピルビン酸塩フラックスをピルビン酸デヒドロゲナーゼのほうに向けてエタノール形成を阻害することができる。この突然変異体ネットワークについての生産曲線を図15bに示す。

10

【0171】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、異種ピルビン酸:NADP-オキシドレダクターゼを用いる。ミトコンドリアにおけるドデカノールの生産は、図16に示すようにミトコンドリアにおけるピルビン酸:NADPオキシドレダクターゼの導入によって達成することができる。この酵素は、*E. gracilis*から精製される。この酵素は、ミトコンドリア中に自然に存在し、嫌気性条件下で活性であるので、嫌気性条件下でこの酵素の高い活性を得ることができる。この酵素の導入は、ドデカノール生産のための前駆体アセチルC o Aおよびまた還元等価物を生じさせる。この酵素によって生成されたNADPHは、トランスヒドロゲナーゼによってNADHに変換され、それをミトコンドリアに導入することができる。追加の還元等価物ために、レドックスシャトルは、サイトゾルからミトコンドリアにNADHを輸送する必要がある。この酵素を用いるLC Aの増殖連動生産は、ピルビン酸デカルボキシラーゼの破壊によって達成することができる。その突然変異株の生産曲線は、図15bに示すものに非常に類似している。

20

30

【0172】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、異種ピルビン酸ギ酸リアーゼを用いる。ミトコンドリアにおけるピルビン酸ギ酸リアーゼを用いるドデカノールの生産を図17に示す。これらの遺伝子は、本明細書において上で概説した。そのような実施形態では、天然ギ酸デヒドロゲナーゼをミトコンドリアに再びターゲッティングして、ギ酸塩のさらなる代謝およびさらなる還元等価物の生成を可能にする。この株を採用して、酸素不在の状態でミトコンドリアにおいてLC Aの高い収量および生産性を維持するために十分なフラックスを有することができる。

【0173】

嫌気性増殖条件は、この株設計を用いるドデカノールの生産に適している。レドックスシャトルを過発現させて、サイトゾルにおいて生成されたNADHをミトコンドリアに輸送することができる。このシナリオでの生産は、サイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を破壊することによって実行できる。この突然変異株の生産特性は、図15bに示すものに類似している。

40

【0174】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、異種アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(アシル化性)を用いる。そのような実施形態では、図18に示すように、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをミトコンドリアに導入して、アセチル-C o AとNADHの両方をLC Aの生産に供する。一部の実施形態では、ピルビン酸デカルボ

50

キシラーゼアイソザイムをミトコンドリアに再びターゲティングして、ピルビン酸塩をアセトアルデヒドに変換する。ミトコンドリアにおけるこれら2つの活性の発現は、ピルビン酸ヒドロゲナーゼの活性と等価である。その増殖連動生産曲線は、図15bに示すものと同じである。一部の実施形態において、この増殖連動生産株は、破壊された天然ミトコンドリアアセトアルデヒドヒドロゲナーゼ (Pronkら、Yeast 12:1607-1633 (1996)) およびサイトゾルピルビン酸デカルボキシラーゼを有する。他の実施形態では、アセトアルデヒドのエタノールへの変換を防止するために、ミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼも破壊される。

【0175】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、ミトコンドリアアセチルCoAシンセターゼ (AMP-形成性) を用いる。上で論じたように、この酵素の発現は、好適なエネルギー特性のために酸素を必要とする。アセチルCoAシンセターゼのアイソザイムであるACS1は、*S. cerevisiae* において好気性条件下ではミトコンドリアにおいて発現されるが、グルコースによって抑制される。この酵素は、導入することができる対象となる条件下で発現される抑制または異種酵素を除去するように突然変異させることができる。加えて、ピルビン酸デカルボキシラーゼをミトコンドリアにおいて発現させて、酢酸塩を形成することもできる。例えば、*S. cerevisiae* は、ミトコンドリアアセトアルデヒドヒドロゲナーゼを既に有している (Pronkら、Yeast 12:1607-1633 (1996))。あるいは、ピルビン酸オキシダーゼなどの酵素を異種発現させて、ピルビン酸塩を酢酸塩に変換することができる。1つのそのような酵素候補は、*E. coli* からのピルビン酸オキシダーゼ (Genbank id: NP_451392.1) である。この酵素は、酸素が存在する状態で自然に発現される。

【0176】

この株設計を用いるLCAの生産は、次の破壊される酵素の1つ以上から恩恵を受ける：サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部NADHデヒドロゲナーゼ、およびミトコンドリア内部NADHデヒドロゲナーゼ。グリセロール-3-リン酸シャトルは、サイトゾルグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよび膜結合グリセロール-3-リン酸：ユビキノンオキシドレダクターゼから成り、後者もミトコンドリアグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとして機能する。一部の実施形態にでは、アセトアルデヒドのエタノールへの変換を防止するまたは減少させるために、ミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼも破壊する。このネットワークに加えられるミトコンドリアピルビン酸デカルボキシラーゼを有する野生型株についての生産曲線を図19bに黒色で示す。この曲線は、好気性条件について示すものである。上述の破壊をこのネットワークに負わせたときの生産特性を薄灰色で示す。ペントースリン酸経路の酸化部分、特に委任段階、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのダウンレギュレーションは、そのネットワークのLCA生産特性をさらに向上させる。

【0177】

一部の実施形態において、天然に存在しない真核生物は、ミトコンドリア酢酸CoAリガーゼ (ADP形成性) を用いる。ミトコンドリアLCA生産は、図20に示すように酢酸-CoAリガーゼを使用して酢酸塩をアセチル-CoAに変換することによっても遂行することができる。上で説明したように、この酵素の使用はエネルギー的に好適であり、LCA生産は酸素が供給されない限りエネルギー的に中立である。そのような実施形態では、ピルビン酸デカルボキシラーゼのミトコンドリア発現が用いられる。LCA生産は、サイトゾルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼシャトル、外部NADHデヒドロゲナーゼ、および内部NADHデヒドロゲナーゼの破壊を負わせることによって達成される。ペントースリン酸経路の酸化部分のダウンレギュレーションは、その増殖連動生産特性をさらに向上させて、図19bに示すものに類似した生産曲線を生じさせる。一部の実施形態では、アルデヒドのエタノールへの変換を防止するま

たは減少させるために、ミトコンドリアエタノール特異的アルコールデヒドロゲナーゼも破壊される。

【0178】

本明細書に記載する設計戦略は、長鎖アルコールの生産をエネルギー生成および/またはレドックス均衡に結び付けるため、増殖連動生産の増進に有用であるばかりでなく、非増殖連動生産にもよく適する。

【0179】

例示的非増殖連動生産方法は、好気性増殖期、その後の嫌気性生産期の実施を含む。例えば、Vemuriら、*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (6): 325 - 332, (2002)には、*E. Coli*におけるコハク酸塩の生産のための二相プロセスが記載されている。Okinoら、*Appl. Microbiol. Biotechnol. Sep* 6, (2008) [現在、オンライン版で入手可能]には、*Corynebacterium glutamicum*株の株における類似の非増殖連動生産プロセスが記載されている。

【0180】

もう1つのそのような方法は、増殖細胞培養物に必須栄養素を与えずにおき、それによって増殖を制限することを含むが、Durnerら、*Appl. Environ. Microbiol.* (8): 3408 - 3414 (2000)に記載されているような生産を含まない。生産から増殖を切り離すことを目的とするさらにもう1つの戦略は、Altamiranoら、*Biotechnol. Bioeng.* 76: 351 - 360 (2001)に記載されているようなよりゆっくりと代謝することができる別の化合物での増殖基質の置換を含む。増殖を切り離れた生産形式は、Blombachら、*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 471 - 9 (2008)に記載されているような特定の遺伝子修飾によって行うこともできる。

【0181】

LCA生産が可能な一部の微生物を*Saccharomyces cerevisiae* 遺伝的バックグラウンドに関して本明細書では例示する。しかし、395の微生物ゲノムならびに様々な酵母、真菌、植物および哺乳動物ゲノムを含めて、現在550を超える種について入手できる完全ゲノム配列（これらの半分より多くがNCBIなどの公的データベースで入手できる）を用いる、例えば、オーソログ、パラログおよび非オーソログ遺伝子置換を含む1つ以上の遺伝子について代替種ホモログの特定ならびに真核生物間の遺伝子改変の相互交換は、当該技術分野において常例的であり、周知である。従って、*Saccharomyces cerevisiae*などの特定の生物に関連して本明細書に記載するLCA生産を可能にする代謝改変を、他の微生物に容易に適用できる。本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、ある生物において例示する代謝改変を他の生物に同様に適用できることは、当業者にはわかるであろう。

【0182】

本発明の方法は、酵母および真菌などの様々な真核生物に適用することができる。酵母としては、例えば、*S. cerevisiae*および*Rhizopus arrhizus*を挙げることができる。例示的真核種としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus niger*、*Rhizopus arrhizus*、*Rhizopus oryzae*、*Candida albicans*、*Candida boidinii*および*Pichia pastoris*から選択されるものが挙げられる。加えて、より大きな真核生物からの選択細胞も本発明の方法に利用することができる。

【0183】

幾つかの方法を用いて遺伝子を*S. cerevisiae*に挿入することができ、これらの方法の一部は、プラスミドに基づくものであるが、他のものは、染色体における遺伝

10

20

30

40

50

子の組み込みを可能にするものである。後者のアプローチは、組み込みプロモーターに基づく発現ベクター、例えば、GAPプロモーターに基づくpGAPZまたはpGAPZベクターを利用する。前記発現ベクターは、耐性マーカーの除去および再循環を可能にするloxP部位が隣接するKanMXカセットに加えて、GAPプロモーター、組み込みのためのHIS4野生型対立遺伝子およびP.pastorisの3'AOX転写末端領域を構成する。前記ベクターは、Invitrogenから市販されている。これについての詳細は、下の実施例において詳しく述べる。

【0184】

遺伝子工学で作り変えた株を、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を測定することによって特性づけする。培養物を一晩増殖させ、新しい回分培養のための接種材料として使用し、指数増殖期中にそれらについての測定を行う。増殖速度は、分光光度計(A600)を使用して光学密度を測定することによって決定する。培養上清中のグルコース、アルコールおよび他の有機酸副産物の濃度は、HPLC-87Hカラム(BioRad)を使用するHPLCまたはGC-MSを含む分析法によって決定することとなり、それを用いて取り込みおよび分泌速度を算出する。すべての実験は、三重反復培養で行う。

【0185】

本発明は、本明細書において上で説明した天然に存在しない真核生物を培養することによる長鎖アルコールの生産方法も提供する。1つ以上の遺伝子破壊が、酵素をコードする遺伝子において生じ、この酵素は、遺伝子破壊がその酵素の活性を低下させるとその生物の増殖に長鎖アルコール生産を連動させるものである。1つ以上の遺伝子破壊が、その生物に長鎖アルコールの安定した増殖連動生産をもたらす。代替実施形態において、前記遺伝子破壊は、増殖依存様式でLCA生産を増進させることができる。

【0186】

予測された株設計がLCAの形成とバイオマス形成を十分に連動させないと判定された場合、本明細書に提示する株のそれぞれにさらなる破壊を追加することができる。しかし、ここに提供する遺伝破壊セットのリストは、高収量増殖連動LCA生産株の構築のための卓越した出発点として役立つ。

【0187】

予測された株設計が産物の形成をバイオマス形成に十分に連動させないと判定された場合、提案する株のそれぞれにさらなる破壊を追加することができる。あるいは、増殖条件下で有意な活性を有することが知られていない何らかの他の酵素が、適応進化またはランダム突然変異誘発のため活性になることがあり、破壊されることもある。しかし、ここに提供する遺伝子破壊セットのリストは、高収量増殖連動LCA生産株の構築のための卓越した出発点として役立つ。

【0188】

本発明の天然に存在しない微生物をLCAの増殖連動生産に利用することができる。本発明の増殖連動LCA生産を用いて、商業的な量を含めて、本質的に任意の量を合成することができる。本発明の微生物は、連続増殖または準連続増殖プロセスにLCAを強制的に連動させるので、LCAの生合成生産に特に有用である。そのような連続および/または準連続増殖プロセスは、上で説明しており、および下で実施例Iにおいて例示する。連続および/または準連続微生物増殖プロセスも当該技術分野において周知である。簡単に言うと、連続および/または準連続増殖プロセスは、微生物を指数増殖または対数期で維持することを含む。手法は、Evoluta(商標)進化マシン(フロリダ州、ケインズヴィルのEvolute LLC)、発酵槽およびこれらに類するものなどの装置の使用を含む。加えて、微好気性条件下での振盪フラスコ発酵および増殖も利用することができる。本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、当該技術分野において周知の様々な異なるプロセスおよび/または装置を用いて、様々な異なる条件下、様々な異なる設定で、前記増殖連動LCA生産性微生物を利用できることは、当業者には理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【0189】

一般に、C L Aの連続および/または準連続生産は、増殖を指数期で維持するおよび/またはほぼ維持するために十分な栄養および培地で本発明の天然に存在しない増殖連動L C A生産性微生物を培養することを含むであろう。そのような条件下での連続培養を、例えば、1日、2、3、4、5、6または7日以上、生じさせることができる。加えて、連続培養は、1週、2、3、4または5週以上、および数か月以下の継続期間を含むことができる。前記連続および/または準連続培養条件が、これらの例示的期間の間のすべての時間間隔も含み得ることは、理解されるはずである。特定の実施形態では、実質的に嫌気性の培養基において培養を行う。

【0190】

上に例示した連続および/または準連続培養期間中の任意の時点でL C Aを回収または単離することができる。下で例示するように、連続および/または準連続増殖期での微生物の維持が長いほど、生産することができるL C Aの量は比例して多い。

【0191】

従って、本発明は、1つ以上の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物を培養することを含むL C Aの生産方法を提供する。前記破壊は、酵素をコードする遺伝子において生じ得、この酵素は、遺伝子破壊がその酵素の活性を低下させるとその微生物の増殖にL C A生産を連動させるものである。前記破壊が、前記天然に存在しない微生物にL C Aの安定した増殖連動生産をもたらす。

【0192】

一部の実施形態において、前記遺伝子破壊は、完全遺伝子欠失を含む場合がある。一部の実施形態において、遺伝子を破壊するための他の手段は、例えば、オリゴヌクレオチドの欠損もしくは付加によるまたは遺伝子を作動不能にさせる突然変異によるフレームシフトを含む。しかし、それが前記天然に存在しない生物にその野生型に復帰変異しないようにもたすことができる安定性のため、遺伝子欠失の利点が当業者にはわかるであろう。詳細には、遺伝子破壊は、本明細書において上で詳述した遺伝子を含む遺伝子セットから選択される。

【0193】

本開示において列挙する代謝経路を遺伝子工学で作り変える戦略は、その生物がマロニル - C o A非依存性経路によって長鎖アルコールを生産できることを仮定している。マロニル - C o A非依存性経路によって長鎖アルコールを生産できる組み換え宿主生物の構築は、第一級アルコールを生産するために十分な量で発現されるマロニル - C o A非依存性F A S経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を有する、マロニル - C o A非依存性脂肪酸合成 (F A S) 経路とアシル還元経路とアシル還元経路とを有する、天然に存在しない微生物を遺伝子工学で作ることを含む。そのようなマロニル - C o A非依存性F A S経路は、ケトアシル - C o Aアシルトランスフェラーゼまたはケトアシル - C o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - C o Aデヒドロゲナーゼ、エノイル - C o Aヒドラターゼおよびエノイル - C o Aレダクターゼを含む。前記アシル還元経路は、アシル - C o Aレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを含む。

【0194】

本明細書に提示するコンピュータ計算予測を実証するために、それらの株を構築し、進化させ、試験しなければならない。M I - L C A経路を保有する*Escherichia coli* K - 12 M G 1 6 5 5は、破壊を導入することとなる株として役立つ。前記破壊は、D a t s e n k oおよびW a n n e rの R e dリコンビナーゼ系による相同組み換え (D a t s e n k o , K . A . a n d B . L . W a n n e r , O n e - s t e p i n a c t i v a t i o n o f c h r o m o s o m a l g e n e s i n E s c h e r i c h i a c o l i K - 1 2 u s i n g P C R p r o d u c t s . P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 0 . 9 7 (1 2) : p . 6 6 4 0 - 5) を用いてインフレーム欠失を組み込むことによって構成されることとなる。このアプローチは、染色体配列 (すなわち、除去のターゲットにされた遺伝子) を選択

可能な抗生物質耐性遺伝子（それ自体、後に除去される）で置換することを含む。ノックアウトを1つ1つ受容株に組み込む。それぞれの欠失後に抗生物質耐性遺伝子は残存せず、その結果、それぞれのターゲット株における多重突然変異の蓄積が可能となる。この欠失技術は、除去のターゲットにされた遺伝子を完全に除去して、構築された突然変異体が野生型に復帰変異する可能性を実質的に低下させる。

【0195】

中間株が構築されることとなる場合、振盪フラスコ発酵を行うことより株の性能を定量することとなる。ゴムセプタムでフラスコを封止し、その後、窒素ガスを培地に散布することによって、嫌気性条件が得られるであろう。厳密な嫌気性条件下で増殖が観察されない株については、フラスコをホイルで覆い、制限通気用の小さな穴をあけることによって微好気性条件を適用することができる。別様に述べない限り、グルコースを補足したM9最小培地を使用してすべての実験を行う。予備培養物を一晩増殖させ、新しい回分培養のための摂取材料として使用し、指数増殖中にそれらについての測定を行う。分光光度計（600nm）を使用して光学密度を測定することにより増殖速度を決定し、継時的に炭素源枯渇をモニターすることによりグルコース取り込み速度を決定する。常例の手順を用いてGC-MSまたはHPLCによりLCA、エタノール、および有機酸を分析する。三重反復培養物をそれぞれの株について増殖させる。

【0196】

嫌気性、pH制御回分発酵での選択株の性能を試験する。これは、酸性発酵産物の蓄積が細胞増殖を制限しないことを保証するばかりでなく、すべての産物の増殖、グルコース取り込み、および形成速度の信頼できる定量を可能にする。加えて、それは、株の性能のベンチマーキングにおける2つの重要なパラメータであるLCA容積生産性および収量の正確な決定を可能にする。発酵は、温度およびpH制御部が装備された600mLの使用容積を有する1Lバイオリアクターにおいて行う。そのリアクターにN₂をおおよそ0.5L/分で散布して、DOレベルが確実に検出レベル未満のままであるようにする。培養基は、発酵容器内で達成できるいっそう高い細胞密度に合わせてグルコース濃度を上昇させることを除き、上で説明したものと同一である。

【0197】

回分から連続への発酵モードの切り替えがLCA収量および容積生産性にどのように影響するかを直接測定を達成するためにケモスタット実験を行うこととなる。回分モードを用いる上で説明したバイオリアクターを、培地の連続供給および使用済み培地の除去によってケモスタットモードで動作させる。回分でそれぞれの株について観察された最大増殖速度の80%の一定希釈率を維持するように入口流量を設定し、出口流量を制御してレベルを維持する。グルコースはその培地における制限栄養であり、その容器において所望の最適密度を達成するように設定する。

【0198】

組み換え株は、それらの代謝ネットワークがそれらの失われた機能に順応するまで、最初は最適下増殖速度を示すと予測される。この順応を可能にするために、それらの株を適応進化させる。それらの株を適応進化に付すことにより、細胞増殖速度が主選択圧となり、突然変異細胞は、それらの増殖速度を向上させるために、それらの代謝フラックスに再び割り当てられることを余儀なくされる。この代謝再プログラミングは、インシリコモデルによりアプリアリに予測された増殖速度に達することが、様々な基質で適応進化させた幾つかの*E. coli*突然変異体について最近実証されている（Fong, S. S. および B. O. Palsson, *Metabolic gene-deletion strains of Escherichia coli evolve to computationally predicted growth phenotypes*. Nat Genet, 2004. 36(10): p. 1056-8）。他のものより優れた生産品質を有する1つの株をとすれば生じさせる結果となり得る*E. coli*において以前に目撃された進化パターンの相違（Fong, S. S. および B. O. Palsson, *Metabolic gene-deletion strains of Esc*

10

20

30

40

50

herichia coli evolve to computationally predicted growth phenotypes. Nat Genet, 2004. 36(10): p. 1056-8; Fong, S. S., J. Y. Marciniak, および B. O. Palsson, Description and interpretation of adaptive evolution of Escherichia coli K-12 MG1655 by using a genome-scale in silico metabolic model. J Bacteriol, 2003. 185(21): p. 6400-8; Ibarra, R. U., J. S. Edwards, および B. O. Palsson, Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. Nature, 2002. 420(6912): p. 186-189) のため、OptKnock 生成株を (並行して実行する) 三重反復で適応進化させる。達成される増殖速度向上に依存して、2~6 週間、またはそれ以上の間、進化を実行する。一般に、安定な表現型が得られたら進化を停止させる。この OptKnock アプローチの背後の増殖連動生化学生産概念が、結果として、遺伝的に安定な過剰生産体を生じさせる。

【0199】

遺伝子工学で作り変えられた株を、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を測定することによって特性づけすることができる。培養物を一晚増殖させ、新しい回分培養のための摂取材料として使用し、指数増殖中にその測定を行う。増殖速度は、分光光度計 (A600) を使用して光学密度を測定することにより決定することができる。培地上清中のグルコースおよび他の有機酸副産物の濃度は、HPX-87H カラム (BioRad) を使用する HPLC によって決定し、それを用いて取り込みおよび分泌速度を算出する。すべての実験を三重反復培養で行う。

【0200】

適応進化プロセス後、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を再び測定することによってそれらの新しい株を特性づけする。これらの結果と OptKnock 予測とを、上の計算での生産エンベロップと共に実際の増殖および生産収量をプロットすることによって比較することとなる。最も成功した OptKnock 設計/進化の組み合わせをさらに追跡するために選択し、実験室規模の回分および連続発酵で特性づけする。この OptKnock アプローチの背後の増殖連動生化学生産概念は、結果として、遺伝的に安定した過剰生産体も生じさせる。それ故、それらの培養物を一か月間連続モードで維持して、長期安定性を評価する。この実験を通して収量および生産性が維持されることを保証するために定期的サンプルを採取する。

【0201】

前に述べたように、所望の産物の生合成に好適である代謝改変を特定および設計するための1つのコンピュータ計算方法が OptKnock コンピュータ計算フレームワーク (Burgardら, Biotechnol Bioeng. 84: 647-657 (2003)) である。このフレームワークは、微生物の完全代謝および/または生化学ネットワークを調査して、所望の生化学物質を細胞増殖の副産物になるように強いる遺伝子操作を示唆する。戦略的に配置された遺伝子欠失または他の機能的遺伝子破壊によって細胞増殖と生化学的生産を連動させることにより、バイオリアクターでの長い期間の後、遺伝子工学で作り変えられた株にかけられる増殖選択圧が、その強制的増殖連動生化学的生産の結果として性能の向上をもたらす。最後に、遺伝子欠失を構成するとき、OptKnock によって選択された遺伝子はゲノムから完全に除去されることとなるので、設計した株がそれらの野生型状態に復帰変異する可能性は無視してよい。従って、このコンピュータ計算方法論は、所望の産物の生合成をもたらす代替経路を特定するために用いることができ、または所望の産物の生合成のさらなる最適化のために天然に存在しない微生物に関して用いることができる。

【0202】

簡単に言うと、OptKnockは、細胞の代謝をモデリングするためのコンピュータ計算方法およびシステムを指すために本明細書において用いる用語である。OptKnockプログラムは、フラックス均衡解析(FBA)モデルに特定の制約を組み込むモデルおよび方法のフレームワークに關係する。これらの制約としては、例えば、定性的動態情報、定性的調節情報、および/またはDNAマイクロアレイ実験データが挙げられる。OptKnockは、例えば、フラックス均衡モデルによって得られるフラックス範囲を狭め、その後、遺伝子付加または破壊が存在する状態で代謝ネットワークの性能限界を精査することにより、様々な代謝の問題に対する解も推定する。OptKnockコンピュータ計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の有効な照会を可能するモデル式の作成を可能にし、結果として得られる混合整数線形計画問題の解法を提供する。本明細書においてOptKnockと呼ぶ代謝モデリングおよびシミュレート方法は、例えば、2002年1月10日出願の米国特許公開第2002/0168654号に、2002年1月10日出願の国際特許番号PCT/US02/00660に、および2007年8月10日出願の米国特許出願第11/891,602号に記載されている。

【0203】

産物の生合成生産に好適である代謝改変を特定するおよび設計するためのもう1つのコンピュータ計算方法は、SimPheny(登録商標)と呼ばれる代謝モデリングおよびシミュレーションシステムである。このコンピュータ計算方法およびシステムは、例えば、2002年6月14日出願の米国特許公開第2003/0233218号に、および2003年6月13日出願の国際特許出願番号PCT/US03/18838に記載されている。SimPheny(登録商標)は、インシリコでネットワークモデルを生成するために使用することができる、および生体系の化学反応による質量、エネルギーまたは電荷のフラックスをシミュレートするために使用して、その系における化学反応の任意のおよびすべての可能な機能性を含む解空間を定義し、それによってその生態系についての許容活性の範囲を決定することができるコンピュータ計算システムである。このアプローチは、制約に基づくモデリングと呼ばれる。解空間が、制約、例えば、含まれる反応の公知化学量論、ならびに反応による最大フラックスに関連した反応熱力学および容量の制約によって定義されるからである。これらの制約によって定義される空間の情報を送り、その生体系のまたはその生化学成分の表現型の能力および挙動を決定することができる。

【0204】

生体系は順応性があり、多くの異なる方法で同じ結果に達することができるので、これらのコンピュータ計算アプローチは、生物学的現実との矛盾がない。生体系は、生きているすべての系が直面する基本的制約による拘束を受けた進化メカニズムによって設計される。従って、制約に基づくモデリング戦略は、これらの一般的な現実を包含する。さらに、制約をきつくすることによりネットワークモデルにさらなる制限を連続的に課すことができることによって、解空間のサイズが減少され、その結果、生理的機能または表現型を予測することができる精度が向上される。

【0205】

本明細書に提供する教示およびガイダンスを考慮すれば、当業者は、代謝モデリングおよびシミュレーションのために様々なコンピュータ計算フレームワークを利用して、宿主微生物における所望の化合物の生合成を設計するおよび実行することができるであろう。そのような代謝モデリングおよびシミュレーション方法としては、例えば、SimPheny(登録商標)およびOptKnockとして上で例示したコンピュータ計算システムが挙げられる。本発明の例証のために、本明細書ではモデリングおよびシミュレーションのためのOptKnockコンピュータ計算フレームワークに関して一部の方法を説明する。当業者は、OptKnockを用いる代謝改変の特定、設計および実行を、当該技術分野において周知の任意のそのような他の代謝モデリングおよびシミュレーションコンピュータ計算フレームワークおよび方法に適用する方法を知っているだろう。

【0206】

上で説明した方法は、破壊すべき代謝反応の1セットをもたらすであろう。そのセット

の中のそれぞれの反応または代謝修飾の除去によって、その生物の増殖期中に産物として所望の産物を得ることができる。これらの反応は公知であるので、二層OptKnock問題に対する解は、その反応セットの中のそれぞれの反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする関連遺伝子(単数または複数)ももたらすであろう。1セットの反応の特定およびそれぞれの反応に関与する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般に、酵素とコード遺伝子との関係を有する反応データベースとそれらの反応の相関によって遂行される自動プロセスである。

【0207】

特定されると、所望の産物の生産を達成するために破壊されることとなる反応のセットが、ターゲット細胞または生物において、そのセットの中のそれぞれの代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能破壊によって実行される。この反応セットの機能破壊を達成するために特に有用な1つの手段は、それぞれのコード遺伝子の欠失によるものである。しかし、場合により、例えば、突然変異、調節領域、例えばプロモーター、もしくは調節因子のためのシス結合部位、の欠失を含む他の遺伝子異常によって、または多数の位置のいずれかでのコード配列のランケーションによって、反応を破壊することが有益であることがある。遺伝子セットの完全に満たない欠失を生じさせるこれらの後者の異常は、例えば、産物の連動の迅速な評価が望まれるとき、または遺伝子復帰変異が発生する可能性が低いとき、有用であり得る。

【0208】

所望の産物の増殖連動生合成をはじめとする生合成を結果として生じさせることができる、破壊すべき反応または代謝修飾のさらなるセットをもたらし、上で説明した二層OptKnock問題に対する追加の生成解を特定するために、整数カットと呼ばれる最適化方法を実行することができる。この方法は、整数カットと呼ばれる追加の制約をそれぞれの反復時に組み込みながら、上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって行われる。整数カット制約は、産物の生合成を増殖に強制的に連動させる任意の前の反復において特定された反応のまさに同じセットをその解の手順が選択するのを有効に防止する。例えば、前に特定された増殖連動代謝修飾が、破壊に反応1、2および3を指定する場合には、次の制約が、同じ反応が後続の解において同時に考慮されることを防止する。この整数カット法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol Prog, 17:791-797(2001)に記載されているのを見つけることができる。代謝モデリングおよびシミュレーションのためのOptKnockコンピュータ計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載するすべての方法と同様に、反復コンピュータ計算解析における重複を減少させる整数カット法も、例えばSimPheny(登録商標)をはじめとする当該技術分野において周知の他のコンピュータ計算フレームワークと共に利用することができる。

【0209】

本明細書に例示する方法は、所望の産物を生合成生産する細胞および生物の構築を可能にするものであり、この方法は、特定された遺伝子改変を有するように遺伝子工学で作り変えられた細胞または生物の増殖にターゲット生化学物質の生産を連動させることを含む。従って、本明細書に記載するコンピュータ計算方法は、OptKnockまたはSimPheny(登録商標)から選択されたインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定および実行を可能にする。前記代謝修飾のセットは、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の付加、および/または例えば遺伝子欠失による破壊を含む、1つ以上の代謝反応の機能破壊を含むことができる。

【0210】

上で論じたように、OptKnock方法論は、突然変異微生物ネットワークを、長い増殖選択期間に付したとき、それらのコンピュータ計算予測最大増殖表現型のほうに進化させることができることを前提として開発された。言い換えると、このアプローチは、選択圧のもとで自己最適化する生物の能力に影響を与える。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論に基づく生化学的生産と細胞増殖とを強いて連動させる遺伝

10

20

30

40

50

子破壊の組み合わせの網羅的列举を可能にする。最適な遺伝子/反応破壊の特定は、結果として生ずるネットワークについての最適な増殖の解が対象となる生化学物質を過剰生産するように活性反応のセットを選択する二層最適化問題の解を必要とする (Burgardら、Biotechnol Bioeng. 84: 647-657 (2003))。

【0211】

以前に例示されているおよび例えば、米国特許公開US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654およびUS 2004/0009466に、ならびに米国特許第7,127,379号に記載されているように、Escherichia coli代謝のインシリコ化学量論的モデルを利用して代謝経路に必須の遺伝子を特定することができる。本明細書に開示するように、OptKnock数学的ネットワークは、所望の産物の増殖連動生産をもたらす遺伝子破壊の位置を正確に特定するために利用することができる。さらに、二層OptKnock問題の解は、1セットの破壊しか与えない。すべての意味ある解、すなわち、増殖連動生産形成につながる破壊のすべてのセットを列举するために、整数カットと呼ばれる最適化技術を実行することができる。これは、上で論じたように、整数カットと呼ばれる追加の制約をそれぞれの反復時に組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを必然的に伴う。

【0212】

適応進化は、突然変異体もしくは遺伝子工学で作り変えられた微生物株の、または不自然環境条件下で増殖する野生型株の、増殖速度を増すために用いることができる強力な実験技術である。それは、OptKnock数学的形式によって設計された株に特に有用であり、結果として増殖に連動した産物形成をもたらす。従って、最適な増殖株への進化は、間接的に生産も最適化することとなる。E. coli K-12 MG1655のユニークな株は、遺伝子ノックアウトおよび適応進化によって作られた (Fong, S. S. および B. O. Palsson, Nat. Genet. 36: 1056-1058 (2004))。この研究では、すべての適応進化培養物を、定常期に達する前に新しい培地への回分培養物の連続継代によって長期指数増殖状態で維持し、従って増殖速度を主選択圧として与えた。このノックアウト研究のために選択された遺伝子は、ackA、frdA、pckA、ppc、tpiA、およびzwfであった。ノックアウト株を構築し、(それぞれのノックアウト株について4つの)異なる炭素基質を補足した最小培地で進化させた。進化培養を二重反復または三重反復で行って、合計50の進化ノックアウト株を生じさせた。安定した増殖速度に達するまでそれらの進化培養物を指数増殖状態で維持した。コンピュータ計算予測は、ノックアウト株の進化後増殖速度の予測から、調査した50ケースのうち38ケースにおいて正確(すなわち10%以内)であった。さらに、OptKnock成形と適応進化の組み合わせは、改善された乳酸生産株をもたらした (Fong, S. S., A. P. Burgard, C. D. Herring, E. M. Knight, F. R. Blattner, C. D. Maranas, および B. O. Palsson, Biotechnol Bioeng. 91: 643-648 (2005))。E. coliに関連したこれらの教示のガイダンスを他の生物に適用することができる。

【0213】

適応進化を行うために開発された技術は多数ある。例示的方法を本明細書において下で説明する。一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない生物の最適化は、これらの適応進化技術のいずれかの使用という主題を含む。

【0214】

連続培養は、新しい増殖培地を収容するはるかに大きい容器に少量の増殖培養物を繰り返し移すことを含む。培養された生物がその新たな容器内で飽和まで増殖したら、前記プロセスを繰り返す。文献 (Lenski, R. E. および M. Travisano, Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 6808-6814 (1994))では、この方法を用いて、何年もの期間にもわたって増殖速度の一貫した向上を明瞭

10

20

30

40

50

に実証した実験で持続培養の最も長い実証が達成されている。上に記載した P a l s s o n l a b において行われた実験では、移送は、通常、対数期の間に行われ、そのため各日、その移送容積が正確に計算されて、次の 24 時間にわたって対数増殖が維持される。このプロセスは、通常、相当な労力を投資して手作業で行われ、および外部環境への暴露によって汚染される。さらに、そのような少量を各回移すので、進化は不十分であり、多くの有益な突然変異が失われる。プラス面としては、系列希釈は費用がかからず、並行処理が容易である。

【0215】

連続培養の場合、ケモスタットでの細胞の増殖が、細胞集団に非常に高い割合が残存する極端な希釈例の代表である。培養物が増殖し、飽和状態になると、増殖した培養物の小率が新しい培地で置換され、それによってその最大集団サイズ近くで培養物を継続的に増殖させることができる。ケモスタットは、短期間の急速な増殖速度向上を実証するために使用されている。(Dykhuisen, D. E., Methods Enzymol. 613-631 (1993))。これらの装置の潜在能力は認められているが、従来のケモスタットは、希釈耐性(静止)変異体の意図されたものでない選択のため、増加された増殖速度についての長い選択期間を維持することができなかった。これらの変異体は、ケモスタットの表面に付着することによって希釈に耐えることができ、およびそうすることによって、より高い増殖速度を有するものを含むあまり粘着性でない固体と競合してそれらに勝ることができ、従って、その装置の所期の目的を不要にする。(Chao, L. および G. Ramsdell J. Gen. Microbiol. 20:132-138 (1985))。この欠点を克服するための1つの可能な方法は、Pasteur Institute による特許(Marlliere および Mutzel、1999 年出願の米国特許第 6,686,194 号)に記載されているような、一時的な滅菌期間を定期的にこうむる、2つの増殖チャンバを有する装置の実行である。

【0216】

Evolugator (商標) は、Evolugate, LLC (フロリダ州、ゲインズビル) によって開発された連続培養装置であり、従来の進化技術に勝る有意な時間および労作節約を示す。(de Crecy, E., Metzgar, D., Allen, C., Penicaud, M., Lyons, B., Hansen, C.J., de Crecy-Lagard, V. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:489-496 (2007))。定常期に達する前に新しい培地への回分培養の連続継代によって長期指数増殖状態で細胞を維持する。最適密度測定および液体処理を自動化することにより、Evolugator は、大きな培養容積を用いて高速で連続移送を行うことができ、従って、細胞適応度の進化に関してはケモスタットの効率にほぼ等しい。例えば、翻訳機構の成分を欠失し、重度に増殖阻害された *Acinetobacter* 種 ADP1 の突然変異体を 200 世代で野生型増殖速度の 80% に進化させた。しかし、単一容器内に細胞を維持するケモスタットとは対照的に、この機械は、ひと巻の管の細分された領域内の1つの「リアクター」から次への移動によって動作し、このようにして壁での増殖の一切の選択を無くす。移送容積は調節可能であり、通常は約 50% に設定される。

【0217】

本発明の様々な実施形態の活性に実質的に影響を及ぼさない修飾も本明細書に提供する本発明の定義の中に含まれることは理解されるであろう。従って、以下の実施例は、例証のためのものであり、本発明を限定するためのものではない。

【実施例】

【0218】

実施例 I

第一級アルコール合成

この実施例は、マロニル - CoA 非依存性 FAS 代謝経路およびアシル還元代謝経路を使用して第一級アルコールを生産することができる微生物の産生を説明するものである。

【0219】

図1に示すようなマロニル - CoA非依存性FASおよびアシル還元経路を遺伝子工学で作るためにターゲット生物として*Escherichia coli*を使用する。*E. coli*は、オクタノールなどの第一級アルコールを生産することができる天然に存在しない微生物を産生のための良好な宿主となる。*E. coli*は、遺伝子操作に適し、および嫌気性条件下でエタノールなどの様々な産物を有効に生産できることが知られている。

【0220】

第一級アルコールを生産するように遺伝子工学で作り変えられた*E. coli*株を産生するために、前に説明したようなマロニル - CoA非依存性FASおよびアシル還元経路において利用される酵素をコードする核酸を、公知の分子生物学技術（例えば、Sambrook、上記文献、2001；Ausubel、上記文献、1999；Robertsonら、上記文献、1989を参照のこと）を用いて*E. coli*において発現させる。詳細には、嫌気性条件下でケトアシル - CoAチオラーゼ、3 - ヒドロキシアシル - CoAデヒドロゲナーゼ、およびエノイル - CoAヒドラターゼ活性を有する多酵素複合体をコードする*fadI/fadJ*遺伝子（NP_416844.1およびNP_416843.1）、およびエノイル - CoAレダクターゼをコードするTDE0597（NP_971211.1）を、PA1/lacOプロモーターのもとでpZE13ベクター（ドイツ、RuehlzheimのExpressys）にクローニングする。アシル - CoAレダクターゼをコードする*acr1*遺伝子（YP_047869.1）およびアルコールデヒドロゲナーゼをコードする*alrA*遺伝子（BAB12273.1）を、PA1/lacOプロモーターのもとでpZA33ベクター（ドイツ、RuehlzheimのExpressys）にクローニングする。2セットのプラスミドを*E. coli*株MG1655に形質転換させて、マロニル - CoA非依存性FASおよびアシル還元経路に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0221】

結果として得られた遺伝子工学で作り変えられた生物を、当該技術分野において周知の手順（例えば、Sambrookら、上記文献、2001を参照のこと）に従ってグルコース含有培地で培養する。例えばノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、免疫ブロッティングをはじめとする、当該技術分野において周知のポリペプチド発現または酵素活性の決定方法を用いて、マロニル - CoA非依存性FASおよびアシル還元経路遺伝子の発現を裏付ける。発現された酵素の酵素活性は、個々の活性に特有のアッセイを用いて確認する（例えば、Tucci、上記文献、2007；Hoffmeisterら、2005；Inuiら、上記文献、1984；Winkler、2003；Tani、2000；Reiser、1997；Ishige、2000を参照のこと）。HPLC、ガスクロマトグラフィー - 質量分析（GCMS）または液体クロマトグラフィー - 質量分析（LCMS）を用いて、遺伝子工学で作り変えられた*E. coli*株のオクタノールなどの第一級アルコールを生産する能力を確認する。

【0222】

機能的マロニル - CoA非依存性FASおよびアシル還元経路を有するように遺伝子工学で作り変えられた微生物株をその経路の効率的利用についての最適化によってさらに増加させる。簡単に言うと、その遺伝子工学で作り変えられた株を評価して、任意の外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうかを判定する。例えば追加の遺伝子コピー数の導入によってその経路を通るフラックスを制限することができる、低いレベルで発現される任意の酵素について発現が増加する。

【0223】

より良好な生産体を産生させるために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。その経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックダウンを設計するためにもモデリングを用いる（例えば、米国特許公開US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654およびUS 2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照のこと）。モデリン

グ分析は、第一級アルコールのより効率的な生産のほうに代謝をシフトさせる細胞増殖に対する効果の信頼できる予測を可能にする。1つのモデリング方法が二層最適化アプローチ、OptKnock (Burgardら、Biotechnol. Bioengineer. 84: 647-657 (2003))であり、これは、第一級アルコールのより良好な生産を共同で生じさせる結果となる遺伝子ノックアウトを選択するために利用される。例えばアセチル-CoA中間体または第一級アルコール産物のより良好な生産体を生産させるために、適応進化も用いることができる。適応進化を行って、増殖特性と生産特性の両方を向上させる (FongおよびPalsson, Nat. Genet. 36: 1056-1058 (2004); Alperら、Science 314: 1565-1568 (2006))。結果に基づいて、モデリング、遺伝子工学および適応進化の後続のラウンドをその第一級アルコール生産体に適用して、それらの生産をさらに増加させることができる。

10

【0224】

第一級アルコールの大規模生産については、上記マロニル-CoA非依存性FAS経路含有生物を、嫌気性条件下で、その生物の増殖を抑制することが当該技術分野において公知の培地を使用して、発酵槽で培養する。発酵は、回分、流加回分または連続様式のいずれかで行う。その培地に先ず窒素を散布し、その後、培養容器を密封することによって、嫌気性条件を維持する (例えば、フラスコをセブタムおよびクランプキャップで密封することができる)。制限通気用の小さな穴を設けることによって、微嫌気性条件も用いることができる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸の添加によってpH7で維持する。分光光度計 (600nm) を使用して光学密度を仮定することによって増殖速度を決定し、継続的に炭素源枯渇をモニターすることによってグルコース取り込み速度を決定する。望ましくないアルコール、有機酸および残留グルコースなどの副産物は、グルコースおよびアルコールについては屈折率検出器を使用して、ならびに有機酸についてはUV検出器を使用して、HPLC-087カラム (BioRad) を用いるHPLC (株式会社島津製作所 (Shimadzu)) によって定量することができる、Lineら、Biotechnol. Bioeng., 775-779 (2005)。

20

【0225】

産物第一級アルコールの単離は、それらの水への不溶性に基づいて行う。詳細には、二相発酵プロセスをこれらの産物アルコールの分離に用い、この場合、それらが別個の相を形成することができる、または発酵プロセスから有機相中にそれらを容易に抽出することができる。残留細胞および任意の他の不溶性不純物を濾過により除去し、それによって連続または半連続発酵プロセスが可能となる。

30

【0226】

実施例II

LCAの増殖連動生産を有する微生物

この実施例は、LCAの増殖連動生産のために設計した株のインシリコでの構築を説明するものである。

【0227】

E. coli K-12 MG1655は、破壊を導入する野生型株として役立つ。この破壊は、DatsenkoおよびWannerのRedリコンビナーゼシステムによる相同組み換えを用いてインフレーム欠失を組み込むことにより構成する。(Datsenko, K. A. and B. L. Wanner, Proc Natl Acad Sci USA., 97(12): 6640-5 (2000))。このアプローチは、染色体配列 (すなわち、除去のターゲットにされた遺伝子) を選択可能な抗生物質耐性遺伝子 (それ自体、後に除去される) で置換することを含む。ノックアウトを1つ1つ受容株に組み込む。それぞれの欠失後に抗生物質耐性遺伝子は残存せず、その結果、それぞれのターゲット株における多重突然変異の蓄積が可能となる。この欠失技術は、除去のターゲットにされた遺伝子を完全に除去して、構築された突然変異体が野生型に復帰変異する可能性を実質的に低下させる。

40

50

【0228】

下でさらに説明するように、LCAの生合成を達成するための1つの例示的増殖条件は、嫌気性培養または発酵条件を含む。一定の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物を嫌気性または実質的に嫌気性の条件下で維持、培養または発酵させることができる。簡単に言うと、嫌気性条件は、酸素が全く無い環境を指す。実質的に嫌気性の条件は、例えば、培地中の溶解酸素濃度が飽和の0%と10%の間であり続けるような培養、回分発酵または連続発酵を含む。実質的に嫌気性の条件は、酸素1%未満の雰囲気中で維持される密封チャンバ内の液体培地中または寒天上での細胞の増殖または休止も含む。この酸素のパーセントは、例えば、 N_2 / CO_2 混合物または他の適する非酸素ガス（単数もしくは複数）を培養物に散布することによって、維持することができる。

10

【0229】

遺伝子工学で作り変えられた株を、その増殖速度、基質取り込み速度および産物/副産物分泌速度を測定することによって特性づけする。培養物を一晚増殖させ、新しい回分培養のための接種材料として使用し、指数増殖中にそれらについての測定を行う。増殖速度は、分光光度計(A600)を使用して光学密度を測定することによって決定する。培養上清中のグルコース、アルコールおよび他の有機酸副産物の濃度は、HPX-87Hカラム(BioRad)を使用するHPLCによって決定し、それを用いて取り込みおよび分泌速度を計算する。すべての実験は、三重反復培養で行う。

【0230】

組み換え株は、それらの代謝ネットワークがそれらの失われた機能に順応するまで最適化増殖速度を示し得る。この順応を可能にするために、それらの株を適応進化させる。それらの株を適応進化に付すことにより、細胞増殖速度が主選択圧となり、突然変異細胞は、それらの増殖速度を向上させるために、それらの代謝フラックスに再び割り当てられることを余儀なくされる。この代謝再プログラミングは、インシリコモデルによりアプリアリに予測された増殖速度に達することが、様々な基質で適応進化させた幾つかの*E. coli* 突然変異体について最近実証されている(Fong, S. S. and B. O. Palsson, Nat Genet, 36(10): 1056-8(2004))。これらの教示は、*Escherichia coli* に適用することができる。

20

【0231】

OptKnock予測は、うまくいくと証明されており；適応進化によってもたらされる増殖増進を、増速されたLCA生産速度によって果たすこととなる。他のものより優れた生産品質を有する1つの株をとすれば生じさせる結果となり得る*E. coli* において以前に目撃された進化パターンの相違(Fong, S. S. and B. O. Palsson, Nat Genet, 36(10): 1056-8(2004); Fong, S. S., J. Y. Marciniak, and B. O. Palsson, J Bacteriol, 185(21): 6400-8(2003); Ibarra, R. U., J. S. Edwards, and B. O. Palsson, Nature, 420(6912): 186-189(2002))のため、OptKnock生成株を（並行して実行する）三重反復で適応進化させる。達成される増殖速度向上に依存して、2~6週間、進化を実行する。一般に、安定な表現型が得られたら進化を停止させる。

30

40

【0232】

適応進化は、定常期に達する前に新しい培地への回分培養の連続継代によって細胞を長期指数増殖状態で維持することを含む。簡単に言うと、1つの手順は、希釈して新しい培地（すなわち、2g/L炭素源を有するM9最小培地）に継代する前に細胞を中央指数増殖(mid-exponential growth)($A_{600} = 0.5$)に到達させる。それぞれの培養について約500世代を見込んでこのプロセスを繰り返す。進化の過程を通して毎日、培養サンプルを採取し、液体窒素で凍結させ、光学培養密度を記録する。他のものより優れた生産品質を有する1つの株をとすれば生じさせる結果となり得る以前に目撃された進化パターンの相違、Donnellyら、Appl Biochem Biotechnol 70-72: 187-98(1998); Vemuriら、A

50

pp1 Environ Microbiol 68:1715-27(2002)、のため、三重反復で進化を行う。適応進化段階は、約二か月以上まで要する場合がある。適応進化段階は、例えば、株設計に依存して二か月未満である場合もある。

【0233】

もう1つのプロセスは、自動化技術を用いて細胞を進化させることができ、サービス契約のもとでEvolugate, LLC(フロリダ州、ゲインズビル)によって市販されている。この手順は、自動進化技術を用いて有意な時間および労作の節約を生じさせるEvoluator(商標)進化マシンを利用する。定常期に達する前に新しい培地への回分培養の連続継代によって長期指数増殖状態で細胞を維持する。光学密度測定および液体処理を自動化することにより、Evoluator(商標)は、大きな培養容積を用いて高速で連続移送を行うことができ、従って、細胞適応度の進化についてはケモスタットの効率にほぼ等しい。例えば、翻訳機構の成分を欠失し、重度に増殖阻害されたAcinetobacter種ADP1の突然変異体を200世代で野生型増殖速度の80%に進化させた。しかし、単一容器内に細胞を維持するケモスタットとは対照的に、この機械は、ひと巻の管の細分された領域内の1つの「リアクター」から次への移動によって動作し、このようにして壁での増殖の一切の選択を無くす。移送容積は調節可能であり、通常は約50%に設定される。

10

【0234】

単一容器内に細胞を維持するケモスタットとは対照的に、この機械は、ひと巻の管の細分された領域内の1つの「リアクター」から次への移動によって動作し、このようにして壁での増殖の一切の選択を無くす。進化の過程を通して毎日、培養サンプルを採取し、液体窒素で凍結させ、光学培養密度を記録する。安定な増殖速度が達成されるまでそれぞれの株にEvoluatorを使用する。この装置を使用して、2週間でほぼ50%の増殖速度向上が観察された。上で説明した株を(並行して実行する)三重反復で適応進化させる。10日間隔で、Evoluatorから培養サンプルを取り、寒天プレートで精製し、上で論じたように三重反復で培養して株の生理機能を評価する。Evoluator(商標)は、従来の進化技術に勝る有意な時間および労作の節約を示す連続培養装置である。(de Crecyら、Appl Microbiol Biotechnol 77:489-496(2007))。

20

【0235】

適応進化プロセス後、それらの新たな株を、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を測定することによって再び特性づけする。これらの結果とOptKnock予測とを、生産エンベロップと共に実際の増殖および生産収量をプロットすることによって比較する。最も成功したOptKnock設計/進化の組み合わせをさらに追跡するために選択し、実験室規模の回分および連続発酵で特性づけする。このOptKnockアプローチの背後の増殖連動生化学生産概念は、結果として、遺伝的に安定した過剰生産体も生じさせる。それ故、それらの培養物を一か月間連続モードで維持して、長期安定性を評価する。この実験を通して収量および生産性が維持されることを保証するために定期的サンプルを採取することとなる。

30

【0236】

実施例III

LCAの増殖連動生産を有する微生物

この実施例は、LCAの増殖連動生産のために設計した株のインシリコでの構築を説明するものである。

40

【0237】

耐性マーカー(例えば、URA3)の除去および再循環を可能にするloxP部位が隣接するKanMXカセットが割り込んでいる遺伝子の相同組み換えによって、S.cerevisiaeに遺伝子欠失を導入する(Wach, A.ら、PCR-based gene targeting in Saccharomyces cerevisiae, in Yeast Gene Analysis, M.F. Tuite, Editor

50

．1998，Academic Press：San Diego）。プラスミド上のlox-P-kanMX-loxP配列で出発して、上記カセットに相同な領域が続く45～50bpターゲット配列を両方とも含有するプライマーを使用して、PCRにより、対象となる遺伝子のフラグメントが隣接するこの配列を有する人工構築物を作る。この線形DNAを野生型*S. cerevisiae*に形質転換し、グネチシン耐性によって組み換え体を選択する（Wach，A.ら、上記文献）。コロニーを精製し、PCRによる正しい二重交差について検査する。KanMXマーカールを除去するために、Creリコンビナーゼおよびブレオマイシン耐性を有するプラスミドを導入して、loxP部位間の組み換えを促進する（Guedener，U.ら、Nucleic Acids Res. 23（2002））。最後に、抗生物質が一切存在しない培地での逐次培養によって、結果として得られた株のCreプラスミドを回復する。最終株は、無マーカール遺伝子欠失を有し、従って、同じ方法を用いて同じ株に多数の欠失を導入することができる。

10

【0238】

本明細書に開示する方法によって株を構築し、進化させ、試験する。例えば、幾つかの方法を用いて、遺伝子を*S. cerevisiae*に挿入する。これらの方法は、プラスミドに基づくものであり得るが、他のものは、染色体における遺伝子の組み込みを可能にするものである。後者のアプローチは、組み込みプロモーターに基づく発現ベクター、例えば、GAPプロモーターに基づくpGAPZまたはpGAPZ₊を利用する。前記発現ベクターは、耐性マーカールの除去および再循環を可能にするloxP部位が隣接するKanMXカセットに加えて、GAPプロモーター、組み込みのためのHIS4野生型対立遺伝子および*P. pastoris*の3'AOX転写末端領域を構成する。これらのベクターは、Invitrogen（カリフォルニア州、カールズバッド）から市販されている。

20

【0239】

前記方法は、適するプライマーでの対象となる遺伝子の合成および増幅、その後、EcoRI/XhoI酵素によって作られるもの（Vellankiら、Biotechnol. Lett. 29：313-318（2007））などの固有の制限部位でのその遺伝子の消化を必然的に伴う。その遺伝子を、GAPプロモーターの下流の発現ベクター内のEcoRIおよびXhoI部位に挿入する。この遺伝子挿入をPCRおよび/またはDNA配列分析によって検証する。その後、その組み換えプラスミドをヒスチジン組み込みのためにNarIで線形化し、精製し、適切な形質転換方法を用いて*S. cerevisiae*の染色体DNAに組み込む。それらの細胞を適切な選択マーカール（例えば、カナマイシン）と共にYPD培地にプレーティングし、2～3日間インキュベートする。その後、それらの形質転換体をコロニーPCYによる必要遺伝子挿入について分析することとなる。

30

【0240】

その抗生物質マーカールを除去するために、Creリコンビナーゼを含有するプラスミドを導入し、loxP部位間での組み換えを促進する（Guedenerら、上記文献）。最後に、抗生物質が一切存在しない培地での逐次培養によって、結果として得られた株のCreプラスミドを回復する。最終株は、無マーカール遺伝子欠失を有し、従って、同じ方法を用いて同じ株に多数の欠失を導入することができる。

40

【0241】

遺伝子工学で作り変えた株を、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を測定することによって特性づけする。培養物を一晩増殖させ、新しい回分培養物のための接種材料として使用し、指数増殖期中にそれらについての測定を行う。増殖速度は、分光光度計（A600）を使用して光学密度を測定することによって決定する。HPLC-87Hカラム（BioRad）を使用するHPLCまたはGC-MSを含む分析法によって、培養上清中のグルコース、アルコールおよび他の有機酸副産物の濃度を決定し、それを用いて取り込みおよび分泌速度を計算する。すべての実験は、三重反復培養で行う。

【0242】

ノックアウト株は、それらの代謝ネットワークがそれらの失われた機能に順応するまで

50

、最初は最適下増殖速度を示すと予想される。この順応を可能にするために、それらの株を適応進化させることとなる。それらの株を適応進化に付すことにより、細胞増殖速度が主選択圧となり、突然変異細胞は、それらの増殖速度を向上させるために、それらの代謝フラックスに再び割り当てられることを余儀なくされる。この代謝再プログラミングは、インシリコモデルによりアブリアリに予測された増殖速度に達することが、様々な基質で適応進化させた幾つかの *E. coli* 突然変異体について最近実証されている。適応進化によってもたらされる前記増殖増進を、LCA生産の増速によって果たすことができる。他のものより優れた生産品質を有する1つの株をとすれば生じさせる結果となり得る *E. coli* において以前に目撃された進化パターンの相違のため、OptKnock生成株を（並行して実行する）三重反復で適応進化させる。達成される増殖速度向上に依存して、2～6週間またはそれ以上の間、進化を実行することができる。一般に、安定な表現型が得られたら進化を停止させることができる。

10

【0243】

適応進化手順は、定常期に達する前に新しい培地への回分培養の連続継代によって細胞を長期指数増殖状態で維持することを含む。簡単に言うと、1つの手順は、希釈して新しい培地（すなわち、2 g / L炭素源を有するM9最小培地）に継代する前に細胞を中央指数増殖（ $A_{600} = 0.5$ ）に到達させる。それぞれの培養について約500世代を見込んでこのプロセスを繰り返す。進化の過程を通して毎日、培養サンプルを採取し、液体窒素で凍結させ、光学培養密度を記録する。他のものより優れた生産品質を有する1つの株をとすれば生じさせる結果となり得る以前に目撃された進化パターンの相違、Donnellyら、Appl Biochem Biotechnol 70-72:187-98 (1998); Vemuriら、Appl Environ Microbiol 68:1715-27 (2002) のため、三重反復で進化を行う。適応進化段階は、約二か月以上まで要する場合がある。適応進化段階は、例えば、株設計に依存して二か月未満である場合もある。

20

【0244】

もう1つのプロセスは、自動化技術を用いて細胞を進化させることができ、サービス契約のもとでEvolugate, LLC（フロリダ州、ゲインズビル）によって市販されている。この手順は、自動進化技術を用いて有意な時間および労作の節約を生じさせるEvoluator（商標）進化マシンを利用する。定常期に達する前に新しい培地への回分培養の連続継代によって長期指数増殖状態で細胞を維持する。光学密度測定および液体処理を自動化することにより、Evoluatorは、大きな培養容積を用いて高速で連続移送を行うことができ、従って、細胞適応度²⁵の進化についてはケモスタットの効率にほぼ等しい。単一容器内に細胞を維持するケモスタットとは対照的に、この機械は、ひと巻の管の細分された領域内の1つの「リアクター」から次への移動によって動作し、このようにして壁での増殖の一切の選択を無くす。進化の過程を通して毎日、培養サンプルを採取し、液体窒素で凍結させ、光学培養密度を記録する。安定な増殖速度が達成されるまでそれぞれの株にEvoluatorを使用する。この装置を使用して、2週間でほぼ50%の増殖速度向上が観察された。上で説明した株を（並行して実行する）三重反復で適応進化させる。10日間隔で、Evoluatorから培養サンプルを取り、寒天プレートで精製し、上で論じたように三重反復で培養して株の生理機能を評価する。

30

40

【0245】

適応進化プロセス後、それらの新たな株を、増殖速度、基質取り込み速度、および産物/副産物分泌速度を測定することによって再び特性づけする。これらの結果とOptKnock予測とを、生産エンベロップと共に実際の増殖および生産収量をプロットすることによって比較する。最も成功したOptKnock設計/進化の組み合わせをさらに追跡するために選択し、実験室規模の回分および連続発酵で特性づけする。このOptKnockアプローチの背後の増殖連動生化学生産概念は、結果として、遺伝的に安定した過剰生産体も生じさせるはずである。それ故、それらの培養物を一か月間連続モードで維持し

50

て、長期安定性を評価することができる。この実験を通して収量および生産性が維持されることを保証するために定期的サンプルを採取することとなる。

【0246】

有用な遺伝子破壊ターゲットを生成するためのOptKnock方法論の応用を本明細書において上で説明した。LCA生産と*Escherichia coli*増殖との連動を確立するための多数の破壊戦略を列挙した。この方法論は、多種多様な細胞、および*Escherichia coli*以外の微生物に適用することができ、ならびにOptKnock以外の代謝モデリングおよびシミュレーションシステムにも利用することができる。

【0247】

本明細書に記載するコンピュータ計算と工学を併用するプラットフォームは、任意の化学量論的モデル生物に一般に適用することができ、ならびに本明細書に提供する教示およびガイダンスによって、当業者は、任意の生化学物質の増殖連動生産をもたらす代謝変化のための遺伝子修飾のセットを設計および実行することができるであろう。

【0248】

本出願を通して、様々な出版物を括弧内に参考文献として載せた。本発明が属する技術の状態をより十分に説明するために、これらの出版物の開示は、それら全体が、参照により本出願に援用されている。

【0249】

本開示は、嫌気性条件下での*Escherichia coli*におけるLCAの増殖連動生産のための遺伝子破壊戦略を提供する。提案する戦略は、これらの産物のそれぞれについて報告されている収量より産物収量を有意に増加させることができる。LCA生産についての戦略の包括的リストを表1に列挙する。反応破壊のそれぞれについての関連遺伝子および化学量論を表2に載せる。表3は、代謝産物の略語およびそれらの対応する名称と共にそれらの一を列挙するものである。

【0250】

10

20

【表 1 - 2】

表1: 増殖連動LCA生産をもたらす可能性が最も高いOptKnockによって
特定されたすべての破壊戦略のリスト

1	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGDHY	PYK	DHAPT	
2	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGL	PYK	DHAPT	
3	ADHEr	LDH_D	ASPT	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK	DHAPT	
4	ADHEr	LDH_D	ASPT	EDA	MDH	PFLi	PYK	DHAPT	
5	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGDH	PGI	PTAr		
6	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGDH	PGI		
7	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TAL		10
8	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TKT1		
9	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TKT1		
10	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TAL		
11	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	PTAr			
12	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TPI			
13	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TPI			
14	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	PTAr			
15	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLCpts	GLUDy			
16	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PFK			
17	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	RPE		
18	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	RPE		
19	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TKT2		20
20	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TKT2		
21	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH	PGI			
22	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PGI	PTAr			
23	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TKT1			
24	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TAL			
25	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TAL			
26	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TKT1			
27	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PFK				
28	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TPI				
29	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLCpts				
30	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	PTAr				
31	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	PTAr				30
32	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TPI				
33	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	RPE			
34	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	RPE			
35	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI		
36	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TKT2			
37	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TKT2			
38	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi	TPI		
39	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi		
40	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFK	PFLi		
41	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PGI		
42	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PGI		
43	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PFK		40
44	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	NADH6		
45	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	TPI		
46	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	TPI		
47	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH	NADH6		
48	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PFK		
49	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI		

【 0 2 5 1 】

【表 1 - 3】

50	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	PGI	
51	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	PGI	SUCD4		
52	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	PGI		
53	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	PGI		
54	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI	
55	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI	PTAr	
56	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFK	PFLi	
57	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	
58	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFK	PFLi	
59	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	TPI	10
60	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	
61	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	TPI	
62	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	TPI		
63	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	TPI		
64	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLCpts	PFLi		
65	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	NADH6	PFLi		
66	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	PFLi	SUCD4		
67	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFK	PFLi		
68	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4	TPI		
69	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	PFLi	SUCD4		
70	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFK	PFLi		
71	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi	PGI	20
72	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi	PGI	
73	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PGI	PPS	
74	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PGI	PPS	
75	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TAL	
76	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TAL	
77	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TKT1	
78	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TKT1	
79	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	TPI		
80	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PFK		
81	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PTAr	TPI		
82	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFK	PTAr		
83	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLUDy	HEX1		30
84	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	PTAr		
85	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi	TPI	
86	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	GLCpts	MDH	PFLi	
87	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFK	PFLi	
88	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFK	PFLi	
89	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi	TPI	
90	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	GLCpts	PFLi	
91	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	RPE	
92	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	RPE	
93	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGI	
94	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGI	
95	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH	PPS	40
96	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PFK	PPS	
97	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PFK	PPS	
98	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PPS	TPI	
99	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PPS	TPI	
100	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	PPS	
101	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TKT2	

【 0 2 5 2 】

【表 1 - 4】

102	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TKT2	
103	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	
104	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFK	
105	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH	
106	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	TPI	
107	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFK	
108	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	TPI	
109	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH	PGI		
110	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PGI	PTAr		
111	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TAL		10
112	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TKT1		
113	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TKT1		
114	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TAL		
115	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TPI			
116	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PTAr			
117	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PTAr			
118	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLUDy			
119	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PFK			
120	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TPI			
121	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	RPE		
122	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	RPE		
123	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TKT2		20
124	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TKT2		
125	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGDH	PGI	PTAr		
126	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGDH	PGI		
127	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PGI	
128	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	PGI	
129	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TAL		
130	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TKT1		
131	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TKT1		
132	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TAL		
133	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	SUCD4	
134	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	
135	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	PGI	30
136	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	HEX1			
137	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	PTAr			
138	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	PTAr			
139	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PFK			
140	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	TPI			
141	ADHEr	LDH_D	HEX1	PTAr	TPI			
142	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	RPE		
143	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	RPE		
144	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FBA	FUM	
145	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FBA	MDH	
146	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	TPI	
147	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PFK	40
148	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	TPI	
149	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	PFK	
150	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	
151	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PFK	PFLi	
152	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	PFLi	SUCD4	
153	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PFK	PFLi	

【 0 2 5 3 】

【表 1 - 5】

154	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFK	PFLi	SUCD4	
155	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	TPI	
156	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	
157	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFLi	SUCD4	TPI	
158	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	TPI	
159	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi	PGI	
160	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	
161	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TKT2		
162	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TKT2		
163	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	PFK	10
164	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	HEX1	MDH	
165	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	TPI	
166	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	HEX1	
167	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	PFK	
168	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	TPI	
169	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	
170	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	TPI	
171	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi	TPI	
172	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFK	PFLi	
173	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi	
174	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFK	PFLi	
175	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	PGI	20
176	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	PGI	
177	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PGI		
178	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PGI		
179	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PGI	
180	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PGI	
181	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI	
182	ADHEr	LDH_D	PGDH	PGI	PTAr			
183	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH	PGI			
184	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	
185	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	TPI		
186	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	TPI		
187	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PFK		30
188	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM		
189	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH		
190	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PFK		
191	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TKT1			
192	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TAL			
193	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TKT1			
194	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TAL			
195	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH	NADH6	
196	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PFK	
197	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	TPI	
198	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	TPI	
199	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PFK	40
200	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	NADH6	
201	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TAL	
202	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TKT1	
203	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PFK		
204	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	TPI		
205	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	HEX1		

【 0 2 5 4 】

【表 1 - 6】

206	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	PYK	SUCD4	
207	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PYK	SUCD4	
208	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PTAr	PYK	
209	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	GLUDy	PYK	
210	ADHEr	LDH_D	FDH2	GLUDy	NADH6	PTAr	PYK
211	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	GLUDy	NADH6	PYK
212	ADHEr	LDH_D	PFK	PTAr			
213	ADHEr	LDH_D	ACKr	TPI			
214	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA			
215	ADHEr	LDH_D	PTAr	TPI			10
216	ADHEr	LDH_D	FBA	PTAr			
217	ADHEr	LDH_D	ACKr	PFK			
218	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	PGI	
219	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	PRO1z	SUCD4
220	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	RPE		
221	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	RPE		
222	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TKT2		
223	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TKT2		
224	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	RPE
225	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	TPI	
226	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFK	PFLi	
227	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLUDy	PFLi	20
228	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PFLi	PRO1z	SUCD4
229	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PRO1z	SUCD4	TPI
230	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PFLi	PRO1z	SUCD4
231	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PGI	SUCD4
232	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	PGI
233	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	PGI
234	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PGI	SUCD4
235	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	PGI
236	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	PGI
237	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TKT2
238	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFK	PFLi	SUCD4
239	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFK	PFLi
240	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4	TPI
241	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFK	PFLi
242	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4
243	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4	TPI
244	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFK	PFLi	SUCD4
245	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi
246	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4
247	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi
248	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	TPI
249	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	TPI
250	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PYK
251	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PYK
252	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI	PTAr
253	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI
254	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	GLUDy	MDH	PFLi
255	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFK	PFLi
256	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	GLUDy	PFLi
257	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	TPI

【 0 2 5 5 】

【表 1 - 7】

258	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	TPI	
259	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFK	PFLi	
260	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	PTAr	PYK	SUCD4	
261	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PTAr	PYK	
262	ADHEr	LDH_D	ACKr	ME2	PGL	PYK	SUCD4	
263	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	ME2	PGL	PYK	
264	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGL	PTAr	PYK	
265	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PTAr	PYK	SUCD4	
266	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	G6PDHy	ME2	PYK	
267	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	ME2	PYK	SUCD4	10
268	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PTAr	PYK	SUCD4	
269	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	MDH	NADH6	PYK	
270	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PTAr	PYK	
271	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGL	PTAr	PYK	
272	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	MDH	PYK	SUCD4	
273	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	PGL	PYK	SUCD4	
274	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGL	PTAr	PYK	
275	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	NADH6	PGL	PYK	
276	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	G6PDHy	MDH	PYK	
277	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	PTAr	PYK	SUCD4	
278	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	MDH	PGL	PYK	
279	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PTAr	PYK	20
280	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGI		
281	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PTAr	PYK		
282	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	MDH	PYK		
283	ADHEr	LDH_D	ACKr	FUM	GLUDy	PYK		
284	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PTAr	PYK		
285	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGDH	PGI		
286	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TPI		
287	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PFK		
288	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	NADH6		
289	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFLi	PGI			
290	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PYK	
291	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PYK	30
292	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TKT1		
293	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TAL		
294	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PFK			
295	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	HEX1			
296	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	TPI			
297	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFLi	TPI			
298	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	PFLi			
299	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	PFLi			
300	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	RPE		
301	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	NADH6	PGI	PYK	
302	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PGI	PTAr	PYK	
303	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TKT2		40
304	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	PYK			
305	ADHEr	LDH_D	ACKr	PYK	SUCD4			
306	ADHEr	LDH_D	FRD2	PTAr	PYK			
307	ADHEr	LDH_D	PTAr	PYK	SUCD4			
308	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	NADH6	PYK		
309	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PTAr	PYK		

【 0 2 5 6 】

【表 1 - 8】

310	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGI			
311	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PFLi	PGI		
312	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	PGI	PTAr		
313	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	PYK		
314	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGDH	PGI	
315	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGDH	PGI	
316	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PGI		
317	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PGI		
318	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	NADH6			
319	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFK			10
320	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TPI			
321	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy		
322	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFK		
323	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH		
324	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	TPI		
325	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	TPI		
326	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFK		
327	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PFLi	PYK	
328	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PFLi	PGL	PYK	
329	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	ME2	PFLi	PYK	
330	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PFLi	PGDHY	PYK	
331	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFK	PFLi		20
332	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	PFLi		
333	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	TPI		
334	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	PFLi		
335	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	TPI		
336	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFK	PFLi		
337	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	SUCD4			
338	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	PGI			
339	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	PGI			
340	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFLi	PGL	PYK	
341	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK	
342	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFLi	PGDHY	PYK	
343	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	MDH	PFLi	PYK	30
344	ADHEr	LDH_D	ACKr	ASPT	MDH	PYK		
345	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PTAr	PYK		
346	ADHEr	LDH_D	ACKr	ASPT	FUM	PYK		
347	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PTAr	PYK		
348	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGI		
349	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGI		
350	ADHEr	LDH_D	FBA	PFLi	SUCD4			
351	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFK	PFLi			
352	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4	TPI			
353	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	PFLi			
354	ADHEr	LDH_D	PFK	PFLi	SUCD4			40
355	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	TPI			
356	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	TPI			
357	ADHEr	LDH_D	FBA	NADH6	PFLi			
358	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFK	PFLi			
359	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGI		
360	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	PGI		
361	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	PYK	

【 0 2 5 7 】

【表 1 - 9】

362	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	PYK	
363	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PYK	
364	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	TPI		
365	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	TPI		
366	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	MDH	PFLi		
367	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	PFLi		
368	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFK	PFLi		
369	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFK	PFLi		
370	ADHEr	LDH_D	ACKr	NADH6	PGI	PYK		
371	ADHEr	LDH_D	NADH6	PGI	PTAr	PYK		10
372	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PYK		
373	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MALS	MDH	PYK	
374	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	ICL	MDH	PYK	
375	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGDH	PGI		
376	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	PGI		
377	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PFLi			
378	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	TPI			
379	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PFLi			
380	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	TAL		
381	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	TKT1		
382	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4	
383	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	PYK	20
384	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PYK	SUCD4	
385	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PYK	SUCD4	
386	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	PYK	
387	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI			
388	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PFLi	PYK	SUCD4	
389	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	PGDHY	PYK	SUCD4	
390	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	PGL	PYK	SUCD4	
391	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK	SUCD4	
392	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PYK	
393	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PYK	
394	ADHEr	LDH_D	ACKr	AKGD	ATPS4r	GLUDy	PYK	
395	ADHEr	LDH_D	AKGD	ATPS4r	GLUDy	PTAr	PYK	30
396	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	PYK			
397	ADHEr	LDH_D	ALAR	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4	
398	ADHEr	LDH_D	DAAD	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4	
399	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGDH	PGI			
400	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	PGI			
401	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFLi	PYK	
402	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFLi	PYK	
403	ADHEr	LDH_D	PFLi	TPI				
404	ADHEr	LDH_D	FBA	PFLi				
405	ADHEr	LDH_D	PFK	PFLi				
406	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	PYK		40
407	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PYK		
408	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	TKT1			
409	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	TAL			
410	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	
411	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	
412	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PFLi	PYK	SUCD4	
413	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PFLi	PYK	SUCD4	

【 0 2 5 8 】

【表 1 - 10】

414	ADHEr	LDH_D	ME2	PFLi	PGDHY	PYK	SUCD4	
415	ADHEr	LDH_D	ME2	PFLi	PGL	PYK	SUCD4	
416	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	PGDHY	PYK	
417	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PFLi	PYK	
418	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	NADH6	PFLi	PYK	
419	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	PGL	PYK	
420	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	NADH6	
421	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	NADH6	
422	ADIIEr	LDH_D	CBMK2	PFLi	PGI	RPE		
423	ADHEr	LDH_D	ASNS2	GLU5K	PFLi	PGI	RPE	10
424	ADHEr	LDH_D	ASNS2	G5SD	PFLi	PGI	RPE	
425	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PTAr	
426	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PTAr	
427	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI				
428	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy		
429	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH		
430	ADHEr	LDH_D	ACKr	AKGD	ATPS4r	PYK		
431	ADHEr	LDH_D	AKGD	ATPS4r	PTAr	PYK		
432	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6		
433	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6		
434	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	GLUDy	PTAr		
435	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGL		20
436	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGDH	PTAr		
437	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGL	PTAr		
438	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts	GLUDy		
439	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGDH		
440	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TKT1		
441	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TAL		
442	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TKT1		
443	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TAL		
444	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	RPE		
445	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	RPE		
446	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TKT2		
447	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TKT2		30
448	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PTAr	THD2		
449	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	PTAr	THD2		
450	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts	THD2		
451	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGL	THD2		
452	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH	THD2		
453	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGL	PTAr	THD2		
454	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	THD2	TKT1		
455	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TAL	THD2		
456	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TAL	THD2		
457	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	THD2	TKT1		
458	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH			40
459	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM			
460	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	RPE	THD2		
461	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	RPE	THD2		
462	ADHEr	LDH_D	ACKr	ATPS4r	PYK	SUCOAS		
463	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PTAr	PYK	SUCOAS		
464	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi		
465	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	THD2	TKT2		

【 0 2 5 9 】

【表 1 - 1 1】

466	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	THD2	TKT2	
467	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	THD2	
468	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH	THD2	
469	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGL	PTAr	THD2	
470	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLUDy	PTAr	THD2	
471	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PTAr	THD2	
472	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGL	THD2	
473	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLUDy	THD2	
474	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	THD2	
475	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	THD2	TKT1	10
476	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TAL	THD2	
477	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TAL	THD2	
478	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	THD2	TKT1	
479	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH		
480	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGL		
481	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PTAr		
482	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGL	PTAr		
483	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts		
484	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	PTAr		
485	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	RPE	THD2	
486	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	RPE	THD2	
487	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr		20
488	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy		
489	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TKT1		
490	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TAL		
491	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TAL		
492	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TKT1		
493	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	PTAr	PYK	
494	ADHEr	LDH_D	ACKr	NADH6	PFLi	PYK	
495	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	THD2	TKT2	
496	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	THD2	TKT2	
497	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	RPE		
498	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	RPE		
499	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TKT2		30
500	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TKT2		
501	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH		
502	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGL	PTAr		
503	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGL		
504	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLUDy		
505	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PTAr		
506	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLUDy	PTAr		
507	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TKT1		
508	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TKT1		
509	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TAL		
510	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TAL		
511	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	RPE		40
512	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	RPE		
513	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TKT2		
514	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TKT2		
515	ADHEr	LDH_D	PGDH	PTAr	THD2		
516	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH	THD2		
517	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	PTAr	THD2		

【 0 2 6 0 】

【表 1 - 1 2】

518	ADHEr	LDH_D	PGL	PTAr	THD2		
519	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGL	THD2		
520	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	THD2		
521	ADHEr	LDH_D	PTAr	TAL	THD2		
522	ADHEr	LDH_D	ACKr	THD2	TKT1		
523	ADHEr	LDH_D	ACKr	TAL	THD2		
524	ADHEr	LDH_D	PTAr	THD2	TKT1		
525	ADHEr	LDH_D	PTAr	RPE	THD2		
526	ADHEr	LDH_D	ACKr	RPE	THD2		
527	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi		10
528	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PRO1z	SUCD4	
529	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi		
530	ADHEr	LDH_D	PTAr	THD2	TKT2		
531	ADHEr	LDH_D	ACKr	THD2	TKT2		
532	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts			
533	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr			
534	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	THD2		
535	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy		
536	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH		
537	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi	SUCD4	
538	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi	SUCD4	
539	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4	20
540	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4	
541	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	
542	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	
543	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	SUCD4	THD2	
544	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	SUCD4	THD2	
545	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi	
546	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi	
547	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	
548	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	
549	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4	THD2	
550	ADHEr	LDH_D	PGDH	PTAr			
551	ADHEr	LDH_D	PGL	PTAr			30
552	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGL			
553	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	PTAr			
554	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy			
555	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH			
556	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	THD2	
557	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	THD2	
558	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy			
559	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr			
560	ADHEr	LDH_D	PTAr	TAL			
561	ADHEr	LDH_D	ACKr	TAL			
562	ADHEr	LDH_D	ACKr	TKT1			
563	ADHEr	LDH_D	PTAr	TKT1			40
564	ADHEr	LDH_D	ACKr	RPE			
565	ADHEr	LDH_D	PTAr	RPE			
566	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFLi	SUCD4	
567	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	
568	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	
569	ADHEr	LDH_D	ACKr	TKT2			

【 0 2 6 1】

【表 1 - 1 3】

570	ADHEr	LDH_D	PTAr	TKT2				
571	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	SUCD4	THD2		
572	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	THD2		
573	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	THD2		
574	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	NADH6	PFLi		
575	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PFLi		
576	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi	THD2		
577	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi	THD2		
578	ADIIEr	LDH_D	ACKr	CBMK2	FRD2	PFLi		
579	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FRD2	PFLi	PTAr		10
580	ADHEr	LDH_D	MDH	PTAr	SUCD4			
581	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PTAr			
582	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	SUCD4			
583	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	MDH			
584	ADHEr	LDH_D	FDH2	MDH	NADH6	PTAr		
585	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	MDH	NADH6		
586	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	THD2		
587	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4			
588	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH12	NADH6	PFLi		
589	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PGL			
590	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	PGDH			
591	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PGDH			20
592	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	G6PDHy			
593	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	NADH6	PFLi		
594	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	NADH6	PFLi		
595	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi				
596	ADHEr	LDH_D	ALAR	PFLi	PRO1z	SUCD4		
597	ADHEr	LDH_D	DAAD	PFLi	PRO1z	SUCD4		
598	ADHEr	LDH_D	ACKr					
599	ADHEr	LDH_D	PTAr					
600	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	SUCD4			
601	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	SUCD4			
602	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH12	NADH6	PFLi		
603	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH12	NADH6	PFLi		30
604	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TKT1			
605	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TKT1			
606	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TAL			
607	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TAL			
608	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFLi	PYK		
609	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi			
610	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi			
611	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	RPE			
612	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	RPE			
613	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4	THD2			
614	ADHEr	LDH_D	NADH12	NADH6	PFLi	THD2		
615	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH6	PFLi	THD2		40
616	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	THD2		
617	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TKT2			
618	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TKT2			
619	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi			
620	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PFLi	THD2		
621	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	SUCD4			

【 0 2 6 2 】

【表 1 - 1 4】

622	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH12	NADH6	PFLi	
623	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi		
624	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi		
625	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	NADH6		
626	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	NADH6		
627	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	G6PDHy	GLUDy	NADH6	
628	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGDH	
629	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGL	
630	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	PFLi	THD2	
631	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PFLi	THD2	10
632	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TKT1	
633	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TAL	
634	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	THD2	
635	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi		
636	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi		
637	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PFLi		
638	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	RPE	
639	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TKT2	
640	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	THD2		
641	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	THD2		
642	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	THD2		
643	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4			20
644	ADHEr	LDH_D	NADH12	NADH6	PFLi		
645	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFLi		
646	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH6	PFLi		
647	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi		
648	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGL		
649	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGDH		
650	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	G6PDHy	NADH6		
651	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TAL		
652	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TKT1		
653	ADHEr	LDH_D	CBMK2	GLU5K	NADH6	PFLi	
654	ADHEr	LDH_D	CBMK2	G5SD	NADH6	PFLi	
655	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	NADH6	PFLi	30
656	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	THD2		
657	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi			
658	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	RPE		
659	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TKT2		
660	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FUM	G5SD	PFLi	
661	ADHEr	LDH_D	CBMK2	GLU5K	MDH	PFLi	
662	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FUM	GLU5K	PFLi	
663	ADHEr	LDH_D	CBMK2	G5SD	MDH	PFLi	
664	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	FUM	PFLi	
665	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	MDH	PFLi	
666	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi			40
667	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi			
668	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	RPE	
669	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TAL	
670	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TKT1	
671	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TKT2	
672	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi		
673	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6		

【 0 2 6 3 】

【表 1 - 15】

674	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	RPE		
675	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TAL		
676	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TKT1		
677	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TKT2		
678	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	CBMK2	PFLi		
679	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi			
680	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PGDHY	PYK	
681	ADHEr	LDH_D	ASPT	EDA	MDH	PYK	
682	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	CBMK2	NADH6		
683	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6			10
684	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	PPS	
685	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	THD2		
686	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	THD2		
687	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDH	PGDHY	THD2	
688	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PGDH	THD2	
689	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	TAL	THD2	
690	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	TAL	THD2	
691	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	THD2	TKT1	
692	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	THD2	TKT1	
693	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	RPE	THD2	
694	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	RPE	THD2	
695	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	THD2		20
696	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	THD2		
697	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PGDH	THD2	
698	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDH	PGDHY	THD2	
699	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	THD2	TKT2	
700	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	THD2	TKT2	
701	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	THD2	TKT1	
702	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	THD2	TKT1	
703	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	TAL	THD2	
704	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	TAL	THD2	
705	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	
706	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	RPE	THD2	
707	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	RPE	THD2	30
708	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	THD2	TKT2	
709	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	THD2	TKT2	
710	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI		
711	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	PGI	
712	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	PGI	SUCD4	
713	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	SUCOAS		
714	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	NADH6	PGI	
715	ADHEr	LDH_D	FUM	HEX1	NADH6	PGI	
716	ADHEr	LDH_D	FRD2	FUM	HEX1	PGI	
717	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI			
718	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	THD2			40
719	ADHEr	LDH_D	THD2				
720	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT2	TPI	
721	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	SUCOAS	TKT2	
722	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	SUCOAS	TKT2	
723	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT2	TPI	
724	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	TKT2	
725	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	TKT2	

【 0 2 6 4 】

【表 1 - 16】

726	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	SUCOAS	
727	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	
728	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	RPE	SUCOAS
729	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	SUCOAS	TPI
730	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	RPE	SUCOAS
731	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	TPI
732	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	RPE
733	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	RPE
734	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	SUCOAS	TKT2
735	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	SUCOAS	TKT2
736	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT2	TPI
737	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	SUCOAS
738	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TPI
739	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	SUCOAS
740	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	TKT2	
741	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	TKT2	
742	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT2	TPI	
743	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	SUCOAS	
744	ADHEr	LDH_D	PGDHY	PGI		
745	ADHEr	LDH_D	EDA	PGI		
746	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI		
747	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	RPE	SUCOAS
748	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	SUCOAS	TPI
749	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	RPE	SUCOAS
750	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	TPI	
751	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	RPE	
752	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	RPE	
753	ADHEr	LDH_D	PFK	SUCOAS	TKT2	
754	ADHEr	LDH_D	FBA	SUCOAS	TKT2	
755	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TKT2	TPI	
756	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TPI	
757	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	SUCOAS	
758	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	SUCOAS	
759	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	
760	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TPI	
761	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	
762	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	TKT2	
763	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	TKT2	
764	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TKT2	TPI	
765	ADHEr	LDH_D	PGI	SUCOAS		
766	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI		
767	ADHEr	LDH_D	ASPT	G6PDHy	MDH	PYK
768	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PGL	PYK
769	ADHEr	LDH_D	FBA	RPE	SUCOAS	
770	ADHEr	LDH_D	PFK	RPE	SUCOAS	
771	ADHEr	LDH_D	RPE	SUCOAS	TPI	
772	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	SUCOAS	TKT1
773	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	SUCOAS	TAL
774	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	SUCOAS	TAL
775	ADHEr	LDH_D	HEX1	SUCOAS	TKT1	TPI
776	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	SUCOAS	TKT1
777	ADHEr	LDH_D	HEX1	SUCOAS	TAL	TPI

10

20

30

40

【 0 2 6 5 】

【表 1 - 17】

778	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	TPI	
779	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	RPE	
780	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	RPE	
781	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	TKT1	TPI
782	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFK	TKT1
783	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	TKT1
784	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	TAL	TPI
785	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	TAL
786	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFK	TAL
787	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TPI	
788	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	SUCOAS	
789	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	SUCOAS	
790	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TKT2
791	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TKT2
792	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TPI		
793	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK		
794	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts		
795	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	TKT2
796	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	TKT2
797	ADHEr	LDH_D	PFK	TKT2		
798	ADHEr	LDH_D	FBA	TKT2		
799	ADHEr	LDH_D	TKT2	TPI		
800	ADHEr	LDH_D	CBMK2	SUCOAS	TAL	TPI
801	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	SUCOAS	TAL
802	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	SUCOAS	TKT1
803	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	SUCOAS	TAL
804	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	SUCOAS	TKT1
805	ADHEr	LDH_D	CBMK2	SUCOAS	TKT1	TPI
806	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	HEX1	SUCOAS
807	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	SUCOAS	TPI
808	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	PFK	SUCOAS
809	ADHEr	LDH_D	PGI			
810	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	TAL	
811	ADHEr	LDH_D	HEX1	TAL	TPI	
812	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	TAL	
813	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	TKT1	
814	ADHEr	LDH_D	HEX1	TKT1	TPI	
815	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	TKT1	
816	ADHEr	LDH_D	PYK	RPE	SUCD4	SUCOAS
817	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	RPE	SUCOAS
818	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	RPE
819	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	RPE	SUCD4
820	ADHEr	LDH_D	RPE	TPI		
821	ADHEr	LDH_D	PFK	RPE		
822	ADHEr	LDH_D	FBA	RPE		
823	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TPI		
824	ADHEr	LDH_D	PFK	SUCOAS		
825	ADHEr	LDH_D	FBA	SUCOAS		
826	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TPI		
827	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy		
828	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK		
829	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	SUCOAS

【 0 2 6 6 】

【表 1 - 18】

830	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	SUCOAS
831	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	PFK	SUCD4
832	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	SUCD4	TPI
833	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	MDH	SUCD4
834	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	TPI
835	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	HEX1	MDH
836	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	PFK
837	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	TKT1	TPI
838	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	TAL	TPI
839	ADHEr	LDH_D	MDH	PFK	SUCD4	TKT1
840	ADHEr	LDH_D	MDH	PFK	SUCD4	TAL
841	ADHEr	LDH_D	FBA	MDH	SUCD4	TKT1
842	ADHEr	LDH_D	FBA	MDH	SUCD4	TAL
843	ADHEr	LDH_D	MDH	SUCD4	TAL	TPI
844	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFK	TKT1
845	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFK	TAL
846	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	MDH	TAL
847	ADHEr	LDH_D	MDH	SUCD4	TKT1	TPI
848	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	MDH	TKT1
849	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TKT2	
850	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TKT2	
851	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TKT2
852	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	TAL	
853	ADHEr	LDH_D	CBMK2	TAL	TPI	
854	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	TKT1	
855	ADHEr	LDH_D	CBMK2	TKT1	TPI	
856	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	TAL	
857	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	TKT1	
858	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	PFK	
859	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	TPI	
860	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	HEX1	
861	ADHEr	LDH_D	GLU5K	TAL	TPI	
862	ADHEr	LDH_D	G5SD	TAL	TPI	
863	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	TKT1	
864	ADHEr	LDH_D	G5SD	TKT1	TPI	
865	ADHEr	LDH_D	G5SD	PFK	TKT1	
866	ADHEr	LDH_D	GLU5K	PFK	TAL	
867	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	TAL	
868	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	TKT1	
869	ADHEr	LDH_D	G5SD	PFK	TAL	
870	ADHEr	LDH_D	GLU5K	TKT1	TPI	
871	ADHEr	LDH_D	GLU5K	PFK	TKT1	
872	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	TAL	
873	ADHEr	LDH_D	GLU5K	HEX1	TPI	
874	ADHEr	LDH_D	GLU5K	HEX1	PFK	
875	ADHEr	LDH_D	G5SD	HEX1	PFK	
876	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	HEX1	
877	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	HEX1	
878	ADHEr	LDH_D	G5SD	HEX1	TPI	
879	ADHEr	LDH_D	ASNS2	PFK	TKT1	
880	ADHEr	LDH_D	ASNS2	TKT1	TPI	
881	ADHEr	LDH_D	ASNS2	PFK	TAL	

10

20

30

40

【 0 2 6 7 】

【表 1 - 19】

882	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	TKT1	
883	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	TAL	
884	ADHEr	LDH_D	ASNS2	TAL	TPI	
885	ADHEr	LDH_D	ASNS2	HEX1	PFK	
886	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	HEX1	
887	ADHEr	LDH_D	ASNS2	HEX1	TPI	
888	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TKT1
889	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TAL
890	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TAL
891	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TKT1
892	ADHEr	LDH_D	PYK	RPE	SUCD4	
893	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	RPE	
894	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	RPE
895	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	TKT2
896	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	TKT2
897	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TKT2
898	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	
899	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	
900	ADHEr	LDH_D	FDH2	GLUDy	NADH6	PYK
901	ADHEr	LDH_D	FBA			
902	ADHEr	LDH_D	TPI			
903	ADHEr	LDH_D	PFK			
904	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	
905	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	
906	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	SUCOAS
907	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGDHY	PYK
908	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	ME2	PYK
909	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGL	PYK
910	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PYK	SUCD4
911	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	PYK	SUCD4
912	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	PYK	SUCD4
913	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PYK
914	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PYK	SUCD4
915	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGDHY	PYK
916	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	PYK	SUCD4
917	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGL	PYK
918	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGDHY	PYK
919	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PYK	SUCD4
920	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGL	PYK
921	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	MDH	PYK
922	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PYK	SUCD4
923	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	PYK	SUCD4
924	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	NADH6	PYK
925	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PYK
926	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PYK
927	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	RPE
928	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	RPE
929	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TAL	
930	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TKT1	
931	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TAL	
932	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TKT1	
933	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TAL

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

【表 1 - 2 0】

934	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TKT1
935	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	SUCOAS
936	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	SUCOAS
937	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	SUCOAS
938	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PYK
939	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PYK
940	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT2	
941	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT2	
942	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TKT2
943	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TKT2
944	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK		
945	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4		
946	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	
947	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT2	
948	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TAL
949	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TKT1
950	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	
951	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	
952	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	SUCOAS	
953	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	RPE
954	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	RPE
955	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	SUCOAS	
956	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	
957	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	SUCOAS
958	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	SUCOAS
959	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	
960	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	NADH6	PYK
961	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	NADH6	PYK
962	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TKT2		
963	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT2		
964	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TKT1
965	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TAL
966	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TAL
967	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TKT1
968	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TAL	
969	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT1	
970	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TKT2		
971	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT1	
972	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TAL	
973	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT1	
974	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TAL	
975	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	
976	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	
977	ADHEr	LDH_D	RPE	SUCOAS		
978	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE		
979	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS		
980	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE		
981	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy		
982	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS		
983	ADHEr	LDH_D	TKT2			
984	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TAL		
985	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT1		

10

20

30

40

【表 1 - 2 1】

986	ADHEr	LDH_D	SUCOAS TAL
987	ADHEr	LDH_D	SUCOAS TKT1
988	ADHEr	LDH_D	GLUDy TKT1
989	ADHEr	LDH_D	GLUDy TAL
990	ADHEr	LDH_D	RPE
991	ADHEr	LDH_D	GLCpts
992	ADHEr	LDH_D	SUCOAS
993	ADHEr	LDH_D	GLUDy
994	ADHEr	LDH_D	TAL
995	ADHEr	LDH_D	TKT1

10

【 0 2 7 0 】

【表 2 - 1】

表2: 表1に列挙した戦略において破壊について特定された反応に関連する
ことが分かっているすべての反応化学量論および関連遺伝子のリスト

反応略語	反応名	反応化学量論	指定遺伝子
ACKr	酢酸キナーゼ	[c] : ac + atp <=> actp + adp	b2296, b3115
ADHEr	アセトアルデヒド-CoA デヒドロゲナーゼ	[c] : accoa + (2) h + (2) nadh <=> coa + etoh + (2) nad	b1241
AKGD	2-オキシグルタル酸 デヒドロゲナーゼ	[c] : akg + coa + nad -> co2 + nadh + succoa	b0727, b0726, b0116
ALAR	アラニンラセマーゼ	[c] : ala-L <=> ala-D	b4053
ASNS2	アスパラギンシンセターゼ	[c] : asp-L + atp + nh4 -> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	L-アスパルターゼ	[c] : asp-L -> fum + nh4	b4139
ATPS4r	ATPシンターゼ(1つのATPに 対して4つのプロトン)	adp[c] + (4) h[e] + pi[c] <=> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	b3738+b3736+b3737, b3739, b3734+b3732+b3735+b3733+ b3731
CBMK2	カルバミン酸キナーゼ	[c] : atp + co2 + nh4 -> adp + cbp + (2) h	b0323, b0521, b2874
DAAD	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ	[c] : ala-D + fad + h2o -> fadh2 + nh4 + pyr	b1189
EDA	2-デヒドロ-3-デオキシ- ホスホグルコン酸アルドラーゼ	[c] : 2ddg6p -> g3p + pyr	b1850
FBA	フルクトース- 二リン酸アルドラーゼ	[c] : fdp <=> dhap + g3p	b1773, b2097, b2925
FDH2	ギ酸デヒドロゲナーゼ (キノン-8:2プロトン)	for[c] + (3) h[c] + ubq8[c] -> co2[c] + (2) h[e] + ubq8h2[c]	b3893+b3894+b3892, b1476+b1475+b1474, b4079
FRD2	フマル酸レダクターゼ	[c] : fum + mql8 -> mqn8 + succ	b4153+b4152+b4151+b4154
FUM	フマラーゼ	[c] : fum + h2o <=> mal-L	b1612, b4122, b1611
G5SD	グルタミン酸-5-セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ	[c] : glu5p + h + nadph -> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	グルコース6- リン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	PEP:Pyr PTS によるD-グルコース輸送	glc-D[e] + pep[c] -> g6p[c] + pyr[c]	b1817, b1818, b2417, b1621, b2416, b1819, b1101, b2415
GLU5K	グルタミン酸5-キナーゼ	[c] : atp + glu-L -> adp + glu5p	b0242
GLUDy	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	[c] : glu-L + h2o + nadp <=> akg + h + nadph + nh4	b1761
HEX1	ヘキソキナーゼ (D-グルコース:ATP)	[c] : atp + glc-D -> adp + g6p + h	b2388
ICL	イソクエン酸リアーゼ	[c] : icit -> glx + succ	b4015

【 0 2 7 1 】

【表 2 - 2】

LDH_D	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	b2133, b1380	10
MALS	リンゴ酸シンターゼ	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	b4014, b2976	
MDH	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236	
ME2	リンゴ酸酵素 (NADP)	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463	
NADH12	NADHデヒドロゲナーゼ (ユビキノ-8)	[c] : h + nadh + ubq8 --> nad + ubq8h2	b1109	
NADH6	NADHデヒドロゲナーゼ (ユビキノ-8&3.5プロトン)	(4.5) h[c] + nadh[c] + ubq8[c] --> (3.5) h[e] + nad[c] + ubq8h2[c]	b2288+b2277+b2285+b2278+b2276+b2286+b2287+b2279+b2280+b2284+b2283+b2282+b2281	
PFK	ホスホフルクトキナーゼ	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	b3916, b1723	
PFLi	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	[c] : coa + pyr --> accoa + for	b3114, b3951+b3952, b0902+b2579+b0903	
PGDH	ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029	
PGDHY	ホスホグルコン酸デヒドラターゼ	[c] : 6pgc --> 2ddg6p + h2o	b1851	20
PGI	グルコース-6-リン酸イソメラーゼ	[c] : g6p <==> f6p	b4025	
PGL	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767	
PPS	ホスホエノールピルビン酸シンターゼ	[c] : atp + h2o + pyr --> amp + (2) h + pep + pi	b1702	
PRO1z	プロリンオキシダーゼ	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014	
PTAr	ホスホトランスアセチラーゼ	[c] : accoa + pi <==> actp + coa	b2297	
PYK	ピルビン酸キナーゼ	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854, b1676	
RPE	リブローズ5-リン酸3-エピメラーゼ	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	b4301, b3386	
SUCD4	コハク酸デヒドロゲナーゼ	[c] : fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2	b0723+b0721+b0724+b0722	
SUCOAS	スクシニル-CoAシンセターゼ (ADP形成性)	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	b0729+b0728	40
TAL	トランスアルドラーゼ	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	b2464, b0008	
THD2	NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ	(2) h[e] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	b1602+b1603	
TKT1	トランスケトラーゼ	[c] : r5p + xu5p-D <==> g3p + s7p	b2935, b2465	
TKT2	トランスケトラーゼ	[c] : e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p	b2935, b2465	
TPI	トリオース-リン酸イソメラーゼ	[c] : dhap <==> g3p	b3919	

【表 3 - 1】

表3: 表2に列挙した反応に関与するすべての代謝産物についての代謝産物略語、対応する名称および位置のリスト

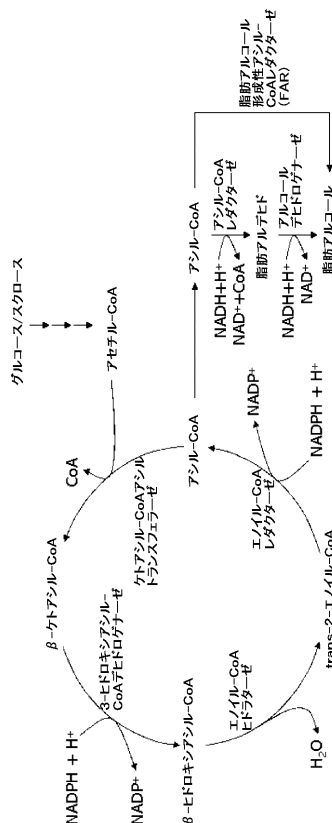
代謝産物略語	コンパートメント	代謝産物名
1pyr5c	サイトゾル	1-ピロリン-5-カルボン酸塩
2ddg6p	サイトゾル	2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコン酸6-リン酸塩
6pgc	サイトゾル	6-ホスホ-D-グルコン酸塩
6pgl	サイトゾル	6-ホスホ-D-グルコノ-1, 5-ラク톤
ac	サイトゾル	酢酸塩
accoa	サイトゾル	アセチル-CoA
actp	サイトゾル	アセチルリン酸塩
adp	サイトゾル	ADP
akg	サイトゾル	2-オキソグルタル酸塩
ala-D	サイトゾル	D-アラニン
ala-L	サイトゾル	L-アラニン
amp	サイトゾル	AMP
asn-L	サイトゾル	L-アスパラギン
asp-L	サイトゾル	L-アスパラギン酸塩
atp	サイトゾル	ATP
cbp	サイトゾル	カルバモイルリン酸塩
cit	サイトゾル	クエン酸塩
co2	サイトゾル	CO2
coa	サイトゾル	補酵素A
ctp	サイトゾル	CTP
dha	サイトゾル	ジヒドロキシアセトン
dhap	サイトゾル	ジヒドロキシアセトンリン酸塩
e4p	サイトゾル	D-エリスロース4-リン酸塩
etoh	サイトゾル	エタノール
f6p	サイトゾル	D-フルクトース6-リン酸塩
fad	サイトゾル	FAD
fadh2	サイトゾル	FADH2
fdp	サイトゾル	D-フルクトース1, 6-ニリン酸塩
for	サイトゾル	ギ酸塩
fum	サイトゾル	フマル酸塩
g3p	サイトゾル	グリセルアルデヒド3-リン酸塩
g6p	サイトゾル	D-グルコース6-リン酸塩
glc-D	サイトゾル	D-グルコース
glc-D[e]	生物外	D-グルコース
glu5p	サイトゾル	L-グルタミン酸5-リン酸塩
glu5sa	サイトゾル	L-グルタミン酸5-セミアルデヒド
glu-L	サイトゾル	L-グルタミン酸塩
glx	サイトゾル	グリオキシル酸塩
h	サイトゾル	H+
h[e]	生物外	H+
h2	サイトゾル	H2
h2o	サイトゾル	H2O
icit	サイトゾル	イソクエン酸塩
k	サイトゾル	K+
lac-D	サイトゾル	D-乳酸塩
mal-L	サイトゾル	L-リンゴ酸塩
mqi8	サイトゾル	メナキノール8
mqn8	サイトゾル	メナキノン8
nad	サイトゾル	ニコチンアミダデニンジヌクレオチド
nadh	サイトゾル	ニコチンアミダデニンジヌクレオチド還元型

【表 3 - 2】

nadp	サイトゾル	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸塩
nadph	サイトゾル	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸塩-還元型
nh4	サイトゾル	アンモニウム
o2	サイトゾル	O ₂
oaa	サイトゾル	オキサロ酢酸塩
pep	サイトゾル	ホスホエノールピルビン酸塩
pi	サイトゾル	リン酸塩
ppi	サイトゾル	ニリン酸塩
pro-L	サイトゾル	L-プロリン
pyr	サイトゾル	ピルビン酸塩
r5p	サイトゾル	アルファ-D-リボース5-リン酸塩
ru5p-D	サイトゾル	D-リブローズ5-リン酸塩
s7p	サイトゾル	セドヘブローズ7-リン酸塩
succ	サイトゾル	コハク酸塩
succoa	サイトゾル	スクシニル-CoA
ubq8	サイトゾル	ユビキノン-8
ubq8h2	サイトゾル	ユビキノール-8
xu5p-D	サイトゾル	D-キシロース5-リン酸塩

開示した実施形態に関連して本発明を説明したが、上で詳述した特定の実施例および研究が本発明の例証となるものにすぎないことは当業者には容易に理解されるであろう。本発明の精神を逸脱することなく様々な変更を行うことができることは理解されるはずである。従って、本発明は、後続の特許請求の範囲によってしか限定されない。

【図 1】



【図 2】

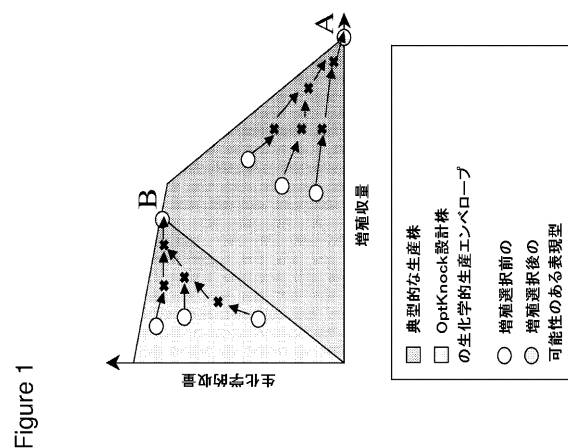


Figure 1

Figure 2

【 図 3 】

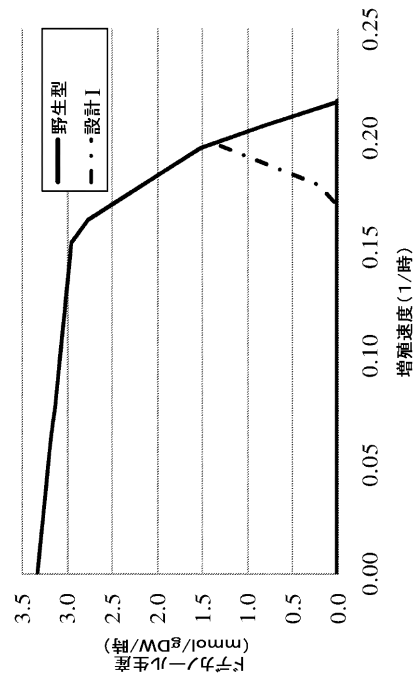


Figure 3

【 図 4 】

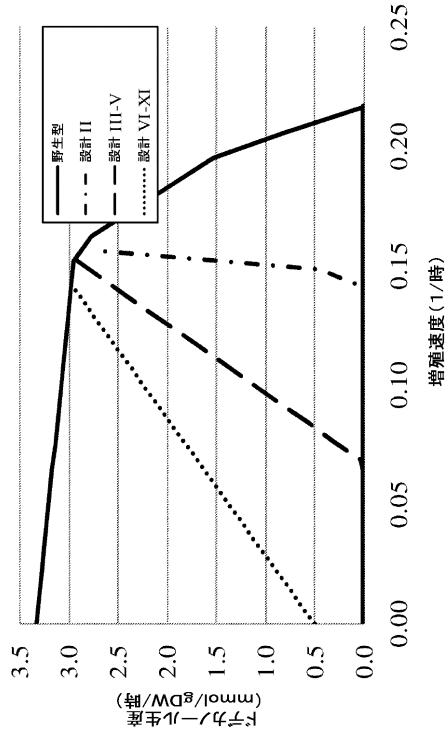


Figure 4

【 図 5 】

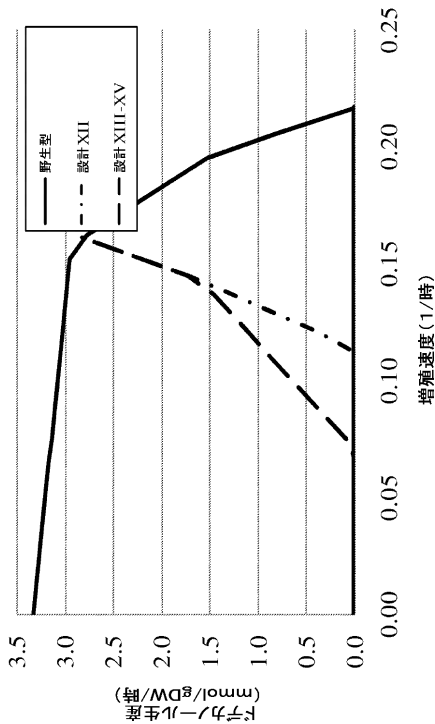


Figure 5

【 図 6 】

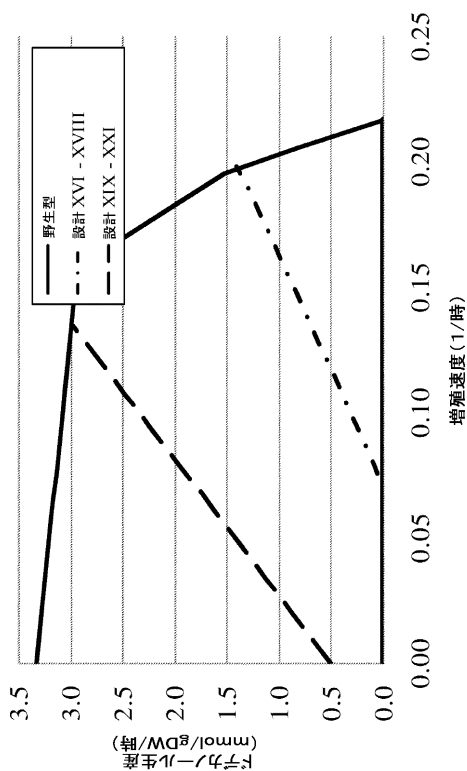


Figure 6

【図 7】

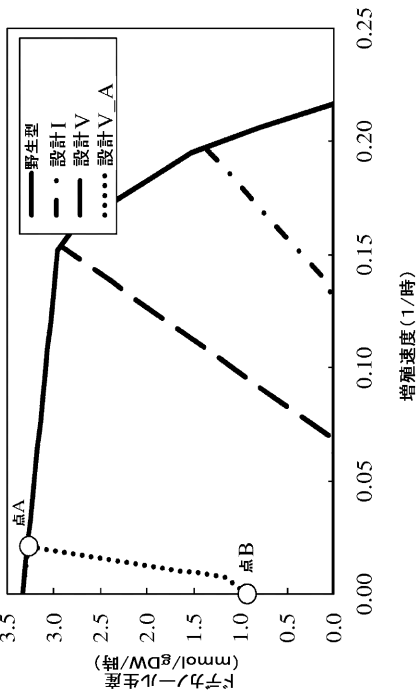


Figure 7

【図 8】

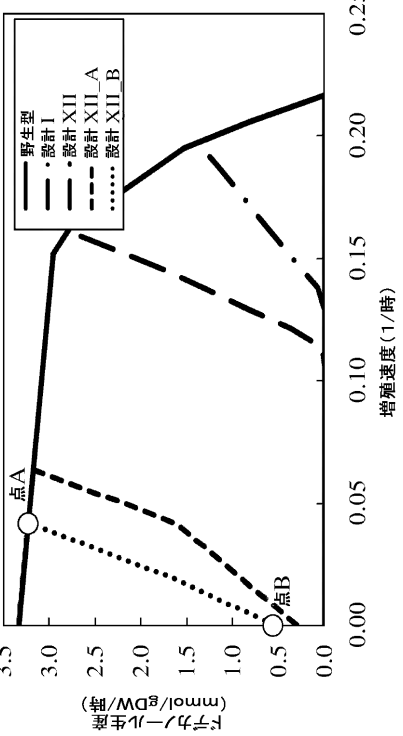


Figure 8

【図 9 a】

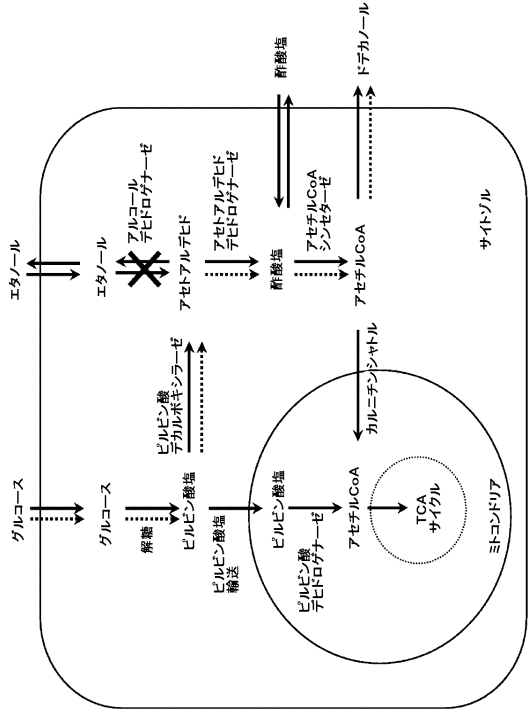


Figure 9a

【図 9 b】

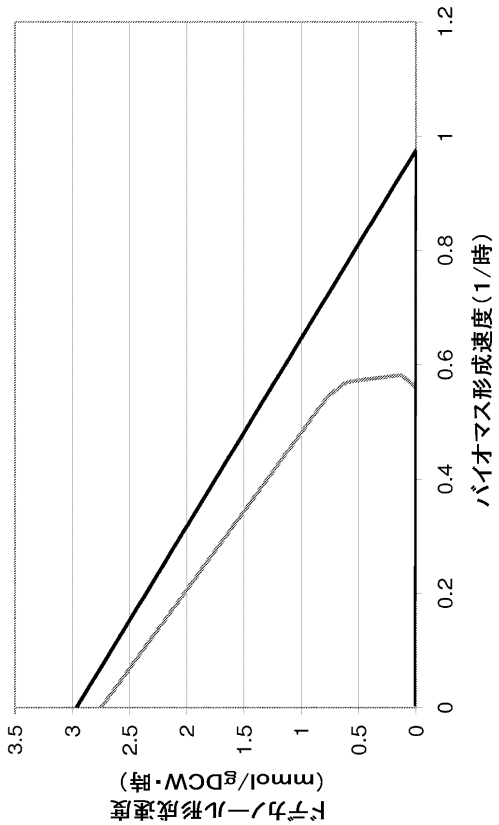
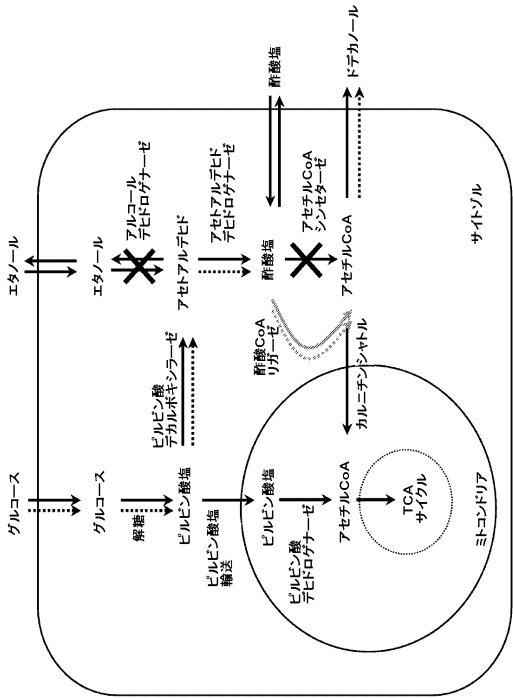


Figure 9b

【図 10 a】



【図 10 b】

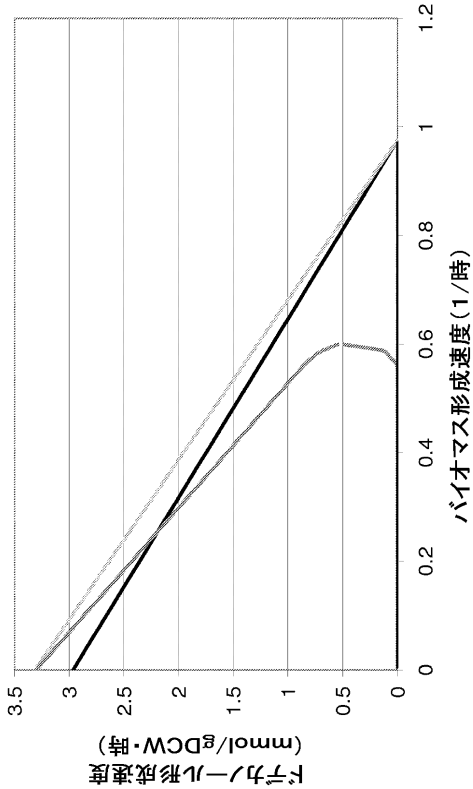
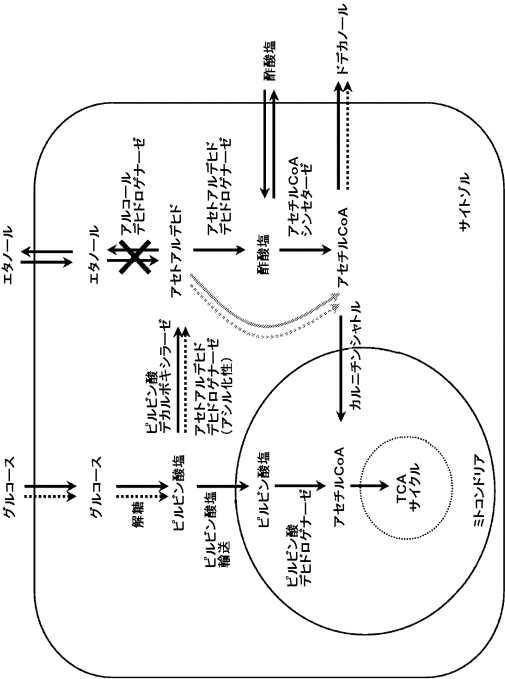


Figure 10b

【図 11 a】



【図 11 b】

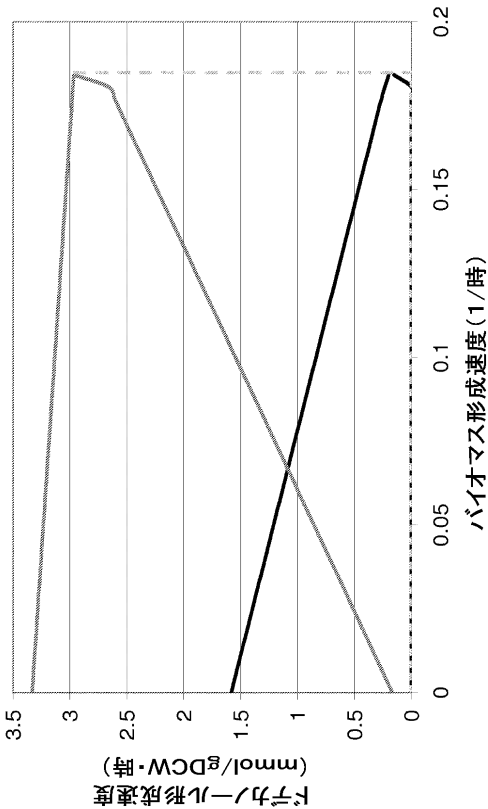
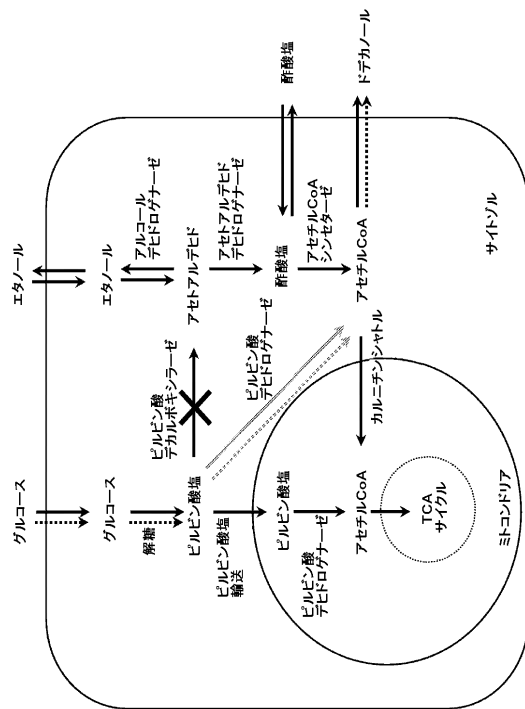
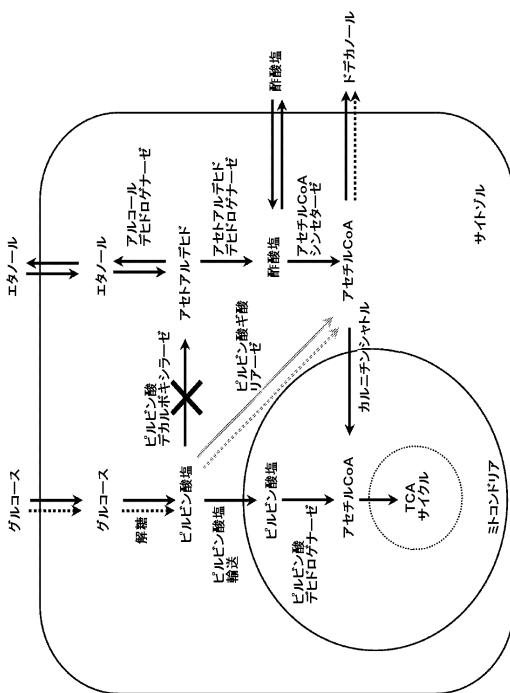


Figure 11b

【図 12】



【図 14】



【図 13】

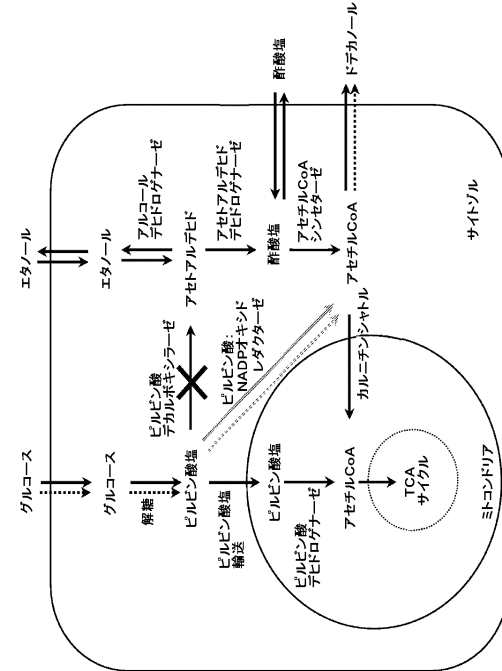


Figure 13

【図 15 a】

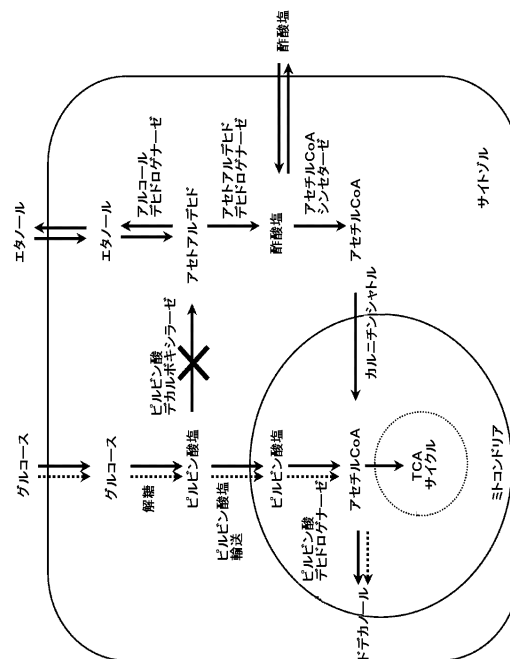


Figure 15a

Figure 12

Figure 14

【図 15 b】

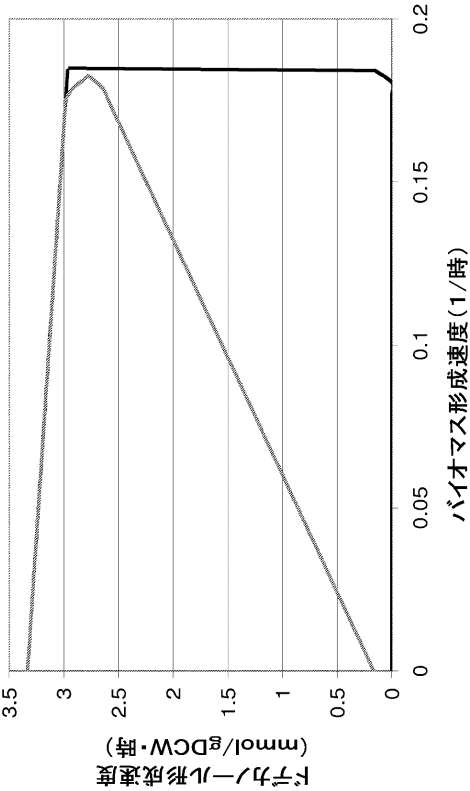


Figure15b

【図 16】

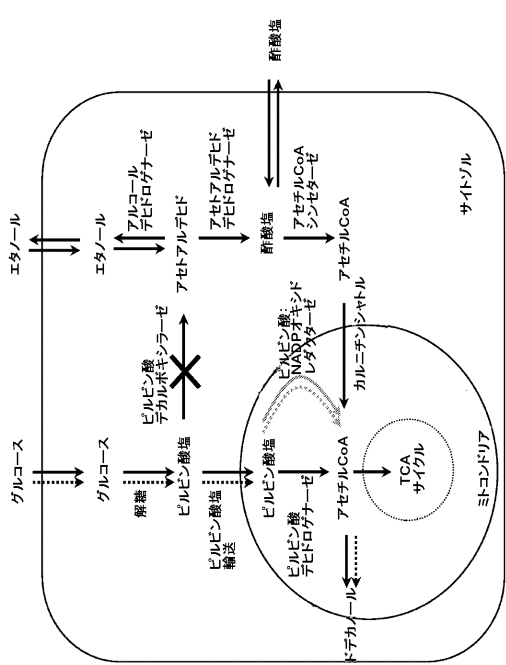


Figure 16

【図 17】

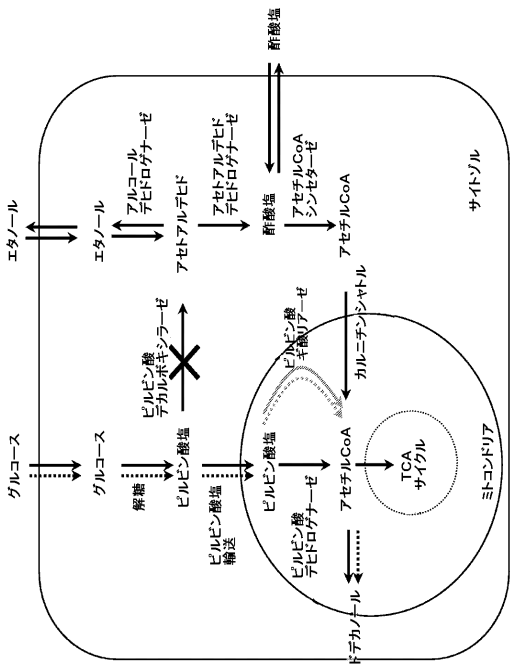


Figure 17

【図 18】

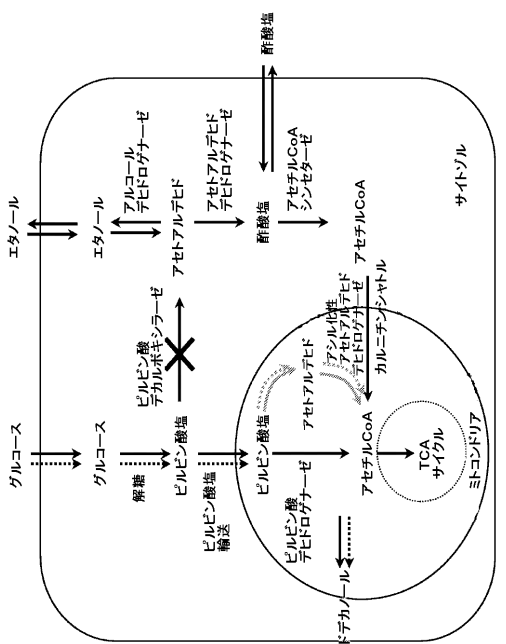
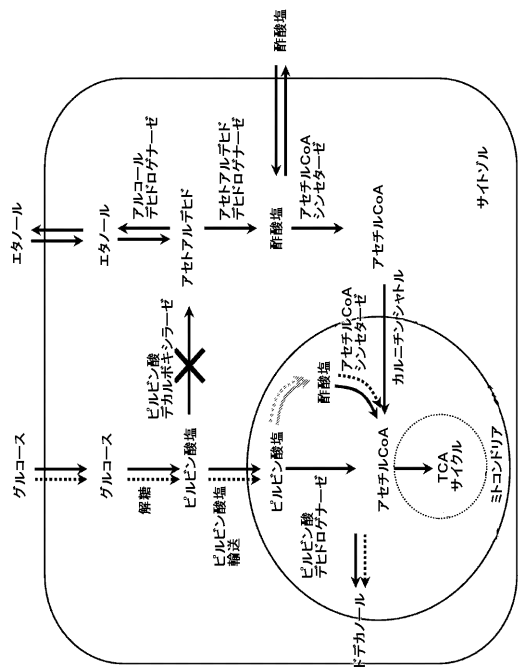


Figure 18

【図 19 a】



【図 19 b】

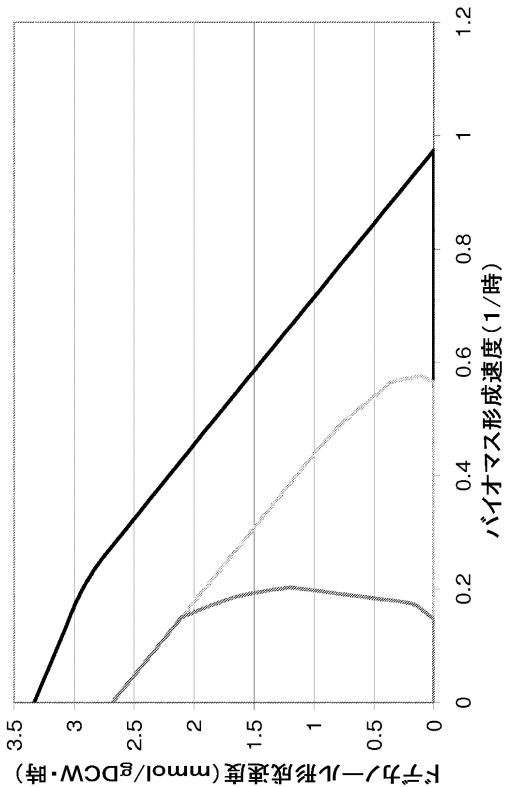


Figure 19b

Figure 19a

【図 20】

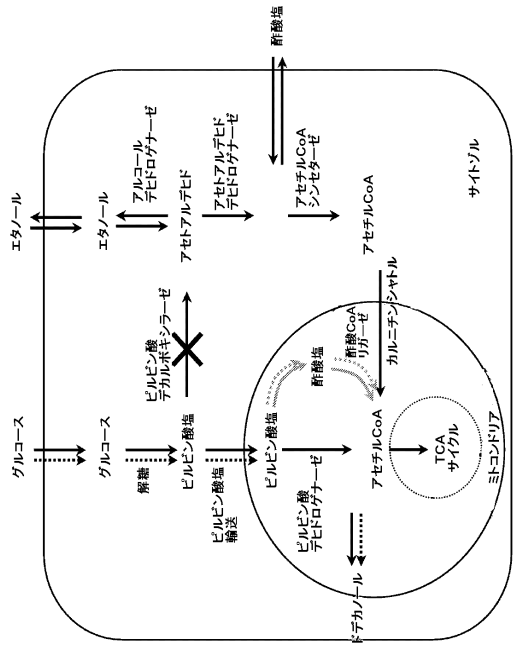


Figure 20

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/110,500

(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ファルキヤ, プリティ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 6 , サン ディエゴ, カミニート アルバレス
1 1 1 2 5

(72)発明者 バーガード, アンソニー ピー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 6 8 2 3 , ベルフォント, ウォーカー クロッシング
2 3 7

審査官 菅原 洋平

(56)参考文献 国際公開第2007/041269(WO,A2)

国際公開第2007/136762(WO,A2)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/21

C12N 1/15

C12N 1/19

C12P 7/04

CAplus(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)