

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6957583号
(P6957583)

(45) 発行日 令和3年11月2日(2021.11.2)

(24) 登録日 令和3年10月8日(2021.10.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/32 (2006.01)	C 1 2 N 15/32
A O 1 H 5/00 (2018.01)	A O 1 H 5/00 A
A O 1 N 63/23 (2020.01)	A O 1 N 63/23 Z N A
A O 1 P 7/04 (2006.01)	A O 1 P 7/04
C O 7 K 14/325 (2006.01)	C O 7 K 14/325
請求項の数 24 外国語出願 (全 52 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2019-214581 (P2019-214581)	(73) 特許権者	510330389
(22) 出願日	令和1年11月27日(2019.11.27)		アテニックス・コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2018-154280 (P2018-154280) の分割		ATHENIX CORPORATION
原出願日	平成26年3月6日(2014.3.6)		アメリカ合衆国ノースカロライナ州、モーリスビル、パラマウント、パークウェイ、3500
(65) 公開番号	特開2020-58357 (P2020-58357A)	(73) 特許権者	507124988
(43) 公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)		バイエル クロップサイエンス エルピー
審査請求日	令和1年12月12日(2019.12.12)		BAYER CROPPSCIENCE LP
(31) 優先権主張番号	61/774,645		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード800番
(32) 優先日	平成25年3月8日(2013.3.8)	(74) 代理人	100091982
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 永井 浩之
(31) 優先権主張番号	61/774,647		最終頁に続く
(32) 優先日	平成25年3月8日(2013.3.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 毒素遺伝子及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

殺虫性活性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、

a) 配列番号17または18に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列番号67または68のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

c) 配列番号67または68のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

からなる群から選択される、組換え核酸分子。

【請求項2】

前記ヌクレオチド配列が合成配列である、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項3】

前記ヌクレオチド配列が、植物細胞における前記ヌクレオチド配列の発現を指令することができるプロモータに作動可能に連結している、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項4】

請求項1に記載の組換え核酸分子を含む発現カセット。

【請求項5】

シグナル配列またはリーダー配列をコードする核酸分子を含む、請求項4に記載の発現カセット。

10

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

【請求項 7】

細菌宿主細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

植物細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の宿主細胞を含むトランスジェニック植物。

【請求項 10】

前記植物が、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、キャベツ、ヒマワリ、トマト、アブラナ科の植物、コショウ、ジャガイモ、ワタ、コメ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、タバコ、オオムギ、及びナタネからなる群から選択される、請求項 9 に記載のトランスジェニック植物。

10

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸分子を含むトランスジェニック植物。

【請求項 12】

a) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

b) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド

からなる群から選択される、殺虫活性を有する組換えポリペプチド。

20

【請求項 13】

シグナル配列またはリーダー配列を含む、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 12 に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 15】

前記組成物が、粉末、粉塵、ペレット、顆粒、スプレー、乳濁剤、コロイド、溶液からなる群から選択される、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物が、細菌細胞の培養物の乾燥、凍結乾燥、均質化、抽出、ろ過、遠心分離、沈降、又は濃縮により調製される、請求項 14 に記載の組成物。

30

【請求項 17】

前記ポリペプチドを 1 重量% ~ 99 重量% 含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 18】

コナガ、ダイズシャクトリムシ、ハッシュウマメイモムシ、ネッタイシマカ、ワタアブラムシおよびダイズアブラムシからなる群から選択されるいずれかの害虫集団を防除する方法であって、前記集団を、殺虫有効量の請求項 12 に記載のポリペプチドと接触させるステップを含む方法。

【請求項 19】

コナガ、ダイズシャクトリムシ、ハッシュウマメイモムシ、ネッタイシマカ、ワタアブラムシおよびダイズアブラムシからなる群から選択されるいずれかの害虫を死滅させる方法であって、前記害虫を殺虫有効量の請求項 12 に記載のポリペプチドと接触させる、または前記害虫に前記ポリペプチドを摂食させるステップを含む方法。

40

【請求項 20】

配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列を含む、殺虫活性を有するポリペプチドを生成する方法であって、前記ポリペプチドをコードする核酸分子を発現させる条件下で、請求項 6 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む方法。

【請求項 21】

殺虫性活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む DNA 構築物をゲノムに安定に組み入れた植物又は植物細胞であって、前記ヌクレオチド配列が、

a) 配列番号 17 または 18 に示されるヌクレオチド配列；

50

b) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；及び

c) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる群から選択される、植物又は植物細胞。

【請求項 22】

植物を害虫から保護する方法であって、植物又はその細胞において、殺虫性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるステップを含み、前記ヌクレオチド配列が、

a) 配列番号 17 または 18 に示されるヌクレオチド配列；

10

b) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；及び

c) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる群から選択され、

前記害虫がコナガ、ダイズシャクトリムシ、ハッシュウマメイモムシ、ネッタイシマカ、ワタアブラムシおよびダイズアブラムシからなる群から選択されるいずれから選択される方法。

【請求項 23】

前記植物が、コナガ、ダイズシャクトリムシ、ハッシュウマメイモムシ、ネッタイシマカ、ワタアブラムシおよびダイズアブラムシからなる群から選択されるいずれかの害虫に対する殺虫活性を有する殺虫性ポリペプチドを産生する、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

植物における収量を増加する方法であって、殺虫活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む DNA 構築物をゲノムに安定に組み入れた植物又はその種子を畑で栽培するステップを含み、前記ヌクレオチド配列が、

a) 配列番号 17 または 18 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；及び

c) 配列番号 67 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる群から選択され、

30

前記畑が、前記ポリペプチドが殺虫活性を有する害虫に外寄生されている方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月7日に提出された米国仮特許出願第61/774,110号明細書、並びに各々2013年3月8日に提出された米国仮特許出願第61/774,627号明細書；同第61/774,629号明細書；同第61/774,635号明細書；同第61/774,638号明細書；同第61/774,642号明細書；同第61/774,645号明細書；同第61/774,647号明細書；同第61/774,650号明細書；同第61/774,655号明細書；及び同第61/774,659号明細書の利益を主張する。尚、これらの文献の内容は、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

40

【0002】

電子データにて提出した配列表の参照

配列表の公式コピーをASCIIフォーマット化配列表（ファイル名：「APA13-6008US01_SEQLIST.txt」、2014年3月5日作成、サイズ：411キロバイト）としてEFS-Webにより電子データにて提出し、これを本明細書と一

50

緒に提出する。このASCIIフォーマット化文書に含まれる配列表は、本明細書の一部であり、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

【0003】

本発明は、分子生物学の分野に関する。殺虫性タンパク質をコードする新規遺伝子が提供される。これらのタンパク質及びそれらをコードする核酸配列は、殺虫性製剤の調製及び害虫抵抗性トランスジェニック植物の作製に有用である。

【背景技術】

【0004】

バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) は、昆虫の特定の目及び種に対して特異的に有毒であるが、植物及び他の非標的生物には無害な結晶性封入体を産生するその能力によって特徴付けられる、グラム陽性孢子形成土壌細菌である。そのため、バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 株又はその殺虫性タンパク質を含む組成物は、農業害虫又は、ヒト若しくは動物の様々な疾患を媒介する昆虫を防除するための環境的に許容される殺虫剤として使用することができる。

【0005】

バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 由来の結晶 (*Cry*) タンパク質 (*デルタ*-*エンドトキシン*) は、主にチョウ目 (*Lepidopteran*)、カメムシ目 (*Hemipteran*)、ハエ目 (*Dipteran*)、及び甲虫目 (*Coleopteran*) の幼虫に対して強力な殺虫活性を有する。これらのタンパク質はまた、ハチ目 (*Hymenoptera*)、ヨコバイ亜目 (*Homoptera*)、シラミ目 (*Phthiraptera*)、ハジラミ目 (*Mallophaga*)、及びダニ (*Acar*) 害虫目、並びに他の無脊椎動物目、例えば線形動物 (*Nemathelminthes*)、扁形動物 (*Platyhelminthes*)、及び有毛足虫 (*Sarcomastigophora*) などに対しても活性を示している (*Feitelson (1993) The Bacillus Thuringiensis family tree. In Advanced Engineered Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.*)。これらのタンパク質は初め、主としてその殺虫活性に基づいて、*Cry I* ~ *Cry V* として分類された。主要なクラスは、チョウ目 (*Lepidoptera*) 特異的 (*I*)、チョウ目 (*Lepidoptera*) 及びハエ目 (*Diptera*) 特異的 (*II*)、甲虫目 (*Coleoptera*) 特異的 (*III*)、ハエ目 (*Diptera*) 特異的 (*IV*)、並びに線虫 (*nematode*) 特異的 (*V*) 及び (*VI*) であった。タンパク質は、亜科にさらに分類され；それぞれの科の中で、より密接に関連するタンパク質は、*Cry 1A*、*Cry 1B*、*Cry 1C*、などの区分を示す文字が割り当てられた。それぞれの区分の中で、さらにより密接に関連するタンパク質は、*Cry 1C1*、*Cry 1C2*、などの名称が付与された。

【0006】

昆虫標的特異性よりもむしろアミノ酸配列の相同性に基づいて、*Cry* 遺伝子に関する命名法が記載されている (*Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807 - 813*)。この分類では、各毒素に、第1階級 (アラビア数字1つ)、第2階級 (大文字1つ)、第3階級 (小文字1つ)、及び第4階級 (別のアラビア数字1つ) を含む固有の名称が割り当てられている。第1階級のローマ数字は、アラビア数字に置き換えられている。45%未満の配列同一性を有するタンパク質は、異なる第1階級を有し、第2及び第3階級についての基準は、それぞれ78%及び95%である。

【0007】

結晶タンパク質は、昆虫の中腸に摂取され、そして可溶化されるまで殺虫活性を示さない。摂取されたプロトキシンは、昆虫の消化管でプロテアーゼにより加水分解されて、活性な毒性分子となる (*Hoefte and Whiteley (1989) Micro*

10

20

30

40

50

biol. Rev. 53: 242 - 255)。この毒素は、標的幼虫の中腸の頂端刷子縁の受容体に結合し、イオンチャンネル又は孔を形成しながら頂端膜に移入し、これによって幼虫の死をもたらす。

【0008】

デルタ - エンドトキシンは、一般に、5つの保存配列ドメイン、及び3つの保存構造ドメインを有する(例えば、de Maagd et al. (2001) Trends Genetics 17: 193 - 199参照)。第1の保存された構造ドメインは、7つのヘリックスから成り、膜挿入及び孔形成に参与する。ドメインIIは、グリークキー(Greek key)立体配置に配置された3つのシートから成り、そしてドメインIIIは、「ゼリーロール」(jelly-roll)構造の2つの逆平行シートから成る(de Maagd et al., 2001, 前掲)。ドメインII及びIIIは、受容体の認識及び結合に参与しており、そのため、毒素特異性の決定因子と考えられる。

10

【0009】

デルタ - エンドトキシン以外にも、殺虫性タンパク質毒素には、いくつかの他の公知のクラスがある。VIP1/VIP2毒素(例えば、米国特許第5,770,696号明細書)は、他のバイナリー(「A/B」)毒素の作用機序と同様に、受容体依存性エンドサイトーシスとそれに続く細胞の被毒を含むと考えられる機序により、昆虫に対して強力な活性を示す、バイナリー殺虫性毒素である。VIP、C2、CDT、CST、又は炭疽菌(B. anthracis)浮腫及び致死毒素などのA/B毒素は、単量体としての「B」成分の特異的な、受容体を介した結合を通して、標的細胞と最初に相互作用する。続いて、これらの単量体は、ホモヘプタマーを形成する。次に、「B」ヘプタマー - 受容体複合体は、ドッキングプラットフォームとして機能し、これは、後に酵素の「A」成分と結合し、受容体依存性エンドサイトーシスを通して「A」成分のサイトゾルへの移動を可能にする。細胞のサイトゾル内に進入すると、「A」成分は、例えば、G - アクチンのADP - リボシル化、又は環状AMP(cAMP)の細胞内レベルの増加により、正常な細胞機能を阻害する。例えば、Barth et al. (2004) Microbiol Mol Biol Rev 68: 373 - 402を参照されたい。

20

【0010】

バチルス・チューリンゲンシス(B. thuringiensis)をベースとする殺虫剤の過度の使用が、既にコナガ、プルテラ・キシロステラ(Plutella xylostella)(Ferre and Van Rie (2002) Annu. Rev. Entomol. 47: 501 - 533)の野外個体群における抵抗性を引き起こしている。抵抗性の最も一般的な機序は、毒素と、その特異的中腸受容体との結合の減少である。これは、同じ受容体を共用する他の毒素にも交差耐性を付与し得る(Ferre and Van Rie (2002))。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

昆虫がもたらし得る壊滅、そして害虫を防除することによる収量の向上のために、新規形態の殺虫性毒素をみいだすことが引き続き求められている。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

細菌、植物、植物細胞、組織及び種子に、殺虫活性を付与するための組成物及び方法が提供される。組成物は、殺虫性及び殺昆虫性ポリペプチドの配列をコードする核酸分子、そのような核酸分子を含むベクター、及び前記ベクターを含む宿主細胞を含む。組成物はまた、殺虫性ポリペプチド配列、及びそのようなポリペプチドに対する抗体も含む。ヌクレオチド配列は、生物(微生物及び植物を含む)における形質転換及び発現のためのDNA構築物又は発現カセットに使用することができる。ヌクレオチド又はアミノ酸配列は、生物(微生物又は植物を含むが、これらに限定されるわけではない)における発現のため

50

に設計された合成配列であってもよい。さらに、組成物は、本発明のヌクレオチド配列を含有する細菌、植物、植物細胞、組織及び種子も含む。

【0013】

特に、殺虫性タンパク質をコードする単離又は組換え核酸分子が提供される。さらに、殺虫性タンパク質に対応するアミノ酸配列も包含される。特に、本発明は、配列番号21～74に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又は配列番号1～20に示されるヌクレオチド配列、並びにそれらの生物学的に活性な変異体及び断片を含む、単離又は組換え核酸分子を提供する。本発明のヌクレオチド配列に相補的であるか、又は本発明の配列若しくはその相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列も包含される。さらに、本発明のヌクレオチド配列、又は本発明のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、並びにそれらの生物学的に活性な変異体及び断片を含む、ベクター、宿主細胞、植物、及び種子も提供される。

10

【0014】

本発明のポリペプチドを作製する方法、並びに、チョウ目 (lepidopteran)、カメムシ目 (hemipteran)、甲虫目 (coleopteran)、線虫 (nematode)、又はハエ目 (dipteran) の害虫を防除又は死滅させるためにこれらのポリペプチドを使用する方法も提供される。また、サンプル中の本発明の核酸ポリペプチドを検出する方法及びキットも含まれる。

【0015】

本発明の組成物及び方法は、増強された害虫抵抗性又は耐性を有する生物の作製に有用である。これらの生物及び該生物を含む組成物は、農業上の目的のために望ましい。本発明の組成物はまた、殺虫活性を有する改変又は改良タンパク質を作製する上で、又は産物もしくは生物中の殺虫性タンパク質又は核酸の存在を検出する上で有用である。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、生物、特に植物又は植物細胞において、害虫抵抗性又は耐性を制御するための組成物及び方法に関する。「抵抗性」とは、本発明のポリペプチドの摂取、あるいは、それ以外の接触時に、害虫 (例えば、昆虫) を死滅させることを意味する。「耐性」とは、害虫の移動、摂食、生殖、又はその他の機能の障害又は抑制を意味する。本方法は、本発明の殺虫性タンパク質をコードするヌクレオチド配列で生物を形質転換することを含む。特に、本発明のヌクレオチド配列は、殺虫活性を有する植物及び微生物を調製するのに有用である。従って、形質転換された細菌、植物、植物細胞、植物組織及び種子が提供される。組成物は、バチルス属 (bacillus) 又は他の種の殺虫性核酸及びタンパク質である。前記配列は、目的とする生物への後の形質転換のための発現ベクターの構築に、他の相同性 (又は部分的相同性) 遺伝子の単離のためのプローブとして、並びに、例えば、エンドトキシンの Cry 1、Cry 2 及び Cry 9 ファミリーのメンバーを用いて、ドメインスワッピング又は DNA シャッフリングなどの当技術分野で公知の方法による改変殺虫性タンパク質の作製のために用いられる。前記タンパク質は、チョウ目、カメムシ目、甲虫目、ハエ目、及び線虫の害虫集団を防除するか又は死滅させるために、並びに殺虫活性を有する組成物を作製するために用いられる。

30

40

【0017】

「殺虫性毒素」又は「殺虫性タンパク質」は、限定するものではないが、チョウ目 (Lepidoptera)、ハエ目 (Diptera)、及び甲虫 (Coleoptera) 目、又は線虫 (nematode) 門のメンバーなどの1種又は複数の害虫に対して毒性活性を有する毒素、あるいは、このようなタンパク質に対して相同性を有するタンパク質を意味する。殺虫性タンパク質は、例えば、バチルス属 (bacillus) 種、クロストリジウム・ピファーマタンス (Clostridium bif fermentans) 及びパエニバチルス・ポリピアエ (Paenibacillus popilliae) などの生物から単離されている。殺虫性タンパク質は、本明細書に開示する完全長ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列、及び、別の下流の開始部位の使用か、又は殺

50

虫活性を有するより短いタンパク質を産生するプロセシングのいずれかの理由で、完全長配列よりも短いアミノ酸配列を含む。プロセシングは、タンパク質が発現される生物において、又はタンパク質の摂取後に害虫において起こり得る。

【0018】

殺虫性タンパク質は、デルタ - エンドトキシンを包含する。デルタ - エンドトキシンは、cry1からcry72、cyt1及びcyt2、並びにCyt様毒素として同定されたタンパク質を含む。現在、多様な特異性及び毒性を有する250を超える公知の種のデルタエンドトキシンが存在する。包括的一覧については、Crickmore et al. (1998), Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807-813を参照し、定期的更新については、www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/indexのCrickmore et al. (2003) "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature," を参照されたい。

10

【0019】

従って、本明細書では、殺虫活性を付与する新規の単離又は組換えヌクレオチド配列が提供される。これらの配列は、デルタ - エンドトキシンタンパク質又はバイナリー毒素と同一性を有するポリペプチドをコードする。また、殺虫性タンパク質のアミノ酸配列も提供される。この遺伝子の翻訳から生じたタンパク質は、細胞が、それを摂取した害虫を排除するか、又は死滅させることを可能にする。

【0020】

20

核酸分子、並びにその変異体及び断片

本発明の1つの態様は、殺虫性タンパク質及びポリペプチド又はその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む単離又は組換え核酸分子、並びに、配列同一性の領域を有するタンパク質をコードする核酸を同定するためのハイブリダイゼーションプロトコルとして使用するのに十分な核酸分子に関する。また、本明細書に定義するストリンジェントな条件下で、本発明のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列も包含される。本明細書で用いるように、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、組換えDNA、cDNA又はゲノムDNA）及びRNA分子（例えば、mRNA）並びにヌクレオチド類似体を使用して作製したDNA又はRNAの類似体を含むものとする。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖のどちらであってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。用語「組換え（体）」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、（例えば、化学組成若しくは構造において）天然に存在するものとは異なるように、ネイティブポリヌクレオチド又はポリペプチドに対して、操作されたポリヌクレオチド又はポリペプチドを包含する。別の実施形態では、「組換え」ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムDNAにおいて天然に存在する内部配列（すなわち、イントロン）を含まない。こうしたポリヌクレオチドの典型的な例は、いわゆる相補的DNA（cDNA）である。

30

【0021】

単離又は組換え核酸（若しくはDNA）は、本明細書において、その自然の環境にはもはや存在せず、例えば、in vitroで又は組換え細菌若しくは植物宿主細胞に存在する核酸（又はDNA）を指すために用いられる。一部の実施形態では、単離又は組換え核酸は、核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて、該核酸に天然にフランキングしている配列（好ましくは、タンパク質をコードする配列）（すなわち、核酸の5'及び3'末端に位置する配列）を含まない。本発明の目的のために、「単離（された）」は、核酸分子を指すのに用いられる場合、単離染色体を除外する。例えば、様々な実施態様において、単離されたデルタ - エンドトキシンをコードする核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて、該核酸分子に天然にフランキングしている約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、又は0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。様々な実施形態において、細胞材料を実質的に含まないデルタ - エンドトキシンタンパク質は、約30%、20%、10%、又は5%（乾燥重量）未満の非デルタ - エンドトキ

40

50

シンタンパク質（本明細書において「混入タンパク質」とも呼ばれる）を有するタンパク質の調製物を含む。

【0022】

本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1～20に示される配列、並びにその変異体、断片及び相補体を含む。「相補体」とは、所与のヌクレオチド配列にハイブリダイズして、これにより安定な二本鎖を形成できるように、所与のヌクレオチド配列に対して十分に相補性であるヌクレオチド配列を意味する。これらのヌクレオチド配列によってコードされる殺虫性タンパク質の対応するアミノ酸配列は、配列番号21～74に示される。

【0023】

殺虫性タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列の断片である核酸分子も本発明に包含される。「断片」とは、殺虫性タンパク質をコードするヌクレオチド配列の部分の意味する。ヌクレオチド配列の断片は、殺虫性タンパク質の生物学的に活性な部分をコードし得るものか、あるいは、以下に開示する方法を用いてハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして使用できる断片であってもよい。殺虫性タンパク質をコードするヌクレオチド配列の断片である核酸分子は、意図する用途に応じて、少なくとも約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1350、1400の連続ヌクレオチド、又は本明細書に開示する殺虫性タンパク質をコードする完全長ヌクレオチド配列に存在するヌクレオチド数までを含む。「連続」ヌクレオチドとは、互いに隣接しているヌクレオチド残基を意味する。本発明のヌクレオチド配列の断片は、殺虫性タンパク質の生物活性を保持しているため、殺虫活性を保持するタンパク質断片をコードする。従って、本明細書に開示する生物学的に活性な断片も包含される。「活性を保持する」とは、断片が、殺虫性タンパク質の殺虫活性の少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約70%、80%、90%、95%又はそれ以上を有することを意味する。一実施形態では、殺虫活性は、甲虫目殺虫活性である。別の実施形態では、殺虫活性は、チョウ目殺虫活性である。別の実施形態では、殺虫活性は、線虫類殺虫活性である。別の実施形態では、殺虫活性は、ハエ目殺虫活性である。別の実施形態では、殺虫活性は、カメムシ目殺虫活性である。殺虫活性を測定するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480 - 2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252: 199 - 206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78: 290 - 293; 及び米国特許第5,743,477号明細書を参照されたい。尚、これらは全て、その全体を参照により本明細書に組みこむものとする。

【0024】

本発明のタンパク質の生物学的に活性な部分をコードする殺虫性タンパク質コードヌクレオチド配列の断片は、少なくとも約15、25、30、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200の連続アミノ酸、又は本発明の完全長殺虫性タンパク質に存在するアミノ酸の総数までをコードし得る。一部の実施形態では、断片は、タンパク質分解性の切断断片である。例えば、タンパク質分解性の切断断片は、配列番号21～74に関して、少なくとも約100のアミノ酸、約120、約130、約140、約150、若しくは約160のアミノ酸のN末端又はC末端の欠損を有していてもよい。一部の実施形態では、本発明に包含される断片は、例えば、タンパク質分解又はコード配列への停止コドンの挿入による、C末端結晶化ドメインの除去によって得られる。例えば、配列番号25、26、39～45、49～51、58、63～64、66、68、及び72～74に示される切断型アミノ酸配列を参照されたい。切断部位は、配列番号25、26、39～45、49～51、58、63～64、66、68、又は72～74の末端により

10

20

30

40

50

表される切断部位のいずれかの側で、(対応する完全長配列と比較して)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又はそれ以上のアミノ酸だけ変動し得ることとは理解されよう。

【0025】

本発明の好ましい殺虫性タンパク質は、配列番号1~20のヌクレオチド配列に十分に同一であるヌクレオチド配列によってコードされるか、又は殺虫性タンパク質は、配列番号21~74に示されるアミノ酸と十分に同一である。「十分に同一」とは、本明細書に記載するアラインメントプログラムの1つを使用して、標準的なパラメーターを用いて参照配列と比較した場合に、少なくとも約60%又は65%の配列同一性、約70%又は75%の配列同一性、約80%又は85%の配列同一性、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸又はヌクレオチド配列を意味する。当業者であれば、コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置などを考慮することにより、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するために、これらの数値を適切に調節できることを認識されよう。

10

【0026】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸の同一性(%)を決定するために、配列を最適に比較する目的でアラインメントする。2つの配列間の同一性(%)は、両配列が共通に有する同一の位置の数の関数である(すなわち、同一性(%) = 同一の位置の数 / 位置の総数(例えば重複位置) × 100)。一実施形態において、2つの配列は同じ長さである。別の実施形態では、同一性(%)は、参照配列(例えば、配列番号1~74のいずれかとして本明細書に開示する配列)の全長にわたって計算する。2つの配列間の同一性(%)は、許容できるギャップを含む、又は含まない、以下に記載のものと同様の技術を使用して決定することができる。典型的には、同一性(%)の算出に際し、完全な一致を計数する。ギャップ、すなわち、ある残基が、一方の配列には存在するが、他方には存在しないアラインメント内の位置を、非同一残基を有する位置としてみなす。

20

【0027】

2つの配列間の同一性(%)の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に使用した数学的アルゴリズムの非制限的な例としては、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877にあるように改変された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403のBLASTN及びBLASTXプログラムに組み込まれている。本発明の殺虫性物質様核酸分子と同一性のヌクレオチド配列を得るために、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて、BLASTヌクレオチド探索を実施することができる。本発明の殺虫性タンパク質分子と同一性のアミノ酸配列を得るために、BLASTXプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて、BLASTタンパク質探索を実施することができる。比較を目的とするギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389に記載されているように、Gapped BLAST (BLAST2.0中の)を用いることができる。あるいは、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係を検出する反復探索を実施することもできる。Altschul et al. (1997)前掲を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-Blastプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム(例えば、BLASTX及びBLASTN)のデフォルトパラメーターを用いることができる。アラインメントはまた、検査によって手動で行ってもよい。

30

40

【0028】

配列の比較に使用される数学的アルゴリズムの別の非制限的な例は、ClustalWアルゴリズムである(Higgins et al. (1994) Nucleic Ac

50

ids Res. 22:4673-4680)。ClustalWは、配列を比較して、アミノ酸又はDNA配列の全長をアラインメントし、このようにして、全アミノ酸配列の配列保存についてのデータを取得することができる。ClustalWアルゴリズムは、いくつかの市販されているDNA/アミノ酸解析ソフトウェアパッケージ、例えば、Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)のALIGNXモジュールで使用されている。ClustalWを用いてアミノ酸配列をアラインメントした後、アミノ酸同一性(%)を評価することができる。ClustalWアラインメントの解析に有用なソフトウェアプログラムの非制限的例としては、GENEDOC(商標)がある。GENEDOC(商標)(Karl Nicholas)は、複数のタンパク質同士のアミノ酸(又はDNA)類似性及び同一性の評価を可能にする。配列の比較に使用される数学的アルゴリズムの別の非制限的例としては、Myers and Miller(1988)CABIOS 4:11-17のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10(Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USAから市販されている)の一部である、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを使用する場合には、PAM120重量残基表、ギャップ長ペナルティー:12、及びギャップペナルティー:4を用いることができる。

10

【0029】

20

特に記載のない限り、配列同一性又は類似性を決定するために、以下のパラメーターを用いて、Needleman and Wunsch(1970)J. Mol. Biol. 48(3):443-453のアルゴリズムを用いたGAP Version 10を使用する:ヌクレオチド配列の同一性(%)及び類似性(%)については、ギャップウェイト(GAP Weight):50及びレングスウェイト(Length Weight):3、並びにnws gap dna. cmpスコアリング・マトリックスを用い;アミノ酸配列の同一性(%)又は類似性(%)については、ギャップウェイト:8及びレングスウェイト:2、並びにBLOSUM62スコアリングプログラムを用いる。また、等価なプログラムを用いてもよい。「等価なプログラム」とは、GAP Version 10によって生成された対応するアラインメントと比較したとき、同一のヌクレオチド残基の一致及び同一の配列同一性(%)を有するアラインメントを、対象となる任意の2つの配列について、生成する任意の配列比較プログラムを意味する。

30

【0030】

本発明はまた、変異体核酸分子も包含する。殺虫性タンパク質をコードするヌクレオチド配列の「変異体」は、本明細書に開示した殺虫性タンパク質をコードするが、遺伝子コードの縮重のために保存的に異なる配列、並びに、前述したように十分に同一な配列を含む。天然に存在する対立遺伝子変異体は、周知の分子生物学技術、例えば、以下に概説するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及びハイブリダイゼーション技術を用いることによって同定することができる。また、変異体ヌクレオチド配列は、合成により得られたヌクレオチド配列も含み、これらは、例えば、部位特異的突然変異誘発によって作製されているが、以下に述べるような本発明に開示する殺虫性タンパク質を依然としてコードする。本発明に包含される変異体タンパク質は、生物学的に活性であり、すなわち、ネイティブタンパク質の要望される生物活性、すなわち、殺虫活性を引き続き有している。「活性を保持する」とは、変異体が、ネイティブタンパク質の殺虫活性の少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約70%、又は少なくとも約80%を有することを意味する。殺虫活性を測定するための方法は、当分野において公知である。例えば、Czapla and Lang(1990)J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al.(1988)Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al.(1985)J. of Economic Entomology 78:290-293;並びに米国特許第5,743,477号明

40

50

細書を参照されたい。尚、これらは全て、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

【0031】

当業者はさらに、本発明のヌクレオチド配列の突然変異によって変化を導入することができ、これにより、タンパク質の生物学的活性を変えることなく、コードされる殺虫性タンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらすことも理解されよう。従って、1つ又は複数のアミノ酸置換、付加又は欠失が、コードされるタンパク質に導入されるように、1つ又は複数のヌクレオチド置換、付加、又は欠失を本明細書に開示の対応するヌクレオチド配列に導入することによって、単離核酸分子の変異体を作成することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発及びPCR介在突然変異誘発などの標準的な技術によって導入することができる。このような変異体ヌクレオチド配列も本発明に包含される。

10

【0032】

例えば、保存的アミノ酸置換は、1つ又は複数の予測される非必須アミノ酸残基に実施してもよい。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変化させることなく、殺虫性タンパク質の野生型配列から改変することができる残基であるのに対し、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる残基である。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。

20

【0033】

デルタ-エンドトキシンは、一般に、5つの保存配列ドメインと、3つの保存構造ドメインとを有する（例えば、de Maagd et al. (2001) Trends Genetics 17: 193-199を参照）。第1の保存構造ドメインは、7つのヘリックスから構成され、膜挿入及び孔形成に關与する。ドメインIIは、グリークキー立体配置に配置された3つのシートから構成され、ドメインIIIは、「ゼリーロール(jelly-roll)」構造の2つの逆平行のシートから構成される（de Maagd et al., 2001、前掲）。ドメインII及びIIIは、受容体の認識及び受容体との結合に關与することから、毒素特異性の決定因子と考えられている。

30

【0034】

アミノ酸置換は、機能を保持する非保存領域中で実施してもよい。一般に、このような置換は、残基が、タンパク質の活性に必須である、保存アミノ酸残基、又は保存モチーフ内に常在するアミノ酸残基に対しては行なわれない。保存され、しかもタンパク質活性に必須であると考えられる残基の例としては、例えば、類似又は関連毒素と本発明の配列とのアラインメントに含まれる全てのタンパク質の間で同一の残基（例えば、相同性タンパク質のアラインメントにおいて同一の残基）がある。保存されているが、保存的アミノ酸置換が可能であり、依然として活性を保持し得る残基の例としては、例えば、類似又は関連毒素と本発明の配列とのアラインメントに含まれる全てのタンパク質の間で保存的置換のみを有する残基（例えば、相同性タンパク質のアラインメントに含まれる全てのタンパク質の間で保存的置換のみを有する残基で同一の残基）がある。しかし、当業者であれば、機能的変異体が、保存残基においてわずかな保存された変化又は非保存の変化を有し得ることは理解されよう。

40

【0035】

あるいは、変異体ヌクレオチド配列は、飽和突然変異誘発などにより、コード配列の全部又は一部に沿って無作為に突然変異を導入することによって作製することもでき、得ら

50

れた突然変異体を、それが殺虫活性を付与する能力についてスクリーニングすることにより、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発後、コードされたタンパク質を組換えにより発現させることができ、タンパク質の活性を標準的なアッセイ技術を用いて決定することができる。

【0036】

PCR、ハイブリダイゼーションなどの方法を用いて、対応すると思われる殺虫性配列を同定することができるが、このような配列は、本発明の配列と実質的な同一性（例えば、参照配列の全長にわたって少なくとも約70%、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上の配列同一性）を有すると共に、殺虫活性を有するか、又は付与する。例えば、Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 及び Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY) を参照されたい。

【0037】

ハイブリダイゼーション法において、殺虫性ヌクレオチド配列の全部又は一部を用いて、cDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。このようなcDNA及びゲノムライブラリーの構築方法は、一般に当技術分野において公知であり、また、Sambrook and Russell, 2001、前掲に開示されている。いわゆるハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNA断片、cDNA断片、RNA断片、又はその他のオリゴヌクレオチドであってよく、³²Pなどの検出可能な基、又は、他の放射性同位体、蛍光化合物、酵素、若しくは酵素補因子などの任意の他の検出可能なマーカを用いて、標識してもよい。ハイブリダイゼーション用のプローブを、本明細書に開示する公知の殺虫性タンパク質コードヌクレオチド配列に基づいて合成オリゴヌクレオチドを標識することにより作製することができる。加えて、ヌクレオチド配列又はコードされたアミノ酸配列における保存ヌクレオチド若しくはアミノ酸残基に基づいて設計された変性プライマーを使用することもできる。プローブは、典型的には、本発明の殺虫性タンパク質をコードするヌクレオチド配列又はその断片若しくは変異体の少なくとも約12、少なくとも約25、少なくとも約50、75、100、125、150、175、200、又は250の連続ヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。ハイブリダイゼーション用プローブを調製するための方法は、一般に当分野において公知であり、また、Sambrook and Russell, 2001、前掲（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0038】

例えば、本明細書に開示する全殺虫性配列、又はその1つ又は複数の部分を、対応する殺虫性タンパク質様配列及びメッセンジャーRNAに特異的にハイブリダイズすることができるプローブとして用いてもよい。様々な条件下で特異的なハイブリダイゼーションを達成するために、このようなプローブは、ユニークであると共に、好ましくは長さが少なくとも約10ヌクレオチド、又は長さが少なくとも約20ヌクレオチドの配列を含む。このようなプローブを用いて、PCRにより選択した生物又はサンプルから、対応する殺虫性配列を増幅することができる。この技術は、対象の生物から、さらに別のコード配列を単離するために、又は生物中のコード配列の存在を決定するための診断アッセイとして用いることもできる。ハイブリダイゼーション技術は、プレーティングしたDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを含む（ブランク又はコロニーのいずれか；例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) を参照）。

【0039】

従って、本発明は、ハイブリダイゼーション用のプローブ、並びに本発明のヌクレオチド配列の全部又は一部（少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400、少なくとも約500、1000、1200、1500、2000、3000、3500、又は本明細書に開示するヌクレオチドの完全長まで）とのハイブリダイゼーションが可能なヌクレオチド配列を包含する。このような配列のハイブリダイゼーションは、ストリンジেন্টな条件下で実施してよい。「ストリンジেন্টな条件」又は「ストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件」とは、プローブが、その標的配列に、検出可能に、その他の配列より強度に（例えば、少なくともバックグラウンドの2倍）ハイブリダイズする条件を意味する。ストリンジেন্টな条件は配列依存的であり、かつ、様々な状況において異なり得る。ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄条件のストリンジエンシーを制御することによって、プローブと100%相補的な標的配列を同定することができる（相同性プロービング）。あるいは、より低い程度の類似性が検出されるように、ストリンジエンシー条件を調整して配列中にいくらかのミスマッチを許容することもできる（異種プロービング）。一般に、プローブは、長さが約1000ヌクレオチド未満であり、好ましくは長さが500ヌクレオチド未満である。

【0040】

典型的には、ストリンジেন্টな条件とは、塩濃度が、pH 7.0 ~ 8.3において約1.5 M未満のNaイオン、典型的には約0.01 ~ 1.0 MのNaイオン濃度（又はその他の塩）であり、かつ、温度が、短いプローブ（例えば、10 ~ 50ヌクレオチド）については少なくとも約30、また長いプローブ（例えば、50ヌクレオチド超）については少なくとも約60である条件である。ストリンジেন্টな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成され得る。低ストリンジエンシー条件の例としては、30 ~ 35%のホルムアミドのバッファー溶液、1 M NaCl、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を用いた37でのハイブリダイゼーション、及び1x ~ 2x SSC（20x SSC = 3.0 M NaCl / 0.3 Mクエン酸三ナトリウム）による50 ~ 55での洗浄が挙げられる。中程度ストリンジエンシー条件の例としては、40 ~ 45%のホルムアミド、1.0 M NaCl、1% SDSにおける37でのハイブリダイゼーション、及び0.5x ~ 1x SSCによる55 ~ 60での洗浄が挙げられる。高ストリンジエンシー条件の例としては、50%ホルムアミド、1 M NaCl、1% SDSにおいて37でのハイブリダイゼーション、及び0.1x SSCによる60 ~ 65での洗浄が挙げられる。任意選択で、洗浄バッファーは、約0.1% ~ 約1% SDSを含んでもよい。ハイブリダイゼーションの期間は、一般に、約24時間未満、通常約4 ~ 約12時間である。

【0041】

特異性は、典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄の関数であり、重要な因子は、最終洗浄溶液のイオン強度及び温度である。DNA - DNAハイブリッドの場合、 T_m は、Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267 - 284の式： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%form) - 500/L$ （式中、Mは、一価のカチオンのモル濃度であり、%GCは、DNA中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドの割合（%）であり、%formは、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの割合（%）であり、Lは、塩基対中のハイブリッドの長さである）から概算することができる。 T_m は、（規定のイオン強度及びpH下で）相補的標的配列の50%が、完全に一致したプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m は、1%のミスマッチにつき約1低下する；従って、要望される同一性の配列とハイブリダイズするように、 T_m 、ハイブリダイゼーション、及び/又は洗浄条件を調整することができる。例えば、90%の同一性を有する配列が求められる場合、 T_m を10減少させることができる。一般に、ストリンジেন্টな条件は、規定のイオン強度及びpHで、特異的配列及びその相補体の熱融解温度（thermal melting point）（ T_m ）よりも約5低くなるように選択される。しかし、極めてストリンジেন্টな条件は、熱融解温度（ T_m ）よりも1、2、3、若し

10

20

30

40

50

くは4 低いハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用することができ; 中程度にストリンジェンタな条件は、熱融解温度(T_m)よりも6、7、8、9、若しくは10 低いハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用することができ; 低ストリンジェンシー条件は、熱融解温度(T_m)よりも11、12、13、14、15、若しくは20 低いハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用することができる。式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成、並びに要望される T_m を用いることで、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄溶液のストリンジェンシーの変動が本質的に説明されることを当業者は理解するだろう。要望されるミスマッチの程度により、 T_m が45 (水溶液)又は32 (ホルムアミド溶液)を下回る場合、より高い温度を使用できるようにSSC濃度を増加することが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションに対する詳細な指針は、以下: Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York); 及び Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) にみいだされる。Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) を参照されたい。

10

20

【0042】

単離タンパク質並びにその変異体及び断片

殺虫性タンパク質もまた本発明に包含される。「殺虫性タンパク質」とは、配列番号21~74に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。また、その断片、生物学的に活性な部分、及び変異体も提供され、本発明の方法を実施するために用いることができる。「組換えタンパク質」又は「組換えポリペプチド」は、その自然の環境にはもはや存在せず、組換えタンパク質又は組換えポリペプチドが、天然に存在するものとは(例えば、化学組成若しくは構造が)異なるように、ネイティブタンパク質に対して操作されたタンパク質を指すために用いられる。

30

【0043】

「断片」又は「生物学的に活性な部分」は、配列番号21~74に示されるアミノ酸配列と十分に同一なアミノ酸配列を含み、しかも殺虫活性を示すポリペプチド断片を含む。殺虫性タンパク質の生物学的に活性な部分は、長さが、例えば、10、25、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、又はそれ以上のアミノ酸であるポリペプチドであってよい。このような生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製することができ、また、殺虫活性について評価することができる。殺虫活性を測定するための方法は、当分野においてよく知られている。例えば、Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252: 199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78: 290-293; 及び米国特許第5,743,477号明細書を参照されたい。尚、これらの文献は全て、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。本明細書で用いられるように、断片は、配列番号21~74の少なくとも8つ連続したアミノ酸を含む。しかし、本発明は、それ以外の断片、例えば前記タンパク質中の、長さ約10、20、30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、又はそれ以上のアミノ酸の任意の断片も包含する。

40

50

【0044】

「変異体」とは、配列番号21～74のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも約60%、65%、約70%、75%、約80%、85%、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質又はポリペプチドを意味する。変異体はまた、ストリンジェントな条件下で、配列番号1～20の核酸分子とハイブリダイズする核酸分子又はその相補体によってコードされるポリペプチドを含む。変異体は、突然変異誘発によりアミノ酸配列が異なるポリペプチドを含む。本発明によって包含される変異体タンパク質は、生物学的に活性であり、すなわち、ネイティブタンパク質の要望される生物活性を引き続き有し、すなわち、殺虫活性を保持している。殺虫活性を測定するための方法は、当分野において公知である。例えば、Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; 及び米国特許第5,743,477号明細書を参照されたい。尚、これらの文献は全て、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

10

【0045】

細菌遺伝子、例えば、本発明のaxmi遺伝子は、オープンリーディングフレームの開始点に近接して複数のメチオニン開始コドンを含むことが極めて多い。往々にして、1つ又は複数のこれらの開始コドンからの翻訳開始により、機能性タンパク質の生成がもたらされ得る。これらの開始コドンは、ATGコドンを含んでもよい。しかし、バチルス属種(Bacillus sp.)などの細菌は、開始コドンとしてコドンGTGも認識し、GTGコドンから翻訳を開始するタンパク質は、最初のアミノ酸としてメチオニンを含む。稀に、細菌系での翻訳は、TTGコドンを開始することができるが、このイベントにおいて、TTGは、メチオニンをコードする。さらに、細菌において、これらのコドンのどれが天然に使用されているのか先験的に決定されることは少ない。従って、別のメチオニンコドンのうちの1つを使用しても、殺虫性タンパク質の生成が達成され得ることが理解される。これらの殺虫性タンパク質は、本発明に包含され、本発明の方法で用いることができる。植物に発現させるとき、適正な翻訳のために、別の開始コドンをATGに改変する必要があることは理解されよう。

20

30

【0046】

本発明の様々な実施形態において、殺虫性タンパク質は、本明細書に開示する完全長ヌクレオチドから推定されるアミノ酸配列、及び別の下流の開始部位の使用によって、完全長配列よりも短いアミノ酸配列を含む。従って、本発明のヌクレオチド配列並びに/又は本発明のヌクレオチド配列を含むベクター、宿主細胞、及び植物(並びに本発明のヌクレオチド配列を作製及び使用する方法)は、表1に記載するアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0047】

本発明のポリペプチド、又はその変異体もしくは断片に対する抗体もまた包含される。抗体を作製するための方法は、当分野において公知である(例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 米国特許第4,196,265号明細書を参照)。

40

【0048】

従って、本発明の一態様は、本発明のタンパク質又はペプチド分子及びその相同体、融合物若しくは断片の1つ又は複数に特異的に結合する抗体、一本鎖抗原結合分子、又はその他のタンパク質に関する。特に好ましい実施形態では、抗体は、配列番号21～74に記載されるアミノ酸配列又はその断片を有するタンパク質と特異的に結合する。別の実施形態では、抗体は、配列番号21～74に記載されるアミノ酸配列又はその断片から選択されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質と特異的に結合する。

50

【0049】

本発明の抗体を用いて、本発明のタンパク質又はペプチド分子を定量的又は定性的に検出するか、又は本発明のタンパク質の翻訳後修飾を検出することができる。本明細書で用いられるように、結合が、非関連分子の存在によって競合的に阻害されていなければ、抗体又はペプチドは、本発明のタンパク質又はペプチド分子と「特異的に結合する」と言う。

【0050】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質又はペプチド分子の検出に有用なキット内に収容してもよい。本発明はさらに、本発明のタンパク質又はペプチド分子（特に、配列番号21～74に示されるアミノ酸配列によりコードされるタンパク質、本発明の抗体と特異的に結合することができるその変異体又は断片を含む）を検出する方法も含み、この方法は、本発明の抗体とサンプルを接触させるステップと、該サンプルが、本発明のタンパク質又はペプチド分子を含有するかどうかを決定するステップを含む。目的のタンパク質又はペプチド分子の検出のために抗体を使用する方法は、当分野では公知である。

【0051】

改変又は改良された変異体

殺虫性タンパク質のDNA配列は、様々な方法によって改変することができること、また、これらの改変により、本発明の殺虫性タンパク質によってコードされるものとは異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA配列が生じ得ることは認識されよう。このタンパク質は、配列番号21～74の1つ又は複数のアミノ酸のアミノ酸置換、欠失、切断短縮、及び挿入（最大約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約100、約105、約110、約115、約120、約125、約130、約135、約140、約145、約150、約155、又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失又は挿入を含む）を含む様々な方法で改変され得る。このような操作のための方法は当分野において一般に公知である。例えば、殺虫性タンパク質のアミノ酸配列変異体は、DNA中の突然変異によって調製することができる。これはまた、突然変異誘発及び/又は指向性進化でのいくつかの形態の1つによって達成され得る。一部の態様では、アミノ酸配列中でコードされる変化は、タンパク質の機能に実質的に影響を及ぼさない。このような変異体は、要望される殺虫活性を有する。しかし、殺虫活性を付与する殺虫性タンパク質の能力が、本発明の組成物にこのような技術を用いることによって改善され得ることは理解されよう。例えば、XL-1Red (Stratagene, La Jolla, CA) のように、DNA複製中に高い割合の塩基の誤取り込みを示す宿主細胞において、殺虫性タンパク質を発現することができる。このような株での増殖後、DNAを単離し（例えば、プラスミドDNAを調製することによって、又はPCRにより増幅し、得られたPCR断片をベクターにクローニングすることによって）、非突然変異誘発株において殺虫性タンパク質突然変異体を培養した後、例えば、殺虫活性について試験するためのアッセイを実施することによって、殺虫活性を有する突然変異遺伝子を同定することができる。一般に、タンパク質は、混合した後、摂食アッセイで使用する。例えば、Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78: 290-293を参照されたい。このようなアッセイは、植物を1種又は複数の害虫と接触させた後、植物が生存する能力及び/又は害虫を死滅させる能力を決定することを含み得る。毒性の増大をもたらす突然変異の例は、Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806にみいだされる。

【0052】

あるいは、実質的に活性に影響を及ぼすことなく、多数のタンパク質のタンパク質配列のアミノ又はカルボキシ末端に改変を実施してもよい。これは、PCR増幅に用いられるオリゴヌクレオチドにアミノ酸コード配列を包含させることによってタンパク質コード配列を改変又は伸長するPCR増幅を含む、PCRなどの、近年の分子法によって導入され

10

20

30

40

50

る挿入、欠失、又は改変を含み得る。これ以外にも、付加されるタンパク質配列は、タンパク質融合物を作製するために当分野で一般的に使用されるものなどの、全タンパク質コード配列を含んでもよい。このような融合タンパク質は、多くの場合、(1)目的とするタンパク質の発現を増大させるために、(2)タンパク質精製、タンパク質検出、又は当分野で公知の他の実験での使用を容易にする目的で、結合ドメイン、酵素活性、又はエピトープを導入するために、(3)細胞内小器官、例えばグラム陰性細菌の細胞膜周辺腔、又は真核細胞の小胞体(後者により、タンパク質のグリコシル化が起こることが多い)へのタンパク質の分泌又は翻訳をターゲティングするために使用される。

【0053】

本発明の変異体ヌクレオチド及びアミノ酸配列はまた、DNAシャッフリングなどの突然変異誘発及び組換え誘導手順から得られた配列を包含する。このような手順を用いて、1つ又は複数の異なる殺虫性タンパク質コード領域を使用することにより、要望される特性を有する新規の殺虫性タンパク質を作出することができる。このように、組換えポリヌクレオチドのライブラリーは、実質的な配列同一性を有し、しかも *in vitro* 又は *in vivo* で相対的に組換えることができる配列領域を含む関連配列ポリヌクレオチドの集団から作製される。例えば、この手法を用いて、目的とする改善された特性、例えば、増大した殺虫活性を有するタンパク質をコードする新規の遺伝子を得るために、目的のドメインをコードする配列モチーフを、本発明の殺虫性遺伝子と他の公知の殺虫性遺伝子との間でシャッフルしてもよい。このようなDNAシャッフリングの戦略は、当分野において公知である。例えば、Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; 及び米国特許第5,605,793号明細書及び同第5,837,458号明細書を参照されたい。

【0054】

ドメインスワッピング又はシャッフリングは、改変された殺虫性タンパク質を作製するための別の機序である。ドメインは、殺虫性タンパク質間で交換することができ、これによって、改善された殺虫活性又は標的スペクトルを有するハイブリッド又はキメラ毒素が得られる。組換えタンパク質を作製し、殺虫活性についてそれらを試験するための方法は、当分野において公知である(例えば、Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925を参照)。

【0055】

また別の実施形態では、以下:エラーブローンPCR、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、アセンブリPCR、セクシャル(sexual)PCR突然変異誘発、*in vivo*突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リクルーシブ・アンサンブル突然変異誘発(recursive ensemble mutagenesis)、エクスポネンシャル・アンサンブル突然変異誘発(exponential ensemble mutagenesis)、部位特異的突然変異誘発、遺伝子リアセンブリ(gene reassembly)、遺伝子部位飽和突然変異誘発、順列突然変異誘発(permutational mutagenesis)、合成ライゲーションリアセンブリ(SLR)、組換え、繰返し配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型突然変異誘発、ギャップド・デュプレックス突然変異誘発(gapped dupl

10

20

30

40

50

ex mutagenesis)、ポイントミスマッチ修復突然変異誘発 (point mismatch repair mutagenesis)、修復欠損宿主株突然変異誘発、化学突然変異誘発、放射線突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限 - 選択突然変異誘発、制限 - 精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発 (ensemble mutagenesis)、キメラ核酸多量体作出の1つ又は複数を用いて、変異体ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列を得ることができる。

【0056】

ベクター

本発明の殺虫性配列は、目的の植物において発現させるための発現カセットにおいて提供することができる。「植物発現カセット」とは、植物細胞においてオープンリーディングフレームからタンパク質の発現を誘導することができるDNA構築物を意味する。典型的には、これらはプロモータ及びコード配列を含む。多くの場合、このような構築物はまた、3'非翻訳領域も含む。このような構築物は、葉緑体(若しくはその他の色素体)、小胞体、又はゴルジ装置などの特定の細胞内構造への、翻訳と同時又は翻訳後のペプチドの輸送を促進するための「シグナル配列」又は「リーダー配列」を含有してもよい。

10

【0057】

「シグナル配列」とは、細胞膜を通して、翻訳と同時又は翻訳後のペプチドの輸送を誘導することがわかっているか、又はそのように考えられている配列を意味する。真核生物では、これは、典型的にはゴルジ装置への分泌を伴い、その結果一部はグリコシル化される。細菌の殺虫性毒素は、プロトキシンとして合成されることが多いが、これは、標的害虫の腸管内でタンパク質分解的に作用する(Chang(1987)Methods Enzymol. 153:507-516)。本発明の一部の実施形態では、シグナル配列は、ネイティブ配列内に位置するものであるか、又は本発明の配列に由来するものであってもよい。「リーダー配列」とは、翻訳されると、翻訳と同時に、細胞内小器官へのペプチド鎖の輸送を引き起こすのに十分なアミノ酸配列をもたらず任意の配列を意味する。従って、これは、小胞体への通過、液胞、色素体(葉緑体を含む)、ミトコンドリアなどへの通過によって、輸送及び/又はグリコシル化をターゲティングするリーダー配列を含む。

20

【0058】

「植物形質転換ベクター」とは、植物細胞の効率的な形質転換に必要とされるDNA分子を意味する。このような分子は、1つ又は複数の植物発現カセットから構成されるものでよく、2つ以上の「ベクター」DNA分子に組織化され得る。例えば、バイナリーベクターは、植物細胞の形質転換のために必要な全てのシス及びトランス作用機能をコードするために2つの非連続的なDNAベクターを使用する植物形質転換ベクターである(Hellens and Mullineaux(2000)Trends in Plant Science 5:446-451)。「ベクター」は、異なる宿主細胞間での移動のために設計された核酸構築物を指す。「発現ベクター」は、外来細胞において異種DNA配列又は断片を取り込み、組み込み、及び発現させる能力を有するベクターを指す。カセットは、本発明の配列に作動可能に連結された5'及び/又は3'調節配列を含む。「作動可能に連結された」とは、プロモータと第2配列との間の機能的連結を意味し、ここで、プロモータ配列は、第2配列に対応するDNA配列の転写を開始及び媒介する。一般に、作動可能に連結されたとは、連結される核酸配列が連続的であると共に、2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合には連続的であり、しかも同じリーディングフレーム内にあることを意味する。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、微生物宿主細胞又は植物宿主細胞などの宿主細胞において、前記ヌクレオチド配列の発現を指令することができる異種プロモータに作動可能に連結されている。このカセットはさらに、生物に共形質転換しようとする少なくとも1つの追加の遺伝子を含有していてもよい。あるいは、追加の遺伝子(群)を複数の発現カセット上に提供してもよい。

30

40

【0059】

様々な実施形態において、本発明のヌクレオチド配列は、プロモータ、例えば、植物

50

ロモータと作動可能に連結している。「プロモータ」は、下流のコード配列の転写を指令するように機能する核酸配列をいう。プロモータは、他の転写及び翻訳調節核酸配列（「制御配列」とも呼ばれる）と共に、目的のDNA配列の発現に必要である。

【0060】

このような発現カセットは、調節領域の転写調節下になるように殺虫性配列を挿入するための複数の制限酵素部位を備えている。

【0061】

発現カセットは、転写の5' - 3'方向に、植物において機能する、転写及び翻訳開始領域（すなわちプロモータ）、本発明のDNA配列、並びに翻訳及び転写終結領域（すなわち終結領域）を含む。プロモータは、植物宿主及び/又は本発明のDNA配列に対して、ネイティブ若しくは類似であってもよいし、又は、外来若しくは異種であってもよい。さらに、プロモータは、天然の配列であっても、又は合成配列であってもよい。プロモータが植物宿主に対して「ネイティブ」又は「相同性」である場合、そのプロモータは、プロモータが導入された天然の植物に存在することを意味する。プロモータが、本発明のDNA配列に対して「外来」又は「異種」である場合、本発明の作動可能に連結されたDNA配列に対して、プロモータが、ネイティブではないか、又は天然に存在するプロモータではないことを意味する。

【0062】

終結領域は、転写開始領域に対してネイティブであってもよいし、目的の作動可能に連結されたDNA配列に対してネイティブであってもよいし、植物宿主に対してネイティブであってもよく、又は別の起源に由来するもの（すなわち、プロモータ、目的のDNA配列、植物宿主、又はその任意の組合せに対して外来又は異種）であってもよい。オクトピニンターゼ及びノパリンシンターゼ終結領域などの好都合な終結領域は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) のTiプラスミドから入手することができる。Guérineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141 - 144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671 - 674; Sanfalcon et al. (1991) Genes Dev. 5: 141 - 149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2: 1261 - 1272; Munroe et al. (1990) Gene 91: 151 - 158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891 - 7903; 並びに Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627 - 9639もまた参照されたい。

【0063】

必要に応じて、形質転換された宿主細胞での発現を増大させるように、遺伝子を最適化してもよい。すなわち、発現の向上のために宿主細胞に好ましいコドンを用いて遺伝子を合成することができるし、又は宿主に好ましいコドン使用頻度でコドンを用いて遺伝子を合成することもできる。一般に、遺伝子のGC含量は増加する。例えば、宿主の好ましいコドン使用頻度の考察のためには、例えば、Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92: 1 - 11を参照されたい。植物に好ましい遺伝子を合成するための方法が当分野において入手可能である。例えば、米国特許第5,380,831号明細書及び同第5,436,391号明細書、並びにMurray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477 - 498 (参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0064】

一実施形態では、殺虫性タンパク質は、葉緑体での発現のためにターゲティングされる。この方法において、殺虫性タンパク質が葉緑体中に直接挿入されない場合には、発現カセットは、殺虫性タンパク質を葉緑体に誘導する輸送ペプチドをコードする核酸をさらに含み得る。このような輸送ペプチドは当分野において公知である。例えば、Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104 - 126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:

10

20

30

40

50

17544 - 17550 ; Della - Cioppa et al . (1987) Plant Physiol . 84 : 965 - 968 ; Romer et al . (1993) Biochem . Biophys . Res . Commun . 196 : 1414 - 1421 ; 及び Shah et al . (1986) Science 233 : 478 - 481 を参照されたい。

【 0065 】

葉緑体にターゲティングされる殺虫性遺伝子は、植物核とこの細胞小器官の間のコドン使用頻度の差を考慮して、葉緑体での発現のために最適化することができる。この方法では、葉緑体に好ましいコドンを用いて、目的の核酸を合成することができる。例えば、米国特許第 5 , 380 , 831 号明細書 (参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

10

【 0066 】

植物形質転換

本発明の方法は、ヌクレオチド構築物を植物に導入するステップを含む。「導入」とは、構築物が植物の細胞内部に進入できるような様式で、植物にヌクレオチド構築物を付与することを意味する。本発明の方法は、植物にヌクレオチド構築物を導入する特定の方法の使用を必要とせず、ヌクレオチド構築物が、植物の少なくとも 1 つの細胞の内部に進入できることだけを必要とする。ヌクレオチド構築物を植物に導入するための方法は当分野において公知であり、限定はしないが、安定な形質転換法、一過性形質転換法、及びウイルス媒介法などが挙げられる。

20

【 0067 】

「植物」とは、全植物、植物器官 (例えば、葉、幹、根など)、種子、植物細胞、むかご、胚、及びその子孫を意味する。植物細胞は、分化した、又は未分化細胞のいずれであってもよい (例えば、カルス、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉細胞、根細胞、師部細胞、花粉) 。

【 0068 】

「トランスジェニック植物」又は「形質転換植物」又は「安定に形質転換された」植物若しくは細胞若しくは組織は、植物細胞に外因性核酸配列若しくは DNA 断片が取り込まれた、又は組み込まれた植物を指す。これらの核酸配列は、外因性の、又は非形質転換植物細胞に存在しない核酸配列、並びに、内因性の、又は非形質転換植物細胞に存在する核酸配列を含む。「異種」は、一般に、細胞、又はそれらが存在するネイティブゲノムの一部に対して内因性ではなく、感染、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクションなどによって細胞に付加された核酸配列を指す。

30

【 0069 】

本発明のトランスジェニック植物は、本明細書に開示する新規の毒素配列の 1 つ又は複数を発現する。一部の実施形態では、本発明のタンパク質又はヌクレオチド配列は、植物において、該植物に有用な農業特性を付与するタンパク質又は RNA をコードする他の遺伝子と組み合わせるのが有利である。形質転換植物に有用な農業特性を付与するタンパク質又は RNA をコードする遺伝子としては、1 種又は複数の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質、及び特定の昆虫に対する耐性を付与するタンパク質、特定の疾患に対する耐性を付与するタンパク質をコードする DNA 配列、線虫若しくは昆虫防除をもたらす RNA をコードする DNA など を 挙 げ る こ と が 可 能 である。このような遺伝子は、特に、公開 PCT 特許出願 : 国際公開第 91 / 02071 号パンフレット及び同第 95 / 06128 号パンフレット、並びに米国特許第 7 , 923 , 602 号明細書及び米国特許出願公開第 20100166723 号明細書に記載されている。尚、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【 0070 】

形質転換植物細胞及び植物に、特定の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質をコードする DNA の中でも、以下のものを挙げるることができる : グルホシネート除草剤に対す

50

る耐性を付与する、国際公開第2009/152359号パンフレットに記載のbar若しくはPAT遺伝子又はストレプトマイセス・セリカラー(*Streptomyces coelicolor*)遺伝子、グリホサート及びその塩など、標的としてEPSPSを有する除草剤に対する耐性を付与する好適なEPSPSをコードする遺伝子(米国特許第4,535,060号明細書、同第4,769,061号明細書、同第5,094,945号明細書、同第4,940,835号明細書、同第5,188,642号明細書、同第4,971,908号明細書、同第5,145,783号明細書、同第5,310,667号明細書、同第5,312,910号明細書、同第5,627,061号明細書、同第5,633,435号明細書)、グリホサート-n-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子(例えば、米国特許第8,222,489号明細書、同第8,088,972号明細書、同第8,044,261号明細書、同第8,021,857号明細書、同第8,008,547号明細書、同第7,999,152号明細書、同第7,998,703号明細書、同第7,863,503号明細書、同第7,714,188号明細書、同第7,709,702号明細書、同第7,666,644号明細書、同第7,666,643号明細書、同第7,531,399号明細書、同第7,527,955号明細書、及び同第7,405,704号明細書)、グリホサートオキシドレダクターゼをコードする遺伝子(例えば、米国特許第5,463,175号明細書)、又はHPPD阻害剤耐性タンパク質をコードする遺伝子(例えば、国際公開第2004/052191号パンフレット、同第199638567号パンフレット、米国特許第6791014号明細書、国際公開第2011/068567号パンフレット、同第2011/076345号パンフレット、同第2011/085221号パンフレット、同第2011/094205号パンフレット、同第2011/068567号パンフレット、同第2011/094199号パンフレット、同第2011/094205号パンフレット、同第2011/145015号パンフレット、同第2012056401号パンフレット、並びにPCT/US2013/59598号パンフレットに記載のHPPD阻害剤耐性遺伝子)。

【0071】

標的としてEPSPSを有する除草剤に対する耐性を付与する好適なEPSPSをコードするDNA配列の中でも、特に、植物EPSPS、とりわけ、トウモロコシEPSPS、具体的には、2つの突然変異(特に、アミノ酸位置102の突然変異とアミノ酸位置106の突然変異(国際公開第2004/074443号パンフレット))を含むトウモロコシEPSPSをコードする遺伝子で、米国特許出願公開第6566587号明細書に記載されており、本明細書では以後二重突然変異体トウモロコシEPSPS若しくは2mEPSPSと呼ぶ遺伝子、又はアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)から単離されたEPSPSをコードする遺伝子で、米国特許第5,633,435号明細書の配列番号2及び配列番号3により記載されている遺伝子(CP4とも呼ばれる)が挙げられる。

【0072】

標的としてEPSPSを有する除草剤に対する耐性を付与する好適なEPSPSをコードするDNA配列の中でも、特に、アルスロバクター・グロビフォルミス(*Arthrobacter globiformis*)由来の、EPSPSをコードする遺伝子GRG23、さらには、突然変異体GRG23 ACE1、GRG23 ACE2、若しくはGRG23 ACE3、具体的には、国際公開第2008/100353号パンフレットに記載のGRG23の突然変異体若しくは変異体、例えば、国際公開第2008/100353号パンフレットに記載の配列番号29のGRG23(ace3)R173Kが挙げられる。

【0073】

EPSPSをコードする、より具体的には、前記遺伝子をコードするDNA配列の場合には、これらの酵素をコードする配列の前に、輸送ペプチド、とりわけ、米国特許第5,510,471号明細書又は同第5,633,448号明細書に記載の「最適化輸送ペプチド」をコードする配列が位置しているのが有利である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

本発明の核酸と組み合わせることができる除草剤耐性の形質の例として、以下のものがさらに挙げられる：少なくとも1つのALS（アセト乳酸シンターゼ）阻害剤（国際公開第2007/024782号パンフレット）；突然変異シロイヌナズナ（*Arabidopsis*）ALS/AHAS遺伝子（米国特許第6,855,533号明細書）；代謝により2,4-D（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸）に耐性を付与する、2,4-D-モノオキシナーゼコード遺伝子（米国特許第6,153,401号明細書）；代謝によりジカンバ（3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸）に対する耐性を付与する、ジカンバモノオキシゲナーゼコード遺伝子（米国特許第2008/0119361号明細書及び米国特許第2008/0120739号明細書）。

10

【 0 0 7 5 】

様々な実施形態では、本発明の核酸は、1種又は複数のHPPD除草剤耐性遺伝子、並びに/又はグリホサート及び/若しくはグルホシネートに対して耐性の1種又は複数の遺伝子などの1種又は複数の除草剤耐性遺伝子とスタッキングさせる。

【 0 0 7 6 】

昆虫に対する耐性の特性に関するタンパク質をコードするDNA配列の中でも、より具体的には、文献に広く記載され、当分野でもよく知られているBtタンパク質が挙げられる。また、フォトラブダス（*Photographus*）属などの細菌から抽出されたタンパク質（国際公開第97/17432号パンフレット及び国際公開第98/08932号パンフレット）も挙げられる。

20

【 0 0 7 7 】

昆虫に対する耐性の新たな特性を付与する昆虫のタンパク質をコードするこうしたDNA配列の中でも、より具体的には、文献に広く記載され、当分野でもよく知られているBt Cry又はVIPタンパク質が挙げられる。これらは、以下のものを含む：Cry1Fタンパク質又はCry1Fタンパク質由来のハイブリッド（例えば、米国特許第6,326,169号明細書；米国特許第6,281,016号明細書；米国特許第6,218,188号明細書に記載のハイブリッドCry1A-Cry1Fタンパク質、若しくはそれらの毒性断片）、Cry1Aタイプタンパク質又はその毒性断片、好ましくはCry1Acタンパク質又はCry1Acタンパク質由来のハイブリッド（例えば、米国特許第5,880,275号明細書に記載のハイブリッドCry1Ab-Cry1Acタンパク質）又は欧州特許第451878号明細書に記載のCry1Ab又はBt2タンパク質若しくはその殺虫性断片、国際公開第2002/057664号パンフレットに記載のCry2Ae、Cry2Af若しくはCry2Agタンパク質又はそれらの毒性断片、国際公開第2007/140256号パンフレットに記載のCry1A.105タンパク質（配列番号7）若しくはその毒性断片、NCBIアクセッション番号ABG20428のVIP3Aa19タンパク質、NCBIアクセッション番号ABG20428のVIP3Aa20タンパク質（国際公開第2007/142840号パンフレットに記載の配列番号2）、COT202若しくはCOT203ワタイベントにおいて生成されるVIP3Aタンパク質（それぞれ、国際公開第2005/054479号パンフレット及び国際公開第2005/054480号パンフレット）、国際公開第2001/47952号パンフレットに記載のCryタンパク質、Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28; 93(11): 5389-94及び米国特許第6,291,156号明細書に記載のVIP3Aaタンパク質若しくはその毒性断片、ゼノラブダス（*Xenorhabdus*）属（国際公開第98/50427号パンフレットに記載）、セラチア（*Serratia*）属（特に、セラチア・エントモフィラ（*S. entomophila*）若しくはフォトラブダス（*Photographus*）属種株由来の殺虫性タンパク質、例えば、国際公開第98/08932号パンフレット（例えば、Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11): 5017-24; French-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5); 8

30

40

50

28-33)に記載されるようなフォトラブダス(Photorhabdus)属由来のTcタンパク質。また、前記配列、特に、その毒性断片の配列のいずれかからいくつか(1~10、好ましくは1~5)のアミノ酸が異なる前記タンパク質、あるいは、色素体輸送ペプチドなどの輸送ペプチド、又は別のタンパク質若しくはペプチドと誘導した前記タンパク質のいずれかが1つの任意の変異体若しくは突然変異体も本明細書に含まれる。

【0078】

様々な実施形態では、本発明の核酸は、植物の場合、除草剤耐性、昆虫耐性、干ばつ耐性、線虫防除、水利用効率、窒素利用効率、改善された栄養価、疾患抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された繁殖などの望ましい形質を付与する1つ又は複数の遺伝子と組み合わせることができる。

10

【0079】

同じ種の植物において、本発明の遺伝子と組み合わせることができる(例えば、交雑により、又は本発明のキメラ遺伝子を用いて、別のトランスジェニックイベントを含む植物を再形質転換することにより)特に有用なトランスジェニックイベントとして、以下のものが挙げられる：イベント531/PV-GHBK04(ワタ、昆虫防除、国際公開第2002/040677号パンフレットに記載)；イベント1143-14A(ワタ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2006/128569号パンフレットに記載)；イベント1143-51B(ワタ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2006/128570号パンフレットに記載)；イベント1445(ワタ、除草剤耐性、寄託なし、米国特許出願第2002-120964号明細書若しくは国際公開第2002/034946号パンフレットに記載)；イベント17053(コメ、除草剤耐性、PTA-9843として寄託、国際公開第2010/117737号パンフレットに記載)；イベント17314(コメ、除草剤耐性、PTA-9844として寄託、国際公開第2010/117735号パンフレットに記載)；イベント281-24-236(ワタ、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-6233として寄託、国際公開第2005/13266号パンフレット若しくは米国特許出願第2005-216969号明細書に記載)；イベント3006-210-23(ワタ、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-6233として寄託、米国特許出願第2007-143876号明細書若しくは国際公開第2005/103266号パンフレットに記載)；イベント3272(トウモロコシ、品質形質、PTA-9972として寄託、国際公開第2006/098952号パンフレット若しくは米国特許出願第2006-230473号明細書に記載)；イベント33391(コムギ、除草剤耐性、PTA-2347として寄託、国際公開第2002/027004号パンフレットに記載)；イベント40416(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-11508として寄託、国際公開第11/075593号パンフレットに記載)；イベント42A47(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-11509として寄託、国際公開第2011/075595号パンフレットに記載)；イベント5307(トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA-9561として寄託、国際公開第2010/077816号パンフレットに記載)；イベントASR-368(ベントグラス、除草剤耐性、ATCC PTA-4816として寄託、米国特許出願第2006-162007号明細書若しくは国際公開第2004/053062号パンフレットに記載)；イベントB16(トウモロコシ、除草剤耐性、寄託なし、米国特許出願第2003-126634号明細書に記載)；イベントBPS-CV127-9(ダイズ、除草剤耐性、NCIMB番号41603として寄託、国際公開第2010/080829号パンフレットに記載)；イベントBLR1(ナタネ、雄性不稔性の回復、NCIMB41193として寄託、国際公開第2005/074671号パンフレットに記載)；イベントCE43-67B(ワタ、昆虫防除、DSM ACC2724として寄託、米国特許出願第2009-217423号明細書若しくは国際公開第2006/128573号パンフレットに記載)；イベントCE44-69D(ワタ、昆虫防除、寄託なし、米国特許出願第2010-0024077号明細書に記載)；イベントCE44-69D(ワタ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2006/128571号パンフレットに記載)；イベントCE46-02A(ワタ、昆虫防

20

30

40

50

除、寄託なし、国際公開第2006/128572号パンフレットに記載) ; イベントCOT102 (ワタ、昆虫防除、寄託なし、米国特許出願第2006-130175号明細書若しくは国際公開第2004/039986号パンフレットに記載) ; イベントCOT202 (ワタ、昆虫防除、寄託なし、米国特許出願第2007-067868号明細書若しくは国際公開第2005/054479号パンフレットに記載) ; イベントCOT203 (ワタ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2005/054480号パンフレットに記載) ;) ; イベントDAS21606-3/1606 (ダイズ、除草剤耐性、PTA-11028として寄託、国際公開第2012/033794号パンフレットに記載) ; イベントDAS40278 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-10244として寄託、国際公開第2011/022469号パンフレットに記載) ; イベントDAS-44406-6/pDAB8264.44.06.1 (ダイズ、除草剤耐性、PTA-11336として寄託、国際公開第2012/075426号パンフレットに記載) ; イベントDAS-14536-7/pDAB8291.45.36.2 (ダイズ、除草剤耐性、PTA-11335として寄託、国際公開第2012/075429号パンフレットに記載) ; イベントDAS-59122-7 (トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA 11384として寄託、米国特許出願第2006-070139号明細書に記載) ; イベントDAS-59132 (トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、寄託なし、国際公開第2009/100188号パンフレットに記載) ; イベントDAS68416 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC PTA-10442として寄託、国際公開第2011/066384号パンフレット若しくは国際公開第2011/066360号パンフレットに記載) ; イベントDP-098140-6 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-8296として寄託、米国特許出願第2009-137395号明細書若しくは国際公開第08/112019号パンフレットに記載) ; イベントDP-305423-1 (ダイズ、品質形質、寄託なし、米国特許出願第2008-312082号明細書若しくは国際公開第2008/054747号パンフレットに記載) ; イベントDP-32138-1 (トウモロコシ、ハイブリダイゼーション系、ATCC PTA-9158として寄託、米国特許出願第2009-0210970号明細書若しくは国際公開第2009/103049号パンフレットに記載) ; イベントDP-356043-5 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC PTA-8287として寄託、米国特許出願第2010-0184079号明細書若しくは国際公開第2008/002872号パンフレットに記載) ; イベントEE-1 (ナス、昆虫防除、寄託なし、国際公開第07/091277号パンフレットに記載) ; イベントFI117 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209031として寄託、米国特許出願第2006-059581号明細書若しくは国際公開第98/044140号パンフレットに記載) ; イベントFG72 (ダイズ、除草剤耐性、PTA-11041として寄託、国際公開第2011/063413号パンフレットに記載) ; イベントGA21 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209033として寄託、米国特許出願第2005-086719号明細書若しくは国際公開第98/044140号パンフレットに記載) ; イベントGG25 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209032として寄託、米国特許出願第2005-188434号明細書若しくは国際公開第98/044140号パンフレットに記載) ; イベントGHB119 (トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-8398として寄託、国際公開第2008/151780号パンフレットに記載) ; イベントGHB614 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-6878として寄託、米国特許出願第2010-050282号明細書若しくは国際公開第2007/017186号パンフレットに記載) ; イベントGJ11 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209030として寄託、米国特許出願第2005-188434号明細書若しくは国際公開第98/044140号パンフレットに記載) ; イベントGM RZ13 (テンサイ、ウイルス耐性、NCIMB-41601として寄託、国際公開第2010/076212号パンフレットに記載) ; イベントH7-1 (テンサイ、除草剤耐性、NCIMB41158若しくはNCIMB41159として寄託、米国特許出願第2004-172669号明細書若しくは国際公開第2

10

20

30

40

50

004/074492号パンフレットに記載) ; イベントJ O P L I N 1 (コムギ、除草剤耐性、寄託なし、米国特許出願第2008-064032号明細書に記載) ; イベントLL27 (ダイズ、除草剤耐性、NCIMB41658として寄託、国際公開第2006/108674号パンフレット若しくは米国特許出願第2008-320616号明細書に記載) ; イベントLL55 (ダイズ、除草剤耐性、NCIMB41660として寄託、国際公開第2006/108675号パンフレット若しくは米国特許出願第2008-196127号明細書に記載) ; イベントL L c o t t o n 2 5 (ワタ、除草剤耐性、ATCC PTA-3343として寄託、国際公開第2003/013224号パンフレット若しくは米国特許出願第2003-097687号明細書に記載) ; イベントL L R I C E 0 6 (コメ、除草剤耐性、ATCC 203353として寄託、米国特許第6,468,747号明細書若しくは国際公開第2000/026345号パンフレットに記載) ; イベントL L R i c e 6 2 (コメ、除草剤耐性、ATCC 203352として寄託、国際公開第2000/026345号パンフレットに記載) ; イベントL L R I C E 6 0 1 (コメ、除草剤耐性、ATCC PTA-2600として寄託、米国特許出願第2008-2289060号明細書若しくは国際公開第2000/026356号パンフレットに記載) ; イベントL Y 0 3 8 (トウモロコシ、品質形質、ATCC PTA-5623として寄託、米国特許出願第2007-028322号明細書若しくは国際公開第2005/061720号パンフレットに記載) ; イベントM I R 1 6 2 (トウモロコシ、昆虫防除、PTA-8166として寄託、米国特許出願第2009-300784号明細書若しくは国際公開第2007/142840号パンフレットに記載) ; イベントM I R 6 0 4 (トウモロコシ、昆虫防除、寄託なし、米国特許出願第2008-167456号明細書若しくは国際公開第2005/103301号パンフレットに記載) ; イベントM O N 1 5 9 8 5 (ワタ、昆虫防除、ATCC PTA-2516として寄託、米国特許出願第2004-250317号明細書若しくは国際公開第2002/100163号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 1 0 (トウモロコシ、昆虫防除、寄託なし、米国特許出願第2002-102582号明細書若しくは記載) ; イベントM O N 8 6 3 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA-2605として寄託、国際公開第2004/011601号パンフレット若しくは米国特許出願第2006-095986号明細書に記載) ; イベントM O N 8 7 4 2 7 (トウモロコシ、受粉調節、ATCC PTA-7899として寄託、国際公開第2011/062904号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 4 6 0 (トウモロコシ、ストレス耐性、ATCC PTA-8910として寄託、国際公開第2009/111263号パンフレット若しくは米国特許出願第2011-0138504号明細書に記載) ; イベントM O N 8 7 7 0 1 (ダイズ、昆虫防除、ATCC PTA-8194として寄託、米国特許出願第2009-130071号明細書若しくは国際公開第2009/064652号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 7 0 5 (ダイズ、品質形質 - 除草剤耐性、ATCC PTA-9214として寄託、米国特許出願第2010-0080887号明細書若しくは国際公開第2010/037016号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 7 0 8 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC PTA-9670として寄託、国際公開第2011/034704号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 7 1 2 (ダイズ、収量、ATCC PTA-10296として寄託、国際公開第2012/051199号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 7 5 4 (ダイズ、品質形質、ATCC PTA-9385として寄託、国際公開第2010/024976号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 7 7 6 9 (ダイズ、品質形質、ATCC PTA-8911として寄託、米国特許出願第2011-0067141号明細書若しくは国際公開第2009/102873号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 8 0 1 7 (トウモロコシ、昆虫防除 - 除草剤耐性、ATCC PTA-5582として寄託、米国特許出願第2008-028482号明細書若しくは国際公開第2005/059103号パンフレットに記載) ; イベントM O N 8 8 9 1 3 (ワタ、除草剤耐性、ATCC PTA-4854として寄託、国際公開第2004/072235号パンフレット若しくは米国特許出願第2006-059590号明細書に記載) ; イベントM O N 8 8 3

02 (ナタネ、除草剤耐性、PTA - 10955として寄託、国際公開第2011/153186号パンフレットに記載) ; イベントMON88701 (ワタ、除草剤耐性、PTA - 11754として寄託、国際公開第2012/134808号パンフレットに記載) ; イベントMON89034 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA - 7455として寄託、国際公開第07/140256号パンフレット若しくは米国特許出願第2008-260932号明細書に記載) ; イベントMON89788 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC PTA - 6708として寄託、米国特許出願第2006-282915号明細書若しくは国際公開第2006/130436号パンフレットに記載) ; イベントMS11 (ナタネ、受粉調節 - 除草剤耐性、ATCC PTA - 850若しくはPTA - 2485として寄託、国際公開第2001/031042号パンフレットに記載) ; イベントMS8 (ナタネ、受粉調節 - 除草剤耐性、ATCC PTA - 730として寄託、国際公開第2001/041558号パンフレット若しくは米国特許出願第2003-188347号明細書に記載) ; イベントNK603 (トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA - 2478として寄託、米国特許出願第2007-292854号明細書に記載) ; イベントPE-7 (コメ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2008/114282号パンフレットに記載) ; イベントRF3 (ナタネ、受粉調節 - 除草剤耐性、ATCC PTA - 730として寄託、国際公開第2001/041558号パンフレット若しくは米国特許出願第2003-188347号明細書に記載) ; イベントRT73 (ナタネ、除草剤耐性、寄託なし、国際公開第2002/036831号パンフレット若しくは米国特許出願第2008-070260号明細書に記載) ; イベントSYHT0H2/SYH-000H2-5 (ダイズ、除草剤耐性、PTA - 11226として寄託、国際公開第2012/082548号パンフレットに記載) ; イベントT227-1 (テンサイ、除草剤耐性、寄託なし、国際公開第2002/44407号パンフレット若しくは米国特許出願第2009-265817号明細書に記載) ; イベントT25 (トウモロコシ、除草剤耐性、寄託なし、米国特許出願第2001-029014号明細書若しくは国際公開第2001/051654号パンフレットに記載) ; イベントT304-40 (ワタ、昆虫防除 - 除草剤耐性、ATCC PTA - 8171として寄託、米国特許出願第2010-077501号明細書若しくは国際公開第2008/122406号パンフレットに記載) ; イベントT342-142 (ワタ、昆虫防除、寄託なし、国際公開第2006/128568号パンフレットに記載) ; イベントTC1507 (トウモロコシ、昆虫防除 - 除草剤耐性、寄託なし、米国特許出願第2005-039226号明細書若しくは国際公開第2004/09947号パンフレットに記載) ; イベントVIP1034 (トウモロコシ、昆虫防除 - 除草剤耐性、ATCC PTA - 3925として寄託、国際公開第2003/052073号パンフレットに記載) ; イベント32316 (トウモロコシ、昆虫防除 - 除草剤耐性、PTA - 11507として寄託、国際公開第2011/084632号パンフレットに記載) ; イベント4114 (トウモロコシ、昆虫防除 - 除草剤耐性、PTA - 11506として寄託、国際公開第2011/084621号パンフレットに記載) ; 任意選択で、イベントEE-GM1/LL27若しくはイベントEE-GM2/LL55とスタッキングしたイベントEE-GM3/FG72 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC アクセセッション番号PTA - 11041) (国際公開第2011/063413A2号パンフレット) ; イベントDAS-68416-4 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC アクセセッション番号PTA - 10442、国際公開第2011/066360A1号パンフレット) ; イベントDAS-68416-4 (ダイズ、除草剤耐性、ATCC アクセセッション番号PTA - 10442、国際公開第2011/066384A1号パンフレット) ; イベントDP-040416-8 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCC アクセセッション番号PTA - 11508、国際公開第2011/075593A1号パンフレット) ; イベントDP-043A47-3 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCC アクセセッション番号PTA - 11509、国際公開第2011/075595A1号パンフレット) ; イベントDP-004114-3 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCC アクセセッション番号PTA - 11506、国際公開第2011/084621A1号パンフレット) ; イベントDP-032

316-8 (トウモロコシ、昆虫防除、ATCCアクセッション番号PTA-11507、国際公開第2011/084632A1号パンフレット)、イベントMON-88302-9 (ナタネ、除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-10955、国際公開第2011/15384A1号パンフレット)、イベントDAS-21606-3 (ダイズ、除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-11028、国際公開第2012/033794A1号パンフレット)、イベントMON-87712-4 (ダイズ、品質形質、ATCCアクセッション番号PTA-10296、国際公開第2012/051199A2号パンフレット)、イベントDAS-444006-6 (ダイズ、スタッキングした除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-11336、国際公開第2012/075426A1号パンフレット)、イベントDAS-14536-7 (ダイズ、スタッキングした除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-11335、国際公開第2012/075429A1号パンフレット)、イベントSYN-000H2-5 (ダイズ、除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-11226、国際公開第2012/082548A2号パンフレット)、イベントDP-061061-7 (ナタネ、除草剤耐性、入手可能な寄託番号なし、国際公開第2012071039A1号パンフレット)、イベントDP-073496-4 (ナタネ、除草剤耐性、入手可能な寄託番号なし、

10

米国特許第2012131692号明細書)、イベント8264.44.06.1 (ダイズ、スタッキングした除草剤耐性、ATCCアクセッション番号PTA-11336、国際公開第2012075426A2号パンフレット)、イベント8291.45.36.2 (ダイズ、スタッキングした除草剤耐性、アクセッション番号PTA-11335、国際公開第2012075429A2号パンフレット)、イベントSYHT0H2 (ダイズ、ATCCアクセッション番号PTA-11226、国際公開第2012/082548A2号パンフレット)、イベントMON88701 (ワタ、ATCCアクセッション番号PTA-11754、国際公開第2012/134808A1号パンフレット)、イベントKK179-2 (ムラサキウマゴヤシ、ATCCアクセッション番号PTA-11833、国際公開第2013/003558A1号パンフレット)、イベントpDAB8264.42.32.1 (ダイズ、スタッキングした除草剤耐性、アクセッション番号PTA-11993、国際公開第2013/010094A1号パンフレット)、イベントMZDT09Y (トウモロコシ、アクセッション番号PTA-13025、国際公開第2013/012775A1号パンフレット)。

20

30

【0080】

植物細胞の形質転換は、当分野において公知のいくつかの技術のうちの1つによって達成することができる。本発明の殺虫性遺伝子は、植物細胞での発現を取得又は増強するように修飾してもよい。典型的には、このようなタンパク質を発現する構築物は、遺伝子の転写を駆動するためのプロモータ、並びに、転写終結及びポリアダニル化を可能にするための3'非翻訳領域を含む。このような構築物の構成は、当分野において公知である。一部のケースでは、得られたペプチドが分泌されるか、又はそうでなければ植物細胞内でターゲットされるように、遺伝子を操作することが有用な場合もある。例えば、遺伝子を、小胞体へのペプチドの輸送を容易にするためのシグナルペプチドを含むように操作することができる。また、イントロンのmRNAプロセシングが発現に必要となるように、植物発現カセットを操作して、イントロンを含有させるのが好ましい場合もある。

40

【0081】

典型的には、この「植物発現カセット」は、「植物形質転換ベクター」に挿入されるだろう。この植物形質転換ベクターは、植物形質転換を達成するために必要な1つ又は複数のDNAベクターから含むものでもよい。例えば、2つ以上の連続したDNAセグメントを含む植物形質転換ベクターを使用することが、当分野において一般的に実施されている。これらのベクターは、当分野では一般に「バイナリーベクター」と呼ばれる。バイナリーベクター並びにヘルパープラスミドを有するベクターは、効率的な形質転換を達成する

50

のに必要なDNAセグメントのサイズ及び複雑性が極めて大きいアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介の形質転換に極めて頻繁に使用され、また、個別のDNA分子に機能を分離する上で有利である。バイナリーベクターは、典型的に、T-DNA導入に必要なシス作用配列 (例えば左境界及び右境界)、植物細胞において発現できるように操作された選択マーカ、及び「目的とする遺伝子」(トランスジェニック植物の作製が望まれる植物細胞において発現できるように操作された遺伝子) を含有するプラスミドベクターを含む。このプラスミドベクター上には、細菌複製に必要な配列も存在する。シス作用配列は、植物細胞への効率的な導入及びそこでの発現を可能とするように配置されている。例えば、選択マーカ遺伝子及び殺虫性遺伝子は、左境界と右境界の間に位置する。多くの場合、第2プラスミドベクターは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) から植物細胞へのT-DNAの導入を媒介するトランス作用因子を含む。このプラスミドは、往々にして、当分野では理解されているように、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による植物細胞の感染、及び境界配列での切断によるDNAの導入及び*vir*媒介DNA導入を可能にする、病原性機能 (*Vir* 遺伝子) を含む (Hellen and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5: 446 - 451)。いくつかのタイプのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 株 (例えば、LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105など) を植物形質転換に使用することができる。マイクロプロジェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ポリエチレングリコールなどの他の方法による植物の形質転換には、第2プラスミドベクターは必要ではない。

10

20

【0082】

一般に、植物形質転換方法は、異種DNAを標的植物細胞 (例えば、未成熟又は成熟胚、懸濁培養液、未分化カルス、プロトプラストなど) に導入するステップと、続いて、最大閾値レベルの適切な選択 (選択マーカー遺伝子に応じて) を適用することによって、非形質転換細胞集団の群から形質転換植物細胞を回収するステップを含む。典型的には、外植片を、新しく供給した同じ培地に移した後、常用的に培養する。その後、形質転換した細胞を、最大閾値レベルの選択試薬を補充した再生培地に配置して、形質転換細胞をシュートに分化させる。次に、シュートを選択発根培地に移し、根づいたシュート又は小植物を回収する。その後、トランスジェニック小植物は成熟植物へと生育し、稔性の種子を産生する (例えば、Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6: 271 - 282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745 - 750)。典型的には、外植片を、新しく供給した同じ培地に移した後、常用的に培養する。これらの技術についての一般的な記載及びトランスジェニック植物を作製するための方法は、Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219 - 239及びBommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107 - 120にみいだされる。形質転換された材料は多くの細胞を含むことから、形質転換細胞と非形質転換細胞の両方が、対象とする標的カルス又は組織又は細胞群のあらゆる断片に存在する。非形質転換細胞を死滅させて、形質転換細胞を増殖させる能力によって、形質転換植物の培養物が得られる。往々にして、非形質転換細胞を除去する能力は、迅速な形質転換植物細胞の回収及びトランスジェニック植物の作製の成功への制約となる。

30

40

【0083】

形質転換プロトコル並びにヌクレオチド配列を植物に導入するためのプロトコルは、形質転換の標的となる、植物又は植物細胞の種類、すなわち単子葉又は双子葉植物かに応じて変わり得る。トランスジェニック植物の作製は、限定はしないが、以下: マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、直接的な遺伝子導入、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による植物細胞への異種DNAの導入 (アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換)、粒子に付着させた異種外来DNAを用いた植物細胞のボンバードメント、バリスティック粒子加速、エアロゾルビーム形質転換

50

(米国特許出願公開第20010026941号明細書；米国特許第4,945,050号明細書；国際出願第91/00915号パンフレット；米国特許第2002015066号明細書)、Lec1形質転換、及びDNAを導入するための様々な他の非粒子直接媒介方法を含む、複数の方法のうちの一つによって実施することができる。

【0084】

葉緑体の形質転換のための方法は当分野では公知である。例えば、Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606を参照されたい。前記方法は、選択マーカを含むDNAの微粒子銃送達、及び相同組換えを介した色素体ゲノムへの該DNAのターゲティングによるものである。さらに、色素体の形質転換は、核にコードされ、かつ色素体を標的とするRNAポリメラーゼを組織優先的に発現させることにより、色素体由来のサイレントトランスジーンのトランス活性化によって達成することができる。このようなシステムは、McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305に報告されている。

10

【0085】

植物細胞に異種外来DNAを組み込んだ後、培地に最大閾値レベルの適切な選択を適用して、非形質転換細胞を死滅させてから、この選択処理から生き残った推定形質転換細胞を分離して、定期的に新しい培地に移すことにより増殖させる。連続的継代及び適切な選択による負荷により、プラスミドベクターで形質転換された細胞を同定し、増殖させる。次に、分子及び生化学的方法を用いて、トランスジェニック植物のゲノムに組み込まれた目的の異種遺伝子の存在を確認することができる。

20

【0086】

形質転換された細胞は、従来の方法に従って植物へと生育させることができる。例えば、McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84を参照されたい。続いて、これらの植物を生育させて、同じ形質転換株又は異なる株のいずれかを用いて受粉させ、こうして得られたハイブリッドで、要望される表現型特徴の構成的発現を有するものを同定する。要望される表現型特徴の発現が、安定に維持され、かつ遺伝されることを確実にするために、2世代以上を生育させてもよく、その後、要望される表現型特徴の発現が達成されたかを確認するために種子を収穫してもよい。このように、本発明は、本発明のヌクレオチド構築物、例えば、そのゲノムに安定に組み込まれた本発明の発現カセット、を有する形質転換した種子(「トランスジェニック種子」ともいう)を提供する。

30

【0087】

植物形質転換の評価

植物細胞に異種外来DNAを導入した後、植物ゲノムにおける異種遺伝子の形質転換又は組込みは、組み入れられた遺伝子に関連する核酸、タンパク質及び代謝物の分析などの様々な方法によって確認される。

【0088】

PCR解析は、土壌に移植する前の早期段階で、形質転換細胞、組織又はシュートを、組み入れられた遺伝子の存在についてスクリーニングするための迅速な方法である(Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。PCRは、目的の遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はアグロバクテリウム(Agrobacterium)ベクターバックグラウンドなどを用いて実施する。

40

【0089】

植物形質転換は、ゲノムDNAのサザンブロット解析によって確認することができる(Sambrook and Russell, 2001、前掲)。一般に、全DNAを形

50

質転換体から抽出し、適切な制限酵素で消化し、アガロースゲルで分画した後、ニトロセルロース又はナイロン膜に移す。続いて、膜又は「プロット」を、例えば放射標識した³²P標的DNA断片でプローブし、標準的な技術に従って植物ゲノムへの導入遺伝子の組み込みを確認する(Sambrook and Russell, 2001、前掲)。

【0090】

ノザンプロット解析では、当分野において常用される標準的な手順に従って、RNAを形質転換体の特定の組織から単離し、ホルムアルデヒドアガロースゲルで分画した後、ナイロンフィルター上にプロットする(Sambrook and Russell, 2001、前掲)。続いて、殺虫性遺伝子によりコードされるRNAの発現を、当分野において公知の方法により、殺虫性遺伝子由来の放射性プローブと上記フィルターをハイブリダイズすることによって試験する(Sambrook and Russell, 2001、前掲)。

10

【0091】

殺虫性タンパク質上に存在する1つ又は複数のエピトープに結合する抗体を用いて、標準的な手順(Sambrook and Russell, 2001、前掲)により、殺虫性遺伝子によってコードされるタンパク質の存在を確認するために、ウェスタンプロット、生化学アッセイなどをトランスジェニック植物に実施してもよい。

【0092】

植物における殺虫活性

本発明の別の態様では、殺虫活性を有する殺虫性タンパク質を発現するトランスジェニック植物を作製することができる。例として前述した方法を使用して、トランスジェニック植物を作製することができるが、トランスジェニック植物細胞を作製する方法は、本発明にとって重要ではない。アグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介の形質転換、微粒子銃形質転換、及び非粒子媒介方法などの当分野において公知の又は記載されている方法を、実験者の判断で使用してよい。殺虫性タンパク質を発現する植物は、例えば、カルスの形質転換、形質転換したカルスの選択、及びこのようなトランスジェニックカルスからの稔性植物の再生などの、当分野において記載されている一般的な方法によって単離することができる。このようなプロセスでは、植物細胞におけるその発現が、形質転換細胞を同定又は選択する能力を付与する限りにおいて、任意の遺伝子を選択マーカとして用いてよい。

20

30

【0093】

クロラムフェニコール、アミノグリコシドG418、ヒグロマイシンなどに対する抵抗性などの、植物細胞で使用するための多数のマーカが開発されている。葉緑体代謝に関する産物をコードする他の遺伝子もまた選択マーカとして用いることができる。例えば、グリホサート、プロモキシニル、又はイミダゾリノンなどの植物除草剤に対する抵抗性を付与する遺伝子は、特に有用となり得る。このような遺伝子は報告されている(Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem. 263: 6310-6314 (プロモキシニル抵抗性ニトリラーゼ遺伝子); 及びSathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 2188 (AHASイミダゾリノン抵抗性遺伝子)。さらに、本明細書に開示する遺伝子は、細菌又は植物細胞の形質転換を評価するためのマーカとして有用である。植物、植物器官(例えば、葉、幹、根など)、種子、植物細胞、むかご、又はその子孫におけるトランスジーンの有無を検出するための方法は、当分野において公知である。一実施形態において、トランスジーンの有無は、殺虫活性について試験することにより検出される。

40

【0094】

殺虫性タンパク質を発現する稔性植物を殺虫活性について試験して、最適活性を示す植物をその後の育種のために選択することができる。害虫活性についてアッセイするための方法は、当分野において利用可能である。一般に、タンパク質を混合した後、摂食アッセイに用いる。例えば、Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78: 290-293を参照されたい。

50

【0095】

本発明は、限定するものではないが、単子葉及び双子葉植物などの任意の植物種の形質転換に用いることができる。目的とする植物の例には、限定はしないが、以下：トウモロコシ (corn) (トウモロコシ (maize))、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、アブラナ科の植物、コショウ、ジャガイモ、ワタ、コメ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、タバコ、オオムギ、及びナタネ、アブラナ属 (Brassica) 種、ムラサキウマゴヤシ、ライムギ、キビ、ベニバナ、ピーナッツ、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、柑橘類の木、ココア、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミヤ、アーモンド、オートムギ、野菜、観葉植物、及び球果植物が含まれる。

10

【0096】

野菜としては、限定はしないが、トマト、レタス、インゲンマメ、ライマメ、エンドウ、並びにキュウリ属 (Cucumis) のメンバー (例えば、キュウリ、カンタローブ、及びマスクメロンなど) が挙げられる。観葉植物としては、限定はしないが、アザレア、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、スイセン、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、及びキクが挙げられる。好ましくは、本発明の植物は、穀物植物である (例えば、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、アブラナ科の植物、コショウ、ジャガイモ、ワタ、コメ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、タバコ、オオムギ、ナタネなど)。

【0097】

害虫防除における使用

害虫防除において、又は殺虫剤として他の生物を操作する上で、本発明のヌクレオチド配列又はその変異体を含む株を使用する一般的な方法は、当分野において公知である。例えば、米国特許第 5,039,523 号明細書及び欧州特許出願第 0480762A2 号明細書を参照されたい。

20

【0098】

本発明のヌクレオチド配列、若しくはその変異体を含むバチルス属 (Bacillus) 株、又は本発明の殺虫性遺伝子及びタンパク質を含むように遺伝子的に改変された微生物を、農業穀物及び生産物を害虫から保護するために使用することができる。本発明の一態様において、細胞を標的害虫の環境に適用した場合に細胞中で生産された毒素の活性を延長する試薬を用いて、毒素 (殺虫剤) を産生する生物の全細胞、すなわち、溶解していない細胞を処理する。

30

【0099】

あるいは、殺虫性遺伝子を細胞宿主に導入することによって、殺虫剤を産生させる。殺虫性遺伝子の発現によって、直接的又は間接的に、殺虫剤が細胞内に産生及び維持される。本発明の一態様では、これらの細胞を、細胞が標的害虫の環境に適用されると、細胞中に産生される毒素の活性を持続させる条件下で処理する。こうして得られた産物は、毒素の毒性を保持する。続いて、標的害虫を宿している環境、例えば、土壌、水、及び植物の枝葉への適用のために、これらの天然に封入された殺虫剤を従来技術に従って製剤化することができる。例えば、欧州特許出願公開第 A0192319 号明細書、及びそこに引用される文献を参照されたい。これ以外にも、例えば、得られた材料を殺虫剤として適用できるようにするために、本発明の遺伝子を発現する細胞を製剤化することも可能である。

40

【0100】

本発明の活性成分は、通常、組成物の形態で適用され、他の化合物と共に、同時に又は連続的に、処置しようとする穀物区域又は植物に適用することができる。これらの化合物は、肥料、除草剤、抗凍結剤、界面活性剤、洗浄剤、殺虫性石鹸、ドーマントオイル (dormant oils)、ポリマー、及び / 又は 1 回の製剤の適用後に標的領域の長期投与を可能にする徐放性もしくは生分解性担体制剤であってよい。それらはまた、必要に応じて、別の農学的に許容される担体、界面活性剤、又は製剤の分野で慣用的に使用され

50

る適用を促進する補助剤と一緒に、選択的除草剤、化学的殺虫剤、殺ウイルス剤、殺微生物剤、殺アメーバ剤、殺虫剤、殺真菌剤、殺菌剤、殺線虫剤、軟体類駆除剤、又はこれらの調製物のいくつかの混合物であってもよい。好適な担体及び補助剤は、固体又は液体であってよく、これらは、製剤技術で通常使用される物質、例えば、天然もしくは再生鉱物、溶媒、分散剤、湿潤剤、粘着剤、結合剤又は肥料に相当する。同様に、製剤は、標的害虫による殺虫性製剤の摂食又は摂取を可能にするように、摂食可能な「餌」として調製するか、又は「捕虫器」として形成してもよい。

【0101】

本発明の細菌株によって産生される殺虫性タンパク質の少なくとも1つを含む、本発明の活性成分又は本発明の農薬組成物を適用する方法としては、葉への適用、種子コーティング及び土壌への適用がある。適用回数及び適用の割合は、対応する害虫による外寄生の強度に応じて変動する。

10

【0102】

前記組成物は、粉末、粉塵、ペレット、顆粒、スプレー、乳濁剤、コロイド、溶液などとして製剤化することができ、前記ポリペプチドを含む細胞培養物の乾燥、凍結乾燥、均質化、抽出、ろ過、遠心分離、沈降、又は濃縮のような従来の手段によって調製することができる。少なくとも1種の前記殺虫性ポリペプチドを含むこのような組成物の全てにおいて、前記ポリペプチドは、約1重量%～約99重量%の濃度で存在し得る。

【0103】

チョウ目、カメムシ目、ハエ目、又は甲虫目の害虫は、所与の区域において本発明の方法により死滅させるか、若しくは数を減少させる、又は被害を受けやすい害虫による外寄生を防ぐために環境区域に予防的に適用することができる。好ましくは、害虫に、殺虫有効量のポリペプチドを摂取させるか、又はそれと接触させる。「殺虫有効量」とは、少なくとも1種の害虫を死滅させるか、又は害虫の増殖、摂食、若しくは正常な生理学的発達を顕著に抑制することができる殺虫剤の量を意味する。この量は、防除しようとする特定の標的害虫、処置しようとする特定の環境、場所、植物、穀物、又は農業用地、環境条件、並びに殺虫に有効なポリペプチド組成物の適用の方法、割合、濃度、安定性及び量などの因子に応じて変動し得る。製剤はまた、気候条件、環境への配慮、及び/又は適用頻度及び/又は害虫外寄生の重度に関しても変わり得る。

20

【0104】

本明細書に記載する殺虫性組成物は、細菌細胞、結晶及び/若しくは孢子懸濁液、又は単離タンパク質成分のいずれかを、要望の農業的に許容される担体と共に製剤化することによって作製することができる。組成物は、投与前に、凍結乾燥、フリーズドライ、乾燥などの適切な手段で、又は水性担体、媒体若しくは適切な希釈剤、例えば、食塩水又は他のバッファー中で製剤化することができる。製剤化された組成物は、粉塵若しくは顆粒材料、あるいは油（植物油若しくは鉱物油）、又は水もしくは油/水乳濁剤中の懸濁液として、又は湿潤可能な粉末として、又は農業適用に適した任意の他の担体材料と組み合わせた形態であってよい。好適な農学的担体は、固体又は液体であってよく、当分野において公知である。用語「農学的に許容される担体」は、農薬製剤技術に通常用いられる全ての補助剤、不活性成分、分散剤、界面活性剤、粘着剤、結合剤などを含み；これらは、農薬製剤分野の当業者には周知である。製剤は、1種以上の固体又は液体補助剤と混合してもよく、従来の製剤技術を用いて、適切な補助剤と共に、殺虫性組成物を例えば、均一に混合、ブレンド及び/又は粉碎するなどの様々な手段によって調製することができる。適切な製剤及び適用法は、米国特許第6,468,523号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

30

40

【0105】

「害虫」は、限定はしないが、昆虫、真菌、細菌、線虫、ダニ、マダニなどを含む。昆虫害虫は、以下：甲虫目（Coleoptera）、ハエ目（Diptera）、ハチ目（Hymenoptera）、チョウ目（Lepidoptera）、ハジラミ目（Mallophaga）、ヨコバイ亜類（Homoptera）、カメムシ目（Hemiptera）

50

era)、バッタ目(Orthoptera)、アザミウマ目(Thysanoptera)、ハサミムシ目(Dermaptera)、シロアリ目(Isoptera)、シラミ目(Anoplura)、ノミ目(Siphonaptera)、トビケラ目(Trichoptera)など、特に甲虫目(Coleoptera)、チョウ目(Lepidoptera)及びハエ目(Diptera)から選択される昆虫を含む。

【0106】

甲虫目(Coleoptera)は、オサムシ(Adephaga)及びカブトムシ(Polyphaga)亜目を含む。オサムシ(Adephaga)亜目は、オサムシ(Caraboidea)及びミズスマシ(Gyrinoidea)上科を含み、またカブトムシ(Polyphaga)亜目は、ガムシ(Hydrophiloidea)、ハネカクシ(Staphylinidea)、ジョウカイボン(Cantharoidea)、カッコウムシ(Cleroidea)、コメツキムシ(Elateroidea)、ナガフナガタムシ(Dascilloidea)、ドロムシ(Dryopoidea)、マルトゲムシ(Byrrhoidea)、ヒダラムシ(Cucujoidea)、ツチハンミョウ(Meloidea)、モルデロイデア(Mordelloidea)、ゴミムシダマシ(Tenebrionoidea)、ナガシンクイムシ(Bostrichidea)、コガネムシ(Scarabaeoidea)、カミキリムシ(Cerambycoidea)、ハムシ(Chrysomeloidea)、及びゾウリムシ(Curculionoidea)上科を含む。オサムシ(Caraboidea)上科は、ハンミョウ(Cicindelidae)、オサムシ(Carabidae)、及び水カブトムシ(Dytiscidae)科を含む。ミズスマシ(Gyrinoidea)上科は、ミズスマシ(Gyrinidae)科を含む。ガムシ(Hydrophiloidea)上科は、ガムシ(Hydrophilidae)科を含む。ハネカクシ(Staphylinidea)上科は、シテムシ(Silphidae)及びハネカクシ(Staphylinidae)科を含む。ジョウカイボン(Cantharoidea)上科は、ジョウカイボン(Cantharidae)及びホタル(Lampyridae)科を含む。カッコウムシ(Cleroidea)上科は、カッコウムシ(Cleridae)及びカツオブシムシ(Dermestidae)科を含む。コメツキムシ(Elateroidea)上科は、コメツキムシ(Elateridae)及びタマムシ(Buprestidae)科を含む。ヒダラムシ(Cucujoidea)上科は、テントウムシ(Coccinellidae)科を含む。ツチハンミョウ(Meloidea)上科は、ツチハンミョウ(Meloidae)科を含む。ゴミムシダマシ(Tenebrionoidea)上科は、ゴミムシダマシ(Tenebrionidae)科を含む。コガネムシ(Scarabaeoidea)上科は、クロツヤムシ(Passalidae)及びコガネムシ(Scarabaeidae)科を含む。カミキリムシ(Cerambycoidea)上科は、カミキリムシ(Cerambycidae)科を含む。ハムシ(Chrysomeloidea)上科は、ハムシ(Chrysomelidae)科を含む。ゾウリムシ(Curculionoidea)上科は、ゾウリムシ(Curculionidae)及びキクイムシ(Scolytidae)科を含む。

【0107】

ハエ目(Diptera)は、長角亜目(Nematocera)、短角亜目(Brachycera)及び還縫亜目(Cyclorhapha)を含む。長角亜目(Nematocera)は、ガガンボ(Tipulidae)、チョウバエ(Psychodidae)、カ(Culicidae)、ヌカカ(Ceratopogonidae)、ユスリカ(Chironomidae)、ブユ(Simuliidae)、ケバエ(Bibionidae)、及びタマバエ(Cecidomyiidae)科を含む。短角亜目(Brachycera)は、ミズアブ(Stratiomyidae)、アブ(Tabanidae)、ツルギアブ(Therevidae)、ムシヒキアブ(Asilidae)、ムシヒキアブモドキ(Mydidae)、ツリアブ(Bombyliidae)、及びアシナガバエ(Dolichopodidae)科を含む。還縫亜目(Cyclorh

10

20

30

40

50

hapha)は、無額囊群(Aschiza)及び無額囊群(Aschiza)門を含む。無額囊群(Aschiza)門は、ノミバエ(Phoridae)、ハナアブ(Syrphidae)、及びメバエ(Conopidae)科を含む。無額囊群(Aschiza)門は、無弁翅(Acalyptratae)及び弁翅(Calyptratae)節を含む。無弁翅(Acalyptratae)節は、マダラバエ(Otitidae)、ミバエ(Tephritidae)、ハモグリバエ(Agromyzidae)、及びシヨウジョウバエ(Drosophilidae)科を含む。弁翅(Calyptratae)節は、シラミバエ(Hippoboscidae)、ヒツジバエ(Oestridae)、ヤドリバエ(Tachinidae)、ハナバエ(Anthomyiidae)、イエバエ(Muscidae)、クロバエ(Calliphoridae)、及びニクバエ(Sarcophagidae)科を含む。

10

【0108】

チョウ目(Lepidoptera)は、アゲハチョウ科(Papilionidae)、シロチョウ科(Pieridae)、シジミチョウ科(Lycaenidae)、タテハチョウ科(Nymphalidae)、マダラチョウ科(Danaidae)、ジャノメチョウ科(Satyridae)、セセリチョウ科(Hesperidae)、スズメガ科(Sphingidae)、ヤマユガ科(Saturniidae)、シャクガ科(Geometridae)、ヒトリガ科(Arctiidae)、ヤガ科(Nocuidae)、ドクガ科(Lymantriidae)、スカシバガ科(Sesiidae)及びヒロズコガ科(Tineidae)を含む。

20

【0109】

線虫は、ヘテロデラ属(Heterodera)種、メロイドジン属(Meloidogyne)種、及びグロボデラ属(Globodera)種を含むネコブ、シスト、及びネグサレ線虫などの寄生性線虫を含み、特に、限定はしないが、ヘテロデラ・グリシン(Heterodera glycines)(ダイズシスト線虫)；ヘテロデラ・シャクチ(Heterodera schachtii)(ビートシスト線虫)；ヘテロデラ・アベナエ(Heterodera avenae)(穀類シスト線虫)；並びにグロボデラ・ロストシエンシス(Globodera rostochiensis)及びグロボデラ・パイルダ(Globodera pallida)(ジャガイモシスト線虫)などのシスト線虫のメンバーを含む。ネグサレ線虫は、プラティレンクス属(Pratylenchus)種を含む。

30

【0110】

半翅類(Hemipteran)(カメムシ目(Hemiptera)、ヨコバイ亜目(Homoptera)、又はカメムシ亜目(Heteroptera)と称される種を含む)の害虫は、限定はしないが、以下を含む：メクラカメムシ科(Lygus)種、例えば、ウエスターン・ターニシュド・プラントバグ(Western tarnished plant bug)(リグス・ヘスペルス(Lygus hesperus))、メクラカメムシ(リグス・リネオラリス(Lygus lineolaris))、及びミドリメクラカメムシ(リグス・エリス(Lygus elisus))；アブラムシ、例えば、モモアカアブラムシ(ミズス・ベルシカエ(Myzus persicae))、ワタアブラムシ(アフィス・ゴシピ(Aphis gossypii))、チェリーアブラムシ若しくはブラックチェリーアブラムシ(ミズス・セラシ(Myzus cerasi))、ダイズアブラムシ(アフィス・グリシンズ・マツムラ(Aphis glycines Matsumura))；トビイロウンカ(ニラパルバタ・ルゲンス(Nilaparvata lugens))、及びツマグロヨコバイ(ネホティックス属種(Nephotettix spp.))；並びにカメムシ、例えば、ミドリカメムシ(アクロステヌム・ヒラレ(Acrosternum hilare))、クサギカメムシ(ハリオモルファ・ハリス(Halyomorpha halys))、ミナミアオカメムシ(ネザラ・ピリデュラ(Nezara viridula))、イネカメムシ(エバルス・プナクス(Oebalus pugnax))、フォレストバグ(forest b

40

50

ug) (ペンタトマ・ルフィペス (*Pentatoma rufipes*))、ヨーロッパカメムシ (ラフィガステル・ヌブロサ (*Rhaphigaster nebulosa*))、及びカメムシ (トロイラス・ルリダス (*Troilus luridus*))。

【0111】

主要な作物についての本発明の昆虫害虫には以下が含まれる：トウモロコシ：オストリニア・ヌビラリス (*Ostrinia nubilalis*) (ヨーロッパアワノメイガ)；アグロティス・イプシロン (*Agrotis ipsilon*) (タマナヤガ)；ヘリコベルパ・ゼア (*Helicoverpa zea*) (アメリカタバコガ)；スポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) (ヨトウガ)；ジ
10 アトラエア・グランジオセラ (*Diatraea grandiosella*) (南西部アワノメイガ)；エラスモパルプス・リグノセルス (*Elasmopalpus lignosellus*) (モロコシマダラメイガ)；ジアトラエア・サッカラリス (*Diatraea saccharalis*) (シュガーケーンボラー)；ジアプロティカ・ビルジフェラ (*Diabrotica virgifera*) (ウェスタンコーンルートワーム)；ジアプロティカ・ロンギコルニス・バルベリ (*Diabrotica longicornis barberi*) (ノーザンコーンルートワーム)；ジアプロティカ・ウンデシムプンクタタ・ホワルディ (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (サザンコーンルートワーム)；メラノツス属 (*Melanotus*) 種 (ワイヤーワーム)；シクロセファラ・ボレアリス (*Cyclocephala borealis*) (ノーザンマスクドコガネムシ (ホワイトグラブ))；シクロセ
20 ファラ・イムマクラタ (*Cyclocephala immaculata*) (サザンマスクドコガネムシ (ホワイトグラブ))；ポピリア・ジャポニカ (*Popillia japonica*) (マメコガネ)；カエトクネマ・プリカリア (*Chaetocnema pulicaria*) (トウモロコシノミハムシ)；スフェノフォルス・マイデイス (*Sphenophorus maidis*) (トウモロコシゾウムシ)；ロパロシフム・マイデイス (*Rhopalosiphum maidis*) (トウモロコシ葉アブラムシ)；アナラフィス・マイディラディシス (*Anuraphis maidiradicis*) (トウモロコシ根アブラムシ)；アメリカコバナナガカメムシ (*Blissus leucopterus leucopterus*) (チンチバグ (chinch bug))；メラノプルス・フェムルブルム (*Melanoplus femurrubrum*) (アカアシバツタ)；メラノプルス・サンガイニペス (*Melanoplus sanguinipes*) (移動性バツタ)；ヒレミア・プラチュラ (*Hylemya platura*) (タネバエ)；アグロミザ・パルビコルニス (*Agromyza parvicornis*) (トウモロコシ斑点モグリバエ)；アナフォトリプス・オブスクルス (*Anaphothrips obscurus*) (アザミウマ)；ソレノプシス・ミレス
30 タ (*Solenopsis milesta*) (盗賊アリ)；テトラニクス・ウルチカエ (*Tetranychus urticae*) (ナミハダニ)；
モロコシ：キロ・パルテルス (*Chilo partellus*) (ソルガムボラー)；スポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) (ツマジロクサヨトウ)；スポドプテラ・コスミオイデス (*Spodoptera cosmioides*)；スポドプテラ・エリダニア (*Spodoptera eridania*)；ヘリコベルパ・ゼア (*Helicoverpa zea*) (アメリカタバコガ)；エラスモパルプス・リグノセルス (*Elasmopalpus lignosellus*) (モロコシマダラメイガ)；フェルチア・サブテラネア (*Feltia subterranea*) (グラニュレートカットワーム)；フィロファガ・クリニタ (*Phyllorhaga crinita*) (ホワイトグラブ)；エレオデス (*Eleodes*)、コノデルス (*Conoderus*) 及びアエオルス属 (*Aeolus*) 種 (ワイヤーワーム)；オウレマ・メラノプス (*Oulema melanopus*) (穀類のハムシ)；カエトクネマ・プリカリア (*Chaetocnema pulicaria*) (トウモロコシノ
40 ミハムシ)；スフェノフォルス・マイデイス (*Sphenophorus maidis* 50

) (トウモロコシゾウムシ) ; ロパロシフム・マイデイス (*Rhopalosiphum maidis*) (トウモロコシ葉アブラムシ) ; サイファ・フラヴァ (*Siphaflava*) (キイロサトウキビアブラムシ) ; アメリカコバネナガカメムシ (*Blissus leucopterus leucopterus*) (チンチバグ) ; ソルガムタマバエ (*Contarinia sorghicola*) (ソルガムミッジ) ; テトラニクス・キナバリヌス (*Tetranychus cinnabarinus*) (ニセナミハダニ) ; テトラニクス・ウルチカエ (*Tetranychus urticae*) (ナミハダニ) ;
 コムギ : シューダレチア・ウニプンクタタ (*Pseudaletia unipunctata*) (アーミーワーム) ; スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (ツマジロクサヨトウ) ; エラスモパルプス・リグノセルス (*Elasmopalpus lignosellus*) (モロコシマダラメイガ) ; アグロチス・オルトゴニア (*Agrotis orthogonia*) (ウエスタンカットワーム) ; エラスモパルプス・リグノセルス (*Elasmopalpus lignosellus*) (モロコシマダラメイガ) ; オウレマ・メラノプス (*Oulema melanopus*) (穀類のハムシ) ; ヒペラ・プンクタタ (*Hypera punctata*) (クローパーゾウムシ) ; ジュウイチホシウリハムシ (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (サザンコーンルートワーム) ; ロシアコムギアブラムシ ; ムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*) (グリーンバグ) ; ムギヒゲナガアブラムシ (*Macrosiphum avenae*) (イギリス穀類アブラムシ) ; メラノプルス・フェムルブルム (*Melanoplus femurrubrum*) (アカアシバツタ) ; メラノプルス・ディフェレンチアリス (*Melanoplus differentialis*) (ディファレンシャルグラスホッパー) ; メラノプルス・サンガイニペス (*Melanoplus sanguinipes*) (移動性バツタ) ; マイエチオラ・デストラクター (*Mayetiola destructor*) (ヘシアンバエ) ; シトディプロシス・モセラナ (*Sitodiplosis mosellana*) (ムギアカタマバエ) ; メロミザ・アメリカーナ (*Meromyza americana*) (ムギキモグリバエ) ; ヒレミア・コアルクタタ (*Hylemya coarctata*) (コムギハナアブ) ; フランクリニエラ・フスカ (*Frankliniella fusca*) (タバコアザミウマ) ; ケフス・シンクトゥス (*Cephus cinctus*) (ムギクキハバチ) ; チューリップサビダニ (*Aceria tulipae*) (ムギカールマイト (wheat curl mite)) ;
 ヒマワリ : スレイマ・ヘリアンサナ (*Suleima helianthana*) (サンフラワーバッドモス (sunflower bud moth) ; ホメオソマ・エレクトェルム (*Homoeosoma electellum*) (サンフラワーモス) ; ジゴグラマ・エクスクラマチオニス (*zygogramma exclamationis*) (サンフラワービートル) ; ボチルス・ギボス (*Bothyrus gibbosus*) (キャロットビートル) ; ネオラシオプテラ・マートフェルドティアナ (*Neolasioptera murtfeldtiana*) (サンフラワーシードミッジ) ;
 ワタ : ヘリオチス・ビレセンス (*Heliothis virescens*) (コットンバッドワーム) ; ヘリコベルパ・ゼア (*Helicoverpa zea*) (コットンボールワーム) ; シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) (ビートアワヨトウ) ; ワタアカミムシガ (*Pectinophora gossypiella*) (ピンクボールワーム) ; アントノムス・グランディス (*Anthonomus grandis*) (ワタミゾウムシ) ; アフィス・ゴシピ (*Aphis gossypii*) (ワタアブラムシ) ; シューダトモスケリス・セリアツス (*Pseudatomoscelis seriatus*) (ワタノミハムシ) ; トリアレウロデス・アブチロネア (*Trialeurodes abutilonea*) (バンデッドウィングド・ホワイトフライ (banded winged white fly)) ; リグス・リネオラリス (*Lygus lineolaris*) (ミドリメクラカメムシ) ; メラノプルス・フェムルブル

10

20

30

40

50

ム (*Melanoplus femurrubrum*) (アカアシバツタ) ; メラノブル
 ス・ディフェレンチアリス (*Melanoplus differentialis*) (デ
 ィファレンシャルグラスホッパー) ; トリプス・タバキ (*Thrips tabaci*
) (タマネギアザミウマ) ; フランクリンキエラ・フスカ (*Frankliniella*
fusca) (タバコアザミウマ) ; テトラニクス・キナバリヌス (*Tetranychus*
cinnabarinus) (ニセナミハダニ) ; テトラニクス・ウルチカエ
 (*Tetranychus urticae*) (ナミハダニ) ;
 コメ : ジアトラエア・サッカラリス (*Diatraea saccharalis*) (シ
 ユガーケーンボラー) ; スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera fru*
giperda) (ヨトウガ) ; スポドプテラ・コスミオイデス (*Spodoptera*
cosmioides) ; スポドプテラ・エリダニア (*Spodoptera eri*
dania) ; ヘリコベルパ・ゼア (*Helicoverpa zea*) (アメリカタバ
 コガ) ; コラスピス・ブルネア (*Colaspis brunnea*) (ブドウコラスピ
 ス) ; リゾホプトルス・オリゾフィルス (*Lissorhopterus oryzoph*
ilus) (イネミズゾウムシ) ; シトフィルス・オリザエ (*Sitophilus o*
ryzae) (イネゾウムシ) ; ネフォテティクス・ニグロピクツス (*Nephotet*
tix nigropictus) (イネヨコバイ) ; アメリカコバネナガカメムシ (*Blis*
sus leucopterus leucopterus) (チンチバグ) ; ア
 クロステルヌム・ヒラレ (*Acrosternum hilare*) (アオカメムシ) ;
 チロ・スプレッサリス (*Chilus suppressalis*) (ニカメイガ) ;
 ダイズ : シュードプルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includ*
ens) (ダイズシャクトリムシ) ; アンチカルシア・ゲムマタリス (*Anticars*
ia gemmatalis) (ハツショウマメイモムシ) ; プラチペナ・スカブラ (*P*
lathypena scabra) (グリーンクローバーワーム) ; オストリニア・ヌ
 ビラリス (*Ostrinia nubilalis*) (ヨーロッパアワノメイガ) ; アグ
 ロティス・イプシロン (*Agrotis ipsilon*) (タマナヤガ) ; シロイチモ
 ジヨトウ (*Spodoptera exigua*) (ビートアワヨトウ) ; スポドプテラ
 ・コスミオイデス (*Spodoptera cosmioides*) ; スポドプテラ・エ
 リダニア (*Spodoptera eridania*) ; ヘリオチス・ビレセンス (*He*
liothis virescens) (コットンバッドワーム) ; ヘリコベルパ・ゼア
 (*Helicoverpa zea*) (コットンボールワーム) ; インゲンテントウ (*E*
pilachna varivestis) (メキシカンビーンビートル) ; ミズス・ペ
 ルシカエ (*Myzus persicae*) (モモアカアブラムシ) ; ジャガイモヒメヨ
 コバイ (*Empoasca fabae*) (ジャガイモリーフホッパー) ; アクロステル
 ヌム・ヒラレ (*Acrosternum hilare*) (アオカメムシ) ; メラノブル
 ス・フェムルブルム (*Melanoplus femurrubrum*) (アカアシバツ
 タ) ; メラノブルス・ディフェレンチアリス (*Melanoplus differen*
tialis) (ディファレンシャルグラスホッパー) ; ヒレミア・プラチュラ (*Hyl*
emya platura) (タネバエ) ; セリコトリプス・バリアビリス (*Seric*
othrips variabilis) (ダイズアザミウマ) ; トリプス・タバキ (*T*
hrips tabaci) (タマネギアザミウマ) ; テトラニクス・ツルケスタニ (*T*
etranychus turkestanii) (イチゴハダニ) ; テトラニクス・ウル
 チカエ (*Tetranychus urticae*) (ナミハダニ) ;
 オオムギ : オストリニア・ヌビラリス (*Ostrinia nubilalis*) (ヨー
 ロッパアワノメイガ) ; アグロティス・イプシロン (*Agrotis ipsilon*)
 (タマナヤガ) ; ムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*) (グ
 リーンバグ) ; アメリカコバネナガカメムシ (*Blissus leucopteru*
s) (チンチバグ) ; アクロステルヌム・ヒラレ (*Acrosternum hilar*
e) (アオカメムシ) ; エウスキスツス・セアヴス (*Euschistus servu*
s) (チャイロカメムシ) ; エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus hero*

10

20

30

40

50

s) (ネオトロピカルチャイロカメムシ) ; デリア・プラチュラ (*Delia platyura*) (タネバエ) ; マイエチオラ・デストラクター (*Mayetiola destructor*) (ヘシアンバエ) ; ペトロビア・ラテンス (*Petrobia lateus*) (チャイロコムギダニ) ;

ナタネ : プレビコリネ・ブラシカエ (*Brevicoryne brassicae*) (ダイコンアブラムシ) ; フィロトレタ・クルシフェラエ (*Phylotreta cruciferae*) (ノミハムシ) ; マメストラ・コンフィグラタ (*Mamestra conjugata*) (ベルタアーミーワーム (*Bertha armyworm*)) ; プルテラ・キシロステラ (*Plutella xylostella*) (コナガ) ; デリア属 (*Delia*) 種 (ネクイムシ)。

10

【0112】

植物収量を増加させるための方法

植物収量を増加させるための方法が提供される。この方法は、本明細書に開示する殺虫性ポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを発現する植物又は植物細胞を用意するステップと、前記ポリペプチドが殺虫活性を有する害虫が外寄生する(又はそのような害虫による外寄生を被りやすい)畑に、前記植物又はその種子を栽培するステップを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、チョウ目 (*lepidopteran*)、甲虫目 (*coleopteran*)、ハエ目 (*dipteran*)、カメムシ目 (*hemipteran*)、及び線虫 (*nematode*) 類の害虫に対する殺虫活性を有し、前記畑は、チョウ目 (*lepidopteran*)、甲虫目 (*coleopteran*)、ハエ目 (*dipteran*)、カメムシ目 (*hemipteran*)、及び線虫 (*nematode*) 類の害虫によって外寄生されている。本明細書で定義するように、植物の「収量」は、植物によって産生されるバイオマスの品質及び/又は量を指す。「バイオマス」とは、任意の測定された植物産物を意味する。バイオマス産生の増加は、測定される植物産物の収量の任意の向上である。植物収量の増加は、いくつかの商業的な用途を有する。例えば、植物の葉のバイオマスの増加は、ヒト又は動物が消費するための葉野菜の収量を増加させ得る。さらに、葉バイオマスの増加を用いて、植物由来の医薬又は工業製品の生産量を増加させることができる。収量の増加は、殺虫性配列を発現しない植物と比較して、限定はしないが、少なくとも1%増加、少なくとも3%増加、少なくとも5%増加、少なくとも10%増加、少なくとも20%増加、少なくとも30%増加、少なくとも50%増加、少なくとも70%増加、少なくとも100%又はそれ以上の収量の増加を含む、任意の統計学的に有意な増加を含み得る。特定の方法において、植物収量は、本明細書に開示する殺虫性タンパク質を発現する植物の害虫抵抗性の改善によって増加する。殺虫性タンパク質の発現は、害虫が、外寄生又は摂食する能力の低下をもたらす。

20

30

【0113】

また、植物は、1種又は複数の除草剤、殺虫剤、若しくは殺真菌剤などの1種又は複数の化学組成物で処理することもできる。化学組成物の例を以下に挙げる：果物/野菜除草剤：アトラジン、プロマシル、ジウロン、グリホサート、リヌロン、メトリブジン、シマジン、トリフルラリン、フルアジホップ、グルホシネート、ハロスルフロンゴワン、パラコート、プロピザミド、セトキシジム、ブタフェナシル、ハロスルフロン、インダジフラム ; 果物/野菜殺虫剤：アルジカルブ、バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、カルバリル、カルボフラン、クロピリホス、シベルメトリン、デルタメトリン、アバメクチン、シフルトリン/ベータ-シフルトリン、エスフェンバレート、ラムダ-シハロトリン、アセキノシル、ピフェナゼート、メトキシフェノジド、ノバルロン、クロマトフェノジド、チアクロブリド、ジノテフラン、フルアクリピリム、スピロジクロフェン、ガンマ-シハロトリン、スピロメシフェン、スピノサド、リナキシピル、シアジピル、トリフルムロン、スピロテトラマト、イミダクロピリド、フルベンジアミド、チオジカルブ、メタフルミゾン、スルホキサフロル、シフルメトフェン、シアノピラフェン、クロチアニジン、チアメトキサム、スピノトラム、チオジカルブ、フロニカミド、メチオカルブ、エマメクチン安息香酸塩、インドキサカルブ、フェナミホ

40

50

ス、ピリプロキシフェン、フェノブタチン - オキシド；果物 / 野菜殺真菌剤：アメトクトラジン、アゾキシストロピン、ベンチアパリカルブ、ボスカリド、カプタン、カルベンダジム、クロロタロニル、銅、シアゾファミド、シフルフェナミド、シモキサニル、シプロコナゾール、シプロジニル、ジフェノコナゾール、ジメトモルフ、ジチアノン、フェナミドン、フェンヘキサミド、フルアジナム、フルジオキシニル、フルオピコリド、フルオピラム、フルオキサストロピン、フルキサピロキサド、フォルペット、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソピラザム、クレソキシム - メチル、マンコゼブ、マンジプロパミド、メタラキシル / メフェノキサム、メチラム、メトラフェノン、ミクロブタニル、ペンコナゾール、ペンチオピラド、ピコキシストロピン、プロパモカルブ、プロピコナゾール、プロピネブ、プロキナジド、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、ピリメタニル、キノキシフェン、スピロキサミン、イオウ、テブコナゾール、チオフェネート - メチル、トリフロキシストロピン；

10

穀類除草剤：

2, 4 - D、アミドスルフロン、プロモキシニル、カルフェントラゾン - E、クロロトルロン、クロルスルフロン、クロジナホップ - P、クロピラリド、ジカンバ、ジクロホップ - M、ジフルフェニカン、フェノキサプロップ、フロラスラム、フルカルバゾン - NA、フルフェナセト、フルピロスルフロン - M、フルロキシピル、フルタモン、グリホセート、ヨードスルフロン、イオキシニル、イソプロツロン、MCPA、メソスルフロン、メトスルフロン、ペンジメタリン、ピノキサデン、プロボキシカルバゾン、プロスルホカルブ、ピロクスラム、スルホスルフロン、チフェンスルフロン、トラルコキシジム、トリアスルフロン、トリベヌロン、トリフルラリン、トリトスルフロン；穀類殺真菌剤：アゾキシストロピン、ピキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クロロタロニル、シフルフェナミド、シプロコナゾール、シプロジニル、ジモキシストロピン、エポキシコナゾール、フェンプロピジン、フェンプロピモルフ、フルオピラム、フルオキサストロピン、フルキンコナゾール、フルキサピロキサド、イソピラザム、クレソキシム - メチル、メトコナゾール、メトラフェノン、ペンチオピラド、ピコキシストロピン、プロクロラズ、プロピコナゾール、プロキナジド、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、キノキシフェン、スピロキサミン、テブコナゾール、チオフェネート - メチル、トリフロキシストロピン；

20

穀類殺虫剤：ジメトエート、ラムダ - シハルトリン、デルタメトリン、アルファ - シペルメトリン、 - シフルトリン、ピフェントリン、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネトフラン、クロルフィリホス、ピリミカルブ、メチオカルブ、スルオキサフルル；トウモロコシ除草剤：アトラジン、アラクロル、プロモキシニル、アセトクロル、ジカンバ、クロピラリド、(S -)ジメテナミド、グルホシネート、グリホセート、イソキサフルトール、(S -)メトラクロル、メソトリオン、ニコスルフロン、プリミスルフロン、リムスルフロン、スルコトリオン、ホラムスルフロン、トブラメゾン、テムボトリオン、サフルフェナシル、チエンカルバゾン、フルフェナセト、ピロキサスルフォン；トウモロコシ殺虫剤：カルボフラン、クロルピリホス、ピフェントリン、フィプロニル、イミダクロプリド、ラムダ - シハルトリン、テフルトリン、テルブホス、チアメトキサム、クロチアニジン、スピロメシフェン、フルベンジアミド、トリフルムロン、リナキシピル、デルタメトリン、チオジカルブ、 - シフルトリン、シペルメトリン、ピフェントリン、ルフェヌロン、テブピリンホス、エチプロール、シアジピル、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネトフラン、アベルメクチン；

30

トウモロコシ殺真菌剤：アゾキシストロピン、ピキサフェン、ボスカリド、シプロコナゾール、ジモキシストロピン、エポキシコナゾール、フェニトロパン、フルオロピラム、フルオキサストロピン、フルキサピロキサド、イソピラザム、メトコナゾール、ペンチオピラド、ピコキシストロピン、プロピコナゾール、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、テブコナゾール、トリフロキシストロピン；コムメ除草剤：ブタクロル、プロパニル、アジムスルフロン、ベンスルフロン、シハルトホップ、ダイムロン、フェントラザミド、イマゾスルフロン、メフェナセト、オキサジクロメホン、ピラゾスルフロン、ピリブチカルブ、キンクロラク、チオベンカルブ、インダノファン、フルフェナセト、フェントラザミ

40

50

ド、ハロスルフロン、オキサジクロメホン、ベンゾピシクロン、ピリフタリド、ペノキス
 スラム、ビスピリバク、オキサジアルギル、エトキシスルフロン、プレチラクロル、メソ
 トリオン、テフリルトリオン、オキサジアゾン、フェノキサプロブ、ピリミスルファン；
 コメ殺虫剤：ジアジノン、フェノブカルブ、ベンフラカルブ、ブプロフェジン、ジノテフ
 ラン、フィプロニル、イミダクロプリド、イソプロカルブ、チアクロプリド、クロマフェ
 ノジド、クロチアニジン、エチプロール、フルベンジアミド、リナキシピル、デルタメト
 リン、アセタミプリド、チアメトキサム、シアジピル、スピノサド、スピノトラム、エマ
 メクチン - 安息香酸塩、シペルメトリン、クオルピリホス、エトフェンプロックス、カル
 ボフラン、ベンフラカルブ、スルホキサフロル；コメ殺真菌剤：アゾキシストロピン、カル
 ベンダジム、カルプロパミド、ジクロシメト、ジフェノコナゾール、エジフェンホス、
 フェリムゾン、ゲンタマイシン、ヘキサコナゾール、ヒメキサゾール、イプロベンホス（
 IBP）、イソプロチオラン、イソチアニル、カスガマイシン、マンコゼブ、メトミノス
 トロピン、オリサストロピン、ペンシクロン、プロベナゾール、プロピコナゾール、プロ
 ピネブ、ピロキロン、テブコナゾール、チオファネート - メチル、チアジニル、トリシク
 ロゾール、トリフロキシストロピン、バリダマイシン；ワタ除草剤：ジウロン、フルオメ
 ツロン、MSMA、オキシフルオルフェン、プロメトリン、トリフルラリン、カルフェン
 トラゾン、クレトジム、フルアジホップ - ブチル、グリホセート、ノルフルラゾン、ペン
 ジメタリン、ピリチオバク - ナトリウム、トリフロキシスルフロン、テブラロキシジム、
 グルホシネート、フルミオキサジン、チジアズロン；ワタ殺虫剤：アセフェート、アルジ
 カルブ、クオルピリホス、シペルメトリン、デルタメトリン、アバメクチン、アセタミブ
 リド、エマメクチン安息香酸塩、イミダクロプリド、インドキサカルブ、ラムダ - シハロ
 トリン、スピノサド、チオジカルブ、ガンマ - シハロトリン、スピロメシフェン、ピリダ
 リル、フロニカミド、フルベンジアミド、トリフルムロン、リナキシピル、ベータ - シフ
 ルトリン、スピロテトラマト、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、ジネ
 トフラン、フルベンジアミド、シアジピル、スピノサド、スピノトラム、ガンマシハロト
 リン、4 - [[(6 - クオルピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオルエチル)
 アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、チオジカルブ、アベルメクチン、フロニカミド、
 ピリダリル、スピロメシフェン、スルホキサフロル；ワタ殺真菌剤：アゾキシストロピン
 、ピキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クオロタロニル、銅、シプロコナゾール
 、ジフェノコナゾール、ジモキシストロピン、エポキシコナゾール、フェナミドン、フル
 アジナム、フルオロピラム、フルオロキサストロピン、フルキサピロキサド、イプロジオ
 ン、イソピラザム、イソチアニル、マンコゼブ、マネブ、メトミノストロピン、ペンチオ
 ピラド、ピコキシストロピン、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、
 キントゼン、テブコナゾール、テトラコナゾール、チオファネート - メチル、トリフロキ
 シストロピン；ダイズ除草剤：アラクロル、ベントゾン、トリフルラリン、クロリムロン
 - エチル、クロランスラム - メチル、フェノキサプロブ、フォメサフェン、フルアジホッ
 プ、グリホセート、イマザモックス、イマザキン、イマゼタピル、(S -)メトラクロル
 、メトリブジン、ペンジメタリン、テブラロキシジム、グルホシネート；ダイズ殺虫剤：
 ラムダ - シハロトリン、メトミル、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム
 、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネトフラン、フルベンジアミド、リナキシピル、
 シアジピル、スピノサド、スピノトラム、エマメクチン - 安息香酸塩、フィプロニル、エ
 チプロール、デルタメトリン、 - シフルトリン、ガンマ及びラムダシハロトリン、4 -
 [[(6 - クオルピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオルエチル) アミノ]
 フラン - 2 (5 H) - オン、スピロテトラマト、スピノジクロフェン、トリフルムロン、
 フロニカミド、チオジカルブ、ベータ - シフルトリン；ダイズ殺真菌剤：アゾキシストロ
 ピン、ピキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クオロタロニル、銅、シプロコナゾ
 ール、ジフェノコナゾール、ジモキシストロピン、エポキシコナゾール、フルアジナム、
 フルオロピラム、フルオキサストロピン、フルトリアホール、フルキサピロキサド、イソ
 ピラザム、イプロジオン、イソチアニル、マンコゼブ、マネブ、メトコナゾール、メトミ
 ノストロピン、ミクロブタニル、ペンチオピラド、ピコキシストロピン、プロピコナゾー

10

20

30

40

50

ル、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、テブコナゾール、テトラコナゾール、チオファネート - メチル、トリフロキシストロピン；テンサイ除草剤：クロリダゾン、デスメジファミン、エトフメセート、フェンメジファミン、トリアレート、クロピラリド、フルアジホップ、レナシル、メタミトロン、キンメラック、シクロキシジム、トリフルスルフロン、テブラロキシジム、キザロホップ；テンサイ殺虫剤：イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネットフラン、デルタメトリン、 α -シフルトリン、ガンマ/ラムダシハロトリン、4 - [[(6 - クロルピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオルエチル) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、テフルトリン、リナキシピル、シナキシピル、フィプロニル、カルボフラン；カノーラ除草剤：クロピラリド、ジクロホップ、フルアジホップ、グルホシネート、グリホセート、メタザクロル、トリフルラリン、エタメトスルフロン、キンメラック、キザロホップ、クレトジム、テブラロキシジム；カノーラ殺真菌剤：アゾキシストロピン、ピキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、シプロコナゾール、ジフェノコナゾール、ジモキシストロピン、エポキシコナゾール、フルアジナム、フルオピラム、フルオキサストロピン、フルシラゾール、フルキサピロキサド、イプロジン、イソピラザム、メピコート - クロリド、メトコナゾール、メトミノストロピン、パクロブトラゾール、ペンチオピラド、ピコキシストロピン、プロクロラズ、プロチオコナゾール、ピラクロストロピン、テブコナゾール、チオファネート - メチル、トリフロキシストロピン、ピンクロゾリン；カノーラ殺虫剤：カルボフラン、チアクロプリド、デルタメトリン、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、アセタミプリド、ジネットフラン、 α -シフルトリン、ガンマ及びラムダシハロトリン、タウ - フルバレリエート (tau - Fl u v a l e r i a t e)、エチプロール、スピノサド、スピノトラム、フルベンジアミド、リナキシピル、シアジピル、4 - [[(6 - クロルピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオルエチル) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン。

10

20

【 0 1 1 4 】

本発明の遺伝子を別の植物に導入する方法

さらに、本発明の核酸を別の植物に導入する方法も提供される。本発明の核酸又はその断片を、循環選択、戻し交雑、系統育種、系統選択、集団選択、突然変異育種及び/又は遺伝子マーカ増強選択により第2植物に導入することができる。

【 0 1 1 5 】

従って、一実施形態では、本発明の方法は、本発明の核酸を含む第1植物を第2植物と交雑させて、F1子孫植物を作製するステップと、本発明の核酸を含むF1子孫植物を選択するステップとを含む。本発明の方法はさらに、選択した子孫植物を本発明の核酸を含む第1植物と交雑させて、戻し交雑子孫植物を作製するステップ、及び本発明の核酸を含む戻し交雑子孫植物を選択するステップも含む。殺虫活性を評価する方法は、本明細書の他所に記載されている。本方法はさらに、これらのステップを1回又は複数回連続して繰り返すことにより、本発明の核酸を含む第2の、又はより高度の戻し交雑子孫植物を選択するステップを含んでもよい。

30

【 0 1 1 6 】

要望される表現型についての植物の選択を含む任意の育種方法を本発明の方法に用いることができる。一部の実施形態では、F1植物を自家受粉させて、分離F2世代を作製してもよい。続いて、形質が育種集団内で同型接合又は一定となるまで、各世代 (F 3 、 F 4 、 F 5 など) において要望される表現型 (例えば、殺虫活性) を呈示する個別の植物を選択することができる。

40

【 0 1 1 7 】

第2植物は、除草剤耐性、昆虫耐性、干ばつ耐性、線虫防除、水利用効率、窒素利用効率、改善された栄養価、疾患抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された繁殖などの要望される形質を有する植物であり得る。第2植物は、本明細書の他所に記載されるようにエリートイベントであってもよい。

【 0 1 1 8 】

50

様々な実施形態において、植物部分（全植物、植物器官（葉、茎、根など）、種子、植物細胞、むかご、胚など）を、得られた交雑から収穫し、川下使用（例えば、食品、飼料、生物燃料、油、粉、ミールなど）のために繁殖させるか、又は収集することができる。

【0119】

植物生産物を得る方法

本発明はまた、商品生産物を取得する方法にも関し、これは、本発明の核酸を含む穀物からの穀粒を収穫及び／又は粉碎して、商品生産物を取得するステップを含む。限定はしないが、以下：動物用飼料、商品、並びにヒトが消費するための食品としての使用、又はヒトが消費するための組成物及び商品における使用を意図する植物生産物及び副産物、特に、失活種子／穀粒製品、例えば、このような穀粒／種子から生産される（半）加工製品（前記製品は、全若しくは加工種子又は穀粒であるか、これを含む）、動物試料、トウモロコシ又はダイズミール、トウモロコシ又はダイズ粉、トウモロコシ、コーンスターチ、ダイズミール、ダイズ粉、フレーク、ダイズタンパク質濃縮物、ダイズタンパク質単離物、織り目加工のダイズタンパク質濃縮物、化粧品、ヘアケア製品、ダイズナッツバター、納豆、テンペ、加水分解ダイズタンパク質、ホイップクリーム、ショートニング、レチシン、食用丸ダイズ（未加工、炒り豆、又は枝豆）、ダイズヨーグルト、ダイズチーズ、豆腐、湯葉、並びに調理、脱穀、蒸し、焼成若しくはパーボイルド穀粒などを含む農学的及び商業的に重要な製品及び／又は組成物は、これらの製品及び組成物が、本明細書に記載するヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列を、このようなヌクレオチド配列を含有するあらゆる植物に特徴的であるものとして、検出可能な量で含有していれば、本発明の範囲に含まれるものとする。

10

20

【0120】

以下の実施例は、例示のために提供されるのであって、限定としてではない。

【実施例】

【0121】

実施例1．バチルス・チューリングシス (*Bacillus thuringiensis*) 由来の新規殺虫性遺伝子の発見

以下のステップを用いて、新規の殺虫性遺伝子を表1に列挙する細菌株から同定した：

- ・菌株からの全DNAの調製。全DNAは、ゲノムDNAと染色体外DNAの両方を含有する。染色体外DNAは、以下：様々なサイズのプラスミド；ファージ染色体；他の非特定決定染色体外分子の一部又は全部の混合物を含有する。

30

- ・DNAの配列決定。全DNAをNext-Generation Sequencing法で配列決定する。

- ・相同性及び／又は他のコンピュータ解析による推定毒素遺伝子の同定。

- ・必要であれば、複数のPCR又はクローニング戦略（例えば、TAIL-PCR）の1つによる目的の遺伝子の配列完成。

【0122】

【表1】

表1. 菌株から同定された新規の遺伝子

株	遺伝子名	分子量(kD)	最も近い 相同体	ヌクレオチド 配列番号	アミノ酸 配列番号	
ATX68363	Axmi368	86.9	87.6% Cry13Aa1	1	21	
	Axmi368.2*				22	
ATX64783	Axmi400	132.9	89% Cry1Da1	2	23	
	Axmi400.2*				24	
	Axmi400(trun)			3	25	
	Axmi400.2(trun)*				26	
ATX29161	Axmi402	73.3	32% Axmi057, 31% Cry32Da1	4	27	
	Axmi402.2*				28	
	Axmi402.3*				29	
	Axmi402.4*				30	
	Axmi402.5*				31	
ATX29161	Axmi403	139.7	60% Axmi103, 57% Cry32Aa1	5	32	
	Axmi403.2*				33	
	Axmi403.3*				34	
	Axmi403.4*				35	
	Axmi403.5*				36	
	Axmi403.6*				37	
	Axmi403.7*				38	
	Axmi403(trun)				6	39
	Axmi403.2(trun)*					40
	Axmi403.3(trun)*					41
	Axmi403.4(trun)*					42
	Axmi403.5(trun)*					43
	Axmi403.6(trun)*					44
Axmi403.7(trun)*	45					
ATX67447	Axmi404	137.1	68% Cry1Ah1	7	46	
	Axmi404.2*				47	
	Axmi404.3*				48	
	Axmi404(trun)				8	49
	Axmi404.2(trun)*					50
Axmi404.3(trun)*	51					
ATX52424	Axmi405	87.6	48% Cry9Aa1	9	52	
	Axmi405.2*				10	53
	Axmi405.3*					54
	Axmi405.4*					55
	Axmi405.5*					56

【表 2】

ATX66842	Axmi416	133	71.3% Cry1Ai1	11	57
	Axmi416(trun)		64.7% Cry1Ai1	12	58
ATX68363	Axmi417	35.9	56% Axmi194, 23% Cry55Aa2	13	59
	Axmi417.2*				60
	Axmi417.3*				61
	Axmi417.4*				62
	Axmi417(trun)			14	63
	Axmi417.2(trun)*				64
ATX65158	Axmi423	43.3	43% Cry15Aa1	15	65
	Axmi423(trun)			16	66
ATX66410	Axmi424	138.9	94% Axmi221z, 60% Cry1Aa9	17	67
	Axmi424(trun)			18	68
ATX66854	Axmi425	140	90% Cry1Ba1	19	69
	Axmi425.2*				70
	Axmi425.3*				71
	Axmi425(trun)		95% Cry1Ba1	20	72
	Axmi425.2(trun)*				73
	Axmi425.3(trun)*				74

*は、下流開始部位からコードされるタンパク質を表し、「(trun)」は、タンパク質が、C末端切断を有することを示す。

【0124】

実施例 2 . 発現及び精製

表 2 に記載するアミノ酸配列の各々をコードする遺伝子を、表 1 に列挙する対応株から、3'末端にAscIリンカーを組み入れたプライマーを含むHERCULASE (登録商標) II 融合DNAポリメラーゼを用いてPCR増幅した。増幅したPCR産物をAscIで消化し、pMalC4Xベクターに連結した。クローンを配列決定により確認してから、プラスミドをBL21コンピテント細胞において形質転換した。単一コロニーをLB培地に接種し、対数期まで37℃で増殖させ、0.5mM IPTGを用いて、20℃で18時間誘導した。精製タンパク質を1:50比のXa因子で、室温にて一晩消化した。精製したタンパク質を標準的のプロトコルに従い、選択した昆虫害虫に対するバイオアッセイに付した。結果を以下の表 2 に示す。害虫は表 3 に示し、表 3 の後に、スコアリングシステムを示す。

【0125】

10

20

30

【表 3】

表2. バイオアッセイ結果(発育阻害率、死滅率スコア)

	配列番号	Ae	BCW	CA	DBM	ECB	FAW	Hv	Hz	SBA	SBL	SCB	SWCB	VBC
Axmi368	21									4,4				
Axmi400(trun)	25			2,3	3,4					2,3	3,4			
Axmi402	27			3,3						2,1			1,1	
Axmi403(trun)	39			2,3						2,3			1,1	
Axmi404.2(trun)	50			4,4	4,4	4,3	1,0	2,0	1,0	2,2	4,4	1,0	1,1	1,1
Axmi405.2	53			2,2	2,2								3,1	2,0
Axmi416(trun)	58		3,2		4,4	1,0	2,0	4,2	2,1		4,4	1,1	4,2	4,2
Axmi417(trun)	63			3,4	4,4					3,4				3,0
Axmi423(trun)	66				4,4	2,2		2,1			4,4	3,4	3,1	2,0
Axmi424(trun)	68	2,2		3,4	4,4			3,0	1,0	3,4	4,4			4,3
Axmi425(trun)	72				4,4	2,2		2,1			3,3	4,4	3,1	1,0

10

【 0 1 2 6 】

【表 4】

表3. バイオアッセイパネルにおける昆虫

Ae	ネッタイシマカ	アエデス・アエギプティ(<i>Aedes aegypti</i>)
BCW	タマナヤガ	アグロティス・イプシロン(<i>Agrotis ipsilon</i>)
CA	ワタアブラムシ	アフイス・ゴシビ(<i>Aphis gossypii</i>)
DBM	コナガ	プルテラ・キシロステラ(<i>Plutella xylostella</i>)
ECB	ヨーロッパアワノメイガ	オストリニア・ヌビラリス(<i>Ostrinia nubilalis</i>)
FAW	ヨトウガ	スポドプテラ・フルギペルダ(<i>Spodoptera frugiperda</i>)
Hv	オオタバコガ	ヘリオチス・ビレセンス(<i>Heliothis virescens</i>)
Hz	アメリカタバコガ	ヘリコベルパ・ゼア(<i>Helicoverpa zea</i>)
SBA	ダイズアブラムシ	アフイス・グリシンス(<i>Aphis glycines</i>)
SBL	ダイズシャクトリムシ	シュードプルシア・インクルデンス(<i>Pseudoplusia includens</i>)
SCB	シュガーケーンボーラー	ジアトラエア・サッカラルリス(<i>Diatraea saccharalis</i>)
SWCB	南西部アワノメイガ	ジアトラエア・グランジオセラ(<i>Diatraea grandiosella</i>)
VBC	ハッショウマメイモムシ	アンチカルシア・ゲムマタリス(<i>Anticarsia gemmatalis</i>)

20

30

【 0 1 2 7 】

発育阻害スコア：

0 = 活性なし

1 = 非均一発育阻害

2 = 若干の均一発育阻害 (対照の75%のサイズ)

3 = 強度の均一発育阻害 (対照の74~26%のサイズ)

4 = 重度の均一発育阻害 (対照の25%未満のサイズ)

40

【 0 1 2 8 】

死滅率スコア：

0 = 活性なし

1 = 25%以下の死滅率

2 = 50%以下の死滅率

3 = 75%以下の死滅率

4 = 75%を超える死滅率

【 0 1 2 9 】

実施例3. 殺虫活性についての追加アッセイ

本発明のヌクレオチド配列を、それが殺虫性タンパク質を産生する能力について試験す

50

ることができる。害虫に対して殺虫剤として作用する殺虫性タンパク質の能力は、一般に、いくつかの方法で評価される。当分野において公知の1つの方法は、摂食アッセイを実施するものである。このような摂食アッセイにおいて、害虫を、試験しようとする化合物を含む試料又は対照試料のいずれかに暴露する。多くの場合、これは、試験材料、又はこのような材料の適切な希釈液を、害虫が摂取する材料、例えば、人工食餌上に載せることによって行なわれる。試験材料は、液体、固体、又はスラリーから構成されるものであってよい。試験材料を前記表面に載せた後、乾燥させてよい。あるいは、試験材料を溶解した人工食餌と混合した後、アッセイチャンバに配分してもよい。アッセイチャンバは、例えば、カップ、皿、又はマイクロプレートのウェルであってもよい。

【0130】

10

吸引害虫（例えばアブラムシ）のためのアッセイは、試験材料の摂取が可能となるように、仕切り、理想的には吸引昆虫の吸引口部分によって突き通すことのできる部分によって、昆虫から試験材料を分離することを含み得る。多くの場合、試験材料は、試験化合物の摂取を促進するために、スクロースなどの摂食刺激剤と混合する。

【0131】

他のタイプのアッセイは、害虫の口、又は腸への試験材料のマイクロインジェクション、並びに、トランスジェニック植物の作製に続いて、害虫によるトランスジェニック植物に対する摂食能力試験を含み得る。植物試験は、通常消費される植物部分、例えば、葉に付着した小さなケージの単離、又は、昆虫を含むケージにおける全植物の単離を含み得る。

20

【0132】

害虫をアッセイするための他の方法及びアプローチは、当分野において公知であり、例えば、Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FLにみいだすことができる。あるいは、刊行物「*Arthropod Management Tests*」及び「*Journal of Economic Entomology*」において、又は米国昆虫学会（*Entomological Society of America*）（*ESA*）のメンバーによる論文によって、アッセイが一般的に記載されている。

【0133】

30

一部の実施形態では、本明細書に開示する殺虫性タンパク質の毒素領域をコードするDNA領域を、マルトース（*Maltose*）結合タンパク質（*MBP*）をコードするmalE遺伝子の後ろの大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpMAL-C4xにクローニングする。これらのインフレーム融合により、大腸菌（*E. coli*）においてMBP-*Axm*i融合タンパク質の発現が達成される。

【0134】

大腸菌（*E. coli*）における発現のために、BL21*DE3を個々のプラスミドで形質転換する。単一コロニーを、カルベニシリン及びグルコースで補充したLBに接種した後、37℃で一晩増殖させた。翌日、新しい培地に、一晩培養液の1%を接種した後、37℃で対数増殖期まで増殖させる。続いて、培養液を、20℃で一晩かけて、0.3

40

mM IPTGを用いて誘導する。各細胞ペレットを、20 mM トリス - Cl バッファー、pH 7.4 + 200 mM NaCl + 1 mM DTT + プロテアーゼ阻害剤中に懸濁させてから、超音波処理する。SDS-PAGEによる分析を用いて、融合タンパク質の発現を確認することができる。

【0135】

次に、全細胞遊離抽出液を、MBP-*axmi*融合タンパク質のアフィニティ精製のための高速タンパク質液体クロマトグラフィー（*FPLC*）に取り付けたアミロースカラムに流し込む。結合した融合タンパク質を、10 mM マルトース溶液を用いて樹脂から溶出する。次に、精製済み融合タンパク質をXa因子又はトリプシンのいずれかで切断して、*Axm*iタンパク質からアミノ末端MBPタグを除去した。タンパク質の切断及び可溶性

50

を SDS - PAGE によって決定する。

【0136】

実施例4．植物発現のための遺伝子のベクター化

本発明の遺伝子の各コード領域を、植物における発現のために、適切なプロモータ及び終結配列と結合する。このような配列は当分野において公知であり、単子葉植物における発現用のコメアクチンプロモータ又はトウモロコシユビキチンプロモータ、双子葉植物における発現用のシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) UBQ3プロモータ又はCaMV35Sプロモータ、及びnos又はPinIIターミネータなどが挙げられる。プロモータ - 遺伝子 - ターミネータ構築物を作製及び確認するための技術は、当分野において公知である。

10

【0137】

本発明の一態様では、合成DNA配列を設計及び作製する。これらの合成配列は、親配列と比較して、改変されたヌクレオチド配列を有するが、親配列と実質的に同一のタンパク質をコードする。

【0138】

本発明の別の態様では、得られるペプチドが、植物小器官、例えば、小胞体又はアポプラストをターゲティングするように、修飾した形態の合成遺伝子を設計する。融合タンパク質による植物小器官のターゲティングをもたらすことがわかっているペプチド配列は、当分野において公知である。例えば、当分野において、シロバナルーピン (*White Lupin*) のルピナス・アルブス (*Lupinus albus*) (GENBANK (登録商標) ID GI: 14276838; Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) 由来の酸性ホスファターゼ遺伝子のN末端領域は、異種タンパク質による小胞体のターゲティングをもたらすことがわかっている。得られる融合タンパク質が、C末端においてペプチドN末端 - リシン - アスパラギン酸 - グルタミン酸 - ロイシン (すなわち、「KDEL」モチーフ (配列番号75)) を含む小胞体保持配列も含有するならば、この融合タンパク質は、小胞体をターゲティングするであろう。融合タンパク質が、C末端において小胞体ターゲティング配列を欠失しているならば、このタンパク質は、小胞体をターゲティングするが、最終的にはアポプラストに隔離されるであろう。

20

【0139】

このように、上記遺伝子は、本発明のアミノ酸配列のN末端に融合したシロバナルーピン (*White Lupin*) のルピナス・アルブス (*Lupinus albus*) (GENBANK (登録商標) ID GI: 14276838, Miller et al., 2001, 前掲) 由来の酸性ホスファターゼ遺伝子のN末端31アミノ酸、並びにC末端におけるKDEL (配列番号75) 配列を含む融合タンパク質をコードする。従って、得られるタンパク質は、植物細胞において発現されると、植物小器官をターゲティングすることが予測される。

30

【0140】

前述した植物発現カセットは、形質転換細胞及び組織の選択を補助するための適切な植物選択マーカと組み合わせて、植物形質転換ベクターに連結する。これらは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介の形質転換からのバイナリーベクター又はエアロゾル若しくは微粒子銃形質転換用の単純なプラスミドベクターを含み得る。

40

【0141】

実施例5．ダイズ形質転換

ダイズ形質転換は、当分野では公知の方法、例えば、Paz et al. (2006), *Plant Cell Rep.* 25: 206により記載される方法を実質的に用い、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 媒介の形質転換ダイズハーブシード外植片を使用して記載されるものを用いて達成する。選択マーカとしてテンボトリオンを用いて、形質転換体を同定する。緑色のシュートの外観を観察し、除草剤イソキサフルトール又はテンボトリオンに対する耐性の

50

指標として記録する。耐性トランスジェニックシュートは、イソキサフルトール又はテンボトリオンで処理しなかった野生型ダイズシュートと比較して、正常な緑化を示すのに対し、同量のイソキサフルトール又はテンボトリオンで処理した野生型ダイズシュートは、完全に漂白されるであろう。これは、H P P Dタンパク質の存在が、イソキサフルトール又はテンボトリオンなどのH P P D阻害除草剤に対する耐性を可能にすることを示している。

【0142】

耐性緑色シュートを発根培地に移すか、又は移植する。根付いた小植物を馴化期間後に温室に移す。続いて、トランスジーンを含む植物に、H P P D阻害除草剤、例えば、硫酸アンモニウムメチルエステルナタネ油を補充した100 g A I / h aのテンボトリオン又は300 g A I / h aのメソトリオンを噴霧する。適用から10日後、除草剤の適用による症状を評価し、同じ条件下で野生型植物に観察された症状と比較する。

10

【0143】

実施例6 . ワタT0植物定着及び選択

ワタ形質転換を当分野では公知の方法、P C T特許文献：国際公開第00 / 71733号パンフレットに記載のものにある特に好ましい方法を用いて達成する。再生した植物を温室に移す。馴化期間後、十分に生育した植物に、H P P D阻害剤、例えば、硫酸アンモニウム及びメチルエステルナタネ油を補充した100若しくは200 g A I / h aのテンボトリオン当量を噴霧する。噴霧の適用から7日後、除草剤の処理による症状を評価し、同じ条件下で同じ処理に付した野生型ワタ植物に観察された症状と比較する。

20

【0144】

実施例7 . 本明細書に記載する殺虫性タンパク質を用いたトウモロコシ細胞の形質転換

トウモロコシの雌穂を受粉から8 ~ 12日後に収集する。胚を雌穂から単離するが、0 . 8 ~ 1 . 5 mmサイズの胚が、形質転換での使用に好ましい。胚を、適切なインキュベーション培地、例えば、D N 6 2 A 5 S培地(3 . 98 g / LのN6塩；1 m L / L(1000 xストック)のN6ビタミン；800 m g / LのL - アスパラギン；100 m g / LのM y o - イノシトール；1 . 4 g / LのL - プロリン；100 m g / Lのカザミノ酸；50 g / Lのスクロース；1 m L / L(1 m g / m Lストック)の2 , 4 - D)上に胚盤側を上にして載せる。しかし、D N 6 2 A 5 S以外の培地及び塩も好適であり、当分野では公知である。胚は、暗所にて25 で一晩インキュベートする。しかし、胚を一晩インキュベートすることそれ自体は必要ではない。

30

【0145】

得られた外植片を、メッシュスクエア(1プレートあたり30 ~ 40)に移し、約30 ~ 45分間、浸透圧培地に移し、続いて、ビーミングプレートに移す(例えば、P C T公開番号：国際公開第0138514号パンフレット及び米国特許第5,240,842号明細書を参照)。

【0146】

植物細胞中の、本発明の遺伝子に対して設計されたD N A構築物は、本質的にP C T公開番号：国際公開第0138514号パンフレットに記載の条件を用い、エアロゾルビームアクセレータを使用して植物組織へと加速させる。ビーム後、胚を浸透圧培地上で約30分間インキュベートしてから、暗所にて25 で一晩インキュベーション培地上に置く。ビームを受けた外植片が過度の損傷を受けるのを回避するために、それらを、回復培地に移す前に少なくとも24時間インキュベートする。次に、胚を約5日間暗所にて25 で回復期培地に広げて置き、その後、選択培地に移す。外植片を、使用する特定の選択の性質及び特徴に応じて、最大8週間まで選択培地中でインキュベートする。選択期間後、得られたカルスを、成熟体細胞胚の形成が観察されるまで、胚成熟培地に移す。次に、得られた成熟体細胞胚を微光の下に配置してから、当分野では公知の方法により再生プロセスを開始する。得られたシュートを発根培地上で根付かせ、得られた植物を苗床ポットに移して、トランスジェニック植物として成長させる。

40

【0147】

50

【表5】

材料

DN62A5S培地

成分	1リットル当たり	供給元
Chu's N6基本塩混合物 (製造番号C416)	3.98 g/L	フィットテクノロジー・ラボ
Chu's N6ビタミン溶液 (製造番号C149)	1mL/L(1000×ストック)	フィットテクノロジー・ラボ
L-アスパラギン	800 mg/L	フィットテクノロジー・ラボ
Myo-イノシトール	100 mg/L	シグマ
L-プロリン	1.4 g/L	フィットテクノロジー・ラボ
カザミノ酸	100 mg/L	フィッシャー・サイエンティフィック
スクロース	50 g/L	フィットテクノロジー・ラボ
2,4-D(製造番号D-7299)	1mL/L(1mg/mLのストック)	シグマ

10

【0148】

溶液のpHを、1N KOH / 1N KClを用いてpH 5.8に調節し、ゲルライト（シグマ）を3g/Lまで添加した後、培地をオートクレーブで処理する。50℃まで冷却した後、2ml/Lの5mg/ml硝酸銀のストック溶液（フィットテクノロジー・ラボ）を添加する。

20

【0149】

実施例8．アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介形質転換による植物細胞における本発明の遺伝子の形質転換

雌穂を受粉の8～12日後に収集する。胚を雌穂から単離するが、0.8～1.5mmサイズの胚が、形質転換での使用に好ましい。胚を、適切なインキュベーション培地上に胚盤側を上にして載せ、暗所にて25℃で一晩インキュベーションする。しかし、胚を一晩インキュベーションすること自体は必要ではない。胚を、約5～10分間、Tiプラスミド媒介導入に適切なベクターを含むアグロバクテリウム（Agrobacterium）株と接触させた後、約3日間（暗所にて22℃）共培養培地上で培養する。共培養後、外植片を5～10日間（暗所にて25℃）回復期培地に移す。外植片を、使用する特定の選択の性質及び特徴に応じて、8週間まで選択培地中でインキュベートする。選択期間後、得られたカルスを、成熟体細胞胚の形成が観察されるまで、胚成熟培地に移す。続いて、得られた成熟体細胞胚を微光の下に配置してから、再生プロセスを当分野において公知のように開始する。

30

【0150】

実施例9．コメの形質転換

適切な発育段階にある胚を含む未成熟コメ種子を、温室内で十分に制御された条件下で栽培したドナー植物から収集する。種子の滅菌後、未成熟胚を切除し、3日間固体培地上で前誘導する。前誘導後、要望されるベクターを有するアグロバクテリウム（Agrobacterium）の懸濁液中に、胚を数分間浸漬する。続いて、アセトシリンゴンを含む固体培地上で胚を共培養し、暗所にて4日間インキュベートする。次に、外植片を、選択剤としてホスホフィノトリシンを含有する第1選択培地に移す。約3週間後、発生中のカルスを有する胚盤を複数の小さな切片に切断してから、同じ選択培地に移す。その後の継代培養を約2週間毎に実施する。各継代培養時に、活発に成長するカルスを小さな切片に切断して、第2選択培地上でインキュベートする。数週間後、ホスホフィノトリシンに対して明らかに抵抗性のカルスを選択再生培地に移す。発生した小植物を完全伸長のためにハーフストレングスMS上で培養する。植物を土壌に移した後、温室で栽培する。

40

【0151】

本明細書に記載する全ての刊行物及び特許出願は、本発明が関連する当業者の知識レベ

50

ルを示すものである。全ての刊行物及び特許出願は、あたかも各々の個別の刊行物又は特許出願が、参照により組み込まれていることが、具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【 0 1 5 2 】

上述の本発明は、理解を明瞭にする目的で、説明及び例示として幾分詳しく記載してきたが、特定の変更及び改変を添付の特許請求の範囲内で実践し得ることは明らかであろう。

【 配列表 】

0006957583000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/82	(2006.01)	C 1 2 N	15/82	Z

- (31)優先権主張番号 61/774,635
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,110
(32)優先日 平成25年3月7日(2013.3.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,629
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,638
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,650
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,659
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,655
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,642
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/774,627
(32)優先日 平成25年3月8日(2013.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

- (74)代理人 100091487
弁理士 中村 行孝
- (74)代理人 100105153
弁理士 朝倉 悟

- (74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋
- (72)発明者 レベッカ、セイヤー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、モーリスビル、ハーモンド、ウッド、プレイス、100
- (72)発明者 キーラ、ロバーツ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、バハマ、ロックスボロ、ロード、7810
- (72)発明者 キンバリー、サンブソン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ダラム、フレンチマンズ、クリーク、ドライブ、5505
- (72)発明者 デュアン、レーチネン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ケーリー、ストーンクロフト、レーン、521
- (72)発明者 シェリル、ピーターズ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ローリー、バリー、エステーツ、ドライブ、6308
- (72)発明者 レオナルド、マガリカエス
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ダラム、モーニング、ビュー、コート、206
- (72)発明者 イーサン、ダン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ダラム、カーメル、レーン、110

審査官 長谷川 強

- (56)参考文献 国際公開第2011/103248 (WO, A2)
特表2012-519000 (JP, A)
特表平07-503857 (JP, A)
Database GenBank [online], Accession No. M65252, 1993-04-26 uploaded, [retrieved on 2020-12-18], <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M65252.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=13&RID=XSPG47HS013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M65252.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=13&RID=XSPG47HS013)>, DEFINITION: Bacillus thuringiensis alesti delta endotoxin gene, complete cds.
Toxins, 2012年, vol.4, pp.405-429

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/32
A01H 5/00
A01N 63/23
A01P 7/04
C07K 14/325
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 15/82
UniProt/GeneSeq
PubMed