

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-527930

(P2018-527930A)

(43) 公表日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31 Z N A	2 B 0 3 0
C 1 2 N 15/82 (2006.01)	C 1 2 N 15/82 1 2 2 Z	4 B 0 6 3
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A	4 H 0 1 1
A O 1 H 6/06 (2018.01)	A O 1 H 6/06	4 H 0 4 5
A O 1 H 6/34 (2018.01)	A O 1 H 6/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-510869 (P2018-510869)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月25日 (2016. 8. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月22日 (2018. 3. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/048714
 (87) 国際公開番号 W02017/035364
 (87) 国際公開日 平成29年3月2日 (2017. 3. 2)
 (31) 優先権主張番号 62/210, 737
 (32) 優先日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501231613
 モンサント テクノロジー エルエルシー
 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・プー
 ルバード800番、メール・ゾーン・イー1
 エヌエイ
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100156122
 弁理士 佐藤 剛
 (72) 発明者 デイビッド・ジェイ・ボーウェン
 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・プー
 ルバード800番、メール・ゾーン・イー1
 エヌエイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規防虫タンパク質

(57) 【要約】

L e p i d o p t e r a 目の害虫種に対して毒性活性を示す農薬タンパク質を開示し、このタンパク質としては、T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 及び T I C 7 4 7 3 P L が挙げられるが、これらに限らない。開示する農薬タンパク質の1つ以上をコードする組み換え核酸配列を含むDNAコンストラクトを提供する。L e p i d o p t e r a 目の寄生に対する耐性を有するトランスジェニック植物、植物細胞、種子及び植物部位であって、本発明の農薬タンパク質をコードする組み換え核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物細胞、種子及び植物部位を提供する。生物試料に、本発明の組み換え核酸配列またはタンパク質が存在することの検出方法と、農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 及び T I C 7 4 7 3 P L のいずれかを用いた、L e p i d o p t e r a 目の種の害虫の防除方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

農薬タンパク質またはその農薬性断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに機能可能に連結した異種プロモーターを含む組み換え核酸分子であって、

a. 配列番号 4、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16 もしくは配列番号 18 のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、

b. 配列番号 4、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16 もしくは配列番号 18 に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 85%、90%、95%、98%、99% もしくは約 100% であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、または

c. 前記ポリヌクレオチドセグメントが、ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、配列番号 3、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15 及び配列番号 17 のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズする前記組み換え核酸分子。

【請求項 2】

a. 前記組み換え核酸分子が、植物において前記農薬タンパク質を発現させるように機能する配列を含むか、

b. 前記組み換え核酸分子が、植物細胞で発現して、前記農薬タンパク質または農薬性断片を農薬として有効な量で産生するか、または

c. 前記組み換え核酸分子が、ベクターと機能可能に連結した状態であり、前記ベクターが、プラスミド、ファージミド、バクミド、コスミド及び細菌もしくは酵母人工染色体からなる群から選択されている、

請求項 1 に記載の組み換え核酸分子。

【請求項 3】

前記組み換え核酸分子が、宿主細胞内に存在するように定められており、前記宿主細胞が、細菌細胞と植物細胞からなる群から選択されている、請求項 1 に記載の組み換え核酸分子。

【請求項 4】

前記細菌宿主細胞が、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea* 及び *Erwinia* からなる群から選択した属の細菌に由来する、請求項 3 に記載の組み換え核酸分子。

【請求項 5】

前記 *Bacillus* の種が、*Bacillus cereus* または *Bacillus thuringiensis* であり、前記 *Brevibacillus* が、*Brevibacillus laterosporus* であり、前記 *Escherichia* が、*Escherichia coli* である、請求項 4 に記載の組み換え核酸分子。

【請求項 6】

前記植物細胞が、双子葉植物細胞または単子葉植物細胞である、請求項 2 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7】

前記植物宿主細胞が、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジン、キャッサバ、ヒマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、綿、ウリ、キュウリ、ペイマツ、ナス、ユーカリ、アマ、ニンニク、ブドウ、ホップ、リーキ、レタス、テーダマツ、アワ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞植物、ヤシ、牧草、エンドウ、ラッカセイ、コショウ、キマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、パンプキン、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、モロコシ、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、テンサイ、サトウキ

10

20

30

40

50

ビ、ヒマワリ、スイートコーン、モミジバフウ、サツマイモ、アメリカクサキビ、チャ、タバコ、トマト、トリチカレ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞からなる群から選択されている、請求項 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 8】

前記タンパク質が、L e p i d o p t e r a 目の昆虫に対する活性を示す、請求項 1 に記載の組み換え核酸分子。

【請求項 9】

前記 L e p i d o p t e r a 目の昆虫が、ベルベットビーンキャタピラー、サトウキビメイガ、モロコシマダラメイガ、アメリカタバコガ、タバコバッドワーム、ソイビーンルーパー、ブラックアーミーワーム、サザンアーミーワーム、フォールアーミーワーム、シロイチモンジヨトウ、アメリカンボールワーム、ハスモンヨトウ、ワタアカミムシ、タマナヤガ、南西部アワノメイガ、コットンリーフワーム、コナガ、スポッテドボールワーム、ハスモンヨトウ、ウエスタンビーンカットワーム及びヨーロッパアワノメイガからなる群から選択されている、請求項 8 に記載の組み換え核酸分子。

10

【請求項 10】

請求項 1 に記載の組み換え核酸分子を含む植物またはその部位。

【請求項 11】

前記植物が、単子葉植物または双子葉植物である、請求項 10 に記載の植物またはその部位。

【請求項 12】

前記植物が、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジン、キャッサバ、ヒマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、綿、ウリ、キュウリ、ベイマツ、ナス、ユーカリ、アマ、ニンニク、ブドウ、ホップ、リーキ、レタス、テーダマツ、アワ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞植物、ヤシ、牧草、エンドウ、ラッカセイ、コショウ、キマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、パンプキン、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、モロコシ、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、モミジバフウ、サツマイモ、アメリカクサキビ、チャ、タバコ、トマト、トリチカレ、芝草、スイカ及びコムギからなる群から選択されている、請求項 10 に記載の植物。

20

30

【請求項 13】

前記組み換え核酸分子を含む、請求項 10 に記載の植物の種子。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の組み換え核酸分子を含む防虫組成物。

【請求項 15】

前記農薬タンパク質とは異なる少なくとも 1 つのその他の農薬剤をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 14 に記載の防虫組成物。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つのその他の農薬剤が、防虫タンパク質、防虫 d s R N A 分子及び補助タンパク質からなる群から選択されている、請求項 15 に記載の防虫組成物。

40

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つのその他の農薬剤が、L e p i d o p t e r a 目、C o l e o p t e r a 目または H e m i p t e r a 目の 1 つ以上の病害虫種に対して活性を示す、請求項 15 に記載の防虫組成物。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つのその他の農薬タンパク質が、C r y 1 A、C r y 1 A b、C r y 1 A c、C r y 1 A . 1 0 5、C r y 1 A e、C r y 1 B、C r y 1 C、C r y 1 C バリエーション、C r y 1 D、C r y 1 E、C r y 1 F、C r y 1 A / F キメラ、C r y 1 G、C r y 1 H、C r y 1 I、C r y 1 J、C r y 1 K、C r y 1 L、C r y 2 A、C r y 2 A

50

b、Cry 2 Ae、Cry 3、Cry 3 Aバリエーション、Cry 3 B、Cry 4 B、Cry 6、Cry 7、Cry 8、Cry 9、Cry 15、Cry 34、Cry 35、Cry 43 A、Cry 43 B、Cry 51 Aa1、ET 29、ET 33、ET 34、ET 35、ET 66、ET 70、TIC 400、TIC 407、TIC 417、TIC 431、TIC 800、TIC 807、TIC 834、TIC 853、TIC 900、TIC 901、TIC 1201、TIC 1415、TIC 2160、TIC 3131、TIC 836、TIC 860、TIC 867、TIC 869、TIC 1100、VIP 3 A、VIP 3 B、VIP 3 Ab、AXMI - AXMI -、AXMI - 88、AXMI - 97、AXMI - 102、AXMI - 112、AXMI - 117、AXMI - 100、AXMI - 115、AXMI - 113及びAXMI - 005、AXMI 134、AXMI - 150、AXMI - 171、AXMI - 184、AXMI - 196、AXMI - 204、AXMI - 207、AXMI - 209、AXMI - 205、AXMI - 218、AXMI - 220、AXMI - 221z、AXMI - 222z、AXMI - 223z、AXMI - 224z及びAXMI - 225z、AXMI - 238、AXMI - 270、AXMI - 279、AXMI - 345、AXMI - 335、AXMI - R1及びそれらのバリエーション、IP3及びそのバリエーション、DIG - 3、DIG - 5、DIG - 10、DIG - 657及びDIG - 11のタンパク質からなる群から選択されている、請求項15に記載の防虫組成物。

10

【請求項19】

請求項1に記載の前記組み換え核酸分子を発現する植物細胞を含むものとして定められている、請求項14に記載の防虫組成物。

20

【請求項20】

請求項10に記載の植物またはその部位から作られた商品であって、前記組み換え核酸分子または農薬タンパク質を検出可能な量で含む前記商品。

【請求項21】

穀物取扱者が袋詰めした商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、コーンフラワー、コーンミール、コーンシロップ、コーン油、コーンサイレージ、コーンスターチ、コーンシリアルなど、対応するダイズ、イネ、コムギ、モロコシ、キマメ、ラッカセイ、果実、メロン及び野菜の商品であって、適宜、ジュース、濃縮物、ジャム、ゼリー、マーメイド、上記のような商品のその他の食用形態を含み、上記のようなポリヌクレオチド及びまたは本願のポリペプチドを検出可能な量で含むもの、未加工または加工綿種子、綿実油、リント、飼料または食料用に加工した種子及び植物部位、繊維、紙、綿実油由来の燃料または綿繰り機の綿屑由来のペレットなどのバイオマス及び燃料製品、未加工または加工ダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズふすま、豆乳、ダイズチーズ、ダイズ酒、ダイズを含む動物用飼料、ダイズを含む紙、ダイズを含むクリーム、ダイズバイオマス、ならびにダイズ植物及びダイズ植物部位を用いて作製した燃料製品からなる群から選択されている、請求項20に記載の商品。

30

【請求項22】

種子の作製方法であって、

- a. 請求項13に記載の第1の種子を播くことと、
- b. 前記種子から植物を育てることと、
- c. 前記植物から種子を採ることとを含み、採れた前記種子が、前記組み換え核酸分子を含む、前記方法。

40

【請求項23】

昆虫の寄生に対する耐性を有する植物であって、前記植物の細胞が、請求項1に記載の組み換え核酸分子を含む前記植物。

【請求項24】

Lepidoptera目の種の病害虫または病害虫の寄生の防除方法であって、

- a. 配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に定められているような農薬タンパク質を殺虫剤として有効な量で、前記病害虫

50

と接触させるか、または

b. 配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を含む1つ以上の農薬タンパク質を殺虫剤として有効な量で、前記病害虫と接触させること

を含む前記方法。

【請求項25】

植物ゲノムDNAを含む試料に、請求項1に記載の組み換え核酸分子が存在することの検出方法であって、

a. ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、請求項1に記載の組み換え核酸分子を含む植物由来のゲノムDNAとハイブリダイズするとともに、ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、請求項1に記載の組み換え核酸分子を含まない別段の同種同系の植物由来のゲノムDNAとハイブリダイズしない核酸プローブと、前記試料とを接触させることであって、配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15もしくは配列番号17、または配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15もしくは配列番号17に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を含む農薬タンパク質をコードする配列と、前記プローブが相同または相補的であることと、

b. 前記試料と前記プローブをストリンジェントなハイブリダイズ条件に置くことと、

c. 前記核酸プローブと前記試料の前記植物ゲノムDNAとのハイブリダイズを検出すること、

を含む前記方法。

【請求項26】

タンパク質を含む試料に、農薬タンパク質またはその断片が存在することの検出方法であって、配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、または配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含み、

a. 前記試料と免疫反応性の抗体を接触させることと、

b. 前記農薬タンパク質またはその断片の存在を検出することと、

を含む前記方法。

【請求項27】

前記検出工程が、ELISAまたはウエスタンブロットを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

請求項1に記載の農薬タンパク質または農薬性断片をさらに含む、請求項14に記載の防虫組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本願は、2015年8月27日に提出された米国特許仮出願第62/210,737号に基づく利益を主張するものであり、この仮出願は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【0002】

配列表の援用

コンピューター可読形式の配列表を含む「38-21__61627US0001SEQ

10

20

30

40

50

LISTING_ST25.txt」という名称のファイルを2016年8月3日に作成した。このファイルは、94,508バイト(MS-Windows(登録商標)で測定した)であり、(米国特許庁のEFS-Webという提出システムを用いて)電子申請によって同時に提出したものであり、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【0003】

本発明は概して、防虫タンパク質の分野に関するものである。作物植物と種子の農業関連の病害虫に対して防虫活性を示す新規種類のタンパク質を開示する。特に、開示されている種類のタンパク質は、作物植物と種子の農業関連の病害虫、特にLepidoptera目の種類の病害虫に対して殺虫活性を有する。開示されている毒素タンパク質のうちの一つ以上をコードする組み換えポリヌクレオチドコンストラクトを含む植物、植物部位及び種子を提供する。

10

【背景技術】

【0004】

農業において重要な植物(特に、トウモロコシ、ダイズ、サトウキビ、イネ、コムギ、野菜及び綿を含む)の収穫量を向上させることがますます重要になっている。人口の増加による、食用、衣類用及びエネルギー供給用の農産物に対するニーズの増大に加えて、気候関連の作用と、人口増加による、農作業以外の土地の利用圧力から、農業で利用可能な耕作地の量が減少することが予想されている。これらの要因により、特に、植物バイオテクノロジーと農作業の大幅な改善が見られない中で、食糧安全保障の見通しが厳しくなっている。これらの圧力に鑑みると、技術、農業技法及び病害虫の管理を環境上持続可能に改善することが、農業で利用可能な耕作地の量が限られる中で、作物の生産を高める強力なツールである。

20

【0005】

昆虫、特に、Lepidoptera目及びColeoptera目の昆虫は、畑作物被害の主な原因とみなされており、この被害により、寄生された区域全体にわたって、作物の収穫量が減少する。農業に悪影響を及ぼすLepidoptera目の病害虫種としては、ブラックアーミーワーム(Spodoptera exempta)、タマナヤガ(Agrotis ipsilon)、アメリカタバコガ(Helicoverpa zea)、コットンリーフワーム(Alabama argillacea)、コナガ(Plutella xylostella)、ヨーロッパアワノメイガ(Ostrinia nubilalis)、フォールアーミーワーム(Spodoptera frugiperda)、Cry1Fa1耐性フォールアーミーワーム(Spodoptera frugiperda)、オオタバコガ(OWB、Helicoverpa armigera)、サザンアーミーワーム(Spodoptera eridania)、ソイビーンルーパー(Chrysodeixis includens)、スポッテッドボールワーム(Earias vittella)、南西部アワノメイガ(Diatraea grandiosella)、タバコパッドワーム(Heliothis virescens)、ハスモンヨトウ(Spodoptera litura、クラスターキャタピラーとしても知られている)、ウエスタンビーンカットワーム(Striacosta albicosta)及びベルベットビーンキャタピラー(Anticarsia gemmatalis)が挙げられるが、これらに限らない。

30

40

【0006】

これまで、農業では、病害虫防除剤として、合成化学殺虫剤の集中的施用に依存していた。耐性の問題が生じているのに加えて、環境とヒトの健康状態に対する懸念により、生物農薬の研究開発が促進された。この研究努力により、細菌を含む様々な昆虫病原性微生物種の発見と利用が進んだ。

【0007】

生物病害虫防除剤としての昆虫病原性細菌、特に、Bacillus属に属する細菌の潜在能力が発見及び開発されると、生物による防除のパラダイムにシフトした。Bacillus thuringiensis(Bt)という細菌の株が、特定の昆虫に対して

50

高い毒性を示すことが発見されて以来、Bt株は、農薬タンパク質源として用いられている。Bt株は、芽胞形成の開始時と、定常増殖期に、副芽胞封入体内に局在するδ-エンドトキシン(例えばCryタンパク質)を産生することが知られており、分泌殺虫タンパク質を産生することも知られている。感受性の昆虫が摂食すると、δ-エンドトキシンと、分泌された毒素が、それらの作用を中腸上皮の表面で発揮し、細胞膜を破壊して、細胞の破壊と死を招く。他の*Bacillus*、ならびに様々な追加の細菌種(*Brevibacillus laterosporus*、*Lysinibacillus sphaericus*(「Ls」、以前は*Bacillus sphaericus*として知られていた)及び*Paenibacillus popilliae*など)を含むBt以外の細菌種でも、殺虫タンパク質をコードする遺伝子が同定されている。

10

【0008】

結晶性かつ可溶性の分泌殺虫毒素は、その宿主に対する特異性が高く、化学殺虫剤の代替物として世界的に受け入れられている。例えば、殺虫毒素タンパク質は、農業上重要な植物を昆虫の寄生から守り、化学農薬を施用する必要性を低下させ、収穫高を向上させる目的で、様々な農業的用途で用いられている。様々な細菌株を含む微生物製剤を植物の表面上に分散させる機械的方法(噴霧法など)によって、また、遺伝子形質転換技法を用いて、殺虫毒素タンパク質を発現するトランスジェニック植物及びトランスジェニック種子を作製することによって、殺虫毒素タンパク質を用いて、作物植物の農業関連病害虫を排除する。

20

【0009】

殺虫毒素タンパク質を発現するトランスジェニック植物を用いることは、世界的に採用されている。例えば、2012年には、2610万ヘクタールに、Bt毒素を発現するトランスジェニック作物が植えられた(*James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44*)。昆虫から保護するトランスジェニック作物を広く用いて、これらの作物で用いられる殺虫毒素タンパク質の数を限定することで、現在使用されている殺虫タンパク質に対する耐性を付与する既存の昆虫対立遺伝子に対する淘汰圧が作られている。

【0010】

標的病害虫において、殺虫毒素タンパク質に対する耐性が発達すると、殺虫毒素タンパク質を発現するトランスジェニック作物に対する昆虫耐性の増大に対処するのに有用である新たな形態の殺虫毒素タンパク質の発見と開発に対する継続的なニーズが生じる。効力が向上したとともに、広範な感受性昆虫種に対する防除性を示す新たなタンパク質毒素は、耐性対立遺伝子を発現できる生存虫数を低下させることになる。加えて、同じ病害虫に対して毒性を有するとともに、異なる作用機序を示す2つ以上のトランスジェニック殺虫毒素タンパク質を1つの植物において使用すると、いずれかの1つの標的昆虫種において、耐性が生じる可能性が低下する。

30

【0011】

したがって、本発明者は、本明細書において、標的とするLepidoptera目の種、特に、ブラックアーミーワーム(*Spodoptera exempta*)、タマナヤガ(*Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、コットンリーフワーム(*Alabama argillacea*)、コナガ(*Plutella xylostella*)、ヨーロッパアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)、フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、Cry1Fa1耐性フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、オオタバコガ(OWB、*Helicoverpa armigera*)、サザンアーミーワーム(*Spodoptera eridania*)、ソイビーンルーパー(*Chrysodeixis includens*)、スポッテッドボールワーム(*Earias vittella*)、南西部アワノメイガ(*Diatraea grandiosella*)、タバコバッドワーム(*Heliothis vires*

40

50

cens)、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*、クラスターキャタピラーとしても知られている)、ウエスタンビンカットワーム(*Striacosta albicosta*)及びベルベットピンキャタピラー(*Anticarsia gemmatalis*)に対する殺虫活性を示す、*Paenibacillus popilliae*由来の新規タンパク質毒素ファミリーとともに、類似の毒素タンパク質、バリアントタンパク質及び例示的な組み換えタンパク質を開示する。

【発明の概要】

【0012】

本明細書で開示するのは、防虫活性のある新規農薬タンパク質(毒素タンパク質)群であり、これらのタンパク質は、本明細書では、TIC6757のタンパク質毒素クラスに属するTIC6757、TIC7472及びTIC7473と称し、作物植物の1つ以上の病害虫に対して阻害活性を示すことが示されている。タンパク質TIC6757と、TIC6757のタンパク質毒素クラスのタンパク質は、製剤またはインプラントにおいて、単独で用いることも、他の殺虫タンパク質及び毒性薬剤と組み合わせて用いることもできるので、農業システムで現在用いられている殺虫タンパク質と殺虫化学物質の代替物が得られる。

10

【0013】

一実施形態では、本願で開示するのは、農薬タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに機能可能に連結した異種プロモーター断片を含む組み換え核酸分子であって、(a)配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、(b)配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、(c)配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15及び配列番号17のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドに、前記ポリヌクレオチドセグメントがハイブリダイズするか、(d)配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15もしくは配列番号17のヌクレオチド配列に対する配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるポリヌクレオチド配列を、農薬タンパク質またはその断片をコードする前記ポリヌクレオチドセグメントが含むか、または(e)前記組み換え核酸分子が、ベクターと機能可能に連結した状態であり、前記ベクターが、プラスミド、ファージミド、バクミド、コスミド及び細菌または酵母人工染色体からなる群から選択されている組み換え核酸分子である。この組み換え核酸分子は、植物において上記の農薬タンパク質を発現するように機能するか、または植物細胞において発現して、農薬タンパク質を農薬として有効な量で産生する配列を含むことができる。

20

30

【0014】

本願の別の実施形態は、本願の組み換え核酸分子を含む宿主細胞であって、細菌細胞及び植物細胞からなる群から選択されている宿主細胞である。想定されている細菌宿主細胞としては、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea*及び*Erwinia*が挙げられる。特定の実施形態では、前記*Bacillus*種は、*Bacillus cereus*もしくは*Bacillus thuringiensis*であり、前記*Brevibacillus*は、*Brevibacillus laterosporus*であり、または*Escherichia*は*Escherichia coli*である。想定されている植物宿主細胞としては、双子葉植物細胞と単子葉植物細胞が挙げられる。想定されている植物細胞としてはさらに、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジ

40

50

ン、キャッサバ、ヒマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、綿 (*Gossypium* 属)、ウリ、キュウリ、ベイマツ、ナス、ユーカリ、アマ、ニンニク、ブドウ、ホップ、リーキ、レタス、テーダマツ、アワ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞植物、ヤシ、牧草、エンドウ、ラッカセイ、コショウ、キマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、パンプキン、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、モロコシ、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、モミジバフウ、サツマイモ、アメリカクサキビ、チャ、タバコ、トマト、トリチカレ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞が挙げられる。

【0015】

別の実施形態では、本願の農薬タンパク質は、ベルベットビーンキャタピラー、サトウキビメイガ、モロコシマダラメイガ、アメリカタバコガ、タバコバッドワーム、ソイビーンルーパー、ブラックアーミーワーム、サザンアーミーワーム、フォールアーミーワーム、シロイチモンジヨトウ、オオタバコガ、ハスモンヨトウ、ワタアカミムシ、タマナヤガ、南西部アワノメイガ、コットンリーフワーム、コナガ、スポッテッドボールワーム、ハスモンヨトウ、ウエスタンビーンカットワーム及びヨーロッパアワノメイガを含む *Lepidoptera* 目の昆虫に対して活性を示す。

【0016】

本願では、農薬タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに機能可能に連結した異種プロモーター断片を含む組み換え核酸分子を含む植物であって、(a) 配列番号 4、配列番号 2、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16 もしくは配列番号 18 のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、(b) 配列番号 4、配列番号 2、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16 もしくは配列番号 18 に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 85%、90%、95%、98%、99% もしくは約 100% であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、(c) 前記ポリヌクレオチドセグメントが、ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、配列番号 3、配列番号 15 もしくは配列番号 17 のヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするか、または (d) 前記植物が、検出可能な量の前記農薬タンパク質を示す植物も想定されている。特定の実施形態では、この農薬タンパク質は、配列番号 4、配列番号 2、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16 または配列番号 18 を含む。一実施形態では、この植物は、双子葉植物または単子葉植物のいずれかである。別の実施形態では、この植物はさらに、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジン、キャッサバ、ヒマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、綿、ウリ、キュウリ、ベイマツ、ナス、ユーカリ、アマ、ニンニク、ブドウ、ホップ、リーキ、レタス、テーダマツ、アワ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞植物、ヤシ、牧草、エンドウ、ラッカセイ、コショウ、キマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、パンプキン、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、モロコシ、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、モミジバフウ、サツマイモ、アメリカクサキビ、チャ、タバコ、トマト、トリチカレ、芝草、スイカ及びコムギからなる群から選択されている。

【0017】

さらなる実施形態では、本願の組み換え核酸分子を含む種子を開示する。

【0018】

別の実施形態では、本願で開示されている組み換え核酸分子を含む防虫組成物が想定されている。この防虫組成物はさらに、前記農薬タンパク質とは異なるその他の農薬剤を少なくとも 1 つコードするヌクレオチド配列を含むことができる。特定の実施形態では、この少なくとも 1 つのその他の農薬剤は、防虫タンパク質、防虫 dsRNA 分子及び補助タンパク質からなる群から選択されている。本願の防虫組成物における少なくとも 1 つのその他の農薬剤は、*Lepidoptera* 目、*Coleoptera* 目または *Hemip*

10

20

30

40

50

tera目のうちの1つ以上の病害虫種に対して活性を示すことも想定されている。本願の防虫組成物における少なくとも1つのその他の農薬剤は、一実施形態では、Cry 1 A、Cry 1 A b、Cry 1 A c、Cry 1 A . 1 0 5、Cry 1 A e、Cry 1 B、Cry 1 C、Cry 1 C バリアント、Cry 1 D、Cry 1 E、Cry 1 F、Cry 1 A / F キメラ、Cry 1 G、Cry 1 H、Cry 1 I、Cry 1 J、Cry 1 K、Cry 1 L、Cry 2 A、Cry 2 A b、Cry 2 A e、Cry 3、Cry 3 A バリアント、Cry 3 B、Cry 4 B、Cry 6、Cry 7、Cry 8、Cry 9、Cry 1 5、Cry 3 4、Cry 3 5、Cry 4 3 A、Cry 4 3 B、Cry 5 1 A a 1、ET 2 9、ET 3 3、ET 3 4、ET 3 5、ET 6 6、ET 7 0、TIC 4 0 0、TIC 4 0 7、TIC 4 1 7、TIC 4 3 1、TIC 8 0 0、TIC 8 0 7、TIC 8 3 4、TIC 8 5 3、TIC 9 0 0、TIC 9 0 1、TIC 1 2 0 1、TIC 1 4 1 5、TIC 2 1 6 0、TIC 3 1 3 1、TIC 8 3 6、TIC 8 6 0、TIC 8 6 7、TIC 8 6 9、TIC 1 1 0 0、VIP 3 A、VIP 3 B、VIP 3 A b、AXMI - AXMI -、AXMI - 8 8、AXMI - 9 7、AXMI - 1 0 2、AXMI - 1 1 2、AXMI - 1 1 7、AXMI - 1 0 0、AXMI - 1 1 5、AXMI - 1 1 3 及び AXMI - 0 0 5、AXMI 1 3 4、AXMI - 1 5 0、AXMI - 1 7 1、AXMI - 1 8 4、AXMI - 1 9 6、AXMI - 2 0 4、AXMI - 2 0 7、AXMI - 2 0 9、AXMI - 2 0 5、AXMI - 2 1 8、AXMI - 2 2 0、AXMI - 2 2 1 z、AXMI - 2 2 2 z、AXMI - 2 2 3 z、AXMI - 2 2 4 z 及び AXMI - 2 2 5 z、AXMI - 2 3 8、AXMI - 2 7 0、AXMI - 2 7 9、AXMI - 3 4 5、AXMI - 3 3 5、AXMI - R 1 及びそのバリアント、IP 3 及びそのバリアント、DIG - 3、DIG - 5、DIG - 1 0、DIG - 6 5 7 及び DIG - 1 1 というタンパク質からなる群から選択されている。

10

20

30

40

【0019】

本願で開示されている組み換え核酸分子を検出可能な量で含む商品も想定されている。このような商品としては、穀物取扱者が袋詰めした商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、コーンフラワー、コーンミール、コーンシロップ、コーン油、コーンサイレージ、コーンスターチ、コーンシリアルなど、対応するダイズ、イネ、コムギ、モロコシ、キマメ、ラッカセイ、果実、メロン及び野菜の商品（適宜、ジュース、濃縮物、ジャム、ゼリー、マーマレード、上記のような商品のその他の食用形態を含む）であって、上記のようなポリヌクレオチド及びまたは本願のポリペプチドを検出可能な量で含むもの、未加工または加工綿種子、綿実油、リント、飼料または食料用に加工した種子及び植物部位、繊維、紙、バイオマス及び燃料製品（綿実油由来の燃料または綿繰り機の綿屑由来のペレットなど）、未加工または加工ダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズふすま、豆乳、ダイズチーズ、ダイズ酒、ダイズを含む動物用飼料、ダイズを含む紙、ダイズを含むクリーム、ダイズバイオマス、ならびにダイズ植物及びダイズ植物部位を用いて作製した燃料製品が挙げられる。

【0020】

本願では、本願で開示されている組み換え核酸分子を含む種子の作製方法も想定されている。この方法は、本願で開示されている組み換え核酸分子を含む種子を少なくとも1つ播くことと、その種子から植物を育てることと、その植物から種子を採ることとを含み、採れた種子は、本願における組み換え核酸分子を含む。

【0021】

別の例示的な実施形態では、昆虫の寄生に対する耐性を有する植物を提供し、前記植物の細胞は、(a) 配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に定められているような農薬タンパク質を殺虫剤として有効な量でコードする組み換え核酸分子を含むか、または(b) 配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも85%、90%、95%もしくは約100%であるアミノ酸配列を含むタンパク質を殺虫剤として有効な量含む。

【0022】

50

本願では、Lepidoptera目の種の病害虫を防除するとともに、Lepidoptera目の種の病害虫の植物、特に作物植物への寄生を防除する方法も開示する。この方法は、一実施形態では、(a)配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に定められているような農薬タンパク質を殺虫剤として有効な量で、病害虫と接触させることと、または(b)配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも85%、90%、95%もしくは約100%であるアミノ酸配列を含む1つ以上の農薬タンパク質を殺虫剤として有効な量で、病害虫と接触させることを含む。

【0023】

本願ではさらに、農薬タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む組み換え核酸分子の存在の検出方法であって、(a)配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、(b)配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、または(c)前記ポリヌクレオチドセグメントが、配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15もしくは配列番号17のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズする方法を提供する。本発明の一実施形態では、この方法は、本願で提供する農薬タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む、植物由来のゲノムDNAと、ストリンジェントなハイブリダイズ条件でハイブリダイズするとともに、上記セグメントを含まない別段の同種同系の植物由来のゲノムDNAとは、ストリンジェントなハイブリダイズ条件でハイブリダイズしない核酸プローブと、核酸試料を接触させることを含み、このプローブは、配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15もしくは配列番号17、または配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を含む農薬タンパク質をコードする配列と相同または相補的である。この方法はさらに、(a)試料とプローブをストリンジェントなハイブリダイズ条件に置くことと、(b)プローブと試料のDNAとのハイブリダイズを検出することを含んでもよい。

【0024】

本発明は、タンパク質を含む試料に、農薬タンパク質またはその断片が存在することの検出方法であって、配列番号2のアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含むか、または配列番号4、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16もしくは配列番号18に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%もしくは約100%であるアミノ酸配列を前記農薬タンパク質が含む方法も提供する。一実施形態では、この方法は、(a)試料と免疫反応性の抗体を接触させることと、(b)上記タンパク質の存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、この検出工程は、ELISAまたはウエスタンブロットを含む。

配列の簡単な説明

【0025】

配列番号1は、Paenibacillus popilliae種DSC004343から得られる農薬タンパク質TIC6757をコードする核酸配列である。

【0026】

配列番号2は、農薬タンパク質TIC6757のアミノ酸配列である。

【0027】

10

20

30

40

50

配列番号3は、農薬タンパク質T I C 6 7 5 7 P Lをコードする合成コード配列であって、植物細胞内で発現するように設計された配列であり、開始メチオニンコドンの直後に、追加のアラニンコドンが挿入されている。

【0028】

配列番号4は、植物細胞内で発現するように設計された合成コード配列（配列番号3）によってコードされるT I C 6 7 5 7 P Lのアミノ酸配列であり、開始メチオニンの直後に、追加のアラニンアミノ酸が挿入されている。

【0029】

配列番号5は、農薬タンパク質T I C 6 7 5 7 _ H i sをコードする核酸配列であり、ヒスチジntagをコードする核酸配列が、5'に、T I C 6 7 5 7コード配列とインフレームで、機能可能に連結されている。

10

【0030】

配列番号6は、農薬タンパク質T I C 6 7 5 7 _ H i sのアミノ酸配列である。

【0031】

配列番号7は、Paenibacillus popilliae種D S C 0 0 7 6 4 8から得られる農薬タンパク質T I C 7 4 7 2をコードする核酸配列である。

【0032】

配列番号8は、農薬タンパク質T I C 7 2 4 2のアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号9は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 2 _ H i sをコードする核酸配列であり、ヒスチジntagをコードする核酸配列が、3'に、T I C 7 4 7 2コード配列とインフレームで、機能可能に連結されている。

20

【0034】

配列番号10は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 2 _ H i sのアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号11は、1~2391位のヌクレオチドのオープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンから、農薬タンパク質T I C 7 4 7 3をコードする核酸配列である。

【0036】

配列番号12は、Paenibacillus popilliae種D S C 0 0 8 4 9 3から得られる農薬タンパク質T I C 7 2 4 3のアミノ酸配列翻訳である。

30

【0037】

配列番号13は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 3 _ H i sをコードする組み換え核酸配列であり、ヒスチジntagをコードする核酸配列が、3'に、T I C 7 4 7 2コード配列とインフレームで、機能可能に連結されている。

【0038】

配列番号14は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 3 _ H i sのアミノ酸配列翻訳である。

【0039】

配列番号15は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 2 P Lをコードする合成コード配列であって、植物細胞内で発現するように設計された合成コード配列であり、開始メチオニンコドンの直後に、追加のアラニンコドンが挿入されている。

40

【0040】

配列番号16は、植物細胞内で発現するように設計された合成コード配列（配列番号15）によってコードされるT I C 7 4 7 2 P Lのアミノ酸配列であり、開始メチオニンの直後に、追加のアラニンアミノ酸が挿入されている。

【0041】

配列番号17は、農薬タンパク質T I C 7 4 7 3 P Lをコードする合成コード配列であって、植物細胞内で発現するように設計された合成コード配列であり、開始メチオニンコドンの直後に、追加のアラニンコドンが挿入されている。

【0042】

配列番号18は、植物細胞内で発現するように設計された合成コード配列（配列番号1

50

7) によってコードされるTIC7473PLのアミノ酸配列であり、開始メチオニンの直後に、追加のアラニンアミノ酸が挿入されている。

【発明を実施するための形態】

【0043】

農業病害虫防除の分野における課題は、標的病害虫に対して効力があり、標的病害虫種に対して広範な毒性を示し、望ましくない農業上の問題を引き起こすことなく、植物内で発現でき、植物において商業的に利用されている現状の毒素と比べて、代替的な作用機序をもたらす新たな毒素タンパク質の必要性として特徴付けることができる。

【0044】

TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLを始めとする新規農薬タンパク質が本明細書に開示されており、これらは、上記の各ニーズ、特に、広範なLepidoptera目の病害虫、より特定的にはブラックアーミーワーム(*Spodoptera exempta*)、タマナヤガ(*Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、コットンリーフワーム(*Alabama argillacea*)、コナガ(*Plutella xylostella*)、ヨーロッパアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)、フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、Cry1Fa1耐性フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、オオタバコガ(OWB、*Helicoverpa armigera*)、サザンアーミーワーム(*Spodoptera eridania*)、ソイビーンルーパー(*Chrysodeixis includens*)、スポッテッドボールワーム(*Earias vittella*)、南西部アワノメイガ(*Diatraea grandiosella*)、タバコパッドワーム(*Heliothis virescens*)、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*、クラスターキータピラーとしても知られている)、ウエスタンビーンカットワーム(*Striacosta albicosta*)及びベルベットビーンキータピラー(*Anticarsia gemmatalis*)に対処するものである。

【0045】

本願において、TIC6757、「タンパク質TIC6757」、「タンパク質毒素TIC6757」、「毒素タンパク質TIC6757」、「農薬タンパク質TIC6757」、「TIC6757関連毒素」、「TIC6757関連毒素タンパク質」、TIC6757PL、「タンパク質TIC6757PL」、「タンパク質毒素TIC6757PL」、「毒素タンパク質TIC6757PL」、「農薬タンパク質TIC6757PL」、「TIC6757PL関連毒素」、「TIC6757PL関連毒素タンパク質」、TIC7472、「タンパク質TIC7472」、「タンパク質毒素TIC7472」、「毒素タンパク質TIC7472」、「農薬タンパク質TIC7472」、「TIC7472関連毒素」、「TIC7472関連毒素タンパク質」、TIC7472PL、「タンパク質TIC7472PL」、「タンパク質毒素TIC7472PL」、「毒素タンパク質TIC7472PL」、「農薬タンパク質TIC7472PL」、「TIC7472PL関連毒素」、「TIC7472PL関連毒素タンパク質」、TIC7473、「タンパク質TIC7473」、「タンパク質毒素TIC7473」、「毒素タンパク質TIC7473」、「農薬タンパク質TIC7473」、「TIC7473関連毒素」、「TIC7473関連毒素タンパク質」、TIC7473PL、「タンパク質TIC7473PL」、「タンパク質毒素TIC7473PL」、「毒素タンパク質TIC7473PL」、「農薬タンパク質TIC7473PL」、「関連毒素TIC7473PL」、「TIC7473PL関連毒素タンパク質」などに言及する際は、Lepidoptera目の病害虫に対する活性を付与するTIC6757(配列番号2)、TIC6757PL(配列番号4)、TIC7472(配列番号8)、TIC7472PL(配列番号16)、TIC7473(配列番号12)もしくはTIC7473PL(配列番号18)のいずれかの農薬タンパク質配列もしくは防虫タンパク質配列と、その農薬セグメントもしくは防虫セグメント、

10

20

30

40

50

またはこれらを組み合わせたものを含むか、これらからなるか、これらと実質的に相同であるか、これらと類似であるか、またはこれらに由来するいずれかの新規農薬タンパク質または防虫タンパク質を指し、農薬活性または防虫活性を示すタンパク質であって、これらのタンパク質をT I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lとアライメントすると、アミノ酸配列同一性が、約85%～約100%のいずれかの割合となるいずれのタンパク質も含む。タンパク質T I C 6 7 5 7とT I C 6 7 5 7 P Lはいずれも、そのタンパク質のプラスチックドターゲティング形態と非プラスチックドターゲティング形態を含む。

【0046】

「セグメント」または「断片」という用語は、本願においては、タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lを表す完全なアミノ酸配列または核酸配列よりも短い連続的なアミノ酸配列または核酸配列を説明する目的で使用される。防虫活性を示すセグメントまたは断片であって、そのセグメントまたは断片を、配列番号2に定められているタンパク質T I C 6 7 5 7、配列番号4に定められているタンパク質T I C 6 7 5 7 P L、配列番号8に定められているタンパク質T I C 7 4 7 2、配列番号16に定められているタンパク質T I C 7 4 7 2 P L、配列番号12に定められているタンパク質T I C 7 4 7 3または配列番号18に定められているタンパク質T I C 7 4 7 3 P Lの対応区域とアラインメントすると、そのセグメントまたは断片と、タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lの対応区域とのアミノ酸配列同一性が、約85～約100パーセントのいずれかの割合となるセグメントまたは断片も本願で開示する。

【0047】

本願において、「活性な」、「活性」、「農薬活性」、「農薬性」、「殺虫活性」、「防虫」または「殺虫性」という用語に言及することは、タンパク質毒素のような毒性薬剤が、病害虫を阻害したり（増殖、摂食、産卵能もしくは生存能を阻害したり）、抑制したり（増殖、摂食、産卵能もしくは生存能を抑制したり）、防除したり（病害虫の寄生を防除したり、タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3もしくはT I C 7 4 7 3 P Lを有効量含む特定の作物での病害虫の摂食活動を防除したり）、または殺したりする（罹病させたり、死亡させたり、もしくは産卵数を減少させたりする）効力を指す。これらの用語には、毒素タンパク質を農薬として有効な量で病害虫に与える成果（病害虫を毒素タンパク質に暴露して、罹病させたり、死亡させたり、産卵数を減少させたり、または成長を抑制したりする成果）が含まれるように意図されている。これらの用語には、毒素タンパク質を農薬として有効な量で植物の中または上に施用することによって、植物、植物組織、植物部位、種子、植物細胞、または植物を栽培し得る特定の地理的な場所から、病害虫を撃退することも含まれる。概して、農薬活性とは、特定の標的病害虫（L e p i d o p t e r a目の昆虫が挙げられるが、これに限らない）に、このタンパク質、タンパク質断片、タンパク質セグメントまたはポリヌクレオチドを摂食させることによって、増殖、発生、生存能、摂食挙動、交尾挙動、産卵を阻害したり、または悪影響をいずれかの測定可能な程度で軽減したりするの

【0048】

毒性薬剤の農薬として有効な量は、標的病害虫の餌に含めて与えたときに、その毒性薬剤が病害虫と接触すると農薬活性を示す量である。毒性薬剤は、当該技術分野において知られている農薬タンパク質または1つ以上の化学薬剤であることができる。農薬または殺虫化学剤と、農薬または殺虫タンパク質剤は、単独で用いることも、互いと組み合わせて

用いることもできる。化学薬剤としては、標的病害虫を抑制するために特異的遺伝子を標的とする dsRNA 分子、オルガノクロライド、オルガノホスフェート、カルバメート、ピレスロイド、ネオニコチノイド及びリリアノイドが挙げられるが、これらに限らない。農薬または殺虫タンパク質剤としては、本願に定められているタンパク質毒素と、その他のタンパク質性毒性薬剤 (Lepidoptera 目を標的とするものを含む) と、その他の植物病害虫を防除するのに用いるタンパク質毒素 (Coleoptera 目の種、Hemiptera 目の種及び Homoptera 目の種の防除用として、当該技術分野で入手可能なタンパク質 Cry 及び Cyt など) が挙げられる。

【0049】

病害虫、特に、作物植物の病害虫に言及する際は、作物植物の病害虫、特に、TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473 または TIC7473PL というタンパク質毒素クラスによって防除される Lepidoptera の病害虫を意味するように意図されている。しかしながら、病害虫に言及する際には、これらの病害虫を標的とする毒性薬剤が、タンパク質 TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473 もしくは TIC7473PL、または TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473 もしくは TIC7473PL と 85~約100パーセント同一であるタンパク質と共局在または共存するときには、Coleoptera 目、Hemiptera 目及び Homoptera 目の植物病害虫と、線虫及び真菌も含むことができる。

【0050】

タンパク質 TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473 及び TIC7473PL は、共通の機能によって関連付けられており、Lepidoptera の昆虫種の病害虫 (成虫、さなぎ、幼虫及び新生虫を含む) に対して殺虫活性を示す。

【0051】

Lepidoptera 目の昆虫としては、Noctuidae 科のアーミーワーム、カットワーム、ルーパー及びヘリオチン (例えば、フォルアーミーワーム (Spodoptera frugiperda)、シロイチモンジヨトウ (Spodoptera exigua)、ブラックアーミーワーム (Spodoptera exempta)、サザンアーミーワーム (Spodoptera eridania)、バーサアーミーワーム (Mamestra configurata)、タマナヤガ (Agrotis ipsilon)、イラクサギンウワバ (Trichoplusia ni)、ソイビーンルーパー (Pseudoplusia includens)、ベルベットビーンキャタピラー (Anticarsia gemmatalis)、グリーンクローパーワーム (Hypena scabra)、タバコバッドワーム (Heliothis virescens)、グラニユレートカットワーム (Agrotis subterranea)、アーミーワーム (Pseudaletia unipuncta)、ウエスタンカットワーム (Agrotis orthogonia)、Pyralidae 科の穿孔虫、繭を作る昆虫、ウェブワーム、コーンワーム、アオムシ及び葉を食害する幼虫 (例えば、ヨーロッパアワノメイガ (Ostrinia nubilalis)、ネーブルオレンジワーム (Amyelois transitella)、コーンルートウェブワーム (Crambus caliginosellus)、ソドウェブワーム (Herpetogramma licarsisalis)、サンフラワーモス (Homoeosoma electellum)、モロコシマダラメイガ (Elasmopalpus lignosellus)) Tortricidae 科のハマキムシ、バッドワーム、シードワーム及びフルーツワーム (例えば、コドリング (Cydia pomonella)、グレープベリーモス (Endopiza viteana)、ナシヒメシンクイ (Grapholita molesta)、サンフラワーバッドモス (Suleima helianthana)) ならびに多くのその他の経済上重要な Lepidoptera (例えば

10

20

30

40

50

、コナガ (*Plutella xylostella*)、ワタアカミムシ (*Pectinophora gossypiella*) 及びマイマイガ (*Lymantria dispar*) が挙げられるが、これらに限らない。Lepidoptera 目のその他の病害虫としては、例えば、コットンリーフワーム (*Alabama argillacea*)、フルーツリーフローラー (*Archips argyrospila*)、ヨーロッパリーフローラー (*Archips rosana*) 及びその他の *Archips* 種 (*Chilo suppressalis*、ニカメイガまたはライスステムボラー)、コブノメイガ (*Cnaphalocrocis medinalis*)、コーンルートウェブワーム (*Crambus caliginosellus*)、シバツトガ (*Crambus teterrellus*)、南西部アワノメイガ (*Diatraea grandiosella*)、シュガーケインボラー (*Diatraea saccharalis*)、スピニーボールワーム (*Earias insulana*)、スポットドボールワーム (*Earias vittella*)、アメリカンボールワーム (*Helicoverpa armigera*)、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*)、マメヒメサヤムシガ及びオオタバコガとしても知られている)、タバコバッドワーム (*Heliothis virescens*)、ソドウェブワーム (*Herpetogramma licarsisalis*)、ウエスタンビーンカットワーム (*Striacosta albicosta*)、ヨーロッパグレーブパインモス (*Lobesia botrana*)、ミカンハモグリガ (*Phyllocnistis citrella*)、オオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*)、モンシロチョウ (*Pieris rapae*、ナノアオムシとしても知られている)、シロイチモンジヨトウ (*Spodoptera exigua*)、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*、クラスターキャタピラーとしても知られている) ならびにトマトハモグリバエ (*Tuta absoluta*) が挙げられる。

【0052】

本願では、「単離 DNA 分子」または等価の語もしくは語句に言及する際には、その DNA 分子が、単独で、または他の組成物と組み合わせられて存在しているが、自然の環境では存在しない DNA 分子であることを意味するように意図されている。例えば、天然において、生物のゲノムの DNA で見られるコード配列、イントロン配列、非翻訳リーダー配列、プロモーター配列、転写終結配列などのような核酸エレメントは、その生物のゲノム内、かつ、天然においてそのエレメントが見られる、ゲノム内の位置にある場合、「単離」したものとみなさない。しかしながら、これらの各エレメントと、これらのエレメントの一部は、その生物のゲノム内、かつ、天然においてそのエレメントが見られる、ゲノム内の位置にない場合には、本開示の範囲内においては、「単離」したものとなる。同様に、殺虫タンパク質またはそのタンパク質のいずれかの天然の殺虫バリエーションをコードするヌクレオチド配列は、そのタンパク質をコードするその配列が天然に見られる細菌の DNA 内にはない場合には、単離ヌクレオチド配列となる。天然の殺虫タンパク質のアミノ酸配列をコードする合成ヌクレオチド配列は、本開示の目的においては、単離したものとみなすことになる。本開示の目的においては、いずれかのトランスジェニックヌクレオチド配列、すなわち、植物または細菌の細胞のゲノムに挿入されているかまたは染色体外ベクターに存在する DNA のヌクレオチド配列は、プラスミド、または植物もしくは細菌のゲノムにおいて細胞を形質転換するのに用いる同様の構造体に存在するか、あるいは、植物または細菌に由来する組織、子孫、生物試料もしくは商品に、検出可能な量で存在するかを問わず、単離ヌクレオチド配列とみなすことになる。

【0053】

本願にさらに説明されているように、TIC6757 をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) (配列番号 19) は、*Paenibacillus popilliae* DSC004343 株から得た DNA で発見した。このコード配列をクローニングして、微生物宿主細胞において発現させて、バイオアッセイで用いる組み換えタンパク質を作製した。ハイスループットスクリーニングとバイオインフォマティクスの技法を用

いて、微生物配列に対して、TIC6757と類似性を示すタンパク質をコードする遺伝子についてスクリーニングを行った。TIC7472をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)(配列番号7)は、*Paenibacillus popilliae* DSC007648株から得たDNAで発見した。TIC7473をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)(配列番号11)は、*Paenibacillus popilliae* DSC008493株から得たDNAで発見した。微生物宿主細胞由来のタンパク質のTIC6757を用いたバイオアッセイによって、Lepidoptera目の種であるシロイチモンジヨトウ(*Spodoptera exigua*)、タマナヤガ(*Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、コットンリーフワーム(*Alabama argillacea*)、コナガ(*Plutella xylostella*)、ヨーロッパアワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)、フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、Cry1Fa1耐性フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、オオタバコガ(OWB、*Helicoverpa armigera*)、サザンアーミーワーム(*Spodoptera eridania*)、ソイビーンルーパー(*Chrysodeixis includens*)、スポッテッドボールワーム(*Earias vittella*)、南西部アワノメイガ(*Diatraea grandiosella*)、タバコパッドワーム(*Heliothis virescens*)、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*、クラスターキータピラーとしても知られている)及びベルベットビーンキータピラー(*Anticarsia gemmatalis*)に対する活性が示された。微生物宿主細胞由来のタンパク質のTIC7472とTIC7473を用いたバイオアッセイによって、Lepidoptera目の種であるアメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム(*Spodoptera frugiperda*)、サザンアーミーワーム(*Spodoptera eridania*)、ソイビーンルーパー(*Chrysodeixis includens*)及び南西部アワノメイガ(*Diatraea grandiosella*)に対する活性が示された。

【0054】

植物細胞で発現させる際には、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLは、細胞質ゾルに存在するように発現させることも、その植物細胞の様々な細胞小器官にターゲティングすることもできる。例えば、タンパク質を葉緑体にターゲティングすると、トランスジェニック植物における発現タンパク質のレベルが上昇し得るとともに、表現型の喪失が阻止される。ターゲティングにより、トランスジェニックイベントで病害虫耐性効力も増大し得る。ターゲットペプチドまたはトランジットペプチドは、細胞内の特定の領域(核、ミトコンドリア、小胞体(ER)、葉緑体、アポプラスト、ペルオキシソーム及び細胞膜を含む)にタンパク質を輸送するように誘導する短い(3~70個のアミノ酸の長さの)ペプチド鎖である。タンパク質を輸送した後、いくつかのターゲットペプチドは、シグナルペプチダーゼによってタンパク質から切断される。葉緑体へのターゲティングのために、タンパク質は、40~50個ほどのアミノ酸であるトランジットペプチドを含む。葉緑体トランジットペプチドの利用の説明については、米国特許第5,188,642号及び同第5,728,925号を参照されたい。多くの葉緑体局在化タンパク質は、核遺伝子から前駆体として発現され、葉緑体トランジットペプチド(CTP)によって、葉緑体にターゲティングされる。このような単離葉緑体タンパク質の例としては、リブローズ-1,5,-ビスホスフェートカルボキシラーゼの小サブユニット(SSU)、フェレドキシン、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、集光複合体タンパク質I及びタンパク質II、チオレドキシンF、エノールピルビルシキメートホスフェートシンターゼ(EPSPS)と関連するもの、ならびに米国特許第7,193,133号に記載されているトランジットペプチドが挙げられるが、これらに限らない。異種CTPとのタンパク質融合体を用いることによって、非葉緑体タンパク質を葉緑体にターゲティングできると、CTP

が、タンパク質を葉緑体にターゲティングするのに十分であることがインビボ及びインビトロで示されている。好適な葉緑体トランジットペプチド (*Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210: 437-442, 1987を参照されたい) または *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6873-6877, 1986を参照されたい) など) の導入により、トランスジェニック植物において、異種EPSPSタンパク質配列が葉緑体にターゲティングされることが示されている (米国特許第5,627,061号、同第5,633,435号、同第5,312,910号、EP0218571、EP189707、EP508909及びEP924299を参照されたい)。毒素タンパク質TIC6757またはTIC6757PLを葉緑体にターゲティングするには、葉緑体トランジットペプチドをコードする配列を5'で、毒素タンパク質TIC6757またはTIC6757PLをコードする合成コード配列であって、植物細胞で最適に発現するように設計した合成コード配列と機能可能に連結した状態かつインフレームで配置する。

10

【0055】

TIC6757、TIC7472またはTIC7473のアミノ酸配列を用いることによって、TIC6757、TIC7472及びTIC7473に関連する追加の毒素タンパク質配列を作製して、新規な特性を持つ新規タンパク質を作製できることが想定されている。毒素タンパク質TIC6757、TIC7472及びTIC7473をアラインメントして、アミノ酸配列レベルでの違いを組み合わせて、新規アミノ酸配列バリエーションにでき、そのバリエーションをコードする組み換え核酸配列に適切な変更を加えることができる。

20

【0056】

さらに、当該技術分野において知られている様々な遺伝子編集法を用いることによって、TIC6757のタンパク質毒素クラスの改良型バリエーションをインプラントで操作できることを本開示は想定している。ゲノム編集に用いられるこのような技法としては、ZFN (ジंकフィンガーヌクレアーゼ)、メガヌクレアーゼ、TALEN (転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ) 及びCRISPR (クラスター化した規則的な配置の短い回文反復配列) / Cas (CRISPR関連) システムが挙げられるが、これらに限らない。これらのゲノム編集法を用いて、植物細胞において形質転換された毒素タンパク質コード配列を改変して、異なる毒素コード配列にできる。具体的には、これらの方法を通じて、毒素コード配列内の1つ以上のコドンを変更して、新たなタンパク質アミノ酸配列を作る。あるいは、コード配列内の断片を置換もしくは欠損させるか、または追加のDNA断片をコード配列に挿入して、新たな毒素コード配列を作製する。新たなコード配列は、新たな特性 (病害虫に対する活性またはスペクトルの拡大など) を持つ毒素タンパク質をコードできるとともに、元の昆虫毒素タンパク質に対して耐性を発達させた病害虫種に対する活性をもたらすことができる。当該技術分野において知られている方法によって、遺伝子編集済みの毒素コード配列を含む植物細胞を用いて、新たな毒素タンパク質を発現する植物体全体を作る。

30

40

【0057】

TIC6757、TIC7472及びTIC7473の断片またはそれらのタンパク質バリエーションは、トランケート形態であることができ、この形態では、1つ以上のアミノ酸が、タンパク質のN末端、C末端、中央またはこれらを組み合わせた位置から欠損しており、その断片及びバリエーションが防虫活性を保持していることも想定されている。これらの断片は、TIC6757、TIC7472及びTIC7473の天然または合成のバリエーションであることも、誘導タンパク質バリエーションであることもできるが、少なくともTIC6757、TIC7472またはTIC7473の防虫活性を保持している必要がある。

【0058】

当該技術分野において知られている様々なコンピューターベースのアルゴリズムを用い

50

て、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLと類似のタンパク質を同定するとともに、互いに比較することができる(表1及び2を参照されたい)。本願に報告されているアミノ酸配列同一性は、デフォルトパラメーター(ウェイトマトリックス:blorum、ギャップオープニングペナルティー:10.0、ギャップエクステンションペナルティー:0.05、親水性ギャップ:オン、親水性残基:GPSNDQERK、残基特異的ギャップペナルティー:オン)を用いたClustal Wアラインメントの結果である(Thompson, et al (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680)。さらに、アミノ酸一致率は、(アミノ酸同一性/対象のタンパク質の長さ)に100%を乗じた積によって算出する。当該技術分野では、他のアラインメントアルゴリズムも利用可能であり、Clustal Wアラインメントを用いて得られる結果と同様の結果が得られ、これらの他のアルゴリズムも本願で想定されている。

10

【0059】

Lepidoptera目の昆虫種に対して防虫活性を示すタンパク質は、そのタンパク質をクエリーで、例えば、Clustal Wアラインメントで用いる場合、TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473またはTIC7473PLに関連するものであり、配列番号2、配列番号4、配列番号8、配列番号16、配列番号12または配列番号18として定められているような、本発明のタンパク質は、このようなアラインメントにおいて、ヒットとして同定され、この場合、クエリータンパク質は、そのクエリータンパク質の長さに沿って、アミノ酸一致率が少なくとも85%~約100%(約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%またはこの範囲における端数領域の割合)であることが意図されている。

20

【0060】

Clustal Wアルゴリズムを用いて、例示的なタンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLを互いにアラインメントした。表1に報告されているように、各完全長タンパク質におけるアミノ酸配列一致率のペアワイズマトリックスを作成した。

【表 1】

表 1. 例示的なタンパク質 TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLのペアワイズマトリックス表示

毒素	TIC6757 (配列番号 2)	TIC6757 PL (配列番号 4)	TIC7472 (配列番号 8)	TIC7472PL (配列番号1 6)	TIC7473 (配列番号 12)	TIC7473PL (配列番号1 8)
TIC6757 (配列番号 2)	—	99.9 (796)	99.7 (795)	99.6 (794)	99.9 (796)	99.7 (795)
TIC6757P L (配列番号 4)	99.7 (796)	—	99.5 (794)	99.7 (796)	99.6 (795)	99.9 (797)
TIC7472 (配列番号 8)	99.7 (795)	99.6 (794)	—	99.9 (796)	99.9 (796)	99.7 (795)
TIC7472P L (配列番号 16)	99.5 (794)	99.7 (796)	99.7 (796)	—	99.6 (795)	99.9 (797)
TIC7473 (配列番号 12)	99.9 (796)	99.7 (795)	99.9 (796)	99.7 (795)	—	99.9 (796)
TIC7473P L (配列番号 18)	99.6 (795)	99.9 (797)	99.6 (795)	99.9 (797)	99.7 (796)	—

10

20

30

表の説明：(X)と(Y)間のClustal Wアラインメントがペアワイズマトリックスで報告されている。すべてのペア間のアミノ酸一致率が算出されており、各ボックスの第1の数字によって表されている。各ボックスの第2の数字(括弧内)は、ペア間の同一アミノ酸の数を表している。

【0061】

一致率に加えて、TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473、TIC7473PL及び関連タンパク質は、一次構造(保存されているアミノ酸モチーフ)、長さ(約797個のアミノ酸)及びその他の特徴によっても関連付けることができる。タンパク質毒素TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLの特徴は、表2に報告されている。

40

【表 2】

表 2. タンパク質 TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLの所定の特徴

タンパク質	分子量(ダルトン)	アミノ酸の長さ	等電点	PH7.0における電荷	強塩基性(-)アミノ酸の数	強酸性アミノ酸の数	疎水性アミノ酸の数	極性アミノ酸の数
TIC6757	90011.21	797	4.4289	-34.5	81	112	391	406
TIC6757PL	90082.29	798	4.4289	-34.5	81	112	392	406
TIC7472	90096.28	797	4.4141	-35.5	81	113	390	407
TIC7472PL	90167.36	798	4.4141	-35.5	81	113	391	407
TIC7473	90069.25	797	4.4141	-35.5	81	113	390	407
TIC7473PL	90140.33	798	4.4141	-35.5	81	113	391	407

10

【0062】

本願の実施例でさらに説明されているように、TIC6757のバリエーションTIC6757PLをコードする合成核酸分子配列を植物で使用するために設計した。植物で使用するために設計した例示的な組み換え核酸分子配列であって、タンパク質TIC6757PLをコードする組み換え核酸分子配列は、配列番号3として示されている。タンパク質TIC6757PLは、タンパク質TIC6757に対して、開始メチオニンの直後に、追加のアラニンアミノ酸を有する。TIC6757のアミノ酸配列に挿入した追加のアラニン残基は、インプラントにおいてタンパク質の発現を高めると考えられる。同様に、本願では、TIC7472のバリエーションをコードする合成核酸分子配列はTIC7472PL、TIC7473のバリエーションをコードする合成核酸分子配列はTIC7473PLといい、これらを植物で使用するために設計した。植物で使用するために設計した例示的な合成核酸分子配列であって、TIC7472PLをコードする合成核酸分子配列は配列番号15、TIC7473PLをコードする合成核酸分子配列は配列番号17として示されている。タンパク質TIC7472PLとTIC7473PLのいずれも、タンパク質TIC7472及びTIC7473に対して、開始メチオニンの直後に、追加のアラニンアミノ酸を有する。

20

30

【0063】

組み換え核酸分子配列を含む発現カセットとベクターを構築して、当該技術分野において知られている形質転換の方法と技法に従って、トウモロコシ、ダイズまたは綿の植物細胞に導入できる。例えば、Agrobacterium媒介形質転換が、米国特許出願公開第2009/0138985A1号(ダイズ)、同第2008/0280361A1号(ダイズ)、同第2009/0142837A1号(トウモロコシ)、同第2008/0282432号(綿)、同第2008/0256667号(綿)、同第2003/0110531号(コムギ)、同第2001/0042257A1号(テンサイ)、米国特許第5,750,871号(カノラ)、同第7,026,528号(コムギ)、同第6,365,807号、(イネ)及びArenicibia et al. (1998) Transgenic Res. 7: 213-222(サトウキビ)で説明されており、これらの文献はすべて、参照により、その全体が本明細書に援用される。形質転換細胞は、タンパク質TIC6757PL、TIC7472及びTIC7473を発現するとともに、Lepidoptera目の病害虫の幼虫の存在下で、その形質転換植物から得た植物葉片を用いて行うバイオアッセイによって農薬活性を示す形質転換植物に再生させることができる。植物は、再生による植物細胞、種子、花粉または茎頂形質転換技法に由来することがで

40

50

きる。植物の形質転換法は、当該技術分野において知られている。

【0064】

従来の形質転換法の代替方法として、導入遺伝子、発現カセット（複数可）などのようなDNA配列を部位特異的組み込みによって、植物または植物細胞のゲノムの特定の部位または座位に挿入したりまたは組み込んだりしてよい。したがって、本開示の組み換えDNAコンストラクト（複数可）及び分子（複数可）は、植物または植物細胞のゲノムに挿入するための少なくとも1つの導入遺伝子、発現カセットまたはその他のDNA配列を含むドナーテンプレート配列を含んでよい。部位特異的組み込み用のこのようなドナーテンプレートはさらに、挿入配列（すなわち、植物ゲノムに挿入する配列、導入遺伝子、カセットなど）に隣接する1つまたは2つのホモロジーアームを含んでもよい。本開示の組み換えDNAコンストラクト（複数可）はさらに、部位特異的組み込みを行うための部位特異的ヌクレアーゼ及び/またはいずれかの関連タンパク質（複数可）をコードする発現カセット（複数可）を含んでよい。これらのヌクレアーゼ発現カセット（複数可）は、ドナーテンプレートと同じ分子またはベクターに存在しても（シス）、別の分子またはベクターに存在してもよい（トランス）。いくつかの部位特異的組み込み法が、当該技術分野において知られており、ゲノムDNAを切断して、所望のゲノム部位または座位に、二本鎖切断（DSB）またはニックを作る異なるタンパク質（またはタンパク質及び/またはガイドRNAの複合体）を伴うものである。簡潔には、当該技術分野において理解されているように、ヌクレアーゼ酵素によって導入されたDSBまたはニックを修復するプロセスの際に、ドナーテンプレートDNAをゲノムに、DSBまたはニックの部位で組み込むことができる。ドナーテンプレートにホモロジーアーム（複数可）が存在することにより、相同組み換えによる修復プロセスの際に、挿入配列の植物ゲノムへの適合とターゲティングを促進させることができるが、挿入イベントは、非相同末端結合（NHEJ）によって行うこともできる。用いてよい部位特異的ヌクレアーゼの例としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、操作したメガヌクレアーゼ、天然のメガヌクレアーゼ、TALE-エンドヌクレアーゼ及びRNA誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）が挙げられる。RNA誘導型部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）を用いる方法では、組み換えDNAコンストラクト（複数可）は、ヌクレアーゼを植物ゲノム内の所望の部位に誘導するための1つ以上のガイドRNAをコードする配列も含むことになる。

【0065】

TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLをコードする組み換え核酸分子組成物が想定されている。例えば、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473及びTIC7473PLは、組み換えDNAコンストラクトで発現させることができ、このコンストラクトにおいては、プロモーター及びコンストラクトが挿入される系での発現に必要ないずれかのその他の調節エレメントのような遺伝子発現エレメントに、そのタンパク質をコードするORFを有するポリヌクレオチド分子が機能可能に連結している。非限定的な例としては、タンパク質TIC6757PL、TIC7472PLまたはTIC7473PLをコードする配列に機能可能に連結した植物機能性プロモーターであって、そのタンパク質を植物において発現させるためのプロモーター、またはタンパク質TIC6757、TIC7472またはTIC7473をコードする配列に機能可能に連結したBt機能性プロモーターであって、そのタンパク質をBt菌またはその他のBacillus種において発現させるためのプロモーターが挙げられる。タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PLをコードする配列には、その他のエレメントが、機能可能に連結していることができ、そのエレメントとしては、エンハンサー、イントロン、非翻訳リーダー、コードタンパク質固定化タグ（HISタグ）、移行ペプチド（すなわち、プラスチドトランジットペプチド、シグナルペプチド）、翻訳後修飾酵素のポリペプチド配列、リボソーム結合部位及びRNAiターゲット部位が挙げられるが、

これらに限らない。本発明で提供する例示的な組み換えポリヌクレオチド分子としては、配列番号4、配列番号2、配列番号8、配列番号12、配列番号16及び配列番号18に定められているようなアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはタンパク質をコードする配列番号3、配列番号1、配列番号7、配列番号11、配列番号15及び配列番号17のようなポリヌクレオチドに機能可能に連結した異種プロモーターが挙げられるが、これらに限らない。異種プロモーターは、プラスチドターゲティングTIC6757PL、TIC7472PLもしくはTIC7473PL、または非ターゲティングTIC6757PL、TIC7472PLもしくはTIC7473PLをコードする合成DNAコード配列に機能可能に連結していることもできる。本明細書に開示されているタンパク質をコードする組み換え核酸分子のコドンは、同義コドンによって置換することができる（当該技術分野においては、サイレント置換として知られている）。

10

【0066】

タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PLをコードする配列を含む組み換えDNAコンストラクトはさらに、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PL、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PLとは異なるタンパク質、防虫dsRNA分子または補助タンパク質をコードするDNA配列と付随的に発現または共発現するように構成できる1つ以上の防虫剤をコードするDNA領域を含むことができる。補助タンパク質としては、補因子、酵素、結合パートナー、または例えば、防虫剤の発現を補助したり、植物における防虫剤の安定性に影響を与えたり、オリゴマー化のために自由エネルギーを最適化したり、防虫剤の毒性を向上させたり、防虫剤の活性スペクトルを拡大したりすることによって、防虫剤の有効性を補うように機能するその他の作用物質が挙げられるが、これらに限らない。補助タンパク質は、例えば、1つ以上の防虫剤の取り込みを促したり、毒性薬剤の毒性作用を高めたりできる。

20

【0067】

すべてのタンパク質もしくはdsRNA分子が1つのプロモーターから発現するか、各タンパク質もしくはdsRNA分子が、別々のプロモーターの制御下となるか、またはこれらをいずれかに組み合わせた状態となるように、組み換えDNAコンストラクトをアセンブルできる。本発明のタンパク質は、選択した発現系のタイプに応じて、他のオープンリーディングフレーム及びプロモーターも含む共通のヌクレオチドセグメントから、TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473またはTIC7473PLの1つ以上のタンパク質を発現させる複数遺伝子発現系から発現させることができる。例えば、細菌の複数遺伝子発現系は、1つのプロモーターを用いて、1つのオペロン内から多重連結/タンデムオープンリーディングフレームの発現（すなわち、ポリシストロニックな発現）を駆動できる。別の例では、植物の複数遺伝子発現系は、各カセットが異なるタンパク質または他の作用物質（1つ以上のdsRNA分子など）を発現する非多重連結または連結発現カセットを用いることができる。

30

【0068】

タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473またはTIC7473PLをコードする配列を含む組み換えポリヌクレオチドまたは組み換えDNAコンストラクトは、ベクター、例えば、プラスミド、バキュロウイルス、合成染色体、ピリオン、コスミド、ファージミド、ファージまたはウイルスベクターによって、宿主細胞に送達できる。このようなベクターを用いて、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PLをコードする配列を宿主細胞において安定発現もしくは一過性発現させたり、またはその後、コードされるポリペプチドを発現させたりできる。タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473またはTIC7473PLをコードする配列を含むとともに、宿主

40

50

細胞に組み込まれる外来組み換えポリヌクレオチドまたは組み換えDNAコンストラクトは、本願では、「導入遺伝子」という。

【0069】

TIC6757のいずれかの1つ以上を発現する組み換えポリヌクレオチド、または関連ファミリー毒素タンパク質をコードする配列を含むトランスジェニック細菌、トランスジェニック植物細胞、トランスジェニック植物及びトランスジェニック植物部位を本願で提供する。「細菌細胞」または「細菌」という用語としては、*Agrobacterium*、*Bacillus*、*Escherichia*、*Salmonella*、*Pseudomonas*、*Brevibacillus*、*Klebsiella*、*Erwinia*または*Rhizobium*の細胞を挙げることができるが、これらに限らない。「植物細胞」または「植物」という用語としては、双子葉植物または単子葉植物を挙げることができるが、これらに限らない。「植物細胞」または「植物」という用語としては、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジン、キャッサバ、ヒマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、綿、ウリ、キュウリ、ベイマツ、ナス、ユーカリ、アマ、ニンク、ブドウ、ホップ、リーキ、レタス、テグマツ、アワ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞植物、ヤシ、牧草、エンドウ、ラッカセイ、コショウ、キマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、パンプキン、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、モロコシ、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、モミジバフウ、サツマイモ、アメリカクサキビ、チャ、タバコ、トマト、トリチカレ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞または植物を挙げられることもできるが、これらに限らない。特定の実施形態では、トランスジェニック植物と、トランスジェニック植物細胞から再生されるトランスジェニック植物部位を提供する。特定の実施形態では、トランスジェニック植物は、その植物の一部を切断したり、折ったり、粉碎したり、または別段の形で分離したりすることによって、トランスジェニック種子から得ることができる。特定の実施形態では、植物部位は、種子、莢、葉、花、茎、根もしくはこれらのいずれかの部分、またはトランスジェニック植物部位の再生不能部分であることができる。この文脈で用いる場合、トランスジェニック植物部位の「再生不能」部分は、植物体全体を形成するように誘導できない部分または有性及び/または無性生殖できる植物体全体を形成するように誘導できない部分である。特定の実施形態では、植物部位の再生不能部分は、トランスジェニック種子、莢、葉、花、茎または根の部分である。

【0070】

昆虫の*Lepidoptera*を阻害する量で、タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473またはTIC7473PLを含むトランスジェニック植物の作製方法を提供する。このような植物は、本願に示されているタンパク質のいずれかをコードする組み換えポリヌクレオチドを植物細胞に導入し、前記植物細胞由来の植物のうち、昆虫の*Lepidoptera*を阻害する量で、そのタンパク質を発現する植物を選抜することによって作製できる。植物は、再生、種子、花粉または茎頂形質転換技法によって、植物細胞から得ることができる。植物の形質転換方法は、当該技術分野において知られている。

【0071】

タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PL、その防虫セグメントもしくは断片、またはそのいずれかの特徴的部分を検出可能な量で含む加工植物も本願で開示する。特定の実施形態では、この加工品は、植物部位、植物バイオマス、油、食品、糖、動物飼料、粉、フレーク、ふすま、リント、外皮、加工種子及び種子からなる群から選択されている。特定の実施形態では、加工品は、再生不能である。この植物製品は、トランスジェニック植物またはトランスジェニック植物部位に由来する商品またはその他の商用品を含むことができ、その商品またはその他の商用品は、タンパク質TIC6757、TIC675

10

20

30

40

50

7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lの特徴的部分をコードするかまたは含むヌクレオチドセグメント、発現RNA、またはタンパク質を検出することによって、通商を通じて追跡できる。

【0072】

タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lを発現する植物は、他の毒素タンパク質を発現したり及び/または他のトランスジェニック形質(除草剤耐性遺伝子、収量性もしくはストレス耐性形質を付与する遺伝子など)を発現したりするトランスジェニックイベントとの育種によって交配でき、あるいは、このような形質を1つのベクターで組み合わせ、形質がすべて連鎖するようにできる。

10

【0073】

実施例でさらに説明されているように、タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3もしくはT I C 7 4 7 3 P Lをコードする配列と、T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lに対する同一率がかなりの値である配列は、当業者に知られている方法(ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、熱増幅及びハイブリダイズなど)を用いて同定できる。例えば、タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3またはT I C 7 4 7 3 P Lを用いて、関連タンパク質に特異的に結合する抗体を作製できるとともに、これらのタンパク質を用いて、密接に関連する他のタンパク質メンバーについてスクリーニングして、それらのタンパク質メンバーを見つけることができる。

20

【0074】

さらに、毒素タンパク質T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3及びT I C 7 4 7 3 P Lをコードするヌクレオチド配列をスクリーニング用のプローブ及びプライマーとして用いて、熱サイクルまたは等温増幅とハイブリダイズ方法を用いて、そのタンパク質クラスの他のメンバーを同定できる。例えば、配列番号3、配列番号15または配列番号17に定められているような配列に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、商品由来のデオキシリボ核酸試料におけるT I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2 P LまたはT I C 7 4 7 3 P L導入遺伝子の有無を判断できる。オリゴヌクレオチドを用いて特定の核酸を検出する方法の感度を考慮すると、配列番号3、配列番号15及び配列番号17に定められているような配列に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、プール供給源に由来する商品(その商品のごく一部が、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2 P L及びT I C 7 4 7 3 P L導入遺伝子のいずれかを含むトランスジェニック植物に由来する)におけるT I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2 P L及びT I C 7 4 7 3 P L導入遺伝子を検出できることが予測される。さらに、このようなオリゴヌクレオチドを用いて、配列番号3、配列番号15及び配列番号17のそれぞれに、ヌクレオチド配列変異を導入できることが認められる。このような「突然変異誘発」オリゴヌクレオチドは、トランスジェニック植物宿主細胞においてさまざまな防虫活性または多様な発現を示すアミノ酸配列バリエーションT I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2 P L及びT I C 7 4 7 3 P Lの同定に有用である。

30

40

【0075】

ヌクレオチド配列ホモログ、例えば、ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、互いにまたは本願に開示されている配列のいずれかにハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる殺虫タンパク質も、本発明の実施形態である。本発明は、第2のヌクレオチド配列にハイブリダイズする第1のヌクレオチド配列の検出方法であって、第1のヌクレオチド配列(またはその逆向き相補配列)が、農薬タンパク質またはその農薬性断片をコードするとともに、第2のヌクレオチド配列にハイブリダイズする方法も提供する。このようなケースでは、第2のヌクレオチド配列は、ストリンジェントなハイブリダイズ条件で、配列番号3、配列番号1、配列番号7、配列番号11、配列番号15または配列番号17として示されているヌクレオチド配列のいずれかであることができる。ヌクレ

50

オチドコード配列は、適切なハイブリダイズ条件（ストリンジェントなハイブリダイズ条件など）で互いにハイブリダイズし、これらのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質は、その他のタンパク質のいずれか1つに対する抗血清と交差反応する。ストリンジェントなハイブリダイズ条件は、本明細書で定義する場合、少なくとも42 でハイブリダイズしてから、室温で2 × S S C、0.1% S D Sによって5分間洗浄することを2回行い、その後、65 で0.5 × S S C、0.1% S D Sによって30分洗浄することを2回行うことを含む。これよりもさらに高い温度で洗浄すると、さらにストリンジェントな条件となる（例えば、68 の条件でハイブリダイズした後、68 で、0.1% S D Sを含む2 × S S Cによって洗浄する）。

【0076】

当業者であれば、遺伝暗号の冗長性により、多くの他の配列が、上記のような関連タンパク質をコードでき、これらの配列は、B a c i l l u s 株または植物細胞のいずれかにおいて農薬タンパク質を発現させるように機能する限りにおいては、本発明の実施形態であることを認識するであろうし、当然ながら、このような多くの冗長なコード配列は、上記条件では、T I C 6 7 5 7、T I C 7 4 7 2 及び T I C 7 4 7 3 をコードする天然の B a c i l l u s または P a e n i b a c i l l u s 配列にハイブリダイズしないことが認められる。本願では、上記の同定方法と、当業者に知られているその他の同定方法を用いて、タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 7 4 7 2 及び T I C 7 4 7 3 をコードする配列と、タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 7 4 7 2 及び T I C 7 4 7 3 をコードする配列に対する同一率がかなりの値である配列を同定することが想定されている。

【0077】

本開示では、当該技術分野において知られている分子方法を用いて、農薬タンパク質から、タンパク質のキメラを含む商業的に有用なタンパク質を操作及びクローニングすることも想定されており、例えば、タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L のセグメントからこのキメラをアセンブルして、タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L のセグメントと、T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L 及び関連タンパク質とは異なる多様なタンパク質のセグメントとのアセンブリーを含む追加の有用な実施形態を導いてよい。タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L を互いに及び他の B a c i l l u s、P a e n i b a c i l l u s またはその他の農薬タンパク質（系統発生的に密接な関連があるか、または関連性が低いかは問わない）とアラインメントしてよく、これらの各タンパク質のセグメントのうち、アラインメントしたタンパク質間の置換に有用であるセグメントを特定してよく、それにより、キメラタンパク質を構築する。このようなキメラタンパク質に対して、病害虫バイオアッセイ解析を行って、キメラ中のこれらの各セグメントの由来元である親タンパク質と比較して、生物活性の向上または標的病害虫スペクトルの拡大の有無について、特徴付けを行うことができる。ドメインまたはセグメントを他のタンパク質と置き換えるか、または当該技術分野において知られている指向性進化法を用いることによって、特定の病害虫または広範な病害虫に対する活性に関して、これらのポリペプチドの農薬活性をさらに操作してよい。

【0078】

昆虫、特に L e p i d o p t e r a の作物植物への寄生をタンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L で防除する方法も本願で開示する。このような方法は、昆虫または L e p i d o p t e r a を防除する量で、毒素タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4 7 2 P L、T I C 7 4 7 3 または T I C 7 4 7 3 P L を含む植物を育てることを含むことができる。特定の実施形態では、この方法はさらに、(i) 毒素タンパク質 T I C 6 7 5 7、T I C 6 7 5 7 P L、T I C 7 4 7 2、T I C 7 4

10

20

30

40

50

72 PL、TIC7473またはTIC7473 PLを含むかまたはコードするいずれかの組成物を植物または植物に育つ種子に施用することと、(ii)毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLをコードするポリヌクレオチドで、植物または植物に育つ植物細胞を形質転換することのいずれか1つ以上を含むことができる。概して、毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLを組成物内に供給するか、微生物内に供給するか、またはトランスジェニック植物内に供給して、Lepidoptera目の虫に対する防虫活性を付与できることが想定されている。

【0079】

特定の実施形態では、毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLの組み換え核酸分子は、形質転換された組み換えBacillusまたはいずれかの他の組み換え細菌細胞を培養して、毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLを発現させるのに適する条件で、毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLを発現させることによって調製する防虫組成物の殺虫活性成分である。このような組成物は、前記組み換えポリペプチドを発現/産生するこのような組み換え細胞の培養液の乾燥、凍結乾燥、ホモジナイズ、抽出、ろ過、遠心分離、沈降または濃縮によって調製できる。このようなプロセスにより、Bacillusまたはその他の昆虫病原性細菌細胞抽出物、細胞懸濁液、細胞ホモジネート、細胞溶解液、細胞上清、細胞ろ液または細胞ペレットを得ることができる。このようにして作製した組み換えポリペプチドを得ることによって、その組み換えポリペプチドを含む組成物は、細菌細胞、細菌孢子及び副芽胞封入体を含むことができるとともに、様々な用途(農業用防虫スプレー製品または餌バイオアッセイにおける防虫製剤を含む)のために調合できる。

【0080】

一実施形態では、耐性の発達の可能性を軽減するために、TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLを含む防虫組成物はさらに、同じLepidoptera目の昆虫種に対して防虫活性を示すが、毒素タンパク質TIC6757、TIC6757 PL、TIC7472、TIC7472 PL、TIC7473またはTIC7473 PLとは異なる追加のポリペプチドを少なくとも1つ含むことができる。このような組成物用として考え得る追加のポリペプチドとしては、防虫タンパク質と防虫dsRNA分子が挙げられる。病害虫を防除するためのこのようなりボヌクレオチド配列の使用の一例は、Baum, et al.の文献(米国特許出願公開第2006/0021087A1号)に記載されている。Lepidoptera目の病害虫を防除するためのこのような追加のポリペプチドは、Cry1A(米国特許第5,880,275号)、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B(米国特許出願第10/525,318号)、Cry1C(米国特許第6,033,874号)、Cry1D、Cry1Da及びこれらのバリエーション、Cry1E、Cry1F及びCry1A/Fキメラ(米国特許第7,070,982号、同第6,962,705号、同第6,713,063号)、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry1型キメラ(TIC836、TIC860、TIC867、TIC869、TIC1100(国際公開第2016/061391(A2)号)、TIC2160(国際公開第2016/061392(A2)号)などが挙げられるが、これらに限らない)、Cry2A、Cry2Ab(米国特許第7,064,249号)、Cry2Ae、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry43A、Cry43B、Cry51Aa1、ET66、TIC400、TIC800、TIC834、TIC1415、Vip3A、VIP3Ab、VIP3B、AXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI

10

20

30

40

50

- 035 及び AXMI - 045 (米国特許出願公開第 2013 - 0117884 A1号)、AXMI - 52、AXMI - 58、AXMI - 88、AXMI - 97、AXMI - 102、AXMI - 112、AXMI - 117、AXMI - 100 (米国特許出願公開第 2013 - 0310543 A1号)、AXMI - 115、AXMI - 113、AXMI - 005 (米国特許出願公開第 2013 - 0104259 A1号)、AXMI - 134 (米国特許出願公開第 2013 - 0167264 A1号)、AXMI - 150 (米国特許出願公開第 2010 - 0160231 A1号)、AXMI - 184 (米国特許出願公開第 2010 - 0004176 A1号)、AXMI - 196、AXMI - 204、AXMI - 207、AXMI - 209 (米国特許出願公開第 2011 - 0030096 A1号)、AXMI - 218、AXMI - 220 (米国特許出願公開第 2014 - 0245491 A1号)、AXMI - 221z、AXMI - 222z、AXMI - 223z、AXMI - 224z、AXMI - 225z (米国特許出願公開第 2014 - 0196175 A1号)、AXMI - 238 (米国特許出願公開第 2014 - 0033363 A1号)、AXMI - 270 (米国特許出願公開第 2014 - 0223598 A1号)、AXMI - 345 (米国特許出願公開第 2014 - 0373195 A1号)、AXMI - 335 (国際公開第 2013 / 134523 (A2)号)、DIG - 3 (米国特許出願公開第 2013 - 0219570 A1号)、DIG - 5 (米国特許出願公開第 2010 - 0317569 A1号)、DIG - 11 (米国特許出願公開第 2010 - 0319093 A1号)、AFIP - 1A 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2014 - 0033361 A1号)、AFIP - 1B 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2014 - 0033361 A1号)、PIPP - 1A PIPP - 1B (米国特許出願公開第 2014 - 0007292 A1号)、PSEEN3174 (米国特許出願公開第 2014 - 0007292 A1号)、AECFG - 592740 (米国特許出願公開第 2014 - 0007292 A1号)、Pput__1063 (米国特許出願公開第 2014 - 0007292 A1号)、DIG - 657 (国際公開第 2015 / 195594 A2号)、Pput__1064 (米国特許出願公開第 2014 - 0007292 A1号)、GS - 135 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2012 - 0233726 A1号)、GS153 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2012 - 0192310 A1号)、GS154 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2012 - 0192310 A1号)、GS155 及びその誘導体 (米国特許出願公開第 2012 - 0192310 A1号)、米国特許出願公開第 2012 - 0167259 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2012 - 0047606 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2011 - 0154536 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2011 - 0112013 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2010 - 0192256 A1号に記載されている配列番号 2、配列番号 4 及びそれらの誘導体、米国特許出願公開第 2010 - 0077507 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2010 - 0077508 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2009 - 0313721 A1号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2010 - 0269221 A1号に記載されている配列番号 2 または配列番号 4 及びその誘導体、米国特許第 7, 772, 465 (B2)号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、WO2014 / 008054 A2 に記載されている CF161__0085 及びその誘導体、米国特許出願公開第 2008 - 0172762 A1号、同第 2011 - 0055968 A1号及び同第 2012 - 0117690 A1号に記載されているような Lepidoptera 目の毒素タンパク質及びそれらの誘導体、US7510878 (B2) に記載されている配列番号 2 及びその誘導体、米国特許第 7812129 (B1)号に記載されている配列番号 2 及びその誘導体など (これらに限らない) の防虫タンパク質からなる群から選択してよい。

【0081】

別の実施形態では、このような組成物 / 製剤はさらに、得られる昆虫阻害スペクトルを拡大するために、本発明の別段の防虫タンパク質によって阻害されない昆虫に対して防虫

10

20

30

40

50

活性を示す追加のポリペプチドを少なくとも1つ含むことができる。例えば、Hemiptera目の害虫の防除のために、本発明の防虫タンパク質を組み合わせたものをHemiptera目阻害活性タンパク質(TIC1415(米国特許出願公開第2013-0097735A1号)、TIC807(米国特許第8609936号)、TIC834(米国特許出願公開第2013-0269060A1号)、AXMI-036(米国特許出願公開第2010-0137216A1号)及びAXMI-171(米国特許出願公開第2013-0055469A1号)など)とともに用いることができる。さらに、Coleoptera目の害虫の防除用のポリペプチドは、Cry3Bb(米国特許第6,501,009号)、Cry1Cバリエント、Cry3Aバリエント、Cry3、Cry3B、Cry34/35、5307、AXMI134(米国特許出願公開第2013-0167264A1号)、AXMI-184(米国特許出願公開第2010-0004176A1号)、AXMI-205(米国特許出願公開第2014-0298538A1号)、AXMI-207(米国特許出願公開第2013-0303440A1号)、AXMI-218、AXMI-220(米国特許出願公開第20140245491A1)、AXMI-221z、AXMI-223z(米国特許出願公開第2014-0196175A1号)、AXMI-279(米国特許出願公開第2014-0223599A1号)、AXMI-R1及びそのバリエント(米国特許出願公開第2010-0197592A1号、TIC407、TIC417、TIC431、TIC807、TIC853、TIC901、TIC1201、TIC3131、DIG-10(米国特許出願公開第2010-0319092A1号)、eHIPS(米国特許出願公開第2010/0017914号)、IP3及びそのバリエント(米国特許出願公開第2012-0210462A1号)、ならびにヘキサトキシン-Hv1a(米国特許出願公開第2014-0366227A1号)など(これらに限らない)の防虫タンパク質からなる群から選択してよい。

【0082】

Coleoptera目、Lepidoptera目及びHemiptera目の害虫の防除用の追加のポリペプチドは、Neil Crickmoreによって(btnomenclature.infoのワールドワイドウェブ上に)維持されているBacillus thuringiensis toxin nomenclatureのウェブサイトで見つけることができる。

【0083】

当該技術分野においては、昆虫が特定の殺虫剤に対する耐性を発達させる可能性が記録されてきた。昆虫の耐性への対処策の1つは、異なる作用機序を通じて機能する2つの異なる防虫剤を発現するトランスジェニック作物を用いることである。したがって、それらの防虫剤のいずれか1つに対する耐性を持ついずれかの昆虫をもう一方の防虫剤によって防除できる。昆虫の耐性への別の対処策では、標的とするLepidoptera目の害虫種から保護されない植物の利用を採用して、保護されないその植物にリフュージを提供することである。特定の例の1つが米国特許第6,551,962号に記載されており、この特許は、参照により、その全体が援用される。

【0084】

別の実施形態(本明細書に開示されているタンパク質によっても防除される害虫を防除するように設計されている局所施用殺虫化学剤であって、種子処理剤、噴霧式製剤、点滴式製剤または塗布式製剤において、タンパク質とともに使用する局所施用殺虫化学剤など)は、直接土壌に施用したり(土壌ドレンチ)、本明細書に開示されているタンパク質を発現する生長植物に施用したり、または開示されているタンパク質のうちの1つ以上をコードする導入遺伝子を1つ以上含む種子に施用するものとして調合したりできる。種子処理剤で使用する上記のような製剤は、当該技術分野において知られている様々なスティッカー及び粘着付与剤とともに施用できる。このような製剤は、開示されているタンパク質と作用機序において相乗作用を有する農薬を含み、それらの調合農薬が、異なる作用機序を通じて作用して、開示されているタンパク質によって防除できる同じまたは類似の害虫を防除するようにするか、あるいは、それらの農薬が、広範な宿主範囲内の害虫ま

たは農薬タンパク質TIC6757、TIC6757PL、TIC7472、TIC7472PL、TIC7473もしくはTIC7473PLによって有効には防除されない植物病害虫種を防除するように作用するようにできる。

【0085】

上記の組成物/製剤はさらに、農業上許容可能な担体を含むことができる(毒餌、粉末、粉剤、ペレット、顆粒、噴霧剤、乳濁剤、コロイド懸濁液、水溶液、Bacillus孢子/結晶調製剤、種子処理剤、本願のタンパク質の1つ以上を発現するように形質転換された組み換え植物細胞/植物組織/種子/植物、または本願のタンパク質の1つ以上を発現するように形質転換された細菌など)。その組み換えポリペプチドに固有の防虫または殺虫阻害レベルと、植物または餌アッセイに適用する製剤のレベルに応じて、組成物/製剤は、様々な量(重量ベース)の組み換えポリペプチド、例えば0.0001重量%~0.001重量%~0.01重量%~1重量%~99重量%の組み換えポリペプチドを含むことができる。

10

【0086】

当業者であれば、上記に鑑み、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、開示されている具体的な態様に変更を加え得るとともに、変更しても、同様または類似の結果が得られることが分かるはずである。したがって、本明細書に開示されている具体的な構造及び機能的な詳細は、限定するものとして解釈してはならない。本明細書で引用されている各参照文献の開示内容の全体は、本願の範囲内に援用されることが分かるはずである。

20

【実施例】

【0087】

実施例1

TIC6757の発見、クローニング及び発現

3つの新規Paenibacillus popilliae農薬タンパク質をコードする配列の同定、クローニング、配列の確認、及び昆虫バイオアッセイにおける試験を行った。Paenibacillus popilliae DSC004343株から単離した農薬タンパク質TIC6757、同DSC007648株から単離したTIC7472及び同DSC008493株から単離したTIC7473が、新規Vip3C様タンパク質である。TIC6757、TIC7472及びTIC7473に対する遠縁の配列は、Vip3Ca2(同一性83.7%、最も近縁な既知の種)、Vip3Aa1(同一性66.75%)及びVip3B様タンパク質(同一性60.93%)である。TIC6757、TIC7472及びTIC7473の示差かつ独特の特性から、これらの農薬タンパク質が新規作用機序(MOA)を有する可能性が高いことが示されている。

30

【0088】

Paenibacillus popilliae DSC004343株から単離した全ゲノムDNAからTIC6757のコード領域の完全長コピーを、同DSC007648株から単離した全ゲノムDNAからTIC7472のコード領域の完全長コピーを、同DSC008493株から単離した全ゲノムDNAからTIC7473のコード領域の完全長コピーを増幅するように、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーを設計した。PCRアンプリコンには、各コード配列の翻訳開始コドンと終止コドンも含めた。

40

【0089】

当該技術分野において知られている方法を用いて、Btで発現可能なプロモーターと機能可能に連結した状態で、2つの異なるBt発現ベクターに各アンプリコンをクローニングした。Bt発現ベクターの1つは、bacillusの芽胞形成中にオン状態であるプロモーターを含んでいた。もう一方の発現ベクターは、非芽胞形成プロモーターを含んでいた。加えて、Escherichia coli(E.coli)でタンパク質を発現させるのに用いるベクターに、各アンプリコンをクローニングした。E.coliで発現させたタンパク質の単離のために、ヒスチジンタグを発現コード配列に機能可能に連結して、タンパク質のカラム精製を促した。細菌での発現で用いたコード配列と、それぞれの対応するタンパク質配列を下記の表3に示す。

50

【表3】

表3. Bt及びE. coliでの発現で用いた毒素コード配列と、対応するタンパク質配列

毒素	DNAコード配列の配列番号	タンパク質の配列番号	発現宿主細菌
TIC6757	1	2	Bt
TIC7472	7	8	Bt
TIC7473	11	12	Bt
TIC6757_His	5	6	E.coli
TIC7472_His	9	10	E.coli
TIC7473_His	13	14	E.coli

10

【0090】

実施例2

TIC6757、TIC7472及びTIC7473は、昆虫バイオアッセイにおいて、Lepidoptera目に対する活性を示す。

農薬タンパク質TIC6757、TIC7472及びTIC7473をBt及びE. coliで発現させ、Lepidoptera、Coleoptera及びHemipteraの様々な種に対する毒性についてアッセイした。Btによる各毒素の調製物をLepidoptera目の種のシロイチモンジヨトウ(BAW、Spodoptera exigua)、タマナヤガ(BCW、Agrotis ipsilon)、アメリカタバコガ(CEW、Helicoverpa zea)、コットンリーフワーム(CLW、Alabama argillacea)、コナガ(DBM、Plutella xylostella)、ヨーロッパアワノメイガ(ECB、Ostrinia nubilalis)、フォールアーミーワーム(FAW、Spodoptera frugiperda)、Cry1Fa1耐性フォールアーミーワーム(FAWR1、Spodoptera frugiperda)、アメリカンボールワーム(AWB、Helicoverpa armigera)、ワタアカミムシ(PBW、Pectinophora gossypiella)、サザンアーミーワーム(SAW、Spodoptera eridania)、ソイビーンルーパー(SBL、Chrysodeixis includens)、スポットドボールワーム(SBW、Earias vittella)、南西部アワノメイガ(SWCB、Diatraea grandiosella)、タバコバッドワーム(TBW、Heliothis virescens)、ハスモンヨトウ(TCW、Spodoptera litura、クラスターキャタピラーとしても知られている)及びベルベットビーンキャタピラー(VBW、Anticarsia gemmatalis)と、Coleoptera目の種のコロラドポテトビートル(CPB、Leptinotarsa decemlineata)、ウェスタンコーンルートワーム(WCB、Diabrotica virgifera virgifera)と、Hemiptera目の種のターニッシュプラントバグ(TPB、Lygus lineolaris)、ウェスタンターニッシュプラントバグ(WTP、Lygus hesperus)、ネオトロピカルブラウンカメムシ(NBSB、Euschistus heros)及びグリーンステインクバグ(GSB、Nezara viridula)に対してアッセイした。

20

30

40

【0091】

農薬タンパク質TIC6757、TIC7472及びTIC7473をE. coliまたはBtのいずれかの発現宿主で発現させることによって、これらのタンパク質の生物活性を評価した。Bt宿主のケースでは、TIC6757、TIC7472またはTIC7473を発現するBt株を24時間増殖させてから、その培養液を昆虫の餌に加えた。TIC6757、TIC7472またはTIC7473を発現するBt株の培養液を含む餌

50

を食べた昆虫と、未処理のコントロール培養液を含む餌を食べた昆虫の増殖と発育を比較することによって、死亡率と成長抑制を評価した。TIC6757、TIC7472またはTIC7473を発現するE. coli株を同様の方式で処理し、昆虫の餌に供給した。Bt調製物もしくはE. coli調製物のいずれか、またはこれらの両方から得た各タンパク質について観察したバイオアッセイ活性を下記の表4及び5に示すが、表中、「+」は、活性を示しており、「NT」は、その特定の病害虫に対して毒素をアッセイしなかったことを示している。

【表4】

表4. TIC6757、TIC7472及びTIC7473の病害虫に対するバイオアッセイ活性

毒素	BAW	BCW	CEW	CLW	DBM	ECB	FAW	FAWR1	AWB	PBW	SAW	SBL
TIC6757	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
TIC7472	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+
TIC7473	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+

10

20

【表5】

表5. TIC6757、TIC7472及びTIC7473の病害虫に対するバイオアッセイ活性

毒素	SBW	SWCB	TBW	TCW	VBC	CPB	WCR	TPB	WTP	NBSB	SGB
TIC6757	+	+	+	+	+						
TIC7472	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT
TIC7473	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT

30

【0092】

上記の表4及び5で見取れるように、昆虫毒素TIC6757は、多くのLepidoptera目の病害虫(BAW、BCW、CEW、CLW、DBM、ECB、FAW、FAWR1、AWB、SAW、SBL、SBW、SWCB、TBW、TCW及びVBC)に対して活性を示した。TIC7472及びTIC7473に対してアッセイした大半の病害虫(CEW、FAW、SAW、SBL、SWCB)において、活性が観察された。

【0093】

実施例3

安定的に形質転換したトウモロコシ植物における、Lepidoptera目の病害虫に対するTIC6757PL活性のアッセイ

当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲットング農薬タンパク質TIC6757PLとプラスチック非ターゲットング農薬タンパク質TIC6757PLの両方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターをクローニングした。得られたベクターを用いて、トウモロコシ植物体を安定的に形質転換した。この形質転換体から組織を採取して、様々なLepidoptera目の病害虫に対する昆虫バイオアッセイで使用した。

40

【0094】

植物においてコードタンパク質を発現させるのに用いるために、合成コード配列を構築し、バイナリー植物形質転換ベクターにクローニングし、トウモロコシ植物細胞を形質転

50

換するのに用いた。この合成配列は、米国特許第 5,500,365 号におおまかに説明されている方法に従って合成して、特定の有害な問題の配列 (A T T T A 及び A / T リッチ植物ポリアデニル化配列など) を回避したとともに、天然の *Paenibacillus* タンパク質のアミノ酸配列を保存した。この合成コード配列は、タンパク質 T I C 6 7 5 7 に対して、開始メチオニンの直後に追加のアラニン残基を含むタンパク質 T I C 6 7 5 7 P L をコードする。プラスチドターゲットタンパク質では、農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L をコードする合成配列を、葉緑体ターゲットシグナルペプチドコード配列とインフレームで機能可能に連結した。得られた植物形質転換ベクターには、農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L の発現用の第 1 の導入遺伝子カセットであって、5' でリーダーに機能可能に連結されているか、5' でイントロンに機能可能に連結されているか、5' で、プラスチドターゲットタンパク質 T I C 6 7 5 7 P L またはプラスチド非ターゲットタンパク質 T I C 6 7 5 7 P L をコードする合成コード配列に機能可能に連結されている (その結果、5' で 3' U T R に機能可能に連結される) 構成的プロモーターを含むカセットと、グリホサート選抜を用いて形質転換植物細胞を選抜するための第 2 の導入遺伝子カセットが含まれていた。農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L の合成コード配列は、配列番号 3 として示されており、配列番号 4 として示されているタンパク質をコードする。

【0095】

Agrobacterium 媒介形質転換法を用いて、トウモロコシ植物体を上記のような 4 つの異なるバイナリー形質転換ベクターで形質転換した。バイナリー植物形質転換ベクターコンストラクト 1 及び 3 には、プラスチドターゲットタンパク質 T I C 6 7 5 7 P L をコードするコード配列が含まれていたのに対し、コンストラクト 2 及び 4 には、非ターゲットタンパク質 T I C 6 7 5 7 P L をコードするコード配列が含まれていた。形質転換した細胞を誘導して、当該技術分野において知られている方法によって、植物体を形成させた。米国特許第 8,344,207 号に記載されているアッセイと同様に、植物葉片を用いたバイオアッセイを行った。1 日齢未満の孵化したばかりの新生幼虫 1 匹を各葉片試料の上に置き、約 4 日間摂食させた。非形質転換トウモロコシ植物体を用いて、ネガティブコントロールとして用いる組織を得た。各バイナリーベクターによる複数の形質転換 R₀ 単一コピーの挿入イベントをタマナヤガ (*BCW*, *Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ (*CEW*, *Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム (*FAW*, *Spodoptera frugiperda*) 及び南西部アワノメイガ (*SWCB*, *Diatraea grandiosella*) に対して評価した。

【0096】

T I C 6 7 5 7 P L を発現する形質転換 R₀ 植物体は、表 6 に示されているように、アッセイした 4 つのすべての病害虫に対する効力 (葉害が 17.5 パーセント以下で、死亡率が 100% であることとして定義した) が高かった。高浸透度 (「(H)」として示されている) は、各コンストラクトにおいて、葉害が 17.5 パーセント以下で、死亡率が 100% であるアッセイイベントが 50% 超であることとして定義されている。低浸透度 (「(L)」として示されている) は、各コンストラクトにおいて、葉害が 17.5 パーセント以下で、死亡率が 100% であるアッセイイベントが 50% 以下であることとして定義されている。

【表6】

表6. TIC6757発現イベント数と、葉害が17.5%以下で死亡率が100%であるイベント数と、浸透度

コンストラクト	総イベント数	葉害が17.5%以下で死亡率が100%であるイベント数(浸透度)			
		BCW	CEW	FAW	SWC
コンストラクト1	22	17(H)	18(H)	18(H)	11(L)
コンストラクト2	20	14(H)	14(H)	14(H)	4(L)
コンストラクト3	19	17(H)	17(H)	17(H)	17(H)
コンストラクト4	20	16(H)	16(H)	15(H)	7(L)

10

【0097】

R₀コンストラクト1(プラスチックターゲット型)とコンストラクト2(プラスチック非ターゲット型)に由来する所定のR₀イベントを自家受粉させ、F₁子孫を作製した。各R₀イベント由来のヘテロ型のF₁子孫植物体をいくつか、葉片バイオアッセイ用に選抜し、タマナヤガ(BCW、*Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ(CEW、*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム(FAW、*Spodoptera frugiperda*)及び南西部アワノメイガ(SWCB、*Diatraea grandiosella*)に対してアッセイした。下記の表7には、各コンストラクト/イベントに由来する各植物に関する平均葉害率と平均死亡率が示されている。F₁子孫植物体は、R₀イベントに関して参照されている。例えば、「イベント-1__1」は、イベント-1に由来する第1のヘテロ型のF₁子孫植物体であり、「イベント-1__2」は、イベント-1に由来する第1のヘテロ型のF₁子孫植物体である。「N」は、アッセイで用いた各植物由来の試料の数を表している。表7及び8で見取れるように、各R₀イベントに由来する大半の植物では、BCW、CEW及びFAWに対しては、葉害が5%以下で、死亡率が100%であった。SWCBに関しては、各R₀イベントに由来する複数の植物において、アッセイでの葉害が10%未満で、死亡率が50%超であった。

20

30

【表 7】

表 7. TIC6757PLを発現する所定のR₀イベントに由来するF₁子孫における平均葉害率と死亡率

コンストラクト	イベント_植物	N	BCW		CEW	
			平均葉害率	平均死亡率	平均葉害率	平均死亡率
コンストラクト1	イベント-1_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト1	イベント-1_2	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト1	イベント-1_3	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト1	イベント-1_4	3	5.00	100.00	6.65	100.00
コンストラクト1	イベント-2_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト1	イベント-2_2	3	NT	NT	7.50	100.00
コンストラクト1	イベント-2_3	3	NT	NT	8.35	100.00
コンストラクト2	イベント-3_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-3_2	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_2	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_3	3	6.65	66.67	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_4	3	6.65	66.67	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_5	3	20.00	33.33	10.00	100.00
コンストラクト2	イベント-5_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-5_2	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-5_3	3	5.00	100.00	5.00	100.00
なし	ネガティブコントロール	3	55.00	0.00	55.00	0.00

10

20

30

40

【表 8】

表 8. TIC6757PLを発現する所定のR₀イベントに由来するF₁子孫における平均葉害率と死亡率

コンストラクト	イベント_植物	N	FAW		SWCB	
			平均葉害率	平均死亡率	平均葉害率	平均死亡率
コンストラクト1	イベント-1_1	3	5.00	100.00	6.65	66.67
コンストラクト1	イベント-1_2	3	5.00	100.00	6.65	66.67
コンストラクト1	イベント-1_3	3	5.00	100.00	7.50	50.00
コンストラクト1	イベント-1_4	3	5.00	100.00	8.35	66.67
コンストラクト1	イベント-2_1	3	5.00	100.00	5.00	50.00
コンストラクト1	イベント-2_2	3	5.00	100.00	5.00	50.00
コンストラクト1	イベント-2_3	3	5.00	100.00	6.65	66.67
コンストラクト2	イベント-3_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-3_2	3	5.00	100.00	15.00	50.00
コンストラクト2	イベント-4_1	3	5.00	100.00	12.50	0.00
コンストラクト2	イベント-4_2	3	5.00	100.00	40.00	100.00
コンストラクト2	イベント-4_3	3	5.00	100.00	48.35	0.00
コンストラクト2	イベント-4_4	3	5.00	100.00	55.00	0.00
コンストラクト2	イベント-4_5	3	5.00	100.00	55.00	0.00
コンストラクト2	イベント-5_1	3	5.00	100.00	5.00	100.00
コンストラクト2	イベント-5_2	3	5.00	100.00	6.65	66.67
コンストラクト2	イベント-5_3	3	5.00	100.00	8.35	0.00
なし	ネガティブコントロール	3	55.00	0.00	51.65	0.00

【0098】

コンストラクト3（プラスチックターゲット型）とコンストラクト4（プラスチック非ターゲット型）に由来する所定のR₀イベントを自家受粉させ、F₁子孫を作製した。各R₀イベント由来のヘテロ型のF₁子孫植物体を葉片バイオアッセイ用に選抜し、ウエスタンビーンカットワーム（WBC、*Striacosta albicosta*）に

10

20

30

40

50

対してアッセイした。表9には、各R₀イベント由来のF₁子孫植物体とネガティブコントロールの平均葉害率と平均死亡率が示されている。「N」は、アッセイで用いた各植物由来の試料の数を表している。

【表9】

表9. TIC6757PLを発現する所定のR₀イベントに由来するF₁子孫における平均葉害率と平均死亡率

コンストラクト	イベント	N	平均葉害率	平均死亡率
コンストラクト3	イベント-6_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-7_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-8_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-9_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-10_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-11_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-12_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-13_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-14_1	4	5.00	100.00
コンストラクト3	イベント-15_1	4	27.50	50.00
コンストラクト4	イベント-16_1	4	5.00	100.00
コンストラクト4	イベント-17_1	4	5.00	100.00
コンストラクト4	イベント-18_1	4	5.00	100.00
ネガティブコントロール		4	45.00	0.00

10

20

【0099】

上記の表9で見てとれるように、WBCに対してアッセイした各R₀イベントに由来するF₁子孫植物体では、1つ以外はすべて、葉害が5%以下で、死亡率が100%であった。

【0100】

コンストラクト3（プラスチックターゲット型）とコンストラクト4（プラスチック非ターゲット型）で形質転換した所定のヘテロ型のF₁子孫植物体に由来する苗において、タマナヤガ（BCW、*Agrotis ipsilon*）に対する耐性をアッセイした。F₁子孫種子と、非形質転換種子（ネガティブコントロール）をポットに植えた。8日後、苗が土壌から出芽していたときに、各植物に3齢BCWを3匹寄生させた。寄生から14日後に植物体を調べて、BCWによって切り倒された植物体の数を計数した。コンストラクト3で形質転換した10個の異なるR₀イベントに由来する64株のF₁子孫植物体と、コンストラクト4で形質転換した4つの異なるR₀イベントに由来する10株のF₁子孫植物体をこのアッセイで用いた。15株のネガティブコントロール植物体もこのアッセイで用いた。植物を調べたところ、ネガティブコントロールの80%がBCWによって切り倒されていた一方で、コンストラクト3とコンストラクト4のいずれかで形質転換したF₁子孫植物体には、切り倒されたものはなかったことが観察された。

30

40

【0101】

上記の結果から、TIC6757PLを発現する形質転換トウモロコシ植物体は、Lepidoptera目の病害虫、特に、タマナヤガ（*Agrotis ipsilon*）、アメリカタバコガ（*Helicoverpa zea*）、フォールアーミーワーム（*Spodoptera frugiperda*）、南西部アワノメイガ（*Diatraea grandiosella*）及びウエスタンピンカットワーム（*Striacosta albicosta*）に対する優れた耐性をもたらすことが示されている。

【0102】

実施例4

50

安定的に形質転換したダイズ植物体における、Lepidoptera目の病害虫に対するTIC6757PL活性のアッセイ

当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲティング農薬タンパク質TIC6757PLとプラスチック非ターゲティング農薬タンパク質TIC6757PLの両方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターをクローニングした。得られたベクターを用いて、ダイズ植物体を安定的に形質転換した。この形質転換体から組織を採取して、様々なLepidoptera目の病害虫に対する昆虫バイオアッセイで使用した。

【0103】

上記の実施例3で説明したように、植物で発現するように設計した合成コード配列をバイナリー植物形質転換ベクターにクローニングして、ダイズ植物細胞を形質転換するのに用いた。当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲティングTIC6757PLコード配列と、プラスチック非ターゲティングTIC6757PLコード配列を含むバイナリーベクターを構築した。得られた植物形質転換ベクターには、農薬タンパク質TIC6757PLの発現用の第1の導入遺伝子カセットであって、5'でリーダーに機能可能に連結されているか、5'で、プラスチックターゲティングタンパク質TIC6757PLまたはプラスチック非ターゲティングタンパク質TIC6757PLをコードする合成コード配列に機能可能に連結されている(その結果、5'で3'UTRに機能可能に連結される)構成的プロモーターを含むカセットと、スペクチノマイシン選抜を用いて形質転換植物細胞を選抜するための第2の導入遺伝子カセットが含まれていた。コンストラクト1、3及び5には、非ターゲティング農薬タンパク質TIC6757PLをコードするコード配列が含まれていた。コンストラクト2、4及び6には、プラスチックターゲティングタンパク質TIC6757PLをコードするコード配列が含まれていた。

【0104】

形質転換ダイズ細胞を誘導して、当該技術分野において知られている方法によって、植物体を形成させた。米国特許第8,344,207号に記載されているアッセイと同様に、植物葉片を用いたバイオアッセイを行った。非形質転換ダイズ植物を用いて、ネガティブコントロールとして用いる組織を得た。各バイナリーベクターによる複数の形質転換イベントをサザンアーミーワーム(SAW、Spodoptera eridania)、ソイビーンルーパー(SBL、Chrysodeixis includens)及びマメヒメサヤムシガ(SPW、Helicoverpa zea)に対して評価した。

【0105】

TIC6757PLを発現する形質転換R₀ダイズ植物体は、表10に示されているように、SAW、SBL及びSPWに対する効力が高かった(葉害が20パーセント以下であることとして定義した)。高浸透度(「(H)」として示されている)は、各コンストラクトにおいて、葉害が20パーセント以下であるアッセイイベントが50%超であることとして定義されている。低浸透度(「(L)」として示されている)は、各コンストラクトにおいて、葉害が20パーセント以下であるアッセイイベントが50%以下であることとして定義されている。

10

20

30

【表 10】

表 10. TIC6757PL 発現イベント数と、葉害が 20%以下のイベント数と、浸透度

		葉害が20%以下のイベント数(浸透度)		
コンストラクト	総イベント数	SAW	SBL	SPW
コンストラクト 1	15	14(H)	14(H)	12(H)
コンストラクト 2	15	5(L)	3(L)	8(H)
コンストラクト 3	15	12(H)	13(H)	13(H)
コンストラクト 4	15	15(H)	15(H)	15(H)
コンストラクト 5	15	14(H)	13(H)	14(H)
コンストラクト 6	15	15(H)	15(H)	15(H)

10

【0106】

タンパク質毒素 TIC6757PL を発現する所定の R₀ トランスジェニックダイズ植物体であって、コンストラクト 3、4、5 及び 6 の形質転換に由来する植物体を自家受粉させ、R₁ 種子を作製した。R₁ 種子を発芽させ、R₁ 植物体を作製した。TIC6757PL 発現カセットに関してホモである R₁ 植物体を、サザンアーミーワーム (SAW、*Spodoptera eridania*)、ソイビーンルーパー (SBL、*Chrysodeixis includens*)、マメヒメサヤムシガ (SPW、*Helicoverpa zea*) 及びベルベットビーンキャタピラー (VBW、*Anticarsia gemmatalis*) に対する葉片バイオアッセイ用に選抜した。表 11 及び 12 には、各 R₁ 子孫植物体とネガティブコントロール (変種 A3555) において、各昆虫によって示された平均葉害率が示されている。表 11 及び 12 には、ネガティブコントロールとの比較で、アッセイした各イベントにおいて各昆虫によって示された葉害率の平均値標準誤差 (SEM) も示されている。「N」は、アッセイで用いた各植物由来の試料の数を表している。「SEM」は、葉害率の平均値標準誤差を表している。

20

30

【表 11】

表 11. TIC6757PL を発現する R₁ ダイズ植物の平均葉害率

コンストラクト	イベント数	植物/イベント数	SAW			SBL		
			N	葉害率	SEM	N	葉害率	SEM
コンストラクト 3	5	6	4	0.37	0.30	4	1.91	0.72
コンストラクト 4	8	6	4	0.31	0.25	4	1.25	0.34
コンストラクト 5	8	6	4	0.02	0.02	4	0.75	0.35
コンストラクト 6	8	6	4	0.76	0.34	4	0.97	0.35
ネガティブコントロール	変種 A3555	8	4	87.93	9.74	4	79.44	12.44

40

50

【表 1 2】

表 1 2. T I C 6 7 5 7 P L を発現する R₁ サイズ植物の平均葉害率

コンストラクト	イベント数	植物/イベント数	SPW			VBC		
			N	葉害率	SEM	N	葉害率	SEM
コンストラクト3	5	6	4	16.32	3.83	4	1.89	0.60
コンストラクト4	8	6	4	2.25	0.30	4	0.96	0.31
コンストラクト5	8	6	4	2.40	0.50	4	0.51	0.25
コンストラクト6	8	6	4	3.65	0.53	4	0.71	0.32
ネガティブコントロール	変種A35 55	8	4	97.25	1.09	4	88.88	10.30

10

【 0 1 0 7 】

表 1 1 及び 1 2 で見て取れるように、毒素タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L を発現する R₁ サイズ植物体は、S A W、S B L、S P W 及び V B C に対する優れた耐性をもたらす。S A W に関しては、4 つのすべてのイベントにおいて、葉害率が 1 % 未満であったのに対して、ネガティブコントロールでは、葉害率は約 8 8 % であった。S B L に関しては、4 つのすべてのイベントにおいて、葉害率が 2 % 未満であったのに対して、コントロールでは、葉害率は約 8 0 % であった。S P W に関しては、4 つのイベントのうち 3 つにおいて、葉害率が 4 % 未満であったのに対して、コントロールでは、葉害率は約 9 7 % であった。V B C に関しては、イベントのうち 3 つにおいて、葉害率が 1 % 未満であったとともに、1 つのイベントにおいて、葉害率が 2 % 未満であったのに対して、ネガティブコントロールでは、葉害率は 8 9 % 近かった。

20

【 0 1 0 8 】

上記の結果から、T I C 6 7 5 7 P L を発現する形質転換サイズ植物体は、L e p i d o p t e r a 目の昆虫、特に、サザンアミーワーム (S p o d o p t e r a e r i d a n i a)、ソイビーンルーパー (C h r y s o d e i x i s i n c l u d e n s)、マメヒメサヤムシガ (H e l i c o v e r p a z e a) 及びベルベットビーンキャタピラー (A n t i c a r s i a g e m m a t a l i s) に対する優れた耐性をもたらすことが示されている。

30

【 0 1 0 9 】

実施例 5

安定的に形質転換した綿植物体における、L e p i d o p t e r a 目の病害虫に対する T I C 6 7 5 7 P L 活性のアッセイ

当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲットング農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L と、プラスチック非ターゲットング農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L の両方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターをクローニングした。得られたベクターを用いて、綿植物体を安定的に形質転換した。この形質転換体から組織を採取して、様々な L e p i d o p t e r a 目の病害虫に対する昆虫バイオアッセイで使用した。

40

【 0 1 1 0 】

上記の実施例 3 で説明したように、植物で発現するように設計した合成コード配列をバイナリー植物形質転換ベクターにクローニングし、綿植物細胞を形質転換するのに用いた。当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲットング T I C 6 7 5 7 P L コード配列と、プラスチック非ターゲットング T I C 6 7 5 7 P L コード配列を含むバイナリーベクター構築した。得られた植物形質転換ベクターには、農薬タンパク質 T I C 6 7 5 7 P L の発現用の第 1 の導入遺伝子カセットであって、5' でリーダーに機能可能に連結されているか、5' で、プラスチックターゲットングタンパク質 T I C 6 7 5

50

7 P Lまたはプラスチック非ターゲティングタンパク質T I C 6 7 5 7 P Lをコードする合成コード配列に機能可能に連結されている（その結果、5'で3' U T Rに機能可能に連結される）構成的プロモーターを含む導入遺伝子カセットと、スペクチノマイシン選抜を用いて形質転換植物細胞を選抜するための第2の導入遺伝子カセットが含まれていた。

【0111】

形質転換綿細胞を誘導して、当該技術分野において知られている方法によって、植物体を形成させた。米国特許第8,344,207号に記載されているアッセイと同様に、植物葉片を用いたバイオアッセイを行った。非形質転換綿植物体を用いて、ネガティブコントロールとして用いる組織を得た。各バイナリーベクターによる複数の形質転換イベントをサザンアーミーワームオオタバコガ(C B W、H e l i c o v e r p a z e a)、フォールアーミーワーム(F A W、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a)、ソイビーンルーパー(S B L、C h r y s o d e i x i s i n c l u d e n s)及びタバコバッドワーム(T B W、H e l i o t h i s v i r e s c e n s)に対して評価した。

10

【0112】

T I C 6 7 5 7 P Lを発現する形質転換R₀綿植物体は、表13に示されているように、C B W、F A W、S B L及びT B Wに対する効力が高かった（葉害が10パーセント以下であることとして定義した）。高浸透度（「(H)」として示されている）は、各コンストラクトにおいて、葉害が10パーセント以下であるアッセイイベントが50%超であることとして定義されている。低浸透度（「(L)」として示されている）は、各コンストラクトにおいて、葉害が10パーセント以下であるアッセイイベントが50%以下であることとして定義されている。

20

【表13】

表13. T I C 6 7 5 7 P Lを発現するイベント数と、葉害が10%以下のイベント数と、浸透度

コンストラクト	葉害が10%以下のイベント数/アッセイしたイベント数(浸透度)			
	CBW	FAW	SBL	TBW
コンストラクト1	22/25(H)	21/24(H)	21/25(H)	21/25(H)
コンストラクト2	12/15(H)	6/15(L)	13/15(H)	13/15(H)
コンストラクト3	7/13(H)	8/14(H)	4/13(L)	6/14(L)
コンストラクト4	11/14(H)	8/14(H)	9/14(H)	10/14(H)
コンストラクト5	20/25(H)	19/23(H)	20/24(H)	19/23(H)
コンストラクト6	6/7(H)	7/7(H)	7/7(H)	6/7(H)
コンストラクト7	22/25(H)	22/25(H)	22/25(H)	22/25(H)

30

【0113】

実施例6

安定的に形質転換したトウモロコシ植物体における、L e p i d o p t e r a目の害虫に対するT I C 7 4 7 2 P L活性及びT I C 7 4 7 3 P L活性のアッセイ

40

当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチックターゲティング農薬タンパク質T I C 7 4 7 2 P LまたはT I C 7 4 7 3 P Lと、プラスチック非ターゲティング農薬タンパク質T I C 7 4 7 2 P LまたはT I C 7 4 7 3 P Lの両方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターをクローニングする。得られたベクターを用いて、トウモロコシ植物体を安定的に形質転換する。この形質転換体から組織を採取して、様々なL e p i d o p t e r a目の害虫に対する昆虫バイオアッセイで使用する。

【0114】

植物においてコードタンパク質を発現させるのに用いるために、合成コード配列を構築し、バイナリー植物形質転換ベクターにクローニングし、トウモロコシ植物細胞を形質転

50

換するのに用いる。この合成配列は、米国特許第 5,500,365 号におおまかに説明されている方法に従って合成して、特定の有害な問題の配列 (A T T T A 及び A / T リッチ植物ポリアデニル化配列など) を回避するとともに、天然の *Paenibacillus* タンパク質のアミノ酸配列を保存する。この合成コード配列は、タンパク質 T I C 7 4 7 2 及び T I C 7 4 7 3 に対して、開始メチオニンの直後に、追加のアラニン残基を含むタンパク質 T I C 7 4 7 2 P L 及び T I C 7 4 7 3 P L をコードする。プラスチドターゲットタンパク質では、合成 T I C 7 4 7 2 P L または T I C 7 4 7 3 P L 農薬タンパク質コード配列を、葉緑体ターゲットシグナルペプチドコード配列とインフレームで機能可能に連結する。得られた植物形質転換ベクターには、農薬タンパク質 T I C 7 4 7 2 P L または T I C 7 4 7 3 P L の発現用の第 1 の導入遺伝子カセットであって、5' でリーダー機能可能に連結されているか、5' でイントロンに機能可能に連結されているか、5' で、プラスチドターゲットタンパク質 T I C 7 4 7 2 P L もしくは T I C 7 4 7 3 P L またはプラスチド非ターゲットタンパク質 T I C 7 4 7 2 P L もしくは T I C 7 4 7 3 P L をコードする合成コード配列に機能可能に連結されている (その結果、5' で 3' U T R に機能可能に連結される) 構成的プロモーターを含むカセットと、グリホサート選抜を用いて形質転換植物細胞を選抜するための第 2 の導入遺伝子カセットが含まれている。農薬タンパク質 T I C 7 4 7 2 P L の合成コード配列は、配列番号 15 として示されており、配列番号 16 として示されているタンパク質をコードする。農薬タンパク質 T I C 7 4 7 3 P L の合成コード配列は、配列番号 17 として示されており、配列番号 18 として示されているタンパク質をコードする。

【0115】

Agrobacterium 媒介形質転換法を用いて、トウモロコシ植物体を上記のようなバイナリー形質転換ベクターで形質転換する。形質転換細胞を誘導して、当該技術分野において知られている方法によって、植物体を形成させる。米国特許第 8,344,207 号に記載されているアッセイと同様に、植物葉片を用いたバイオアッセイを行う。非形質転換トウモロコシ植物体を用いて、ネガティブコントロールとして用いる組織を得る。各バイナリーベクターによる複数の形質転換イベントをタマナヤガ (*BCW*、*Agrotis ipsilon*)、アメリカタバコガ (*CEW*、*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム (*FAW*、*Spodoptera frugiperda*) 及び南西部アワノメイガ (*SWCB*、*Diatraea grandiosella*) と、その他の *Lepidoptera* 目の病害虫に対して評価した。

【0116】

病害虫において、T I C 7 4 7 2 P L または T I C 7 4 7 3 P L を発現する提示葉片の摂食を原因とする死亡率と成長抑制を観察するとともに、非形質転換トウモロコシ植物体に由来する葉片と比較する。

【0117】

実施例 7

安定的に形質転換したダイズ及び綿植物体における、*Lepidoptera* 目の病害虫に対する T I C 6 7 5 7 P L 活性のアッセイ

当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチドターゲットタンパク質 T I C 7 4 7 2 P L または T I C 7 4 7 3 P L と、プラスチド非ターゲットタンパク質 T I C 7 4 7 2 P L または T I C 7 4 7 3 P L の両方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターをクローニングする。得られたベクターを用いて、ダイズと綿の植物体を安定的に形質転換する。この形質転換体から組織を採取して、様々な *Lepidoptera* 目の病害虫に対する昆虫バイオアッセイで使用する。

【0118】

上記の実施例 6 で説明されているように、植物で発現するように設計した合成コード配列をバイナリー植物形質転換ベクターにクローニングし、ダイズまたは綿植物細胞を形質転換するのに用いる。当該技術分野において知られている方法を用いて、プラスチドター

ゲティングTIC7472PLまたはTIC7473PLコード配列と、プラスチック非ターゲットティングTIC7472PLまたはTIC7473PLコード配列を含むバイナリーベクターを構築する。得られた植物形質転換ベクターには、農薬タンパク質TIC7472PLまたはTIC7473PLの発現用の第1の導入遺伝子カセットであって、5'でリーダーに機能可能に連結されているか、5'で、プラスチックターゲットティングタンパク質TIC7472PLもしくはTIC7473PL、またはプラスチック非ターゲットティングタンパク質TIC7472PLもしくはTIC7473PLをコードする合成コード配列に機能可能に連結されている(その結果、5'で3'UTRに機能可能に連結される)構成的プロモーターを含むカセットと、スペクチノマイシン選抜を用いて形質転換植物細胞を選抜するための第2の導入遺伝子カセットが含まれている。コンストラクト1、2及び7には、非ターゲットティング農薬タンパク質TIC6757PLをコードするクローニング配列が含まれていた。コンストラクト3、4、5及び6には、ターゲットティング農薬タンパク質TIC6757PLをコードするコード配列が含まれていた。

10

20

30

40

【0119】

形質転換ダイズまたは綿細胞を誘導して、当該技術分野において知られている方法によって、植物体を形成させる。米国特許第8,344,207号に記載されているアッセイと同様に、植物葉片を用いたバイオアッセイを行う。非形質転換ダイズまたは綿植物を用いて、ネガティブコントロールとして用いる組織を得る。各バイナリーベクターによる複数の形質転換イベントをサザンアーミーワーム(SAW、*Spodoptera eridania*)、ソイビートルーパー(SBL、*Chrysodeixis includens*)、マメヒメサヤムシガ(SPW、*Helicoverpa zea*)、フォールアーミーワーム(AFW、*Spodoptera frugiperda*)、ソイビートルーパー(SBL、*Chrysodeixis includens*)、タバコバッドワーム(Heliothis virescens)、オオタバコガ(CBW、*Helicoverpa zea*)及びベルベットビーンキャタピラー(VBW、*Anticarsia gemmatalis*)と、その他のLepidoptera目の病害虫に対して評価する。病害虫において、TIC7472PLまたはTIC7473PLを発現する指定の葉片の摂食を原因とする死亡率と成長抑制を観察するとともに、非形質転換ダイズまたは綿植物に由来する葉片と比較する。

【0120】

本明細書に開示及び特許請求されている組成物はいずれも、本開示に鑑みれば、過度の実験なしに作製及び実行できる。上記の例示的な実施形態に関して、本発明の組成物を説明してきたが、当業者であれば、本発明の真の概念、趣旨及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載されている組成物に、変形、変更、修正及び改変を加え得ることは分かるであろう。より具体的には、本明細書に記載されている薬剤を、化学的にも生理学的にも関連がある特定の薬剤に置換してよく、それと同時に、同じまたは同様の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかなこのような類似の置換形態及び修正形態はいずれも、添付の特許請求の範囲によって定義されているような、本発明の趣旨、範囲及び概念の範囲内とみなすものとする。

【0121】

本明細書で引用されている文献と公開特許文献はいずれも、個々の各文献または特許出願が参照により援用されることが具体的かつ個々に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用される。

【配列表】

2018527930000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/048714

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- SEQ ID NOs: 1-18 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2016/048714
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 63/02; A61K 35/742; C07K 14/325; C12N 15/32; C12N 15/82 (2016.01) CPC - A01N 63/02; C07K 14/325; C12N 15/8216; C12N 15/8257; C12N 15/8286 (2016.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A01H 5/00; A01N 63/02; A61K 35/66; A61K 35/742; C07K 14/32; C07K 14/325; C12N 15/03; C12N 15/31; C12N 15/32; C12N 15/82 CPC - A01N 63/02; C07K 14/325; C12N 15/8216; C12N 15/8257; C12N 15/8286 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/93.461; 435/418; 435/252.31; 514/4.5; 800/302 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: (Paenibacillus popilliae) OR ("P" WF1 "popilliae") OR (Bacillus popilliae) OR ("B" WF1 "popilliae") OR (milky spore) insecticid* OR repellent% OR (insect control) OR (pest control) OR repellent% OR (bug control) OR bug% OR (insect control) OR (insect repellent) OR (bug repellent) OR pesticide%																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2012/138703 A1 (ATHENIX CORP. et al) 11 October 2012 (11.10.2012) entire document</td> <td>26, 27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 7,364,728 B2 (ASANO et al) 29 April 2008 (29.04.2008) entire document</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHANG et al. "Cloning and Analysis of the First cry Gene from Bacillus popilliae," Journal of Bacteriology, 01 July 1997 (01.07.1997), Vol. 179, No. 13, Pgs. 4336-4341. entire document</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2008/0019914 A1 (BINTRIM et al) 24 January 2008 (24.01.2008) entire document</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YAMAMOTO et al. "Chapter 2.2: Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests," Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application, 2000, Pgs. 81-100. entire document</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015/120276 A1 (PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC et al) 13 August 2015 (13.08.2015) entire document</td> <td>1-28</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2012/138703 A1 (ATHENIX CORP. et al) 11 October 2012 (11.10.2012) entire document	26, 27	A	US 7,364,728 B2 (ASANO et al) 29 April 2008 (29.04.2008) entire document	1-28	A	ZHANG et al. "Cloning and Analysis of the First cry Gene from Bacillus popilliae," Journal of Bacteriology, 01 July 1997 (01.07.1997), Vol. 179, No. 13, Pgs. 4336-4341. entire document	1-28	A	US 2008/0019914 A1 (BINTRIM et al) 24 January 2008 (24.01.2008) entire document	1-28	A	YAMAMOTO et al. "Chapter 2.2: Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests," Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application, 2000, Pgs. 81-100. entire document	1-28	A	WO 2015/120276 A1 (PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC et al) 13 August 2015 (13.08.2015) entire document	1-28
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	WO 2012/138703 A1 (ATHENIX CORP. et al) 11 October 2012 (11.10.2012) entire document	26, 27																					
A	US 7,364,728 B2 (ASANO et al) 29 April 2008 (29.04.2008) entire document	1-28																					
A	ZHANG et al. "Cloning and Analysis of the First cry Gene from Bacillus popilliae," Journal of Bacteriology, 01 July 1997 (01.07.1997), Vol. 179, No. 13, Pgs. 4336-4341. entire document	1-28																					
A	US 2008/0019914 A1 (BINTRIM et al) 24 January 2008 (24.01.2008) entire document	1-28																					
A	YAMAMOTO et al. "Chapter 2.2: Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests," Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application, 2000, Pgs. 81-100. entire document	1-28																					
A	WO 2015/120276 A1 (PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC et al) 13 August 2015 (13.08.2015) entire document	1-28																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 24 October 2016		Date of mailing of the international search report 04 NOV 2016																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 0 1 H	6/46	(2018.01)	A 0 1 H	6/46	
A 0 1 H	6/54	(2018.01)	A 0 1 H	6/54	
A 0 1 H	6/82	(2018.01)	A 0 1 H	6/82	
A 0 1 H	6/88	(2018.01)	A 0 1 H	6/88	
A 0 1 H	6/60	(2018.01)	A 0 1 H	6/60	
A 0 1 H	6/14	(2018.01)	A 0 1 H	6/14	
C 1 2 N	15/74	(2006.01)	C 1 2 N	15/74	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/75	(2006.01)	C 1 2 N	15/75	Z
C 1 2 N	15/78	(2006.01)	C 1 2 N	15/78	Z
C 1 2 N	15/70	(2006.01)	C 1 2 N	15/74	Z
C 1 2 Q	1/6813	(2018.01)	C 1 2 N	15/70	Z
A 0 1 H	5/00	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6813	Z
A 0 1 H	5/10	(2018.01)	A 0 1 H	5/00	A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 0 1 H	5/10	
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 0 1 N	37/46	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
A 0 1 P	7/04	(2006.01)	A 0 1 N	37/46	
C 0 7 K	14/195	(2006.01)	A 0 1 P	7/04	
			C 0 7 K	14/195	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 キャサリン・エイ・チェイ
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番、メール・ゾーン・イー 1 エヌエイ

(72)発明者 トッド・エイ・シーシュ
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番、メール・ゾーン・イー 1 エヌエイ

(72)発明者 ウマ・アール・ケサナバリ
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番、メール・ゾーン・イー 1 エヌエイ

(72)発明者 ジェニファー・エル・ラック
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番、メール・ゾーン・イー 1 エヌエイ

F ターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AB03 AD04 AD08 CA17 CB02
4B063 QA01 QQ09 QQ13 QR08 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34 QX02
4H011 AC01 BB06 BB19 DH11
4H045 AA30 BA10 CA11 DA83 EA06 FA74

专利名称(译)	新型驱虫蛋白		
公开(公告)号	JP2018527930A	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2018510869	申请日	2016-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	孟山都公司		
申请(专利权)人(译)	孟山都科技有限责任公司		
[标]发明人	デイビッドジェイポーウエン キャサリンエイチエイ トッドエイシーシュ ウマアールケサナバリ ジェニファーエルラック		
发明人	デイビッド・ジェイ・ポーウエン キャサリン・エイ・チエイ トッド・エイ・シーシュ ウマ・アール・ケサナバリ ジェニファー・エル・ラック		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/82 A01H1/00 A01H6/06 A01H6/34 A01H6/46 A01H6/54 A01H6/82 A01H6/88 A01H6/60 A01H6/14 C12N15/74 C12N15/75 C12N15/78 C12N15/70 C12Q1/6813 A01H5/00 A01H5/10 G01N33/53 G01N33/543 A01N37/46 A01P7/04 C07K14/195		
CPC分类号	A01N37/46 A01N63/10 C07K14/32 C12N15/8286 C12Q1/6895 C12Q2600/13 G01N33/5308 Y02A40 /162 G01N33/68 G01N2333/415		
FI分类号	C12N15/31.ZNA C12N15/82.122.Z A01H1/00.A A01H6/06 A01H6/34 A01H6/46 A01H6/54 A01H6/82 A01H6/88 A01H6/60 A01H6/14 C12N15/74.100.Z C12N15/75.Z C12N15/78.Z C12N15/74.Z C12N15 /70.Z C12Q1/6813.Z A01H5/00.A A01H5/10 G01N33/53.D G01N33/543.501.A A01N37/46 A01P7/04 C07K14/195		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AA03 2B030/AB03 2B030/AD04 2B030/AD08 2B030/CA17 2B030/CB02 4B063 /QA01 4B063/QQ09 4B063/QQ13 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4H011/AC01 4H011/BB06 4H011/BB19 4H011/DH11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA11 4H045/DA83 4H045/EA06 4H045/FA74		
代理人(译)	佐藤 剛		
优先权	62/210737 2015-08-27 US		
其他公开文献	JP2018527930A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

表现出毒性的活性杀虫剂蛋白质中公开鳞翅目第害虫种类，如该蛋白质，TIC6757，TIC6757PL，TIC7472，TIC7472PL，TIC7473和TIC7473PL包括但不限于此。提供了包含编码一种或多种所公开的农药蛋白的重组核酸序列的DNA构建体。转基因植物对鳞翅目个寄生，植物细胞，种子和植物部分抗性，提供了转基因植物，其包含编码本发明的杀虫蛋白，植物细胞，种子和植物部分的重组核酸序列。所述生物样品中，检测本发明的重组核酸序列或蛋白质的存在的方法中，农药蛋白TIC6757，TIC6757PL，TIC7472，TIC7472PL，TIC7473，并用TIC7473PL，用于控制物种方法鳞翅目害虫第同样。

(5) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	Z N A	2 B O 3 O
C 1 2 N	15/82	(2006.01)	C 1 2 N	15/82	1 2 2 Z	4 B O 6 3
A O 1 H	1/00	(2006.01)	A O 1 H	1/00	A	4 H O 1 1
A O 1 H	6/06	(2018.01)	A O 1 H	6/06		4 H O 4 5
A O 1 H	6/34	(2018.01)	A O 1 H	6/34		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-510869 (P2018-510869)	(71) 出願人	501231613
(86) (22) 出願日	平成28年8月25日 (2016.8.25)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月22日 (2018.3.22)		アメリカ合衆国 G 3 1 6 7 ミズーリ州セン
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/048714		トルイス、ノース・リンドバーグ・プー
(87) 国際公開番号	W02017/035364		バード 8 O 0 番、メール・ゾーン・イー 1
(87) 国際公開日	平成29年3月2日 (2017.3.2)		エヌエイ
(31) 優先権主張番号	62/210, 737	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成27年8月27日 (2015.8.27)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100156122
			弁理士 佐藤 剛
		(72) 発明者	デイビッド・ジェイ・ポーウェン
			アメリカ合衆国 G 3 1 6 7 ミズーリ州セン
			トルイス、ノース・リンドバーグ・プー
			バード 8 O 0 番、メール・ゾーン・イー 1
			エヌエイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規防虫タンパク質