

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6933641号  
(P6933641)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月23日(2021.8.23)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N 15/32 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/32 Z N A
<b>C O 7 K 14/325 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/325
<b>A O 1 H 5/00 (2018.01)</b>	A O 1 H 5/00 A
<b>A O 1 H 6/46 (2018.01)</b>	A O 1 H 6/46
<b>A O 1 H 6/54 (2018.01)</b>	A O 1 H 6/54

請求項の数 31 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-504868 (P2018-504868)	(73) 特許権者	501231613
(86) (22) 出願日	平成28年7月27日(2016.7.27)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(65) 公表番号	特表2018-525987 (P2018-525987A)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン
(43) 公表日	平成30年9月13日(2018.9.13)		トルイス、ノース・リンドバーグ・プール
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/044296		バード800番、メール・ゾーン・イー1
(87) 国際公開番号	W02017/019787		エヌエイ
(87) 国際公開日	平成29年2月2日(2017.2.2)	(74) 代理人	100114188
審査請求日	令和1年6月17日(2019.6.17)		弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	62/199,024	(74) 代理人	100119253
(32) 優先日	平成27年7月30日(2015.7.30)		弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
		(74) 代理人	100129713
			弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の昆虫阻害タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

殺虫性タンパク質またはその殺虫性断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに操作可能に連結される異種プロモータを含む組換え核酸分子であって、

- (a) 前記殺虫性タンパク質が配列番号2のアミノ酸配列を含み；または
- (b) 前記殺虫性タンパク質が配列番号2に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；または
- (c) 前記ポリヌクレオチドセグメントが配列番号1もしくは配列番号3のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成する、前記組換え核酸分子。

【請求項2】

(a) 前記組換え核酸分子が植物にて前記殺虫性タンパク質を発現するように機能する配列を含む；または

(b) 前記組換え核酸分子が植物細胞で発現されて殺虫剤として有効な量の前記殺虫性タンパク質を産生する；または

(c) 前記組換え核酸分子がベクターとの操作可能な連結にあり、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、及び細菌のまたは酵母の人工染色体から成る群から選択される請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項3】

宿主細胞内に存在すると定義され、前記宿主細胞が細菌細胞及び植物細胞から成る群か

ら選択される請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 4】

前記細菌宿主細胞が、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea*、及び *Erwinia* から成る群から選択される細菌の属に由来する請求項 3 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 5】

前記 *Bacillus* の種が *Bacillus cereus* もしくは *Bacillus thuringiensis* であり、前記 *Brevibacillus* が *Brevibacillus laterosperus* であり、または前記 *Escherichia* が *Escherichia coli* である請求項 4 に記載の組換え核酸分子。

10

【請求項 6】

前記植物細胞が、双子葉植物または単子葉植物の細胞である請求項 3 に記載の組換え核酸分子。

【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、キャベツ、ブラッシア、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、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、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、セイヨウネギ、レタス、テーダマツ、キビ、メロン、ナッツ、カラスムギ、オリーブ、タマネギ、観葉植物、パーム、牧草、マメ、ピーナッツ、コショウ、キマメ、パイン、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、コメ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、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、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞から成る群から選択される請求項 6 に記載の組換え核酸分子。

20

【請求項 8】

前記殺虫性タンパク質が鞘翅目の昆虫に対して活性を示す請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 9】

前記昆虫が、ウエスタンコーンルートワーム、サザンコーンルートワーム、ノーザンコーンルートワーム、メキシココーンルートワーム、ブラジルコーンルートワーム、または *Diabrotica viridula* と *Diabrotica speciosa* とから成るブラジルコーンルートワーム複合体である請求項 8 に記載の組換え核酸分子。

30

【請求項 10】

前記殺虫性タンパク質が鱗翅目の昆虫種に対して活性を示す請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 11】

前記昆虫が、ハッシュョウマメ毛虫、サトウキビ害虫、メイガ科のガの幼虫、アメリカタバコガの幼虫、ニセアメリカタバコガ、ダイズシャクトリムシ、クロアワヨトウの幼虫、サザンアワヨトウの幼虫、ツマジロクサヨトウの幼虫、シロイチモンジヨトウ、旧大陸ワタアカミムシガ、東洋リーフワーム、ピンクワタアカミムシガ、クロヨトウムシ、サウスウエスタンマツマダラメイガ、またはヨーロッパマツマダラメイガである請求項 10 に記載の組換え核酸分子。

40

【請求項 12】

前記殺虫性タンパク質が半翅目の昆虫に対して活性を示す請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 13】

前記昆虫が、ウエスタンミドリメクラガメ、ミドリメクラガメまたはワタノミハムシである請求項 12 に記載の組換え核酸分子。

50

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含む植物またはその一部。

## 【請求項 15】

前記植物が単子葉植物または双子葉植物である請求項 14 に記載の植物またはその一部。

## 【請求項 16】

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、キャベツ、ブラッシア、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、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、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、セイヨウネギ、レタス、  
10  
テダマツ、キビ、メロン、ナッツ、カラスムギ、オリーブ、タマネギ、観葉植物、パーム、牧草、マメ、ピーナッツ、コショウ、キマメ、パイン、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、コメ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、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、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ及びコムギから成る群から選択される請求項 14 に記載の植物またはその一部。

## 【請求項 17】

請求項 14 に記載の植物の種子であって、前記種子が前記組換え核酸分子を含む、前記種子。  
20

## 【請求項 18】

請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含む昆虫阻害組成物。

## 【請求項 19】

さらに、前記殺虫性タンパク質とは異なる少なくとも 1 つの他の殺虫剤をコードするヌクレオチド配列を含む請求項 18 に記載の昆虫阻害組成物。

## 【請求項 20】

前記少なくとも 1 つの他の殺虫剤が、昆虫阻害タンパク質、昆虫阻害 dsRNA 及び補助タンパク質から成る群から選択される請求項 19 に記載の昆虫阻害組成物。

## 【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの他の殺虫剤が、鱗翅目、鞘翅目または半翅目の 1 以上の害虫種に対して活性を示す請求項 19 に記載の昆虫阻害組成物。  
30

## 【請求項 22】

前記少なくとも 1 つの他の殺虫性タンパク質が、Cry1A、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B、Cry1C、Cry1C変異体、Cry1D、Cry1E、Cry1F、Cry1A/Fキメラ、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry2A、Cry2Ab、Cry2Ae、Cry3、Cry3A変異体、Cry3B、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry34、Cry35、Cry43A、Cry43B、Cry51Aa1、ET29、ET33、ET34、ET35、ET66、ET70、TIC400、TIC407、TIC417、TIC431、TIC800、TIC807、TIC834、TIC853、TIC900、TIC901、TIC1201、TIC1415、TIC2160、TIC3131、TIC836、TIC860、TIC867、TIC869、TIC1100、VIP3A、VIP3B、VIP3Ab、AXMI-AXMI-、AXMI-88、AXMI-97、AXMI-102、AXMI-112、AXMI-117、AXMI-100、AXMI-115、AXMI-113、及びAXMI-005、AXMI134、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、AXM  
40  
50

I - 3 3 5、A X M I - R 1 及びその変異体、I P 3 及びその変異体、D I G - 3、D I G - 5、D I G - 1 0、D I G - 6 5 7 及び D I G - 1 1 タンパク質から成る群から選択される請求項 2 1 に記載の昆虫阻害組成物。

【請求項 2 3】

前記組換え核酸分子を発現する植物細胞を含むと定義される請求項 1 8 に記載の昆虫阻害組成物。

【請求項 2 4】

請求項 1 4 に記載の植物またはその一部から製造される商品生産物であって、前記商品生産物が検出可能な量の前記組換え核酸分子またはそれによってコードされる殺虫性タンパク質を含む、前記商品生産物。

10

【請求項 2 5】

穀類取扱業者によって袋詰めにされる商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、トウモロコシ粉、コーンミール、コーンシロップ、コーン油、サイレージ用トウモロコシ、コーンスターチ、コーンシリアル、その全体または加工された綿実、綿油、リント布、種子及び飼料または食糧、繊維、紙、バイオマスのために加工される植物の一部、及び綿油または綿繰り機廃棄物に由来するペレットに由来する燃料のような燃料製品、その全体または加工されたダイズ種子、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、ダイズ糠、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズを含む動物飼料、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、及びダイズ植物やダイズ植物の一部を用いて生産される燃料製品から成る群から選択される請求項 2 4 に記載の商品生産物。

20

【請求項 2 6】

種子の生産方法であって、

( a ) 請求項 1 7 に記載の少なくとも第 1 の種子を植え付けることと、

( b ) 前記種子に由来する植物を生育させることと、

( c ) 前記植物から種子を収穫することとを含み、その際、前記収穫された種子が前記組換え核酸分子を含む、前記生産方法。

【請求項 2 7】

昆虫の侵襲に対して抵抗性である植物であって、前記植物の細胞が請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含む、前記植物。

30

【請求項 2 8】

鞘翅目または鱗翅目または半翅目の種の害虫または害虫の侵襲の防除方法であって、前記方法が、

( a ) 殺昆虫剤として有効な量の配列番号 2 で示される アミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質に前記害虫を接触させること、または

( b ) 殺昆虫剤として有効な量の、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む 1 以上の殺虫性タンパク質に前記害虫を接触させることを含む、前記防除方法。

【請求項 2 9】

植物のゲノム DNA を含む試料にて請求項 1 に記載の組換え核酸分子の存在を検出する方法であって、

40

( a ) 請求項 1 に記載の DNA 分子を含む植物に由来するゲノム DNA とストリンジェントなハイブリッド形成条件下にてハイブリッド形成するが、請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含まない別の同系植物のゲノム DNA とはそのようなハイブリッド形成条件下ではハイブリッド形成しない核酸プローブに前記試料を接触させ、その際、前記プローブは、配列番号 1、配列番号 3 と相同性もしくは相補性である、または配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質をコードする配列であることと、

( b ) 前記試料とプローブとをストリンジェントなハイブリッド形成条件に供することと、

50

(c) 前記プローブの前記試料におけるDNAとのハイブリッド形成を検出することを含む、前記方法。

【請求項30】

タンパク質を含む試料にて殺虫性タンパク質またはその断片の存在を検出する方法であって、前記殺虫性タンパク質が配列番号2のアミノ酸配列を含み；または前記殺虫性タンパク質が配列番号2に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；

(a) 前記試料を免疫反応性の抗体に接触させることと、

(b) 前記タンパク質の前記存在を検出することを含む、前記方法。

【請求項31】

検出がELISAまたはウエスタンブロットを含む請求項30に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への参照

本出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる2015年7月30日に  
出願された米国仮特許出願番号62/199,024の利益を主張する。

【0002】

配列表の組み込み

配列表のコンピュータ可読形態を含有する「MONS394WO - sequence\_ 20  
listing.txt」と名付けたファイルを2016年7月19日に作製した。この  
ファイルは16,077バイト(MS-Windows(登録商標)で測定した)であり  
、電子出願(米国特許局EFS-Web出願システムを用いて)によって同時に  
出願され、その全体が参照によって本明細書に組み入れられている。

【0003】

発明の分野

本発明は一般に昆虫阻害タンパク質の分野に関する。作物及び種子の農業に関連する害虫  
に対する昆虫阻害活性を示す新規クラスのタンパク質が開示される。特に、開示されて  
いるタンパク質は、作物及び種子の農業に関連する害虫、昆虫害虫の特に鞘翅目、鱗翅目  
及び半翅目の種に対して殺虫剤としての活性がある。開示されている毒素タンパク質の1 30  
以上をコードする組換えポリヌクレオチド構築物を含有する植物、植物の一部及び種子が  
提供される。

【背景技術】

【0004】

数ある中でもトウモロコシ、ダイズ、サトウキビ、コメ、コムギ、野菜及び綿を含む農  
業上意義のある植物からの作物収量を改善することはますます重要になってきている。増  
え続ける人口を養い、衣類を着せ、エネルギーを供給するための農業生産物に対する増え  
続けるニーズに加えて、気候関連の影響及び農作業のため以外の土地を使用する増え続け  
る集団からの圧力は、農業に利用できる耕作可能な土地の量を減らすと予測されている。  
これらの因子は、特に植物バイオテクノロジー及び農学の実践における主要な改善がない 40  
状況で食糧安全保障の厳しい予想をもたらしている。これらの圧力を踏まえると、技術、  
農業技法及び害虫管理における環境的に持続可能な改善は農業に利用できる限られた量の  
耕作可能な土地で作物生産を拡大するために欠かせないツールである。

【0005】

昆虫、特に鱗翅目、鞘翅目及び半翅目の範囲内の昆虫は、農作物の損傷の主要な原因  
と見なされ、それによって被害領域にわたって作物収量が低下する。農業に悪い影響を与  
える鱗翅目の害虫種には、*Helicoverpa zea*、*Ostrinia nub  
ilalis*、*Diatraea saccharalis*、*Diatraea gra  
ndiosella*、*Anticarsia gemmatalis*、*Spodopte  
ra frugiperda*、*Spodoptera exigua*、*Agrotis* 50

10

20

30

40

50

*ipsilon*、*Trichoplusia ni*、*Chrysodeixis includens*、*Heliothis virescens*、*Plutella xylostella*、*Pectinophora gossypiella*、*Helicoverpa armigera*、*Elasmopalpus lignosellus*、*Striacosta albicosta*及び*Phyllocnistis citrella*が挙げられるが、これらに限定されない。農業に悪い影響を与える鞘翅目の害虫種には、*Agriotes* spp.、*Anthonomus* spp.、*Atomaria linearis*、*Chaetocnema tibialis*、*Cosmopolites* spp.、*Curculio* spp.、*Dermestes* spp.、*Diabrotica* spp.、*Epilachna* spp.、*Eremnus* spp.、*Leptinotarsa decemlineata*、*Lissorhopterus* spp.、*Melolontha* spp.、*Oryzaephilus* spp.、*Otiorynchus* spp.、*Phlyctinus* spp.、*Popillia* spp.、*Psylliodes* spp.、*Rhizopertha* spp.、*Scarabeidae*、*Sitophilus* spp.、*Sitotroga* spp.、*Tenebrio* spp.、*Tribolium* spp.及び*Trogoderma* sppが挙げられるが、これらに限定されず、特にその際、害虫は、*Diabrotica virgifera virgifera* (ウエスタンコーンルートワーム、WCR)、*Diabrotica barberi* (ノーザンコーンルートワーム、NCR)、*Diabrotica virgifera zea* (メキシココーンルートワーム、MCR)、*Diabrotica balteata* (ブラジルコーンルートワーム (BZR))、*Diabrotica undecimpunctata howardii* (サザンルートワーム、SCR)、及び*Diabrotica viridula*及び*Diabrotica speciosa*から成るブラジルルートワーム複合体 (BCR))である。農業に悪い影響を与える半翅目の害虫種には、*Lygus hesperus*、*Lygus lineolaris*及び*Pseudatomoscelis seriatus*が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0006】

歴史的には、農業における害虫駆除剤として合成化学殺虫剤の広範な適用が当てにされていた。出現している耐性の問題に加えて環境及びヒトの健康に関する懸念が生物学的殺虫剤の研究と開発のきっかけとなった。この研究尽力によって細菌を含む種々の昆虫病原性微生物種の漸進的な発見及び使用がもたらされた。

#### 【0007】

昆虫病原性細菌、特に*Bacillus*属に属する細菌の潜在力が発見され、生物学的害虫駆除剤として開発されると、生物防除の枠組みが変わった。細菌*Bacillus thuringiensis* (Bt)株が特定の昆虫に対して高い毒性を示すことが発見されて以来、細菌Btの株は殺虫性タンパク質の供給源として用いられている。Bt株は、孢子形成の開始時及び増殖の定常期の間副孢子結晶封入体の中に位置する(たとえば、Cryタンパク質) エンドトキシンを産生することが知られ、及び分泌される殺昆虫性タンパク質を産生することも知られている。受容昆虫による摂取の際、エンドトキシンは分泌された毒素と同様に中腸上皮の表面にてその効果を発揮し、細胞膜を破り、細胞の破壊と細胞死をもたらす。殺昆虫性タンパク質をコードする遺伝子は、他の*Bacillus*及びたとえば、*Brevibacillus laterosporus*、*Lysinibacillus sphaericus* (以前は*Bacillus sphaericus*として知られた「Ls」)及び*Paenibacillus popilliae*のような多様な追加の細菌種を含む、Bt以外の細菌種でも特定されている。

#### 【0008】

結晶性及び分泌される可溶性の殺昆虫性毒素はその宿主に高度に特異的であり、化学殺虫剤の代替物として世界中で広く受け入れられている。たとえば、種々の農業応用にて殺昆虫性毒素タンパク質を採用して昆虫の侵襲から農業上重要な植物を保護し、化学殺虫剤

の適用の必要性を減らし、収量を高めている。殺昆虫性毒素タンパク質を用いて、たとえば、種々の細菌株を含有する微生物製剤を植物表面に分散させる噴霧のような機械的な方法によって、及び殺昆虫性毒素タンパク質を発現しているトランスジェニック植物や種子を作出する遺伝的形質転換法を使用することによって、作物の農業上関連する害虫を防除する。

#### 【0009】

殺昆虫性毒素タンパク質を発現しているトランスジェニック植物の使用は世界中で適応している。たとえば、2012年では、26,100,000ヘクタールにBt毒素を発現してい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)。昆虫から保護されるトランスジェニック作物の世界的な使用とこれらの作物で使用される限られた数の殺昆虫性毒素タンパク質とが、現在利用されている殺昆虫性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ついて選択圧を作り出している。

10

#### 【0010】

殺昆虫性毒素タンパク質に対する標的害虫における耐性の発生は、殺昆虫性毒素タンパク質を発現しているトランスジェニック作物に対する昆虫の耐性の上昇を管理するのに有用である新しい形態の殺昆虫性毒素タンパク質の発見及び開発のための連続する必要性を作り出している。改善された有効性を持ち、受容昆虫種の広いスペクトルにわたって防除を示す新しいタンパク質毒素は耐性対立遺伝子を発生することができる生き延びる昆虫の数を減らすであろう。加えて、1つの植物での同じ昆虫害虫に対して毒性であり、異なる作用様式を示す2以上のトランスジェニック殺昆虫性毒素タンパク質の使用は単一の標的昆虫種における耐性の可能性を低くする。

20

#### 【0011】

従って、本発明者らは本明細書にて、標的の鱗翅目、鞘翅目及び半翅目の害虫種に対して、特にウエスタンコーンルートワームに対して殺昆虫活性を示す、*Bacillus thuringiensis*に由来する新規のタンパク質毒素ファミリーと共に類似の毒素タンパク質、変異タンパク質、及び例となる組換えタンパク質を開示する。

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

本明細書で開示されているのは、本明細書ではTIC5290と呼ばれ、作物の1以上の害虫に対して阻害活性を呈することが示されている昆虫阻害活性を持つ殺虫性タンパク質(毒素タンパク質)の新規の群である。TIC5290タンパク質及びTIC5290タンパク質毒素のクラスにおけるタンパク質は単独で使用することができ、または製剤及び植物内で他の殺昆虫性タンパク質及び毒物との併用で使用することができるので、農業系で現在使用されている殺昆虫性タンパク質及び殺虫性化学物質の代替物を提供する。

30

#### 【0013】

一実施形態では、本出願で開示されているのは、殺虫性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操作可能に連結される異種プロモータを含む組換え核酸分子であり、その際、(a)前記殺虫性タンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を含む；または(b)前記殺虫性タンパク質は配列番号2に対して少なくとも65%または70%または75%または80%または85%または90%または95%または98%または99%または約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または(c)前記ポリヌクレオチドセグメントは配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとハイブリッド形成する；または(d)殺虫性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は配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも65%または70%または75%または80%または85%または90%または95%または98%または99%または約100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む；または(e)前記組換え核酸分子はベクターとの操作可能な結合にあり、前記ベクターはプラスミド、ファージミド、バクミド、

40

50

コスミド及び細菌または酵母の人工染色体から成る群から選択される。組換え核酸分子は、植物にて殺虫性タンパク質を発現するように機能する；または植物細胞で発現させて殺虫剤として有効な量の殺虫性タンパク質を産生する配列を含むことができる。

【0014】

本出願の別の実施形態では、宿主細胞は本出願の組換え核酸分子を含み、その際、該宿主細胞は細菌細胞及び植物細胞から成る群から選択される。熟考される宿主細胞には、*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*または*Bacillus thuringiensis*であり、前記*Brevibacillus*は*Brevibacillus laterosperus*であり、または前記*Escherichia*は*Escherichia coli*である。熟考される植物宿主細胞には、双子葉植物細胞及び単子葉植物細胞が挙げられる。さらに熟考される植物宿主細胞には、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリ、キャベツ、ブラッシア、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、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* sp.)、ウリ、キュウリ、ペイマツ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、セイヨウネギ、レタス、テーダマツ、キビ、メロン、ナッツ、カラスムギ、オリーブ、タマネギ、観葉植物、パーム、牧草、マメ、ピーナッツ、コショウ、キマメ、パイン、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、コメ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、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、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞が挙げられる。

【0015】

さらに別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、ウエスタンコーンルートワーム、サザンコーンルートワーム、ノーザンコーンルートワーム、メキシココーンルートワーム、ブラジルコーンルートワーム、または*Diabrotica viridula*と*Diabrotica speciosa*とから成るブラジルコーンルートワーム複合体を含む鞘翅目昆虫に対する活性を示す。

【0016】

別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、ハッシュョウマメ毛虫、サトウキビ害虫、メイガ科のガの幼虫、アメリカタバコガの幼虫、ニセアメリカタバコガ、ダイズシャクトリムシ、クロアワヨトウの幼虫、サザンアワヨトウの幼虫、ツマジロクサヨトウの幼虫、シロイチモンジヨトウ、旧大陸ワタアカミムシガ、東洋リーフワーム、ピンクワタアカミムシガ、クロヨトウムシ、サウスウエスタンマツダラメイガ、コナガ、またはヨーロッパマツダラメイガを含む鱗翅目昆虫に対して活性を示す。

【0017】

さらに別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、ウエスタンサビイロメクラガメ、サビイロメクラガメ、またはワタノミハムシを含む半翅目昆虫に対して活性を示す。

【0018】

本出願で熟考されるのはまた、殺虫性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操作可能に連結される異種プロモータを含む組換え核酸分子を含む植物であり、その際、(a) 前記殺虫性タンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を含み；または(b) 前記殺虫性タンパク質は配列番号2に対して少なくとも65%または70%または75%または80%または85%または90%または95%または98%または99%または約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；または(c) 前記ポリヌクレオチドセグメントはストリンジェントなハイブリッド形成条件下で配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリッド形成し；または(d) 前記植物は検出可能な量の前記殺虫性タンパク質を提示する。特定の実施形態では、殺虫

10

20

30

40

50

性タンパク質は配列番号2を含む。一実施形態では、植物は単子葉植物または双子葉植物のいずれかである。別の実施形態では、植物は、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリ、キャベツ、ブラッシア、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、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、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、セイヨウネギ、レタス、テーダマツ、キビ、メロン、ナッツ、カラスムギ、オリーブ、タマネギ、観葉植物、パーム、牧草、マメ、ピーナッツ、コショウ、キマメ、パイン、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、コメ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、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、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ及びコムギから成る群から選択される。

10

## 【0019】

さらなる実施形態では、組換え核酸分子を含む種子が開示される。

## 【0020】

別の実施形態では、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む昆虫阻害組成物が熟考される。昆虫阻害組成物はさらに、前記殺虫性タンパク質とは異なる少なくとも1つの他の殺虫剤をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。少なくとも1つの他の殺虫剤は、昆虫阻害タンパク質、昆虫阻害 dsRNA 分子及び補助タンパク質から成る群から選択される。昆虫阻害組成物における少なくとも1つの他の殺虫剤は鱗翅目、鞘翅目または半翅目の1以上の害虫種に対して活性を示す。昆虫阻害組成物における少なくとも1つの他の殺虫剤は一実施形態では、Cry1A、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B、Cry1C、Cry1C変異体、Cry1D、Cry1E、Cry1F、Cry1A/Fキメラ、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry2A、Cry2Ab、Cry2Ae、Cry3、Cry3A変異体、Cry3B、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry34、Cry35、Cry43A、Cry43B、Cry51Aa1、ET29、ET33、ET34、ET35、ET66、ET70、TIC400、TIC407、TIC417、TIC431、TIC800、TIC807、TIC834、TIC853、TIC900、TIC901、TIC1201、TIC1415、TIC2160、TIC3131、TIC836、TIC860、TIC867、TIC869、TIC1100、VIP3A、VIP3B、VIP3Ab、AXMI-AXMI-、AXMI-88、AXMI-97、AXMI-102、AXMI-112、AXMI-117、AXMI-100、AXMI-115、AXMI-113、及びAXMI-005、AXMI134、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及びその変異体、IP3及びその変異体、DIG-3、DIG-5、DIG-10、DIG-657及びDIG-11タンパク質から成る群から選択される。

20

30

40

## 【0021】

本出願で開示されている検出可能な量の組換え核酸分子を含む商品生産物が熟考される。そのような商品生産物には、穀類取扱業者によって袋詰めにされる商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、トウモロコシ粉、コーンミール、コーンシロップ、コーン油、サイレージ用トウモロコシ、コーンスターチ、コーンシリアル、等、及びたとえば、その全体または加工された綿実、綿油、リント布、種子及び飼料または食糧、繊維、紙、バイオマスのために加工される植物の一部、及び綿油または綿繰り機廃棄物に由来するペレットに由来する燃料のような燃料製品のような相当する綿の商品生産物、及びたとえば、その全体または加工されたダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール

50

、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズ糠、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズを含む動物飼料、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、及びダイズ植物やダイズ植物の一部を用いて生産される燃料製品のような相当するダイズの商品生産物、及び相当するコメ、コムギ、ソルガム、キマメ、ピーナッツ、果実、メロン、及び当てはまれば、ジュース、濃縮物、ジャム、ゼリー、マーマレードを含む野菜商品生産物、及び検出可能な量の本出願のそのようなポリヌクレオチド及びポリペプチドを含有するそのような商品生産物の他の食用形態が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

本出願で熟考されるのはまた、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む種子を生産する方法である。該方法は、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む種子の少なくとも1つを植えることと、種子に由来する植物を生育させることと、植物から種子を収穫することとを含み、その際、収穫された種子は本出願の組換え核酸分子を含む。

10

【 0 0 2 3 】

別の説明に役立つ実施形態では、昆虫侵襲に対する植物の抵抗性が提供され、その際、前記植物の細胞は、(a)殺虫剤として有効な量の配列番号2で示されるような殺虫性タンパク質をコードする組換え核酸分子；または(b)配列番号2に対して少なくとも65%もしくは70%もしくは75%もしくは80%もしくは85%もしくは90%もしくは95%もしくは約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む殺虫剤として有効な量のタンパク質を含む。

【 0 0 2 4 】

本出願で開示されているのはまた、鞘翅目または鱗翅目または半翅目の種の害虫を防除する方法及び植物、特に作物の鞘翅目または鱗翅目または半翅目の種の害虫侵襲を防除する方法である。方法は、一実施形態では、(a)殺虫剤として有効な量の配列番号2で示されるような1以上の殺虫性タンパク質に害虫を接触させること、または(b)配列番号2に対して少なくとも65%もしくは70%もしくは75%もしくは80%もしくは85%もしくは90%もしくは95%もしくは約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む殺虫剤として有効な量の1以上の殺虫性タンパク質に害虫を接触させることを含む。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書でさらに提供されるのは、殺虫性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換え核酸分子の存在を検出する方法であり、その際、(a)前記殺虫性タンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を含み；または(b)前記殺虫性タンパク質は配列番号2に対して少なくとも65%もしくは70%もしくは75%もしくは80%もしくは85%もしくは90%もしくは95%もしくは98%もしくは99%もしくは約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；または(c)前記ポリヌクレオチドセグメントは配列番号1もしくは配列番号3のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとハイブリッド形成する。本発明の一実施形態では、方法は、本明細書で提供されている殺虫性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のゲノムDNAとストリンジентなハイブリッド形成条件下にてハイブリッド形成するが、そのセグメントを含まない別の同系植物のゲノムDNAとはそのようなハイブリッド形成条件下ではハイブリッド形成しない核酸プローブに核酸の試料を接触させることを含み、その際、プローブは、配列番号1、配列番号3に対して相同性もしくは相補性であり、または配列番号2に対して少なくとも65%もしくは70%もしくは75%もしくは80%もしくは85%もしくは90%もしくは95%もしくは98%もしくは99%もしくは約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質をコードする配列である。方法はさらに、(a)試料とプローブとをストリンジентなハイブリッド形成条件に供することと、(b)プローブの試料におけるDNAとのハイブリッド形成を検出することとを含む。

30

40

【 0 0 2 6 】

本発明によって提供されるのはまた、タンパク質を含む試料にて殺虫性タンパク質また

50

はその断片の存在を検出する方法であり、その際、前記殺虫性タンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を含み；または前記殺虫性タンパク質は配列番号2に対して少なくとも65%もしくは70%もしくは75%もしくは80%もしくは85%もしくは90%もしくは95%もしくは98%もしくは99%もしくは約100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、方法は(a)免疫反応性の抗体に試料を接触させることと、(b)タンパク質の存在を検出することを含む。一部の実施形態では、検出する工程はELISAまたはウエスタンブロットを含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】例となる葉緑体を標的とする及び標的としないTIC5290タンパク質の植物内でのウエスタンブロット(WCR)の阻害活性を示す図である。

10

【0028】

配列の簡単な説明

配列番号1は*Bacillus thuringiensis*種EG6657から得られたTIC5290殺虫性タンパク質の配列をコードする核酸である。

【0029】

配列番号2はTIC5290タンパク質のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号3は植物細胞での発現のために使用されるTIC5290殺虫性タンパク質をコードする合成コーディング配列である。

20

【発明を実施するための形態】

【0031】

農業の害虫駆除の技術における課題は、標的害虫に対して有効であり、標的害虫種に対してスペクトルの広い毒性を示し、望ましくない農業問題を起こすことなく植物にて発現させることができ、植物で商業的に使用されている現在の毒素に比べて代替モードの作用を提供する新しい毒素タンパク質の必要性として特徴づけることができる。

【0032】

新規の殺昆虫性タンパク質が本明細書で開示され、鞘翅目、鱗翅目及び半翅目の害虫に対して、さらに詳しくはコナジラコ害虫種に対して抵抗性を提供するTIC5290及び関連するファミリーメンバーによって例示される。開示されるのはまた、TIC5290をコードする植物細胞での発現のために指定された合成コーディング配列である。さらに開示されるのは、TIC5290毒素タンパク質、または関連するファミリーメンバーまたはその断片をコードするコーディング配列への操作可能な連結にてプロモータを含む組換え核酸分子である。

30

【0033】

本出願におけるTIC5290、「TIC5290タンパク質」、「TIC5290タンパク質毒素」、「TIC5290毒素タンパク質」、「TIC5290殺虫性タンパク質」、「TIC5290-関連毒素」、または「TIC5290-関連毒素タンパク質」等への言及は、タンパク質のTIC5290との配列比較が約65~約100パーセントの分画比率のアミノ酸配列同一性を生じるのであれば、殺虫活性または昆虫阻害活性を示すそのようなタンパク質を含む、鞘翅目害虫、鱗翅目害虫及び半翅目害虫に対する活性を付与するTIC5290(配列番号2)の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質の配列及びその殺虫セグメントまたは昆虫阻害セグメントまたはそれらの組み合わせを含む、それらから成る、それらに実質的に相同である、それらに類似する、またはそれらに由来する新規の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質を指す。

40

【0034】

用語「セグメント」または「断片」は、TIC5290タンパク質または関連するファミリーメンバーの殺昆虫性タンパク質を記載する完全なアミノ酸配列または核酸配列よりも短い連続するアミノ酸配列または核酸配列を記載するのに本出願では使用される。昆虫阻害活性を示すセグメントまたは断片は、そのようなセグメントまたは断片の配列番号2

50

で示されるT I C 5 2 9 0タンパク質の対応する区分との配列比較がセグメントまたは断片とT I C 5 2 9 0タンパク質の対応する区分との間で約65～約100パーセントの分画比率のアミノ酸配列同一性を生じるのであれば、本出願でも開示される。

【0035】

用語「活性がある」または「活性」、「殺虫活性」または「殺虫性」または「殺昆虫活性」、「昆虫阻害」または「殺昆虫性」は、害虫を阻害すること（増殖、摂食、繁殖力または生存性を阻害すること）、抑制すること（増殖、摂食、繁殖力または生存性を抑制すること）、防除すること（有効量のT I C 5 2 9 0タンパク質を含有する特定の作物にて害虫の侵襲を防除すること、害虫の摂食活動を防除すること）、または害虫を殺傷すること（害虫の病的状態、死すべき運命または低下した繁殖力を引き起こすこと）におけるタンパク質毒素のような毒物の有効性を指す。これらの用語は、害虫の毒性タンパク質への曝露が病的状態、死すべき運命、低下した繁殖力または成長阻害を生じる、殺虫性剤として有効な量の毒性タンパク質を害虫に提供する結果を含むように意図される。これらの用語は、殺虫剤として有効な量の毒性タンパク質を植物内にまたは植物上に提供した結果としての、植物、植物の組織、植物の一部、種子、植物細胞からの、または植物が生育してもよい特定の地理的な位置からの害虫の撃退も含む。一般に、殺虫活性は、鱗翅目、鞘翅目または半翅目の昆虫を含むが、これらに限定されない特定の標的害虫の、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の昆虫摂食によって引き起こされる増殖、発達、生存性、摂食行動、交配行動、繁殖力を阻害すること、または有害効果における測定可能な減少にて有効である毒性タンパク質の能力を指す。毒性タンパク質は、植物によって産生され得るし、または植物に、もしくは植物が位置づけられる位置の範囲内での環境に適用され得る。用語「生物活性」、「効果的な」、「有効な」またはその変形は、本発明のタンパク質の標的昆虫害虫に対する効果を記載するのに本出願で相互交換可能に利用される用語でもある。

【0036】

殺虫剤として有効な量の毒物は、標的害虫の餌として提供されると、毒物が害虫に接触した際、殺虫活性を示す。毒物は殺虫性タンパク質または当該技術で既知の1以上の化学剤であることができる。殺虫性または殺昆虫性の化学剤及び殺虫性または殺昆虫性のタンパク質作用剤は単独で使用することができ、または互いに併用することができる。化学剤には、標的害虫にて抑制のために特定の遺伝子を標的とするd s R N A分子、有機塩化物、有機リン酸エステル、カルバメート、ピレスロイド、ネオニコチノイド、及びリアノイドが挙げられるが、これらに限定されない。殺虫性または殺昆虫性のタンパク質作用剤には、本出願で示されるタンパク質毒素と同様に鱗翅目、鞘翅目及び半翅目の害虫種を標的とするものを含む他のタンパク質様の毒物と同様に同翅目種を防除することにおいて使用するための当該技術で利用できるC r yタンパク質のような他の植物害虫を防除するのに使用されるタンパク質毒素が挙げられる。

【0037】

害虫、特に作物の害虫への言及は作物の昆虫害虫、特にT I C 5 2 9 0タンパク質によって防除されるものを意味することが意図される。しかしながら、害虫への言及はまた、これらの害虫を標的とする毒物がT I C 5 2 9 0タンパク質またはT I C 5 2 9 0に対して約65～約100パーセント同一であるタンパク質と同時局在化するまたは一緒に存在する場合、植物の同翅目昆虫害虫と同様に線虫及び真菌も含むことができる。

【0038】

T I C 5 2 9 0タンパク質毒素クラスの殺昆虫性タンパク質は共通する機能によって関連付けられ、鞘翅目に由来する昆虫害虫、及び成虫、蛹、幼虫及び子虫を含む鱗翅目昆虫種、と同様に成虫及び若虫を含む半翅目昆虫種に向けた殺昆虫活性を示す。

【0039】

鱗翅目の昆虫には、ヤガ科におけるアーミーワーム、ネキリムシ、シャクトリムシ及びタバコガ、たとえば、ツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)、シロイチモンジヨトウ(*Spodoptera exigua*)、バーサヨトウム

10

20

30

40

50

シ (*Mamestra configurata*)、サザンアーミーワーム (*Spodoptera eridania*)、クロネキリムシ (*Agrotis ipsilon*)、キャベツシャクトリムシ (*Trichoplusia ni*)、ダイズシャクトリムシ (*Pseudoplusia includens*)、ハッショウマメイモムシ (*Anticarsia gemmatalis*)、グリーンクローバーワーム (*Hypena scabra*)、ニセアメリカタバコガ (*Heliothis virescens*)、カリユネキリムシ (*Agrotis subterranea*)、アーミーワーム (*Pseudaletia unipuncta*)、ウエスタンネキリムシ (*Agrotis orthogonia*)；*Pyralidae*科に由来する穿孔虫、繭を作る昆虫、ウエブワーム、コーンワーム、キャベツムシ及び葉を食い荒らす幼虫、たとえば、ヨーロッパパマツマダラメイガ (*Ostrinia nubilalis*)、ネーブルオレンジワーム (*Amyelois transitella*)、コーンルートウエブワーム (*Crambus caliginosellus*)、芝生ウエブワーム (*Herpetogramma licarsisalis*)、ヒマワリガ (*Homoeosoma electellum*)、モロコシマダラメイガ (*Elasmopalpus lignosellus*)；*Tortricidae*科におけるハマキガ、植物の芽を貪り食う虫、シードワーム、及び果実を食害する虫、たとえば、コドリガ (*Cydia pomonella*)、グレーベリーモス (*Endopiza viteana*)、オリエンタルフルーツモス (*Grapholita molesta*)、ヒマワリ芽ガ (*Suleima helianthana*)；及び他の経済的に重要な *Lepidoptera*、たとえば、コナガ (*Plutella xylostella*)、ワタアカミムシガの幼虫 (*Pectinophora gossypiella*) 及びマイマイガ (*Lymantria dispar*) が挙げられるが、これらに限定されない。鱗翅目の他の昆虫害虫には、たとえば、コットンリーフワーム (*Alabama argillacea*)、フルーツツリーハマキムシ (*Archips argyrospila*)、ヨーロッパハマキムシ (*Archips rosana*) 及び他の *Archips* 種、(*Chilo suppressalis*、螟虫、またはミカメイガ)、コメハマキムシ (*Cnaphalocrocis medinalis*)、コーンルートウエブワーム (*Crambus caliginosellus*)、ブルーグラスウエブワーム (*Crambus teterrellus*)、サウスウエスタンマツマダラメイガ (*Diatraea grandiose* 30  
*lla*)、サトウキビ害虫 (*Diatraea saccharalis*)、ミスジアオリガ (*Earias insulana*)、オオタバコガ (*Earias vittella*)、旧大陸タバコガ (*Helicoverpa armigera*)、アメリカタバコガの幼虫 (*Helicoverpa zea*、マメヒメサヤムシガ及びコットンボールワームとしても知られる)、オオタバコガ (*Heliothis virescens*)、芝生ウエブワーム (*Herpetogramma licarsisalis*)、ヨーロッパグレーブインモス (*Lobesia botrana*)、ミカンハモグリガ (*Phyllocnistis citrella*)、大型モンシロチョウ (*Pieris brassicae*)、小型モンシロチョウ (*Pieris rapae*、輸入されたアオムシとしても知られる)、コナガ (*Plutella xylostella*)、ピートアワヨトウ (*Spodoptera exigua*)、タバコネキリムシ (*Spodoptera litura*、ケブカノメイガとしても知られる)、及びトマトハモグリバエ (*Tuta absoluta*) が挙げられる。

【0040】

鞘翅目の昆虫には、特に害虫がウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera*、WCR)、ノーザンコーンルートワーム (*Diabrotica barberi*、NCR)、メキシココーンルートワーム (*Diabrotica virgifera zea*、MCR)、ブラジルコーンルートワーム (*Diabrotica balteata*、BZR)、サザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardii*、SCR) 及びブラジルコーン 50

ルートワーム複合体 (*BCR*、*Diabrotica viridula* 及び *Diabrotica speciosa* から成る) である場合、*Agriotes spp.*、*Anthonomus spp.*、*Atomaria linearis*、*Chaetocnema tibialis*、*Cosmopolites spp.*、*Curculio spp.*、*Dermestes spp.*、*Diabrotica spp.*、*Epilachna spp.*、*Eremnus spp.*、*Leptinotarsa decemlineata*、*Lissorhopterus spp.*、*Melolontha spp.*、*Orycaephilus spp.*、*Otiorrhynchus spp.*、*Phlyctinus spp.*、*Popillia spp.*、*Psylliodes spp.*、*Rhizopertha spp.*、*Scarabeidae*、*Sitophilus spp.*、*Sitotroga spp.*、*Tenebrio spp.*、*Tribolium spp.* 及び *Trogoderma spp.* が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0041】

半翅目の昆虫には、ウエスタンサビイロメクラガメ (*Lygus hesperus*)、サビイロメクラガメ (*Lygus lineolaris*)、及びワタノミハムシ (*Pseudatomoscelis seriatus*) が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0042】

「単離されたDNA分子」または同等の用語もしくは語句への本出願での言及は、DNA分子が単独でまたは他の組成物との組み合わせで存在するが、その天然の環境の範囲内にはないものであることを意味するように意図される。たとえば、生物のゲノムのDNAの範囲内で天然に見いだされる、たとえば、コーディング配列、イントロン配列、未翻訳のリーダー配列、プロモータ配列、転写終結配列等のような核酸要素は、その要素が生物のゲノムの範囲内にあり、且つそれが天然に見いだされるゲノムの範囲内での位置である限り、「単離されている」とは見なされない。しかしながら、これらの要素のそれぞれ及びこれらの要素の下位区分は、その要素が生物のゲノムの範囲内になく、及びそれが天然に見いだされるゲノム内の位置にはないということであれば、本開示の範囲内で「単離」されることになる。同様に、殺昆虫性タンパク質またはそのタンパク質の天然に存在する殺昆虫性変異体をコードするヌクレオチド配列は、そのヌクレオチド配列が、そのタンパク質コードする配列が天然に見いだされる細菌のDNAの範囲内になかったということであれば、単離されたヌクレオチド配列であるということになる。天然に存在する殺昆虫性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では単離されていると見なされる。本開示の目的では、トランスジェニックヌクレオチド配列、すなわち、植物もしくは細菌の細胞のゲノムに挿入された、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、それが、細胞を形質転換するのに使用されたプラスミドもしくは類似の構造の中に存在してもしなくても、植物もしくは細菌のゲノム内に存在してもしなくても、または植物もしくは細菌に由来する組織、子孫、生体試料もしくは商品生産物にて検出可能な量で存在してもしなくても、単離されたヌクレオチド配列であると見なされることになる。

20

30

40

## 【0043】

本明細書でさらに記載されるように、TIC5290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1)は*Bacillus thuringiensis*株EG6657から得られたDNAで発見された。コーディング配列をクローニングし、微生物宿主細胞で発現させてバイオアッセイで使用されるタンパク質(配列番号2)を産生させた。TIC5290に最も近い毒素ホモログはVip4Aaタンパク質であり、56.9%の配列同一性であるということは、TIC5290は新規のVip4サブファミリーを表すことを示している。TIC5290の微生物宿主細胞に由来するタンパク質を用いたバイオアッセイは、鞘翅目害虫ウエスタンコーンルートワーム(*Diabrotica virgifera virgifera*、WCR); 鱗翅目種、ツマジロクサヨ

50

トウ (*Spodoptera frugiperda*, FAW)、アメリカタバコガの幼虫 (*Helicoverpa zea*, CEW)、ヨーロッパマツマダラメイガ (*Ostrinia nubilalis*)、及びコナガ (*Plutella xylostella*) ; と同様に半翅目害虫であるウエスタンサビイロメクラガメ (*Lygus hesperus*) に対して活性を実証した。

【0044】

TIC5290に関連する追加の毒素タンパク質配列は、TIC5290の天然に存在するアミノ酸配列を用いて新規の特性を持つ新規のタンパク質を作り出すことによって作り出すことができることが熟考される。TIC5290毒素タンパク質をTIC5290に類似する他のタンパク質と並べて、アミノ酸配列レベルでの差異を新規のアミノ酸配列変異体に統合し、及び変異体をコードする組換え核酸配列に対して適当な変更を行うことができる。

10

【0045】

当該技術で既知の種々の遺伝子編集法を用いてTIC5290の改善された変異体を植物内で操作することができることがさらに熟考される。ゲノム編集に使用されるそのような技法には、ZFN (ジンク・フィンガーヌクレアーゼ)、メガヌクレアーゼ、TALEN (転写活性因子様のエフェクターヌクレアーゼ)、及びCRISPR (クラスター化された、等間隔にスペーサーが入った、短い回文型のリピート) / Cas (CRISPR-関連の) システムが挙げられるが、これらに限定されない。これらのゲノム編集法を用いて植物細胞内で形質転換される毒素タンパク質のコーディング配列を異なる毒素コーディング配列に変更することができる。具体的には、これらの方法を介して毒素コーディング配列内での1以上のコドンを変更して新しいタンパク質のアミノ酸配列を操作する。或いは、コーディング配列内の断片を置換してもしくは欠失させて、または追加のDNA断片をコーディング配列に挿入して新しい毒素のコーディング配列を操作する。新しいコーディング配列は、たとえば、昆虫害虫に対する高い活性または活性スペクトルのような新しい特性を持つ毒素タンパク質をコードすることができると共に、元々の昆虫毒素タンパク質に対して耐性が発生している昆虫害虫種に対して活性を提供することができる。遺伝子編集された毒素コーディング配列を含む植物細胞は当該技術で既知の方法によって使用されて新しい毒素タンパク質を発現する植物全体を生成することができる。

20

【0046】

TIC5290タンパク質の断片またはそのタンパク質変異体は、1以上のアミノ酸をタンパク質のN末端、C末端、真ん中から欠失させる切り詰められた形態、または昆虫阻害活性を持つその組み合わせであることができる。これらの断片はTIC5290の天然に存在する変異体もしくは合成の変異体、または導出されたタンパク質変異体であることができるが、TIC5290の昆虫阻害活性を保持するべきである。

30

【0047】

TIC5290タンパク質に類似するタンパク質は、当該技術で既知の種々のコンピュータに基づいたアルゴリズムを用いて互いに比較することによって特定することができる。たとえば、TIC5290に関連するタンパク質のアミノ酸配列同一性は、これらの初期設定パラメータ：加重マトリクス：BLOSUM, ギャップ開放ペナルティ：10.0, ギャップ拡張ペナルティ：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：オン (Thompsonら、(1994), *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680) を用い、Clustal W配列比較を用いて解析することができる。アミノ酸同一性百分率はさらに、(アミノ酸同一性 / 対象タンパク質の長さ) によって乗じられた100%の積によって算出される。他の配列比較アルゴリズムも当該技術で利用可能であり、Clustal W配列比較を用いて得られるものと類似の結果を提供する。

40

【0048】

クエリタンパク質のTIC5290との配列比較がクエリタンパク質と対象タンパク質との間で約65%、66%、67%、68%、69%、70%、75%、76%、77%

50

、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 5 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 1 0 0 %のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲内での比率の分画）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも65%～約100%のアミノ酸同一性を示すのであれば、鱗翅目、鞘翅目または半翅目の昆虫種に対する昆虫阻害活性を示すそのようなタンパク質はTIC5290に関係することが意図される。

【0049】

TIC5290タンパク質は、一次構造（保存されたアミノ酸モチーフ）によって、長さ（約937アミノ酸）によって、及び他の特徴によっても関連付けることができる。バイオインフォマティクス解析は、TIC5290が孔形成タンパク質であり、標的昆虫の中腸における細胞受容体（複数可）への結合機能に関わりを持つ可能性があり、アミノ酸16～140にて検出されるPA14Pfamドメイン（PF07691）を有し、バレル型膜貫通孔の形成に寄与し得るアミノ酸186～593における二元\_toxB Pfamドメイン（PF03495）がその後続くことを示唆している。これらのPfamは双方ともタンパク質の殺昆虫活性に寄与する可能性が高い。TIC5290タンパク質毒素の特徴を表1にて報告する。

10

【表1】

表1. TIC5290タンパク質の選択された特徴

タンパク質	分子量 (ダルトンで)	アミノ酸の長さ	等電点	PH7.0での電荷	強力に塩基性(-)のアミノ酸の数	強力に酸性のアミノ酸の数	疎水性アミノ酸の数	極性アミノ酸の数
TIC5290	104962.93	937	6.7076	1.0	116	110	440	497

20

【0050】

本出願の実施例でさらに記載されているように、TIC5290をコードする組換え核酸分子の配列が植物での使用のために設計された。TIC5290タンパク質をコードする植物での使用のために設計された例となる植物用に最適化された組換え核酸分子の配列は配列番号3で示されている。

30

【0051】

これらの合成核酸分子の配列を含有する発現用のカセット及びベクターは当該技術で既知の形質転換の方法及び技法に従って構築し、トウモロコシ、ダイズ、綿または他の植物の細胞に導入することができる。たとえば、Agrobacteriumが介在する形質転換は、そのすべてが全体として参照によって本明細書に組み入れられる米国特許出願公開2009/0138985A1（ダイズ）、2008/0280361A1（ダイズ）、2009/0142837A1（トウモロコシ）、2008/0282432（綿）、2008/0256667（綿）、2003/0110531（コムギ）、2001/0042257A1（サトウダイコン）、米国特許第5,750,871号（キャノーラ）、同第7,026,528号（コムギ）、及び同第6,365,807号（コメ）、及び Arenicibia, et al. (1998), Transgenic Res. 7: 213-222（サトウキビ）に記載されている。TIC5290を発現する形質転換された植物に形質転換された細胞を再生し、形質転換された植物から得られた植物葉片を用いて鱗翅目または半翅目の害虫の幼虫の存在下で実施されるバイオアッセイを介して殺虫活性を実証することができる。鞘翅目害虫に対する殺虫活性を調べるために、以下の実施例に記載されているようなルートワームアッセイにてR<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代の形質転換された植物が使用される。

40

【0052】

従来の形質転換法に対する代替として、たとえば、導入遺伝子、発現カセット（複数可）等のようなDNA配列を、部位特異的組込みを介して植物または植物細胞のゲノムの中

50

の特定の部位または遺伝子座に挿入してもよく、または組み込んでよい。従って、本開示の組換えDNAの構築物（複数可）及び分子（複数可）は、植物または植物細胞のゲノムへの挿入のための少なくとも1つの導入遺伝子、発現カセットまたは他のDNA配列を含むドナーの鋳型配列を含んでもよい。部位特異的な組込みのためのそのようなドナーの鋳型にはさらに、挿入配列（すなわち、植物ゲノムに挿入される配列、導入遺伝子、カセット等）に隣接する1または2の相同性アームが含まれてもよい。本開示の組換えDNA構築物（複数可）はさらに、部位特異的な組込みを行うための部位特異的なヌクレアーゼ及び/または関連するタンパク質（複数可）をコードする発現カセット（複数可）を含んでもよい。これらのヌクレアーゼを発現するカセット（複数可）は、ドナーの鋳型と同じ分子もしくはベクターに存在してもよく（シスで）、または別々の分子もしくはベクターに存在してもよい（トランスで）。ゲノムDNAを切断して所望のゲノムの位置または遺伝子座で二本鎖の切断（DSB）またはニックを生じる様々なタンパク質（またはタンパク質及び/またはガイドRNAの複合体）が関与する部位特異的な組込みの幾つかの方法が当該技術で既知である。当該技術で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過程の間に、ドナーの鋳型DNAはDSBまたはニックの部位でゲノムに組み込まれるようになってもよい。ドナーの鋳型における相同性アーム（複数可）の存在は、挿入事象は非相同末端結合（NHEJ）を介して生じてもよいが、相同組換えを介した修復過程の間で植物ゲノムへの挿入配列の適合及び標的化を促進してもよい。使用されてもよい部位特異的なヌクレアーゼの例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、操作されたまたはネイティブ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（たとえば、Cas9またはCpf1）が挙げられる。RNA誘導型部位特異的なヌクレアーゼ（たとえば、Cas9またはCpf1）を用いる方法については、組換えDNA構築物（複数可）は植物ゲノムの範囲内での所望の部位にヌクレアーゼを差し向ける1以上のガイドRNAをコードする配列も含むであろう。

#### 【0053】

TIC5290をコードする組換え核酸分子組成物が熟考される。たとえば、TIC5290タンパク質は、そのタンパク質をコードするORFを持つポリヌクレオチド分子が、プロモータのような遺伝子発現要素と、構築物が意図される系にて発現に必要な他の調節性要素とに操作可能に連結されている組換えDNA構築物によって発現させることができる。非限定例には、植物でのタンパク質の発現のためのTIC5290タンパク質をコードする配列に操作可能に連結される植物で機能的なプロモータ、またはBt細菌もしくは他のBacillus種におけるタンパク質の発現のためのTIC5290タンパク質をコードする配列に操作可能に連結されるBtで機能的なプロモータが挙げられる。エンハンサ、イントロン、未翻訳リーダー、コードされるタンパク質不活化タグ（HISタグ）、転座ペプチド（すなわち、色素体輸送ペプチド、シグナルペプチド）、翻訳後修飾酵素のためのポリペプチド配列、リボソーム結合部位及びRNAi標的部位を含むが、これらに限定されない他の要素を、TIC5290タンパク質をコードする配列に操作可能に連結することができる。本明細書で提供される例となる組換えポリヌクレオチド分子には、配列番号2で示され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1及び配列番号3のようなポリヌクレオチドに操作可能に連結される異種プロモータが挙げられるが、これらに限定されない。異種プロモータはまた、色素体を標的とするTIC5290及び標的としないTIC5290をコードする合成DNAコーディング配列にも操作可能に連結することができる。本明細書で開示されているタンパク質をコードする組換え核酸分子のコドンは同義のコドンによって置換することができる（サイレント置換として当該技術で既知である）。

#### 【0054】

TIC5290タンパク質をコードする配列を含む組換えDNA構築物はさらに、TIC5290タンパク質、TIC5290タンパク質とは異なるタンパク質、昆虫阻害dsRNA分子または補助タンパク質をコードするDNA配列に付随して発現するようにまた

10

20

30

40

50

は同時発現するように構成することができる1以上の昆虫阻害剤をコードするDNAの領域を含むことができる。補助タンパク質には、たとえば、その発現を助けること、植物におけるその安定性に影響を与えること、オリゴマー形成のための自由エネルギーを最適化すること、その毒性を増強すること、及び活性のそのスペクトルを増やすことによって昆虫阻害剤の有効性で役立つように機能する補因子、酵素、結合相手、または他の作用物質が挙げられるが、これらに限定されない。補助タンパク質は例えば、1以上の昆虫阻害剤の取り込みを円滑にしてもよいし、または毒物の毒性効果を強化してもよい。

【0055】

タンパク質もしくはdsRNA分子のすべてが1つのプロモータから発現されるように、またはタンパク質もしくはdsRNA分子のそれぞれが別のプロモータ若しくはそれら 10  
の一部の組み合わせのもとにあるように組換えDNA構築物を組み立てることができる。本発明のタンパク質は、TIC5290が選択される発現系の種類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も含有する共通するヌクレオチドセグメントから発現される多重遺伝子発現系から発現させることができる。たとえば、植物の多重遺伝子発現系は単一のプロモータを利用して単一のオペロン内からの多重連結された/直列のオープンリーディングフレームの発現を推進することができる。別の例では、植物の多重遺伝子発現系は、それぞれ異なるタンパク質または1以上のdsRNA分子のような他の作用物質を発現させる多重で連結させない発現カセットを利用することができる。

【0056】

TIC5290タンパク質をコードする配列を含む組換え核酸分子または組換えDNA 20  
構築物はベクター、たとえば、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することができる。そのようなベクターを用いて宿主細胞におけるTIC5290タンパク質をコードする配列の安定なもしくは一時的な発現、またはコードされるポリペプチドのその後の発現を達成することができる。TIC5290タンパク質をコードする配列を含み、宿主細胞に導入される外来性の組換えポリヌクレオチドまたは組換えDNA構築物は本明細書では「導入遺伝子」と呼ばれる。

【0057】

TIC5290タンパク質をコードする配列の1以上を発現する組換えポリヌクレオチドを含有する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 30  
植物及びトランスジェニック植物の一部が本明細書で提供される。用語「細菌細胞」または「細菌」には、Agrobacterium、Bacillus、Escherichia、Salmonella、Pseudomonas、またはRhizobiumの細胞が含まれ得るが、これらに限定されない。用語「植物細胞」または「植物」には、双子葉植物の細胞または単子葉植物の細胞が含まれ得るが、これらに限定されない。熟考される植物及び植物細胞には、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリ、キャベツ、ブラッシア、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、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、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、セイヨウネギ、レタス、テーダマツ、キビ、メロン、ナッツ、カラスムギ、オリーブ、タマネギ、観 40  
葉植物、パーム、牧草、マメ、ピーナッツ、コショウ、キマメ、パイン、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、コメ、根茎、ライムギ、ベニバナ、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、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、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ及びコムギの植物細胞または植物が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、トランスジェニック植物及びトランスジェニック植物細胞から再生されたトランスジェニック植物の一部が提供される。特定の実施形態では、トランスジェニック植物は、トランスジェニック種子から得ることができ、植物から一部を切断する、折取る、粉碎するまたはさもなければ切り離すことによって得ることができる。特定の実施形態では、植物の一部は、種子、丸莢、葉 50

、花、茎、根、またはそれらの一部、またはトランスジェニック植物の一部の再生できない部分であることができる。この文脈で使用されるとき、トランスジェニック植物の一部の「再生できない」部分は、植物全体を形成するように誘導できない、または有性生殖及び/または無性生殖が可能である植物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、植物の一部の再生できない部分は、トランスジェニックの種子、丸莢、葉、花、茎、または根の一部である。

【 0 0 5 8 】

鞘翅目または鱗翅目または半翅目の昆虫を阻害する量の T I C 5 2 9 0 タンパク質を含むトランスジェニック植物を作製する方法が提供される。そのような植物は、本出願で提供されている T I C 5 2 9 0 タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチドを植物細胞に導入し、鞘翅目または鱗翅目または半翅目の昆虫を阻害する量の T I C 5 2 9 0 タンパク質を発現している前記植物細胞に由来する植物を選択することによって作製することができる。植物は、再生法、種子法、花粉法または分裂組織の形質転換法によって植物細胞から導き出すことができる。植物を形質転換する方法は当該技術で既知である。

10

【 0 0 5 9 】

処理された植物生成物が検出可能な量の T I C 5 2 9 0 タンパク質、その昆虫阻害セグメントまたは断片、またはその識別部分を含む、処理された植物生成物も本明細書で開示されている。特定の実施形態では、処理された生成物は植物の一部、植物バイオマス、油、粗びき粉、糖、動物飼料、粉、薄片、糠、リント布、外皮、加工種子及び種子から成る群から選択される。特定の実施形態では、処理された生成物は再生できない。植物生成物は、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の一部に由来する商品または商業の他の製品を含むことができ、その際、商品または他の製品は、T I C 5 2 9 0 タンパク質の識別部分をコードするまたは含むヌクレオチドセグメントまたは発現された R N A またはタンパク質を検出することによって商業を介して追跡することができる。

20

【 0 0 6 0 】

T I C 5 2 9 0 タンパク質を発現している植物は、他の毒素タンパク質を発現している及び/または、たとえば、除草剤耐性遺伝子、収量またはストレス耐性の形質を付与する遺伝子等のような他のトランスジェニック形質を発現しているトランスジェニック事象と繁殖させることによって交配することができ、またはそのような形質は形質がすべて連鎖されるように単一のベクター内で組み合わせることができる。

30

【 0 0 6 1 】

実施例にてさらに記載されているように、植物にて使用するために設計された T I C 5 2 9 0 をコードする合成のまたは人工の配列が配列番号 3 で示されている。

【 0 0 6 2 】

植物細胞での発現については、T I C 5 2 9 0 タンパク質を細胞質ゾルに存在するように発現させることができ、または植物細胞の種々の細胞内小器官に対して標的化することができる。たとえば、葉緑体をタンパク質の標的にすることはトランスジェニック植物にて発現されたタンパク質のレベルの上昇を生じてもよい一方で、外れた表現型が生じるのを防ぐ。標的にすることはまたトランスジェニック事象にて害虫抵抗性の有効性での上昇も生じてもよい。標的ペプチドまたは輸送ペプチドは、核、ミトコンドリア、小胞体 ( E R )、葉緑体、アポプラスト、ペルオキシソーム及び原形質膜を含む細胞における特定の領域にタンパク質の輸送を向ける短い ( 3 ~ 7 0 のアミノ酸の長さ ) ペプチド鎖である。一部の標的ペプチドはタンパク質が輸送された後、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。葉緑体を標的にすることについては、タンパク質は 4 0 ~ 5 0 前後のアミノ酸である輸送ペプチドを含有する。葉緑体輸送ペプチドの使用の記載については、米国特許第 5 , 1 8 8 , 6 4 2 号及び同第 5 , 7 2 8 , 9 2 5 号を参照のこと。多数の葉緑体に局在するタンパク質が前駆体として核遺伝子から発現され、葉緑体輸送ペプチド ( C T P ) によって葉緑体に対して向けられる。そのような単離された葉緑体タンパク質の例には、リブロース - 1 , 5 - ビスリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット ( S S U ) に関連するもの、フェレドキシン、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、光収穫複合

40

50

体タンパク質 I 及びタンパク質 II、チオレドキシニン F、5 - エノイルピルビニルシキミ酸 - 3 - リン酸合成酵素 (EPSPS)、及び米国特許第 7, 193, 133 号に記載された輸送ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。非葉緑体タンパク質は異種 CTP とのタンパク質融合体の使用によって葉緑体に対して標的指向化されてもよく、CTP はタンパク質が葉緑体を標的にするのに十分であることが生体内及び試験管内で実証されている。たとえば、*Arabidopsis thaliana* の EPSPS CTP (CTP2) (Klee, et al., Mol. Gen. Genet. 210: 437 - 442, 1987 を参照) または *Petunia hybrida* の EPSPS CTP (CTP4) (della-Cioppa, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 6873 - 6877, 1986 を参照) のような好適な葉緑体輸送ペプチドの組み込みは、トランスジェニック植物にて葉緑体を異種の EPSPS タンパク質配列の標的にす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; 及び同第 5, 312, 910 号; 及び EP0218571; EP189707; EP508909; 及び EP924299 を参照のこと)。葉緑体を TIC5290 タンパク質の標的にすることについては、操作可能な結合にて、及び植物細胞での最適な発現のために設計されている TIC5290 毒素タンパク質をコードする合成コーディング配列に対してインフレームで 5' に葉緑体輸送ペプチドをコードする配列を配置する。

10

#### 【0063】

当該技術で既知である形質転換の方法及び技法に従って、これらの合成のまたは人工のヌクレオチド配列を含有する発現用のカセット及びベクターを構築し、トウモロコシ、綿及びダイズの植物細胞に導入することができる。TIC5290 を発現していることが観察される形質転換された植物にて形質転換された細胞が再生される。殺虫活性を調べるために、鱗翅目、鞘翅目及び半翅目の害虫の存在下でバイオアッセイを実施する。

20

#### 【0064】

たとえば、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR)、熱増幅及びハイブリッド形成のような当業者に既知の方法を用いて、TIC5290 タンパク質をコードする配列及び TIC5290 に対する実質的な比率の同一性を有する配列を特定することができる。たとえば、タンパク質 TIC5290 を用いて関連するタンパク質に特異的に結合する抗体を作製することができ、それを用いて密接に関連する他のタンパク質メンバーをスクリーニングし、見

30

#### 【0065】

さらに、熱サイクル増幅または等温増幅及びハイブリッド形成の方法を用いてクラス他のメンバーを特定するためのスクリーニング用のプローブ及びプライマーとして TIC5290 毒素タンパク質をコードするヌクレオチド配列を使用することができる。たとえば、配列番号 3 で示され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生産物に由来するデオキシリボ核酸試料における TIC5290 導入遺伝子の存在または非存在を決定することができる。オリゴヌクレオチドを採用する特定の核酸の検出方法の感度を考えると、配列番号 3 で示されるような配列に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、商品生産物の一分画だけが配列番号 3 を含有するトランスジェニック植物に由来するプールされた供給源に由来する商品生産物にて TIC5290 導入遺伝子を検出することができることが十分に理解される。そのようなオリゴヌクレオチドを用いて配列番号 3 におけるヌクレオチド配列の変異を導入することができることがさらに認識される。そのような「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の宿主細胞にて様々な昆虫阻害活性または多様な発現を示す TIC5290 のアミノ酸配列変異体の特定に有用である。

40

#### 【0066】

ヌクレオチド配列のホモログ、たとえば、ハイブリッド形成条件下にて本出願で開示されている配列のそれぞれまたはいずれかとハイブリッド形成するヌクレオチド配列によってコードされる殺昆虫性タンパク質も本発明の実施形態である。本発明はまた、第 2 のヌ

50

クレオチド配列とハイブリッド形成する第1のヌクレオチド配列を検出する方法も提供し、その際、第1のヌクレオチド配列（またはその逆相補鎖配列）は殺虫性タンパク質またはその殺虫性断片をコードし、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で第2のヌクレオチド配列とハイブリッド形成する。そのような場合、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ッド形成条件下にて配列番号1または配列番号3として提示されるヌクレオチド配列であることができる。ヌクレオチドのコーディング配列は適当なハイブリッド形成条件下にて互いにハイブリッド形成し、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他のタンパク質のいずれか1つに対して作られた抗血清と交差反応する。ストリンジェントなハイブリッド形成条件は本明細書で定義されているように、42 での少なくともハイブリッド形成と、その後の2 × S S C、0.1% S D Sによる室温での各5分間の2回の洗浄と、その後の0.5 × S S C、0.1% S D Sによる65 での各30分間の2回の洗浄を含む。さらに高い温度での洗浄は、一層さらにストリンジェントな条件、たとえば、68 でのハイブリッド形成条件と、その後の0.1% S D Sを含有する2 × S S Cにおける68 での洗浄を構成する。

10

## 【0067】

当業者は、遺伝子コードの冗長性のために多数の他の配列がT I C 5 2 9 0に関連するタンパク質をコードすることができることを認識するであろうし、これらの配列は、それらがB a c i l l u s株または植物細胞にて殺虫性タンパク質を発現するように機能する限りにおいて本発明の実施形態であるということは、多数のそのような冗長なコーディング配列はT I C 5 2 9 0をコードするネイティブのB a c i l l u sの配列とはこれらの条件ではハイブリッド形成しないであろうことを当然認識する。本出願は、T I C 5 2 9 0タンパク質をコードする配列及びT I C 5 2 9 0タンパク質をコードする配列に対して実質的な比率の同一性を有する配列を特定するための、当業者に既知のこれら及び他の特定方法の使用を熟考する。

20

## 【0068】

T I C 5 2 9 0タンパク質によって昆虫、特に鱗翅目または鞘翅目または半翅目の昆虫の作物への侵襲を防除する方法も本出願で開示されている。そのような方法は、T I C 5 2 9 0毒素タンパク質の昆虫、鞘翅目または鱗翅目または半翅目を阻害する量のタンパク質を含む植物を生育させることを含むことができる。特定の実施形態では、そのような方法はさらに、( i ) T I C 5 2 9 0毒素タンパク質を含むまたはコードする任意の組成物を植物または植物を生じる種子に適用すること、及び( i i ) T I C 5 2 9 0毒素タンパク質をコードするポリヌクレオチドによって植物または植物を生じる植物細胞を形質転換することの任意の1以上を含むことができる。一般に、T I C 5 2 9 0毒素タンパク質は組成物にて提供され、微生物にて提供され、またはトランスジェニック植物にて提供されて、鱗翅目、鞘翅目または半翅目の昆虫に対して昆虫阻害活性を付与することができることが熟考される。

30

## 【0069】

特定の実施形態では、T I C 5 2 9 0毒素タンパク質の組換え核酸分子は、T I C 5 2 9 0毒素タンパク質を発現させるのに好適な条件下でT I C 5 2 9 0毒素タンパク質を発現するように形質転換された組換えB a c i l l u sまたは任意の他の組換え細菌細胞を培養することによって調製される昆虫阻害組成物の殺虫性の有効成分である。そのような組成物は、前記組換えポリペプチドを発現している/産生しているそのような組換え細胞の培養物の乾燥、凍結乾燥、均質化、抽出、濾過、遠心分離、沈殿または濃縮によって調製することができる。そのような過程は、B a c i l l u sまたは他の昆虫病原性細菌の細胞抽出物、細胞浮遊液、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞上清、細胞濾液または細胞沈殿物を生じることができる。そのように産生された組換えポリペプチドを得ることによって、組換えポリペプチドを含む組成物は細菌細胞、細菌の孢子及び副孢子封入体を含むことができ、農業用昆虫阻害噴霧製品または餌バイオアッセイにおける昆虫阻害剤を含む種々の用途のために製剤化することができる。

40

## 【0070】

50

一実施形態では、耐性が発生する可能性を減らすために、T I C 5 2 9 0 を含む昆虫阻害組成物はさらに、同じ鱗翅目、鞘翅目または半翅目の昆虫種に対して昆虫阻害活性を示すが、T I C 5 2 9 0 毒素タンパク質とは異なる少なくとも1つの追加のポリペプチドを含むことができる。そのような組成物のために考えられる追加のポリペプチドには、昆虫阻害タンパク質及び昆虫阻害dsRNA分子が挙げられる。昆虫害虫を防御するためのそのようなリボヌクレオチド配列の使用のための一例はBaumら(米国特許公開2006/0021087 A1)に記載されている。鱗翅目害虫の防御のためのそ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(米国特許公開番号10/525,318)、Cry1C(米国特許第6,033,874号)、Cry1D、Cry1Da及びその変異体、Cry1E、Cry1F、及びCry1A/Fキメラ(米国特許第7,070,982号;同第6,962,705号;及び同第6,713,063号)、Cry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、たとえば、TIC836、TIC860、TIC867、TIC869、及びTIC1100のような、しかし、これらに限定されないCry1-型のキメラ(国際出願公開WO2016/061391(A2))、TIC2160(国際出願公開WO2016/061392(A2))、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-035、及びAXMI-045(米国特許公開2013-0117884 A1)、AXMI-52、AXMI-58、AXMI-88、AXMI-97、AXMI-102、AXMI-112、AXMI-117、AXMI-100(米国特許公開2013-0310543 A1)、AXMI-115、AXMI-113、AXMI-005(米国特許公開2013-0104259 A1)、AXMI-134(米国特許公開2013-0167264 A1)、AXMI-150(米国特許公開2010-0160231 A1)、AXMI-184(米国特許公開2010-0004176 A1)、AXMI-196、AXMI-204、AXMI-207、axmi209(米国特許公開2011-0030096 A1)、AXMI-218、AXMI-220(米国特許公開2014-0245491 A1)、AXMI-221z、AXMI-222z、AXMI-223z、AXMI-224z、AXMI-225z(米国特許公開2014-0196175 A1)、AXMI-238(米国特許公開2014-0033363 A1)、AXMI-270(米国特許公開2014-0223598 A1)、AXMI-345(米国特許公開2014-0373195 A1)、AXMI-335(国際出願公開WO2013/134523(A2))、DIG-3(米国特許公開2013-0219570 A1)、DIG-5(米国特許公開2010-0317569 A1)、DIG-11(米国特許公開2010-0319093 A1)、AfIP-1A及びその誘導体(米国特許公開2014-0033361 A1)、AfIP-1B及びその誘導体(米国特許公開2014-0033361 A1)、PIP-1APIP-1B(米国特許公開2014-0007292 A1)、PSEEN3174(米国特許公開2014-0007292 A1)、AECFG-592740(米国特許公開2014-0007292 A1)、Pput\_1063(米国特許公開2014-0007292 A1)、DIG-657(国際出願公開WO2015/195594(A2))、Pput\_1064(米国特許公開2014-0007292 A1)、GS-135及びその誘導体(米国特許公開2012-0233726 A1)、GS153及びその誘導体(米国特許公開2012-0192310 A1)、GS154及びその誘導体(米国特許公開2012-0192310 A1)、GS155及びその誘導体(米国特許公開2012-0192310 A1)、米国特許公開2012-0167259 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2012-0047606 A1にて記載されたような配列番号：2及びその

10

20

30

40

50

誘導体、米国特許公開2011-0154536 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2011-0112013 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2010-0192256 A1にて記載されたような配列番号2及び4及びその誘導体、米国特許公開2010-0077507 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2010-0077508 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2009-0313721 A1にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許公開2010-0269221 A1にて記載されたような配列番号2または4及びその誘導体、米国特許第7,772,465号(B2)にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、WO2014/008054 A2にて記載されたようなCF161\_0085及びその誘導体、米国特許公開US2008-0172762 A1、US2011-0055968 A1、及びUS2012-0117690 A1にて記載されたような鱗翅目毒性タンパク質及びそれらの誘導体；US7510878(B2)にて記載されたような配列番号2及びその誘導体、米国特許第7,812,129号(B1)にて記載されたような配列番号2及びその誘導体；等のような、しかし、これらに限定されない昆虫阻害タンパク質から成る群から選択されてもよい。

10

#### 【0071】

鞘翅目害虫の防御のためのそのような追加のポリペプチドは、Cry3Bb(米国特許第6,501,009号)、Cry1C変異体、Cry3A変異体、Cry3、Cry3B、Cry34/35、5307、AXMI134(米国特許公開2013-0167264 A1)、AXMI-184(米国特許公開2010-0004176 A1)、AXMI-205(米国特許公開2014-0298538 A1)、AXMI207(米国特許公開2013-0303440 A1)、AXMI-218、AXMI-220(米国特許公開20140245491 A1)、AXMI-221z、AXMI-223z(米国特許公開2014-0196175 A1)、AXMI-279(米国特許公開2014-0223599 A1)、AXMI-R1及びその変異体(米国特許公開2010-0197592 A1)、TIC407、TIC417、TIC431、TIC807、TIC853、TIC901、TIC1201、TIC3131、DIG-10(米国特許公開2010-0319092 A1)、eHIPS(米国特許出願公開番号2010/0017914)、IP3及びその変異体(米国特許公開2012-0210462 A1)、及びHexatoxin-Hv1a(米国特許出願公開US2014-0366227 A1)のような、しかし、これらに限定されない昆虫阻害タンパク質から成る群から選択されてもよい。

20

30

#### 【0072】

半翅目害虫の防御のためのそのような追加のポリペプチドは、TIC1415(米国特許公開2013-0097735 A1)、TIC807(米国特許第8609936号)、TIC834(米国特許公開2013-0269060 A1)、AXMI-036(米国特許公開2010-0137216 A1)、及びAXMI-171(米国特許公開2013-0055469 A1)のような、しかし、これらに限定されない半翅目で活性のあるタンパク質から成る群から選択されてもよい。鞘翅目、鱗翅目及び半翅目の昆虫害虫の防除のための追加のポリペプチドは、Neil Crickmoreによって維持されているBacillus thuringiensisの毒素命名法ウェブサイト(on the world wide web at bt nomenclature . info)にて見いだすことができる。

40

#### 【0073】

他の実施形態では、そのような組成物/製剤はさらに、本発明の他の昆虫阻害タンパク質によって阻害されない昆虫に対して昆虫阻害活性を示して得られる昆虫阻害のスペクトルを拡大する少なくとも1つの追加のポリペプチドを含むことができる。

#### 【0074】

特定の殺昆虫剤に対する耐性を発生する昆虫についての可能性は当該技術で文書にされ

50

ている。昆虫の耐性の管理戦略の1つは、異なる作用様式を介して作動する2つの異なる昆虫阻害剤を発現するトランスジェニック作物を採用することである。従って、いずれか一方の昆虫阻害剤に対して耐性を持つ昆虫は他方の昆虫阻害剤によって防除することができる。別の昆虫耐性管理戦略は、標的とされる鞘翅目または鱗翅目または半翅目の害虫種に対して保護されず、そのような保護されない植物のための避難を提供する植物の使用を採用する。特定の例の1つは、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第6,551,962号に記載されている。

#### 【0075】

種子処理、製剤での噴霧、滴下または拭き取りにおいてタンパク質と共に使用される本明細書で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ために設計される局所に適用される殺虫化学物質のような他の実施形態は、土壌に直接適用することができ(土壌水浸し)、本明細書で開示されているタンパク質を発現する植物を生育させることに適用することができ、または開示されているタンパク質の1以上をコードする1以上の導入遺伝子を含有する種子に適用されるように製剤化することができる。種子処理で使用するためのそのような製剤は当該技術で既知の種々の粘着剤及び粘着付与剤と共に適用することができる。そのような製剤は作用様式での開示されているタンパク質との相乗効果がある殺虫剤を含有することができるので、製剤殺虫剤は異なる作用様式を介して作用して、開示されているタンパク質によって防除することができる同じまたは類似の害虫を防除する、またはそのような殺虫剤は、TIC5290殺虫性タンパク質によって効果的に防除されない広い宿主範囲もしくは植物害虫種の範囲内で作用して害虫を防除する。

#### 【0076】

前述の組成物/製剤はさらに、農業上許容できるキャリア、たとえば、餌、粉末、細粉、ペレット、顆粒、スプレー、エマルジョン、コロイド状懸濁液、水溶液、*Bacillus*の孢子/結晶調製物、種子処理、タンパク質の1以上を発現するように形質転換された組換えの植物細胞/植物組織/種子/植物、またはタンパク質の1以上を発現するように形質転換された細菌を含むことができる。組換えポリペプチドにおける固有の昆虫阻害または殺昆虫性の阻害のレベル、及び植物または食餌アッセイに適用される製剤のレベルに応じて、組成物/製剤は種々の重量による量の組換えポリペプチド、たとえば、0.0001重量%~0.001重量%~0.01重量%~1重量%~99重量%の組換えポリペプチドを含むことができる。

#### 【実施例】

#### 【0077】

前述を考慮して、当業者は開示されている特定の態様にて変更を行うことができ、それが本発明の精神及び範囲から逸脱することなく類似のまたは同様の結果を依然として得ることを十分に理解するべきである。従って、本明細書で開示されている特定の構造的な及び機能的な詳細は限定として解釈されるべきではない。本明細書で引用されている各参考文献の開示全体が本出願の開示の中に組み入れられることが理解されるべきである。

#### 【0078】

実施例1：TIC5290の発見

この実施例は殺虫性タンパク質であるTIC5290の発見を記載する。

#### 【0079】

新規の*Bacillus thuringiensis* (Bt) 殺虫性タンパク質をコードする配列が特定され、クローニングされ、配列が確認され、昆虫バイオアッセイで調べられた。配列番号1(Btをコードする配列)及び2(タンパク質)として本明細書で提示されている殺虫性タンパク質TIC5290はBt株EG6657から単離された。TIC5290は937アミノ酸の長さのタンパク質であり、既知の殺昆虫性タンパク質毒素との相同性に基づいて、及び既知の殺昆虫性タンパク質ファミリーによってそれをクラスターにするPfam解析の使用を介して特定された。バイオインフォマティクス解析は、TIC5290が孔形成性タンパク質であることを示唆している。アミノ酸残基16~140でのPA14Pfamドメイン(PF07691)は結合機能に關与する可能性

10

20

30

40

50

が高い。このドメインには、バレル膜貫通孔の形成に寄与してもよいアミノ酸186～593での二元\_\_toxBPfamドメイン(PF03495)が続く。TIC5290に最も密接なBt毒素ホモログはVip4Aaタンパク質であり、56.9%の配列同一性はTIC5290が新規のVip4サブファミリーを表すことを示唆している。

【0080】

株EG6657から単離された全ゲノムDNAからTIC5290についてのコーディング領域の完全長コピーを増幅するためにPCRプライマーを設計した。PCRのアンプリコンはコーディング配列の開始コドンと停止コドンも含んだ。

【0081】

当該技術で既知の方法を用いて、Bacillusの孢子形成の間、作動中であるBtの発現可能プロモータと操作可能に結合したBtプラスミド発現ベクターにTIC5290のアンプリコンをクローニングした。加えて、大腸菌(E.coli)発現系でのタンパク質の発現に使用されるベクターにアンプリコンをクローニングした。得られた組換え株は組換えタンパク質を発現することが観察された。

【0082】

実施例2：TIC5290は昆虫バイオアッセイにて鞘翅目、鱗翅目及び半翅目への活性を実証する。

この実施例は鞘翅目、鱗翅目及び半翅目の種々の種に対するTIC5290タンパク質によって示される阻害活性を説明する。

【0083】

新規の殺虫性タンパク質であるTIC5290をBt及びE.coliで発現させ、鞘翅目、鱗翅目、半翅目及び双翅目の種々の種に対する毒性についてアッセイした。Bt及びE.coliに由来する各毒性の調製物を鞘翅目種Leptinotarsa decemlineata(コロラドハムシ、CPB)及びDiabrotica virgifera virgifera(ウエスタンコーンルートワーム、WCR)に対してアッセイした。毒素調製物はまた、鱗翅目種アメリカタバコガの幼虫(CEW、Helicoverpa zea)、ヨーロッパマツマダラメイガ(ECB、Ostrinia nubilalis)、ツマジロクサヨトウ(FAW、Spodoptera frugiperda)、ダイズシャクトリムシ(SBL、Chrysodeixis includens)、サウスウエスタンマツマダラメイガ(SWC、Diatraea grandiosella)、タバコガ(TBW、Heliothis virescens)、及びコナガ(DBM、(lutella xylostella)に対してもアッセイした。毒素調製物は、半翅目種ミドリメクラガメ(TPB、Lygus lineolaris)及びウエスタンミドリメクラガメ(WTP、Lygus hesperus)；と同様に双翅目種、黄熱病力(YFM、Aedes aegypti)に対してもアッセイした。アメリカタバコガの幼虫(CEW、Helicoverpa zea)はダイズサヤムシガ(SPW)及びコットンボウルワーム(CBW)とも呼ばれる。

【0084】

ベクターのそれぞれで発現されるタンパク質のアッセイは昆虫の餌に加えられる様々な調製物を必要とした。孢子形成の間に活性があるプロモータを使用するベクターについては、培養での増殖の3日後、結晶/孢子の混合物を回収し、昆虫の餌(一般に昆虫の人工餌に適用され、種々の昆虫に別々に食べさせる)に使用した。E.coliにおける発現に由来するタンパク質の調製物を精製し、昆虫の餌でも提供した。

【0085】

TIC5290は、「+」が活性を示す以下の表2で示されるようにWCR、CEW、ECB、FAW、DBM及びWTPに対して活性を示した。

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2. 鞘翅目、鱗翅目、半翅目及び双翅目の昆虫種に対する T I C 5 2 9 0 のバイオアッセイでの活性

昆虫	餌バイオアッセイ
WCR	+
CPB	—
CEW	+
ECB	+
FAW	+
SBL	—
SWC	—
TBW	—
DBM	+
TPB	—
WTP	+
YFM	—

10

## 【 0 0 8 6 】

実施例 3：植物細胞での発現のための T I C 5 2 9 0 をコードする合成コーディング配列の設計

20

植物における T I C 5 2 9 0 の発現で使用するために合成のまたは人工のコーディング配列を構築し、二元植物形質転換ベクターにクローニングし、植物細胞を形質転換するのに使用した。たとえば、A T T T A 及び A / T リッチの植物ポリアデニル化配列のような特定の好ましくない問題配列を回避する一方で、ネイティブの B t タンパク質のアミノ酸配列を保存して、米国特許第 5,500,365 号にて一般に記載された方法に従って合成の核酸配列を合成した。T I C 5 2 9 0 殺虫性タンパク質のための合成コーディング配列は配列番号 3 として提示され、配列番号 2 として提示されるタンパク質をコードする。

## 【 0 0 8 7 】

実施例 4：植物細胞における T I C 5 2 9 0 の発現のための発現カセット

30

配列番号 3 で示されるような配列によって種々の植物発現カセットを設計した。そのような発現カセットは植物のプロトプラストまたは植物細胞の形質転換における一時的な発現に有用である。典型的な発現カセットは植物細胞内でのタンパク質の最終的な置き換えに関して設計された。色素体を標的にしたタンパク質については、合成の T I C 5 2 9 0 殺虫性タンパク質をコードする配列は葉緑体を標的とするシグナルペプチドをコードする配列にインフレームで操作可能に連結された。得られた植物形質転換ベクターは、5' でリーダーに操作可能に連結され、5' でイントロンに操作可能に連結され（または任意でイントロンはない）、色素体を標的にするまたは標的にしない T I C 5 2 9 0 タンパク質をコードする合成コーディング配列に 5' で操作可能に連結され、それは次に 5' で 3' UTR に操作可能に連結された構成的プロモータを含む殺虫性タンパク質の発現のための第 1 の導入遺伝子カセットと、グリホサート選択または抗生剤選択を用いた形質転換植物細胞の選択のための第 2 の導入遺伝子カセットとを含む。上述の要素のすべては、たとえば、制限エンドヌクレアーゼ部位またはライゲーションに無関係なクローニング部位のような発現カセットの構築のために提供される追加の配列と共に隣接して配置されることが多かった。

40

## 【 0 0 8 8 】

実施例 5：T I C 5 2 9 0 は、安定して形質転換されたトウモロコシ植物で発現されるとウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) に対する有効な抵抗性を提供する。

この実施例は、植物で発現され、餌として各昆虫害虫に提供された場合のコーンルート

50

ワームのような鞘翅目に対するT I C 5 2 9 0によって示される阻害活性を説明する。

【 0 0 8 9 】

色素体を標的にする及び標的にしないT I C 5 2 9 0 殺虫性タンパク質の双方を発現させるように設計された導入遺伝子カセットを含む二元植物形質転換ベクターを、当該技術で既知の方法を用いてクローニングした。得られたベクターを用いてトウモロコシ植物を安定的に形質転換した。単一のT - DNA挿入事象を選択し、生育させた。安定的に形質転換されたトウモロコシ植物の根で食べる鞘翅目害虫であるウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) に対して殺虫活性をアッセイした。

【 0 0 9 0 】

R<sub>0</sub>の安定的に形質転換された植物を用いて、生成しているF<sub>1</sub>子孫と同様に鞘翅目への抵抗性についてアッセイした。各二元ベクターの形質転換から複数の単一コピー事象を選択した。各二元ベクターの形質転換から生じているこれらの事象の一部を鞘翅目のアッセイに使用した一方で、事象の別の部分はさらなる試験のためにF<sub>1</sub>子孫を生成するのに使用した。

【 0 0 9 1 】

R<sub>0</sub>アッセイの植物を8インチのポットに移植した。植物にウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*、WCR) の卵を植菌した。植菌に先立ってほぼ10日間、卵をインキュベートして植菌の4日後に孵化が起きるようにして確実に十分な数の幼虫が生き残り、トウモロコシの根を攻撃できるようにした。ほぼV<sub>2</sub>からV<sub>3</sub>の段階で形質転換された植物に植菌した。侵襲の後、およそ28日間、植物を生育させた。植物をポットから取り出し、根を慎重に洗浄して土をすべて取り除いた。以下の表3で提示されたような1~5の損傷評価尺度を用いて根への損傷を評価した。陰性対照との比較を行ってアッセイが適正に行われたことを保証した。根の損傷の低いスコアはT I C 5 2 9 0 タンパク質によって付与された鞘翅目害虫に対する抵抗性を示す。WCRアッセイにて各二元ベクター形質転換について複数のR<sub>0</sub>事象を使用した。色素体を標的にする及び標的にしないT I C 5 2 9 0 双方を発現するR<sub>0</sub>事象の多くはトランスジェニック対照と比較した場合、根の損傷の評価スコアによって決定されるWCRへの抵抗性を実証した。

【表3】

表3. R<sub>0</sub>の根の損傷の評価スコア

根の損傷のスコア	説明
1	視覚的な食害なし
2	若干の食害；剪定なし
3	少なくとも1つの剪根
4	節全体の剪定
5	1を超える節の剪定

【 0 0 9 2 】

各二元ベクター形質転換から生じるR<sub>0</sub>の安定的に形質転換された事象の一部を用いてF<sub>1</sub>子孫を作出した。R<sub>0</sub>の安定的に形質転換された植物を自家受粉させ、F<sub>1</sub>子孫を作出した。F<sub>1</sub>種子を植え付けた。当該技術で既知の分子法を介してヘテロ接合体の植物を特定し、WCRに対するアッセイと同様にT I C 5 2 9 0 毒素タンパク質のE L I S A 発現測定に使用した。各事象に由来するヘテロ接合体のF<sub>1</sub>子孫の一部を昆虫アッセイに使用した一方で、別の部分はT I C 5 2 9 0 の発現を測定するために使用した。

【 0 0 9 3 】

ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*、WCR) の卵をおよそ10日間インキュベートして植菌後4日以内の孵化を可能にした。植物はほぼV<sub>2</sub>~V<sub>3</sub>の段階で植菌した。WCRについては、各ポットに

10

20

30

40

50

約2000個の卵を入れた。侵襲後、約28日間植物を生育させた。植物をポットから取り出し、根を慎重に洗浄して土をすべて取り除いた。根に対する損傷は、以下の表4にて提示されるような0～3の損傷評定尺度を用いて評価した。陰性対照との比較を行ってアッセイが適正に行われたことを保証した。根の損傷の低いスコアはTIC5290タンパク質によって付与された鞘翅目害虫に対する抵抗性を示した。F<sub>1</sub>事象の多くが対照と比べた場合のWCRに対する有効な抵抗性を実証した。図1は、タンパク質が葉緑体を標的にするかどうかにかかわらず、F<sub>1</sub>トウモロコシ植物で発現された場合、TIC5290のための幾つかの事象についての平均の根損傷の評定を示す。

【表4】

表4. 根の損傷の評定スコア

根の損傷スコア	説明
0	視覚的な食害なし
0.01-0.09	食べ跡及び摂食痕
0.1-0.9	剪根、しかし、完全な節に満たない
1.0-1.9	植物の1.5インチ以内まで破壊された少なくとも1つの完全な節
2.0-2.9	2以上の節がなくなった
3	3以上の節がなくなった

【0094】

実施例5：安定的に形質転換されたトウモロコシ、ダイズまたは綿植物にて発現される場合の鱗翅目害虫に対するTIC5290の活性のアッセイ

当該技術で既知の方法を用いて、色素体を標的にする及び標的にしない双方のTIC5290殺虫性タンパク質を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含む二元植物形質転換ベクターをクローニングする。

【0095】

*Agrobacterium*が介在する形質転換法を用いて、上述の二元形質転換ベクターによってトウモロコシ、ダイズまたは綿を形質転換する。当該技術で既知の方法によって植物を形成するように形質転換した細胞を誘導する。米国特許第8,344,207号に記載されたものに類似する植物の葉片を用いたバイオアッセイを行う。形質転換されていないトウモロコシ、ダイズまたは綿の植物を用いて陰性対照として使用される組織を得る。各二元ベクターに由来する複数の形質転換事象を、たとえば、アメリカタバコガの幼虫(CEW、*Helicoverpa zea*)、ヨーロッパマツマダラメイガ(ECB、*Ostrinia nubilalis*)、ツマジロクサヨトウ(FAW、*Spodoptera frugiperda*)、ダイズシャクトリムシ(SBL、*Chrysodeixis includens*)、サウスウエスタンマツマダラメイガ(SWCB、*Diatraea grandiosella*)、タバコガ(TBW、*Heliothis virescens*)、及びコナガ(DBM、(*lutella xylosteella*))のような、しかし、これらに限定されない鱗翅目害虫に対して評価する。昆虫バイオアッセイにて成長阻害及び/または大量死を示すそれらの昆虫はTIC5290昆虫毒素の影響を受け易いと判定される。

【0096】

実施例6：TIC5290を発現している安定的に形質転換された綿植物を用いた半翅目害虫に対する活性のアッセイ

当該技術で既知の方法を用いて、色素体を標的にする及び標的にしない双方のTIC5290殺虫性タンパク質を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含む二元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綿植物を安定的に形質転換する。安定的に形質転換された綿植物を食べる半翅目害虫に対して殺虫活性をアッセイする。

10

20

30

40

50

## 【0097】

色素体を標的にする及び標的にしないT I C 5 2 9 0を発現させる実施例3にて前に記載された二元ベクターを用いて綿植物を安定的に形質転換する。単一のT - D N A挿入事象を選択し、生育させる。R<sub>0</sub>の安定的に形質転換された植物を自家受粉させ、R<sub>1</sub>子孫を生産する。

## 【0098】

非トランスジェニック対照に相当する種子と共に、T I C 5 2 9 0のための発現カセットを含むR<sub>1</sub>トランスジェニック種子を10インチのポットに植え付ける。摂氏32度での16時間の明期と摂氏23度での8時間の暗期の光周期及び800~900の間のマイクロアインシュタインの光強度を伴った環境チャンバーにて植物を維持する。植え付けの40~45日後、通気性のあるプラスチックの「受粉」シート(Vilutis and Company Inc, Frankfurt, IL)で作られたケージに個々の植物を入れる。Velcro(登録商標)のヒモを用いてシートのスリーブを土表面のすぐ上で主要な茎に固定する。実験室の培養に由来する2対の性的に成熟したオスとメスのLygus lineolarisまたはLygus hesparusの成虫(6日齢)を14mLの丸底プラスチック管(Becton Dickson Labware, Franklin Lakes, NJ)に回収し、各植物に使用する。ケージ側の小さな開口部を介して各個々のケージに成虫を解放し、次いでケージをしっかりと閉じて昆虫が逃げないようにする。昆虫を交配させ、植物を21日間ケージで保持する。21日後、ケージの下で植物を切断し、各植物について昆虫を回収し、数える実験室に移動させる。ケージを開ける前に、植物を激しく振って確実に昆虫のすべてがその喰いつき部位からケージの底に落ちるようにする。次いでケージの底を開け、植物物質をすべて取り出し、黒色シート上に置く。吸引器を用いて昆虫を回収する。次いで植物全体を検査して残っている昆虫を回収する。各植物について昆虫の数及びその発生段階を記録する。Lygusの成熟度:3齢、4齢、5齢までの若虫及び成虫に基づいて昆虫のカウントをいくつかの群に分ける。形質転換されなかった綿対照植物に比べて若虫及び成虫の数の低下を示すトランスジェニック綿植物はT I C 5 2 9 0毒素タンパク質の発現を介して付与された半翅目害虫に対する抵抗性を実証している。

## 【0099】

本明細書で開示され、請求されている組成物のすべては、本開示を踏まえて過度の実験を行うことなく作製し、実行することができる。本発明の組成物は前述の説明に役立つ実施形態という点で記載されてきた一方で、変異、変化、改変及び変更は本発明の真の概念、精神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適用されてもよいことが当業者に明らかであろう。さらに具体的には、化学的に且つ生理的に関連する特定の作用物質が本明細書に記載されている作用物質の代わりに使用されてもよい一方で、同一のまたは類似の結果が達成されることが明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の置き換え及び改変はすべて、添付のクレームによって定義されるような本発明の精神、範囲及び概念の範囲内にあると見なされる。

## 【0100】

本明細書で引用されている出版物及び公開された特許文書はすべて、各個々の出版物または特許出願が具体的に且つ個々に参照によって組み入れられるように指示されたかのようにと同じ程度に参照によって本明細書に組み入れられる。

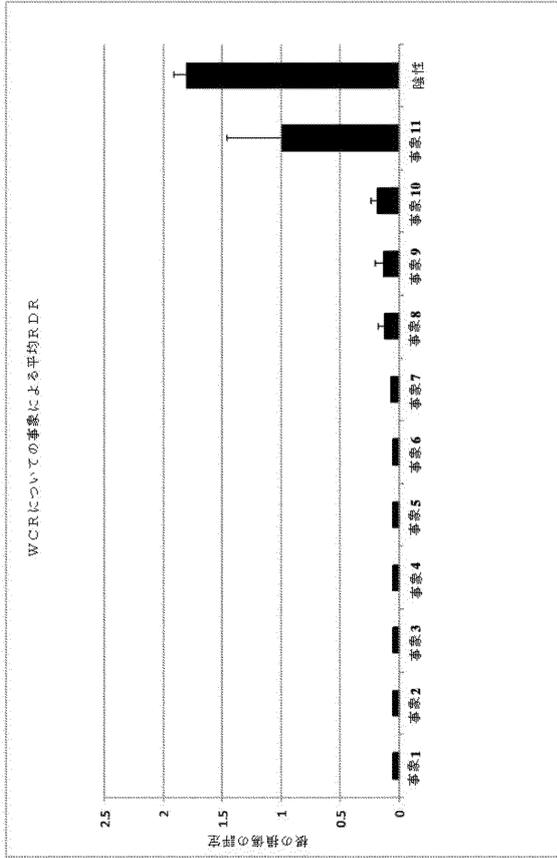
10

20

30

40

【図 1】



【配列表】

[0006933641000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 0 1 H	6/60 (2018.01)	A 0 1 H	6/60
A 0 1 H	5/10 (2018.01)	A 0 1 H	5/10
C 1 2 Q	1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6813
A 2 3 L	19/00 (2016.01)	A 2 3 L	19/00 Z
A 0 1 P	7/04 (2006.01)	A 0 1 P	7/04
A 0 1 N	63/23 (2020.01)	A 0 1 N	63/23
A 0 1 M	1/20 (2006.01)	A 0 1 M	1/20 A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
C 1 2 N	15/82 (2006.01)	C 1 2 N	15/82 Z
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 デイビッド・ジェイ・ポーウェン

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・ブルバード 8 0 0 番

(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・ブルバード 8 0 0 番

(72)発明者 スタニスラフ・フラシンスキー

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・ブルバード 8 0 0 番

(72)発明者 ヨン・イン

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・ブルバード 8 0 0 番

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0047076 (US, A1)

特表2014-526893 (JP, A)

特表2012-519000 (JP, A)

特表2001-502919 (JP, A)

国際公開第2012/139004 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

A01H 1/00 - 5/12

C07K 1/00 - 19/00

C12P 1/00 - 41/00

C12Q 1/00 - 3/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed