

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5922646号
(P5922646)

(45) 発行日 平成28年5月24日 (2016. 5. 24)

(24) 登録日 平成28年4月22日 (2016. 4. 22)

(51) Int. Cl.	F 1				
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H	5/00	Z	N	A A
C12N 5/10 (2006.01)	C12N	5/10			
AO1N 63/00 (2006.01)	AO1N	63/00		A	
AO1P 7/04 (2006.01)	AO1P	7/04			
C12N 15/09 (2006.01)	C12N	15/09		A	
請求項の数 13 (全 25 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号	特願2013-506332 (P2013-506332)	(73) 特許権者	501035309
(86) (22) 出願日	平成23年4月22日 (2011. 4. 22)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
(65) 公表番号	特表2013-528365 (P2013-528365A)		ー
(43) 公表日	平成25年7月11日 (2013. 7. 11)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/033618		68, インディアナポリス, ジオンス
(87) 国際公開番号	W02011/133892	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成26年4月16日 (2014. 4. 16)	(74) 代理人	100095360
(31) 優先権主張番号	61/477, 447		弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成23年4月20日 (2011. 4. 20)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	61/476, 005	(74) 代理人	100126354
(32) 優先日	平成23年4月15日 (2011. 4. 15)		弁理士 藤田 尚
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 コーンルートワーム (ジアブロチカ種 (Diabrotica spp.)) に関する抵抗性の発生を予防するための Cry34Ab/35Ab 及び Cry3Ba タンパク質を含む組み合わせ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Cry34Ab タンパク質、Cry35Ab タンパク質及びCry3Ba 殺虫タンパク質を生産するトランスジェニック植物であって、前記Cry35Ab タンパク質が、配列番号1 および配列番号2 からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であり、前記Cry3Ba 殺虫タンパク質が、配列番号3 および配列番号4 からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であり、前記Cry34Ab タンパク質が、配列番号5 と少なくとも95%同一である、トランスジェニック植物。

【請求項 2】

Cry3Aa 及びCry6Aa からなる群より選択される第四の殺虫タンパク質をさらに生産する、請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3】

前記DNAを含む、請求項1から2のいずれかに記載の植物の種子。

【請求項 4】

非Bトリフュージ植物からのリフュージ種子と請求項3に記載の複数の種子とを含む種子の混合物であって、前記リフュージ種子が前記混合物中のすべての種子の40%未満を構成する、種子の混合物。

【請求項 5】

前記リフュージ種子が、前記混合物中のすべての種子の30%未満を構成する、請求項4に記載の種子の混合物。

【請求項 6】

前記リフュージ種子が、前記混合物中のすべての種子の 20%未満を構成する、請求項 4 に記載の種子の混合物。

【請求項 7】

前記リフュージ種子が、前記混合物中のすべての種子の 10%未満を構成する、請求項 4 に記載の種子の混合物。

【請求項 8】

前記リフュージ種子が、前記混合物中のすべての種子の 5%未満を構成する、請求項 4 に記載の種子の混合物。

【請求項 9】

請求項 3 に記載の複数の種子を含む種子袋又は容器であって、ゼロのリフュージ種子を含む、袋又は容器。

10

【請求項 10】

前記植物が、とうもろこし植物である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の植物。

【請求項 11】

前記 C r y 3 5 A b タンパク質が、配列番号 1 及び配列番号 2 からなる群より選択される配列と少なくとも 95%同一であり、前記 C r y 3 B a 殺虫タンパク質が、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群より選択される配列と少なくとも 95%同一であり、並びに前記 C r y 3 4 A b タンパク質が、配列番号 5 と少なくとも 95%同一である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の植物の植物細胞。

20

【請求項 12】

前記 C r y 3 5 タンパク A b 質が、配列番号 1 及び配列番号 2 からなる群より選択される配列を含み、前記 C r y 3 B a 殺虫タンパク質が、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群より選択される配列を含み、並びに前記 C r y 3 4 A b タンパク質が、配列番号 5 を含む、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の植物。

【請求項 13】

ルートワーム昆虫を防除する方法であって、前記昆虫を請求項 1 に記載のトランスジェニック植物と接触させることによる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

人間は食物及びエネルギー用にトウモロコシを育てる。トウモロコシは、重要な作物である。トウモロコシは、世界の多くの地域において食物、食品及び動物の餌の重要な源である。昆虫は、植物を食べて損害を与え、その結果、これらの人間の努力を台無しにする。害虫を防除するために毎年何十億ドルもが費やされ、害虫が与える損害のためにさらに何十億もが失われる。

【0002】

化学的殺有害生物剤などの防護手段の使用にもかかわらず、害虫によって引き起こされる損害は、世界のトウモロコシ作物の損失の大きな要因である。これに照らして、虫害を防除するために及び従来の化学的殺有害生物剤の必要を低減するために、遺伝子工学によってトウモロコシなどの作物に害虫抵抗性を持たせている。

40

【0003】

1,000万エーカーを超える米国トウモロコシに、毎年、コーンルートワーム種の複合種がはびこっている。コーンルートワーム種の複合種としては、ノーザンコーンルートワーム(ジアプロティカ・バルベリ(Diabrotica barberi))、サザンコーンルートワーム(D.ウンデシムプンクタタ・ホワルディ(D.undecimpunctata howardi))及びウエスタンコーンルートワーム(D.ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ(D.virgifera virgifera))が挙げられる。(他の種としては、ジアプロティカ・ヴィルギフェラ・ゼアエ(Diabrotica virgifera zeaee)(メキシココーンルートワーム)、ジアプロティカ

50

・バルテアタ (*Diabrotica balteata*) (ブラジルコーンルートワーム)、及びブラジルコーンルートワーム複合種 (ジアプロティカ・ヴィリデュラ及びジジアプロティカ・スペシオーサ) が挙げられる。))

【0004】

これらのジアプロティカ種の土壌生息幼虫は、トウモロコシ植物の根を餌にし、その結果、倒伏を引き起こす。倒伏は、結局、トウモロコシ収穫量を低減させ、多くの場合、植物を枯死させる結果となる。トウモロコシの毛を餌にすることにより、それらの成虫甲虫は受粉を低減させ、従って、植物あたりのトウモロコシの収穫量に有害な影響を及ぼす。加えて、ジアプロティカ属の成虫及び幼虫は、ウリ科作物 (キュウリ、メロン、カボチャなど) 並びに商業生産されている多くの野菜及び農作物、並びに家の庭で栽培されるものを襲う。

10

【0005】

合成有機化学殺虫剤が、害虫を防除するために使用される主なツールとなっているが、一部の地域では生物殺虫剤、例えば、バシラス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) (Bt) に由来する殺虫タンパク質、が重要な役割を果たしている。Bt 殺虫タンパク質遺伝子での形質転換により害虫抵抗性植物を生産できるようになって、近代農業に革命が起こり、殺虫タンパク質及びそれらの遺伝子の重要性及び価値が高まった。

【0006】

バシラス・スリンジエンシス (B. t.) の一部の菌株からの殺虫結晶タンパク質は、当分野において周知である。例えば、Hofte et al., *Microbial Reviews*, Vol.53, No.2, pp.242-255 (1989) を参照のこと。これらのタンパク質は、典型的には、前記細菌によっておおよそ 130 kDa のプロトキシンとして生産され、その後、昆虫による摂食後に該昆虫の中腸においてプロテアーゼによって切断されて、おおよそ 60 kDa のコア毒素をもたらす。B. t. の一部の菌株における花粉で異質の結晶性封入体を観察できるので、これらのタンパク質は、結晶タンパク質として公知である。これらの結晶性封入体は、多くの場合、幾つかの異質のタンパク質から構成される。

20

【0007】

トランスジェニック害虫抵抗性作物の生産に利用されている遺伝子の 1 つの群は、バシラス・スリンジエンシス (B. t.) からのデルタ - エンドトキシンである。デルタ - エンドトキシンは、トウモロコシばかりでなく、ワタ、ジャガイモ、イネ、ヒマワリなどの作物植物での発現に成功しており、害虫に対する優れた防除を提供することが証明されている。(Perlak, F. J et al. (1990) *Bio/Technology* 8, 939-943; Perlak, F. J. et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 313-321; Fujimoto H. et al. (1993) *Bio/Technology* 11: 1151-1155; Tu et al. (2000) *Nature Biotechnology* 18:1101-1104; PCT publication number WO 01/13731; 及び Bing J W et al. (2000) *Efficacy of Cry1F Transgenic Maize*, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, Colo)。

30

【0008】

今日までに、幾つかの Bt タンパク質を使用して害虫抵抗性トランスジェニック植物が作り出されており、該植物は、登録及び商品化に成功している。これらとしては、トウモロコシにおける *Cry1Ab*、*Cry1Ac*、*Cry1F*、*Cry3Aa* 及び *Cry3Bb*、ワタにおける *Cry1Ac* 及び *Cry2Ab*、並びにジャガイモにおける *Cry3A* が挙げられる。トウモロコシには SMART STAX もあり、これは *Cry1A.105* 及び *Cry2Ab* を含む。

40

【0009】

これらのタンパク質を発現する商品は、2 つのタンパク質の組み合わせられた殺虫スペクトルが所望される場合 (例えば、レプチドプレラ属の有害生物及びルートワームに対する抵抗性をそれぞれ提供するために組み合わせられるトウモロコシにおける *Cry1Ab* と *Cry3Bb*)、又はそれらのタンパク質の独立した作用が、感受性昆虫集団における

50

抵抗性の発生を遅らせるためのツールとしてそれらを有用なものにする場合（例えば、オオタバコガ幼虫に対する抵抗性管理を提供するために組み合わせられるワタにおける *Cry1Ac* 及び *Cry2Ab*）を除き、単一のタンパク質を発現する。

【0010】

この技術の急速且つ広範にわたる採用につながった害虫抵抗性トランスジェニックタンパク質の特質の一部は、有害生物集団がこれらの植物によって生産される殺虫タンパク質に対する抵抗性を発生する懸念も生じさせる。Btに基づく害虫抵抗性形質の有用性を保つための幾つかの戦略が提唱されており、それらの戦略としては、リフュージと併用での高用量のタンパク質の展開、及び異なる毒素との交替又は同時展開が挙げられる (McGaughy et al. (1998), 「B.t. Resistance Management」, *Nature Biotechnol.* 16:144-146)。

10

【0011】

害虫抵抗性管理 (IRM) スタックでの使用に選択されるタンパク質は、ありタンパク質に対して発生した抵抗性が、別のタンパク質に対する抵抗性を付与しない（すなわち、それらのタンパク質に対して交叉抵抗性でない）ような活性でなければならない。例えば、「タンパク質A」に対する抵抗性について選択された有害生物集団が「タンパク質B」に対して感受性である場合、交叉抵抗性ではないと、及びタンパク質Aとタンパク質Bの併用がタンパク質A単独に対する抵抗性を遅らせるのに有効であろうと結論づけられるだろう。

【0012】

抵抗性昆虫集団が不在の場合、交叉抵抗性の可能性に関連づけられると推定される他の特性に基づいて評価を行うことができる。殺虫タンパク質の同定における受容体媒介結合の有用性は、提唱された交叉抵抗性を呈示しない可能性が高い (van Mellaert et al. 1999)。このアプローチにつきものである交叉抵抗性の欠如の主要予測因子は、殺虫タンパク質が感受性昆虫種における受容体について競合しないことである。

20

【0013】

2つのBt毒素が同じ受容体について競合する事象において、その受容体はその昆虫において突然変異して、それらの毒素の一方がその受容体にもはや結合しない、従って、その昆虫に対してもはや殺虫性でない場合、その昆虫は、（同じ受容体に競合的に結合する）もう一方の毒素に対しても抵抗性であると言えるだろう。すなわち、その昆虫は、両方のBt毒素に対して交叉抵抗性であると言える。しかし、2つの毒素が2つの異なる受容体に結合する場合、これは、その昆虫が同時にそれら2つの毒素に対して抵抗性でないことの表れであり得るだろう。

30

【0014】

国際公開第97/40162号に開示されているように、比較的新しい殺虫タンパク質系がバシラス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) において発見された。この系は、二つのタンパク質、一方はおおよそ15kDa及び他方は約45kDaを含む。米国特許第6,083,499号及び同第6,127,180号も参照のこと。これらのタンパク質は、今ではそれら固有のクラスに割り当てられており、それに応じてそれぞれ *Cry34* 及び *Cry35* という *Cry* 名を受けている。Crickmoreらのウェブサイト (biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) を参照のこと。このタイプの系の多くの他の関連タンパク質が今や開示されている。例えば、米国特許第6,372,480号；国際公開第01/14417号；及び同第00/66742号を参照のこと。そのようなタンパク質をコードする植物最適化遺伝子であって、植物における最適化発現のためにコドンを使用するように遺伝子工学で作製変えられる遺伝子も、開示されている。例えば、米国特許第6,218,188号を参照のこと。

40

【0015】

Cry34/35 系の正確な作用機作は未だ確定されていないが、昆虫腸細胞の膜に細孔を形成するようである。Moellenbeck et al., *Nature Biotechnology*, vol.19, p.668 (July 2001); Masson et al., *Biochemistry*, 43 (12349-12357) (2004) を参照のこと。

50

Cry34及びCry35タンパク質については3D原子座標及び結晶構造が公知であるにもかかわらず、正確な作用メカニズムは、依然として不明である。米国特許第7,524,810号及び同第7,309,785号を参照のこと。例えば、これらのタンパク質の一方又は両方が、典型的なタイプの受容体、例えばアルカリホスファターゼ又はアミノペプチダーゼ、を結合するかどうかは不明である。

【0016】

さらに、昆虫がCryタンパク質に対する抵抗性を発生し得る種々のメカニズム(例えば、受容体の改変グリコシル化によるもの[Jurat-Fuentes et al.(2002) 68 AEM 5711-5717参照]、受容体タンパク質の除去によるもの[Lee et al.(1995) 61 AEM 3836-3842参照]、受容体を突然変異させることによるもの又は他のメカニズムによるもの[Heckel et al., J. Inv. Pathol. 95 (2007) 192-197参照])が存在するため、Cry34/35と他のCryタンパク質の間の交叉抵抗性が存在するのかどうかを演繹的に予測することは不可能であった。2つのタンパク質がCry34/35二成分系に関係しているということも、Cry34/35系についての競合的結合の予測をさらに複雑にする。重ねて、これらのタンパク質が昆虫腸/腸細胞に有効に結合するかどうか及びどのように結合するのか、並びにそれらが互いに相互作用又は結合するかどうか及びどのように相互作用又は結合するのかは、不明である。

【0017】

甲虫類の防除のための他の選択肢としては、次のタンパク質が挙げられる：Cry3Bb、Cry3C、Cry6B、ET29、ET33とET34、TIC407、TIC435、TIC417、TIC901、TIC1201、ET29とTIC810、ET70、ET76とET80、TIC851、及びその他。RNAiアプローチも提案されている。例えば、Baum et al., Nature Biotechnology, vol.25, no.11 (Nov.2007) pp.1322-1326を参照のこと。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】国際公開第97/40162号

【特許文献2】米国特許第6,083,499号

【特許文献3】米国特許第6,127,180号

【特許文献4】米国特許第6,372,480号

【特許文献5】国際公開第01/14417号

【特許文献6】国際公開第00/66742号

【特許文献7】米国特許第6,218,188号

【特許文献8】米国特許第7,524,810号

【特許文献9】米国特許第7,309,785号

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】Hofte et al., Microbial Reviews, Vol.53, No.2, pp.242-255 (1989)

【非特許文献2】Perlak, F. J et al. (1990) Bio/Technology 8, 939-943

【非特許文献3】Perlak, F. J. et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 313-321

【非特許文献4】Fujimoto H. et al. (1993) Bio/Technology 11: 1151-1155

【非特許文献5】Tu et al. (2000) Nature Biotechnology 18:1101-1104

【非特許文献6】Bing J W et al. (2000) Efficacy of Cry1F Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, Colo

【非特許文献7】McGaughey et al.(1998), 「B.t.Resistance Management」, Nature Biotechnol.16:144-146

【非特許文献8】van Mellaert et al.1999

【非特許文献9】Moellenbeck et al., Nature Biotechnology, vol.19, p.668 (July 2001)

10

20

30

40

50

【非特許文献10】Masson et al., Biochemistry, 43 (12349-12357) (2004)

【非特許文献11】Jurat-Fuentes et al.(2002) 68 AEM 5711-5717

【非特許文献12】Lee et al.(1995) 61 AEM 3836-3842

【非特許文献13】Heckel et al., J.Inv.Pathol.95 (2007) 192-197

【非特許文献14】Baum et al., Nature Biotechnology, vol.25, no.11 (Nov.2007) pp .1322-1326

【発明の概要】

【0020】

本発明は、以下を提供する。

[1] Cry34タンパク質、Cry35タンパク質及びCry3B殺虫タンパク質を生産する、トランスジェニック植物。 10

[2] Cry3A及びCry6Aからなる群より選択される第四の殺虫タンパク質をさらに生産する、上記[1]に記載のトランスジェニック植物。

[3] 上記DNAを含む、上記[1]から[2]のいずれかに記載の植物の種子。

[4] 上記[1]から[2]のいずれかに記載の複数の植物を含む植物の圃場。

[5] 非Bトリフュージ植物をさらに含む圃場であって、上記リフュージ植物が、上記圃場内のすべての作物植物の40%未満を構成する、上記[4]に記載の植物の圃場。

[6] 上記リフュージ植物が、上記圃場内のすべての作物植物の30%未満を構成する、上記[5]に記載の植物の圃場。

[7] 上記リフュージ植物が、上記圃場内のすべての作物植物の20%未満を構成する、上記[5]に記載の植物の圃場。 20

[8] 上記リフュージ植物が、上記圃場内のすべての作物植物の10%未満を構成する、上記[5]に記載の植物の圃場。

[9] 上記リフュージ植物が、上記圃場内のすべての作物植物の5%未満を構成する、上記[5]に記載の植物の圃場。

[10] リフュージ植物がない、上記[4]に記載の植物の圃場。

[11] 上記リフュージ植物が、区画又は植栽帯内に存在する、上記[5]に記載の植物の圃場。

[12] 非Bトリフュージ植物からのリフュージ種子と上記[3]に記載の複数の種子とを含む種子の混合物であって、上記リフュージ種子が上記混合物中のすべての種子の40%未満を構成する、種子の混合物。 30

[13] 上記リフュージ種子が、上記混合物中のすべての種子の30%未満を構成する、上記[12]に記載の種子の混合物。

[14] 上記リフュージ種子が、上記混合物中のすべての種子の20%未満を構成する、上記[12]に記載の種子の混合物。

[15] 上記リフュージ種子が、上記混合物中のすべての種子の10%未満を構成する、上記[12]に記載の種子の混合物。

[16] 上記リフュージ種子が、上記混合物中のすべての種子の5%未満を構成する、上記[12]に記載の種子の混合物。

[17] 上記[3]に記載の複数の種子を含む種子袋又は容器であって、ゼロのリフュージ種子を含む、袋又は容器。 40

[18] 昆虫によるCryタンパク質に対する抵抗性の発生を管理する方法であって、種子を作付けして、上記[5又は10]に記載の植物の圃場を作ることを含む方法。

[19] 上記植物が、10エーカーより多くを占有する、上記[5]から[11]のいずれかに記載の圃場。

[20] 上記植物が、とうもろこし植物である、上記[1]から[2]のいずれかに記載の植物。

[21] 上記Cry35タンパク質が、配列番号1及び配列番号2からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一であり、上記Cry3B殺虫タンパク質が、配列番号3及び配列番号4からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一であり、並びに上 50

記Cry34タンパク質が、配列番号5と少なくとも95%同一である、上記[1]から[2]のいずれかに記載の植物の植物細胞。

[22]上記Cry35タンパク質が、配列番号1及び配列番号2からなる群より選択される配列を含み、上記Cry3B殺虫タンパク質が、配列番号3及び配列番号4からなる群より選択される配列を含み、並びに上記Cry34タンパク質が、配列番号5を含む、上記[1]から[2]のいずれかに記載の植物。

[23]上記[21]に記載の植物細胞を生産する方法。

[24]ルートワーム昆虫を防除する方法であって、上記昆虫をCry34タンパク質、Cry35タンパク質及びCry3B殺虫タンパク質と接触させることによる方法。

[25]上記Cry34タンパク質が、Cry34Aタンパク質であり、上記Cry35タンパク質が、Cry35Aタンパク質であり、上記Cry3Bタンパク質が、Cry3Baタンパク質である、上記[1]に記載の植物。

[26]上記Cry34タンパク質が、Cry34Abタンパク質であり、上記Cry35タンパク質が、Cry35Abタンパク質である、上記[1]に記載の植物。

[27]上記Cry3Aタンパク質が、Cry3Aaタンパク質であり、上記Cry6Aタンパク質が、Cry6Aaタンパク質である、上記[2]に記載の植物。

[28]上記Cry34タンパク質が、Cry34Aタンパク質であり、上記Cry35タンパク質が、Cry35Aタンパク質であり、上記Cry3Bタンパク質が、Cry3Baタンパク質である、上記[24]に記載の方法。

[29]上記Cry34タンパク質が、Cry34Abタンパク質であり、上記Cry35タンパク質が、Cry35Abタンパク質である、上記[24]に記載の方法。

本発明は、一つには、Cry3Baとの組み合わせでのCry34Ab/35Abに関する。本発明は、一つには、Cry34Ab/Cry35Ab及びCry3Baがコーンルートワーム（ジアプロティカ種）集団による（いずれかの殺虫タンパク質系のみに対する）抵抗性の発生の予防に有用であるという驚くべき発見に関する。本開示のおかげで当業者には分かるであろうが、これらの殺虫Cryタンパク質を生産する植物は、これらの殺虫タンパク質系のいずれかのみに対して抵抗性であるコーンルートワーム集団が発生し得る懸念の軽減に有用であろう。

【0021】

本発明は、一つには、これらのCryタンパク質系の成分が、コーンルートワーム腸受容体を結合することについて互いに競合しないという発見によって裏づけられる。

【0022】

本発明は、一つには、三（又はそれ以上）毒素系のトリプルスタック又は「プラスミド」にも関し、Cry34Ab/Cry35Ab及びCry3Baがその基本ペアである。従って、これらの2種の殺虫タンパク質系を生産する植物（及びそのような植物が作付けされる地所）は、本発明の範囲に含まれる。

【0023】

図面のこの詳細な説明は、特に、添付の図に言及するものである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1A．ウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへのインプット放射標識Cry毒素の関数としての ^{125}I -Cry35Ab1の結合。特異的結合 = 全結合 - 非特異的結合、エラーバー = SEM（標準誤差）。 図1B．ウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへのインプット放射標識Cry毒素の関数としての ^{125}I -Cry3BAb1の結合。特異的結合 = 全結合 - 非特異的結合、エラーバー = SEM（標準誤差）。

【図2】異なる非標識競合物濃度でのウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへの ^{125}I -Cry35Ab1の結合（ $\log 0.1 = -1.0$ 、 $\log 10 =$

10

20

30

40

50

1.0、 $\log 100 = 2.0$ 、 $\log 1,000 = 3.0$)。

【図3】図3A. Cry34Ab1不在下でのウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへの^{1 2 5}I-Cry35Ab1の結合。 図3B. Cry34Ab1存在下でのウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへの^{1 2 5}I-Cry35Ab1の結合。

【図4】様々な濃度の様々な非標識競合物の存在下でのウエスタンコーンルートワーム幼虫から調製したBBMVへの^{1 2 5}I-Cry3Ba1の結合。

【0025】

配列の簡単な説明

【0026】

配列番号1：完全長、天然CRY35AB1タンパク質配列。

【0027】

配列番号2：キモトリプシンでトランケートされたCry35Ab1コアタンパク質配列。

【0028】

配列番号3：完全長、天然Cry3Ba1タンパク質配列。

【0029】

配列番号4：Cry3Ba1トリプシンコアタンパク質配列。

【0030】

配列番号5：完全長、天然Cry34Ab1タンパク質配列。

【発明を実施するための形態】

【0031】

Cry34Ab/35Abタンパク質についての配列は、例えば、バシラス・スリンジエンシス(*Bacillus thuringiensis*)分離株PS149B1から得ることができる。本発明に従って使用するための他の遺伝子、タンパク質配列、及び源分離株については、例えば、Crickmoreらのウェブサイト(lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intr.o.html)を参照のこと。

【0032】

本発明は、Cry34Ab/35Ab殺虫タンパク質を、これらのCryタンパク質系のいずれか単独(他方を伴わない)に対する抵抗性を発生し得るコーンルートワーム集団によるコーンルートワーム摂食に起因する損害及び収穫量低下からトウモロコシを防護するために、Cry3Ba毒素と併用することを含む。

【0033】

従って、本発明は、コーンルートワームによるCry3Ba及び/又はCry34Ab/35Abに対する抵抗性の発生を予防するための害虫抵抗性管理(IRM)スタックを教示する。

【0034】

本発明は、Cry3Ba毒素タンパク質及びCry34Ab/35Ab毒素系を生産する細胞を含む有害生物ルートワームを防除するための組成物を提供する。

【0035】

本発明は、さらに、Cry3Baタンパク質とCry34Ab/35Ab二成分毒素の両方を生産するように形質転換された宿主を含み、該宿主は、微生物又は植物細胞である。

【0036】

加えて、本発明は、有害生物ルートワームを防除する方法を提供することを意図しており、この方法は、前記有害生物又は前記有害生物の環境と、Cry3Baタンパク質を含有する及びさらにCry34Ab/35Ab二成分毒素を含有する有効量の組成物とを接触させることを含む。

【0037】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態は、Cry34Ab/35Ab二成分毒素をコードする植物発現可能遺伝子とCry3Baタンパク質をコードする植物発現可能遺伝子とを含むとうもろこし植物、及びそのような植物の種子を含む。

【0038】

本発明のさらなる実施形態は、Cry34Ab/35Ab二成分毒素をコードする植物発現可能遺伝子とCry3Baタンパク質をコードする植物発現可能遺伝子とが遺伝子移入されたとうもろこし植物、並びにそのような植物の種子を含む。

【0039】

実施例において説明するように、放射標識Cry35Abコア毒素タンパク質を使用する競合的受容体結合研究は、Cry35Abが結合するCRW昆虫組織サンプルにおいてCry3Baコア毒素タンパク質が結合について競合しないことを示す。図2参照。これらの結果は、Cry3Baタンパク質とCry34Ab/35Abタンパク質の組み合わせが、いずれかのタンパク質系のみに対するCRW集団における抵抗性の発生を軽減するための有効な手段であることを示している。

10

【0040】

従って、上に記載した又は本明細書の他の箇所に記載するデータの一部に基づいて、Cry34Ab/35Ab及びCry3Baタンパク質を使用して、CRWによる抵抗性発生の予防又は軽減するためのIRM組み合わせを生成することができる。他のタンパク質をこの組み合わせに加えて、例えば、害虫防除スペクトラムを拡大することができる。(Cry34Ab/35Abタンパク質とCry3Baタンパク質の)本組み合わせは、幾つかの好ましい「トリプルスタック」又は「ピラミッド」において、ルートワームの防除用のさらに別のタンパク質、例えばCry3Aa及び/又はCry6Aa、との組み合わせで使用することもできる；従って、そのような追加の組み合わせは、ルートワームに対する多重作用機作をもたらすであろう。ルートワームに対するRNAiは、尚さらなる選択肢である。例えば、Baum et al., Nature Biotechnology, vol.25, no.11 (Nov.2007) pp.1322-1326を参照のこと。

20

【0041】

Cry34Ab/35Abタンパク質とCry3Aaタンパク質の組み合わせに関する米国特許出願第61/327,240号(2010年4月23日出願)、Cry34Ab/35Abタンパク質とCry6Aaタンパク質の組み合わせに関する米国特許出願第61/388,273号(2010年9月30日出願)、及びCry3Aaタンパク質とCry6Aaタンパク質の組み合わせに関する米国特許出願第61/477,447号(2011年9月20日出願)の開示に照らして、本発明の幾つかの好ましい「トリプルスタック」又は「多重作用機作スタック」は、Cry6Aaタンパク質及び/又はCry3Aaタンパク質と共に、Cry34Ab/35Abタンパク質と組み合わせたCry3Baタンパク質を含む。cry3Ba遺伝子、cry34Ab/35Ab遺伝子、及び第三又は第四の毒素系(例えば、cry3Aa及び/又はcry6Aa遺伝子を含む、トウモロコシをはじめとする、トランスジェニック植物は、本発明の範囲に含まれる。従って、そのような実施形態は、少なくとも3つの作用機作で昆虫を標的にする。

30

【0042】

本発明の展開選択肢は、ジアプロティカ種が問題となるトウモロコシ栽培地におけるCry3Ba及びCry34Ab/35Abタンパク質の使用を含む。もう1つの展開選択肢は、Cry3Ba及びCry34Ab/35Abタンパク質の一方又は両方と他の形質との併用であるだろう。

40

【0043】

Bt毒素が、Cry3Ba及びCry34Ab/35Abなどの一定のクラス内であっても、ある程度異なる場合があることは、当業者には理解されるであろう。

【0044】

遺伝子及び毒素。用語「単離された」は、天然に存在しない構築物中のポリヌクレオチドを、又は精製された状態の若しくは別様に天然に存在しない状態のタンパク質を指す。

50

本発明に従って有用な遺伝子及び毒素としては、開示する完全長配列ばかりでなく、これらの配列のフラグメント、変異体、突然変異体、及び本明細書において具体的に例示する毒素の特徴的殺有害生物活性を保持する融合タンパク質も挙げられる。本明細書において用いる場合、遺伝子の「変異体」又は「異形」という用語は、同じ毒素をコードする、又は殺有害生物活性を有する等価の毒素をコードする、ヌクレオチド配列を指す。本明細書において用いる場合、用語「等価の毒素」は、標的有害生物に対して請求項記載の毒素と同じ又は本質的に同じ生物活性を有する毒素を指す。これは、本発明によるとCry3及びCry34/35、ならびに(トリプル/マルチプルスタックで使用する場合)Cry6に当てはまる。これらのタンパク質のドメイン/サブドメインを交換してキメラタンパク質を作製することができる。Cry34/35タンパク質に関しては米国特許第7,309,785号及び同第7,524,810号を参照のこと。前記785特許は、トランケートされたCry35タンパク質も教示している。トランケートされた毒素を本明細書においても例示する。

10

【0045】

本明細書において用いる場合、境界線は、「Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins」, N.Crickmore, D.R.Zeigler, J. Feitelson, E.Schnepf, J.Van Rie, D.Lereclus, J.Baum, and D.H.Dean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1998) Vol 62: 807-813に従って、おおよそ95% (Cry3Ba及びCry34Ab及びCry35Ab)、78% (Cry3B及びCry34A及びCry35A)及び45% (Cry6及びCry34及びCry35)配列同一性を表す。本発明に従って例えばトリプル/マルチプルスタックで使用する場合、同じことがCry3A/Cry6にも当てはまる。

20

【0046】

活性毒素をコードする遺伝子を幾つかの手段によって同定及び得ることができることは当業者には明らかであろう。本明細書において例示する特定の遺伝子又は遺伝子部分は、培養物寄託機関に寄託されている分離株から得ることができる。これらの遺伝子、又はこれらの部分若しくは変異体は、合成的に、例えば遺伝子合成装置の使用によって、構築することもできる。遺伝子の異形は、点突然変異を行うための標準的な技術を用いて容易に構築することができる。また、標準的な手順に従って市販のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼを使用して、これらの遺伝子のフラグメントを作製することができる。例えば、Bal31などの酵素、又は部位特異的突然変異誘発を用いて、これらの遺伝子の末端からヌクレオチドを系統的に切除することができる。様々な制限酵素を使用して、活性フラグメントをコードする遺伝子を得ることもできる。プロテアーゼを使用して、これらのタンパク質毒素のフラグメントを直接得ることができる。

30

【0047】

例示する毒素の殺有害生物活性を保持するフラグメント及び等価物は、本発明の範囲内であるだろう。また、遺伝コードの冗長性のため、様々な異なるDNA配列が、本明細書において開示するアミノ酸配列をコードする場合がある。同じ又は本質的に同じ毒素をコードするこれらの代替DNA配列を作り出すことは、十分に当業者の技能の範囲内である。これらの変異体DNA配列は、本発明の範囲内である。本明細書において用いる場合、「本質的に同じ」配列への言及は、殺有害生物活性にあまり影響を及ぼさないアミノ酸置換、欠失、付加又は挿入を有する配列を指す。殺有害生物活性を保持するタンパク質をコードする遺伝子のフラグメントもこの定義に含まれる。

40

【0048】

本発明に従って有用な毒素をコードする遺伝子及び遺伝子部分を同定するためのさらなる方法は、オリゴヌクレオチドプローブの使用によるものである。これらのプローブは、検出可能ヌクレオチド配列である。これらの配列は、適切な標識によって検出可能である場合があり、又は国際出願番号国際公開第93/16094号に記載されているように生得的に蛍光性にされている場合がある。当分野において周知であるように、プローブ分子と核酸サンプルが、それら二分子間の強力な結合を形成することによってハイブリダイズ

50

る場合、道理上、このプローブ及びサンプルは実質的に相同であると想定することができる。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、例えばKeller, G.H., M.M.Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp.169-170に記載されているような分野において周知の技術によって、ストリンジェントな条件下で行われる。塩濃度と温度の組み合わせの幾つかの例は、次のとおりである（ストリンジェンシーが低い順に）：室温で2 X S S P E又はS S C；42 で1 X S S P E又はS S C；42 で0.1 X S S P E又はS S C；65 で0.1 X S S P E又はS S C。プローブの検出は、ハイブリダイゼーションが発生したかどうかを公知の手法で判定する手段を提供する。そのようなプローブ分析は、本発明の毒素コード遺伝子を同定するための迅速な方法を提供する。本発明に従ってプローブとして使用されるヌクレオチドセグメントは、DNA合成装置又は標準的な手順を使用して合成することができる。これらのヌクレオチド配列をPCRプライマーとして使用して、本発明の遺伝子を増幅することもできる。

10

【0049】

変異体毒素。本発明の一定の毒素を本明細書の中で具体的に例示してきた。これらの毒素は、単に本発明の毒素の例示であるので、本発明が、例示する毒素と同じ又は同様の殺有害生物活性を有する変異体又は等価の毒素（及び等価の毒素をコードするヌクレオチド配列）を含むことは、容易に分かるはずである。等価の毒素は、例示する毒素とのアミノ酸相同性を有するであろう。このアミノ酸同一性は、一部の実施形態において、典型的には75%より大きく、又は好ましくは85%より大きく、好ましくは90%より大きく、好ましくは95%より大きく、好ましくは96%より大きく、好ましくは97%より大きく、好ましくは98%より大きく、又は好ましくは99%より大きい。アミノ酸同一性は、生物活性の原因となる、又は結局は生物活性の原因である三次元配座の決定に係る、毒素の重要領域において典型的に最も高いであろう。これに関して言えば、一定のアミノ酸置換は、これらの置換が、活性にとって重要でない領域にある場合、又はその分子の三次元配座に影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換である場合、許容され及び予想され得る。例えば、アミノ酸を次のクラスに配属することができる：非極性、非荷電極性、塩基性、及び酸性。あるクラスのアミノ酸を同じタイプの別のアミノ酸で置き換える保存的アミノ酸置換は、その置換がその化合物の生物活性を著しく改変しない限り、本発明の範囲内に入る。表1は、各クラスに属するアミノ酸の例のリストを提供するものである。

20

【表1】

30

アミノ酸のクラスと各クラスに属するアミノ酸の例

アミノ酸のクラス	アミノ酸の例
非極性	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
非荷電極性	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
酸性	Asp, Glu
塩基性	Lys, Arg, His

40

【0050】

場合によっては、非保存的置換を行うこともできる。重要な要因は、これらの置換が、前記毒素の生物活性を有意に損なってはならないということである。

【0051】

組換え宿主。本発明の毒素をコードする遺伝子を多種多様な微生物又は植物宿主に導入することができる。毒素遺伝子の発現は、殺有害生物剤の細胞内生産及び維持を直接又は間接的に生じさせる結果となる。接合伝達及び組換え伝達を用いて、本発明の両方の毒素を発現するBt株を作り出すことができる。他の宿主生物を前記毒素遺伝子の一方又は両方で形質転換させ、その後、使用して相乗効果を果たすことができる。適する微生物宿主、例えばシュードモナス属(Pseudomonas)、を用いて、該微生物を有害生物

50

の生育環境に適用することができ、そこで該微生物は増殖し、摂取されることとなる。結果として有害生物は防除されることとなる。あるいは、毒素遺伝子の宿主としての役割を果たす微生物を、毒素の活性を延長する及び細胞を安定させる条件下で、処理することができる。毒素活性を保持するその処理された細胞を、標的有害生物の環境に適用することができる。(本IRM遺伝子の少なくとも1つを含む)本発明の植物からの非再生可能/非全能性植物細胞は、本発明に含まれる。

【0052】

植物形質転換。本発明の好ましい実施形態は、本殺虫タンパク質又はその変異体をコードする遺伝子での植物の形質転換である。形質転換植物は、該形質転換植物の細胞内の防除量の本殺虫タンパク質又はその変異体の存在のおかげで、昆虫標的有害生物による攻撃に対して抵抗性である。B.t.殺虫毒素の殺虫特性をコードする遺伝物質を、特定の害虫によって食された植物のゲノムに導入することにより、成虫又は幼虫は、餌物植物の消費後、死滅するだろう。非常に多くの単子葉植物及び双子葉植物分類が形質転換されている。トランスジェニック普通作物並びに果実及び野菜は、商業的関心対象である。そのような作物としては、とうもろこし、イネ、ダイズ、カノーラ、ヒマワリ、アルファルファ、モロコシ属、コムギ、ワタ、ラッカセイ、トマト、ジャガイモなどが挙げられるが、それらに限定されない。外来遺伝物質を植物細胞に導入するための、並びに導入された遺伝子を安定的に維持及び発現する植物を得るための、幾つかの技術が存在する。そのような技術としては、微粒体にコーティングされた遺伝物質の直接細胞への加速(米国特許第4,945,050号及び同第5,141,131号)が挙げられる。アグロバクテリウム技術を用いて植物を形質転換させることもできる、例えば、米国特許第5,177,010号、同第5,104,310号、欧州特許出願第0131624号B1、同第120516号、同第159418号B1、同第176112号、米国特許第5,149,645号、同第5,469,976号、同第5,464,763号、同第4,940,838号、同第4,693,976号、欧州特許出願第116718号、同第290799号、同第320500号、同第604662号、同第627752号、同第0267159号、同第0292435号、米国特許第5,231,019号、同第5,463,174号、同第4,762,785号、同第5,004,863号及び同第5,159,135号参照。他の形質転換技術としては、WHISKERS(商標)技術が挙げられる、米国特許第5,302,523号及び米国特許第5,464,765号参照。電気穿孔法技術も植物を形質転換させるために使用されている、国際公開第87/06614号、米国特許第5,472,869号、同第5,384,253号、国際公開第9209696号、及び同第9321335号参照。これらの形質転換特許及び公報のすべてが参照により組み込まれる。植物を形質転換させるための非常に多くの技術に加えて、外来遺伝子と接触させる組織のタイプも様々であり得る。そのような組織としては、胚形成組織、カルス組織タイプI及びII、胚軸、分裂組織などが挙げられるだろうが、それらに限定されない。当業者の技能の範囲内の適切な技術を用いて、ほぼすべての植物組織を分化中に形質転換させることができる。

【0053】

上で論じたような当分野において周知である様々な技術を用いて、本毒素のいずれかをコードする遺伝子を植物細胞に挿入することができる。例えば、形質転換された微生物細胞の選択を可能にするマーカーと大腸菌(*Escherichia coli*)において機能し得る複製系とを含む多数のクローニングベクターを、高等植物への挿入のための外来遺伝子の調製及び修飾に利用することができる。そのような操作は、例えば、所期の用途の必要に応じて突然変異、トランケーション、付加又は置換の挿入を含み得る。前記ベクターは、例えば、pBR322、pUCシリーズ、M13mpシリーズ、pACYC184などを含む。従って、Cryタンパク質又は変異体をコードする配列をベクターの適する制限部位に挿入することができる。結果として生じたプラスミドを大腸菌(*E. coli*)の細胞の形質転換に使用し、それらの細胞を適切な栄養培地において培養し、その後、採取し、溶解して、作業可能な量のプラスミドを回収する。配列分析、制限フラグメ

10

20

30

40

50

ント分析、電気泳動、及び他の生化学的・分子生物学的方法が、一般に、分析法として実施される。それぞれの操作の後、使用したDNA配列を切断し、次のDNA配列に連結させることができる。操作されたDNA配列それぞれを同じ又は異なるプラスミドにおいてクローニングすることができる。

【0054】

植物細胞の形質転換のためのT-DNA含有ベクターの使用は徹底的に研究されており、EP 120516; Lee and Gelvin (2008), Fraley et al.(1986), and An et al.(1985)に十分に記載されており、当分野において定着している。

【0055】

挿入されたDNAは、一旦、植物ゲノムに組み込まれてしまえば、その後の世代全体にわたって比較的安定している。植物細胞を形質転換させるために使用されるベクターは、除草剤又は抗生物質、例えば、とりわけ、ピアラフォス、カナマイシン、G418、ブレオマイシン又はヒグロマイシンに対する抵抗性をそれらの形質転換細胞に付与するタンパク質をコードする選択可能マーカー遺伝子を通常は含有する。従って、個々に利用される選択可能マーカー遺伝子は、形質転換細胞の選択を可能にするが、挿入DNAを含有しない細胞の成長は、その選択的化合物によって抑制されない。

【0056】

宿主細胞へのDNAの挿入には多数の技術を利用できる。それらの技術としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 又はアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) によって形質転換剤として送達されるT-DNAでの形質転換が挙げられる。加えて、送達すべきDNAを含有するリポソームと植物プロトプラストの融合、DNAの直接注入、微粒子銃形質転換(微粒子ボンバードメント)、又は電気穿孔法、及び他の可能な方法を利用してもよい。

【0057】

本発明の好ましい実施形態において、植物は、タンパク質コーディング領域のコドン使用量が植物にとって最適化されている遺伝子で形質転換されるであろう。例えば、参照により本明細書によって組み込まれる米国特許第5380831号を参照のこと。また、有利には、トランケートされた毒素をコードする植物が使用されるであろう。前記トランケートされた毒素は、典型的に、その完全長毒素の約55%から約80%をコードするであろう。植物において使用するための合成B.t.遺伝子を作り出す方法は、当分野において公知である(Stewart, 2007)。

【0058】

形質転換技術にかかわらず、遺伝子は、植物細胞においてB.t.殺虫毒素遺伝子及び変異体を発現することに適応させた遺伝子伝達ベクターに、該ベクターに植物プロモーターを含めることによって、組み込まれる。植物プロモーターに加えて、植物細胞において外来遺伝子を発現させるために、様々な源からのプロモーターを効率的に使用することができる。例えば、細菌起源のプロモーター、例えばオクトピンシンターゼプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター及びマンノピンシンターゼプロモーター、を使用することができる。非バシラススリンジエンシスプロモーターを一部の好ましい実施形態では使用することができる。植物ウイルス起源のプロモーター、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (*Cauliflower Mosaic Virus*) の35S及び19Sプロモーター、キャッサバベインモザイクウイルス (*Cassava Vein Mosaic Virus*) のプロモーターなどを使用することができる。植物プロモーターとしては、リブ羅斯-1,6-ニリン酸(RUBP)カルボキシラーゼ小サブユニット(ssu)、ベータ-コングリシンプロモーター、ファセオリンプロモーター、ADH(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、熱ショックプロモーター、ADF(アクチン解重合因子)プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、及び組織特異的プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターは、転写効率を向上させることができる一定のエンハンサー配列要素を含有することもある。典型的なエン

10

20

30

40

50

ハンサーとしては、ADH1 - イントロン1及びADH1 - イントロン6が挙げられるが、これらに限定されない。構成的プロモーターを使用してもよい。構成的プロモーターは、ほぼすべての細胞タイプにおいて及びほぼ常に継続的遺伝子発現を命令する（例えば、アクチン、ユビキチン、CaMV 35S）。組織特異的プロモーター（例えば、ゼイン、オレオシン、ナピン、ACP（アシルキャリアータンパク質）プロモーター）は、特定の細胞又は組織タイプ、例えば葉又は種子、における遺伝子発現の責任を負うものであり、これらのプロモーターも使用することができる。植物の一定の発育段階中に活性であり、特定の植物組織及び器官において活性でもあるプロモーターを使用することもできる。そのようなプロモーターの例としては、根特異的、花粉特異的、胚特異的、トウモロコシの毛に特異的、ワタ繊維特異的、種子内胚乳特異的、節部特異的などであるプロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0059】

一定の状況下では、誘導性プロモーターの使用が望ましいことがある。誘導性プロモーターは、特定のシグナル、例えば、物理的刺激（例えば、熱ショック遺伝子）；光（例えば、RUBPカルボキシラーゼ）；ホルモン（例えば、糖質コルチコイド）；抗生物質（例えば、テトラサイクリン）；代謝産物；及びストレス（例えば、干ばつ）に応答しての遺伝子の発現に責任を負う。植物において機能する他の望ましい転写及び翻訳要素、例えば、5'非翻訳リーダー配列、RNA転写終結配列及びポリアデニレート付加シグナル配列を使用してもよい。非常に多くの植物特異的遺伝子伝達ベクターが当分野に公知である。

20

【0060】

害虫抵抗性（IR）形質を有するトランスジェニック作物は、北米中のトウモロコシ及びワタ植物において優勢であり、これらの形質の取り扱いが世界的に拡大している。IR形質と除草剤耐性（HT）形質とを併せ持つ商用トランスジェニック作物が、多数の種子会社によって開発されている。これは、B.t.殺虫タンパク質によって付与されるIR形質と、アセト乳酸シンターゼ（ALS）阻害剤、例えばスルホニル尿素、イミダゾリノン、トリアゾロピリミジン、スルホンアニリドなど、グルタミンシンセターゼ（GS）阻害剤、例えばピアアフォス、グルホシネートなど、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（HPPD）阻害剤、例えばメソトリオン、イソキサフルトールなど、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ（EPSPS）阻害剤、例えばグリホサートなど、並びにアセチル補酵素Aカルボキシラーゼ（ACCase）阻害剤、例えばハロキシホップ、キザロホップ、ジクロホップなどに対する耐性などのHT形質との組み合わせを含む。遺伝子導入で得たタンパク質が、除草剤化学クラス、例えばフェノキシ酸系除草剤及びピリジジオキシ酢酸オーキシ系除草剤（国際公開第2007/053482A2号参照）、又はフェノキシ酸系除草剤及びアリアルオキシフェノキシプロピオン酸系除草剤（国際公開第2005/107437A2、A3号）、に対して耐性を植物にもたらず、他の例は、公知である。IR形質によって多数の有害生物の問題を防除できることは、価値のある商品概念であり、この製品概念の利便性は、害虫防除形質及び形質及び雑草防除形質が同じ植物に兼備されれば向上される。さらに、本発明のものなどのB.t.殺虫タンパク質によって付与されるIR形質と、上で述べたものなどの1つ又はそれ以上の追加のHT形質、加えて、1つ又はそれ以上の追加のインプット形質（例えば、B.t.由来の若しくは他の殺虫特性によって付与される他の害虫抵抗性、RNAiなどのメカニズムによって付与される害虫抵抗性、線虫抵抗性、病害抵抗性、ストレス耐性、改善された窒素利用能など）又はアウトプット形質（例えば、高い含油量、健康な油組成、栄養改善など）の単一植物兼備により、向上された価値を得ることができる。そのような兼備は、従来育種（育種スタック）によって達成されることがあり、又は付帯的に、多数の遺伝子の同時導入を伴う新規形質転換事象（分子スタック）として達成されることがある。恩恵としては、害虫を管理できること、並びに生産者及び/又は消費者に二次的な恩恵をもたらす作物植物における改善された雑草防除が挙げられる。このように、本発明を他の形質と併用して、任意の数の農耕学的問題点を柔軟に及び費用効果的に制御するこ

30

40

50

とができる改善された作物品質の完全な農耕学的パッケージを提供することができる。

【 0 0 6 1 】

形質転換された細胞は、通常の様式で植物内部で成長する。それらは、生殖細胞を形成することができ、及び形質転換された形質を後代植物に伝えることができる。

【 0 0 6 2 】

そのような植物を通常の様式で成長させることができ、同じ形質転換遺伝因子又は他の遺伝因子を有する植物と交配することができる。結果として生じたハイブリッド個体は、対応する表現型特性を有する。

【 0 0 6 3 】

本発明の好ましい実施形態において、植物は、コドン使用量が植物にとって最適化されている遺伝子で形質転換されるであろう。例えば、米国特許第 5, 380, 831号参照。加えて、植物において使用するための合成 B t 遺伝子を作り出すための方法は、当分野において公知である(Stewart and Burgin, 2007)。好ましい形質転換植物の 1 つの非限定的な例は、C r y 3 B a タンパク質をコードする植物発現可能遺伝子を含む、及びさらに、C r y 3 4 A b / 3 5 A b タンパク質をコードする第二のセットの植物発現可能遺伝子を含む、稔性とうもろこし植物である。

【 0 0 6 4 】

同系交配とうもろこし系統への C r y 3 B a - 及び C r y 3 4 A b / 3 5 A b - 決定形質の伝達(又は遺伝子移入)は、循環選抜育種法によって、例えば戻し交配によって、達成することができる。この場合、所望の反復親を、C r y 決定形質に適する遺伝子を保有するドナー同系交配体(一回親)と先ず交配させる。次に、この交配種の後代を交配して反復親に戻し、その後、その結果として生じた後代を、一回親から伝達されるべき所望の形質について選抜する。所望の形質についての選抜を伴う反復親との三世代、好ましくは四世代、さらに好ましくは五世代又はそれ以上の世代の戻し交配の後、その後代は、伝達される形質を制御する遺伝子座についてヘテロ接合性であるだろうが、殆どの又はほぼすべての他の遺伝子については反復親と同様であるだろう(例えば、Poehlman & Sleper(1995) Breeding Field Crops, 4th Ed., 172-175;Fehr (1987) Principles of Cultivar Development, Vol.1: Theory and Technique, 360-376参照)。

【 0 0 6 5 】

害虫抵抗性管理(IRM)戦略。例えば、R o u s hらは、殺虫性トランスジェニック作物の管理のための二毒素戦略(「ピラミディング」又は「スタッキング」とも呼ばれる)を概説している。(The Royal Society.Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.(1998) 353, 1777-1786)。

【 0 0 6 6 】

ウェブサイト上で、アメリカ合衆国観光保護庁(United States Environmental Protection Agency)(epa.gov/oppppd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm)は、標的有害生物に対して活性な単一のB tタンパク質を生産するトランスジェニック作物と共に使用するための非トランスジェニック(すなわち、非B . t .)リフュージ(非B t作物/トウモロコシの区画)を設けることについて、以下の要件を発表している。

「マツマダラメイガ(corn borer)防護B t(C r y 1 A b又はC r y 1 F)トウモロコシ製品についての具体的な構造化要件は、次のとおりである:

構造化リフュージ: コーンベルト内に20%非レプチドブレラ属B tトウモロコシリフュージ; コットンベルト内に50%非レプチドブレラ属B tリフュージ;

区画

内部(すなわち、B t圃場内)

外部(すなわち、任意交配を最大にするためのB t圃場から1/2マイル(可能な場合には1/4マイル)以内の離隔した圃場)

圃場内植栽帯(In-field Strips)

10

20

30

40

50

植栽帯は、幼虫移動の影響を低減させるために少なくとも4畝幅（好ましくは6畝）でなければならない」

【0067】

加えて、全米トウモロコシ生産者協会（National Corn Growers Association）も、彼らのウェブサイト：ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn）

で、リフュージ要件に関する同様のガイダンスを提供している。例えば：

「マツマダラメイガIRMの要件：

- 貴方のトウモロコシ畑の少なくとも20%をリフュージハイブリッドのために作付けすること

- ワタ生産地では、リフュージは50%でなければならない

- リフュージハイブリッドから1/2マイル以内に作付けしなければならない

- リフュージをBt圃場内の植栽帯として作付けすることができる；リフュージ植栽帯は、少なくとも4畝幅でなければならない

- 標的昆虫のために経済的許容限界に達する場合にのみ、リフュージを従来の殺有害生物剤で処理してもよい

- Bt系噴霧可能殺虫剤をリフュージトウモロコシに対して使用することはできない

- 適切なリフュージを、Btトウモロコシを有するすべての農地に作付けしなければならない」

【0068】

Roushらが（例えば、1780頁及び1784頁右列で）述べているように、それぞれが標的有害生物に対して有効であり、交叉抵抗性が殆ど又は全くない2つのタンパク質のスタッキング又はピラミディングは、より小さいリフュージの使用を可能にし得る。Roushは、好結果のスタックについては10%リフュージ未満のリフュージサイズで単一の（ピラミディングされていない）形質のための約50%リフュージに匹敵する抵抗性管理を提供できることを示唆している。現在利用できるピラミディングされたBtトウモロコシ製品について、アメリカ合衆国環境保護庁（U.S. Environmental Protection Agency）は、単一形質製品についてのもの（一般に20%）より有意に少ない（一般に5%）非Btトウモロコシの構造化リフュージを作付けすることを求めている。

【0069】

リフュージのIRM効果をもたらすための様々な方法があり、それらとしては、Roush et al. (supra)、及び米国特許第6,551,962号によってさらに論じられているように、圃場における様々な幾何学的作付けパターン（例えば上述のもの）及び袋詰め種子混合物（in-bag seed mixture）が挙げられる。

【0070】

上記百分率又は類似のリフュージ比率を、本ダブル又はトリプルスタック又はピラミッドに用いることができる。本発明はルートワーム標的昆虫に対する多重、非競合作用機作を提供するため、本発明は、「ゼロリフュージ」、すなわちリフュージ植物のない圃場、を（リフュージを必要としないため）提供することができるだろう。約10エーカーより広い典型的なBtトランスジェニック圃場には、一般に、許可が求められる。従って、本発明は、「ゼロリフュージ」である又はBt植物を有さない10エーカー又はそれ以上の圃場を含む；このサイズの圃場は、以前には、有意な非Btリフュージを有することが求められた。

【0071】

本明細書の中で言及又は引用するすべての特許、特許出願、仮出願、及び出版物は、それらが本出願の明確な教示と矛盾しない程度に、それら全体が参照により組み込まれる。

【0072】

以下は、本発明を実施するための手順を例証する実施例である。これらの実施例を限定

とみなすべきではない。別の注記がない限り、すべての百分率は重量によるものであり、及びすべての溶媒混合物の比率は容量によるものである。すべての温度は、摂氏度でのものである。

【0073】

具体的な指示又は含意がない限り、用語「a」、「an」及び「the」は、本明細書において用いる場合、「少なくとも1」を意味する。

【実施例】

【0074】

実施例 1

Cry34Ab1、Cry35Ab1及びCry3Ba1完全長毒素をコードする発現プラスミドの構築

10

【0075】

完全長Cry34Ab1、Cry35Ab1及びCry3Ba1 Cryタンパク質をそれぞれ生産するように遺伝子操作で作製されたシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) (Pf) 発現プラスミドの構築には標準的なクローニング法を用いた。New England Biolabs (NEB; マサチューセッツ州イプスウィッチ) からの制限エンドヌクレアーゼをDNA消化に使用し、InvitrogenからのT4 DNAリガーゼをDNAライゲーションに使用した。Plasmid Midi Kit (Qiagen) をその供給業者の指示書に従って使用して、プラスミド調製を行った。アガロースTris-アセテートゲル電気泳動の後、Millipore Ultrafree (登録商標) - DAカートリッジ (マサチューセッツ州ビルリカ) を使用して、DNAフラグメントを精製した。基本クローニング戦略は、完全長Cry34Ab1及びCry35Ab1 Cryタンパク質のコーディング配列 (CDS) をpMYC1803のSpeI及びXhoI (又はXbaI) 制限部位に、並びに完全長Cry3Ba1タンパク質のCDSをpMYC1050のKpnI及びXbaI制限部位に、それぞれサブクローニングすること、それによって、それらを、それぞれプラスミドpKK223-3 (PL Pharmacia、ウイスコンシン州ミルウォーキー) からのPtacプロモーター及びrrnBT1T2ターミネータの発現制御下に置くことを必要とした。pMYC1803は、RSF1010複製起点と、テトラサイクリン抵抗性遺伝子と、DNAフラグメント含有タンパク質コーディング領域を導入することができる制限酵素認識部位の前にリボソーム結合部位とを有する中コピープラスミドである (米国特許出願第2008/0193974号)。その発現プラスミドを電気穿孔法によってP.フルオレッセンス株MB214に形質転換させ、SOC-Soy加水分解物培地に回収し、20 µg/mL テトラサイクリンを含む溶原培地 (Lysogeny broth) (LB) 培地にプレティングした。微生物操作の詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2006/0008877号、米国特許出願第2008/0193974号及び米国特許出願第2008/0058262号において入手できる。mini prepプラスミドDNAの制限消化によって、コロニーをスクリーニングした。挿入物を含む選択されたコロニーのプラスミドDNAは、商業的シーケンシング供給業者、例えばMWG Biotech (アラバマ州ハンツビル)、との契約によりシーケンシングされた。配列データを集め、Sequencher (商標) ソフトウェア (Gene Codes Corp、ミシガン州アナーバー) を使用して分析した。

20

30

40

【0076】

実施例 2

成長及び発現

【0077】

Bt受容体結合及び昆虫バイオアッセイをはじめとする特性づけのためのCry34Ab1、Cry35Ab1及びCry3Ba1毒素の振盪フラスコ生産での成長及び発現分析を、発現構築物を持つ振盪フラスコ成長P.フルオレッセンス株 (例えば、Cry34

50

Ab1についてはクローンpMYC2593、Cry35Ab1についてはpMYC3122、及びCry3Ba1についてはpMYC1177)によって遂行した。20µg/mLテトラサイクリンを補足したLB培地で成長させた種培養物を使用して、20µg/mLテトラサイクリンを伴う200mLの同培地に接種した。24時間、30で振盪しながらの最初のインキュベーションの後、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加により、PtacプロモーターによるCry34Ab1、Cry35Ab1及びCry3Ba1毒素の発現を誘導した。誘導時に及び誘導後の様々な時点で培養物をサンプリングした。600nmでの光学密度(OD600)により、細胞密度を測定した。

【0078】

10

実施例3

振盪フラスコサンプルの細胞分画及びSDS-PAGE分析

【0079】

各サンプリング時、サンプルの細胞密度をOD600=20に調整した。1mLアリコート管を14,000×gで5分間、遠心分離する。細胞ペレットを-80で凍結させた。EasyLyse(商標)細菌タンパク質抽出溶液(EPICENTRE(登録商標)Biotechnologies、ウィスコンシン州マディソン)を使用して、凍結された振盪フラスコ細胞ペレットサンプルから可溶性及び不溶性画分を生成した。各細胞ペレットを1mLEasyLyse(商標)溶液に再浮遊させ、溶解バッファでさらに1:4希釈し、振盪しながら室温で30分間インキュベートした。溶解産物を14,000rpmで20分間、4で遠心分離し、上清を可溶性画分として回収した。その後、ペレット(不溶性画分)を等容量のリン酸緩衝食塩水(PBS;11.9mMNa₂HPO₄、137mMNaCl、2.7mMKCl、pH7.4)に再浮遊させた。サンプルを、β-メルカプトエタノールを含有する2×Laemmliサンプルバッファと1:1混合し、5分間沸騰させた後、NuPAGE Novex 4-20% Bis-Trisゲル(Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)に負荷した。電気泳動は、推奨XTMOPSBuffa中で行った。SimplyBlue(商標)SafeStainをその製造業者(Invitrogen)のプロトコルに従って用いてゲルを染色し、Typhoon画像形成システム(GE Healthcare Life Sciences、ペンシルバニア州ピッツバーグ)を使用して画像形成した。

20

30

【0080】

実施例4

封入体調製

【0081】

SDS-PAGE及びMALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析)によって実証されるように、不溶性B.t.殺虫タンパク質を生産したP.フルオレッセンスからの細胞を用いて、Cryタンパク質封入体(IB)調製を行った。P.フルオレッセンス発酵ペレットを37水浴で解凍する。それらの細胞を、溶解バッファ[50mMTris、pH7.5、200mMNaCl、20mMEDTA二ナトリウム塩(エチレンジアミン四酢酸)、1%TritonX-100、及び5mMジチオトレイトール(DTT)]に再浮遊させて25%w/vにし、使用直前に5mL/Lの細菌プロテアーゼ阻害剤カクテル(P8465Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス)を添加した。最低設定でホモジナイザー(Tissue Tearor、BioSpec Products, Inc.、オクラホマ州バートルズビル)を使用して、細胞を浮遊させた。金属製スパチュラで混ぜることによってリゾチーム(白色鶏卵からの25mgのSigmaL7651)をその細胞浮遊液に添加し、その浮遊液を室温で1時間インキュベートした。その浮遊液を氷で15分間冷却し、その後、Branson Sonifier 250を使用して音波処理した(1分セッションを2回、50%デューティサイクル、30%アウトプット)。細胞溶解産物を顕微鏡検査によって点検した。追加の25mgのリゾチームを必要に応じて添加し、インキュベーション及

40

50

び音波処理を繰り返した。細胞溶解が顕微鏡検査によって確認されたら、溶解産物を $11,500 \times g$ で 25 分間 (4) 遠心分離して IB ペレットを形成し、上清を廃棄した。IB ペレットを 100 mL 溶解バッファに再浮遊させ、ハンドミキサーで均質化し、上記のように遠心分離した。上清が無色になり、IB ペレットが堅くなり、オフホワイトの色になるまで、その IB ペレットを (50 mL 溶解バッファへの) 再浮遊、音波処理及び遠心分離によって繰り返し洗浄した。最終洗浄については、2 mM EDTA を含有する滅菌濾過 ($0.22 \mu m$) 蒸留水に IB ペレットを再浮遊させ、遠心分離した。2 mM EDTA を含有する滅菌濾過蒸留水に最終ペレットを再浮遊させ、1 mL アリコート - 80 で保存した。

【0082】

10

実施例 5

SDS - PAGE 分析及び定量

【0083】

IB ペレットの 1 mL アリコートを解凍し、滅菌濾過蒸留水で 1 : 20 希釈することによって、IB 調製物中のタンパク質の SDS - PAGE 分析及び定量を行った。次に、その希釈サンプルを $4 \times$ 還元用サンプルバッファ [250 mM Tris、pH 6.8、40% グリセロール (v/v)、0.4% プロモフェノールブルー (w/v)、8% SDS (w/v) 及び 8% β -メルカプト-エタノール (v/v)] と共に沸騰させ、Novex (登録商標) 4~20% Tris-グリシン、12+2 ウエルゲル (Invitrogen) 上に負荷し、 $1 \times$ Tris/グリシン/SDS バッファ (Invitrogen) で泳動させた。ゲルをおおよそ 60 分間、200 ボルトで泳動させて、染色し、脱染し、その後、Simply Blue (商標) Safe Stain (Invitrogen) 手順を行った。同じゲルでのウシ血清アルブミン (BSA) サンプル泳動についての濃度測定値を比較することによって標的バンドの定量を行って、Bio-Rad Quantity One (登録商標) ソフトウェアを使用して標準曲線を生成した。

20

【0084】

実施例 6

封入体の可溶化

【0085】

(50~70 mg/mL の Cry34Ab1、Cry35Ab1 及び Cry3Ba1 タンパク質をそれぞれ含有する) P. フルオレッセンス (P. fluorescens) クローン MR1253、MR1636 及び MR816 からの 10 mL の封入体浮遊液を Eppendorf モデル 5415C 微量遠心管の最高設定 (おおよそ $14,000 \times g$) で遠心分離して、封入体をペレット化した。保存用バッファ上清を除去し、50 mL コニカルチューブの中で、Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 の両方については 25 mL の 10 mM 酢酸ナトリウムバッファ、pH 3.0、及び Cry3Ba1 については 100 mM 炭酸ナトリウムバッファ、pH 11 でそれぞれ置換した。ピペットを使用して封入体を再浮遊させ、ボルテックスにかけて徹底的に混合した。4 で一晩、穏やかに揺動するプラットフォーム上にそれらのチューブを置いて、完全長 Cry34Ab1、Cry35Ab1 及び Cry3Ba1 タンパク質を抽出した。それらの抽出物を $30,000 \times g$ で 30 分間、4 で遠心分離し、得られた上清 (可溶化された完全長 Cry タンパク質を含有する) を保存した。

30

40

【0086】

実施例 7

完全長プロトキシンのトランケーション

【0087】

完全長 Cry35Ab1 及び Cry3Ba1 をキモトリプシン又はトリプシンでトランケート又は消化して、それらのタンパク質の活性形態であるキモトリプシン又はトリプシンコアフラグメントを生成した。具体的には、可溶化された完全長 Cry35Ab1 を、キモトリプシン (ウシ膵臓) (Sigma、ミズーリ州 St.) と共に (50 : 1 = Cr

50

yタンパク質：酵素、w/wで)、100mM 酢酸ナトリウムバッファ、pH3.0(実施例6)中、4 で、穏やかに振盪しながら2~3日間インキュベートし、その一方で、完全長Cry3Ba1を、トリプシン(ウシ膵臓)(Sigma、ミズーリ州St.)と共に(20:1=Cryタンパク質：酵素、w/wで)、100mM 炭酸ナトリウムバッファ、pH11(実施例6)中、室温で、1~3時間インキュベートした。完全タンパク質分解性プロセッシングをSDS-PAGE分析によって確認した。完全長Cry35Ab1及びCry3Ba1の分子質量は、おおよそ44kDaに相当及びおおよそ53kDaに相当し、並びにそれらのキモトリプシン又はトリプシンコアは、おおよそ40kDaに相当及びおおよそ55kDaに相当した。Cry35Ab1の完全長及びキモトリプシンコアのアミノ酸配列をSEQ ID 1及びSEQ ID 2に提供し、並びにCry3Ba1の完全長及びトリプシンコアのアミノ酸配列をSEQ ID 3及びSEQ ID 4に提供する。キモトリプシンコアもトリプシンコアも、Cry34Ab1については入手できず、従って、完全長Cry34Ab1を結合アッセイに使用した。完全長Cry34Ab1のアミノ酸配列を、SEQ ID 5として提供する。

10

【0088】

実施例8

トランケートされた毒素の精製

【0089】

キモトリプシン処理Cry35Ab1及びトリプシン処理Cry3Ba1コアフラグメントを精製した。具体的には、消化反応物を30,000xgで30分間、4 で遠心分離して脂質を除去し、得られた上清を、Amicon Ultra-15再生セルロース遠心濾過装置(10,000分子量カットオフ;Millipore)を使用して5倍濃縮した。その後、使い捨てPD-10カラム(GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ)又は透析を使用して、サンプルバッファを、Cry34Ab1及びCry35Ab1の両方については20mM 酢酸ナトリウムバッファ、pH3.5に、並びにCry3Ba1については10mM CAPS[3-(シクロヘキサミノ)1-プロパンスルホン酸]、pH10.5に変えた。ATKA Explorer液体クロマトグラフィシステム(Amersham Biosciences)を使用する精製のために対応するバッファを使用して最終容量を15mLに調整した。Cry35Ab1については、バッファAは、20mM 酢酸ナトリウムバッファ、pH3.5であり、バッファBは、バッファA+1M NaCl、pH3.5であった。HiTrap SP(5mL)カラム(GE)を使用した。バッファAを使用してカラムを十分に平衡させた後、Cry35Ab1溶液をカラムに5mL/分の流量で注入した。1mL/画分で5mL/分での0~100%のバッファB勾配を使用して溶離を行った。Cry3Ba1については、バッファAは、10mM CAPSバッファ、pH10.5であり、バッファBは、10mM CAPSバッファ、pH10.5+1M NaClであった。Capto Q、5mL(5mL)カラム(GE)を使用し、すべての他の手順は、Cry35Ab1についてのもと同様であった。選択された画分の、最高品質の標的タンパク質を含有する画分をさらに選択するための、SDS-PAGE分析の後、それらの画分をプールした。精製Cry35Ab1キモトリプシンコアについては、上で説明したようにバッファを20mM Bist-Tris、pH6.0と交換した。精製Cry3Ba1トリプシンコアについては、使い捨てPD-10カラム(GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ)又は透析を使用してその塩を除去した。SDS-PAGE、及びBSAを標準物質として用いるTyphoon画像形成システム(GE)分析を用いて定量した後、サンプルを、後の結合アッセイのために4 で保存した。

20

30

40

【0090】

実施例9

BBMV調製

【0091】

昆虫の刷子縁膜小胞(BBMV)調製物を、Cry毒素受容体結合アッセイのために広

50

範に使用した。本発明において使用するBBMV調製物は、Wolferberger et al.(1987)によって記載された方法を用いて第3齢のウエスタンコーンルートワーム(ジアブロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ(Diabrotica virgifera virgifera)LeConte)の単離された中腸から調製した。ロイシンアミノペプチダーゼを前記調製物中の膜タンパク質のマーカーとして使用し、以前に記載されているように(Li et al.2004a)、粗製ホモジネート及びBBMV調製物のロイシンアミノペプチダーゼ活性を判定した。ブラッドフォード法(1976)を用いて、BBMV調製物のタンパク質濃度を測定した。

【0092】

実施例10

¹²⁵I 標識

【0093】

飽和及び同種競合結合アッセイのために、¹²⁵Iを使用して精製完全長Cry34Ab1、キモトリプシン処理Cry35Ab1、及びトリプシン処理Cry3Ba1を標識した。放射標識がCry毒素の生物活性を無効にしないことを保証するために、Pierce(登録商標)Iodination Beads(Pierce Biotechnology, Thermo Scientific、イリノイ州ロックフォード)の指示書に従うことによりNaIを使用して低温ヨウ素標識化を行った。バイオアッセイの結果は、ヨウ素標識化Cry35Ab1キモトリプシンコアがウエスタンコーンルートワームの幼虫に対して依然として活性であるが、ヨウ素標識化がCry34Ab1を不活性化することを示した。昆虫BBMVへの放射標識¹²⁵I-Cry34Ab1の特異的結合を検出することができず、それ故、Cry34Ab1の膜受容体結合を評定するために別の標識方法を必要とした。トリプシン処理Cry3Ba1は、ウエスタンコーンルートワームに対して限られた活性を有し、それ故、低温ヨウ素標識化Cry3Ba1トリプシンコアを使用するコーンルートワームに関するバイオアッセイは、活性変化を評定することが難しいと考えられた。加えて、BBMVへの¹²⁵I-Cry3Ba1の特異的結合は、レベルが低かったとしても検出された。Cry3Ba1の低温ヨウ素標識化及びその毒性アッセイを省略した。放射標識¹²⁵I-Cry35Ab1及び¹²⁵I-Cry3Ba1を、Pierce(登録商標)Iodination Beads(Pierce)及びNa¹²⁵Iでのヨウ素標識化によって得た。Zeba(商標)Desalt Spin Columns(Pierce)を使用して、ヨウ素標識化タンパク質から取り込まれない又は遊離¹²⁵Iを除去した。ヨウ素標識化Cryタンパク質の比放射能は、1~5 uCi/ugの範囲であった。標識及び結合アッセイの多数のバッチを行った。

【0094】

実施例11

飽和結合アッセイ

【0095】

以前に記載されているように(Li et al. 2004b)、¹²⁵I 標識Cry毒素を使用して特異的又は飽和結合アッセイを行った。昆虫BBMVへのCry35Ab1及びCry3Ba1の特異的結合を判定するため並びに結合親和性(解離定数、Kd)及び結合部位濃度(Bmax)を推定するために、一連の漸増濃度の¹²⁵I-Cry35Ab1又は¹²⁵I-Cry3Ba1いずれかを、それぞれ、所与の濃度(0.1mg/mL)の昆虫BBMVと共に、0.1% BSAを補足した150uLの20mM Bis-Tris、pH6.0、150mM KCl中、室温で1時間、穏やかに振盪させながらインキュベートした。20,000xgで、室温で8分間の遠心分離により、浮遊液中の遊離毒素から、BBMVに結合した毒素を分離した。0.1% BSAを含有する900uLの同じバッファ(氷冷)でそのペレットを2回洗浄した。ペレットに残存する放射能をCOBRA II Auto-Gamma counter(Packard、a Canberra company)で測定し、全結合を考究した。別の系列の結合反応を並行して準備し、BBMVのすべての特異的結合部位を完全に占有するように500~1000倍過

10

20

30

40

50

剰の対応する非標識毒素を結合反応のそれぞれに含め、それを使用して非特異的結合を判定した。全結合から非特異的結合を引くことによって、特異的結合を推定した。GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software、カリフォルニア州サンディエゴ) を実行することにより、使用した標識毒素の濃度に対する特異的結合を用いてこれらの毒素のKd及びBmax値を推定した。Microsoft Excel又はGraphPad Prismソフトウェアのいずれかを使用して、チャートを作成した。実験を少なくとも4回繰り返し、結果を図1A (BBMVへの¹²⁵I-Cry35Ab1の結合)及び図1B (BBMVへの¹²⁵I-Cry3Ba1の結合)のグラフにプロットした。これらの結合実験は、¹²⁵I-Cry35Ab1と¹²⁵I-Cry3Ba1の両方がBBMVに特異的に結合できることを明示した(図1A及び1B)。¹²⁵I-Cry35Ab1及び¹²⁵I-Cry3Ba1は、結合親和性、それぞれ、Kd = 11.66 ± 11.44、7.35 ± 3.81 (nM)、及び結合部位濃度、それぞれ、Bmax = 0.78 ± 0.46、0.55 ± 0.13 (pmole/mg BBMV)を有した。

10

【0096】

¹²⁵I-Cry35Ab1の特異的結合を非標識Cry34Ab1の存在時に行った(1:50 = ¹²⁵I-Cry35Ab1:Cry34Ab1、モル比)。¹²⁵I-Cry35Ab1の特異的結合が飽和されなかった(図2)ので、結合パラメータ(Kd及びBmax)は得られなかった。しかし、¹²⁵I-Cry35Ab1の特異的結合は、非標識Cry34Ab1の存在時に全結合のおおよそ90%を占めた。

20

【0097】

実施例12

競合結合アッセイ

Cry34Ab1及びCry35Ab1が別々に、加えて二成分毒素としてそれらの混合物が、Cry3Ba1と同じセットの結合部位を共有するかどうかを判定するために、競合結合アッセイを行った。Cry3Ba1の同種競合結合アッセイのために、漸増量(0~2.500nM)の非標識Cry3Ba1を、先ず、5nM ¹²⁵I-Cry3Ba1と混合し、その後、それぞれ、0.1mg/mLの昆虫BBMVと共に室温で1時間インキュベートして、BBMV上の推定受容体についてそれらを競合させた。同様に、5nM ¹²⁵I-Cry35Ab1を非標識Cry34Ab1の不在下又は存在時に(1:50 = ¹²⁵I-Cry35Ab1:Cry34Ab1、モル比)及び0.03mg/mLのBBMVと共にそれぞれ用いて、Cry35Ab1同種競合を完了した。BBMVに結合した¹²⁵I-Cry3Ba1又は¹²⁵I-Cry35Ab1の百分率を、それぞれの反応について、非標識競合物不在時の最初の全(又は特異的)結合と比較して決定した。

30

【0098】

¹²⁵I-Cry35Ab1と非標識Cry3Ba1の間の異種競合結合アッセイを非標識Cry34Ab1不在又は存在時に行って、それらが同じセットの結合部位を共有するかどうかを特定した。これは、競合物としての非標識Cry3Ba1の量を増加させて、¹²⁵I-Cry35Ab1単独又は¹²⁵I-Cry35Ab1+Cry34Ab1(1:50 = ¹²⁵I-Cry35Ab1:Cry34Ab1、モル比)と結合について競合させることによって達成した。同様に、相互異種競合結合アッセイも行い、これは、非標識Cry3Ba1と結合について競合するように反応に含める1つ又は2つの競合物として、別々に非標識Cry35Ab1及びCry34Ab1、又はCry35Ab1+Cry34Ab1(1:50 = Cry35Ab1:Cry34Ab1、モル比)混合物の量を増加させることによって達成した。この実験を少なくとも3回繰り返し、結果を図3A(単独の¹²⁵I-Cry35Ab1の結合パーセント)及び図3B(Cry34Ab1の存在下での¹²⁵I-Cry35Ab1の結合パーセント)のグラフにプロットした。

40

【0099】

これらの実験結果は、Cry34Ab1の存在(図3A)又は不在(図3B)に係な

50

く、Cry35Ab1が^{1 2 5}I-Cry35Ab1の特異的結合を競合除去 (compete off) できることを明示していた。しかし、Cry3Ba1は、Cry34Ab1の不在時にも、存在時にも、^{1 2 5}I-Cry35Ab1の特異的結合を競合除去することができなかった。相互競合結合アッセイにおいて、Cry3Ba1も全結合の20%を超えてそれ自体を置換することができ、これは、特異的結合がほんの小率しか占めない (図1B参照) ため、それがその特異的結合を完全に競合除去することを反映している。しかし、単独でのCry34Ab1又はCry35Ab1も、Cry35Ab1+Cry34Ab1の混合物 (1:10) も、^{1 2 5}I-Cry3Ba1を置換することができなかった。これらのデータは、Cry35Ab1単独又はCry35Ab1+Cry34Ab1の混合物がCry3Ba1と受容体結合部位を共有しないことを示していた。

10

参考文献

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Li, H., Oppert, B., Higgins, R.A., Huang, F., Zhu, K.Y., Buschman, L.L., 2004a. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 753-762.

Li, H., Oppert, B., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J., Higgins, R.A., Buschman, L.L. and Zhu, K.Y. and Huang, F. 2004b. Binding analysis of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 52-57.

20

Wolfersberger, M.G., Luthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 301-308.

米国特許出願第20080193974号.2008.BACTERIAL LEADER SEQUENCES FOR INCREASED EXPRESSION

米国特許出願第20060008877号, 2006. Expression systems with sec-system secretion.

30

米国特許出願第20080058262号, 2008. rPA optimization.

【 図 1 】

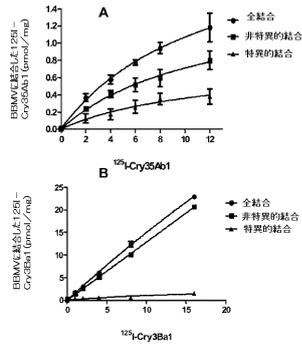


図1. インフラ特放射標識Cry35Ab1 (nM)の関数としての、125I-Cry35Ab1 (A) 及び125I-Cry38Ab1 (B)のウエスタンブロット法によるBEMVAへの結合。特異的結合=全結合-非特異的結合。エラーバー=SEM (標準誤差)。Cry35Ab1:キモトリプシン処理コア(40kDa)；及びCry38Ab1:トリプシン処理コア(55kDa)。

【 図 2 】

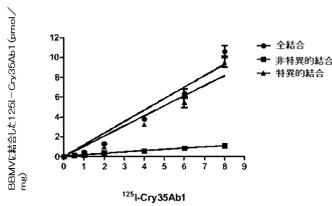


図2. インフラ特放射標識Cry35Ab1 (nM)の関数としての、Cry34Ab1存在時の125I-Cry35Ab1 (1:50 = 125I-Cry35Ab1:Cry34Ab1、モル比)のウエスタンブロット法によるBEMVAへの結合。特異的結合=全結合-非特異的結合。エラーバー=SEM (標準誤差)。Cry35Ab1:キモトリプシン処理(chymotrypsinized)コア(40kDa)。

【 図 3 】

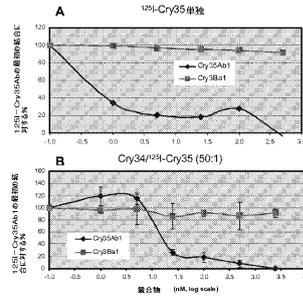


図3. 5nM 125I-Cry35Ab1単独と共E (1%EA) 又は250nM Cry34Ab1 + 5nM 125I-Cry35Ab1と共E (1%EA)又は0.03mg/mL (1%EA)のBEMVAへの125I-Cry35Ab1の最初の特異的結合に対する百分率。Cry34Ab1:完全長(14kDa)；Cry35Ab1:キモトリプシン処理コア(40kDa)；及びCry38Ab1:トリプシン処理コア(55kDa)；log0.1 = -1.0, log1 = 0, log10 = 1.0, log100 = 2.0, log1,000 = 3.0。

【 図 4 】

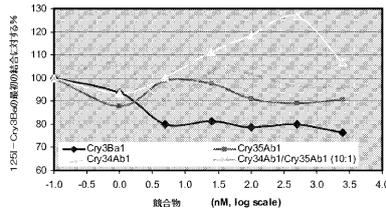


図4. 5nM 125I-Cry38Ab1と共E (1%EA)と共E (1%EA)による非特異的結合物濃度でのウエスタンブロット法によるBEMVAへの125I-Cry38Ab1の最初の全結合に対する百分率。Cry34Ab1:完全長(14kDa)；Cry35Ab1:キモトリプシン処理コア(40kDa)；及びCry38Ab1:トリプシン処理コア(55kDa)；log0.1 = -1.0, log1 = 0, log10 = 1.0, log100 = 2.0, log1,000 = 3.0。

【 配 列 表 】

0005922646000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/32 (2006.01) C 0 7 K 14/32

- (31)優先権主張番号 61/388,273
 (32)優先日 平成22年9月30日(2010.9.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/327,240
 (32)優先日 平成22年4月23日(2010.4.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 ナルバ, ケネス, イー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンスビレ, クリークサイド パス 4 3 7 2
- (72)発明者 ミード, トーマス
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンスビレ, ハンティングトン ウッズ ポイント 1 1 4 1
- (72)発明者 フェンシル, クリスティン, ジェイ.
アメリカ合衆国 インディアナ州, インディアナポリス, ノース パーク アベニュー 5 3 2 9
- (72)発明者 リ, ヒュアロング
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンスビレ, イーグル レイク ドライブ 6 2 0 3
- (72)発明者 ヘイ, ティモシー, ディー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンスビレ, カタリーナ ウェイ 1 6 5 3
- (72)発明者 ウッズレイ, アーロン, ティー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 8, フィッシャーズ, ターナー ドライブ 8 9 0 6
- (72)発明者 オルソン, モニカ, ブリット
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 5 2, レバノン, サウス バッド ロード 4 7 0 6

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0300980(US, A1)
特表2001-512021(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 0 1 H 5 / 0 0
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 P u b M e d
 C i N i i
 D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)