

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4112617号
(P4112617)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
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 5/00 B
C 1 2 N 9/18 (2006.01)	C 1 2 N 9/18
C O 2 F 1/00 (2006.01)	C O 2 F 1/00 Z A B P
請求項の数 12 (全 45 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平9-519237	(73) 特許権者	コモンウェルス サイエンティフィック アンド インダストリアル リサーチ オ ーガニゼーション
(86) (22) 出願日	平成8年11月22日(1996.11.22)		オーストラリア国 オーストラリアン キ ャピタル テリトリー 2601キャンベ ル ライムストーン アヴェニュー (番地 なし)
(65) 公表番号	特表2000-504203(P2000-504203A)		
(43) 公表日	平成12年4月11日(2000.4.11)	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/AU1996/000746	(74) 代理人	弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W01997/019176		
(87) 国際公開日	平成9年5月29日(1997.5.29)		
審査請求日	平成15年6月17日(2003.6.17)		
(31) 優先権主張番号	PN6751		
(32) 優先日	平成7年11月23日(1995.11.23)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 マラチオンカルボキシエステラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マラチオンを加水分解できる酵素をコードする単離されたDNA分子であって、

i) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 9、または配列番号 14 に示されたヌクレオチド配列；

ii) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 9、または配列番号 14 に示された配列において、1 個または数個のヌクレオチドの欠失、置換、または付加を有するヌクレオチド配列；あるいは

iii) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 9、または配列番号 14 に示されたヌクレオチド配列に対して高い厳重さの条件でハイブリダイズするヌクレオチド配列

を含み、
前記DNA分子によってコードされる前記酵素が、配列番号 10 の 251 位に対応する位置で、Leu,Ser,Ala,Ile,Val,Thr,Cys,Met及びGlyより成る群から選択されたアミノ酸を含む、単離されたDNA分子。

【請求項 2】

配列番号 10 の 251 位に対応する位置でLeuまたはSerを含む、請求項 1 に記載の単離されたDNA分子。

【請求項 3】

配列番号 10 のアミノ酸配列、または、251 位のTrpがSerに置換されている配列番号 13 のアミノ酸配列を有する酵素をコードする単離されたDNA分子。

【請求項 4】

マラチオンを加水分解できる酵素を発現するトランスフォームされた細胞であって、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のDNA分子を用いてトランスフォームされた細胞。

【請求項 5】

原核生物細胞または昆虫細胞である請求項 4 に記載のトランスフォームされた細胞。

【請求項 6】

マラチオンを加水分解できる酵素であって、請求項 4 または 5 に記載の細胞によって生産される酵素。

【請求項 7】

マラチオンを加水分解できる単離された酵素であって、配列番号 10 に示されたアミノ酸配列、または配列番号 10 のアミノ酸配列において、1 個または数個のアミノ酸の欠失、置換、または付加を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 10 の 251 位に対応する位置で、Leu, Ser, Ala, Ile, Val, Thr, Cys, Met 及び Gly より成る群から選択されたアミノ酸を少なくとも含む、単離された酵素。

10

【請求項 8】

配列番号 10 の 251 位に対応する位置で Leu または Ser を含む、請求項 7 に記載の単離された酵素。

【請求項 9】

サンプルまたは物質における混ざったマラチオン残留物の濃度を除去または減少する方法であって、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のDNA分子によってコードされる酵素と前記サンプルまたは物質を接触させることを含む方法。

20

【請求項 10】

サンプルまたは物質における混ざったマラチオン残留物の濃度を除去または減少する方法であって、請求項 4 または 5 に記載の細胞と前記サンプルまたは物質を接触させることを含む方法。

【請求項 11】

サンプルまたは物質における混ざったマラチオン残留物の濃度を除去または減少する方法であって、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の酵素と前記サンプルまたは物質を接触させることを含む方法。

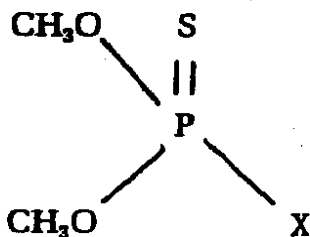
【請求項 12】

30

マラチオンを加水分解できる酵素を生産する方法であって、プロモーター配列と実施可能にリンクした請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のDNA分子を用いて宿主細胞をトランスフォームし、前記DNA配列の発現を許容するコンディションの下で前記トランスフォームされた細胞を培養し、そして生産された酵素を回収することを含む方法。

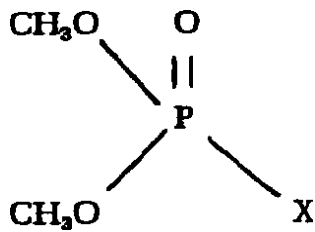
【発明の詳細な説明】

本発明は、一般的に以下の構造を持つ有機リン酸類(OP)殺虫剤の特異的なクラスを能率的に加水分解できるマラチオンカルボキシエステラーゼと呼ばれる酵素(及び該酵素をコードする核酸配列)に関する。



(例えば、マラチオン、フェントエート(phenthoate))

40



(例えば、マラオキソン(malaoxon)、フェントエートオキソン(phenthoate oxon))Xにはチオン型有機リン酸類に対する一つ以上のカルボキシルエステル基が含まれるが、オキソン型有機リン酸類に対するものは含まれない。

有機リン酸類の残留物が、環境及び一定範囲の必需品に混ざるとは望まれない。特に感受性の範囲としては、家庭向きの給水及び土、様々な食料及び繊維製品の輸出における許容されるレベルでの上述の残留物、家畜へ混ざることが含まれる。それゆえ生物学的改善の戦略が、これらの殺虫剤の残留物を除去または減少するために必要とされる。一つの提案される戦略には、該殺虫剤残留物を固定または分解できる酵素の使用が含まれる。該酵素は例えば、混ざった水が通過できるバイオリアクターにおいて;混ざった牧草及び給水内への流出に関する問題を減少するために、動物を殺虫剤に浸して洗う工程において;または残留物レベルを減少し時間を節約するために、果物または動物生産物の収穫後の害虫駆除後の溶液の洗浄において用いられるであろう。農薬残留物を分解するための適した酵素には、エステラーゼが含まれる。エステラーゼは農薬残留物に比較的特異的で、急速な割合で該残留物を加水分解することが望ましい。

MCE酵素は*L.cuprina*、RM及び*der-L*の異なるマラチオン耐性株から精製されている(Whyard S., Russell R.J. 及び Walker V.K., *Biochemical Genetics* 32:9, 1994; Whyard S. 及び Walker V.K., *Pesticide Biochemistry and Physiology* 50:198, 1994)。それは $11.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ のマラチオンに対する K_m 及び $775 \pm 28 \text{nmol マラチオン/分/mgの} V_{\text{max}}$ を持つ60.5kDaの単量体である。それはまたマラチオンに対する高ターンオーバーレートを持つ($k_{\text{cat}}=46 \text{min}^{-1}$)。有用な量のMCE酵素の生産を可能にするために、本発明はPCR及びクローニング法を用いて*L.cuprina*(RM-8)のマラチオン耐性株から推定のMCE遺伝子をクローニングしようとした。*L.cuprina*におけるMCE遺伝子は、第IV染色体のE3遺伝子から0.7マップユニット内の位置に、古典的な遺伝学的方法を用いてマッピングされている。*Drosophila melanogaster*におけるMCEの考え得るホモログ、Mceは、主要な -カルボキシルエステラーゼ, EST9及び*L.cuprina* E3のオソログ(orthologue), EST23の付近で第III染色体の右腕にマッピングされている(Spackman M.E., Oakeshott J.G., Smyth K-A., Medveczky K.M., 及び Russell R.J., *Biochemical Genetics*, 32:39, 1994)。

*L.cuprina*からMCE遺伝子をクローニングする目的のため、MCEホモログをクローニングするために*D.melanogaster*に対して有用な豊富な分子遺伝学的方法を使用し、*L.cuprina*遺伝子自身を単離するためにこれらのクローンをプローブとして使用することを決めた。要約すると、*L.cuprina*ゲノム及びcDNAから5のエステラーゼアンプリコンを単離した。クラスター特異的プライマーを用いたPCRによって得られた5の*L.cuprina*アンプリコンのうち4は、相当する*Drosophila*遺伝子に対するホモログに基づいて、Lc E7, Lc E8, Lc E9, 及びLc E10と名付けられた。第5のLc#53には、いかなる*Drosophila*遺伝子との同一性もないことに基づいて、自信を持って名前を与えることができなかった。

MCE特異的活性は、胸部または腹部よりもむしろ成虫の頭部で最も高い(Smyth, K-M., Walker, V.K., Russell, R.J., 及び Oakeshott, J.G. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54:48, 1996)。これに基づいて、Lc E7, Lc E8 及び Lc E10は全てMCE候補であった。Parker, A.P., Russell, R.J., Delves, A.C. 及び Oakeshott, J.G. の以前の生理学的研究(*Pesticide Biochemistry and Physiology* 41:305, 1991)によって、E3(Lc E7)酵素が成虫の頭部に存在することが示されている。さらに、クラスター特異的プライマーを用いたPCRで、頭部のcDNAライブラリーからこれらの遺伝子を増幅することが可能であったことより、Lc E8 及び Lc E10遺伝子もまた頭部で発現されている。PCRでは幼虫の脂肪体または成虫の頭部のいずれにおいても、Lc E9 及び Lc #53を検出できず、*D.melanogaster* E9ホモログの

ノーザン分析により、この遺伝子は胚でのみ発現されていることが示された。それゆえLc E9及びLc # 53は、E3及びMCEをコードする遺伝子の候補としては外された。

この分類に基づき及びLc E7が*L. cuprina*におけるジアジノン/パラチオンOP耐性に含まれるE3酵素をコードすることが知られていたという事実(PCT/AU95/00016: "Enzyme based bioremediation")及びマラチオン耐性とジアジノン/パラチオン耐性は別の遺伝子にコードされていると考えられるという事実のため、Lc E8及びLc E10遺伝子が主要なMCE候補として最初に選択された。

本発明はMCE酵素をコードするのはLc E7の変異体であるという驚くべき発見をなした。この遺伝子は*in vitro*で発現され、その産物はMCE活性をもつことを示した。発現された産物は環境のカルボキシルエステルまたはジメチル一般的OPの分解での使用のため処方され得る。

10

したがって第一の面として本発明は、カルボキシルエステル有機リン酸類及びジメチル-オキソン有機リン酸類より成る群から選択された少なくとも一つの有機リン酸類を加水分解できる酵素をコードする単離されたDNA分子、Lc E7とのホモロジーが少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%およびより好ましくは少なくとも95%である核酸配列を含む単離されたDNA分子で、該DNA分子によってコードされるタンパク質は251位のTrpがLeu, Ser, Ala, Ile, Val, Thr, Cys, Met及びGlyより成る群から選択されたアミノ酸で置換されている点でE3とは異なるという特徴を持つ単離されたDNA分子にある。

本発明の好ましい実施態様として、単離されたDNA分子は図1に示された配列を持ち、または該DNA分子によってコードされるタンパク質は251位のTrpがLeu, Ser, Ala, Ile, Val, Thr, Cys, Met及びGlyより成る群から選択されたアミノ酸で置換されている点でE3とは異なるという条件付きで、それらにハイブリダイズする配列を持つ。

20

本発明の好ましい実施態様として、251位のTrpはLeuまたはSerで置換されている。

上述したように、本発明は図1に示された配列とハイブリダイズする核酸分子を含む。好ましくは該ハイブリダイゼーションは低い及び高い厳重さのコンディションで、またはその間で生ずる。一般的な用語として、低い厳重さのコンディションとは約65 の環境温度で3×SSCとして定義され、高い厳重さのコンディションとは約65 で0.1×SSCとして定義される。SSCとは0.15MNaCl, 0.015Mクエン酸三ナトリウムのバッファの略語である。3×SSCとはSSCより3倍強いことであり、以下同様である。

第二の面として、本発明は図1に示されたRM-8Conのアミノ酸配列、または251位のTrpがSerで置換されている図3に示されたMd E7のアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする単離されたDNA分子にある。

30

MCEコード配列のホモログは、他の昆虫のゲノムにも存在するであろうし、および特に双翅目の他の種のゲノムにも存在するであろう。それゆえ本発明はこれらのホモログにも拡張されることが理解される。この例は、*Musca* MCEに関して以下に示された結果によって提供される。

本発明の単離されたDNA分子は、適した発現ベクター内にクローン化され、続いて酵素の発現のため原核生物または真核生物ホスト細胞内にトランスフェクトされる。特に適した系として、バキュロウイルスベクター及び昆虫細胞系が含まれる。

第三の面として、本発明はカルボキシルエステル有機リン酸類及びジメチル-オキソン有機リン酸類より成る群から選択された少なくとも一つの有機リン酸類を加水分解できる酵素、またはそれらの酵素学的に活性なタンパク質生産法にあり、該方法はコントロール配列と実施可能にリンクした本発明の第一の面のDNA分子でホスト細胞をトランスフォームし、該DNA分子の発現を許容するコンディションの下で該トランスフォームされたホスト細胞を培養し、及び生産された酵素またはそれらの酵素学的に活性なタンパク質を回収することを含む。

40

生物学的改善試薬として本質的に該酵素を使用する代わりとして、生物学的改善試薬は該酵素をコードするDNAでトランスフォームされた生物であることも視野に含まれる。該構成において、該酵素を発現するようにトランスフォームされた該生物は生物学的改善試薬として用いられるであろう。

50

本発明はさらに、本発明にしたがって単離されたDNA分子によってコードされるエステラーゼの使用を含む、サンプルまたは物質に混ざったカルボキシルエステルまたはジメチル-オキソン型有機リン酸類殺虫剤残留物の濃度の除去法または減少法に関する。

本発明の性質をより明白に理解するために、以下の実施例及び図面を参考として好ましい形態が記述されているであろう。

図1はLc E7(E3)の感受性クローン(Lc743)を参考として、3のマラチオン耐性クローン(RM8A-C)及びそれらのコンセンサス(RM8con)の複数の核酸配列を示す。点印はLc743感受性クローンと同一であることを示す。罫線の下は並べられた核酸配列であり、罫線の上はLc743の推定されるアミノ酸配列であり、Lc7RM8conで見出される一つの置換がすぐ下に太字で示されている。核酸は予想される翻訳の開始から数値が打たれており、アミノ酸は予想される開始メチオニンから数値が打たれている。Lc743 5' 及びLc743 3' プライマー配列には下線が引かれている。

10

図2は*Lucilia cuprina* Lc743クローン由来のLc E7(E3)タンパク質(PCT/AU95/00016 "Enzyme Based Bioremediation")と比較した*Musca domestica*のRutgers株由来の予想されるMd E7タンパク質のアミノ酸配列を示す。配列比較により、同じ長さ、570残基タンパク質の間で75%の同一性及び86%の相同性が示される。矢印は配列の251位の保存されたトリプトファン残基を示す。

図3はRutgers株Md E7遺伝子の配列をコードする1710bp核酸を示す。予想される570タンパク質配列もまた示されている。

図4はPCR Ankara株Md E7アンプリコンのアミノ酸配列及びRM-8マラチオン耐性Lc E7タンパク質の相当する領域を示す。マラチオン耐性に示される構造的ミューテーション(Md E7に対するセリン及びLc E7に対するロイシン)は、251位の残基で矢印で示されている。

20

*Lucilia cuprina*のマラチオン耐性株由来のMCE遺伝子のクローニング及びシーケンシング

カルボキシルエステラーゼ活性における2の型の変化は、より高等な双翅目におけるOP殺虫剤に対する耐性に関連している。変化の一つの型はジアジノン及びパラチオンのようなOPに対する耐性を引き起こし、一方で残りのものはマラチオンのようなOPに対する耐性を引き起こし、それらは化学物質をOPと定義するリン酸トリエステル部分に加えて一つ以上のカルボキシルエステル基を持つ(上記参照)。

30

2の変化の型は*Musca domestica*のOP耐性株において最初に記述された。両方において増大したOPの分解は、減少したアリエステラーゼ活性に関連し、そこで「アリエステラーゼ」なる語はカルボキシルエステル、メチル酪酸または同様の分子の加水分解に主に寄与する酵素をいう(Oppenoorth F.J., Entomology Experimental and Applied, 2:304, 1959; Oppenoorth F.J. 及び van Asperen, K., Entomology Experimental and Applied 4:311, 1961)。これは「ミュータントアリエステラーゼ仮説」の定式化を導き、それは同時に全てのOPのオキソン型に共通のリン酸エステル結合を加水分解でき、特定のカルボキシルエステル物質に向けた活性を減少する特異的なカルボキシルエステラーゼにおけるミューテーションのため各型の耐性が生ずることを提案する(Oppenoorth, F.J. 及び van Asperen, K., Science 132:298, 1960)。

40

両型の変化は約2-30倍の範囲で多様なOP(マラチオンを除く)に対する耐性因子を生じた(Bell, J.D. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied, 10:263, 1967)。しかしながら、マラチオン耐性*M. domestica*株はまた例外的にマラチオンに対する高耐性(一般的に>100倍)をも示した。この高耐性はリン酸エステル結合の加水分解(OP加水分解活性)に加えてマラチオンにおけるカルボキシルエステル結合の切断(すなわちMCE活性)と関連した。MCE活性は*in vivo*及び*in vitro*での主要な分解産物を説明した(Townsent, M.G. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 12:243, 1969)。

2の型の耐性間のまたはそれらとアリエステラーゼ間の組換えは*M. domestica*株において全く観察されなかった(Nguy, V.D. 及び Busvine, J.R., World Health Organisation 22:531, 1960)。これは、それらがOP加水分解及びMCE活性の面では明白に区別される一方で、それに

50

もかわらず2の型の耐性は同じカルボキシルエステラーゼ/アリエステラーゼ遺伝子/酵素系での対立遺伝子変化であろうことを示唆する(Oppenoorth, F.J. 及び Welling, W., in Insecticide Biochemistry and Pharmacology, Wilkinson, C.F. 編, Plenum Press, New York and London, pp.507-551, 1976)。

マラチオン耐性表現型はまたクロバエ類、*Chrysomya putoria*でも記述されており、それは高MCE活性及び低アリエステラーゼ活性と関連する点で*M.domestica*のマラチオン耐性表現型と同様である(Busvine, J.R., Bell, J.D. 及び Guneidy, A.M., Bulletin of Entomological Research 54:589, 1963; Bell, J.D. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 10:263, 1967; Townsent, M.G. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 12:243, 1969)。二種におけるマラチオン耐性表現型の類似性に対するさらなる証拠は、マラチオンを助け補強するOP化合物のスペクトルによって示される。特異的には一連の対称の一分子中に3個の置換基を有するリン化合物において、最高の共同薬(例えばトリフェニルリン酸)は両種で共通であった(Bell, J.D. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 10:263, 1967)。しかしながら*C.putoria*におけるジアジノン/パラチオン型耐性についてはほとんど知られていない。

これらのハエは感受性のハエより急速にパラオキシソンを加水分解し(Hughes, P.B. 及び Devonshire, A.L., Pesticide Biochemistry and Physiology 18:289, 1982)、そして耐性は減少したカルボキシルエステラーゼ活性と関連するので、ミュータントアリエステラーゼ仮説はまた*L.cuprina*におけるジアジノン/パラチオン耐性を説明するために引き合いに出された。この場合耐性ハエ由来のエステラーゼアイソザイムE3は、ポリアクリルアミド電気泳動後に検出されなかった(「非染色」)(PAGE; Hughes, P.B. 及び Raftos, D.A., Bulletin of Entomological Research 75:535, 1985)。E3変化と耐性の間の因果関係に対する証拠は、*L.cuprina*のE3染色、OP感受性ミュータントのEMSミュータジェネシス及びOP耐性ミュータントに対する選択によって得られた;回収された全ての耐性ミュータントはE3非染色PAGE表現型を持った(McKenzie, J.A., Parker, A.G. 及び Yen, J.L., Genetics 130:613, 1992)。

*M.domestica*のマラチオン耐性株と同様に、マラチオンに対して耐性である*L.cuprina*の株はマラチオンに対する大変高耐性力価を示し、増大されたMCE活性を示す。また*M.domestica*と共通して、マラチオン耐性*L.cuprina*は一般的にジアジノン/パラチオン耐性を示さず、逆もまた然りである。しかしながら*M.domestica*における状況との一つの相違点として、2の耐性表現型をコードするローカスはいくつかの実験においてたとえ近接してリンクしていても一般的に分離可能であるようであることが存在する(Smyth, K-A., Russell, R.J. 及び Oakeshott, J.G., Biochemical Genetics 32:437, 1994; Smyth, K-A., Walker, V.K., Russell, R.J. 及び Oakeshott, J.G., Pesticide Biochemistry and Physiology 54:48, 1996)。

OP耐性に関与する遺伝子を含むエステラーゼ遺伝子クラスターは、*L.cuprina*から単離されている(Newcomb, R.D., East, P.D., Russell, R.J. 及び Oakeshott, J.G. Insect Molecular Biology 5:211, 1996)。これらの遺伝子の一つ、Lc E7は、エステラーゼE3をコードし(Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Russell, R.J. 及び Oakeshott, J.G. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 印刷中)、*L.cuprina*におけるジアジノン/パラチオン耐性を与える活性部位における構造的ミューテーションをコードする。これらのデータは以前の特許出願PCT/AU95/00016: "Enzyme based bioremediation" に記述されており、この開示は参考としてここで取り込まれる。

以下で我々は*L.cuprina*のマラチオン耐性株からのLc E7遺伝子のクローニング及びシーケンシングを記述する。我々はエステラーゼE3の本対立遺伝子が*L.cuprina*におけるマラチオン耐性に必須のMCE遺伝子であるという分子遺伝学的証拠を提供する。

a) Lc E7のマラチオン耐性対立遺伝子のクローニング

RT-PCR(逆転写PCR)アプローチを第IV染色体に対して同一である*L.cuprina*(RM-8)のマラチオン耐性株からLc E7のcDNA対立遺伝子をクローン化するために用いた。

RM-8株由来の成虫を収集の前3日間成長させ、-70℃で貯蔵した。Chigwin等の修飾されたプロトコルを用いてRNAを調製した(Chigwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J., 1979, Biochemistry 18, 5294)。約100の成虫をSorvall Omnimix blenderを用い

10

20

30

40

50

てD溶液(4Mグアニジンチオシアン酸,25mMクエン酸ナトリウム,pH7.0,0.5%サルコシル,0.1Mβ-メルカプトエタノール)の15ml中に完全に均質化した。結果として生じた均質物を、ガラス綿及び10mMNa-EDTA,pH8において形成された5mlの4.8M CsClを上部に層状にした6mlを通して、SW41超遠心チューブにおいて濾過した。これらを15℃で16時間SW41ローターで35,000rpmで遠心した。上清を除去し、RNAペレットを400μlのDEPC処理H₂Oに再懸濁した。RNAを800μlのエタノールと10μlの4MNaClを添加することによって沈殿させ、-20℃のエタノールの下で貯蔵した。使用の前にRNAペレットを75%エタノールで洗い、風乾した後DEPC処理H₂Oに再懸濁した。

オリゴdTセルロース上のアフィニティークロマトグラフィー(Pharmacia;Sambrook,J.,Fritsch,E.F.,及びManiatis,T.,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,USA)を用いてポリA⁺RNAを500μgの全RNAから調製した。結果として生じたmRNA(1-5μg)を再び沈殿させ、20μlのDEPC処理H₂Oで洗浄して再懸濁した。オリゴdTプライマー-cDNAを、20μlの容量反応で製品の説明書にしたがって、逆転写酵素(Superscript II,BRL)を用いて1μgのmRNAから作製した。200ngのcDNAを、Lc E7遺伝子のコード領域の5' (Lc7435':5' atgaatttcaacgttagtttgatgga3')及び相補的な3' (Lc7433':5' ctaaaataaaatctctatgtttttcaaac3')末端からデザインされたプライマーを用いた2のPCR反応のそれぞれにおけるテンプレートとして使用した。反応にはTaqDNAポリメラーゼ(BRL)を用い、100pmolの各プライマー、0.2mMの各dNTP,10mMTris-HCl,pH8.3,50mMKCl,0.002%Tween20(v/v),0.5mMMgCl₂及び200ngのテンプレートが含まれた。2滴の鉱油を各50μlの反応物に層状にした。6ユニットのTaq酵素を95℃で5分の「ホットスタート」の後加え、97℃で35秒、60℃で1分及び72℃で2分の40サイクルが後に引き続いた。72℃で8分の最終サイクルが含まれた。1.7kbの主要産物をゲル精製し、一般的なクローニング法を用いてpBSK⁺(Stratagene)またはpGEM-T(Promega)プラスミドベクターのEcoRV切断部位内にクローン化した(Sambrook,J.,Fritsch,E.F.,及びManiatis,T.,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,USA)。

b) Lc E7のマラチオン耐性対立遺伝子のシーケンシング

方法:

シーケンシングのための3のクローン(RM8-Aから-C)を選択し、それら全ては独立のPCR反応に由来した。一連の12の21マーシーフェンシングプライマー(以下に示された配列)を存在するLc E7配列からデザインした:

10

20

30

表1

プライマー配列(5'-3')	プライマー名	Lc743配列における5'位置 (図1)
ggatgggtgctgattgttg	7F1	246
aaaaggatgtgggttgatta	7F2	464
actaatgtcgggtaatgctat	7F3	723
cactatgatgggtaacacttc	7F4	1026
tggtacaggagaaacaccaac	7F5	1203
agaatcgctgaatacaaaac	7F6	1467
acggtataccctcaaaactgt	7R1	187
tcccaaacgatattgtatgtt	7R2	504
acatcatgtagtgggtagaag	7R3	685
ccgaggatgtttgggtaagac	7R4	990
tatcagctgttgggtttctc	7R5	1231
acgcgattctttaggcatacg	7R6	1476

これらを50pmolのプライマーを反応に対して用い、96 で3分の「ホットスタート」を含みそして30サイクルで各シーケンシング反応を完成させることを除いて、Corbett Researchキャピラリーサーマルサイクラーで25 μ lのキャピラリーチューブにおいて製品の説明書にしたがって実施された色素 - ターミネーターシーケンシング反応(ABI)に用いた。色素プライマー反応もまたABIプロトコールにしたがってABI M13前方向及び後方法プライマーを用いて、全てのクローンで実施した。シーケンシング反応は製品の説明書にしたがってABI 370A自動シーケンシングマシンでの電気泳動によって解読した。両ストランドで実施されたこれによって、全配列決定がなされた。

結果:

図1はLc E7の感受性クローン(Lc743)を参考として比較した3の耐性クローン(RM8 A - C)の核酸配列及びアミノ酸配列を示す。マラチオン耐性Lc E7対立遺伝子のコンセンサ配列が決定された(RM-8con)。耐性クローン間の差異はTaqポリメラーゼによって取り込まれた誤差であると推定された。

マラチオン耐性RM-8コンセンサ配列(RM-8con)のものとの感受性配列(Lc743)の比較は、たった一つの置換部位の差異、すなわちアミノ酸251位でのTrpからLeuへの置換(核酸752位)を示した。同一のアミノ酸はT.californica AChEの三次元モデルで強調されており、それはLeuミューテーションが活性部位Serから6.5オングストロームである活性部位の谷間のベースで位置を定められていることを示していた。

c) 様々なLc E7対立遺伝子由来の752位の核酸を取り巻く領域のシーケンシング
マラチオン耐性を与えるエステラーゼの構造的ミューテーションは、分子の活性部位領域で生じると期待されるであろう。それゆえLc E7での核酸752位でのTrpからLeuへのミューテーションは、マラチオン耐性ミューテーションに対する最適な候補である。
本発明者は第IV染色体に対して均質で、既知のマラチオン耐性性質を持つL.cuprinaの全部で14の株を確立した。これらの系をプローブとしてLc E7遺伝子を用いたゲノムDNAのRFLP分析に基づいて7のクラスに分けた。それゆえ核酸752位は全範囲のクラスで調べられた。

方法:

いくつかのクラスで代表的な株由来のLc E7対立遺伝子の完全なcDNA配列を入手した。例えばRM-8由来のLc E7の配列が図1に示されている。さらに2より多いクラスを代表するLS

2及びLlandillo103株由来のLc E7cDNA配列が、特許出願PCT/AU95/00016(" Enzyme based bioremediation ")に記述されている。第四のクラスを代表するGunning107株の完全なLc E7cDNA配列は、J.Trott,B.Agr.Sc Thesis,1995に記述されている。

残りの3のクラスを代表するLBB101、Llandillo104及びHampton Hill6.2株における核酸752位の領域でのLc E7の配列を得るために、PCRアプローチをとった。ゲノムDNAをDavis,L.G.,Dibner,M.D.,及びBatley,J.F.,(1986.Basis Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publ.Co.,New York,Section 5.3)の方法を用いて卵から、またはC-TAB法(Crozier,Y.C.,Koulianos,S.& Crozier,R.H.,1991,Experientia 47,9668-969)を用いて成虫のハエから調製した。それから1µgのサンプルを、100pmolのプライマー7F1及び7R4を用いたPCR反応におけるテンプレートとして用いた。また反応物中には0.2mMの各dNTP,10mMTris-HCl,pH8.3,50mMKCl,1.5mMMgCl₂が含まれる。2滴の鉱油を50µlの各反応物中に層状にした。2.5ユニットのTaqポリメラーゼを97 で3分の「ホットスタート」の後加え、一方55 でアニリング温度を維持した。72 での最初の伸長を2分維持した。これに97 で35秒、55 で1分そして72 で1分の34サイクルが引き続いた。72 で9分の最終伸長が含まれた。約1kbの単一の生成物が生産された。これを製品の説明書にしたがってQIA高速回転カラム(Qiagen)を用いてシーケンシングのため精製した。500ngのテンプレートを上述したような7F7(5' :5' tgctgcctctacccactacat3')及び7R7(3' :5' cctgtggcttggctttcat aa3')プライマーを用いた色素-ターミネーターシーケンシング反応において用いた。

結果:

アッセイされた7のクラスにおいて、全ての5のマラチオン感受性株(LS2,LBB101,Llandillo104,Gunning107及びLlandillo103)は核酸752位でGを持っており、一方両マラチオン耐性株(Hampton Hill6.2及びRM-8)はこの位置でTを持っており、アミノ酸251位でTrpからLeuの置換を引き起こしている(表2)。異なる第IV染色体を持つ2のマラチオン耐性株における同じ構造的ミューテーションの存在は、該ミューテーションが耐性のため必須であることを強く示唆する。

表2

株	マラチオン耐性状態	クラス	アミノ酸251の残基 ^a
LS2	感受性	A	Trp
LBB101	感受性	C	Trp
Llandillo 104	感受性	B	Trp
RM-8	耐性	E	Leu
Hampton Hill 6.2	耐性	F	Leu
Llandillo 103	感受性	D	Trp
Gunning 107	感受性	G	Trp

^a251位でのアミノ酸は図1において核酸752位に相当する。

d) *Musca domestica*のマラチオン耐性株由来のオーソローガスな E7遺伝子のクローニングとシーケンシング

上述したように、ジアジノン/パラチオン及びマラチオンエステラーゼ介在性OP耐性型は、*L.cuprina*,*M.domestica*及び*C.putoria*の間で多くの強い共通性を示し、そしておそらくオーソローガスな遺伝子における機能的に同等なミューテーションによって引き起こされる。それゆえイエバエ、*M.domestica*からオーソローガスな遺伝子をクローン化し、核酸752位の周辺の領域を、マラチオン耐性*Musca*株におけるマラチオン耐性ミューテーションの存在のため調べた。

PCR反応:

コンセンサス一般的 - エステラーゼプライマーを*D.melanogaster*(Robin, C. Russell, R. J., Medveczky, K. M. 及び Oakeshott, R. J., *Journal of Molecular Evolution* 43:241, 1996) 及び *L.cuprina*(Newcomb, R. D., Campbell, P. M., Russell, R. J. 及び Oakeshott, J. G. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 印刷中) の - エステラーゼ遺伝子の複数のアミノ酸配列の保存された領域に対してデザインし、*M.domestica*由来の相同な E7 遺伝子配列の回収のためPCR増幅実験において用いた。

ゲノムDNAをLifton法(Bender, W., Spierer, P. 及び Hogness, D. S., *Journal of Molecular Biology* 168:17, 1989)を用いて、Rutgers OP耐性イエバエ株の成虫メスから調製した(Plapp, F. W. Jr., Tate, L. G. 及び Hodgson, E. 1976. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6:175-182)。Rutgers株ゲノムDNAを50 µlの増幅反応においてテンプレートとして用いた:

表3

	最終濃度/量
テンプレートDNA	100ng
プライマー-Md1	50pmoles
プライマー-Md2	50pmoles
バッファー	10mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mM MgCl ₂ , 50mM KCl
dNTP	0.25mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
Taqポリメラーゼ	1 ユニット
全容量	50µl

プライマー:

Md1 (35マー)

5' TTCGAGGGIATCCITAYGCIMARCCICCBTNGG 3'

L.cuprina E7における58-69残基に相当する

Md2 (32マー)

5' ACYTGRTCYTTIARICCGICRTTICCGGNAC 3'

L.cuprina E7における92-82残基に相当する

注意: IUBコードは混合された位置に対して用いられる; I = イノシン。

38サイクルを通してのPCRコンディション:

95°C 3' 1サイクル

80°C 維持(1ユニットのTaqポリメラーゼの添加)

95°C 1' 50°C 1' 72°C 1' 1サイクル

95°C 1' 55°C 1' 72°C 1' 35サイクル

95°C 1' 55°C 1' 72°C 4' 1サイクル

PCR増幅物のクローニングとシークエンシング:

540bp主要産物をアガロースゲルから溶出し、QIAGEN QIA高速PCR精製キットを用いて精製し、標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989)を用いてpGEM-Tプラスミドベクター(PROMEGA)内にクローン化した。クローン化されたインサートの末端を、Applied Biosystems Model 370A自動化DNAシークエンサーにおいて、商業的に入手可能なT7とSP6プライマー及びTaqFS色素-ターミネーター法(ABI)を用いてシークエンシングした。翻訳されたアミノ酸配列を、GCGコンピューターパッケージ(Devereux, J., GCG配列分析ソフトウェアパッケージバージョン6.0, Genetics Computer Group, University of

Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin, USA, 1989)由来のPILEUPを用いて予想される - エステラーゼタンパク質配列に対して並べた; *D. melanogaster* 及び *L. cuprina* 由来の既知の - エステラーゼ遺伝子の配列に対して同一であることが全て証明された。クローン化された534bp増幅物は、*L. cuprina* の E7の予想されるタンパク質配列の等しい135アミノ酸に対して76%の同一性を示した。

*M. domestica*からの完全な E7遺伝子の単離:

*M. domestica*のRutgers株の DASH(Stratagene)ゲノムライブラリー(Koener, J.F., Carino, F.A. 及び Feyereisen, R., *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23:439, 1993)をE7のフルレングスゲノムクローンのためにスクリーニングした。およそ300,000プラークを上記した³²Pラベル534bp増幅物を用いて突き止めた。一般的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989)を用いたライブラリースクリーニングを、高く厳しい条件で(50%ホルムアミド, 5×SSC, 3×Denhardt's, 0.5%SDS及び10 µg/mlサケ精子DNA、45度)で実施し、最後に高く厳しい条件で洗浄(0.1%SSC, 0.1%SDS、65度)を含んだ。制限地図は、17.5kbのゲノム挿入物と共に単一の DASHクローンが E7遺伝子を含むことを示した。4.5kbHindIII断片をpBSKベクター(Stratagene)内にサブクローン化し、上述したような色素-ターミネーター自動シーケンシング法を用いて特性指摘した。一連の13のシーケンシングプライマーをデザインし、フルレングスゲノム配列を解釈するために用いた:

表4

プライマー名	5'-3'プライマー配列	サイズ	MdaE7コード配列 における5'位置(図3)
T7	4.5kbpBSKクローンの末端配列		ホリックローニング部位
T3	4.5kbpBSKクローンの末端配列		ホリックローニング部位
AE7.1	TTTGGTCCCGACTACTTTATGA	227-	442
AE7.2	TGCCACTTATGAAATCTGTCTGTA	247-	310
AE7.3	TACATGATGATAACCGAACAGACC	247-	676
AE7.4	TCGATTATTTGGGTTTCATTTGT	237-	107
AE7.5	ACAGACAGATTTTCATAAGTGG	217-	288
AE7.6	TTTGCATTCTTTCCGGGTGTCA	217-	913
AE7.7	ATTCGATACCCACATTGATAG	217-	1016
AE7.8	GGCACTCCCATTTATTTGTAT	217-	1312
AE7.10	ATGACTTTTCTGAAGCAATTCAT	237-	1
AE7.11	AAACAATTCCCTTCTTTTATCGA	237-	1710
AE7.12	GGCATGGAAAACCTCACCTGG	217-	1558

1710bpまたは570アミノ酸の予想されるコード配列は、*L. cuprina*由来の E7タンパク質の同等なフルレングス570残基に対して大変高い75%の同一性及び85%の相同性を示した(図2及び3)。プローブとして534bp E7PCR増幅物を用いたRutgers株由来のゲノムDNA、及びEcoRI、HindIII、SalI切断DNAの、標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989)にしたがったサザンハイブリダイゼーション分析により、HindIIIに対する単一の4.5kbのハイブリダイジングバンド、単一の6.0kbのSalIバンド、そして1.5kbと0.8kbの2のEcoRIバンドが示された。該分析により、ラムダゲノムクローンのシーケンシング及びマッピングデータから解釈される制限パターンが確認された。他の異常型のハイブリダイゼーションパターンは、E7が単一コピー遺伝子として存在する高い蓋然性を

示すように生じなかった。

M.domesticの推定される E7マラチオン耐性対立遺伝子の特性指摘:

高マラチオン耐性Ankara株(Sisli,M.N.,Bosgelmez,A.,Kocak,O.,及びPorsuk,H.1983.Mikrobiyol Bul.17:49-46)の単一の成虫メス由来のゲノムDNA抽出物(Bender,W.,Spieler,P.及びHogness,D.S.,Journal of Molecular Biology 168:17,1989)を、推定のマラチオン耐性対立遺伝子の配列特性指摘のため用いた。一連のPCR反応を E7遺伝子の対立遺伝子変異体の特性指摘のために単一ハエゲノムDNAを用いて実施した。特異的なイエバエAE7.5及びAE7.6プライマーペアと共に、上述のコンディションを用いたPCR増幅により、およそ760bpの単一の増幅物が生産された。この増幅物は、L.cuprinaにおけるマラチオン耐性に関連したアミノ酸残基251でのTrpからLeuへのミューテーションの部位を含む、翻訳された配列の96-304残基に対してコードする酵素の触媒部位において含まれる高く保存された領域を包含する(図4)。9の個々のハエ由来のPCR増幅物のクローニング及びシーケンシング(前に記述した)により、Ankara株は E7遺伝子の2の対立遺伝子変異体に分離されることが示された:一つはアミノ酸251位でTrp残基を持ち、一方でもう一つはこの同じ位置でSerを持つ。この置換はL.cuprinaにおけるマラチオン耐性に含まれるTrpからLeuへの置換と同義である。ロイシンとセリンの両者は活性部位内のかさばったトリプトファン残基と置換し、それゆえ我々はこの変化がカルボキシエステル及びOPに向けられた酵素の速度論的性質における観察された変化を説明することを提案する。同様な方式で、かさばったTrp残基のAla,Ile,Gly,Val,Thr,Cys及びMetのような他のより小さい残基での置換が同様な効果を持つことが考えられる。Lucilia及びMuscaの両者のマラチオン耐性株におけるこれらの同様な活性部位でのミューテーションの発見は、これらのミューテーションがこれらの種におけるマラチオン耐性に必須であるという我々の結論をさらに支持する。

Lc E7の感受性及びマラチオン耐性対立遺伝子の発現された産物の加水分解活性

以下に我々は様々なカルボキシエステル及びOPに対するLc E7の感受性及びマラチオン耐性対立遺伝子の発現された産物の活性を記述する。該結果はLc E7遺伝子における核酸752位でのミューテーションの結果として、L.cuprinaにおけるマラチオン耐性に対する考え得る機構を示唆する。

a) in vitro発現

Lc E7のOP感受性対立遺伝子(クローンLc743)のin vitro発現が、特許出願PCT/AU95/00016("Enzyme based bioremediation")に記述されている。

マラチオン耐性Lc E7フルレングスcDNAを、ポリヘドリンプロモーターのバキュロウイルストランスファクター、Bacpac6(Clontech)3'内にクローン化した。King及びPossee(The Baculovirus Expression System:A Laboratory Guide,Chapman & Hall,London,1992)にしたがってDOTAP(Boehringer Mannheim)を用いたりポフェクト法を用いて、トランスフェクションを実施した。制限酵素BSU36I(Promega)を用いた切断によって直線化した200ngのBacpac6バキュロウイルスDNA(Clontech)と共に結果として生じた構築物のそれぞれの1µgのDNAを、室温で10分ポリスチレン含有物中において15%DOTAP(Boehringer Mannheim)を含むHBS(hepes buffered saline)の溶液中でインキュベートした。それから1.5mlのGrace's培地(King及びPossee,The Baculovirus Expression System:A Laboratory Guide,Chapman & Hall,London,1992)における 10^4 Sf9(*Spodoptera frugiperda*)細胞を用いて以前に2時間前接種された6穴組織培養プレートの単一のウェルにトランスフェクトするために該溶液を用いた。12時間後、該培地を10%胎児ウシ血清を含む3mlのGrace's培地を用いて置換した。構築物プラスDOTAP、直線化ウイルスプラスDOTAP、及びDOTAPのみのコントロールを、トランスフェクションを用いて平行に実施した。該トランスフェクション物を感染後4-5日で回収し、細胞を500gで5分の遠心分離によって単離した。結果として生じた細胞ペレットの均等物をすぐに氷上で貯蔵し、0.5%TritonX-100を含む10mMイミダゾール-HClバッファー,pH7.0に再懸濁した。これらの細胞抽出物における最終タンパク質濃度は、5から40mg/mlの間であった。細胞抽出物の均等物を酵素アッセイの前に-70℃で貯蔵した。

b) マラチオン加水分解

方法:

Whyard, S., Russell, R. J. 及び Walker, V. K. Biochemical Genetics 32:9(1994) によって修飾されたような Ziegler, R., Whyard, S., Downe, A. E. R., Wyatt, G. R. 及び Walker, V. K., Pesticide Biochemistry and Physiology, 28:279(1987) の仕切り法を用いて MCE 活性をアッセイした。細胞抽出物を 10mM イミダゾール-HCl, pH7.0 において 300 倍に希釈し、150 μ l の均等物をマイクロヒュージチューブに三重に置いた。[14 C]-マラチオン [Amersham; 103mCi/mmol, 280nCi, コハク酸部分の両メチレン炭素でラベルし、非ラベルマラチオン (99%; Riedel-de-Haen Ag., Seelze, Germany) の添加によって 15mM (または速度論実験に対しては 375 μ M-15mM) に調節した] を含む 1 μ l のエタノールの添加によって反応を開始した。アッセイ混合物を 25 で 10 分インキュベートし、それから 300 μ l の希釈バッファを加え、そして非分解マラチオンを 600 μ l のクロロホルムを用いて 3 回抽出した。300 μ l の水相におけるマラチオンのカルボン酸の濃度を液体シンチレーションによって測定した。細胞上清におけるタンパク質濃度を、スタンダードとしてウシ血清アルブミンを用いた Bradford, M., Analytical Biochemistry 72:248(1976) の方法によって、Biorad Protein Assay Kit を用いて測定した。ポイルした酵素コントロールを通常のように実施した。非組換えバキュロウイルスを用いて感染された細胞の抽出物の特異的 MCE 活性は、Lc E7 の OP 感受性またはマラチオン耐性対立遺伝子をコードするバキュロウイルスを用いて感染された細胞のものより、少なくとも 700 倍低かった。Lc E7 の対立遺伝子のためではないこのわずかな MCE 活性は、大変少量のソース及び誤差のためであると考えられ、引き続いて無視された。

結果:

2.5 から 100 μ M の間のマラチオンの最初の濃度を用いて、Lc E7 のマラチオン耐性及び感受性対立遺伝子によってコードされる MCE は、Michaelis-Menten 速度論に適したフィットを示した。 K_m 及び V_{max} を両酵素に対して計算した。それから K_{cat} を V_{max} 及びそれら各自の細胞抽出物における Lc E7 産物のモル濃度から計算した。細胞抽出物における感受性 Lc E7 産物のモル濃度は、Newcomb, R. D., Campbell, P. M. Russell, R. J. 及び Oakeshott, J. G., Insect Biochemistry and Molecular Biology (印刷中) に以前に記述されたようにパラオキソンを用いた滴定によって測定された。Lc E7 のマラチオン耐性対立遺伝子の産物のモル濃度は、リン酸トリフェニル (TPP; 1 から 10×10^{-8} M) をパラオキシソンの代わりに用いた点を除いて同様に計算された。コントロール実験において、TPP (8×10^{-8} M) を基質マラチオンの添加前 15, 30 または 45 分で三重に細胞抽出物と共にブレインキュベートした。各ブレイン

キュベーション時間で残余の MCE 活性の間で有意な差異は存在せず、これは第一に TPP による MCE の障害が完成してしまったこと、そして第二に TPP は MCE によってターンオーバーされないことを示した。

Lc E7 のマラチオン耐性及び感受性対立遺伝子の産物に対するマラチオン加水分解の速度論的パラメーターは以下の通りである:

表5

発現された Lc E7 遺伝子産物	K_m (μ M)	K_{cat} (min^{-1})
マラチオン感受性 (LS2 株)	200 \pm 30	70 \pm 11
マラチオン耐性 (RM-8 株)	21 \pm 1	43 \pm 1

マラチオン耐性産物に対する K_m 及び K_{cat} は、マラチオン耐性のハエから精製された MCE 酵素に対して測定されたものと程よく一致した (それぞれ 11 ± 0.4 μ M 及び 分当たり 46 ± 2 : Whyard, S. 及び Walker, V. K., Pesticide Biochemistry and Physiology, 50:198, 1994)。

c) TPP に対する MCE 活性の感受性

TPP による障害の高感受性は、M. domestica, C. putoria 及び L. cuprina におけるマラチオン耐性と関連した MCE 活性の明白な性質であり、これらの種の耐性株における TPP によるマラチオンの潜在的な共同薬性に一致する (Shono, T., Applied and Entomological Zoology 18:407, 1983; Bell, J. D. 及び Busvine, J. R., Entomology Experimental and Applied 10:263, 1967; Townsent, M. G. 及び Busvine, J. R., Entomology Experimental and Applied 12:243, 196

9; Hughes, P.B., Green, P.E. 及び Reichmann, K.G., Journal of Economic Entomology 77:1400, 1984; Smyth, K-A., Walker, V.K., Russell, R.J. 及び Oakeshott, J.G., Pesticide Biochemistry and Physiology, 54:48, 1996)。Lc E7のマラチオン耐性対立遺伝子によってコードされるMCE活性は、 10^{-7} M以下の濃度での酵素の化学量論的阻害によって示されるように、TPPによって阻害される可能性がある(上記参照)。

d) -ナフチル酢酸加水分解

方法:

マラチオン耐性及び感受性Lc E7対立遺伝子の発現された産物を含む細胞抽出物、及び -ナフチル酢酸(-NA)の間の反応の最初の割合を、記録式分光光度計及びMastrapaolo及びYournonの方法(Analytical Biochemistry 115:188, 1981)を用いて25℃で測定した。10 μ lの2-メトキシエタノールに溶解された6-200 μ M -NAを、石英キュベット内の0.1M Tris-HCl, pH8.0(980 μ l)に加えた。 -ナフチル酢酸は水中でゆっくりと加水分解され、そのためバックグラウンドの割合は10 μ lの希釈された細胞抽出物の添加によって酵素反応を開始する前に記録された。コントロール反応を非感染細胞及びBacpac6感染細胞の両者の抽出物を用いて実施した。これらのコントロールは極めてわずかな酵素的加水分解のみを示した。

結果:

6から200 μ Mの -NAの最初の濃度を用いて、Lc E7のマラチオン耐性及び感受性対立遺伝子によってコードされる酵素は、Michaelis-Menten速度論に適したフィットを示した。 K_m 及び V_{max} を両酵素に対して計算した。それから K_{cat} を V_{max} 及びそれら各自の細胞抽出物におけるLc E7産物のモル濃度(上記測定された)から計算した。

表6

発現されたLcE7遺伝子産物	K_m (μ M)	K_{cat} (min^{-1})
マラチオン感受性(LS2株)	70 \pm 5	11,000 \pm 300
マラチオン耐性(RM-8株)	150 \pm 50	2270 \pm 30

マラチオン耐性産物に対する K_m 及び K_{cat} は、マラチオン耐性のハエから精製されたMCE酵素に対して測定されたものと程よく一致した(167 \pm 14 μ M及び分当たり2063; Whyard, S. 及び Walker, V.K., Pesticide Biochemistry and Physiology, 50:198, 1994)。

e) -ナフチル酪酸加水分解

方法:

-NAの代わりに、6-200 μ M -ナフチル酪酸(-NB)を用いたことを除いて、 -NA加水分解に対して上述したように実施した。

結果:

6から200 μ Mの -NBの最初の濃度を用いて、Lc E7のマラチオン耐性及び感受性対立遺伝子によってコードされる酵素は、Michaelis-Menten速度論に適したフィットを示した。 K_m 及び V_{max} を両酵素に対して計算した。それから K_{cat} を V_{max} 及びそれら各自の細胞抽出物におけるLc E7産物のモル濃度(上記測定された)から計算した。

表7

発現されたLcE7遺伝子産物	K_m (μ M)	K_{cat} (min^{-1})
マラチオン感受性(LS2株)	20 \pm 5	18,000 \pm 2,000
マラチオン耐性(RM-8株)	29 \pm 4	9,000 \pm 400

マラチオン耐性産物に対する K_m 及び K_{cat} は、マラチオン耐性のハエから精製されたMCE酵素に対して測定されたものと程よく一致した(39 \pm 4 μ M及び分当たり3700; Whyard, S. 及び Walker, V.K., Pesticide Biochemistry and Physiology, 50:198, 1994)。

f) 一般的OP加水分解

M.domesticaにおいては、パラチオン/ジアジノン耐性のハエは、2のメトキシ基(「ジメチルOP」)よりむしろリン原子に付着した2のエトキシ基を持つOP(「ジエチルOP」)に対して、より大きい耐性力価を一般的に示すように、OP間で交差耐性のパターンが存在する(Bell, J.D. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 10:263, 1967)。逆のパターン(すなわちジメチルOPに対してより大きい耐性)は、M.domestica及びC.putoriaのマラチオン耐性株に対して観察される(Bell, J.D. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 10:263, 1967; Townsend, M.G. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 12:243, 1969)。このジメチルOP選択性は、マラチオン類似体(カルボキシルエステル基を持つ)及び一般的OP(カルボキシルエステル基を持たない)の両者に対して適用される。これらの研究により、マラチオン型耐性と密接に関連した一般的OP加水分解活性が存在し、そしてOP加水分解はジメチルOPに対して選択性を示すことが示唆される。該ジメチル/ジエチルOP交差耐性パターンがL.cuprinaにおいて生じるかどうかを測定する印刷されたデータは不十分にしか存在しない。ここで我々は第一に該交差耐性パターンが存在することを、第二にLc E7のマラチオン耐性対立遺伝子によってコードされる酵素はカルボキシルエステル基を欠くOPに対して加水分解活性をもつことを調べる。

方法:

i) 毒理学

以下の有機リン酸類化合物を用いた:ジアジノン(0,0-ジエチル0-2-イソプロピル-6-メチルピリミジン-4-イル ホスホロチオエート, 91%, Mallinckrodt)、パラチオン-メチル(0,0-ジメチル0-4-ニトロフェニル ホスホロチオエート, 97.0%, Bayer)、パラチオン(0,0-ジエチル0-4-ニトロフェニル ホスホロチオエート, 99%, Pestanal グレード, Riedel-de-Haen)、フェンチオン(fenthion)(0,0-ジメチル0-[3-メチル-4-(メチルチオ)フェニル]ホスホロチオエート, 98.8%, Bayer)、フェンチオン-エチル(0,0-ジエチル0-[3-メチル-4-(メチルチオ)フェニル]ホスホロチオエート, Dr.G.Levotからの贈呈)、ジクロロボス(2,2-ジクロロビニルジメチルホスフェート, 99%, Chem Service)、ジエチル-ジクロロボス(2,2-ジクロロビニルジエチルホスフェート, Dr.J.Desmarchelierからの贈呈)、ジ-イソプロピル-ジクロロボス(2,2-ジクロロビニルジ-イソプロピルホスフェート, Dr.J.Desmarchelierからの贈呈)、マラチオン(S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル0,0-ジメチル ホスホロジチオエート, テクニカルグレード, Nufarm)、イソプロピルマラチオン(S-1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル0,0-ジ-イソプロピル ホスホロジチオエート, Dr.J.Desmarchelierからの贈呈)。

成虫メスのL.cuprinaにおけるOPの毒理学を、0.7 µlのジオクチルフタレートにおいて小盾板にOPを適用することによって孵化後3または4日で測定した(Busvine, J.R., Bell, J.D. 及び Guneidy, A.M., Bulletin of Entomological Research 54:589, 1963; Townsend, M.G. 及び Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 12:243, 1969)。各OPを、50%モル濃度(LD₅₀)を引き起こす投与量にわたって各少なくとも5の異なる濃度で少なくとも20のハエに適用した。コントロールグループはOPを含まない溶媒で処理された。モル濃度を24時間後測定した。Probit Or Logit(POLO-PC)コンピュートプログラム(LeOra Software, 1987)を用いて、データをプロビットカーブにフィットした。このプログラムは<5%であった天然のモル濃度に対して正確である。統計値g(「潜在的見積もりに対する有意性の指標」)は常に、LD₅₀の95%信頼限界に対して0.5より小さかった。

ii) クロルフェンビンホス(Chlorfenvinphos)加水分解アッセイ:

酵素サンプルを最終容量50 µlに0.1Mイミダゾール-HClバッファー, pH7.0(「イミダゾールバッファー」)に希釈した。エタノール中の7.5mMストック溶液から0.5 µlの(¹⁴C-エチル)-クロルフェンビンホス(CVP, 306.5MBq/mmol, Internationale Isotope Munchen)の添加によって反応を開始した。該反応物を30 でインキュベートし、300 µlのジクロロメタンの添加によって停止させ、引き続き150 µlの水を勢いのあるボルテックス攪拌によって混ぜた。相を分離するために該反応物を遠心分離し、150 µlの上部の水相をCVPの加水分解によって生産された¹⁴C-ジエチルリン酸の量を測定するためにシンチレーションカウンタのため取り出した。熱した酵素を用いたインキュベーションも、CVPの非酵素的加水分解に

10

20

30

40

50

対するコントロールとするために実施した。

結果：

1) 毒理学：

10のOPのLD₅₀をWoodside5.2株(Lc E7のマラチオン耐性対立遺伝子に対して同種)及びLlandillo103株(Lc E7のパラチオン/ジアジノン耐性対立遺伝子に対して同種)に対して測定した。耐性力価を計算するためにOP感受性LS2株に対してLD₅₀もまた測定した(表8)。Woodside5.2ハエはジメチルOP、パラチオン-メチル、フェンチオン及びジクロルボスの方が、それらのジエチル類似体、パラチオン、フェンチオン-エチル及びエチルジクロルボスに対するものより約2から5倍大きい耐性力価を示した。逆にLlandillo103ハエはジエチルOP、パラチオン、及びエチルジクロルボスの方が、それらのジメチル類似体、パラチオン-メチル、及びジクロルボスに対するものより約2倍大きい耐性力価を示した。しかしながらフェンチオン及びフェンチオン-エチルに対するLlandillo103ハエの耐性力価の間には有意な差異が存在しなかった。

10

4のジエチルOPの間では、Llandillo103ハエはWoodside5.2ハエより(同様の耐性力価を持つフェンチオン-エチルを除いて;表8)高い耐性力価を持つ。対照的に、Woodside5.2ハエは4のジメチルOPのそれぞれに対してLlandillo103より高い耐性力価を持つ。それゆえ両株は、ジメチルOPまたはジエチルOPのいずれかに対する偏向を持つにもかかわらず、同様な有効性の一般的OP耐性を示す。

ジクロルボスまたはマラチオンのジ-イソプロピル類似体に対する3倍より大きい耐性を示す耐性株は両者で存在しなかった(表8)。

20

M.domestica由来の比較可能なデータは、7の試験化合物に対して入手可能である。各場合において耐性力価は平行な耐性型を示す2の種の株において同様である(表8)。

表8 M. domesticaと比較した成虫L. cuprinaにおける交差耐性

OP化合物 ¹	LD ₅₀ ² LS2 (OP感受性)	LD ₅₀ Llandillo 103 (Dz/para耐性)	LD ₅₀ Woodside 5.2 (Mal耐性)	RF3 (Dz/para耐性)	RF (Mal耐性)
ジアジノン(E)	57 (40-79), 3.5 ± 0.5	550 (490-630), 4.9 ± 0.7	270 (240-300), 5.1 ± 0.6	10 (20)	5 (2)
ハロチオン-メチル(M)	16 (11-20), 6.5 ± 0.8	185 (141-244), 3.4 ± 0.5	430 (390-490), 9.7 ± 1.5	12 (9)	27 (10)
ハロチオン(E)	52 (48-55), 9.2 ± 1.1	1050 (890-1280), 6.8 ± 1.2	290 (270-310), 13.3 ± 2.3	20 (35)	6 (3)
フェンチオン(M)	61 (42-87), 5.2 ± 0.7	210 (180-240), 8.7 ± 1.5	320 (210-490), 3.9 ± 0.7	3 (3)	5 (7)
フェンチオン-エチル(E)	330 (290-370), 7.4 ± 1.1	690 (570-830), 8.7 ± 1.5	730 (680-870), 13.4 ± 2.6	2	2
ジクロルボス(M)	41 (35-51), 8.2 ± 1.1	150 (95-190), 5.1 ± 0.8	270 (210-340), 6.3 ± 1.0	4 (3)	7 (6)
エチルジクロルボス(E)	360 (300-420), 5.0 ± 0.8	2370 (2320-2410), 54 ± 14	1100 (700-1500), 4.9 ± 1.2	7	3
イソプロピルジクロルボス(P)	3500 (2200-4800), 4.1 ± 0.6	4600 (3400-5900), 4.1 ± 0.5	10200 (8800-12000), 8.1 ± 1.4	NS	3
マラチオン(M)	550 (480-610), 6.4 ± 1.2	490 (360-600), 4.2 ± 0.9	4	NS (2)	>130 (157)
イソプロピルマラチオン(P)	3600 (2700-4900), 6.3 ± 0.7	4900 (3700-6200), 8.5 ± 1.7	6400 (5000-7100), 10.1 ± 1.8	NS	1.8 (4)

1. ジメチル(M)、ジエチル(E)またはジ-プロピル(P)OP。

2. プロピット回帰曲線の95%信頼限界、傾斜及び標準誤差を持つLD₅₀(ng/ハエ)。

3. 耐性力価: LS2のLD₅₀に対するLlandillo103またはWoodside5.2のLD₅₀の割合。「NS」は1より有意な差異が存在しないRFを示す。適切な耐性型のM. domesticaの耐性力価がカッコ内に示されている。
(Bell, J.D. and Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 10: 263, 1967; Townsend, M.G. and Busvine, J.R., Entomology Experimental and Applied 12: 243, 1969).

4. この投与量ではモル濃度が存在しない。

ii) 全ハエホモジェネート及び発現されたLc E7遺伝子産物のクロルフェンビンホス加水分解活性:

L. cuprinaのマラチオン耐性(株はRM-8, 60NE1.1, 4.2, Beverly6.2, Hampton Hill6.1, Hampton Hill6.2, Woodside5.2, RopRma11, M22.2 6.3, M27.1 4.1)、ジアジノン耐性(Gunning107, Inverell22, Q4, RM2.6, Llandillo103, Sunbury5.2)及び感受性(LBB101, Llandillo104, LS2)株の全ハエホモジェネートを、CVP、一般的OP(すなわちマラチオン型OPではない)のエステラーゼ介在性加水分解に対して試験した。全ての10のマラチオン耐性株は3の感受性株(0.5-

1.0pmol/分/mg)よりも大きいCVP加水分解活性を示したが(1.5-3.0pmol/分/mg)、6のジアジノン耐性株(8.2-30.0pmol/分/mg)よりは小さかった。

マラチオン耐性Lc E7対立遺伝子の発現された産物をCVP加水分解活性に対して試験した。75 μ MCVPのターンオーバーは約1.2hour⁻¹であり、それはジアジノン耐性(RM2-6)Lc E7遺伝子産物のものよりおよそ50倍小さいが、CVP活性が検出できないOP感受性(LS2)遺伝子産物のものよりはるかに大きかった。[Lc E7のRM2-6及びLS2対立遺伝子の遺伝子産物のCVP加水分解活性は、特許出願PCT/AU95/00016: "Enzyme based bioremediation" に記述されている]

g) 結論

1. 我々はM.domestica及びC.putoriaのOP耐性株のパターンと類似するL.cuprinaの株の間のOP交差耐性のジエチルパターンに対するジメチルパターンを発見した。2のOP耐性型はジメチルまたはジエチルOP選択性にもかかわらず、ほとんどのOP(マラチオンは除く)の間で等しく効力があり一般的である。

2. Lc E7のOP感受性対立遺伝子(0)、マラチオン耐性対立遺伝子(1.2hour⁻¹)及びジアジノン/パラチオン耐性対立遺伝子($\sim 1\text{min}^{-1}$)によってコードされるジエチルOP加水分解活性は、L.cuprina株のOP感受性(低)、マラチオン耐性(中)及びジアジノン/パラチオン耐性(局)のホモジェネートにおけるジエチルOP加水分解活性と同様である。

3. 1及び2の指摘を共に考えて、我々は一般的OP交差耐性のジエチルパターンに対するジメチルパターンは、E7遺伝子の2の択一的なOP耐性対立遺伝子によってコードされる一般的OP加水分解活性の基質特異性を反映していることを提案する。それゆえ我々は、L.cuprina及びM.domestica由来のE7遺伝子のマラチオン耐性対立遺伝子の産物が、ジアジノン/パラチオン耐性E7対立遺伝子がジエチルOPに対するものと同じくらい生物学的改善に対して好ましい速度論を持ったジメチルOP加水分解を示すであろうことを期待する。

4. E7遺伝子のマラチオン耐性対立遺伝子の産物の増大されたMCE活性は、ハエをマラチオンの100倍以上大きい投与量でも生存することを引き起こす。MCE活性は2の点において増大されている。第一に、それは感受性対立遺伝子のものよりマラチオン分解に対する好ましい速度論を持つ(K_{cat}/K_m は6倍大きい)。第二に、それは一般的OP加水分解活性を持っている。後者は、酵素がOP殺虫剤の「活性化」または「P=0」形態によってリン酸化/阻害後にそのMCE活性を回復することを可能にするので、耐性及び生物学的改善の両者に対して重要である。P=0 OPは昆虫の代謝系で生産されるので昆虫内に存在する。生物学的改善に対して、OP加水分解は2の理由で必要とされる:第一に、主要な残留物である一般的OPを加水分解するため、そして第二に、酵素によるマラチオン加水分解は「P=0」OPでの少量残留物の存在が継続するであろうことを確実にするために必要とされる。

L.cuprinaにおけるマラチオン及びジアジノン/パラチオン耐性表現型の対立性

L.cuprinaにおけるマラチオン耐性はLc E7(エステラーゼE3)、ジアジノン/パラチオン型OPに対する耐性に関与するものと同じ遺伝子の活性部位における構造的ミューテーションによって与えられることは、上記分子遺伝学的及び生化学的データから明白である。しかしながら2の古典的遺伝学的研究によって、L.cuprinaにおけるマラチオン耐性表現型とジアジノン耐性表現型の間で少量の推定される組換えが検出されており、それは両者が非常に近接してリンクしているが分離できる遺伝子であることを示唆するであろう(Raftos,D. A.及びHughes,P.B., Journal of Economic Entomology 77:553,1986;Smyth,K-A,Russell,R.J.及びOakeshott,J.G., Biochemical Genetics 32:437,1994)。

Smyth等(1994)の研究によって生産された5の仮定的な組換え体の3由来の凍結抽出物の入手により、著者はPCR法を用いて予想される表現型に対して直接的にそれらを試験することが可能であった。この特定の研究において、ジアジノン耐性オス(Q4株)をマラチオン耐性メス(RM-8株)と交配させ、F1のメスをQ4のオスと戻し交配させた。子孫をE3非染色及びジアジノンとマラチオンの両者に対する耐性の表示として高MCE表現型について記録した。高MCE/E3非染色表現型を示す5の仮定的な組換え個体を、692の戻し交配子孫から回収した;おそらくマラチオンとジアジノンの両者に感受性であろう逆の低MCE/E3染色表現型を持つ個体は全く回収されなかった。

10

20

30

40

50

方法:

ジアジノン耐性ミューテーション(137位でGlyからAspへの置換)及びマラチオン耐性ミューテーション(251位でTrpからLeuへの置換)を取り巻くLc E7遺伝子の領域を、それぞれ7F1/7R2プライマーセット及び7F7/7R4プライマーセットを用いて、Smyth等(1994)の研究由来の3の入手可能な抽出物のそれぞれから増幅した。PCRコンディション及びプライマー(7F7を除く)は、55 °Cのアニーリング温度及びTaqDNAポリメラーゼの製品によって提供されたバッファー(BRL; 0.2mMの各dNTP, 20mMTris-HCl, pH8.4, 50mMKCl, 1.5mMMgCl₂)を用いる点を除き、上述したようなものである。7F7プライマーは以下の配列: 5' tgctgcctctacccactacat3' をもち、Lc743配列におけるその5' 位置は核酸660である(図1参照)。

7F7/7R4プライマーセットによって生産されるLc E7の330nt断片は、Q4及びRM-8対立遺伝子のそれぞれに対して特異的なRFLP多形を含む: 核酸752位でのNco I切断部位はQ4対立遺伝子の特徴付け(この多形はマラチオン耐性に必須なTrpからLeuへのミューテーションの部位である)、一方796位のBgl I部位はRM-8対立遺伝子の特徴付ける。それゆえそれぞれの抽出物におけるQ4及びRM-8対立遺伝子を同定するために、PCR産物を標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E.F., 及びManiatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989)を用いて、それぞれの酵素を用いて直接的に切断し、該産物をアガロースゲル電気泳動によってサイズ分離した。コントロールはQ4及びRM-8ゲノムDNAから生産されたPCR産物を含んだ。

該一般的なRFLP多形は7F1/7R2プライマーセットによって増幅された326nt断片に含まれていなかった(この断片は核酸360位に68ntのイントロンを含む)。しかしながら3の核酸多形がQ4及びRM-8断片を区別する: Q4配列における345位でのTからC及び410位でのGからAである(後者の置換はジアジノン/パラチオン耐性に必須である)。それゆえPCR産物は標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E.F., 及びManiatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989)を用いて、pGEM-Tベクター(Promega)内にクローン化され、個々のクローンを上述したように、商業的に入手可能なSP6及びT7プライマーそして色素ターミネーター法を用いてシーケンスした。

結果:

Nco IまたはBgl Iを用いた7F7/7R4プライマーセットによって生産されたPCR産物の切断により、全ての3の抽出物においてRM-8の染色体のみの存在が明らかとなった(すなわちPCR産物はBgl Iでのみ切断可能でNco Iでは不可能であり、一方コントロールQ4ゲノムDNAの産物はNco Iを用いて容易に切断された; データは示していない)。奇妙にもQ4対立遺伝子は、F1子孫が交配工程においてQ4と戻し交配されたという事実にもかかわらず、いかなる抽出物からも増幅されなかった。

第一の抽出物由来の3のクローンのうち2が、そして第二の抽出物由来の2のクローンのうち2が、303位及び345位でのQ4対立遺伝子の多形特徴を、そして410位でのRM-8の多形特徴を含んだ。これに対して第一の抽出物由来の第三のクローン、及び第三の抽出物由来の単一のクローンは、RM-8の全ての3の多形特徴を含んだ。再言すると、Q4染色体から完全に生産された断片はクローン化DNAの間で全く見出されなかった。

結論:

1. Q4対立遺伝子はF1子孫がQ4に対して戻し交配され、それゆえQ4の第IV染色体の少なくとも1コピーが含まれていると期待されるであろうという事実にもかかわらず、いかなる抽出物からも増幅されなかった。
2. もしマラチオン耐性ミュータントがLc E7とは別の遺伝子上に位置していたならば、Q4対立遺伝子と同種の子孫が期待されるであろう。該子孫は全く見出されなかった。
3. もしE3及びMCEが別の遺伝子であれば期待されるであろう、低MCE/E3染色(おそらくマラチオン及びパラチオンの両者に対して感受性である)子孫は全く回収されなかった。
4. 少なくとも2の抽出物は、核酸410位でGlyからAspへのミューテーションに対するLc E7遺伝子5' の領域のどこかでQ4/RM-8組換え体である第IV染色体を含んだ。この第IV染色体及び結果として生じたキメラタンパク質のMCE活性/PAGE表現型を持つハエの起源は未知である。

10

20

30

40

50

5. 推定されるE3/MCE組換え体は子孫を交配する間の単純な逆の組換え現象の結果であった;それゆえそれらはE3及びMCE遺伝子が別の遺伝子である証明を構成しない。

*L. cuprina*におけるマラチオン耐性が、*Lc E7*(E3) 遺伝子、ジアジノン/パラチオン型OPに耐性を与えるためにミューテートした同じ遺伝子における構造的ミューテーションの結果であることは、本発明より明らかである。換言すると、以前の古典的遺伝学的研究が示したように、MCE及びE3遺伝子はおそらく対立遺伝子であり、0.7マップまでは離れていない。2の耐性ミューテーションの対立性は、マラチオン型OP耐性とジアジノン/パラチオン型OP耐性の間にネガティブな関連性が存在するというSmyth, K-A, Russell, R. J. 及びOakeshott, J. G. (Biochemical Genetics 32:437, 1994)の観察を説明する。それゆえ集団内のマラチオン型耐性の存在は、ウジの発生に対抗するためのジエチルOPの使用を示唆し、一方でジアジノン/パラチオン型耐性対立遺伝子の存在は、ジメチルOPの使用を示唆するであろう。

10

本発明の方法によって生産されたMCE酵素は、E3酵素(特許:Enzyme Based Bioremediation)が一般的OP加水分解に対する*in vitro*アッセイを発展するために用いられているのと全く同様の方法で、機能的な*in vitro*アッセイを発展するために用いられるであろう。共に使用すれば、該アッセイはE3様酵素による耐性の問題に打ち勝つであろう択一的OPに対するスクリーニングの範囲を提供する。

たくさんの変異形及び/または修飾が広く記述された本発明の精神または範囲から離れることなく、特異的な実施態様に示されたように本発明に対してなされるであろうことは、当業者にとって察知されるであろう。それゆえ本実施態様は説明として全ての面において考えられるべきで、制限のためと考えられるべきではない。

20

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Malathion carboxylesterase

<130> Malathion carboxylesterase

<140> JP-519237

<141> 1996-11-22

<150> PN 6751

<151> 1995-11-23

10

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1713

<212> DNA

<213> *Lucilia cuprina*

<400> 1

```

atgaatttca acgttagttt gatggagaaa ttaaaatgga agattaaatg cattgaaaat 60
aagtttttaa actatcgttt aactaccaat gaaacgggtg tagctgaaac tgaatatggc 120
aaagtgaaag gcgttaaacy tttaactgtg tacgatgatt cctactacag ttttgagggt 180
ataccgtacg cccaaccgcc agtgggtgag ctgagattta aagcacccca gcgaccaaca 240
ccctgggatg gtgtgctgta ttgttgcaat cataaagata agtcagtgcg agttgatttt 300
ataacgggga aagtgtgtgg ctgagaggat tgtctatacc taagtgtcta tacgaataat 360
ctaaatcccg aaactaaacy tcccgtttta gtatacatat atgggtgggtg ttttattatc 420
ggtgaaaatc atcgtgatat gtatggctct gattatttca ttaaaaagga tgtgggtgtg 480
attaacatac aatatcgttt gggagctcta gggttttcta gtttaaattc agaagacctt 540
aatgtgcccc gtaatgccgg ccttaaagat caagtcattg ccttgctgtg gattaataat 600
aattgcgcca actttgggtg caatcccgat aatattacag tctttgggtg aagtgccggt 660
gctgcctcta cccactacat gatgttaacc gaacaaactc gcggtctttt ccatcggtgt 720
ataactaatg cgggtaaatg tatttgtcca ttggctaata cccaatgtca acatcggtgc 780
ttcaccttag ccaaattggc cggctataag ggtgaggata atgataagga tgttttgtaa 840
tttcttatga aagccaagcc acaggattta ataaaacttg aggaaaaagt ttttaactta 900
gaagagcgta caaataaggt catgtttcct tttggtecca ctgttgagcc atatcagacc 960
gctgattgtg tcttacccta acatcctcgg gaaatgggtt aaactgcttg gggtaattcg 1020
ataccacta tgatgggtaa cacttcatat gagggcttat ttttacttc aattcttaag 1080
caaatgccta tgcttggtta ggaattggaa acttgtgtca attttgtgcc aagtgaattg 1140
gctgatgttg aacgcaccgc cccagagacc ttggaaatgg gtgctaaaat taaaaaggct 1200
catgttacag gagaaacacc aacagctgat aattttatgg atctttgtc tcacatctat 1260
ttctggttcc ccatgcatcg tttgttgcaa ttacgtttca atcacacctc cggtagaccc 1320
gtctacttgt atcgttcga cttcgattcg gaagatctta tcaatcccta tcgtattatg 1380
cgtagtggac gtgggtgtta ggggtgttag catgctgatg aattaacctt tttcttctgg 1440
aatcaattgg ccaaacgtat gcctaaagaa tcgctggaat acaaaacaat tgaacgtatg 1500
actggtatat ggatacaatt tgccaccact ggtaatcctt atagcaatga aattgaagggt 1560
atggaaaatg tttcctggga tccaattaag aaatccgatg aagtatacaa gtgtttgaat 1620
attagtgtat aattgaaaat gattgatgtg cctgaaatgg ataagattaa acaatgggag 1680
tcgatgtttg aaaaacatag agatttattt tag 1713

```

20

30

40

<210> 2

<211> 570

<212> PRT

<213> *Lucilia cuprina*

<400> 2

Met Asn Phe Asn Val Ser Leu Met Glu Lys Leu Lys Trp Lys Ile Lys
 1 5 10 15

Cys Ile Glu Asn Lys Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Thr Asn Glu Thr
 20 25 30

Val Val Ala Glu Thr Glu Tyr Gly Lys Val Lys Gly Val Lys Arg Leu
 35 40 45

Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala
 50 55 60

Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Thr
 65 70 75 80

Pro Trp Asp Gly Val Arg Asp Cys Cys Asn His Lys Asp Lys Ser Val
 85 90 95

Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu
 100 105 110

Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro
 115 120 125

Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His
 130 135 140

Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu
 145 150 155 160

Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn
 165 170 175

Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 180 185 190

Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn
 195 200 205

Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr
 210 215 220

His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Leu Ala Asn Thr Gln Cys
 245 250 255

Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu
 260 265 270

Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln
 275 280 285

Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg Thr
 290 295 300

Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr
 305 310 315 320

10

20

30

40

Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala
 325 330 335

Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350

Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu
 355 360 365

Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu
 370 375 380

Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala
 385 390 395 400

His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys
 405 410 415

Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg
 420 425 430

Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445

Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg
 450 455 460

Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp
 465 470 475 480

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe
 565 570

10

20

30

<210> 3
 <211> 1713
 <212> DNA
 <213> Lucilia cuprina

40

<400> 3
 atgaatttca acgtagttt gatggagaaa ttaaaatgga agattaaatg cattgaaaat 60
 aagtttttaa actatcgttt aactaccaat gaaacggtg tagctgaaac tgaatatggc 120
 aaagtgaaag gcgttaaacg tttaactgtg tacgatgatt cctactacag ttttgagggt 180
 ataccgtacg cccaaccgcc agtgggtgag ctgagattta aagcacccca gcgaccaaca 240
 ccctgggatg gtgtgcgcga ttgttgcaat cataaagata agtcagtgc agttgatttt 300
 ataacgggca aagtgtgtgg ctcagaggat tgtctatacc taagtgtcta tacgaataat 360

```

ctaaatcccg aaactaaacg tcccgtttta gtatacatat atggtggtgg ttttattatc 420
ggtgaaaatc atcgtgatat gtatggctct gattatttca ttaaaaagga tgtggtgttg 480
attaacatac aatatcgttt gggagctcta ggttttctaa gtttaaattc agaagacctt 540
aatgtgcccg gtaatgccgg ccttaaagat caagtcattg ccttgcggtg gattaaaaat 600
aattgcgcca actttggtgg caatcccgat aatattacag tctttggtga aagtgccggt 660
gctgcctcta cccactacat gatgttaacc gaacaaactc gcggtctttt ccatcgtggt 720
atactaattg cgggtaaatg tatttgctca ttggctaata cccaatgtca acatcgtgcc 780
ttcaccttag ccaaattggc cggctataag ggtgaggata atgataagga tgttttggaa 840
tttcttatga aagccaagcc acaggattta ataaaacttg aggaaaaagt tttactcta 900
gaagagcgta caaataaggt catgtttcct tttggtccca ctgttgagcc atatcagacc 960
gctgattgtg tcttaccctaa acatcctcgg gaaatggtta aaactgcttg gggtaattcg 1020
ataccacta tgatgggtaa cacttcatat gaggtctat ttttacttc aattcttaag 1080
caaatgccta tgcttggtta ggaattggaa acttggtgca attttgtgcc aagtgaattg 1140
gctgatgctg aacgcaccgc cccagagacc ttggaaatgg gtgctaaaat taaaaaggct 1200
catgttacag gagaaacacc aacagctgat aattttatgg atctttgctc tcacatctat 1260
ttctggttcc ccatgcacgc tttgttgcaa ttacgtttca atcacacctc cggtagaccc 1320
gtctacttgt atcgtctcga cttcgattcg gaagatctta tcaatcccta tcgtattatg 1380
cgtagtggac gtggtgttaa ggggtgttag catgctgatg aattaacctt tttcttctgg 1440
aatcaattgg ccaaactgat gcctaaagaa tcgcgtgaat acaaaacaat tgaacgtatg 1500
actggtatat ggatacaatt tgccaccact ggtaatcctt atagcaatga aattgaaggt 1560
atggaaaatg tttcctggga tccaattaag aaatccgatg aagtatacaa gtgtttgaat 1620
attagtgatg aattgaaaat gattgatgtg cctgaaatgg ataagattaa acaatgggag 1680
tcgatgtttg aaaaacatag agatttattt tag 1713

```

10

<210> 4
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Lucilia cuprina*

20

```

<400> 4
Met Asn Phe Asn Val Ser Leu Met Glu Lys Leu Lys Trp Lys Ile Lys
  1                      5                      10          15
Cys Ile Glu Asn Lys Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Thr Asn Glu Thr
                20                      25          30
Val Val Ala Glu Thr Glu Tyr Gly Lys Val Lys Gly Val Lys Arg Leu
    35                      40          45
Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala
    50                      55          60
Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Thr
    65                      70          75          80
Pro Trp Asp Gly Val Arg Asp Cys Cys Asn His Lys Asp Lys Ser Val
                85                      90          95
Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu
    100                      105          110
Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro
    115                      120          125
Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His
    130                      135          140
Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu
    145                      150          155          160

```

30

40

Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn
 165 170 175
 Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 180 185 190
 Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn
 195 200 205
 Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr
 210 215 220
 His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Leu Ala Asn Thr Gln Cys
 245 250 255
 Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu
 260 265 270
 Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln
 275 280 285
 Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg Thr
 290 295 300
 Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr
 305 310 315 320
 Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala
 325 330 335
 Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350
 Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu
 355 360 365
 Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu
 370 375 380
 Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala
 385 390 395 400
 His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys
 405 410 415
 Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg
 420 425 430
 Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445
 Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg
 450 455 460
 Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp
 465 470 475 480

10

20

30

40

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe
 565 570

10

<210> 5
 <211> 1713
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 5 20

atgaatttca	acgttagttt	gatggagaaa	ttaaaatgga	agattaaatg	cattgaaaat	60
aagtttttaa	actatcgttt	aactaccaat	gaaacgggtg	tagctgaaac	tgaatatggc	120
aaagtgaaag	gcgttaaacg	tttaactgtg	tacgatgatt	cctactacag	ttttgagggt	180
ataccgtacg	cccaaccgcc	agtgggtgag	ctgagattta	aagcacccca	gcgaccaaca	240
ccttgggatg	gtgtgctgta	ttgttgcaat	cataaagata	agtcagtgca	agttgatttt	300
ataacgggca	aagtgtgtgg	ctcagaggat	tgtctatacc	taagtgtcta	tacgaataat	360
ctaaatcccc	aaactaaacg	tcccgtttta	gtatacatat	atgggtgggtg	ttttattatc	420
gggtgaaaatc	atcgtgatat	gtatggctct	gattatttca	ttaaaaagga	tgtgggtgttg	480
attaacatac	aatatcgttt	gggagctcta	ggttttctaa	gttttaattc	agaagacctt	540
aatgtgcccc	gtaatgcccg	ccttaaagat	caagtcattg	ccttgcatgg	gattaaaaat	600
aattgcgcca	actttgggtg	caatcccgat	aattattacag	tctttgggtg	aagtgccggt	660
gctgcctcta	cccactacat	gatgttaacc	gaacaaactc	gcgggtctttt	ccatcggtgg	720
atactaattg	cgggtaatgc	tatttgtecca	ttggctaata	cccaatgtca	acatcggtgc	780
ttcaccttag	ccaaattggc	cggctataag	gggtgagaata	atgataagga	tgttttggaa	840
tttcttatga	aagccaagcc	acaggattta	gtaaaacttg	aggaaaaagt	tttaactcta	900
gaagagcgta	caaataaggt	catgtttcct	tttggtccca	ctgttgagcc	atatcagacc	960
gctgattgtg	tcttacccaa	acatcctcgg	gaaatgggtta	aaactgcttg	gggtaattcg	1020
atacccacta	tgatgggtaa	cacttcatat	gaggggtctat	ttttcacttc	aattccttaag	1080
caaatgccta	tgcttggtta	ggaattggaa	acttgtgtca	atthttgtgc	aagtgaattg	1140
gctgatgctg	aacgcaccgc	cccagagacc	ttggaaatgg	gtgctaaaat	taaaaaggct	1200
catgttacag	gagaaacacc	aacagctgat	aattttatgg	atctttgctc	tcacatctat	1260
ttctggttcc	ccatgcatcg	tttgttgcaa	ttacgtttca	atcacacctc	cgggtacaccc	1320
gtctacttgt	atcgcttcga	cttcgattcg	gaagatctta	tcaatcccta	tcgtattatg	1380
cgtagtggac	gtgggtgtta	gggtgttagt	catgctgatg	aattaaccta	tttcttctgg	1440
aatcaattgg	ccaaacgtat	gcctaaagaa	tcgctggaat	acaaaacaat	tgaacgtatg	1500
actggtatat	ggatacaatt	tgccaccact	ggtaatcctt	atagcaatga	aattgaagggt	1560
atggaaaatg	tttcctggga	tccaattaag	aaatccgatg	aagtatacaa	gtgtttgaat	1620
attagtgatg	aattgaaaat	gattgatgtg	cctgaaatgg	ataagattaa	acaatgggag	1680
tcgatgtttg	aaaaacatag	agattttatt	tag			1713

30

40

<210> 6
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Lucilia cuprina*

40

Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala
 325 330 335

Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350

Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu
 355 360 365

Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu
 370 375 380

Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala
 385 390 395 400

His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys
 405 410 415

Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg
 420 425 430

Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445

Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg
 450 455 460

Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp
 465 470 475 480

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe
 565 570

10

20

30

<210> 7
 <211> 1713
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

40

<400> 7
 atgaatttca acgttagttt gatggagaaa ttaaaatgga agattaaatg cattgaaaat 60
 aagtttttaa actatcgttt aactaccaat gaaacggtgg tagctgaaac tgaatatggc 120
 aaagtgaaaag gcgttaaacg tttaactgtg tacgatgatt cctactacag ttttgagggt 180
 ataccgtacg cccaaccgcc agtgggtgag ctgagattta aagcacccca gcgaccaaca 240
 ccctgggatg gtgtgctga ttgttgcaat cataaagata agtcagtga agttgatattt 300
 ataacgggca aagtgtgtgg ctcagaggat tgtctatacc taagtgtcta tacgaataat 360

```

ctaaatcccg aaactaaacg tcccgtttta gtatacatat atgggtggtg ttttattatc 420
ggtgaaaatc atcgtgatat gtatggtcct gattattttca ttaaaaagga tgtggtgttg 480
attaacatac aatatcgttt gggagctcta ggtttttctaa gtttaaattc agaagacctt 540
aatgtgcccc gtaatgcccg ccttaaagat caagtcattg ccttgcggtg gattaaaaat 600
aattgccccg actttggtgg caatcccgat aatattacag tctttggtga aagtgccggt 660
gctgcctcta cccactacat gatgttaacc gaacaaactc gcggtctttt ccatcggtgg 720
ataactaatg cgggtaatgc tatttgcca tgggctaata cccaatgtca acatcggtgc 780
ttcaccttag ccaaattggc cggctataag ggtgaggata atgataagga tgttttggaa 840
tttcttatga aagccaagcc acaggattta ataaaacttg aggaaaaagt tttaactcta 900
gaagagcgta caaataaggt catgtttcct tttggtccca ctggtgagcc atatcagacc 960
gctgattgtg tcttaccctaa acatcctcgg gaaatggtta aaactgcttg gggtaattcg 1020
atacccta tgatgggtaa cacttcatat gaggggtctat ttttcacttc aattcttaag 1080
caaatgccta tgcttgtaa ggaattggaa acttggtgca attttggtgc aagtgaattg 1140
gctgatgctg aacgcaccgc cccagagacc ttggaaatgg gtgctaaaat taaaaaggct 1200
catgttacag gagaaacacc aacagctgat aattttatgg atctttgctc tcacatctat 1260
ttctggttcc ccatgcatcg tttgttgcaa ttacgtttca atcacacctc cggtaacccc 1320
gtctacttgt atcgtcttga ctttgattcg gaagatctta ttaatcccta tcgtattatg 1380
cgtagtggac gtggtgttaa ggggtgttag catgctgatg aattaaccta tttcttcttg 1440
aatcaattgg ccaaacgtat gcctaaagaa tcgctggaat acaaaaacaat tgaacgtatg 1500
actggtatat ggatacaatt tgccaccact ggtaatcctt atagcaatga aattgaaggt 1560
atggaaaatg tttcctggga tccaattaag aaatccgacg aagtatacaa gtgtttgaat 1620
attagtgcg aattgaaaat gattgatgtg cctgaaatgg ataagattaa acaatgggaa 1680
tcgatgttg aaaaacatag agattttatt tag 1713

```

10

<210> 8
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Lucilia cuprina*

20

```

<400> 8
Met Asn Phe Asn Val Ser Leu Met Glu Lys Leu Lys Trp Lys Ile Lys
  1              5              10              15
Cys Ile Glu Asn Lys Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Thr Asn Glu Thr
              20              25              30
Val Val Ala Glu Thr Glu Tyr Gly Lys Val Lys Gly Val Lys Arg Leu
              35              40              45
Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala
  50              55              60
Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Thr
  65              70              75              80
Pro Trp Asp Gly Val Arg Asp Cys Cys Asn His Lys Asp Lys Ser Val
              85              90              95
Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu
              100              105              110
Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro
              115              120              125
Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His
              130              135              140
Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu
              145              150              155              160

```

30

40

Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn
 165 170 175
 Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 180 185 190
 Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn
 195 200 205
 Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr
 210 215 220
 His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Trp Ala Asn Thr Gln Cys
 245 250 255
 Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu
 260 265 270
 Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln
 275 280 285
 Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg Thr
 290 295 300
 Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr
 305 310 315 320
 Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala
 325 330 335
 Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350
 Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu
 355 360 365
 Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu
 370 375 380
 Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala
 385 390 395 400
 His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys
 405 410 415
 Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg
 420 425 430
 Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445
 Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg
 450 455 460
 Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp
 465 470 475 480

10

20

30

40

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe
 565 570

<210> 9
 <211> 1713
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 9 20
 atgaatttca acgttagttt gatggagaaa ttaaaatgga agattaaatg cattgaaaat 60
 aagtttttaa actatcggtt aactaccaat gaaacgggtg tagctgaaac tgaatatggc 120
 aaagtgaag gcgttaaagc tttaactgtg tacgatgatt cctactacag ttttgagggt 180
 ataccgtacg cccaaccgcc agtgggtgag ctgagattta aagcaccoca gcgaccaaca 240
 cctgaggatg gtgtgcgtga ttgttgcaat cataaagata agtcagtgca agttgatttt 300
 ataacgggca aagtgtgtgg ctgagaggat tgtctatacc taagtgtcta tacgaataat 360
 ctaaatcccg aaactaaacg tcccgtttta gtatacatat atgggtggtg ttttattatc 420
 ggtgaaaatc atcgtgatat gtatggctct gattatttca ttaaaaagga tgtgggtgtg 480
 attaacatac aatatcggtt gggagctcta ggttttctaa gtttaaattc agaagacctt 540
 aatgtgcccg gtaatgcccg ccttaaagat caagtcatgg ccttgcggtg gattaaaaat 600
 aattgcgcca actttggtgg caatcccgat aatattacag tctttggtga aagtgccggt 660
 gctgcctcta cccactacat gatgttaacc gaacaaactc gcggtctttt ccactgtggt 720
 atactaatgt cgggtaatgc tatttgctca ttggctaata cccaatgtca acatcggtgc 780
 ttcaccttag ccaaattggc cggctataag ggtgaggata atgataagga tgttttggaa 840
 tttcttatga aagccaagcc acaggattta ataaaacttg aggaaaaagt tttaactcta 900
 gaagagcgta caaataaggt catgtttcct tttggtccca ctgttgagcc atatcagacc 960
 gctgattgtg tcttacccaa acatcctcgg gaaatggtta aaactgcttg gggtaattcg 1020
 ataccacta tgatgggtaa cacttcatat gagggctctat ttttacttc aattcttaag 1080
 caaatgccta tgcttggtta ggaattggaa acttgtgtca attttgtgcc aagtgaattg 1140
 gctgatgctg aacgcaccgc cccagagacc ttggaaatgg gtgctaaaat taaaaaggct 1200
 catgttacag gagaaacacc aacagctgat aattttatgg atctttgtc tcacatctat 1260
 ttctggttcc ccatgcatcg tttgttgcaa ttacgtttca atcacacctc cggtaacccc 1320
 gtctacttgt atcgcttcga cticgattcg gaagatctta tcaatcccta tcgtattatg 1380
 cgtagtggac gtgggtgtta ggggtgttagt catgctgatg aattaacctt tttcttctgg 1440
 aatcaattgg ccaaacgtat gcctaaagaa tcgctggaat acaaaacaat tgaacgtatg 1500
 actggtatat ggatacaatt tgccaccact ggtaatcctt atagcaatga aattgaaggt 1560
 atggaaaatg tttcctggga tccaattaag aaatccgatg aagtatacaa gtgtttgaat 1620
 attagtgatg aattgaaaat gattgatgtg cctgaaatgg ataagattaa acaatgggag 1680
 tcgatgtttg aaaaacatag agatttattt tag 1713

<210> 10
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 10

Met Asn Phe Asn Val Ser Leu Met Glu Lys Leu Lys Trp Lys Ile Lys
 1 5 10 15
 Cys Ile Glu Asn Lys Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Thr Asn Glu Thr
 20 25 30
 Val Val Ala Glu Thr Glu Tyr Gly Lys Val Lys Gly Val Lys Arg Leu
 35 40 45
 Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala
 50 55 60
 Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Thr
 65 70 75 80
 Pro Trp Asp Gly Val Arg Asp Cys Cys Asn His Lys Asp Lys Ser Val
 85 90 95
 Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro
 115 120 125
 Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His
 130 135 140
 Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu
 145 150 155 160
 Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn
 165 170 175
 Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 180 185 190
 Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn
 195 200 205
 Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr
 210 215 220
 His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Leu Ala Asn Thr Gln Cys
 245 250 255
 Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu
 260 265 270
 Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln
 275 280 285
 Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg Thr
 290 295 300
 Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr
 305 310 315 320

10

20

30

40

Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala
 325 330 335

Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350

Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu
 355 360 365

Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu
 370 375 380

Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala
 385 390 395 400

His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys
 405 410 415

Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg
 420 425 430

Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445

Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg
 450 455 460

Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp
 465 470 475 480

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe
 565 570

10

20

30

<210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Lucilia cuprina

40

<400> 11
 atgaatttca acgtagttt gatgga

26

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Lucilia cuprina

<400> 12

ctaaaataaaa tctctatggt tttcaaac

28

<210> 13

<211> 570

<212> PRT

<213> Musca domestica

<400> 13

Met Thr Phe Leu Lys Gln Phe Ile Phe Arg Leu Lys Leu Cys Val Lys
 1 5 10 15

10

Cys Met Val Asn Lys Tyr Thr Asn Tyr Arg Leu Ser Thr Asn Glu Thr
 20 25 30

Gln Ile Ile Asp Thr Glu Tyr Gly Gln Ile Lys Gly Val Lys Arg Met
 35 40 45

Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Ser Ile Pro Tyr Ala
 50 55 60

Lys Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Val
 65 70 75 80

20

Pro Trp Glu Gly Val Arg Asp Cys Cys Gly Pro Ala Asn Arg Ser Val
 85 90 95

Gln Thr Asp Phe Ile Ser Gly Lys Pro Thr Gly Ser Glu Asp Cys Leu
 100 105 110

Tyr Leu Asn Val Tyr Thr Asn Asp Leu Asn Pro Asp Lys Arg Arg Pro
 115 120 125

Val Met Val Phe Ile His Gly Gly Asp Phe Ile Phe Gly Glu Ala Asn
 130 135 140

Arg Asn Trp Phe Gly Pro Asp Tyr Phe Met Lys Lys Pro Val Val Leu
 145 150 155 160

30

Val Thr Val Gln Tyr Arg Leu Gly Val Leu Gly Phe Leu Ser Leu Lys
 165 170 175

Ser Glu Asn Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 180 185 190

Met Ala Leu Arg Trp Val Lys Ser Asn Ile Ala Ile Phe Gly Gly Asp
 195 200 205

Val Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Thr
 210 215 220

40

His Tyr Met Met Ile Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 225 230 235 240

Ile Met Met Ser Gly Asn Ser Met Cys Ser Trp Ala Ser Thr Glu Cys
 245 250 255

Gln Ser Arg Ala Leu Thr Met Ala Lys Arg Val Gly Tyr Lys Gly Glu
 260 265 270

Asp Asn Glu Lys Asp Ile Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Asn Pro Tyr
 275 280 285
 Asp Leu Ile Lys Glu Glu Pro Gln Val Leu Thr Pro Glu Arg Met Gln
 290 295 300
 Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr
 305 310 315 320
 Ala Asp Cys Val Val Pro Lys Pro Ile Arg Glu Met Val Lys Ser Ala
 325 330 335
 Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Leu Ile Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly
 340 345 350
 Leu Leu Ser Lys Ser Val Ala Lys Gln Tyr Pro Glu Val Val Lys Glu
 355 360 365
 Leu Glu Ser Cys Val Asn Tyr Val Pro Trp Glu Leu Ala Asp Ser Glu
 370 375 380
 Arg Ser Ala Pro Glu Thr Leu Glu Arg Ala Ala Ile Val Lys Lys Ala
 385 390 395 400
 His Val Asp Gly Glu Thr Pro Thr Leu Asp Asn Phe Met Glu Leu Cys
 405 410 415
 Ser Tyr Phe Tyr Phe Leu Phe Pro Met His Arg Phe Leu Gln Leu Arg
 420 425 430
 Phe Asn His Thr Ala Gly Thr Pro Ile Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe
 435 440 445
 Asp Ser Glu Glu Ile Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Phe Gly Arg
 450 455 460
 Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Leu Phe Trp
 465 470 475 480
 Asn Ile Leu Ser Lys Arg Leu Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr
 485 490 495
 Ile Glu Arg Met Val Gly Ile Trp Thr Glu Phe Ala Thr Thr Gly Lys
 500 505 510
 Pro Tyr Ser Asn Asp Ile Ala Gly Met Glu Asn Leu Thr Trp Asp Pro
 515 520 525
 Ile Lys Lys Ser Asp Asp Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Gly Asp Glu
 530 535 540
 Leu Lys Val Met Asp Leu Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Gly Ala
 545 550 555 560
 Ser Ile Phe Asp Lys Lys Lys Glu Leu Phe
 565 570

10

20

30

40

<210> 14

<211> 1710

<212> DNA

<213> Musca domestica

<400> 14

```

atgacttttc tgaagcaatt catatttcgc ctgaaactat gctttaaatg catgggtcaat 60
aaatacacaa actaccgtct gagtacaaat gaaacccaaa taatcgatac tgaatatgga 120
caaattaagg gtgttaagcg aatgaccgtc tacgatgatt cttactacag tttcgagagt 180
ataccctatg ctaagcctcc agtgggtgag ttgagattca aggcacccca gcggcctgta 240
ccatgggagg gtgtacgtga ttgctgtggg ccagccaaca gatcggtaca gacagatttc 300
ataagtgcca aacccacagg ttcggaggat tgtctatacc tgaatgtgta taccaatgac 360
ttgaacccag acaaaaggcg tcctgttatg gttttcatcc atggcggaga ttttattttc 420
ggcgaagcaa atcgtaactg gtttggtccc gactacttta tgaagaaacc cgtggtcttg 480
gtaaccgtgc aatatcgttt ggggtgtgtg gggttcctta gcctgaaatc ggaaaatctc 540
aatgtccccg gcaacgctgg cctcaaggat caagtaatgg ccttgagatg ggtcaagagt 600
aatattgcca ttttcggtgg cgatgtagac aatattaccg tcttcggcga aagtgtctgt 660
ggggcctcaa ccattacat gatgataacc gaacagaccc gtggtttatt ccatcgtggt 720
atcatgatgt ccggtaatc catgtgctca tgggcctcta cagaatgcca aagtcgtgcg 780
ctcaccatgg ccaaacgtgt tggctataag ggagaggaca atgaaaaaga tatcctggaa 840
ttcctaataa aagccaatcc ctatgatttg atcaaagg agccacaagt tttgacaccc 900
gaaagaatgc aaaataaggt catgtttcct tttggacca ctgtagaacc ataccagaca 960
gccgactgtg tggtaaccaa accaatcaga gaaatggtga agagcgctg gggaaattcg 1020
ataccacat tgataggcaa tacctctac gaaggtttgc tttccaaatc aattgccaaa 1080
caatatccgg aggttgtaaa agagttggaa tcctgtgtga attatgtgcc ttgggagttg 1140
gctgacagtg aacgcagtgc cccggaaccc ctggagagg ctgccattgt gaaaaaggcc 1200
catgtggatg gggaaacacc tactctggat aattttatgg agctttgctc ctatttctat 1260
ttcctcttcc ccatgcatcg ctctctacaa ttgcgcttca accacacagc tggcactccc 1320
atatttttgt atcgtttcga tttcgattcc gaagaaatta ttaaccctta tcgtattatg 1380
cgttttgccc gtggcggttaa aggtgtaagc catgccgatg agctaacct tctcttctgg 1440
aacattttgt cgaaacgcct gccaaaggaa agccgcgaat acaaaacat tgaacgcatg 1500
gttggcattt ggacggaatt cgccaccacc ggcaaaccat acagcaatga tatagccggc 1560
atggaaaacc tcacctggga tcccataaaa aaatccgatg atgtctataa atgtttaaat 1620
atcggcgatg aattgaaagt tatggatttg ccagaaatgg ataaaattaa acaatgggca 1680
agtatattcg ataaaaagaa ggaattgttt

```

10

20

<210> 15

<211> 207

<212> PRT

<213> Musca domestica

<400> 15

```

Gln Thr Asp Phe Ile Ser Gly Lys Pro Thr Gly Ser Glu Asp Cys Leu
  1           5           10           15

Tyr Leu Asn Val Tyr Thr Asn Asp Leu Asn Pro Asp Lys Lys Arg Pro
      20           25           30

Val Met Val Phe Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Phe Gly Glu Ala Asn
      35           40           45

Arg Asn Trp Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Met Lys Lys Pro Val Val Leu
      50           55           60

Val Thr Val Gln Tyr Arg Leu Gly Val Leu Gly Phe Leu Ser Leu Lys
      65           70           75           80

Ser Glu Asn Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
      85           90           95

Met Ala Leu Arg Trp Phe Lys Ser Asn Ile Ala Ile Phe Gly Gly Asp
      100          105          110

Val Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Thr
      115          120          125

```

30

40

His Tyr Met Met Ile Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 130 135 140
 Ile Met Met Ser Gly Asn Ser Met Cys Ser Ser Ala Ser Thr Glu Cys
 145 150 155 160
 Gln Ser Arg Ala Leu Thr Met Ala Lys Arg Val Gly Tyr Lys Gly Glu
 165 170 175
 Glu Asn Glu Lys Asp Ile Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Asn Pro Tyr
 180 185 190
 Asp Leu Ile Lys Glu Glu Pro Gln Val Leu Thr Pro Glu Arg Met
 195 200 205

10

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 16
 ggatggtgtg cgtgattggt g 21

20

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 17
 aaaaggatgt ggtgttgatt a 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

30

<400> 18
 actaatgtcg ggtaatgcta t 21

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 19
 cactatgatg ggtaacactt c 21

40

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

<400> 20
 tgttacagga gaaacaccaa c 21

<210> 21		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 21		
agaatcgcgt gaatacaaaa c	21	
<210> 22		
<211> 21		
<212> DNA		10
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 22		
acggtatacc ctcaaaactg t	21	
<210> 23		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 23		
tcccaaacga tattgtatgt t	21	20
<210> 24		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 24		
acatcatgta gtgggtagaa g	21	
<210> 25		
<211> 21		
<212> DNA		30
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 25		
ccgaggatgt ttgggtaaga c	21	
<210> 26		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 26		
tatcagctgt tgggtgtttct c	21	40
<210> 27		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Lucilia cuprina</i>		
<400> 27		
acgcgattct ttaggcatac g	21	

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

 <400> 28
 tgctgcctct acccactaca t 21

 <210> 29

 <211> 21 10
 <212> DNA
 <213> *Lucilia cuprina*

 <400> 29
 cctgtggcctt ggctttcata a 21

 <210> 30
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 20
 <223> Description of Artificial Sequence: Degenerate
 Primer

 <400> 30
 ttcgagggna tncctaygc nmarccnccn btngg 35

 <210> 31
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 30
 <223> Description of Artificial Sequence: Degenerate
 Primer

 <400> 31
 acytgrtctt tnarncnngc rttncnngn ac 32

 <210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> *Musca domestica*

 <400> 32 40
 tttgggtcccg actactttat ga 22

 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> *Musca domestica*

<400> 33		
tgccacttat gaaatctgtc tgta	24	
<210> 34		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Musca domestica		
<400> 34		
tacatgatga taaccgaaca gacc	24	10
<210> 35		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Musca domestica		
<400> 35		
tcgattattt gggtttcatt tgt	23	
<210> 36		
<211> 21		
<212> DNA		20
<213> Musca domestica		
<400> 36		
acagacagat ttcataagtg g	21	
<210> 37		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Musca domestica		
<400> 37		
tttgcattct ttcgggtgtc a	21	30
<210> 38		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Musca domestica		
<400> 38		
attcgatacc cacattgata g	21	
<210> 39		
<211> 21		
<212> DNA		40
<213> Musca domestica		
<400> 39		
ggcactccca tttatttgta t	21	
<210> 40		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Musca domestica		

<400> 40
 atgacttttc tgaagcaatt cat 23

<210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Musca domestica

<400> 41
 aaacaattcc ttctttttat cga 23

<210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Musca domestica

<400> 42
 ggcatggaaa acctcacctg g 21

<210> 43
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Lucilia cuprina 20

<400> 43
 Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro
 20 25 30
 Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His
 35 40 45
 Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu
 50 55 60
 Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val
 85 90 95
 Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn
 100 105 110
 Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr
 115 120 125
 His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly
 130 135 140
 Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Leu Ala Asn Thr Gln Cys
 145 150 155 160
 Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu
 165 170 175
 Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln
 180 185 190
 Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg
 195 200 205

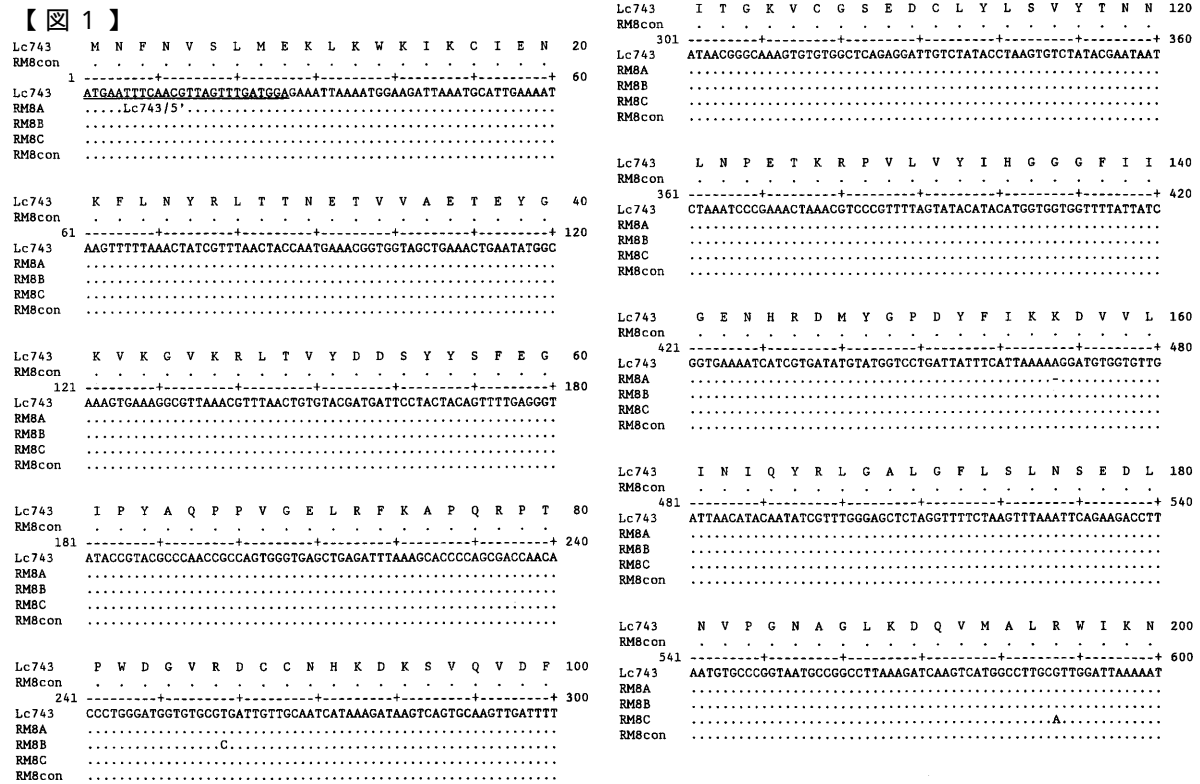


FIGURE 1

Figure 1 continued

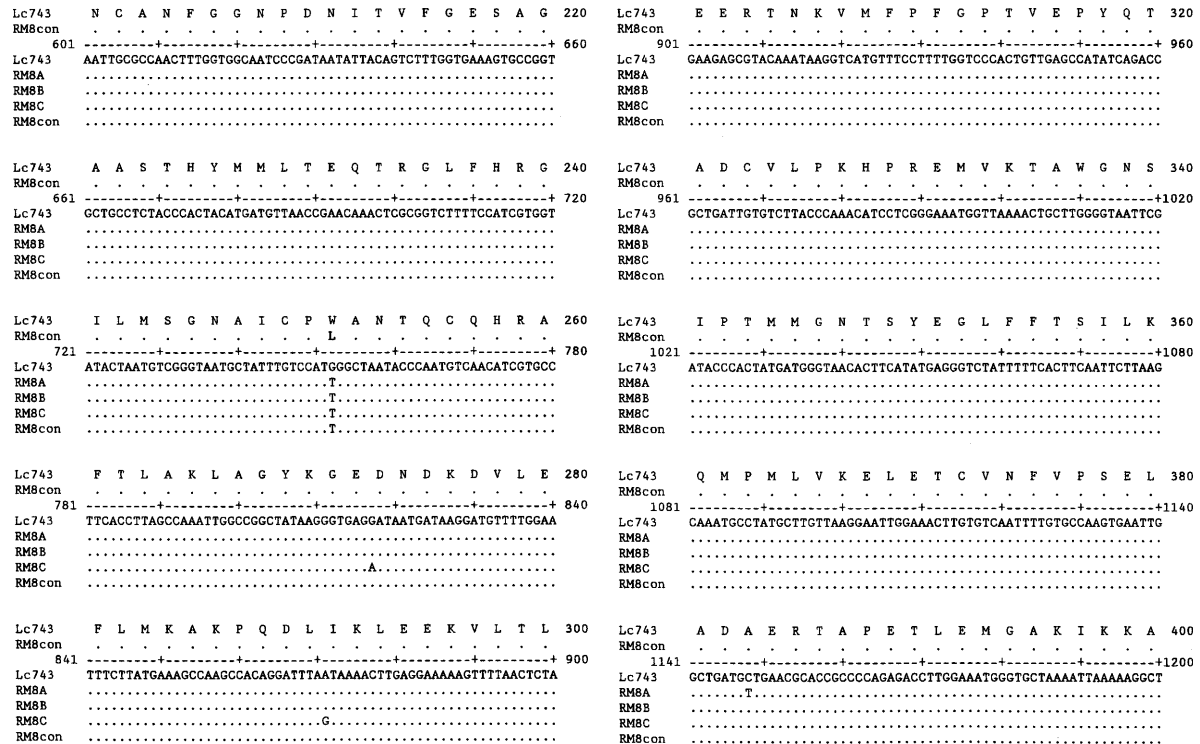


Figure 1 continued

Figure 1 continued

481 GTACCGTCAATATCGTTTGGGTGTGGGTTCCTTAGCCTGAAATCGGAAATCTC
 CATTGGCAGCTTATAGCAACCCACACCAACCAAGGAATCGGACTTAGCCTTTAGAG 540
 V T V Q Y R L G V L G F L S L K S E N L -
 541 AATGTCGCCCGCAACGCTGGCCTCAAGGATCAAGTAATGGCCTTGAGATGGGTCAAGAGT
 TTACAGGGGCGGTGGCAGCGGAGTTCTAGTTTCAATACCGGAACCTACCGCAGTTCTCA 600
 N V P G N A G L K D Q V M A L R W V K S -
 601 AATATTGCCAATTTTCGGTGGGATGTAGACAATATTACCGCTTCGGCGAAAGTGGTGT
 TTATAACGTAAGAACCCACCGCTACATCTGTATATGCGCAGAACCGCTTTCAGCAGCA 660
 N I A I F G G D V D N I T V F G E S A G -
 661 GGGGCCCAACCCATTACATGATGATAACCGAACACCGCGTGGTTTATTCATCGTGGT
 CCCCGGAGTTGGTAATGTACTACTATTGGCTTGTCTGGGCACCAATAAGGTAGCACCA 720
 G A S T H Y M M I T E Q T R G L F H R G -
 721 ATCATGATGTCGGTAATTCATGTGCTCATGGGCTCTACAGAATGCCAAAGTGGTGG
 TAGTACTACAGGCCATTAAGGTACAGGATACCGCGAGATGTCTTACGGTTTCAGCAGCG 780
 I M M S G N S M C S W A S T E C Q S R A -
 781 CTCACCATGGCCAAACGTTGGCTATAAGGAGAGGACAATGAAAAGATATCTGGAA
 GAGTGGTACCGGTTGGCAACCGATATTCCCTCTCGCTTACTTTTCTATAGGACCTT 840
 L T M A K R V G Y K G E D N E K D I L E -
 841 TTCCTAATGAAAGCCATCCCTATGATTGATCAAGAGGAGCCACAACTTTTGACACCC
 AAGGATTACTTTTCGGTTAGGATACCTAACTAGTTTCTCCTCGGTCTCAAACTGTGGG 900
 F L M K A N P Y D L I K E E P Q V L T P -
 901 GAAAGATGCAAAATAAGGTCAATGTTTCCTTTTGGACCCACTGTAGAACCATACAGACA
 CTTTCTTAGGTTTATTCAGTACAAAGGAAACCTGGGTGACATCTTGGTATGGTCTGT 960
 E R M Q N K V M F P F G P T V E P Y Q T -
 961 GCGGACTGTGTGTTACCCAAACCAATCAGAGAAATGGTGAAGAGCGCTGGGGAAATTCG
 CGGCTGACACACCATGGGTTGGTTAGTCTCTTTACCACTTCTCGCGGACCCCTTAAAGC 1020
 A D C V V P K P I R E M V K S A W G N S -

Figure 3 continued

1021 ATACCCACATTGATAGGCAATACCTCCTACGAAGGTTTGGCTTTCCAAATCAATTGCCAAA
 TATGGGTGTAACATCCGTTATGGAGGATGCTTCCAAACGAAAGGTTTATGTTAACGGTTT 1080
 I P T L I G N T S Y E G L L S K S I A K -
 1081 CAATATCCGAGGTTGTAAAGAGTTGGAATCCTGTGTGAATATGTGCCCTTGGGAGTTG
 GTTATAGGCTCGAACATTTTCTCAACCTTAGGACACACTTAATACAGGGAACCCCTCAAC 1140
 Q Y P E V V K E L E S C V N Y V P W E L -
 1141 CCGACAGTGAACGAGTSCCCCGGAAACCCCTGGAGAGGGCTGCCATTGTGAAAAAGGCG
 CGACTGTCACTTGGCTCAGGGGCGCTTGGGACCTCTCCGACGGTAACACTTTTTCGGG 1200
 A D S E R S A P E T L E R A A I V K K A -
 1201 CATGTGGATGGGAAACACCTACTCTGGATAATTTATGGAGCTTGTCTCTATTCTAT
 GTACACCTACCCCTTTGTGGATGAGACCTATTAAATACCTCGAAACGAGGATAAAGATA 1260
 H V D G E T P T L D N F M E L C S Y F Y -
 1261 TTCTCTTCCCATGTCATCGCTTCTACAATTCAGCTTCAACACACAGCTGGCCTCC
 AAGGAGAAGGGGTACGTAGCGAAGGATGTTAACGGAAGTTGCTGTCTGACCGGTGAGGG 1320
 F L F P M H R F L Q L R F N H T A G T P -
 1321 ATTTATTTGTATCGTTTCGATTTCGATTCCGAAGAAATTTATTAACCCCTATCGTATTATG
 TAAATAAACATAGCAAGCTAAAGCTAAGGCTTCTTTAATAATTGGGATAGCATAATAC 1380
 I Y L Y R F D F D S E E I I N P Y R I M -
 1381 CGTTTGGCCGTGGCGTTAAAGGTGTAAAGCATGCCGATGAGCTAACCTATCTCTTGG
 GCAAAACCGGACCGCAATTTCCACATTGCGTACGGCTACTCGATTGGATAGAGAAGACC 1440
 R F G R G V K G V S H A D E L T Y L F W -
 1441 AACATTTTGTGAAACGCTGCGCAAGGAAAGCCGGAATACAAACCAATTGAACGCATG
 TTGTAACAGCTTTCGGGACGGTTTCTTTCGGGCTTATGTTTGGTAACCTGCGTAC 1500
 N I L S K R L P K E S R E Y K T I E R M -
 1501 GTTGGCATTGGACGGAATTCGCCACACCGGCAACCATACAGCAATGATATAGCGGCG
 CAACCGTAAACCTGCCTTAAGCGGTGGTGGCGGTTTGGTATGCTGTACTATATCGGCGG 1560
 V G I W T E F A T T G K P Y S N D I A G -

Figure 3 continued

1561 ATGGAACACCTCACTGGGATCCCATAAAAAATCCGATGATGCTATAAATGTTAAAT
 TACCTTTTGGAGTGGACCTTAGGGTATTTTTTAGGCTACTACAGATATTACAAATTTA 1620
 M E N L T W D P I K K S D D V Y K C L N -
 1621 ATCGGCGATGAATTGAAAGTTATGGATTGCCAGAAATGGATAAAATTAACAATGGGCA
 TAGCGGCTACTTAACTTTCAATACCTAAACGGCTTTACCTATTTAATTGTTACCGCT 1680
 I G D E L K V M D L P E M D K I K Q W A -
 1681 AGTATATTCGATAAAAAAGGAATGTTT
 TCATATAAGCTATTTTCTTCCTTAACAAA 1710
 S I F D K K K E L F

Figure 3 continued

【 4 】

Figure 4.

MdaE7 97 QTDIFSGKPTGSEDCLYLNVYTNLNDLPDKRPVMVFIHGGGFIFGEANRN 146
 LcaE7 97 QVDFITGKVCSEDCLYLSVYTNLNPETKRPVLVYIHGGGFIIENHRD 146
 147 WYGPDPYFMKKPVVLVTQYRLGVLGFLSLKSENLPVGNAGLKDQVMALR 196
 147 MYGPDPYFIKDVLLINIYRLGALGFLSLNSEDLPVGNAGLKDQVMALR 196
 197 WFKSNIAIFGGVDNITVFGESAGGASTHMMITEQTRGLFHRGIMMSGN 246
 197 WIKNVCANFGGNPDNITVFGESAGASTHMMITEQTRGLFHRGIMMSGN 246
 247 SMCSSASTEQSRALTMARVGYKGEENEKDILEFLMKANPYDLIKEEPQ 296
 247 AICPLANTQCHRAFTLAKLAGYKGEDNDKDLLEFLMKAKPDLIKLEEK 296
 297 VLTPERM 303
 297 VLTLEER 303

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/91 (2006.01) C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 R 1:91
C 1 2 N 9/18
C 1 2 R 1:91
- (72)発明者 ラッセル, ロバイン ジョイス
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 3 ワンニアッサ サリヴァン クレセント 2 8
- (72)発明者 ニューコム, リチャード デヴィッド
ニュージーランド オークランド マウント アルバート ルアランギ ロード 1 1 / 2 1
- (72)発明者 キャンベル, ピーター マルコム
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 4 クック ワイバレナ グローヴ 2 5
- (72)発明者 ロビン, ジェフリー シャルル ドゥ ケトゥヴィーユ
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 4 アランダ グンダラ ストリート 1 0
- (72)発明者 クローディアノス, チャールズ
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 5 イザベラ プレーンズ バビンダ プレイス 8 / 1 2
- (72)発明者 スミス, ケリー アン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 3 2 1 0 サイラキューズ ヒューズ プレイス 1 3 7
- (72)発明者 ボイス, トーマス マーク
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 3 2 1 0 サイラキューズ ヒューズ プレイス 1 3 7
- (72)発明者 オークショット, ジョン グラハム
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 3 ワンニアッサ サリヴァン クレセント 2 8
- (72)発明者 ブラウンリー, ジェレミー コリン
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ 2 6 2 0 ヴィア クウィーンビーアン パラ ロード アールエムビー 8 3

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 国際公開第9 5 / 0 1 9 4 4 0 (WO, A 1)
Biochem. Genetics., 1 9 9 4 年, Vol.32 Nos.11/12, p437-453
Biochem. Genetics., 1 9 9 4 年, Vol.32.Nos.1/2, p9-24

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00
BIOSIS(STN)
CA(STN)
WPIDS(STN)
MEDLINE(DIALOG)