

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6942632号

(P6942632)

(45) 発行日 令和3年9月29日 (2021.9.29)

(24) 登録日 令和3年9月10日 (2021.9.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A
A O 1 H 5/00 (2018.01)	A O 1 H 5/00 A
A O 1 H 5/08 (2018.01)	A O 1 H 5/08
A O 1 H 5/10 (2018.01)	A O 1 H 5/10

請求項の数 17 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-538699 (P2017-538699)	(73) 特許権者	501231613
(86) (22) 出願日	平成28年1月21日 (2016.1.21)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(65) 公表番号	特表2018-509138 (P2018-509138A)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン
(43) 公表日	平成30年4月5日 (2018.4.5)		トルイス、ノース・リンドバーグ・プール
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/014344		バード800番、メール・ゾーン・イー1
(87) 国際公開番号	W02016/118762		エヌエイ
(87) 国際公開日	平成28年7月28日 (2016.7.28)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成31年1月8日 (2019.1.8)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	62/106,710	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成27年1月22日 (2015.1.22)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LEPTINOTARSA防除用組成物及びその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物へのレプチノタルサ (Leptinotarsa) 種の侵入を防除する方法であって、

(a) 配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む二本鎖RNA (dsRNA) ポリヌクレオチドと前記レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種とを接触させること：または、

(b) 配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むdsRNAポリヌクレオチドを前記レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種の食餌に提供すること：または、

(c) 配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドを前記レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種の幼虫の食餌に提供することによって前記レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種の幼虫の死滅または成長阻害を招くこと：または、

(d) 配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドを含む組成物を前記植物に局所投与すること：または

(e) 前記植物に少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドを含む組成物を局所投与することであって、有効量の前記ポリヌクレオチドを前記植物上で前記植物を餌にしているレプチノタルサ (Leptinotarsa) 種に摂餌させるような方法で局所投与することであり、前記少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドが配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、前記ポリヌクレオチドを含む前記組成物を局所投与すること：または

10

20

(f) 配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのdsRNAをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを前記植物中に発現させること：または、

(g) 配列番号：1117～1119からなる群から選択される配列に同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを前記植物に提供すること：または、

(h) 前記レプチノタルサ (*Leptinotarsa*) 種を配列番号：1117～1119からなる群から選択される有効量の二本鎖RNAと接触させることであって、RNA干渉が誘導され、死滅が発生する、有効量の二本鎖RNAと接触させること

：を含む方法。

10

【請求項2】

前記少なくとも1つの二本鎖RNAは、化学合成されるか、または微生物中での発現若しくは植物細胞中での発現によって産生される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法は、配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドを含む組成物を前記植物に局所投与することを含み；前記組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項4】

前記方法は、前記レプチノタルサ (*Leptinotarsa*) 種を有効量の少なくとも1つの二本鎖RNAを含有する溶液と接触させることを含み、前記少なくとも1つの二本鎖RNAは、配列番号：1117～1119からなる群から選択される配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記溶液は、オルガノシリコーン界面活性剤または陽イオン性脂質からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記方法は、前記植物に配列番号：1117～1119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのdsRNAポリヌクレオチドを含む組成物を局所投与することであって、有効量の前記ポリヌクレオチドを、前記植物上で前記植物を餌にしているレプチノタルサ (*Leptinotarsa*) 種に摂餌させるような方法で局所投与することを含み、前記レプチノタルサ (*Leptinotarsa*) 種は、レプチノタルサ・デセムリネアータ (*Leptinotarsa decemlineata*) である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項7】

前記レプチノタルサ (*Leptinotarsa*) 種は、レプチノタルサ・ベヘレンシ (*Leptinotarsa behrensi*)、レプチノタルサ・コリンシ (*Leptinotarsa collinsi*)、レプチノタルサ・デセムリネアータ (*Leptinotarsa decemlineata*) (Colorado potato beetle)、レプチノタルサ・デフェクタ (*Leptinotarsa defecta*)、レプチノタルサ・ハルデマニ (*Leptinotarsa haldemani*) (Haldeman's green potato beetle)、レプチノタルサ・ヘイデニ (*Leptinotarsa heydeni*)、レプチノタルサ・ジャンクタ (*Leptinotarsa juncta*) (false potato beetle)、レプチノタルサ・リネオラータ (*Leptinotarsa lineolata*) (burrobrush leaf beetle)、レプチノタルサ・ペニンスラリス (*Leptinotarsa peninsularis*)、レプチノタルサ・ルビギノーサ (*Leptinotarsa rubiginosa*)、レプチノタルサ・テキサナ (*Leptinotarsa texana*)、レプチノタルサ・トラスカラナ (*Leptinotarsa tlascalana*)、レプチノタルサ・ツマモカ (*Leptinotarsa tumamoca*)、及びレプチノタルサ・タイポグラフィカ (*Leptinotarsa typographica*) からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

40

【請求項8】

請求項1の (d)、請求項1の (e) または請求項1の (f) に記載の方法によって提供

50

される、レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種の侵入に対する改善された耐性を有する植物、または前記植物の果実、種子、若しくは伝播生殖部分。

【請求項 9】

前記植物は、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される、請求項8に記載の植物。

【請求項 10】

レプチノタルサ (Leptinotarsa) 種を防除するための殺虫性組成物であって、前記殺虫性組成物が、配列番号：1117、1118および1119からなる群から選択される配列を含む殺虫性有効量の少なくとも1つの二本鎖RNAを含む、前記殺虫性組成物。

【請求項 11】

前記殺虫性組成物は、固体、液体、粉体、懸濁液、乳剤、噴霧剤、封入形態、マイクロビーズ、キャリア微粒子、フィルム、基質、種子処理剤、土壌灌水、植付可能配合物、及びインファロー配合物からなる群から選択される少なくとも1つの形態である、請求項10に記載の殺虫性組成物。

【請求項 12】

前記組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質、オルガノシリコン、オルガノシリコン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される少なくとも1つの成分を更に含む、請求項10に記載の殺虫性組成物。

【請求項 13】

異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体であって、前記異種プロモーターは、配列番号：1117、1118および1119またはこれらの相補体からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNAをコードするDNA、に操作可能に連結されている、組換え型DNA構造体。

【請求項 14】

請求項13に記載の組換え型DNA構造体を含む、植物染色体。

【請求項 15】

ゲノム内に請求項13に記載の前記組換え型DNA構造体を有するトランスジェニックナス科植物細胞。

【請求項 16】

前記トランスジェニックナス科植物細胞は、ゲノム内に、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、バチルス・チューリングエンシス (Bacillus thuringiensis) 殺虫タンパク質、ゼノルハブダス (Xenorhabdus) 殺虫タンパク質、フォトルハブダス (Photorhabdus) 殺虫タンパク質、バチルス・ラテロスポラス (Bacillus laterosporous) 殺虫タンパク質、及びバチルス・スファエリカス (Bacillus sphaericus) 殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤をコードするDNAを更に有する、請求項15に記載のトランスジェニックナス科植物細胞。

【請求項 17】

請求項15に記載のトランスジェニックナス科植物細胞を含むトランスジェニックナス科植物、または、前記トランスジェニックナス科植物の果実、種子、若しくは伝播生殖部分。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照及び配列表の組み込み 本出願は、参照によってその全体が本明細書に援用される2015年1月22日出願の米国仮特許出願第62/106, 710号に対する優先権を主張する。ファイル「P34157W001__SEQ. txt」(2, 558, 678バイト、2016年1月20日作成)に記載されている配列表は、参照によってその全体が本明細書に援用される。

【0002】

特に植物において、無脊椎有害生物、並びにこうした方法に有用な組成物、ポリヌクレオチド、及び組換え型DNA構造体を防除する方法が開示されている。より具体的には、本

10

20

30

40

50

発明は、害虫において、特にRNA干渉を介して、遺伝子の発現を改変するために、ポリヌクレオチド及びその使用方法に関する。対象の害虫種としては、特に作物に侵入するLeptinotarsa種が挙げられる。

【背景技術】

【0003】

商業用の作物は、多くの場合、昆虫など、無脊椎有害生物による攻撃の標的である。植物において、昆虫の侵入を防除するための組成物は、典型的には、化学的殺虫剤の形態であった。しかし、化学的殺虫剤を使用するには、いくつかの欠点がある。例えば、化学的殺虫剤は、一般に、選択性ではなく、作物中において害虫を防除することを意図する化学的殺虫剤を使用することにより、非標的昆虫並びに他の無脊椎動物に影響を及ぼす可能性がある。化学的殺虫剤は、多くの場合、その環境に留まり、緩徐に分解されるため、潜在的に食物連鎖において累積される可能性がある。更に、持続的殺虫剤の使用により、標的昆虫種において耐性の発現をもたらす得る。このため、植物上または植物中において昆虫の侵入を防除又は根絶するためのより環境に優しい方法、すなわち、種選択性、環境上不活性、非永続的生分解性であり、害虫耐性管理スキームに確実に適合する方法が必要であると長年考えられている。

【0004】

RNA干渉(RNAi、RNA-媒介遺伝子抑圧)は、有害生物の防除に使用される別の方法である。無脊椎動物では、まず線虫においてRNAi系遺伝子抑圧が認められた(Fire et al., (1998) Nature, 391:806-811; Timmons & Fire (1998) Nature, 395:854)。その後、種々の昆虫分類群及び線虫分類群の農業的にまたは経済的に重要である害虫など、多数の種において、組換え型核酸技術を使用した無脊椎動物の遺伝子のRNAi系抑圧が報告された。

【0005】

Leptinotarsa種は、多くのナス科植物(例えば、ジャガイモ、トマト、ナス、コショウ、タバコ、及びペチュニア)など、商業的に重要な植物に侵入する多数の種を含む属を形成する。例えば、Leptinotarsa decemlineata(コロラドハムシ(Colorado potato beetle), CPB)は、ジャガイモなどのナス科植物に影響を及ぼす春から初夏の害虫である。Colorado potato beetlesは主に植物の地表上部分を餌にし、落葉により、塊茎収量が低下する。害虫、特に、作物に侵入するLeptinotarsa種を防除するための方法及び組成物が所望される。

【発明の概要】

【0006】

本発明の実施形態は、Leptinotarsa種、特に経済的にまたは農業的に重要な害虫であるLeptinotarsa種の抑制に関する。さまざまな実施形態では、Leptinotarsa種は、Leptinotarsa behrensi、Leptinotarsa collinsi、Leptinotarsa decemlineata(Colorado potato beetle)、Leptinotarsa defecta、Leptinotarsa haldemani(Haldeman's green potato beetle)、Leptinotarsa heydeni、Leptinotarsa juncta(false potato beetle)、Leptinotarsa lineolata(burrobrush leaf beetle)、Leptinotarsa peninsularis、Leptinotarsa rubiginosa、Leptinotarsa texana、Leptinotarsa tlascala、Leptinotarsa tumamoca、及びLeptinotarsa typographicaからなる群から選択される少なくとも1つである。特定の実施形態では、Leptinotarsa種は、Leptinotarsa decemlineata(Colorado potato beetle)、Leptinotarsa juncta(false potato beetle)、Leptinotarsa haldemani(Haldeman's green potato beetle)、及びLeptinotarsa lineolata(burrobrush leaf beetle)からなる群から選択される。

【0007】

本明細書に記載される組成物及び方法は、Leptinotarsa種の侵入に耐性のあるトランスジェニック植物を産生するための組換え型DNA構造体などの組換え型ポリヌクレオチド分子、及びLeptinotarsa種による植物への侵入を防除するまたは阻止するために有用である本明細書において「トリガー」とも称される一本鎖または二本鎖DNAまたはRNA分子を含む

。いくつかの実施形態では、Leptinotarsa種による植物への侵入を防除するまたは阻止するために、局所に投与される薬剤として、ポリヌクレオチドトリガーが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドトリガーが発現しているトランスジェニックナス科植物（例えば種子、または塊茎などの伝播生殖部分）など、Leptinotarsa種による侵入への耐性が改善されているナス科植物が提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドトリガー（例えば、dsRNA分子溶液を噴霧したナス科植物など）を含有する組成物で局所処理されたナス科植物（種子または塊茎などの伝播生殖部分など）が提供される。また、Leptinotarsa種による侵入から保護されるように、Leptinotarsa種または食物、食物部分、または種子に局所的に投与されるポリヌクレオチド含有組成物を提供する。

【0008】

いくつかの実施形態は、Leptinotarsa種におけるポリヌクレオチドトリガーによる、標的遺伝子の抑制に関する。いくつかの実施形態は、Leptinotarsa種のRNAi-媒介防除のために効果的な標的となる可能性のあるLeptinotarsa標的遺伝子の選択方法に関する。いくつかの実施形態では、RNAi媒介抑制のために選択された標的遺伝子は、Leptinotarsa種ゲノムにおける非反復性及び非重複性遺伝子であるか、または低いヌクレオチド多様性を有するか、または非同義的 (K_a) ヌクレオチドの変化よりも同義的 (K_s) ヌクレオチドの変化を有するように進化的若しくは機能的に拘束された遺伝子である。本明細書に提供するのは、本明細書において「標的遺伝子配列群」と称されるヌクレオチド配列であり、配列番号：1~725及び配列番号：726~830及び配列番号：1087~1094から構成される。また、本明細書に提供するのは、本明細書において「トリガー配列群」と称されるヌクレオチド配列であり、配列番号：831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、989、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1049、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、及び1126から構成される。

【0009】

一態様では、Leptinotarsa種を、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントとの約95%同一性~約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチド（例えば、100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント）のうちの少なくとも1つのセグメントを含むポリヌクレオチドと接触させることを含む、植物へのLeptinotarsa種の侵入を防除する方法。一実施形態において、植物へのLeptinotarsa種の侵入を防除する方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1~725、配列番号：726~729、配列番号：731~806、配列番号：808~830、及び配列番号：1087~1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドとLeptinotarsa種とを接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドとの接触は、ポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチド（訳抜け）を含有する組成物若しくは溶液を直接Leptinotarsa種若しくはLeptinotarsa種が接触する表面または基質（例えば植物または土壌）に対して局所投与することによって達成される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドとの接触は、Leptinotarsa種によって摂取されるポリヌクレオチドを提供することによって達成される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドとの接触は、発現するトランスジェニック植物をLeptinotarsa種に提供することによって達成される。

【0010】

いくつかの実施形態は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントとの約95%同一性～約100%同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメント（例えば、100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチド）を含むポリヌクレオチドを含む薬剤をLeptinotarsa種の食餌に提供することによって、植物へのLeptinotarsa種の侵入を防除する方法に関し、その薬剤は、Leptinotarsa種による摂餌時に作用して、Leptinotarsa種内での生物学的機能を阻害し、これによってLeptinotarsa種による侵入を防除する。一実施形態において、植物へのLeptinotarsa種の侵入を防除する方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドをLeptinotarsa種の食餌に提供することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含有する本薬剤は、例えば、噴霧可能な溶液または乳化剤、タンクミックスまたは散剤などにおいて、作物の産地に投与するために配合される。いくつかの実施形態では、その薬剤は、例えば、微生物発酵産物の形態で、またはトランスジェニック植物に発現させて、生物学的に産生される。

10

【0011】

別の態様では、Leptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害を引き起こす方法が提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのRNAは、Leptinotarsa種幼虫の食餌に提供され、Leptinotarsa種幼虫によるRNAの摂餌により、Leptinotarsa種幼虫の死滅または阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的であり、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群中の遺伝子からなる群から選択される。一実施形態において、Leptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害を引き起こす方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的な21の近接ヌクレオチドを含む少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを幼虫の食餌に提供することを含む。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態は、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのRNAをLeptinotarsa種の食餌に提供することを含む、Leptinotarsa種の死滅または生殖能の低下を引き起こす方法に関し、Leptinotarsa種によるRNAの摂餌は、Leptinotarsa種における死滅及び生殖能力の低下を招く。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群内の遺伝子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本方法は、変態率の低下または摂食活動の低下を招く。いくつかの実施形態では、本方法は、増大されたLeptinotarsa種による侵入への耐性を有する植物を提供するために有用である。

20

30

40

【0012】

複数の実施形態は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントとの約95%同一性～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメント（例えば、100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント）を有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む、増大されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法に関する。一実施形態では、改善されたLeptinotarsa種の侵入へ

50

の耐性を有する植物を提供する方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む。一実施形態では、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法は、有効量のポリヌクレオチドを植物上で摂餌しているLeptinotarsa種に摂餌させる方法で、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含み、ポリヌクレオチドは、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。複数の実施形態は、例えば、噴霧可能な溶液または乳化剤、タンクミックスまたは散剤などにおいて、作物の産地に投与するために配合されるポリヌクレオチドを含有する組成物に関する。

10

【0013】

複数の実施形態は、Leptinotarsa種を防除するために、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントと本質的に同一であるかまたは相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメント（例えば、100%同一性または相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント）を含む、殺虫剤として有効な量の少なくとも1つのポリヌクレオチド分子を含む殺虫性組成物に関する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、組換え型ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、二本鎖RNAである。関連する実施形態としては、例えば、噴霧可能な溶液または乳化剤、タンクミックスもしくは散剤において、作物の産地に投与するために配合された、ポリヌクレオチド分子を含有し、また任意により1つ以上の更なる構成成分を含む、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド農薬、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤などの殺虫性組成物が挙げられる。

20

30

【0014】

いくつかの実施形態は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である（例えば、100%同一性または相補性である配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント）18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法に関する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。

40

【0015】

複数の実施形態は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントに約95%同一性～約100%同一性の配列を有する、18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメント（例えば、100%同一性の配列を

50

有する21の近接ヌクレオチドのセグメント)を含む、DNA成分に操作可能に結合される異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体に関する。いくつかの実施形態では、DNA成分は、二本鎖RNAをコードする。いくつかの実施形態では、二本鎖RNAは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。関連する実施形態としては、植物染色体または色素体または組換え型植物ウイルスベクトルまたは組換え型DNA構造体を含むか、または異種プロモーターを含有せずにDNA成分を含む組換え型バキュロウイルスベクターが挙げられる。

【0016】

複数の実施形態は、そのゲノム内に、RNAと接触するかまたは摂餌するLeptinotarsa種内での標的遺伝子の発現を抑制する組換え型DNAコードRNAを有する、トランスジェニックナス科植物細胞に関し、RNAは、標的遺伝子のフラグメントに相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのサイレンシング要素を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群から選択される。特定の実施形態は、エクソシスト遺伝子、リボソームタンパク質遺伝子、及びプロテアソーム遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子の発現をサイレンシングするために、そのゲノム内に組換え型DNAコードRNAを有する、トランスジェニックナス科植物細胞である。いくつかの実施形態では、RNAは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。

【0017】

複数の実施形態は、Leptinotarsa種によって摂餌されるか、または接触されたときに、Leptinotarsa種の死滅または成長の障害を引き起こす孤立した組換え型RNA分子に関し、組換え型RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有する対応DNAフラグメントと本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメント(例えば、100%相補的である配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント)を含む。いくつかの実施形態では、組み換え型RNA分子は、二本鎖RNAである。特定の実施形態としては、リボソームL7タンパク質または配列番号:730によってコードされたタンパク質など、のリボソームタンパク質の発現を抑制するための孤立された組換え型二本鎖RNAが挙げられ、孤立された組換え型二本鎖RNA分子は配列番号:989、988、1104または1105からなる群から選択された配列を有する。

【0018】

いくつかの実施形態は、標的遺伝子配列群から選択される標的遺伝子の対応フラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である(例えば、100%同一性または相補性である配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント)18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に提供することを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法に関する。一実施形態では、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法は、標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドまたは標的遺伝子から転写されたRNAに同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に提供することを含み、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。

【0019】

複数の実施形態は、標的遺伝子配列群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さである対応フラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメント(例えば、100%同一性または相補性である配列を有する21の近接ヌクレオチドのセグメント)を含むポリヌクレオチドとLeptinotarsa種を接触させることを含む、Leptinotarsa種の植物への侵入を防除するための方法に関する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。一実施形態では、Leptinotarsa種の植物への侵入を防除するための方法は、Leptinotarsa種を有効量の二本鎖RNA

と接触させることを含み、そのうちの1本の鎖は、リボソームタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であり、RNA干渉が誘導され、死滅が発生する。いくつかの実施形態では、二本鎖RNAは、トリガー配列群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む。

【0020】

複数の実施形態は、植物ゲノムからまたは動物ゲノムからRNAi—媒介動物ゲノムからRNAiを行うための標的遺伝子の選択方法に関する。さまざまな実施形態において、本方法により、特定のゲノムにおいて、単一のまたは複製数の少ない（非反復性及び非重複性）中で存在する、または低ヌクレオチド多様性を有するか、または同義（ K_s ）ヌクレオチド対非同義（ K_a ）ヌクレオチドの比率の変化（ $K_s \gg K_a$ ）を有する、標的遺伝子のサブセットを提供する。

10

【0021】

複数の実施形態は、本明細書に記載されるように、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む人工組成物に関する。いくつかの実施形態では、Leptinotarsa種の侵入から保護する必要のある植物または物質への局所投与に有用な配合物が提供される。いくつかの実施形態では、トランスジェニックナス科植物細胞及びトランスジェニックナス科植物の産生に有用な組換え型構造体及びベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ナス科植物、ナス科植物種子または塊茎などの伝播生殖部分の処理に有用な配合物及びコーティング剤が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドによって処理されたか、またはポリヌクレオチドをコーティングされたこうしたナス科植物、種子または伝播生殖部分（特に、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドの検出可能性を有する商品生産物及び食料品）から作製された商品生産物及び食料品が提供される。複数の実施形態は、標的遺伝子配列群から選択された配列または標的遺伝子配列群から選択された配列のフラグメントによってコードされたたんぱく質に結合されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体に関する。別の態様は、トリガー配列またはこれらの補体から選択される配列または配列のフラグメントによってコードされたタンパク質に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体に関する。このような抗体は、当業者に公知の常用方法によって産生される。

20

【0022】

本明細書に記載のさまざまな実施形態では、植物は、Leptinotarsa種による侵入を受けている任意の植物である。特に興味深いのは、植物がナス科植物（ナス科族）である実施形態である。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される植物が挙げられる。実施形態は、植物が、不発芽ナス科植物種子、休止期のナス科植物または生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態は、植物が「種芋」であり、伝播されて新規ジャガイモ植物になり得るジャガイモの塊茎またはジャガイモの塊茎の一片を意味する実施形態を含む。

30

【0023】

本発明の他の態様及び特定の実施形態は、以下の発明を実施するための形態に詳細に開示する。

【発明を実施するための形態】

40

【0024】

別に定義されていない限り、本発明の属する当業者に一般に理解されたとおり、使用されるすべての技術用語及び科学用語は、同一の意味を有する。用語が単数形で示されている場合、発明者は、その用語の複数形によって記述された本発明の態様も意図する。参照によって援用される参考文献に使用される用語及び定義に不一致がある場合、本出願にて使用される用語は、明細書に付与された定義を有するものとする。使用される他の専門用語は、各種分野特有の辞書、例えば、「The American Heritage (登録商標) Science Dictionary」(Editors of the American Heritage Dictionaries, 2011, Houghton Mifflin Harcourt, Boston and New York)、「McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms」(6th edition, 2002, McGraw-Hill, New York

50

）、または「Oxford Dictionary of Biology」(6th edition, 2008, Oxford University Press, Oxford and New York)によって例示されるとおり、使用されている分野における通常の意味を有する。本発明は、作用の機序または様式を限定することを意図するものではない。明細書への参照は、図示する目的のためにのみ提供される。

【0025】

別段の記載がないかぎり、5'から3'の方向へ、左から右に読むときに、本明細書に本文の核酸配列が付与される。当業者は、DNAのチミン(T)ヌクレオチドをウラシル(U)ヌクレオチドに置換する場合を除き、付与されたDNA配列は、DNA配列に同一である対応RNA配列を定義しているものと理解されることを認識するものとする。したがって、正確なRNA等価物を定義するために、特定のDNA配列が提供されることが理解される。DNAまたはRNAのいずれかの所与の第1のポリヌクレオチド配列は、ワトソン・クリック型塩基対を形成することによって、第1のポリヌクレオチドに完全にハイブリッド形成させる第2のポリヌクレオチドとのその正確な補体の配列(DNAまたはRNAであってもよい)を更に定義する。DNA:DNA二重鎖(ハイブリッド鎖)塩基対については、アデニン:チミンまたはグアニン:シトシンであり、DNA:RNA二重鎖塩基対は、アデニン:ウラシルまたはグアニン:シトシンである。したがって、完全にハイブリッドされている(鎖間が「100%相補性」であるか、または、鎖が「相補的」である)平滑末端二本鎖ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、DNAまたはRNAのいずれかとして付与されているかに関わらず、一本鎖のヌクレオチド配列を提供することによって明瞭に定義される。標的遺伝子または標的遺伝子のフラグメントに「本質的に同一である」または「本質的に相補的である」ことは、ポリヌクレオチド鎖(または二本鎖ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つの鎖)が、標的遺伝子若しくは標的遺伝子のフラグメント、標的遺伝子若しくは標的遺伝子のフラグメントの転写物に対してハイブリッド形成される(生きている植物または動物細胞に認められるなど、一般に生理学的条件下において)ように設計されていることを意味し、当業者は、こうしたハイブリッド形成は、必ずしも100%配列の同一性または相補性に必要ではないことを理解しているものとする。第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係において配置されると、第1の核酸配列は、第2の核酸配列に「操作可能に」連結されるか、または「結合」される。例えば、プロモーターがDNAの転写または発現のために提供される場合、プロモーター配列は、DNAに「操作可能に結合」される。一般に、操作可能に結合されたDNA配列は連続的である。

【0026】

用語「ポリヌクレオチド」は、一般に、複数のヌクレオチドを含有するDNA分子またはRNA分子を意味し、一般に、「オリゴヌクレオチド」(長さ18~25のヌクレオチドであるポリヌクレオチド分子)及び26以上のヌクレオチドである更に長いポリヌクレオチドの両者を指す。また、ポリヌクレオチドは、当業者において一般に実施されているとおり、非正準ヌクレオチドまたは化学的修飾ヌクレオチドなど、複数のヌクレオチドを含む分子を含む。例えば、技術マニュアルに開示されている化学的修飾「RNA Interference (RNAi)

and DsiRNAs」、2011(Integrated DNA Technologies Coralville, IA)を参照されたい。一般に、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか、若しくはその両方、及び一本鎖または二本鎖のいずれか)は、標的遺伝子のDNAの同等サイズのフラグメントまたは標的遺伝子のRNA転写物に本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメント(または、二本鎖ポリヌクレオチドの場合、少なくとも18の近接塩基対)を含む。本開示全体において、「少なくとも18の近接」とは、「約18~約10,000を意味し、その間のすべての整数点を含む。」したがって、本発明の実施形態としては、18~25のヌクレオチドの長さ(18-mer、19-mer、20-mers、21-mer、22-mer、23-mer、24-merまたは25-mer)、若しくは26以上のヌクレオチドの長さを有する中程度の長さのポリヌクレオチド(ポリヌクレオチド26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170

、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、または約300のヌクレオチド）、または、300ヌクレオチド超の長さ（例えば、長さ300～約400ヌクレオチド、約400～約500ヌクレオチド、約500～約600ヌクレオチド、約600～約700ヌクレオチド、約700～約800ヌクレオチド、約800～約900ヌクレオチド、約900～約1000ヌクレオチド、約300～約500ヌクレオチド、約300～約600ヌクレオチド、約300～約700ヌクレオチド、約300～約800ヌクレオチド、約300～約900ヌクレオチド若しくは約1000ヌクレオチドのポリヌクレオチド、または例えば、標的遺伝子の全長以下コード若しくは非コードまたは標的遺伝子のコードと非コード両方など約1000も超えるヌクレオチドの長さを有するポリヌクレオチド）を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。ポリヌクレオチドが二本鎖である場合、その長さは、塩基対に関して記載されているものと類似していてもよい。

10

【0027】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、一本鎖（ss）または二本鎖（ds）であってもよい。「二本鎖」とは、概して、生理学的に関連のある条件下で二本鎖核酸構造体を形成するために十分に相補的である逆平行ヌクレオチド鎖間で発生する塩基対形成を指す。実施形態は、ポリヌクレオチドが、センス一本鎖DNA（ssDNA）、センス一本鎖RNA（ssRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、二本鎖DNA（dsDNA）、二本鎖DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスssDNAまたはアンチセンスssRNAからなる群から選択される実施形態を含み、任意のこれらの型のポリヌクレオチドの混合型を使用することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、自然調節小分子RNA（内因性siRNA及び成熟miRNAなど）の典型的な長さを超える長さの二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、長さが少なくとも約30である近接塩基対の二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、約50～約500塩基対の長さを有する二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドとしては、標準リボヌクレオチド以外の構成成分を挙げることができる。例えば、実施形態は、末端デオキシリボヌクレオチドを含むRNAである。

20

【0028】

さまざまな実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、DNA及びRNA中に産生するものなど、天然ヌクレオチドを含む。ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとを組み合わせたもの、例えば、主にリボヌクレオチドからなるが、1つ以上の末端デオキシリボヌクレオチドを有する合成ポリヌクレオチド、若しくは1つ以上の末端ジデオキシリボヌクレオチドまたは主にデオキシリボヌクレオチドからなるが、1つ以上の末端ジデオキシリボヌクレオチドを有する合成ポリヌクレオチドである。ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドは、イノシン、チオウリジン、またはプソイドウリジンなど、非正準的なヌクレオチドを含む。ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドは、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの例は、当業者に周知であり、例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許公報第2011/0171287号、米国特許公報第2011/0171176号、米国特許公報第2011/0152353号、米国特許公報第2011/0152346号及び米国特許公報第2011/0160082号を参照されたい。例示的实施例としては、これらに限定されるものではないが、ホスホロチオネート、ホスホロジチオネートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合の修飾によって部分的にまたは完全に修飾され得るオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの天然ホスホジエステル骨格が挙げられ、修飾ヌクレオチド塩基または改変糖は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド合成中に使用することができ、また、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、蛍光性部分（例えば、フルオレセインまたはローダミン）または他のラベル（例えば、ビオチン）で標識化することができる。

30

40

【0029】

複数の実施形態は、DNAまたは標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配

50

列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、近接ヌクレオチド数が少なくとも18（例えば、18～24、18～28、20～30または20～50、または20～100、または50～100、または50～500または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはこれ以上）である。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、近接ヌクレオチド数が18以上、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500または500超）である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸（例えば、dsRNA）であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそのDNA相補性から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対を含むように塩基対として発現している。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド内に収容された各セグメントは、自然調節小分子RNA典型的な長さを超える長さであり、例えば、各セグメントは、長さが少なくとも約30の近接ヌクレオチド（または塩基対）である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド内に収容されるポリヌクレオチドの合計長さまたは各セグメントの長さは、標的遺伝子配列群から選択させる配列を有するDNAまたは標的遺伝子の長さ未満である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの合計長さは、約50～約500のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチド）または塩基対（二本鎖ポリヌクレオチド）である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーの長さのdsRNAなど、約100～約500の塩基対のdsRNAである。実施形態としては、植物に発現するポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはその相補性の群から選択される配列を有するセグメントを含むRNAである実施形態であるか、または配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンである実施形態が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、植物中に発現する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、典型的には、食物またはLeptinotarsa種の表面に提供される。

【0030】

複数の実施形態は、種標的因子の調節または抑制を誘導することによって発現を調節するように設計されているポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、Leptinotarsa種標的遺伝子またはcDNA（例えば、標的遺伝子配列群）のヌクレオチド配列またはLeptinotarsa種標的遺伝子から転写され、コード配列または非コード列であり得るRNAの配列に本質的に同一であるかまたは本質的に相補的であるヌクレオチド配列を有するように設計されている。発現の調節に効果的なこれらのポリヌクレオチド分子は、本明細書において、「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチドトリガー」「トリガー」または「トリガー（複数可）」と称される場合もある。

【0031】

任意のサイズの効果的なポリヌクレオチドは、本明細書に記載のさまざまな方法及び組成物を単独で、または組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、単一のポリヌクレオチドトリガーを使用して組成物を作製する（例えば、トランスジェニック植物を作製するために有用な局所投与用組成物または組換え型DNA構造体）。他の実施形態では、ポリヌクレオチドトリガーが単一標的遺伝子用または複数の標的遺伝子用であり得る場合、異なるポリヌクレオチドトリガーの混合または貯蔵を使用する。

【0032】

本発明で使用する場合、用語「単離された」は、自生または天然状態において、通常、関連している他の分子から分子を単離することを指す。このため、用語「単離された」は、自生または天然状態において、通常、関連している他のDNA分子（複数可）から単離されたDNA分子を指してもよい。こうしたDNA分子は、組換え型DNA分子など、組換え型中に存在してもよい。したがって、例えば、組換え技術の結果として、通常、関連のない調節またはコード配列に融合したDNA分子は、導入遺伝子として細胞の染色体に一体化しているとき、または他のDNA分子と共に存在しているときでも単離していると考えられる。

【0033】

本明細書で使用する時、用語「標的遺伝子配列群」は、配列番号：1～725及び配列番号：726～830及び配列番号：1087～1094）からなる配列の群を指す。本明細書で使用する時、「トリガー配列群」は、配列番号：831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、989、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1049、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、及び1126からなる配列群を指す。

【0034】

さまざまな実施形態では、*Leptinotarsa*種は、*Leptinotarsa behrensi*、*Leptinotarsa collinsi*、*Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle)、*Leptinotarsa defecta*、*Leptinotarsa haldemani* (Haldeman's green potato beetle)、*Leptinotarsa heydeni*、*Leptinotarsa juncta* (false potato beetle)、*Leptinotarsa lineolata* (burrobrush leaf beetle)、*Leptinotarsa peninsularis*、*Leptinotarsa rubiginosa*、*Leptinotarsa texana*、*Leptinotarsa tlascalana*、*Leptinotarsa tumamoca*、及び*Leptinotarsa typographica*からなる群から選択される少なくとも1つである。特定の実施形態では、*Leptinotarsa*種は、*Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle)、*Leptinotarsa juncta* (false potato beetle)、*Leptinotarsa haldemani* (Haldeman's green potato beetle)、及び*Leptinotarsa lineolata* (burrobrush leaf beetle) からなる群から選択される。

ポリヌクレオチドとの接触によるLEPTINOTARSAの侵入の防除

【0035】

本明細書で、標的遺伝子配列群またはDNA補体からなる群から選択されるDNAまたは標的遺伝子の対応フラグメントとの約95%同一性～約100%同一性または相補性を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むポリヌクレオチドと*Leptinotarsa*種との接触による*Leptinotarsa*の植物への侵入の防除方法を提供する。一実施形態では、*Leptinotarsa*の植物への侵入の防除方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、またはそれらのDNA補体からなる群から選択されるDNA配列を有する標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドと*Leptinotarsa*種と接触することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。実施形態は、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはその補体からなる群から選択される配列を含むdsRNAである実施形態であるか、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態が挙げられる。一実施形態において

、植物へのLeptinotarsa種の侵入を防除する方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドとLeptinotarsa種と接触させることを含む。実施形態としては、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択させる配列を有する鎖を含むdsRNAである実施形態が挙げられる。いくつかの実施形態では、本方法では、配列番号：825によってコードされる標的遺伝子の127の近接ヌクレオチドのアンチセンス（逆相補性）配列である127の近接ヌクレオチド（配列番号：831）の1つのセグメントを含むヌクレオチドを使用する。いくつかの実施形態では、本方法は、配列番号：732によってコードされた標的遺伝子のそれぞれ409及び403の近接ヌクレオチドのアンチセンス（逆相補性）配列である409及び403の近接ヌクレオチド（それぞれ、配列番号：937及び配列番号：938）のセグメントを含むポリヌクレオチドを使用する。本方法において有用なポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子のために設計され得る。本発明の関連態様としては、本方法において有用な単離ポリヌクレオチド、及び本方法により提供された改善されたLeptinotarsa耐性を有する植物が挙げられる。

【0036】

いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、配列番号：1～725及び配列番号：726～830及び配列番号：1087～1094またはこれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと确实（100%）に同一である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する全体の配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、またはそれらのDNA補体からなる群から選択されるDNA配列を有する標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性を有する21の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに加えて、「中立」配列（標的遺伝子と配列同一性または相補性を持たない配列）を含み、このため、ポリヌクレオチドは、全体として、標的遺伝子との同一性が全体的にかなり低い。

【0037】

複数の実施形態は、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）を抑制するために設計されたポリヌクレオチドに関する。用語「遺伝子」とは、転写物の発現のために提供されるか、または転写物をコードする核酸の任意の部分を目指す。「遺伝子」は、これに限定されないが、プロモーター領域、5'非翻訳領域、イントロン化領域を含み得る転写物コード領域、3'非翻訳領域またはこれらの領域を組み合わせたものを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。他の実施形態では、標的遺伝子は、メッセンジャーRNAと同一であるか、または相補している配列を有する。例えば、いくつかの実施形態では、標的遺伝子はcDNAである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群から選択されるDNA配列によってコードされる。さまざまな実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群から選択される配列によってコードされ、また、この群から複数の標的遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの標的遺伝子の異なる標的領域に対して、複数の標的遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形

態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性を有する21の近接ヌクレオチドの複数のセグメントを含む。こうした場合、各セグメントは、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、ポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数のセグメントを含み、各セグメントは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよい。いくつかの実施形態では、標的遺伝子に対応していない「スペーサー」ヌクレオチドは、任意より、そのセグメント間またはそのセグメントに隣接して使用され得る。

【0038】

本方法で使用するポリヌクレオチドの合計長さは、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%~約100%の同一性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、ポリヌクレオチドの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含むことができる。一実施形態において、ポリヌクレオチドとしては、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%~約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上に直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含み得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3'オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態では、ポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドの配列に100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも2つのセグメントを含み、21の近接ヌクレオチドのそれぞれは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0039】

本方法において有用なポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、ポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生され

る、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0040】

いくつかの実施形態では、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、単離DNAフラグメントまたは単離RNAフラグメントとして提供される。いくつかの実施形態では、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている。こうしたポリヌクレオチドは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドに関して）の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドなど、比較的短くてもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーの長さのdsRNAなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。実施形態としては、ポリヌクレオチドが配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAである実施形態であるか、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態である。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態では、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計される。

【0041】

本方法のさまざまな実施形態では、接触することには、*Leptinotarsa*種の表面に本方法において有用なポリヌクレオチドを含む好適な組成物を提供することを含み、こうした組成物は、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質内、または種子処理剤として提供することができる。接触することは、種子処理剤の形態または「種芋」塊茎または塊茎片の処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）であってもよい。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により組成物に含むことができる。いくつかの実施形態では、接触することは、組成物において、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施形態では、接触することは、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*（バチルスチューリンゲンシス）殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む組成物においてポリヌクレオチドを提供することを含む。一実施形態では、接触することは、摂取させるか、または別の方法で*Leptinotarsa*種によって内部的に吸収させることができる組成物中にポリヌクレオチドを提供することを含む。

【0042】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチド及びパタチン、植物レクチン、植物

エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、相乗的に向上された*Leptinotarsa*種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

食餌性ポリヌクレオチドを提供することによるLEPTINOTARSAの侵入の防除

【0043】

本発明の別の態様は、*Leptinotarsa*種の食餌に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%同一性～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有するポリヌクレオチドを含む薬剤を提供することを含む、植物への*Leptinotarsa*種の侵入を防除する方法を提供し、薬剤は、*Leptinotarsa*種内で生物学的機能を阻止し、それによって*Leptinotarsa*種による侵入を防除するために、*Leptinotarsa*種による摂取時に機能する。ポリヌクレオチドは、それを含むセグメント（複数可）より長くてもよいが、それぞれのポリヌクレオチドセグメント及び対応するDNAフラグメントは同等の長さである。本方法において有用なポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子のために設計され得る。実施形態としては、薬剤が配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAである実施形態であり、または薬剤は、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるポリヌクレオチドまたはRNAを含む実施形態である。一実施形態において、植物への*Leptinotarsa*種の侵入を防除する方法は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを*Leptinotarsa*種の食餌に提供することを含むか、または標的遺伝子から転写されるRNAが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。実施形態としては、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAである実施形態が挙げられる。本発明の関連態様としては、本方法において有用な単離ポリヌクレオチド、及び本方法により提供された改善された*Leptinotarsa*耐性を有する植物が挙げられる。

【0044】

さまざまな実施形態において、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、微生物細胞を含むか、または微生物中に産生される。例えば、本薬剤は、細菌またはイースト菌を含み得るか細菌またはイースト菌中に産生され得る。他の実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、トランスジェニック植物細胞を含むか、または植物細胞中に産生され（例えば、ポリヌクレオチドが過渡的に発現する植物細胞）、こうした植物細胞は、植物中で細胞であり得るか、または組織培養液中若しくは細胞懸濁液中で成長した細胞であり得る。

【0045】

さまざまな実施形態では、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内、または種子処理剤として、摂取に好適な形態での*Leptinotarsa*種による食餌摂取のためにポリヌクレオチドを含む本薬剤が提供される。ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、*Leptinotarsa*種による侵入を受ける本薬剤を植物に投与することによって、または本薬剤を植物の種子に投与することによって（例えば、植物への噴霧、散布またはコーティングによって）、または土壌灌注によって、または人工食餌中に提供することによって、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために提供され得る。ポリヌクレオチ

ドを含む本薬剤は、*Leptinotarsa*種を維持するために特定の栄養所要量に見合うように配合された人工食餌中において*Leptinotarsa*種による食事摂取のために提供されてもよく、人工食餌は、異なる供給源から得られた若干量のポリヌクレオチド（化学合成されたものまたは微生物発酵から精製されたものなど）が補充され、本実施形態は、例えば、有効なポリヌクレオチド処理法の時機及び量を決定する際に有用であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、植物細胞の形態で、または植物細胞組成物中において、または微生物微生物（細菌または酵母菌など）、または微生物発酵物において、または合成食餌若しくは人工食餌中において*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために提供され得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、*Leptinotarsa*種によって摂取される餌の形態で提供される。ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために種子処理剤の形態で、または、「種芋」塊茎または塊茎片の処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）で提供され得る。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により薬剤に含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む組成物においてポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、植物中に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの植付可能な配合物を含み、こうした実施形態では、本方法は植物中に植付可能な配合物を植付することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本薬剤は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態では、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ナス科植物の種子、種芋、種芋片を本薬剤で処理することを含む。

【0046】

本方法において有用な薬剤において有用な特定のポリヌクレオチド（例えば、実施例に記載されたポリヌクレオチドトリガー）と1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせにより、ポリヌクレオチドを単独、または非ポリヌクレオチド殺虫剤を単独することによって得た効果と比較すると、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において合成する上での改善が達成されることが予測される。一実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチド及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、食餌中において*Leptinotarsa*種に提供されたとき、相乗的に向上された*Leptinotarsa*種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

【0047】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAであり、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態である。

【0048】

いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1~725、配列番号：726~729、配列番号：731~806、配列番号：808~830、及び配列番号：1087~1094、またはそれらのDNA補体からなる群から選択されるDNA配列を有する標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含み：いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性を有する21の近接ヌクレオチドのセグメントに加えて、「中立」配列（標的遺伝子と配列同一性または相補性を持たない）を含み、このため、ポリヌクレオチドは、全体として、標的遺伝子との同一性が全体的にかなり低い。

10

【0049】

本方法で有用なポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子に抑制されるように設計される（「標的遺伝子」）。用語「遺伝子」とは、転写物の発現のために提供されるか、または転写物をコードする核酸の任意の部分を目指す。「遺伝子」は、これに限定されないが、プロモーター領域、5'非翻訳領域、イントロン化領域を含み得る転写物コード領域、3'非翻訳領域またはこれらの領域を組み合わせたものを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。他の実施形態では、標的遺伝子は、メッセンジャーRNAと同一であるか、または相補している配列を有する。例えば、いくつかの実施形態では、標的遺伝子はcDNAである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群から複数の標的遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの標的遺伝子の異なる標的領域に対して、複数の標的遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの複数のセグメントを含む。こうした場合、各セグメントは、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、ポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数のセグメントを含み、各セグメントは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

20

30

40

【0050】

本方法で使用するポリヌクレオチドの合計長は、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%~約100%の同一性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、ポリヌクレオチドの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチ

50

ドの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含むことができる。一実施形態において、ポリヌクレオチドとしては、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上に直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含み得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチド3'を含むdsRNA）。このため、様々な実施形態では、ポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドの配列に100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、21の近接ヌクレオチドの少なくとも2つのセグメントを含み、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA相補性からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0051】

本方法において有用なポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、ポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0052】

いくつかの実施形態では、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、単離DNAフラグメントまたは単離RNAフラグメントとして提供される。いくつかの実施形態では、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている。こうしたポリヌクレオチドは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドに関して）の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドなど、比較的短くてもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態では、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計される。

食餌性RNAを提供することによるLEPTINOTARSAの侵入の防除

10

20

30

40

50

【0053】

本発明の別の態様は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的な21の近接ヌクレオチドを含む少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを幼虫の食餌に提供することを含むLeptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害を引き起こす方法を提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。ある実施形態では、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのRNAをLeptinotarsa種の幼虫の食餌に提供することを含む、Leptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害を引き起こす方法に関し、標的遺伝子配列は標的遺伝子配列群からなる群から選択され、Leptinotarsa種の幼虫によるRNAの摂取によりLeptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害となる。本発明の関連態様は、少なくとも1つのサイレンシング要素を含むRNAであり、少なくとも1つのサイレンシング要素は、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的であり、標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される。RNAは、サイレンシング要素またはそれを含むサイレンシング要素より長くてもよいが、各サイレンシング要素及び対象遺伝子の対応するフラグメントは同等の長さである。本方法において有用なRNAは、複数の標的遺伝子について設計することができ、実施形態は、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはその補体からなる群から選択される配列を含む少なくとも1つの元素サイレンシング要素を含むRNAを含むか、またはサイレンシング要素は、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる。実施形態としては、RNAは、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAを含む実施形態が挙げられる。関連のある態様では、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つのRNAをLeptinotarsa種の食餌に提供することを含む、Leptinotarsa種の死滅または生殖能の低下を引き起こし、標的遺伝子配列が標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択され、また、Leptinotarsa種によるRNAの摂取がLeptinotarsa種における死滅及び生殖能力の低下を招く方法が提供される。本発明の関連態様としては、本方法において有用な単離RNA、及び本方法により提供された改善されたLeptinotarsa耐性を有する植物が挙げられる。

【0054】

さまざまな実施形態では、RNAを提供している食餌は、微生物細胞を含むか、または微生物中で作製される。例えば、RNAを提供している食餌は、細菌若しくはイースト菌を含み得るか、または細菌若しくはイースト菌中で作製され得る。類似の実施形態では、RNAを提供している食餌は、トランスジェニック植物細胞を含むか、または植物細胞中に産生され（例えば、ポリヌクレオチドが過渡的に発現する植物細胞）、こうした植物細胞は、植物中で細胞であり得るか、または組織培養液中若しくは細胞懸濁液中で成長した細胞であり得る。

【0055】

一実施形態では、RNAを提供する食餌は、Leptinotarsa種による侵入を受ける任意の植物の形態で提供され、RNAは、植物中または植物上に含まれる。こうした植物は安定して、RNAを発現するトランスジェニック植物、または過渡的にRNAを発現するか、またはRNAで処理された（例えば、噴霧またはコーティングにより）非トランスジェニック植物であり得る。安定したトランスジェニック植物は、一般に、RNAをコードする組換え型構造体を含み、ゲノムに一体化される。特に興味深いのは、植物がナス科植物（ナス科族）である実施形態である。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される植物が挙げられる。実施形態は、植物が、不発芽ナス科植物種子、休止期のナス科植物ま

たは生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態は、植物が「種芋」であり、伝播されて新規ジャガイモ植物になり得るジャガイモの塊茎またはジャガイモの塊茎の一部を意味する実施形態を含む。

【0056】

さまざまな実施形態では、RNAを提供する食餌は、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内、または種子処理剤としてなど、*Leptinotarsa*種による摂餌に好適な形態で提供される。RNAを提供する食餌は、*Leptinotarsa*種による侵入を受ける植物に食餌を投与する（例えば、噴霧、散布または植物のコーティング）ことによって、土壤灌水を適用することによって、または人工食餌内に提供することによって提供され得る。一実施形態では、RNAを提供する食餌は、*Leptinotarsa*種によって摂取される餌の形態で提供される。RNAを提供している食餌は、*Leptinotarsa*種を維持するために、特定の栄養要件に適合するように配合された人工食餌であってもよく、化学合成物または微生物発酵からの精製物など異なる供給源から得られた若干量のRNAと共に補充され、本実施形態は、例えば、有効なポリヌクレオチド処理法の時機及び量を決定する際に有用であり得る。いくつかの実施形態では、RNA提供食餌は、植物細胞の形態で、または植物細胞成分中において、または微生物中（バクテリアまたは酵母菌）若しくは微生物発酵物中において、または人工食餌中において提供される。一実施形態では、RNAを提供する食餌は、*Leptinotarsa*種によって摂取される餌の形態で提供される。RNAを提供する食餌は、種子処理剤の形態または「種芋」塊茎または塊茎片の処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）で提供され得る。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により食餌に含むことができる。いくつかの実施形態では、RNAを提供する食餌は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施形態では、RNAを提供する食餌は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む組成物においてポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施形態では、RNAを提供する食餌は、植物中に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの植付可能な配合物を含み、こうした実施形態では、本方法は植物中に植付可能な配合物を植付することを含む。いくつかの実施形態では、RNAを提供する食餌は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態では、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ナス科植物の種子、種芋、種芋片を本薬剤で処理することを含む。

【0057】

RNA単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のRNAと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のdsRNA）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態では、1つ以上のRNA及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺

10

20

30

40

50

虫タンパク質、及びBacillus sphaericus殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、相乗的に向上されたLeptinotarsa種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

【0058】

本方法において有用なRNAは、一本鎖(ss)または二本鎖(ds)であってもよい。本方法の実施例としては、RNAがセンス一本鎖RNA(ssRNA)、アンチセンス一本鎖(ssRNA)または二本鎖RNA(dsRNA)からなる群から選択される少なくとも1つであるものが挙げられ、任意のこれらの種類のRNAの混合型を使用してもよい。一実施形態では、二本鎖DNA/RNAハイブリッドが使用される。RNAは、標準リボヌクレオチド以外の成分を含んでもよく、例えば、一実施形態は、末端デオキシリボヌクレオチドを含むRNAである。

10

【0059】

RNA態様は、少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、サイレンシング要素は、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに本質的に同一であるか(RNA等価物として)、または本質的に相補的であり、標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の配列を有する。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等長さのフラグメントに対して、確実に(100%)同一であるか、または確実に(100%)相補的である(RNA等価物として)。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素(複数可)を含有するRNAは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の全配列を有する。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、標的遺伝子と同等の長さのフラグメントに対して約95%~約100%の同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントに対して約95%~約100%の同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、例えば、18~24、または18~28、または20~30、または20~50、または20~100、または50~100、または50~500、または100~250、または100~500、または200~1000、または500~2000またはそれ以上などの18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、サイレンシング要素は、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超(例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500、または500超の近接ヌクレオチド)など、18以上の近接ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。特定の実施形態では、RNAは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸(例えば、dsRNA)であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対を含むように塩基対として発現している。特定の実施形態では、RNA内に収容された各セグメントは、自然調節小分子RNA、例えば、各セグメントが、少なくとも約30の近接ヌクレオチド(または塩基対)である長さを超える長さである。いくつかの実施形態では、RNA

30

40

50

の合計長さまたはRNA内に収容される各サイレンシング要素の長さは、対象の配列の合計長さ未満である（標的遺伝子配列群からなる群から選択させる配列を有するDNAまたは標的遺伝子）。いくつかの実施形態では、RNAの合計長さは、約50～約500のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチド）または塩基対（二本鎖ポリヌクレオチド）である。いくつかの実施形態では、RNAは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。実施形態としては、RNAが配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAである実施形態であるか、またはRNAは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態である。

【0061】

本方法で有用なRNAは、一般に、1つ以上の遺伝子に抑制されるように設計される（「標的遺伝子」）。用語「遺伝子」とは、転写物の発現のために提供されるか、または転写物をコードする核酸の任意の部分を目指す。「遺伝子」は、これに限定されないが、プロモーター領域、5'非翻訳領域、イントロン化領域を含み得る転写物コード領域、3'非翻訳領域またはこれらの領域を組み合わせたものを含み得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。他の実施形態では、標的遺伝子は、メッセンジャーRNAと同一であるか、または相補している配列を有する。例えば、いくつかの実施形態では、標的遺伝子はcDNAである。特定の実施形態では、RNAは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態では、RNAは、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域に対して、複数の遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形態において、RNAは、複数のサイレンシング要素を含み、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性または100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各サイレンシング要素は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態では、RNAとしては、縦列型配列または反復配列内の複数のサイレンシング要素を挙げることができ、各サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントに対して約100%の同一性または約100%の相補性の配列を有する21以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スパーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0062】

本方法で使用するRNAの合計長さは、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性または相補性の配列を有するサイレンシング要素に加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、RNAの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたサイレンシング要素の長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、標的遺伝子を抑制するか、または活性サイレンシング要素間に「スパーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」サイレンシング要素の側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、RNAは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（すなわち、相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、

10

20

30

40

50

またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド)を含む。一実施形態において、RNAは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のサイレンシング要素に直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態では、RNAは、追加の5' G若しくは追加の3' Cまたはその両方と共に、そのサイレンシング要素に近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、RNAは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである(例えば、オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチド3'を含むdsRNA)。このため、様々な実施形態では、RNA全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、RNAは、少なくとも2つのサイレンシング要素を含み、21の近接ヌクレオチドのそれぞれは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、(1)少なくとも2つのサイレンシング要素は、1つ以上のスパーサーヌクレオチドによって分離されるか、または(2)少なくとも2つのサイレンシング要素は、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群4またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0063】

いくつかの実施形態では、RNAは、天然リボヌクレオチドからなる。ある種の実施形態では、RNAは、例えば、主にリボヌクレオチドからなるが、1つ以上の末端デオキシリボヌクレオチドまたは1つ以上の末端ジデオキシリボヌクレオチドを有する合成RNA、リボヌクレオチド以外の成分を含む。ある種の実施形態では、RNAは、イノシン、チオウリジン、またはプソイドウリジンなど、非正準的なヌクレオチドを含む。ある種の実施形態では、RNAは、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。

【0064】

本方法において有用なRNAは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、RNAが化学合成される(例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって)、微生物または細胞培養(培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など)中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0065】

いくつかの実施形態では、RNAは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている単離RNAとして提供される。こうしたRNAは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド(一本鎖RNAに関して)または約18～約300または約50～約500塩基対(二本鎖RNAに関して)の一本鎖または二本鎖RNAなど、比較的短くてもよい。あるいは、RNAは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態では、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子(殺虫タンパク質など)を発現させるアプタマーまたはリボザイムまたは発現カセットなどをコードする追加のRNAなど、追加の要素を含むように設計される。

改善されたLEPTINOTARSA種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法及びこのように提供される植物、植物部分及び種子

【0066】

本発明の別の態様により、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントとの約95%同一性～約100%同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのセグメントの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法が、ポリヌクレオチ

ド含有組成物で処理された植物は、未処理植物に対して、改善されたLeptinotarsa種に対する耐性を示す方法で提供される。一実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと本質的に同一である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。ポリヌクレオチドは、セグメントまたはそれを含むセグメントより長くてもよいが、各セグメント及び対象遺伝子の対応するフラグメントは同等の長さである。一実施形態では、本発明は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法を提供する。一実施形態では、本発明は、植物に少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を局所投与することを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を、有効量のポリヌクレオチドを植物上で摂餌しているLeptinotarsa種に摂餌させる方法で提供する方法を提供し、ポリヌクレオチドは、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む。一実施形態では、本発明は、植物に少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を局所塗布することを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を、有効量のポリヌクレオチドを植物上で摂餌しているLeptinotarsa種に摂餌させる方法で提供する方法を提供し、ポリヌクレオチドは、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む：Leptinotarsa種は、Leptinotarsa decemlineataであり、標的遺伝子は、配列番号：730、の配列を有しポリヌクレオチドは、配列番号：989、988、1104または1105からなる群から選択される配列を有する鎖を有する二本鎖RNAである。本方法において有用なポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子のために設計され得る。実施形態としては、薬剤が配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むポリヌクレオチドである実施形態であり、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態である。実施形態としては、組成物は、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAを含む実施形態が挙げられる。本発明の関連態様としては、局所投与用の組成物、本方法において有用な単離ポリヌクレオチド、及び本方法により提供された改善されたLeptinotarsa耐性を有する植物が挙げられる。

【0067】

「局所投与」は、植物の表面若しくは外部など、葉、茎部、花、果実、苗条、塊根、種子、塊茎、花、葯若しくは花粉などの植物部分の表面への提供、または植物全体への投与、または植物の地表上部分若しくは地表下部分への投与など、対象の表面若しくは外部に投与することを意味する。局所投与は、土壌への投与、Leptinotarsa昆虫類がポリヌクレオチドと接触可能な表面または基質への投与など非生物表面上に行うことができる。本方法のさまざまな実施形態では、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物は、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質内、または種子処理剤としてなど、好適な形態で植物に局所的に投与される。本方法のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、例えば、植物の葉、茎及び開花部分に噴霧するか、または散布するなど、植物の地表上部分に局所投与される。本方法の実施形態としては、葉面噴霧（例えば、液体ポリヌクレオチド含有組成物をナス科植物の葉に噴霧することなど）または葉

面散布（例えば、粉剤の形態またはキャリア微粒子物上でのポリヌクレオチド含有組成物のナス科植物への散布）などの局所投与を含む。他の実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、土壌灌水の方法などによって、塊根など植物の地表下部分に局所投与される。他の実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、その植物へと成長する種子に局所投与される。局所投与することは、「種芋」塊茎または塊茎片の局所処理剤の形態にて、ナス科植物の果実またはナス科植物の果実の種子の局所処理の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）であってもよい。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意によりポリヌクレオチド含有組成物に含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、植物中に局所的に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの局所的に植付可能な配合物を含み、こうした実施形態では、本方法は植物中に局所的に植付可能な配合物を局所的に植付することを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に局所的に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態では、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、摂取させるか、または別の方法で *Leptinotarsa* 種によって内部的に吸収させることができる。例えば、ポリヌクレオチド含有組成物は、餌の形態であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。一実施形態では、組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を更に含む（現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）。いくつかの実施形態では、局所投与される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis* 殺虫タンパク質、*Xenorhabdus* 殺虫タンパク質、*Photorhabdus* 殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous* 殺虫タンパク質、及び *Bacillus sphaericus* 殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。あるいは、こうした追加の成分または殺虫剤は、別の局所投与によって、または植物中でのトランスジェニック発現によって、別個に提供され得る。あるいは、植物は、ポリヌクレオチド含有組成物によって、及びポリヌクレオチド含有組成物の効果を向上させる物質を別に投与する（投与前、投与後、または同時に）ことによって、局所処理される。例えば、植物は、SILWET（登録商標）、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を含む溶液を第1の局所投与、次に、ポリヌクレオチド含有組成物の第2の局所投与を行うことによって、噴霧され得る。逆もまた同じである。

【0068】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、ポリヌクレオチド含有組成物において有用な特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa* 種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、1つ以上のポリヌクレオチドが発現するトランスジェニック植物として、及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis* 殺虫タンパク質、*Xenorhabdus* 殺虫タンパク質、*Photorhabdus* 殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous* 殺虫タンパク質、及び *Bacillus sphaericus* 殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の遺伝子

コード非ポリヌクレオチド殺虫剤として提供され、トランスジェニック植物は、*Leptinotarsa*種の侵入の相乗的に向上された耐性を示すことがわかっている。

【0069】

ポリヌクレオチド含有組成物において有用なポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、ポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0070】

多くの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物に有用なポリヌクレオチドは、単離DNAフラグメントまたは単離RNAフラグメントとして提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物にて有用なポリヌクレオチドは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている。こうしたポリヌクレオチドは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドに関して）の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドなど、比較的短くてもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計され得る。

【0071】

ポリヌクレオチド含有組成物に有用なポリヌクレオチドは、DNAまたは標的配列群から選択される配列またはそのDNA補体を有する標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、配列番号：1～725または配列番号：726～830及び配列番号：1087～1094またはこれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性の配列を有する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと確実（100%）に同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子のフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する全体の配列を有する。

【0072】

ポリヌクレオチド含有組成物に有用なポリヌクレオチドは、DNAまたは標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、18～24、または18～28、または20～30、または20～50、または20～100、または50～100、または50～500、または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはそれ以上などの18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、セグメントは、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約

75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500、または500超の近接ヌクレオチド) など、18以上の近接ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸(例えば、dsRNA)であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対の少なくとも1つのセグメントを含むように塩基対として発現している。特定の実施形態では、ポリヌクレオチド内に収容された各セグメントは、自然調節小分子RNA、例えば、各セグメントが、少なくとも約30の近接ヌクレオチド(または塩基対)である長さを超える長さである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの合計長さまたはポリヌクレオチド内に収容される各セグメントの長さは、対象の配列(標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子)の長さ未満である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの合計長さは、約50~約500のヌクレオチド(一本鎖ポリヌクレオチド)または塩基対(二本鎖ポリヌクレオチド)である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーなど、約100~約500塩基対のdsRNAである。いくつかの実施形態で、ポリヌクレオチドは、配列番号: 831~1085、1095~1104及び1110~1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAであるか、またはポリヌクレオチドは、配列番号: 1105~1109からなる群から選択される配列によってコードされる。

【0073】

局所投与されるポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子に抑制されるように設計される(「標的遺伝子」)。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態では、局所投与されるポリヌクレオチドは、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域に対して、複数の遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形態において、局所投与されるポリヌクレオチドは、複数の部分またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性または100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、局所投与されるポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含み、各部分は、配列番号: 1~725または配列番号: 726~830及び配列番号: 1087~1094またはこれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含み; セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0074】

局所投与されるポリヌクレオチドの合計長さは、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有す

10

20

30

40

50

るDNAの同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、局所投与するポリヌクレオチドの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、局所投与されるポリヌクレオチドは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクロニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含む。一実施形態において、局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態では、局所投与されるポリヌクレオチドは、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、局所投与されるポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3'オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態では、局所投与されるポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、局所投与されるポリヌクレオチドは、21の近接ヌクレオチドのそれぞれの少なくとも2つのセグメントを含み、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0075】

関連する態様では、本発明は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントとの約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメント有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む本方法によって提供される、改善されたLeptinotarsa種に対する耐性を有する植物に関し、ポリヌクレオチド組成物で処理された植物は、未処理植物に対して、改善されたLeptinotarsa種に対する耐性を示す。一実施形態は、対照植物と比較したとき、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有するナス科植物であり、植物または成長して植物になる種子（または植物が種芋である場合、種芋が成長してジャガイモ苗になる種子）に、以下の群から選択される配列を有するdsRNAトリガー：配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126若しくはこれらの補体、または配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるdsRNAトリガーを局所投与することによって提供される。更に別の態様では、本発明は、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された種子（特に、トランスジェニック後代種子）に関する。また、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された商品生産物及びこうした植物のトランスジェニック後代種子から産生される植物商品生産物が想到される。

LEPTINOTARSA種を防除するための殺虫性組成物

【0076】

本発明の別の態様では、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントと本質的に同一であるかまたは相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む、殺虫剤として有効な量の少なくとも1つのRNAを含むLeptinotarsa種を防除するために、殺虫性組成物を提供する。本文脈中、「防除する」ことは、成長阻害、死滅率の上昇、これらに限定されないが、例えば生殖能力の低下、摂食行動または動作の減少または停止、変態段階の発現の減少または停止など、Leptinotarsa種（成虫または幼虫）における生理学的変化または行動的变化を招くことが挙げられる。「殺虫剤として有効であること」は、成長阻害、死滅率の上昇、これらに限定されないが、例えば生殖能力の低下、摂食行動または動作の減少または停止、変態段階の発現の減少または停止など、Leptinotarsa種（成虫または幼虫）における生理学的変化または行動的变化を招くことに有効であることを意味し、いくつかの実施形態では、殺虫剤として有効な量のRNAを植物に投与することによって、植物のLeptinotarsa種の侵入への耐性が向上する。RNAは、セグメントまたはそれを含むセグメントよりも長くてもよいが、各セグメントまたは標的遺伝子の対応するフラグメントは同等の長さである。本方法において有用なRNAは、複数の標的遺伝子のために設計され得る。実施形態としては、殺虫性組成物が、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む、殺虫性有効量のポリヌクレオチドを含むか、または標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAの少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、標的遺伝子は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する殺虫性有効量の少なくとも1つのポリヌクレオチドであるか、または配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094または標的遺伝子から転写されたRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドと同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含む、殺虫性有効量の少なくとも1つのRNAであるか、または、Leptinotarsa種によって摂餌または接触されると、Leptinotarsa種において死滅または成長の阻害を引き起こすRNA分子であって、RNA分子は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含むか、または、Leptinotarsa種によって摂餌または接触されると、Leptinotarsa種において死滅または成長の阻害を引き起こす殺虫性二本鎖RNA分子であって、殺虫性二本鎖RNA分子の少なくとも1本の鎖は、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されたRNAに相補的である21の近接ヌクレオチドを含み、標的遺伝子は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094の群から選択される配列を有するか、またはトリガー配列族から選択される配列を含む殺虫性有効量の少なくとも1つの二本鎖RNAを含む実施形態が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。実施形態は、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはその補体からなる群から選択される配列を有するdsRNAを含む殺虫性組成物が挙げられるか、または殺虫性組成物は、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるポリヌクレオチドまたはRNAを含む。実施形態としては、殺虫性組成物は、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAを含む実施形態が挙げられる。一実施形態では

10

20

30

40

50

、本発明は、Leptinotarsa種によって摂取されるか、またはLeptinotarsa種が接触するときにLeptinotarsa種の死滅または成長の障害を招く、殺虫性有効量の二本鎖RNA分子を含むLeptinotarsa種を防除するための殺虫性組成物を提供し、殺虫性二本鎖RNA分子は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、またはDNAから転写されるRNAからなる群から選択される配列を有するDNAの21の近接ヌクレオチドと相補的である少なくとも1つのセグメントを含み、二本鎖RNA分子は、長さが少なくとも50塩基対であるか、または長さ約100～約500塩基対である。一実施形態では、本発明は、殺虫性有効量の二本鎖RNAを含むLeptinotarsa種を防除するための殺虫性組成物を提供し、二本鎖RNAの少なくとも一本鎖は、リボソームタンパク質または遺伝子から転写されるRNAをコードする遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であり、Leptinotarsa種は、Leptinotarsa decemlineataであり、RNA干渉が誘導され、Leptinotarsa decemlineataの死滅が発生し、リボソームタンパク質は、リボソームL7タンパク質または配列番号：730によってコードされるタンパク質であるか、または二本鎖RNAは、配列番号：989、988、1104または1105からなる群から選択される配列を含む。本発明の関連態様としては、組成物及び組成物で処理することによって提供された上昇されたLeptinotarsa耐性を有する植物において有用な単離RNAが挙げられる。

【0077】

さまざまな実施形態では、Leptinotarsa種を防除するための殺虫性組成物は、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内、または種子処理剤としてなどからなる群から選択される少なくとも1つの形態である。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、防虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意によりポリヌクレオチド含有組成物に含むことができる。防除されるLeptinotarsa種は、一般に、植物に侵入する種である。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物は、植物中に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの植付可能な配合物であり、こうした実施形態では、本方法は、植付可能な配合物を植物中に植付することを含む。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態では、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。一実施形態では、殺虫性組成物は、摂取させるか、または別の方法でLeptinotarsa種によって内部的に吸収させることができる。例えば、殺虫性組成物は、餌の形態であり得る。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。一実施形態では、殺虫性組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤（現在、Momenitive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を更に含む。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、Bacillus thuringiensis殺虫タンパク質、Xenorhabdus殺虫タンパク質、Photorhabdus殺虫タンパク質、Bacillus laterosporous殺虫タンパク質、及びBacillus sphaericus殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。あるいは、こうした追加の成分または殺虫剤は、別の局所投与によって、または植物中でのトランスジェニック発現によ

10

20

30

40

50

って、別個に提供され得る。あるいは、植物は、殺虫性組成物によって、並びに殺虫性組成物の効果を向上させる物質を別に投与する（投与前、投与後、または同時に）ことによって、局所処理される。例えば、植物は、SILWET（登録商標）、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコン界面活性剤を含む溶液を第1の局所投与、次に、殺虫性組成物の第2の局所投与を行うことによって、噴霧され得る。逆もまた同じである。

【0078】

RNA単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のRNAと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のdsRNAトリガー）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態では、殺虫性組成物は、1つ以上のRNA及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含み、相乗的に改善された*Leptinotarsa*種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

【0079】

防除される*Leptinotarsa*種は、一般に、植物に侵入する種である。植物は、*Leptinotarsa*種による侵入を受けている任意の植物であり得る。特に興味深いのは、植物がナス科植物（ナス科族）である実施形態である。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される植物が挙げられる。実施形態は、植物が、不発芽ナス科植物種子、休止期のナス科植物または生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態は、植物が「種芋」であり、伝播されて新規ジャガイモ植物になり得るジャガイモの塊茎またはジャガイモの塊茎の一部を意味する実施形態を含む。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物の使用により、例えば、成長の阻害、死滅の増加、生殖能力の低下、摂食行動若しくは動作の低下若しくは停止、または変態段階の発現の減少若しくは停止など、*Leptinotarsa*種を防除することとなる。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物で処理していない植物と比較して、殺虫性組成物で処理されたナス科植物の成長の改善または収率の改善として、*Leptinotarsa*種の防除が観察される。いくつかの実施形態では、*Leptinotarsa*種の卵、幼虫または成虫数の減少、落葉または植物への他の損傷の減少、または収穫可能な果実の収率の上昇（例えば、トマトまたはナス）または塊茎（例えば、ジャガイモ）など、*Leptinotarsa*種の防除が観察される。

【0080】

さまざまな実施形態では殺虫性組成物は、微生物細胞を含むか、または微生物中で作製される。例えば、殺虫性組成物は、細菌またはイースト菌を含み得るか細菌またはイースト菌中に産生され得る。類似の実施形態では、殺虫性組成物は、トランスジェニック植物細胞を含むか、または植物細胞中に産生され（例えば、ポリヌクレオチドが過渡的に発現する植物細胞）、こうした植物細胞は、植物中で細胞であり得るか、または組織培養液中若しくは細胞懸濁液中で成長した細胞であり得る。

【0081】

殺虫性組成物は、*Leptinotarsa*種による侵入を受ける組成物を植物または表面に投与することによって（例えば、植物若しくはその植物種子、または種芋への噴霧、散布若しくはコーティングによって）、または土壌灌注の適用、若しくはインファロー処理によって、または人工食餌中に提供することによって、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために提供され得る。殺虫性組成物は、*Leptinotarsa*種を維持するために特定の栄養所要量に見合うように配合された人工食餌中において*Leptinotarsa*種による食事摂取のために提供されてもよく、人工食餌は、異なる供給源から得られた若干量のRNA（化学合成されたものまたは微生物発酵から精製されたものなど）が補充され、本実施形態は、例えば、有効なRNA処理法の時機及び量を決定する際に有用であり得る。いくつかの実施形態では、殺虫性組成物は、植物細胞の形態で、または植物細胞組成物中において、または微生物微生物（

細菌または酵母菌など）、または微生物発酵物において、または合成食餌若しくは人工食餌中においてLeptinotarsa種による食餌摂取のために提供され得る。一実施形態では、殺虫性組成物を提供する食餌は、Leptinotarsa種によって摂取される餌の形態で提供される。殺虫性組成物は、Leptinotarsa種による食餌摂取のために種子（または種芋）処理剤の形態で提供され得る。

【0082】

一実施形態では、殺虫性組成物は、Leptinotarsa種による侵入を受ける任意の植物の形態で提供され、RNAは、植物中または植物上に含まれる。こうした植物は安定して、RNAを発現するトランスジェニック植物、または過渡的にRNAを発現するか、またはRNAで処理された（例えば、噴霧またはコーティングにより）非トランスジェニック植物であり得る。安定したトランスジェニック植物は、一般に、RNAをコードする組換え型構造体を含み、ゲノムに一体化される。特に興味深いのは、植物がナス科植物（ナス科族）である実施形態である。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される植物が挙げられる。実施形態は、植物が、不発芽ナス科植物種子、休止期のナス科植物または生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態は、植物は、「種芋」である実施形態が挙げられ、ジャガイモ塊茎または新規種芋に伝播され得るジャガイモ塊茎片を意味する。

【0083】

殺虫性組成物において有用なRNAは、一本鎖（ss）または二本鎖（ds）であってもよい。実施例としては、RNAがセンス一本鎖RNA（ssRNA）、アンチセンス一本鎖（ssRNA）または二本鎖RNA（dsRNA）からなる群から選択される少なくとも1つであるものが挙げられ、任意のこれらの種類のRNAの混合型を使用してもよい。一実施形態では、二本鎖DNA/RNAハイブリッドが使用される。RNAは、標準リボヌクレオチド以外の成分を含んでもよく、例えば、一実施形態は、末端デオキシリボヌクレオチドを含むRNAである。

【0084】

殺虫性組成物中のRNAは、標的遺伝子配列群から選択される配列若しくはそのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子若しくはDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する。一実施形態において、RNAは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと确实（100%）に同一である。いくつかの実施形態では、RNAは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子のフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する全体の配列を有する。

【0085】

殺虫性組成物中のRNAは、標的配列群から選択される配列若しくはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、RNAは、例えば、18～24、または18～28、または20～30、または20～50、または20～100、または50～100、または50～500、または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはそれ以上などの18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、セグメントは、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約2

30、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500、または500超の近接ヌクレオチド)など、18以上の近接ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、RNAは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。特定の実施形態では、RNAは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸(例えば、dsRNA)であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対を含むように塩基対として発現している。特定の実施形態では、RNA内に収容された各セグメントは、自然調節小分子RNA、例えば、各セグメントが、少なくとも約30の近接ヌクレオチド(または塩基対)である長さを超える長さである。いくつかの実施形態では、RNAの合計長さまたはRNA内に収容される各セグメントの長さは、対象の配列の合計長さ未満である(標的遺伝子配列群からなる群から選択させる配列を有するDNAまたは標的遺伝子)。いくつかの実施形態では、RNAの合計長さは、約50~約500のヌクレオチド(一本鎖RNA)または塩基対(二本鎖RNA)である。いくつかの実施形態では、約50~約500ヌクレオチドの長さの少なくとも1つのRNA鎖を含む。実施形態としては、RNAが配列番号:831~1085、1095~1104及び1110~1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのセグメントを含む実施形態であり、またはRNAは、配列番号:1105~1109からなる群から選択される配列によってコードされる実施形態である。

【0086】

殺虫性組成物中のRNAは、一般に、1つ以上の遺伝子を抑制させるように設計される(「標的遺伝子」)。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態では、RNAは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態では、RNAは、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域に対して、複数の遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形態において、RNAは、複数の部分またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態では、RNAは、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含み、各部分は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0087】

殺虫性組成物に含まれるRNAの合計長さは、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%~約100%の同一性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、RNAの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたRNAの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。RNAは、例えば、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方

に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、RNAは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含む。一実施形態において、RNAは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態では、RNAは、追加の5' G若しくは追加の3' Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、RNAは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3' オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態では、RNA全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、RNAは、21の近接ヌクレオチドのそれぞれの少なくとも2つのセグメントを含み、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0088】

さまざまな実施形態では、殺虫性組成物中のRNAは、天然リボヌクレオチドから構成される。例えば、実施形態としては、主にリボヌクレオチドからなるが、1つ以上の末端デオキシリボヌクレオチドまたは1つ以上の末端ジデオキシリボヌクレオチドを有する完全リボヌクレオチドからなる合成RNAが挙げられる。ある種の実施形態では、RNAは、イノシン、チオウリジン、またはプソイドウリジンなど、非正準的なヌクレオチドを含む。ある種の実施形態では、RNAは、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。（a）本殺虫性組成物中のRNAは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、RNAが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0089】

いくつかの実施形態では、RNAは、発現構造体の一部ではない、単離RNAとして提供される。いくつかの実施形態では、RNAは、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている単離RNAとして提供される。こうしたRNAは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖RNAに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖RNAに関して）の一本鎖または二本鎖RNAなど、比較的短くてもよい。あるいは、RNAは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態では、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させるアプタマーまたはリボザイムまたは発現カセットなどをコードする追加のRNAなど、追加の要素を含むように設計される。

改善されたLEPTINOTARSA種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法及びこのように提供される植物、植物部分及び種子

【0090】

本発明の別の態様は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺

伝子またはDNAのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法に関し、これによって、ポリヌクレオチドが発現していない場合の対照植物と比較したとき、得られた植物のLeptinotarsa種への耐性が改善される。一実施形態において、本方法は、標的遺伝子配列群若しくはそのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子若しくはDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを植物中に含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現させることを含む。一実施形態では、本発明は、配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094からなる群から選択される配列を有するDNAの少なくとも21の近接ヌクレオチドに同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物中に発現させることを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法を提供する。「植物中にポリヌクレオチドを発現させること」とは、例えば、アンチセンスであるか、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAの少なくとも1つのフラグメントに本質的に相補的であるリボヌクレオチド配列を含むRNAを植物中に発現させることなど、一般に「植物中にRNA転写物を発現させること」を意味する。実施形態としては、植物に発現するポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはこれらの補体からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのセグメントを含むRNAである実施形態であるか、または植物中に発現するポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンである実施形態が挙げられる。実施形態としては、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAを含む実施形態が挙げられる。しかし、植物中に発現したポリヌクレオチドは、DNAまたはこうしたDNAによってコードされたRNAでもあり得る（例えば、ゲノム複製中に植物中で産生されたDNA）。本発明の関連態様としては、本方法において有用な単離ポリヌクレオチド、及び本方法により提供された改善されたLeptinotarsa耐性を有する植物が挙げられる。

【0091】

本方法は、少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含み、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、DNAの形態（例えば、単離DNA分子の形態で、または発現構造体として、または形質転換ベクターとして）で植物に提供され、植物中に発現するポリヌクレオチドは、植物中の第2のポリヌクレオチドである（例えば、第1のポリヌクレオチドのRNA転写物である）。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、トランスジェニック発現によって、すなわちポリヌクレオチドの、細胞内または植物の細胞内に発現させることができることから、植物のゲノムへの安定的結合によって、植物中に発現する。一実施形態では、第1のポリヌクレオチド（例えば、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結されたプロモーターを含む組換え型DNA構造体）は、二次的に産生されるポリヌクレオチド（例えば、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの転写物を含むRNA転写物）は、細胞中または植物細胞中に発現させる植物のゲノムに安定して組み込まれる。安定して形質転換された植物を提供する方法は、見出し「トランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物の産生及び使用」としたセクションに提示する。

【0092】

別の実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、一過性の発現によって発現する（すなわち、配列の植物ゲノムへの安定した組込みによるものではない発現）。こうした実施形態では、本方法は、当該技術分野において既知の技術ルーチン技術によって、ポリヌクレオチド（例えば、dsRNAまたはdsDNA）を植物に取り込むステップを含み得る。例えば、無針注射器を用いて、ポリヌクレオチド溶液を植物の葉に浸潤させることにより一過性の発現が達成され得る。

【0093】

植物中にポリヌクレオチドを発現させるいくつかの実施形態では、一過性の発現により発生させ、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両方の形態で植物に提供され、二次的に産生される第2のポリヌクレオチドは、植物内に一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、以下から選択される1つ以上である：(a) 一本鎖RNA分子（ssRNA）、(b) 自己ハイブリダイゼーションにより二本鎖RNA分子を形成する一本鎖RNA分子、(c) 二本鎖RNA分子（dsRNA）、(d) 一本鎖DNA分子（ssDNA）、(e) 自己ハイブリダイゼーションにより二本鎖DNA分子を形成する一本鎖DNA分子、(f) RNA分子に転写される修飾Pol III遺伝子を含む一本鎖DNA分子、(g) 二本鎖DNA分子（dsDNA）、(h) RNA分子に転写される修飾Pol III遺伝子を含む二本鎖DNA分子、(i) 二本鎖ハイブリッドRNA/DNA分子またはこれを組み合わせたもの。特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング剤中、または基質上若しくは基質内、またはナス科植物種子処理剤若しくは種芋処理剤の形態など、好適な形態でのポリヌクレオチド含有組成物の植物への局所投与によって植物に取り込まれる。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により組成物に含むことができる。こうした実施形態では、ポリヌクレオチド含有組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むことができるポリヌクレオチドを提供することを含み、一実施形態では、組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤（現在、Momentum Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を更に含む。いくつかの実施形態では、局所投与される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。あるいは、こうした追加の成分または殺虫剤は、別の局所投与によって、または植物中でのトランスジェニック発現によって、別個に提供され得る。あるいは、植物は、ポリヌクレオチド含有組成物によって、並びにポリヌクレオチド含有組成物の効果を向上させる物質を別に投与する（投与前、投与後、または同時に）ことによって、局所処理される。例えば、植物は、SILWET（登録商標）、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を含む溶液を第1の局所投与、次に、ポリヌクレオチド含有組成物の第2の局所投与を行うことによって、噴霧され得る。逆もまた同じである。

【0094】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺

10

20

30

40

50

虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態では、少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含み、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNAのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む（例えば、実施例に記載されているポリヌクレオチドトリガー）。パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の遺伝子コード非ポリヌクレオチド殺虫剤は、*Leptinotarsa*種の侵入の相乗的に向上された耐性を示すことがわかっている。

10

【0095】

一過性の発現によってポリヌクレオチドを植物中に発現させるいくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両方の形態で植物に提供され、二次的に産生される第2のポリヌクレオチドは、植物中に一過的に発現させ、第1のポリヌクレオチドの投与部位は、第2のポリヌクレオチドが一過的に発現する部位と同じである必要はない。例えば、第1のポリヌクレオチドは、葉に局所投与することによって、または茎部に注入することによって、植物に提供することができ、第2のポリヌクレオチドは、植物内の他の場所、例えば、塊根内または植物全体に一過的に発現させることができる。本方法のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、例えば、植物の葉、茎部及び開花部分への噴霧または散布など、植物の地表上部分に局所投与される。他の実施形態では、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、塊根など、植物の地表下部分に、例えば土壌灌水によって、局所投与される。他の実施形態では、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、成長して、*Leptinotarsa*種の侵入に改善された耐性を有する植物になる種子に局所投与される（または、ジャガイモの場合、種芋に局所投与される）。いくつかの実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドRNAであり、このRNAは、一本鎖（ss）RNAまたは二本鎖（ds）RNAまたはその両者を組み合わせたものであってもよい。

20

【0096】

いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチド（DNAまたはRNA若しくはその両方）が植物に提供され、第1のポリヌクレオチドに対応する（同一であるか、または相補的である）配列を有する第2のポリヌクレオチドが、その後、植物内に発現する。こうした実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、ssRNAまたはdsRNAもしくはその両者を組み合わせたものであり得るRNA転写物である。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるいくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両者の形態で植物に提供され、二次的に産生された第2のポリヌクレオチドは、植物内に一過的に発現され；こうした実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、以下から選択される1つ以上である：（a）一本鎖RNA分子（ssRNA）、（b）自己ハイブリダイゼーションにより二本鎖RNA分子を形成する一本鎖RNA分子、（c）二本鎖RNA分子（dsRNA）、（d）一本鎖DNA分子（ssDNA）、（e）自己ハイブリダイゼーションにより二本鎖DNA分子を形成する一本鎖DNA分子、（f）RNA分子に転写される修飾Pol I III遺伝子を含む一本鎖DNA分子、（g）二本鎖DNA分子（dsDNA）、（h）RNA分子に転写される修飾Pol I II遺伝子を含む二本鎖DNA分子、（i）二本鎖ハイブリッドRNA/DNA分子またはこれを組み合わせたもの。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるこうした実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、DNA及びRNA中に産生するものなど、天然ヌクレオチドから構成され得る。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるこうした実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、化学的修飾されていてもよく、また化学的修飾ヌクレオチドを含む。第1のポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、第1のポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細

30

40

50

胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。第1のポリヌクレオチドは、RNAフラグメントまたはDNAフラグメントとして提供され得る。あるいは、第1のポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計され得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、植物中に発現するポリヌクレオチドは、RNA分子であり、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖RNAに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖RNAに関して）の一本鎖または二本鎖RNAなど、比較的短くてもよい。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態では、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計される。

【0098】

植物中に発現させるポリヌクレオチドは、DNAまたは標的配列群から選択される配列またはそのDNA補体を有する標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと确实（100%）に同一である。いくつかの実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはこれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子のフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する全体の配列を有する。

【0099】

植物中に発現させるポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子を抑制させるように設計される（「標的遺伝子」）。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域に対して、複数の遺伝子を抑制するように設計してもよい。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、複数の部分またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性または100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含み、各部分は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチ

ドの少なくとも1つのセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0100】

植物中に発現させるポリヌクレオチドの合計長さは、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、植物中に発現させるポリヌクレオチドの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、特異的に標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に関連していない（すなわち、相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含む。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3'オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態では、植物中に発現させるポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、21の近接ヌクレオチドのそれぞれの少なくとも2つのセグメントを含み、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNA中に発生するのは異なる順番で配置される。

【0101】

関連のある態様では、本発明は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることによって提供され、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物に関し、これによって、ポリヌクレオチドが発現していない場合の対照植物と比較したとき、得られた植物のLeptinotarsa種の侵入への耐性が改善される。関連する態様では、本発明は、標的遺伝子配列群またはそのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントとの約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に発現させることによって提供される、改善されたLeptinotarsa種に対す

る耐性を有する植物に関し、これによって、得られた植物は、ポリヌクレオチドが発現していない対照植物と比較して、Leptinotarsa種に対する耐性が改善されている。一実施形態は、対照植物と比較したとき、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有するナス科植物であり、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126、若しくはこれらの補体からなる群から選択される配列を有するRNAを植物中に発現させるか、または配列番号：1105～1109からなる群から選択された配列によってコードしたRNAヘアピンを植物中に発現させることによって提供させる。更に別の態様では、本発明は、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された種子（特に、トランスジェニック後代種子）に関する。また、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された商品生産物及びこうした植物のトランスジェニック後代種子から産生される植物商品生産物が想到される。

10

Leptinotarsa種の防除のための組換え型DNA構造体

【0102】

本発明の別の態様は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAフラグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むDNA要素と操作可能に連結する異種プロモーター要素を含む組換え型DNA構造体を提供する。いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、以下に操作可能に連結される異種プロモーターを含む：(a) 配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、または標的遺伝子から転写されるRNAからなる群から選択される配列を有する標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であるヌクレオチド配列を含むDNA、または(b) 配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094、またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントに対して100%同一性を有する21以上の近接ヌクレオチドを含むDNA、または(c) 標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAの少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素をコードしたDNAであって、標的遺伝子が配列番号：730、配列番号：807、配列番号：1～725、配列番号：726～729、配列番号：731～806、配列番号：808～830、及び配列番号：1087～1094からなる群から選択される配列を有するDNA、または(d) 標的遺伝子配列群または標的遺伝子から転写されたRNAにおける遺伝子から選択される標的遺伝子に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む少なくとも1つのサイレンシング要素をコードするDNA、または、(e) トリガー配列群またはそれらの補体から選択されるヌクレオチド配列またはLeptinotarsa種若しくはTribolium種由来のオルソロガスヌクレオチド配列に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含むRNAをコードするDNAであって、オルソロガスヌクレオチド配列は、トリガー配列群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、配列同一率は、同一長さで算出されるDNA、または(f) 少なくとも1つの二本鎖RNA領域を含むRNAをコードするDNAであって、そのうちの少なくとも1本の鎖は、トリガー配列群若しくはそれらの補体、またはLeptinotarsa種若しくはTribolium種由来のオルソロガスヌクレオチド配列から選択されたヌクレオチド配列に相補的である少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む、RNAをコードするDNAであって、オルソロガスヌクレオチド配列は、トリガー配列群からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、配列同一率は、同一長さで算出されるDNA、または、(g) トリガー配列群またはそれらの補体から選択されるヌクレオチド配列を含むRNAをコードするDNA。実施形態としては、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有するRNAをコードするDNA要素に操作可能に連結する異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体、または、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンをコードするDNA要素に操作可能に連結される異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体が挙げられる。実施形態としては、

20

30

40

50

トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本の鎖を有するdsRNAをコードするDNAに操作可能に連結する異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体が挙げられる。組換え型DNA構造体は、例えば、植物中にこうした組換え型DNA構造体の転写物を発現させることによって、Leptinotarsa種の侵入に対して改善された耐性を有する植物に提供する際に有用である。また、組換え型DNA構造体は、Leptinotarsa種の侵入から保護する必要のある植物、種子、伝播可能な植物部分、土壌または畑若しくは表面に投与し得る組成物の製造に有用なポリヌクレオチドの産生に有用である。本発明の関連態様としては、組換え型DNA構造体を含む組成物、植物染色体若しくは色素体若しくは組換え型植物ウィルスベクターまたは組換え型DNA構造体を含む組換え型バキュロウイルスベクター、そのゲノム内に、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤をコードするDNAを任意により含む組換え型DNA構造体をそのゲノム内に有するトランスジェニックナス科植物細胞、及びこうしたトランスジェニックナス科植物、果実、種子またはトランスジェニックナス科植物の伝播部分を含むトランスジェニックナス科植物、及び組換え型DNA構造体またはその中にコードされたRNAの発現によってまたは組換え型DNA構造体またはその中にコードされたRNAによる処置によって提供された改善されたLeptinotarsa耐性を有する植物を有する植物が挙げられる。

【0103】

組換え型DNA構造体は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結する異種プロモーター要素を含む。いくつかの実施形態において、18以上の近接ヌクレオチドのセグメントは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと确实（100%）に同一である。いくつかの実施形態において、DNAは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の同一性の全配列を有する。

【0104】

このため、組換え型DNA構造体は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子の発現を抑制するように設計された18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結する異種プロモーター要素を含む。いくつかの実施形態において、DNAは、例えば、18～24、または18～28、または20～30、または20～50、または20～100、または50～100、または50～500、または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはそれ以上などの18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、セグメントは、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500、または500超の近接ヌクレオチド）など、18超の近接ヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、DNAは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むRNAをコードする。特定の実施形態において、DNAは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸（例えば、dsRNA）をコードし、二本鎖核酸が、標的遺伝子

配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する、少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対の少なくとも1つを含むような塩基対として発現している。特定の実施形態において、DNA内に収容された各セグメントは、自然調節小分子RNA、である長さを超える長さである。いくつかの実施形態において、少なくとも約30近接ヌクレオチド（または塩基対）を超える長さである。いくつかの実施形態において、DNAの全長またはポリヌクレオチド内に収容される各セグメントの長さは、対象の配列の全長未満である（標的遺伝子配列群からなる群から選択させる配列を有するDNAまたは標的遺伝子）。いくつかの実施形態では、DNAの合計長さは約50～約500である。いくつかの実施形態で、DNAは、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有するRNAをコードする。いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列を含む。

10

【0105】

組換え型DNA構造体は、概して、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）を抑制するように設計されたDNAに操作可能に連結される異種プロモーターを含む。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態では、組換え型DNA構造体は、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態において、組換え型DNA構造体は、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群からの複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域を標的にするように設計してもよい。一実施形態において、組換え型DNA構造体は、複数の部分またはセグメントに操作可能に連結する異種プロモーターを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、複数の部分に組換え型DNA構造体は縦列型配列または反復配列に複数の部分に操作可能に連結される異種プロモーターを含んでいてもよく、各部分は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含み：セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

20

30

【0106】

組換え型DNA構造体は、18の近接ヌクレオチドを超える合計長さを有し得るDNAに操作可能に連結される異種プロモーターを含み、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントに加えて、ヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、DNAの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたDNAのセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、DNAは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態において、異種プロモーターは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に特異的に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含むDNAに操作可能に連結される。一実施形態にお

40

50

いて、異種プロモーターは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含むDNAに操作可能に連結される。一実施形態において、異種プロモーターは、追加の5' G若しくは追加の3' Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含むDNAに操作可能に連結する。別の実施形態において、異種プロモーターは、オーバーハングを形成するために、追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAをコードするDNAに操作可能に連結する。このため、様々な実施形態において、異種プロモーターに操作可能に連結するDNA全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドのそれぞれの少なくとも2つのセグメントを含むDNAと操作可能に連結され、(1) 少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または(2) 少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0107】

組換え型DNA構造体では、異種プロモーターは、一本鎖(ss)または二本鎖(ds)またはその両方を組み合わせたものであってもよい転写物をコードするDNAに操作可能に連結する。本方法の実施例としては、DNAは、センス一本鎖RNA(ssRNA)、アンチセンスssRNA、または二本鎖RNA(dsRNA)または任意のこれらを組み合わせたものを含む転写物をコードするものが挙げられる。

【0108】

組換え型DNA構造体は、当業者において既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、組換え型DNA構造体は、インビトロで合成され、微生物または細胞培養中(培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など)での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0109】

組換え型DNA構造体に有用な異種プロモーターは、植物中で機能するプロモーター、原核生物中で機能するプロモーター、真菌細胞中で機能するプロモーター及びバキュロウィルスプロモーターからなる群から選択される。非限定例プロモーターは、見出し「プロモーター」としたセクションに記述している。

【0110】

また、いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、DNAに操作可能に連結される第2のプロモーターを含む。例えば、18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むDNAは、プロモーターが反対の方向及び収束方法で転写し、相補的であり、二本鎖RNAを形成するために互いにハイブリッド形成を行うことができるDNAの逆鎖転写物を産生するように配置された2つのプロモーターが隣接していてもよい。一実施形態において、DNAは、2つの根特異的プロモーター間に配置され、DNAの転写が反対方向で可能であり、その結果、dsRNAが形成される。

【0111】

いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%同一性～約100%同一性の18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結される異種プロモーターに加えて、他のDNA要素を含む。このようなDNA要素は、当業者に既知であり、これに限定されないが、イントロン、リコンビナーゼ認知部位、アプタマーまたはリボザイム、及びコード配列(例えば、殺虫性タンパク質または選択

マーカ―などの導入遺伝子を発現させるため）または非コード配列（例えば、追加の抑制要素を発現させるため）を発現させるための追加カセット及び追加発現カセットが挙げられる。小分子RNA（例えば、特定の細胞または組織のみに発現するmiRNAまたはsiRNAによる）による結合及び切断のために1つ以上の認識部位を包含することによって、植物中において更に正確な発現パターンが可能であり、小分子RNAが発現する場合、組換え型DNA構造体の発現が抑制される。

【0112】

いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、組換え型ベクター中に提供される。「組換え型ベクター」は、1つの細胞から他の細胞へ遺伝情報を伝達するために使用される組換え型ポリヌクレオチド分子を意味する。本発明に好適な実施形態としては、これらに限定されないが、組換え型プラスミド、組換え型コスミド、人工染色体、及び組換え型植物ウィルスベクターなどの組換え型ウィルスベクター、及び組換え型バキュロウィルスベクターが挙げられる。代替的实施形態としては、組換え型プラスミド、組換え型コスミド、人工染色体及び組換え型植物ウィルスベクターなどの組換え型ウィルスベクター、及び異種プロモーターを含まないDNA要素を含む組換え型バキュロウィルスベクターが挙げられる。

10

【0113】

いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体は、植物染色体またはプラスミド中、例えば、トランスジェニック植物細胞またはトランスジェニック植物中で提供される。したがって、本発明によって包含されるものは、そのゲノム中に組換え型DNA構造体を有するトランスジェニック植物細胞、並びにトランスジェニック植物またはこうしたトランスジェニック植物細胞などの部分的トランスジェニック植物である。部分的トランスジェニック植物は、例えば、トランスジェニック植物細胞などの、トランスジェニック根茎に移植される非トランスジェニック移植片が挙げられる。実施形態としては、トランスジェニック植物細胞などのトランスジェニックトマト根茎が挙げられる。植物は、*Leptinotarsa*種による侵入を受けている任意の植物であり得る。特に興味深いのは、植物がナス科植物（ナス科族）である実施形態である。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択される植物が挙げられる。実施形態は、植物が、不発芽ナス科植物種子、休止期のナス科植物または生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態は、植物が「種芋」であり、伝播されて新規ジャガイモ植物になり得るジャガイモの塊茎またはジャガイモの塊茎片を意味する実施形態を含む。更に別の態様では、本発明は、本明細書に記載のとおり、そのゲノム内に組換え型DNA構造体を有するトランスジェニック植物によって産生される種子に関する（特に、トランスジェニック後代種子）。また、実施形態において、本明細書に記載のとおり、そのゲノム内に組換え型DNA構造体を有するトランスジェニック種芋も包含する。また、トランスジェニック植物によって産生された商品生産物及びこうしたトランスジェニック植物のトランスジェニック後代種子から産生される商品生産物も意図される。

20

30

【0114】

組換え型DNA構造体は、植物または植物種子の表面への局所投与用、または*Leptinotarsa*種の侵入から保護する必要のある任意の基質への局所投与用組成物内に提供され得る。同様に、組換え型DNA構造体は、*Leptinotarsa*種への局所投与用組成物中または*Leptinotarsa*種による摂餌用組成物中に提供され得る。さまざまな実施形態において、組換え型DNA構造体を含有するこうした組成物は、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内、または種子処理剤からなる群から選択される少なくとも1つの形態で提供される。局所投与することは、ナス科植物の果実またはナス科植物の果実の種子の局所処理の形態「種芋」塊茎または塊茎片の局所処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）であってもよい。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活

40

50

性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、組換え型DNA構造体含有組成物に含むことができる。いくつかの実施形態において、局所投与用の組換え型DNA構造体含有組成物は、植物中に局所的に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの局所的に植付可能な配合物であり、こうした実施形態においては、本方法は植物中に局所的に植付け可能な配合物を局所的に植付けすることを含む。いくつかの実施形態において、局所投与用の組換え型DNA構造体含有組成物は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に局所的に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態において、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。一実施形態において、局所投与用の組換え型DNA構造体含有組成物は、摂取させるか、または別の方法でLeptinotarsa種によって内部的に吸収させることができる。例えば、局所投与用の組換え型DNA構造体含有組成物は、餌の形態であってもよい。いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に記載されているものなど）、オルガノシリコン、オルガノシリコン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む。一実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤（現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）など、非イオン性オルガノシリコン界面活性剤を更に含む。いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。

【0115】

本明細書に記載のとおり、1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤によるトランスジェニック的発現させたか、または局所投与させた、トランスジェニック的発現させたか、または局所投与させた特定の組換え型DNA構造体の組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガーを含む組換え型DNA構造体）は、組換え型DNA構造体のみまたは非ポリヌクレオチド殺虫剤のみにより得られた効果と比較して、*Leptinotarsa*種の侵入の保護または防除の相乗的改善となるがわかっている。一実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドを発現させるための組換え型DNA構造体並びにパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の遺伝子コード非ポリヌクレオチド殺虫剤は、組換え型DNA構造体を発現させる植物中において、*Leptinotarsa*種の侵入の相乗的に向上させた耐性を提供することがわかっている。一実施形態は、配列番号：831~1085及び1095からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むRNAを発現させるための組換え型DNA構造体並びにパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の遺伝子をコードする非ポリヌクレオチド殺虫剤に関する。

【0116】

組換え型DNA構造体含有組成物は、*Leptinotarsa*種による侵入を受ける植物または表面に組成物を投与することによって（例えば、植物の噴霧、散布若しくはコーティングによって、土壌灌注の適用、または人工食餌中に提供することによって）、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために提供され得る。組換え型DNA構造体含有組成物は、*Leptinotarsa*種

を維持するために特定の栄養所要量に見合うように配合された人工食餌中においてLeptinotarsa種による食事摂取のために提供されてもよく、人工食餌は、異なる供給源から得られた若干量の組換え型DNA構造体（インビトロで合成されたものまたは微生物発酵または他の生物学的起源から精製されたものなど）が補充され、本実施形態は、例えば、有効な処理法の時機及び量を決定する際に有用であり得る。いくつかの実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、植物細胞の形態で、または植物細胞組成物中において、または微生物微生物（細菌または酵母菌など）、または微生物発酵物において、または合成食餌若しくは人工食餌中においてLeptinotarsa種による食餌摂取のために提供される。一実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、Leptinotarsa種によって摂取される餌の形態で提供される。組換え型DNA構造体含有組成物は、Leptinotarsa種による食餌摂取のために種子処理剤の形態で提供され得る。

10

【0117】

さまざまな実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、微生物細胞を含むか、または微生物中で作製される。例えば、組換え型DNA構造体含有組成物は、細菌若しくはイースト菌を含み得るか、細菌若しくはイースト菌中に産生され得る。類似の実施形態において、組換え型DNA構造体含有組成物は、トランスジェニック植物細胞を含むか、または植物細胞中に産生され（例えば、組換え型DNA構造体が過渡的に発現する植物細胞）、こうした植物細胞は、植物中の細胞であり得るか、または組織培養液中若しくは細胞懸濁液中で成長した細胞であり得る。

トランスジェニックナス科植物細胞

20

【0118】

複数の実施形態は、Leptinotarsa種中の標的遺伝子の発現を抑制するために、またはLeptinotarsaの侵入を防除するために、本明細書に記載の本方法において有用なポリヌクレオチドを発現させるトランスジェニックナス科植物細胞に関する。一態様では、本発明は、そのゲノム内に、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む組換え型DNAをコードするRNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供する。一態様では、本発明は、Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子配列のフラグメントに対して本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、そのゲノム内に組換え型DNAをコードするRNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供し、この標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される。一態様では、本発明は、RNAに接触するか、またはRNAを摂餌するLeptinotarsa種において標的遺伝子の発現を抑制する、そのゲノム内に組換え型DNAをコードするRNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供し、RNAは、標的遺伝子配列のフラグメントに対して相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、この標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群における遺伝子からなる群から選択される。特定の実施形態は、ゲノム内に、RNAと接触するかまたはRNAを摂餌するLeptinotarsa種内の標的遺伝子の発現を抑制する組換え型DNAコードRNAを有する、トランスジェニックナス科植物細胞であり、RNAは、1つ以上のエクソシスト標的遺伝子のフラグメントに相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、好適なエクソシスト標的遺伝子としては、表4に提供するLeptinotarsaエクソシスト遺伝子または他の昆虫種から同定される相同配列が挙げられる。一態様では、本発明は、そのゲノム内に配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有する組換え型DNAをコードするRNA、または配列番号：1105～1109からなる群から選択される組換え型DNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供し、実施形態としては、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本の鎖を有するdsRNAをコードする組換え型DNAをそのゲノム内に有するトランスジェニックナス科植物細胞が挙げられる。このようなトランスジェニックナス科植物細胞は、このような植物細胞を欠いている対照植物と比較するとき

30

40

50

、*Leptinotarsa*種の侵入に改善された耐性を有するトランスジェニックナス科植物を提供するにあたって有用である。トランスジェニックナス科植物細胞は、単離トランスジェニックナス科植物細胞または培養中で成長するトランスジェニックナス科植物細胞または*Leptinotarsa*種による侵入を請けている任意のトランスジェニックナス科植物のトランスジェニック細胞であり得る。例としては、ジャガイモ、トマト及びナスからなる群から選択されるトランスジェニックナス科植物が挙げられる。実施形態は、トランスジェニックナス科植物が、不発芽トランスジェニックナス科植物種子、休止期のトランスジェニックナス科植物または生殖成長期のナス科植物である実施形態を含む。実施形態としては、トランスジェニックナス科植物は伝播させて新規トランスジェニックジャガイモ植物になり得るジャガイモ塊茎またはジャガイモ塊茎片（「種芋」）が挙げられる。

10

【0119】

一実施形態において、組換え型DNAは、トランスジェニックナス科植物の細胞（複数可）中に発現させることができる、トランスジェニックナス科植物のゲノムに安定して組み込まれる。安定して形質転換された植物を提供する方法は、見出し「トランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物の産生及び使用」としたセクションに提示する。

【0120】

複数の実施形態は、RNAに接触するか、またはRNAを摂餌する*Leptinotarsa*種において標的遺伝子の発現を抑制する、そのゲノム内に組換え型DNAをコードするRNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞に関し、RNAは、標的遺伝子に対して相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群またはそれらの補体から選択される。いくつかの実施形態において、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントに対して約95%～約100%相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントにインビボでハイブリッド形成可能であるか、または生理学的条件下ハイブリッド形成可能である（例えば、通常、*Leptinotarsa*種の細胞中で見られる生理学的条件など）少なくとも1つの18以上の近接ヌクレオチドを含む。近接ヌクレオチドの数は、少なくとも18（例えば、18～24、18～28、20～30または20～50、または20～100、または50～100、または50～500または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはこれ以上）である。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドの数は、18超、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500または500超）の近接ヌクレオチドである。特定の実施形態において、サイレンシング要素は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。特定の実施形態において、RNAは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸（例えば、dsRNA）であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対の少なくとも1つを含むように塩基対として発現している。特定の実施形態において、RNA内に収容された各サイレンシング要素は、自然調節小分子RNAが典型的である長さを超える長さである。いくつかの実施形態において、各セグメントは少なくとも約30近接ヌクレオチド（または塩基対）を超える長さである。特定の実施形態において、RNAは、約50～約500ヌクレオチドの長さである。特定の実施形態において、RNAは、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有するか、ま

20

30

40

50

たはRNAは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる。

【0121】

いくつかの実施形態において、トランスジェニックナス科植物細胞は、追加の異種DNA配列を更に発現させることが可能である。一実施形態において、トランスジェニックナス科植物細胞は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤をコードする組換え型DNAを更に含むゲノムを有する。特定の実施形態において、トランスジェニックナス科植物細胞は、安定してそのゲノムの中に組み込まれている。(i) 配列番号：831～1085及び1095からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのRNAをコードする組換え型DNA、及び(ii) パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤をコードするDNA。

【0122】

関連態様において、本発明は、トランスジェニックナス科植物細胞、トランスジェニックナス科植物から産生される商品生産物、及びトランスジェニック後代ナス科植物種子またはトランスジェニックナス科植物のトランスジェニック伝播可能部分などのトランスジェニックナス科植物に関する。実施形態としては、*Leptinotarsa*種の侵入への改善された耐性を有するトランスジェニックトマト植物、トランスジェニックトマト根茎、トランスジェニックナス、またはトランスジェニックジャガイモ植物が挙げられる。また、トランスジェニックナス科植物によって産生された商品生産物、及びこうしたトランスジェニックナス科植物のトランスジェニック後代種子によって産生された商品生産物も意図される。

*Leptinotarsa*種の防除用殺虫性組成物

【0123】

本発明の別の態様は、*Leptinotarsa*種の防除用殺虫性組成物を提供し、殺虫性組成物は、本質的に、*Leptinotarsa*種によって摂餌または接触されると、*Leptinotarsa*種において死滅または成長の阻害を引き起こすRNA分子からなり、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。本文脈中、*Leptinotarsa*種を「防除する」ことは、成長阻害または死滅率の上昇など、*Leptinotarsa*種（成虫または幼虫）における生理学的変化または行動的变化を招くことを含む。いくつかの実施形態において、*Leptinotarsa*種を防除することは、*Leptinotarsa*種において、例えば、生殖能力の低下、摂食行動若しくは動作の減少若しくは停止、または変態段階の発現の減少若しくは停止などによって得られる。一般に、RNA分子は、単離されている。つまり、混合物、例えば、発酵からまたはインビトロ合成混合物などから実質的に精製されている。一実施形態において、RNA分子は、標的配列群若しくはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、RNA分子は、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むか、またはRNA分子は、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、RNA分子は二本鎖であり、少なくとも1つのセグメントは、約50～約500塩基対の長さである。いくつかの実施形態において、RNA分子は、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAである。いくつかの実施形態において、殺虫性組成物は、*Leptinotarsa*種を防除するために提供され、殺虫性組成物は、二

本鎖RNAを含み、二本鎖RNAの少なくとも一本鎖は、リボソームタンパク質または遺伝子から転写されるRNAをコードする遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であり、*Leptinotarsa*種は、*Leptinotarsa decemlineata*であり、RNA干渉が誘導され、*Leptinotarsa decemlineata*の死滅が発生し、リボソームタンパク質は、リボソームL7タンパク質または配列番号：730によってコードされるタンパク質であるか、または二本鎖RNAは、配列番号：989、988、1104または1105からなる群から選択される配列を含む。

【0124】

RNA分子の実施形態において、18以上の近接ヌクレオチドのセグメントは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の相補性を有する配列を有する。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと确实（100%）に相補的である。いくつかの実施形態において、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%の相補性の全配列を有する。

【0125】

RNA分子の実施形態としては、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有する標的遺伝子の発現を抑制するように設計された18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントが挙げられる。近接ヌクレオチドのセグメント数は、少なくとも18（例えば、18～24、18～28、20～30または20～50、または20～100、または50～100、または50～500または100～250、または100～500、または200～1000、または500～2000またはこれ以上）である。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドの数は、18超、例えば、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または30超（例えば、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約350、約400、約450、約500または500超）の近接ヌクレオチドである。特定の実施形態において、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。特定の実施形態において、RNAは、一本鎖が標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する少なくとも21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む二本鎖核酸（例えば、dsRNA）であり、二本鎖核酸が、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対応する少なくとも21の近接し、完全に適合している塩基対の少なくとも1つを含むように塩基対として発現している。特定の実施形態において、RNA分子内に収容された各セグメントは、典型的な自然調節小分子RNAである長さを超える長さである。いくつかの実施形態において、各セグメントは少なくとも約30近接ヌクレオチド（または塩基対）を超える長さである。いくつかの実施形態において、RNA分子の合計長さまたはRNA分子内に収容される各セグメントの長さは、対象の配列（標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子）の合計長さ未満である。いくつかの実施形態において、RNA分子の合計長さは、約50～約500のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチド）または塩基対（二本鎖ポリヌクレオチド）である。いくつかの実施形態において、RNA分子は、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーの長さのdsRNAなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。いくつかの実施形態において、殺虫性組成物は、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有する一本の鎖を有する、殺虫性有効量の二本鎖RNA分子から本質的に構成され、または、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる殺虫性有効量のRNAヘアピンから本質的に構成される。いくつかの実施形態において、殺虫性組成物は、トリガー配列群から

なる群から選択される配列を有する一本の鎖を有する、殺虫性有効量の二本鎖RNA分子から本質的に構成される。

【0126】

RNA分子は、概して、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）を抑制するように設計される。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態において、RNA分子は、1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。さまざまな実施形態において、RNA分子は、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有し、また、この群からの複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域を標的にするように設計してもよい。RNA分子の実施形態としては、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計された配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントが挙げられ、各遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択された配列を有する。一実施形態において、RNA分子は、複数の部分またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよい。例えば、一実施形態において、RNA分子は、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含み、各部分は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0127】

RNA分子は、18の近接ヌクレオチドを超える全長を有してもよく、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の相補性を有する配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントに加えて、ヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、RNA分子の合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されるセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるDNA配列を有する。例えば、RNA分子は、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態において、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子に特異的に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）を含む。一実施形態において、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態において、RNA分子は、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態において、RNA分子は、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3'オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態において、RNA分子全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、RNA分子は、標的遺伝子配列群またはそれ

らのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも2つのセグメントを含み、(1)少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサヌクレオチドによって分離されるか、または(2)少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA相補体から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

【0128】

RNA分子は、一本鎖(ss)または二本鎖(ds)またはその両方を組み合わせたものであってもよい。RNA分子の実施例としては、センス一本鎖RNA(ssRNA)、アンチセンスssRNA、または二本鎖RNA(dsRNA)または任意のこれらを組み合わせたものが挙げられる。RNAは、標準リボヌクレオチド以外の成分を含んでもよく、例えば、一実施形態は、末端デオキシリボヌクレオチドを含むRNAである。さまざまな実施形態において、RNA分子は、天然リボヌクレオチドから構成される。ある実施形態において、例えば、主にリボヌクレオチドからなるが、1つ以上の末端デオキシリボヌクレオチドまたは1つ以上の末端を有する合成RNA分子など、RNA分子は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとを組み合わせたものである。ある実施形態において、RNA分子は、イノシン、チオウリジン、またはプソイドウリジンなど、非正準的なヌクレオチドを含む。ある実施形態において、RNA分子は、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。

【0129】

RNA分子は、当業者において既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、RNA分子は、インビトロで合成され、微生物または細胞培養中(培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など)での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0130】

いくつかの実施形態において、RNA分子は、RNAアプタマー若しくはリボザイムなど、他のRNA要素または小分子RNA(例えば、特定の細胞若しくは組織中にのみ発現するmiRNA若しくはsiRNA)による結合及び切断の1つ以上の認識部位を含む、追加の非コードRNA(例えば、追加の抑制要素)を含む。

【0131】

殺虫性組成物は、植物または植物種子の表面への局所投与用、またはLeptinotarsa種の侵入から保護する必要がある任意の基質への局所投与用に提供され得る。同様に、殺虫性組成物は、Leptinotarsa種への局所投与用組成物中またはLeptinotarsa種による摂餌用組成物中に提供され得る。さまざまな実施形態において、殺虫性組成物は、例えば、固体、液体(溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など)、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内などからなる群から選択される少なくとも1つの形態で提供される。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫性剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により殺虫性組成物に含むことができる。殺虫性組成物は、本質的にRNA分子からなるが、いくつかの実施形態において、殺虫性組成物は、キャリア剤、塩、界面活性剤、陽イオン性脂質(参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に開示されているものなど)、オルガノシリコン、オルガノシリコン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、及び毒性緩和剤からなる群から選択される少なくとも1つの非殺虫剤を更に含む殺虫性組成物を提供することを含む。一実施形態において、組換え型RNA分子含有組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号:CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET(登録商標)界面活性剤、例えば、SILWET L-77(登録商標)界面活性剤(現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販)など、非イオン性オルガノシリコン界面活性剤を更に含む。更に、殺虫性組成物を、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除

草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫薬（例えば、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤）による処理後または処理前に組み合わせ使用することができる。関連のある組成物としては、RNA分子とポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫薬と組み合わせたものが挙げられる。

【0132】

殺虫性組成物は、組成物を*Leptinotarsa*種による侵入を受ける植物または表面に投与することによって（例えば、植物への噴霧、散布若しくはコーティングによって）、または土壌灌注の適用、または人工食餌中に提供することによって、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために提供され得る。殺虫性組成物は、*Leptinotarsa*種を維持するために特定の栄養所要量に見合うように配合された人工食餌中において*Leptinotarsa*種による食事摂取のために提供されてもよく、人工食餌は、異なる供給源から得られた若干量の組換え型RNA分子（インビトロで合成されたものまたは微生物発酵または他の生物学的起源から精製されたものなど）が補充され、本実施形態は、例えば、有効なRNA処理法の時機及び量を決定する際に有用であり得る。殺虫性組成物は、*Leptinotarsa*種による食餌摂取のために種子処理剤の形態で提供され得る。

改善された*Leptinotarsa*種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法及びこのように提供される植物、植物部分及び種子

【0133】

複数の実施形態は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に提供することを含む、改善された*Leptinotarsa*種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法に関する。一実施形態では、本発明は、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されたRNAの少なくとも21の近接ヌクレオチドに同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含む、少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に提供することを含む、改善された*Leptinotarsa*種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法を提供し、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子または標的遺伝子から転写されたRNAから選択される。これらの標的遺伝子の実施形態は、表1、2及び4での名前によって同定され、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する遺伝子、並びに関連昆虫種由来のオルソログなどの関連遺伝子（例えば、他の*Leptinotarsa*種、*Tribolium*種、または他の関連属由来の関連遺伝子）を含む。こうした関連遺伝子の例としては、表1に列挙されている*Tribolium castaneum*遺伝子が挙げられる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列と本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAであるか、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される配列を有する一本鎖を有するdsRNAを含む。

【0134】

一実施形態において、本方法は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含み、

これによって、ポリヌクレオチド組成物で処理された植物は、未処理植物に対して、改善されたLeptinotarsa種の侵入に対する耐性を示す。「局所投与」は、植物の表面若しくは外部など、葉、莖部、花、果実、苗条、塊根、種子、塊茎、花、蒴若しくは花粉などの植物部分の表面への投与、または植物全体への投与、または植物の地表上部分若しくは地表下部分への投与など、対象の表面若しくは外部に投与することを意味する。局所投与は、土壌への投与、Leptinotarsa昆虫類がポリヌクレオチドと接触可能な表面または基質への投与など非生物表面上に行うことができる。本方法のさまざまな実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質内、または種子処理剤としてなど、好適な形態で植物に局所的に投与される。本方法のいくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、例えば、植物の葉、莖及び開花部分に噴霧するか、または散布するなど、植物の地表上部分に局所投与される。本方法の実施形態としては、葉面噴霧（例えば、液体ポリヌクレオチド含有組成物をナス科植物の葉に噴霧することなど）または葉面散布（例えば、粉剤の形態またはキャリア微粒子物上でのポリヌクレオチド含有組成物のナス科植物への散布）などの局所投与を含む。他の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、土壌灌水の方法などによって、塊根など植物の地表下部分に局所投与される。他の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、その植物へと成長する種子に局所投与される。局所投与することは、ナス科植物の果実若しくはナス科植物の果実の種子の局所処理の形態、または「種芋」塊茎若しくは塊茎片の局所処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティング若しくは散布）であってもよい。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意によりポリヌクレオチド含有組成物に含むことができる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドを含む組成物は、植物中に局所的に植付可能な微粒子、ペレットまたはカプセルからなる群から選択される少なくとも1つの局所的に植付可能な配合物を含み、こうした実施形態において、本方法は植物中に局所的に植付可能な配合物を局所的に植付することを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、粉末剤、顆粒剤、ペレット剤、カプセル剤、噴霧剤または飲薬からなる群から選択される少なくとも1つのインファロー配合物か、または溝内に局所的に投与するために適した任意の他の形態を含み、こうした実施形態において、本方法は、インファロー配合物を含むインファロー処理剤を含む。一実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、摂取させるか、または別の方法でLeptinotarsa種によって内部的に吸収させることができる。例えば、ポリヌクレオチド含有組成物は、餌の形態であり得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に開示されているものなど）、オルガノシリコーン、オルガノシリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む。一実施形態において、組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWETL-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を更に含む（現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）。いくつかの実施形態において、局所投与される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、Bacillus thuringiensis殺虫タンパク質、Xenorhabdus殺虫タンパク質、Photorhabdus殺虫タンパク質、Bacillus laterosporous殺虫タンパク質、及びBacillus sphaericus殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。あるいは、こうした追加の成分または殺虫剤は、別の局所投与によって、または植物中でのトランスジェニック発現によって、別個に提供され得る。あるいは、植物は、ポリヌクレオチド含有組成物によって、並びにポリヌクレオチド含有組成物

10

20

30

40

50

の効果を向上させる物質を別に投与する（投与前、投与後、または同時に）ことによって、局所処理される。例えば、植物は、SILWET（登録商標）、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコーン界面活性剤を含む溶液を第1の局所投与、次に、ポリヌクレオチド含有組成物の第2の局所投与を行うことによって、噴霧され得る。逆もまた同じである。

【0135】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態において、植物に局所投与すると、1つ以上のポリヌクレオチド及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、相乗的に向上された*Leptinotarsa*種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

10

【0136】

いくつかの実施形態において、本方法は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む。植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、一本鎖（ss）または二本鎖（ds）であってもよい。

20

【0137】

植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、当業者において既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、ポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

30

【0138】

多くの実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、単離DNAまたは単離RNAとして提供される。いくつかの実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている。こうしたポリヌクレオチドは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドに関して）の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドなど、比較的短くてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーの長さのdsRNAなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として更なる錯体構造体で提供され得るか、または例えば、組換え型植物ウィルスベクター若しくは組換え型バキュロウィルスベクターなど、組換え型ベクターに含まれ得る。こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計され得る。

40

【0139】

植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有するか、または、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さのフラグメントに対して約95%～約100%の同

50

一性または相補性の配列を有する。一実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の配列を有する。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さのフラグメントに対して确实（100%）に同一または相補的である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の全配列を有する。

【0140】

植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）を抑制するように設計されている。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。標的遺伝子配列群において同定される遺伝子の実施形態としては、標的遺伝子配列群からなる群から選択されるcDNA配列が挙げられる。さまざまな実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、1つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、各遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択され、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域を標的にするように設計されてもよい。一実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、複数の部位またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含んでもよく、各部分要素は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さのフラグメントに対して約100%の同一性または約100%の相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有するcDNAの異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0141】

植物に局所投与されるポリヌクレオチドの全長は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である配列を有する近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントに加えて、18を超える近接ヌクレオチドであってもよく、また、ヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、植物に局所投与されるポリヌクレオチドの合計長さは、1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよく、各標的遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される。例えば、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態において、植物に局

所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子に特異的に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチドを含み、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）から選択される。一実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子と約95%～約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、追加の5' G若しくは追加の3' Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3' オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、さまざまな実施形態において、植物に局所投与させるポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、植物に局所投与されるポリヌクレオチドは、少なくとも2つのセグメントを含み、21の近接ヌクレオチドのそれぞれが標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと100%同一性の配列を有し、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスパーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子において発生するのとは異なる順番で配置される。

【0142】

関連する態様では、本発明は、*Leptinotarsa*種の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関し、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む、本方法によって提供され、ポリヌクレオチド組成物で処理された植物は、未処理植物に対して、*Leptinotarsa*種の侵入に対する改善された耐性を示す。更に別の態様では、本発明は、本方法によって提供されたように、*Leptinotarsa*種の侵入への改善された耐性を有する植物によって産生された種子（特に、トランスジェニック後代種子）に関する。また、本方法によって提供されたように、改善された*Leptinotarsa*種の侵入への耐性を有する植物によって産生された商品生産物及びこうした植物のトランスジェニック後代種子から産生される植物商品生産物が想到される。

【0143】

別の実施形態において、本方法は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含む、これによって、ポリヌクレオチドが発現した植物は、ポリヌクレオチドを発現していない植物に対して、改善された*Leptinotarsa*種の侵入に対する耐性を示す。一実施形態において、本方法は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドが植物中に発現させることを含む。これらの標的遺伝子の実施形態は、表1、2及び4の名前によって同定され、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する遺伝子、並びに関連昆虫種由来のオルソログなどの関連遺伝子（例えば、他の*Leptinotarsa*種、*Tribolium*種、または他の関連属由来の関連遺伝子）を含む。こうした関連遺伝子の例としては、表1に列挙されている*Tribolium castaneum*遺伝子が挙げら

れる。「植物中にポリヌクレオチドを発現させること」とは、一般に、「植物中にRNA転写物を発現させること」を意味する。しかし、植物中に発現したポリヌクレオチドは、DNAでもあり得る（例えば、ゲノム複製中に植物中で産生させたDNA）。

【0144】

本方法は、少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含み、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定された遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、DNAの形態（例えば、単離DNA分子の形態で、または発現構造体として、または形質転換ベクターとして）で植物に提供され、植物中に発現するポリヌクレオチドは、植物中の第2のポリヌクレオチドである（例えば、第1のポリヌクレオチドのRNA転写物である）。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、トランスジェニック発現によって、すなわちポリヌクレオチドの、細胞内または植物の細胞内に発現させることができることから、植物のゲノムへの安定的結合によって、植物中に発現する。一実施形態において、第1のポリヌクレオチド（例えば、標的遺伝子配列群において同定された遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結されたプロモーターを含む組換え型DNA構造体）は、二次的に産生されるポリヌクレオチド（例えば、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの転写物を含むRNA転写物）は、細胞中または植物細胞中に発現させる植物のゲノムに安定して組み込まれる。安定して形質転換された植物を提供する方法は、見出し「トランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物の産生及び使用」としたセクションに提示する。

【0145】

別の実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、一過性の発現によって発現する（すなわち、配列の植物ゲノムへの安定した組込みによるものではない発現）。こうした実施形態において、本方法は、当該技術分野において既知のルーチン技術によって、ポリヌクレオチド（例えば、dsRNAまたはdsDNA）を植物に取り込むステップを含み得る。例えば、無針注射器を用いて、ポリヌクレオチド溶液を植物の葉に浸潤させることにより一過性の発現が達成され得る。

【0146】

いくつかの実施形態において、植物中に発現したポリヌクレオチドは、一過性の発現によって発現させ、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両方の形態で植物に提供され、二次的に産生される第2のポリヌクレオチドは、植物中に一過的に発現させる。いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、以下から選択される1つ以上である：（a）一本鎖RNA分子（ssRNA）、（b）二本鎖RNA分子を形成するために自己ハイブリダイゼーション形成する一本鎖RNA分子、（c）二本鎖RNA分子（dsRNA）、（d）一本鎖DNA分子（ssDNA）、（e）二本鎖DNA分子を形成するために自己ハイブリダイゼーション形成する一本鎖DNA分子、（f）RNA分子に転写される修飾Pol III遺伝子を含む一本鎖DNA分子、（g）二本鎖DNA分子（dsDNA）、（h）RNA分子に転写される修飾Pol

III遺伝子を含む二本鎖DNA分子、（i）二本鎖ハイブリッドRNA/DNA分子またはこれを組み合わせたもの。特定の実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質上若しくは基質内、またはナス科植物種子処理剤若しくは種芋処理剤の形態など、好適な形態でのポリヌクレオチド含有組成物の植物への局所投与によって植物に取り込まれる。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、

任意により組成物に含むことができる。こうした実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号実施例18に開示されているものなど）、オルガノシリコン、オルガノシリコン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む、一実施形態において、組成物は、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET（登録商標）界面活性剤、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤（現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）など、非イオン性オルガノシリコン界面活性剤を更に含む。いくつかの実施形態において、局所投与される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporus*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む。あるいは、こうした追加の成分または殺虫剤は、例えば、別の局所投与によって、または植物中でのトランスジェニック発現によって、別個に提供され得る。あるいは、植物は、ポリヌクレオチド含有組成物によって、並びにポリヌクレオチド含有組成物の効果を向上させる物質を別に投与する（投与前、投与後、または同時に）ことによって、局所処理される。例えば、植物は、SILWET（登録商標）、例えば、SILWET L-77（登録商標）界面活性剤など、非イオン性オルガノシリコン界面活性剤を含む溶液を第1の局所投与、次に、ポリヌクレオチド含有組成物の第2の局所投与を行うことによって、噴霧され得る。逆もまた同じである。

【0147】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態において、遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現させるトランスジェニック植物は、表1（例えば、実施例に記述されているポリヌクレオチドトリガー）に同定され、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporus*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質からなる群から選択される非ポリヌクレオチド殺虫剤をコードする1つ以上の遺伝子は、*Leptinotarsa*種の侵入の相乗的に向上された耐性を示すことがわかっている。

【0148】

植物中に発現させるポリヌクレオチドが、一過性の発現によって発現させるいくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両方の形態で植物に提供され、二次的に産生される第2のポリヌクレオチドは、植物中に一過的に発現させ、第1のポリヌクレオチドの投与部位は、第2のポリヌクレオチドが一過的に発現する部位と同じである必要はない。例えば、第1のポリヌクレオチドは、葉に局所投与することによって、または茎部に注入することによって、植物に提供することができ、第2のポリヌクレオチドは、植物内の他の場所、例えば、塊根内または植物全体に一過的に発現させることができる。本方法のいくつかの実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、例えば、植物の葉、茎部及び開花部分への噴霧または散布など、植物の地表上部分に局所投与される。他の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、塊根など、植物の地表下部分に、例えば土壌灌水によって、局所投与される。他の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する組成物は、成長して、*Leptinotarsa*種の侵入に改善された耐性を有する植物になる種子に局所投与される（または、ジャガイモの場合、種芋に局所投与される）。

【0149】

いくつかの実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドはRNAであり、このRNAは、一本鎖（ss）RNAまたは二本鎖（ds）RNAまたはその両者を組み合わせたものであってもよい。

【0150】

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチド（DNAまたはRNA若しくはその両方）が植物に提供され、第1のポリヌクレオチドに対応する（同一であるか、または相補的である）配列を有する第2のポリヌクレオチドが、その後、植物内に発現する。こうした実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、ssRNAまたはdsRNA若しくはその両者を組み合わせたものであり得るRNA転写物である。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるいくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNAまたはRNA及びDNAの両者の形態で植物に提供され、二次的に産生された第2のポリヌクレオチドは、植物内に一過的に発現され；こうした実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、以下から選択される1つ以上である：（a）一本鎖RNA分子（ssRNA）、（b）二本鎖RNA分子を形成するために自己ハイブリダイゼーション形成する一本鎖RNA分子、（c）二本鎖RNA分子（dsRNA）、（d）一本鎖DNA分子（ssDNA）、（e）二本鎖DNA分子を形成するために自己ハイブリダイゼーション形成する一本鎖DNA分子、（f）RNA分子に転写される修飾Pol III遺伝子を含む一本鎖DNA分子、（g）二本鎖DNA分子（dsDNA）、（h）RNA分子に転写される修飾Pol III遺伝子を含む二本鎖DNA分子、（i）二本鎖ハイブリッドRNA/DNA分子またはこれを組み合わせたもの。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるこうした実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、DNA及びRNA中に産生するものなど、天然ヌクレオチドから構成され得る。ポリヌクレオチドが一過性の発現により発現させるこうした実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、化学的修飾されていてもよく、また化学的修飾ヌクレオチドを含む。第1のポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、第1のポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。第1のポリヌクレオチドは、RNAフラグメントまたはDNAフラグメントとして提供され得る。あるいは、第1のポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として、更なる錯体構造体で提供され得るか、若しくは組換え型ベクター、例えば、組換え型植物ベクターまたは組換え型バキュロウィルスベクターに含まれてもよく、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計され得る。

【0151】

いくつかの実施形態において、植物中に発現するポリヌクレオチドは、RNA分子であり、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖RNAに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖RNAに関して）の一本鎖または二本鎖RNAなど、比較的短くてもよい。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として更なる錯体構造体で提供され得るか、または例えば、組換え型植物ウィルスベクター若しくは組換え型バキュロウィルスベクターなど、組換え型ベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態において、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計される。

【0152】

植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有する。一実施形態において、植物中に発現するポリヌクレオチ

ドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAと同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の配列を有する。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対して确实（100%）に同一または相補的である。いくつかの実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の全配列を有する。

【0153】

植物中に発現させるポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）を抑制させるように設計される。こうした標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。特定の実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。さまざまな実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、各遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定された遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、また、この群から複数の遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの遺伝子の異なる領域を標的にするように設計してもよい。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、複数の部位またはセグメントを含み、そのそれぞれが、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む。こうした場合、各部分は、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列の複数の部分を含んでもよく、各部分は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0154】

植物中に発現させるポリヌクレオチドの全長は、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと約95%～約100%の同一性または相補性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、植物中に発現させるポリヌクレオチドの合計長さは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよい。例えば、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子に特異的に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチドを含み、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニ

ングまたは産生の便宜上のヌクレオチド)から選択される。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%~約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドも含む。一実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、追加の5' G若しくは追加の3' Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加のヌクレオチドを含む二本鎖RNAである(例えば、3' オーバーハングを形成するために2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA)。このため、様々な実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドのフラグメントに100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、植物中に発現させるポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと100%同一であるまたは100%相補的である配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも2つのセグメントを含み、(1)少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスペーサーヌクレオチドによって分離されるか、または(2)少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子において発生するのとは異なる順番で配置される。

【0155】

関連態様において、本発明は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることによって提供され、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物に関し、これによって、ポリヌクレオチドが発現していない場合の対照植物と比較したとき、得られた植物は、Leptinotarsa種の侵入への改善された耐性を有する。関連する態様では、本発明は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のフラグメントと約95%~約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物に発現させることによって提供される、改善されたLeptinotarsa種に対する耐性を有する植物に関し、これによって、得られた植物は、ポリヌクレオチドが発現していない対照植物と比較して、Leptinotarsa種の侵入への改善された耐性を有する。一実施形態は、対照植物と比較したとき、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有するナス科植物であり、植物中に発現させることによって、配列番号:831~1085及び1095からなる群から選択される配列を有するRNAが提供される。更に別の態様では、本発明は、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された種子または伝播可能部分(特に、トランスジェニック後代種子若しくは伝播可能部分)に関する。また、本方法によって提供されたように、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物によって産生された商品生産物及びこうした植物のトランスジェニック後代種子または伝播可能部分から産生される植物商品生産物が想到される。

植物のLeptinotarsa種の侵入の防除方法

【0156】

複数の実施形態は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子のDNAの同等の長さであるフラグメントに本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチド(原文に対応してない)の少なくとも1つを含むポリヌクレオチドとLeptinotarsa種を接触させることを含む、Leptinotarsa種の植物への侵入を防除するための方法に関する。本文脈中、「防除する」ことは、これらに限定されないが、例えば、成長阻害、死滅率の上昇、生殖能力の低下、摂食行動または動作の

減少または停止、変態段階の発現の減少または停止など、*Leptinotarsa*種（成虫または幼虫）における生理学的変化または行動的变化を招くことが挙げられる。一実施形態において、植物の*Leptinotarsa*種の侵入を防除する方法は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子または標的遺伝子から転写されたRNAから選択される標的遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに同一であるか、または相補的である少なくとも1つのセグメントを含むポリヌクレオチドと*Leptinotarsa*種とを接触させることを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二重鎖RNAである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖RNA）は、化学合成されるか、または微生物中での発現または植物細胞中での発現によって産生される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群から選択される配列を揺する一本の鎖を含む二本鎖RNAである。一実施形態において、*Leptinotarsa*種の植物への侵入を防除するための方法は、*Leptinotarsa*種を有効量の二本鎖RNAと接触させることを含み、そのうちの1本の鎖は、リボソームタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であり、RNA干渉が誘導され、死滅が発生する。標的遺伝子の実施形態は、表1、2及び4の名前によって同定され、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する遺伝子、並びに関連昆虫種由来のオルソログなどの関連遺伝子（例えば、他の*Leptinotarsa*種、*Tribolium*種、または他の関連甲虫属由来の関連遺伝子）を含む。こうした関連遺伝子の例としては、表1に列挙されている*Tribolium castaneum*遺伝子が挙げられる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子のフラグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはその相補性の群から選択される配列を有するRNAを含み、または配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本の鎖を有するdsRNAを含む。いくつかの実施形態において、本発明は、*Leptinotarsa*種と二本鎖RNAを含む有効量の溶液とを接触させることを含み、植物の*Leptinotarsa*種の侵入を防除する方法を提供し、二本鎖RNAの少なくとも一本の鎖は、リボソームタンパク質または遺伝子から転写されるRNAをコードする遺伝子の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であり、*Leptinotarsa*種は、*Leptinotarsa decemlineata*であり、RNA干渉が誘導され、*Leptinotarsa decemlineata*の死滅が発生し、リボソームタンパク質は、リボソームL7タンパク質または配列番号：730によってコードされるタンパク質であるか、または二本鎖RNAは、配列番号：989、988、1104または1105からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、溶液は、オルガノシリコーン界面活性剤または陽イオン性脂質からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む。

【0157】

いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の配列を有する。いくつかの実施形態において、近接ヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントに対して确实（100%）に同一または相補的である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%同一性または相補性の全配列を有する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性または相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含み：いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の対応フラグメントと100%同一性を有する21の近接ヌクレオチドのセグメントに加えて、「中立」配列（標的遺伝子と配列同一性または相補性を持たない）を含み、この

ため、ポリヌクレオチドは、全体として、標的遺伝子との全配列の同一性がかなり低い。

【0158】

本方法で有用なポリヌクレオチドは、一般に、1つ以上の遺伝子（「標的遺伝子」）に抑制されるように設計される。用語「遺伝子」とは、転写物の発現のために提供されるか、または転写物をコードする核酸の任意の部分を目指す。「遺伝子」は、これに限定されないが、プロモーター領域、5'非翻訳領域、イントロン化領域を含み得る転写物コード領域、3'非翻訳領域またはこれらの領域を組み合わせたものを含み得る。いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、コード配列または非コード配列若しくはその両方を含み得る。他の実施形態において、標的遺伝子は、メッセンジャーRNAと同一であるか、または相補している配列を有する。例えば、いくつ実施形態において、標的遺伝子はcDNAである。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。さまざまな実施形態において、ポリヌクレオチドは、各遺伝子は、標的遺伝子配列群において同定された遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計され、また、この群から複数の標的遺伝子を抑制するように、または1つ以上のこれらの標的遺伝子の異なる領域を標的にするように設計してもよい。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAまたは標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの複数のセグメントを含む。こうした場合、各セグメントは、同一または異なるサイズまたは配列であってもよく、また、標的遺伝子に対してセンスまたはアンチセンスであってもよい。例えば、一実施形態において、ポリヌクレオチドは、縦列型配列または反復配列内の複数のセグメントを含み、各部分は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子と同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一であるか、または相補的である配列を有する18以上の近接ヌクレオチドを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であってもよい。例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る。

【0159】

本方法において有用なポリヌクレオチドの全長は、18の近接ヌクレオチドよりも長くてもよく、また、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性または相補性の配列を有する近接ヌクレオチドに加えてヌクレオチドを含んでもよい。換言すれば、ポリヌクレオチドの合計長さは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される1つ以上の標的遺伝子を抑制するために設計されたポリヌクレオチドの部位またはセグメントの長さより長くてもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制するか、または活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むか、または5'末端部または3'末端部若しくは5'末端部と3'末端部との両方に追加のヌクレオチドを有し得る18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントの「活性」セグメントの側面に接したヌクレオチドを有してもよい。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群（例えば、二次構造の安定をもたらすか、またはクローニングまたは産生の便宜上のヌクレオチド）から選択される標的遺伝子に特異的に関連していない（相補的でないまたは同一でない配列を有する）追加のヌクレオチドを挙げることができる。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと約95%～約100%同一性または相補性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの1つ以上のセグメントに直接隣接して配置されている追加のヌクレオチドを挙げることができる。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、追加の5'G若しくは追加の3'Cまたはその両方と共に、そのセグメントに近接している1つのこうしたセグメントを含む。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、オーバーハングを形成するための追加の

ヌクレオチドを含む二本鎖RNAである（例えば、3' オーバーハングを形成するための2デオキシリボヌクレオチドを含むdsRNA）。このため、様々な実施形態において、ポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列群において同定される遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子中において、近接ヌクレオチドの配列に100%同一または相補的ではない。例えば、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性の配列を有する21の近接ヌクレオチドのそれぞれが少なくとも2つのセグメントを含み、（1）少なくとも2つのセグメントは、1つ以上のスパーサーヌクレオチドによって分離されるか、または（2）少なくとも2つのセグメントは、対応するフラグメントが標的遺伝子配列群またはそのDNA相補体から選択される配列を有するDNA中に発生するのとは異なる順番で配置される。

10

【0160】

本方法において有用なポリヌクレオチドは、当業者に既知の好適な手段によって提供される。実施形態としては、ポリヌクレオチドが化学合成される（例えば、T7ポリメラーゼまたは他のポリメラーゼを用いる転写など、インビトロ転写によって）、微生物または細胞培養（培養液中で成長する植物細胞または昆虫細胞など）中での発現によって産生される、植物細胞中での発現によって産生される、または微生物発酵によって産生される実施形態が挙げられる。

【0161】

いくつかの実施形態において、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、単離DNAフラグメントまたは単離RNAフラグメントとして提供される。いくつかの実施形態において、本方法にて有用なポリヌクレオチドは、発現構造体の一部ではなく、プロモーター配列またはターミネーター配列など追加の成分を欠いている。こうしたポリヌクレオチドは、約18～約300、または約50～約500ヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドに関して）または約18～約300または約50～約500塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドに関して）の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドなど、比較的短くてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、表3、表5、表8、表9、及び表10に開示されている任意のdsRNAトリガーの長さのdsRNAなど、約100～約500塩基対のdsRNAである。実施形態は、ポリヌクレオチドは、配列番号：831～1085、1095～1104、及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を有するセグメントを含むdsRNAであるか、またはポリヌクレオチドは、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンである実施形態が挙げられる。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、組換え型発現構造体の一部として更なる錯体構造体で提供され得るか、または例えば、組換え型植物ウィルスベクター若しくは組換え型バキュロウィルスベクターなど、組換え型ベクターに含まれ得る。いくつかの実施形態において、こうした組換え型発現構造体またはベクターは、対象の遺伝子（殺虫タンパク質など）を発現させる発現カセットなど追加の成分を含むように設計される。

20

30

【0162】

本方法のさまざまな実施形態において、接触することには、Leptinotarsa種の表面に本方法において有用なポリヌクレオチドを含む好適な組成物を提供することを含み、こうした組成物は、例えば、固体、液体（溶液などの均一混合物、懸濁液、コロイド、ミセル及び乳化剤などの不均一混合物など）、粉体、懸濁液、乳化剤、噴霧剤、封入製剤またはマイクロカプセル封入製剤、マイクロビーズ中またはマイクロビーズ上、他のキャリア微粒子中または他のキャリア微粒子上、フィルムまたはコーティング材中、または基質内、または種子処理剤として提供することができる。接触することは、種子処理剤の形態または「種芋」塊茎または塊茎片の処理剤の形態（例えば、種芋の浸漬、コーティングまたは散布）であってもよい。好適な結合剤、不活性キャリア、界面活性剤などは、殺虫剤及び種子処理剤の配合物中において、当業者に既知のとおり、任意により組成物に含むことができる。いくつかの実施形態において、接触することは、組成物において、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に開示されているものなど）、オルガノシリコン、オルガノ

40

50

シリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含むポリヌクレオチドを提供することを含む。実施形態において、接触することは、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis* (バチルスチューリンゲンシス) 殺虫タンパク質、*Xenorhabdus* 殺虫タンパク質、*Photorhabdus* 殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous* 殺虫タンパク質、及び *Bacillus sphaericus* 殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤を更に含む組成物においてポリヌクレオチドを提供することを含む。一実施形態において、接触することは、摂取させるか、または別の方法で *Leptinotarsa* 種によって内部的に吸収させることができる組成物中にポリヌクレオチドを提供することを含む。

10

【0163】

ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本方法において有用な特定のポリヌクレオチドと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせ（例えば、実施例に記載のポリヌクレオチドトリガー）により、*Leptinotarsa* 種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。一実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチド及びパタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis* 殺虫タンパク質、*Xenorhabdus* 殺虫タンパク質、*Photorhabdus* 殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous* 殺虫タンパク質、及び *Bacillus sphaericus* 殺虫タンパク質からなる群から選択される1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、相乗的に向上された *Leptinotarsa* 種の侵入の阻害または防除に効果があることがわかっている。

20

標的遺伝子の選択方法

【0164】

本発明の別の態様では、RNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子の非ランダム的選択方法を提供する。ある実施形態において、本方法により、特定のゲノムにおいて単一のまたは低コピー数（非反復性及び非重複性）中で存在する、標的遺伝子のサブセットを提供する。こうした標的遺伝子は、植物ゲノム遺伝子由来の遺伝子または動物ゲノム由来の遺伝子であってもよい。いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、例えば、植物の無脊椎有害生物などの無脊椎有害生物または脊椎動物の無脊椎有害生物の遺伝子である。いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、無脊椎有害生物（例えば、植物の害虫または植物の線虫）の遺伝子である。いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、*Leptinotarsa* 種の遺伝子である。更なる態様としては、本明細書に記載の任意の方法によって選択されたRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子に基づく、ポリヌクレオチド（例えば、実施例に記載のssRNA若しくはdsRNAトリガーなどのdsRNAトリガー、またはトランスジェニック植物の産生に有用な組換え型DNA構造体）を産生することが挙げられる。

30

【0165】

一実施形態において、本方法は、選択されたゲノムにおいて単一または低コピー数遺伝子を同定するステップを含む。あるいは、関連有機体由来のオルソログデータベースにおいて単一または低コピー数遺伝子を同定するステップを含み、選択された有機体において遺伝子が単一／低コピー数遺伝子であることを予測する。低コピー遺伝子及び特に単一コピー遺伝子は、RNAi-媒介サイレンシングの標的として選択される。一実施形態において、配列の比較によって単一または低コピー数遺伝子の同定は、第1種由来の遺伝子セットと第2種由来の遺伝子セットとの間で行われ、第2種由来の遺伝子セットは、第2種における単一または低コピー数遺伝子として同定された。一実施形態において、単一または低コピー数遺伝子の同定は、コンピュータによって実施されるアルゴリズムを第1の種由来の遺伝子セットに適用して、第1の種由来の遺伝子のセットにおいて単一または低コピー数遺伝子のサブセットを同定し、次に、第2の種由来の遺伝子セットと第1の種由来の単一または低コピー数遺伝子のサブセットとを比較して、第2の種由来の対応する単一または低コピー数遺伝子を同定することによって、行われる。第2の種由来の単一または低コピー数遺伝子は、RNAi-媒介サイレンシングの標的遺伝子として有用であり、これらの標的

40

50

遺伝子の配列は、ポリヌクレオチド（例えば、ssRNAまたは実施例に記載されているdsRNAトリガーなどのdsRNAトリガー、またはトランスジェニック植物を産生するための組換え型DNA構造体）の設計及び第2の種による侵入の阻止または防除のためのこれらの使用方法に使用される。

【0166】

本方法の実施形態としては、選択された有機体の集団における低／単一コピー遺伝子のヌクレオチド多様性を見積もるステップ、及び最も低いヌクレオチド多様性を更に有するこれらの低／単一コピー遺伝子を選択するステップを更に含む。低いヌクレオチド多様性を更に有する低／単一コピー遺伝子は、RNAi-媒介サイレンシングの標的として選択される。

10

【0167】

本方法の実施形態としては、機能抑制または進化抑制の推定値として、同義 (K_s) ヌクレオチド変化対非同義 (K_a) ヌクレオチド変化の比率を比較するステップが更に挙げられる。一実施形態において、方法は、 K_s は、 K_a 以上である遺伝子を選択するステップを含む。一実施形態において、本方法は、 $K_s \gg K_a$ である遺伝子を選択するステップを含む。

【0168】

本発明の関連する態様は、本明細書に記載の遺伝子選択方法のいずれかによって、ゲノムから同定されたRNAi-媒介サイレンシングの標的遺伝子セットである。実施形態は、単一または低コピー数の標的遺伝子をそのゲノム由来の更に大きい遺伝子セットから同定することによって、ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシングの標的遺伝子セットに関する。一実施形態は、単一または低コピー数の標的遺伝子は無脊椎ゲノム由来の更に大きい遺伝子セットから同定することによって、無脊椎ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットに関する。特定の実施形態は、単一または低コピー数の標的遺伝子をそのLeptinotarsaゲノム由来の大きい遺伝子セットから同定することによって、Leptinotarsaゲノムから選択されるLeptinotarsa種におけるRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットに関する。特定の実施形態は、単一または低コピー数の標的遺伝子をそのLeptinotarsaゲノム由来の大きい遺伝子セットから同定することによって、Leptinotarsaゲノムから選択されるLeptinotarsa種におけるRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットに関し、配列セットは、配列番：1～725またはそれらのDNA補体からなる群である。

20

30

【0169】

本発明の関連態様は、配列番号：1～725または、それらのDNA補体からなる標的遺伝子セットを利用する方法及び組成物である。これらは、(i) 配列番号：1～725または、それらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAと同等の長さのセグメントと約95%同一性～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むポリヌクレオチドと、Leptinotarsa種とを接触させることを含む植物のLeptinotarsa種の侵入を防除する方法、(ii) 配列番号：1～725またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのセグメントと約95%～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを有するポリヌクレオチドを含む薬剤をLeptinotarsa種の食餌に提供することを含む植物のLeptinotarsa種の侵入を防除する方法であって、薬剤は、Leptinotarsa種内で生物学的機能を阻止し、それによってLeptinotarsa種による侵入を防除するために、Leptinotarsa種による摂取時に機能する方法、(iii) Leptinotarsa種の幼虫の標的遺伝子に本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含む少なくとも1つの組換え型RNAをLeptinotarsa種の幼虫の食餌に提供することを含む、Leptinotarsa種の幼虫の死滅または阻害を引き起こす方法であって、標的遺伝子配列は、配列番号：1～725から選択される方法、(iv) 配列番号：1～725またはそれらのDNA補体からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのセグメントとの約95%～約100%同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物を植物に局所投与することを含む、改

40

50

善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法、(v) 配列番号：1～725からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのセグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つの組換え型ポリヌクレオチドを含み、Leptinotarsa種を排除する組成物、(vi) 配列番号：1～725からなる群から選択される配列を有するDNAの同等の長さのセグメントと本質的に同一であるか、または相補的である18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを植物中に発現させることを含む、改善されたLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供する方法、(vii) 配列番号：1～725またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのセグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結する異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体、及び(viii) そのゲノム中にRNAと接触するかまたはRNAを摂餌するLeptinotarsa種において標的遺伝子の発現を抑制するRNAをコードする組換え型DNAを有するトランスジェニックナス科植物細胞であって、RNAは、標的遺伝子と相補的である少なくとも1つのサイレンシング要素を含み、標的遺伝子配列は、配列番号：1～725、またはそれらの補体からなる群から選択される配列である細胞を含む。

10

【0170】

別の実施形態は、そのゲノムを有する種の個体の集団において、所与の遺伝子セットに関して、ヌクレオチド多様性を推定することによって、及び最も低いヌクレオチド多様性を有するこれらの遺伝子を選択することによって、ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシング用の標的遺伝子セットに関する。一実施形態は、そのゲノムを有する無脊椎動物の個体の集団において、所与の遺伝子セットのヌクレオチド多様性を推定することによって、及び最も低いヌクレオチド多様性を有するこれらの遺伝子を選択することによって、無脊椎ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシング用の標的遺伝子セットに関する。別の実施形態は、そのゲノムを有する無脊椎動物の個体の集団において、低/単一コピー遺伝子のヌクレオチド多様性を推定することによって、及び最も低いヌクレオチド多様性を更に有するこれらの低/単一コピー遺伝子を選択することによって、無脊椎ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシング用の標的遺伝子セットに関する。

20

【0171】

別の実施形態は、そのゲノムの遺伝子及び K_s が少なくとも K_a 以上である場合の選択している遺伝子における同義(K_s)ヌクレオチドの変化対非同義(K_a)ヌクレオチドの変化の比率を比較することによって、ゲノムから選択されるRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットに関する。一実施形態において、RNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットは、 K_s が少なくとも K_a 以上である遺伝子である。一実施形態において、RNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットは、 $K_s > K_a$ である遺伝子である。実施形態は、無脊椎ゲノムから選択され、選択された遺伝子では、 $K_s > K_a$ であるRNAi-媒介サイレンシングのための標的遺伝子セットに関する。

30

【0172】

一実施形態において、単一または低コピー数の標的遺伝子は、第1の無脊椎種由来の更に大きいゲノムセットから選択される第1の無脊椎種の標的遺伝子セットであり、選択は、第1の無脊椎種由来の更に大きい遺伝子セットと第2の無脊椎種において、単一または低コピー数として同定された第2の無脊椎種由来の遺伝子セットとの間で、コンピュータによって行われる配列の比較によるものである。特定の実施形態において、単一または低コピー数の標的遺伝子は、Leptinotarsa decemlineata標的遺伝子の更に大きいセットから選択されるLeptinotarsa decemlineata標的遺伝子のサブセットであり、選択は、Leptinotarsa decemlineata標的遺伝子の更に大きい遺伝子セットと第2の無脊椎種において、単一または低コピー数として同定された第2の無脊椎種由来の遺伝子セットとの間で、コンピュータによって行われる配列の比較によるものである。本方法によって選択されたLeptinotarsa decemlineata単一または低コピー数の標的遺伝子は、例えば、上昇したLeptinotarsa種の侵入への耐性を有する植物を提供するにあたって有用である組換え型DNA構

40

50

造体、及び例えば、Leptinotarsa種の侵入を阻止または防除を提供するために、植物またはLeptinotarsa種の局所処理用の組成物の作製に有用である単離組換え型RNA分子など、本発明のポリヌクレオチドの産生に特に有用である。一実施形態において、本方法によって選択されたLeptinotarsa decemlineata単一または低コピー数の標的遺伝子は、配列番号：1～725からなる群から選択された配列を有する遺伝子である。

【0173】

本発明の更なる態様は、標的遺伝子配列群からなる群から選択された配列または配列のフラグメントによってコードされたタンパク質に結合されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、及びトリガー配列またはそれらの補体から選択される配列または配列のフラグメントによってコードされるタンパク質に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。このような抗体は、例えば、「Antibody Methods and Protocols」(Proetzel and Ebersbach, 編集, 2012, Humana Press, New York) または「Making and Using Antibodies」(Howard and Kaser, 編集, 2006, CRC Press, Boca Raton) に記載されているとおり常用プロトコルを用いるなど、当業者に公知の常用方法によって産生される。

「タイリング」による有効ポリヌクレオチドの選択

【0174】

標的遺伝子の全長を必要としない、本明細書に記載される実施形態及び多くの実施形態において有用なポリヌクレオチドは、標的遺伝子よりもかなり短い。有効なポリヌクレオチドを選択するにあたって有用な技術の例は、標的遺伝子に隣接するか、または標的遺伝子に一部重なりあっているセグメントに対応させるポリヌクレオチドの「タイリング」または評価である。

【0175】

いくつかの実施形態において、有効なポリヌクレオチドトリガーは、標的遺伝子の長さに沿って、例えば、約25ヌクレオチドなどの一部重なっている領域を有する、例えば、長さ200～300ヌクレオチドのフラグメントなど選択された長さのフラグメントにおいて、「タイリング」遺伝子の標的によって同定され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドトリガー配列は、標的遺伝子に特有の領域に対応する（ヌクレオチド同一性または相補性を有する）ように設計される。いくつかの実施形態において、標的遺伝子の選択領域は、コード配列または非コード配列（例えば、プロモーター領域、3' 非翻訳領域、イントロンなど）またはその両方を組み合わせたものを含み得る。

【0176】

複数の標的遺伝子の抑制に有効な標的が設計の対象である場合、複数の標的遺伝子配列を並べ、ポリヌクレオチドトリガーは、複数の標的において共通である高配列相同性を有する領域に対応するように設計される。逆に、複数の標的配列のうちの1つを選択的に抑制するのに有効である標的を設計することを対象とする場合、複数の標的遺伝子配列を並べ、ポリヌクレオチドトリガーは、複数の標的において共通である配列相同性がないか、または配列相同性が低い領域に対応するように設計されている。

有効なポリヌクレオチドの選択における熱力学的考察

【0177】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドトリガーは、設計され得るか、またはこれらの配列は、熱力学的考察を用いて最適化される。例えば、ポリヌクレオチドトリガーは、1つの核酸鎖（例えば、ポリヌクレオチドトリガーまたは個々のsiRNA）と別の核酸鎖（例えば、標的遺伝子転写物）との間での熱力学的制御ハイブリッド形成に基づいて選択され得る。

【0178】

標的遺伝子のRNAi-媒介サイレンシングに有効である可能性の高いヌクレオチド配列を予測する方法及びアルゴリズムは、当技術分野において既知である。こうした方法及びアルゴリズムの非限定例としては、「i-score」Ichiara et al (2007) Nucleic Acids Res. , 35 (18) :123e; 「Oligowalk」(rna. urmc. rochester. edu/servers/olig

10

20

30

40

50

owalkにて公的に入手可能であり、かつLu et al. (2008) Nucleic Acids Res. , 36 : W104-108に記載) ; 及び「Reynolds score」(Khovorova et al. (2004) Nature Biotechnol. , 22 : 326-330に記載) が挙げられる。

許容されるミスマッチ

【0179】

「本質的に同一である」または「本質的に相補的である」は、ポリヌクレオチド（または二本鎖ポリヌクレオチドの少なくとも1つの一本鎖）は、標的遺伝子の発現を抑制するため（例えば、標的遺伝子転写物及び／またはコードタンパク質のレベルまたは活性の低下に影響を与えるために）に、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNA（例えば、転写物）に対して十分な同一性または相補性を有することを意味する。標的遺伝子の発現を抑制するため（例えば、標的遺伝子転写物及び／若しくはコードタンパク質のレベル若しくは活性の低下に影響を与えるためにまたはLeptinotarsa種を防除するために）に、本明細書に記載されるようなポリヌクレオチドは、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAに対して100%同一性または相補性を有する必要のない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドまたはそれらの一部分は、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAのいずれかにおいて少なくとも18または19の近接ヌクレオチドの配列に対して、本質的に同一であるか、または本質的に相補的であるように設計される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドまたはそれらの一部分は、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAのいずれかにおいて21の近接ヌクレオチドの1つ以上の配列に100%同一性または100%相補性であるように設計される。特定の実施形態において、「本質的に同一である」ポリヌクレオチドは、内因性標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAのいずれかにおいて18以上の近接ヌクレオチドの配列と比較したとき、100%配列同一性または少なくとも約83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、「本質的に相補的である」ポリヌクレオチドは、標的遺伝子または標的遺伝子から転写されるRNAのいずれかにおいて18以上の近接ヌクレオチドの配列と比較したとき、100%配列相補性または少なくとも約83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列相補性を有する。

【0180】

標的遺伝子または転写物とのミスマッチを含有するポリヌクレオチドは、本明細書に記載の組成物及び方法の特定の実施形態において使用され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子または標的遺伝子の転写物において同等の長さのセグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的である少なくとも18、または少なくとも19、または少なくとも21の近接ヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、標的遺伝子または標的遺伝子の転写物において同等の長さのセグメントに本質的に同一であるか、または本質的に相補的である21以上の近接ヌクレオチドのポリヌクレオチドは、標的遺伝子または転写物に対して1-2のミスマッチ（すなわち、標的遺伝子または転写物におけるポリヌクレオチドの21の近接ヌクレオチドと同等の長さのセグメントとの間における1または2のミスマッチ）を有してもよい。特定の実施形態において、標的遺伝子または標的遺伝子の転写物において同等の長さのセグメントに対して同一性または相補性の近接している21のヌクレオチドスパンを包含する約50、100、150、200、250、300、350以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドは、標的遺伝子または転写物に対する1または2以上のミスマッチを有し得る。

【0181】

内因性標的遺伝子または標的遺伝子から転写されたRNAに対してミスマッチを有する設計ポリヌクレオチドにおいて、より耐性が高いと考えられる特定の種類のかつ特定の位置でのミスマッチを使用してもよい。特定の実施形態において、アデニン残基とシトシン残基との間またはグアノシン残基とウラシル残基との間に形成されたミスマッチは、Du et al. (2005) Nucleic Acids Res. , 33 : 1671-1677に記載されているように、使用

される。いくつかの実施形態において、19塩基対重複領域におけるミスマッチは、Du et al. (2005), Nucleic Acids Res.、33:1671-1677に記載されているように、耐性の低い位置5、7、8または11位置（19-ヌクレオチド標的の5'末端部由来）、耐性が中程度である位置3、4及び12-17位置（19-ヌクレオチド標的の5'末端部由来）及び相補的領域のいずれかの末端部での耐性の高い位置、すなわち、位置1、2、18及び19（19-ヌクレオチド標的の5'末端部由来）に配置される。許容されるミスマッチは、例えば、*Leptinotarsa*種の幼虫でのインビトロ食餌アッセイなど、常用アッセイにおいて実験的に測定され得る。

中立配列でのサイレンシング要素の組込み

【0182】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子に対応する配列を含む及び標的遺伝子の観察された抑制を担うサイレンシング要素は、「中立配列」、すなわち、標的遺伝子に対する配列同一性または相補性を有さない追加の挿入ヌクレオチドに組み込まれる。中立配列は、例えば、ポリヌクレオチドの全長を増大するように設計され得る。例えば、安定性、対製造費用効果または生物活性の理由によりポリヌクレオチドが特定のサイズであるように所望され得る。いくつかの実施形態において、ヘアピントリガー内でループを形成するにあたって、またはトリガー領域間のスペーサーとして、中立配列も有用である。

【0183】

人工食餌バイオアッセイでは、別の甲虫種、*Diabrotica virgifera*において、約60塩基対 (bp) 以上のdsRNAsが生物活性に必要であることが報告されている (Bolognesi et al. (2012) PLoS ONE 7 (10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534 を参照されたい)。このため、一実施形態において、追加の39塩基対の中立配列において、表1の標的遺伝子に対応し、*Leptinotarsa*の侵入の防除をもたらすことがわかっている21塩基対のdsRNAサイレンシング要素が組み込まれ、このため、約60塩基対のポリヌクレオチドが形成される。いくつかの実施形態において、dsRNAトリガーは、約60-約500の塩基対、または100-約450の塩基対の中立配列を含み、配列番号: 1-725及び配列番号: 726-830及び配列番号: 1087-1094からなる群から選択される配列を有する標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性または100%相補性の配列を有する21の近接ヌクレオチドの少なくとも1つに組み込まれる。別の実施形態において、中立配列の更に大きい部位（例えば、ポリヌクレオチドの合計長さが約60-約300塩基対であるなど）に組み込まれるとき、標的遺伝子の同等の長さのフラグメントと100%同一性または100%相補性の配列を有する単一の21塩基対サイレンシング要素が有効であることがわかっている。別の実施形態において、配列番号: 831-1085、1095-1104及び1110-1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列の少なくとも21の近接ヌクレオチドの1つのセグメントは、有効なポリヌクレオチドを提供するにあたって、中立配列のより大きい部位に組み込まれる。別の実施形態において、配列番号: 831-1085、1095-1104及び1110-1126またはそれらの補体からなる群から選択される複数の配列のセグメント（または1つ以上の配列のセグメントの複数のコピー）は、有効なポリヌクレオチドを提供するにあたって、中立配列のより大きい部位に組み込まれる。ポリヌクレオチドが中立配列領域を含む実施形態において、標的遺伝子と比較して、ポリヌクレオチドは全配列の比較的低い同一性を有し、例えば、中立配列の追加の189塩基対に組み込まれる単一の21塩基対トリガー（標的遺伝子の21-ヌクレオチドフラグメントとの100%同一性または相補性）を含む、210の塩基対の全長を有するdsRNAは、約10%の標的遺伝子と全体の配列同一性を有する。

殺虫性二本鎖RNA分子

【0184】

本発明の別の態様は、*Leptinotarsa*種によって摂餌または接触されると、*Leptinotarsa*種において死滅または成長の障害を引き起こす殺虫性二本鎖RNA分子を提供し、殺虫性二本鎖RNA分子は、標的遺伝子配列群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNA (cDNA) の同等の長さのセグメントと本質的に同一であるかまたは本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態におい

10

20

30

40

50

て、殺虫性二本鎖RNA分子は、約50～約500塩基対の長さである。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNA分子は、長さ少なくとも30の近接ヌクレオチドの少なくとも1つのセグメントを含む。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNA分子は、標的遺伝子配列群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNA（cDNA）の同等の長さのセグメントと本質的に同一であるかまたは本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドの複数のセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であるか（例えば、セグメントは、標的遺伝子の異なるエクソン領域に対応してもよく、標的遺伝子に対応しない「スパーサー」ヌクレオチドは、セグメント間またはセグメントに近接して、任意により使用され得る）、または異なる標的遺伝子由来である。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNA分子は、標的遺伝子配列群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNA（cDNA）の同等の長さのセグメントと本質的に同一であるかまたは本質的に相補的である18以上の近接ヌクレオチドの複数のセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であり、標的遺伝子においてセグメントが自然発生する順番とは異なる順番で殺虫性二本鎖RNA分子内に配置される。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNA分子は、21の近接ヌクレオチドがそれぞれ、標的遺伝子配列群から選択される配列を有する標的遺伝子またはDNA（cDNA）の同等の長さのセグメントと100%同一であるかまたは100%相補的である配列を有する複数のセグメントを含み、セグメントは、標的遺伝子の異なる領域由来であり、標的遺伝子においてセグメントが自然発生する順番とは異なる順番で殺虫性二本鎖RNA分子内に配置される。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNA分子は、配列番号：831～1085、1095～1104及び1110～1126またはそれらの補体からなる群から選択される配列を含む一本の鎖を含むか、または、配列番号：1105～1109からなる群から選択される配列によってコードされるRNAヘアピンを含む。いくつかの実施形態において、殺虫性二本鎖RNAは、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する一本の鎖を有するdsRNAを含む。殺虫性二本鎖RNA分子は、植物、特にナス科植物（トマト、ナスまたはジャガイモなど）に局所投与して、*Leptinotarsa*種による侵入を防除または阻止してもよい。殺虫性二本鎖RNA分子は、*Leptinotarsa*種により摂食または接触させるための好適な形態、例えば、噴霧、粉体または餌の形態で提供されてもよい。殺虫性二本鎖RNA分子を提供するための他の方法及び好適な組成物は、本発明の他の態様に関する前項に記載されているものと類似している。

【0185】

複数の実施形態は、1つ以上の殺虫性ポリヌクレオチド及び水またはその他の溶媒（任意により陽イオン脂質、オルガノシリコン界面活性剤またはその両方）を含むタンク混合物に関する。実施形態としては、ポリヌクレオチドのタンク混合配合物及び任意により、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporus*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質から選択される少なくとも1つの殺虫剤が挙げられる。こうした組成物の実施形態としては、細菌、真菌、イースト菌などが生存しているか、若しくは死滅している微生物内で1つ以上の殺虫性ポリヌクレオチドが提供されるか、または微生物発酵物として提供されるか、または生存しているか、若しくは死滅している植物細胞中に提供されるか、または合成組換え型ポリヌクレオチドとして提供されるものが挙げられる。一実施形態において、組成物は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む微生物の非病原株を含み、微生物の摂食または摂取により、*Leptinotarsa*種の阻害または死滅となり、好適な微生物の非限定的実施例としては、*E. coli*、*B. thuringiensis*、*Pseudomonas*種、*Photorhabdus*種、*Xenorhabdus*種、*Serratia entomophila*及び関連*Serratia*種、*B. sphaericus*、*B. cereus*、*B. laterosporus*、*B. popilliae*、*Clostridium bifermentans*または他の孢子形成陽性細菌を挙げることができる。一実施形態において、組成物は、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドを含む植物ウィルスベクターを含み、植物ウィルスベクターによって処理された植物での*Leptinotarsa*種による給餌により、*Leptinotarsa*種の阻害または死滅となる。一実施形態において、組成物としては、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドなどバキュロ

ウィルスベクターが挙げられ、ベクターの摂食または摂取により、Leptinotarsa種の阻害または死滅となる。一実施形態において、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、ポリマーなど合成マトリックス内に封入されるか、または粒子に接着させ、植物の表面に局所投与し、局所処理された植物でのLeptinotarsa種による給餌は、Leptinotarsa種の阻害または死滅となる。一実施形態において、ポリヌクレオチドが本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドを発現させる植物細胞の形態（例えば、本発明のトランスジェニックナス科植物細胞）で提供され、Leptinotarsa種による植物細胞または本植物細胞の含有物の摂取により、Leptinotarsa種の阻害または死滅となる。

【0186】

いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、dsRNAsなどのポリヌクレオチドをUV損傷から保護するために、効率的な葉面被覆に必要とされる適切な固着剤及び湿潤剤並びにUV保護剤と共に提供される。このような添加剤は、一般に、バイオ殺虫剤業界において使用され、当業者において既知である。土壌処理用組成物としては、Leptinotarsa種の幼虫の餌の役割をする粒状配合物を挙げる事ができる。いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されているとおり、キャリア剤、界面活性剤、陽イオン性脂質（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0296556号の実施例18に開示されているものなど）、オルガノシリコン、オルガノシリコン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド除草剤分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤及び昆虫成長調整剤と共に更に提供される。いくつかの実施形態において、組成物としては、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、Bacillus thuringiensis殺虫タンパク質、Xenorhabdus殺虫タンパク質、Photorhabdus殺虫タンパク質、Bacillus laterosporous殺虫タンパク質、及びBacillus sphaericus殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤が更に挙げられる。

【0187】

このような組成物は、例えば、Leptinotarsa種の直接的な噴霧若しくは散布によって、またはLeptinotarsa種による侵入の阻止若しくは防除が所望される植物若しくは環境への噴霧または散布によって、またはコーティング剤を植物表面に投与することによって、または種子の植付けに備えて、種子（または種芋）にコーティング剤を投与することによって、Leptinotarsa種による侵入の阻止若しくは防除が所望される植物の塊根周囲に土壤灌水を適用することによって、など任意の簡便な方法で投与される。

【0188】

本明細書に記載されるようなポリヌクレオチド有効量は、Leptinotarsa種の防除を提供するか、またはLeptinotarsa種による侵入を阻害するのに十分な量であり、ポリヌクレオチドの有効量の決定は、実施例5及び実施例6に記載されているような常用分析法によって行われる。本明細書に提供されている方法及び組成物において有用であり得る殺虫性ポリヌクレオチド濃度及び用量に上限がない場合、概して、効率的及び経済的に有効濃度が低く、投与量が少ないものが求められるであろう。有効量のポリヌクレオチドの非限定的実施形態としては、植物に噴霧される液体形態においてポリヌクレオチド約10ナノグラム／ミリリットル～約100マイクログラム／ミリリットル、または植物の土地に投与されるポリヌクレオチド約10ミリグラム／エーカ～約100グラム／エーカ、またはLeptinotarsa種の給餌用人工食餌中にポリヌクレオチド約0.001～約0.1マイクログラム／ミリリットルの範囲が挙げられる。本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチドが植物に局所投与される場合、濃度は、植物の葉または他の植物部分表面（花びら、茎部、塊茎、果実、葯、花粉、葉、塊根、または種子など）に投与する噴霧または処理の量を考慮して、調節することができる。一実施形態において、本明細書に記載されるように、25-merポリヌクレオチドを用いる葉状植物に対する有用な処理は、1植物当たりポリヌクレオチド約1ナノモル（nmol）、例えば、1植物当たりポリヌクレオチド約0.05～1nmolである。葉状植物の他の実施形態としては、1植物当たりポリヌクレオチド約0.05～約100nmol、または約0.1～約20nmol、または約1nmol～約10nmolである有用な範囲を含む。特定の実施形態にお

いて、ssDNAポリヌクレオチド約40～約50nmolが投与される。特定の実施形態において、dsRNAの約0.5nmol～約2nmolが投与される。特定の実施形態において、dsRNAまたはssDNA (21-mer) の約0.5～約2.0ミリグラム／ミリリットルまたは約0.14ミリグラム／ミリリットルを含む組成物を投与する。特定の実施形態において、約50～約200以上のヌクレオチドである本発明のdsRNAポリヌクレオチド約0.5～約1.5ミリグラム／ミリリットルの組成物が投与される。特定の実施形態において、本発明のdsRNA約1nmol～約5nmolが植物に投与される。特定の実施形態において、植物に局所投与するようなポリヌクレオチド組成物は、約0.01～約10ミリグラム／ミリリットル、または約0.05～約2ミリグラム／ミリリットルまたは約0.1～約2ミリグラム／ミリリットルの濃度の本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。非常に大きい植物、樹木またはつる植物は、対応して、非常に多い量のポリヌクレオチドを必要とし得る。複数のオリゴヌクレオチド（例えば、本発明の単一の組換え型DNA分子によってコードされる複数のトリガー）を加工することのできる本発明の長いdsRNA分子を用いる場合、より低い濃度を使用してもよい。有効なポリヌクレオチド処理法の非限定例としては、一植物当たりポリヌクレオチド分子約0.1～約1nmol、または、一植物当たりポリヌクレオチド分子約1nmol～約10nmol、一植物当たりポリヌクレオチド分子約10nmol～約100nmolの処理剤が挙げられる。

【0189】

いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドが局所投与されるポリヌクレオチドを有機体の細胞に入れることができる薬剤である、「移送剤」と共に提供される。このような移送剤は、本明細書に記載されるように、ポリヌクレオチド含有組成物の一部として組み込むことができるか、または投与することができる。ポリヌクレオチドの投与前に、投与と同時に、または投与後に投与されてもよい。いくつかの実施形態において、移送剤は、Leptinotarsa種による本発明のポリヌクレオチドの取り込みが向上する薬剤である。いくつかの実施形態において、移送剤は、ポリヌクレオチドによる植物細胞へ浸透に対して、植物組織（例えば、種子、葉、茎部、塊根、花または果実など）の表面を調節する薬剤である。いくつかの実施形態において、移送剤により、ポリヌクレオチドが、クチクラワックスバリア、気孔、及び／または細胞壁若しくは膜バリアを通じて植物細胞の中へ移送される経路を可能にする。

【0190】

好適な移送剤には、有機体の外面の浸透性を増加させる、またはポリヌクレオチドに対する有機体の細胞浸透性を増加させる薬剤が含まれる。好適な移送剤としては、化学剤、物理的物質、またはそれらの組み合わせを含む。コンディショニングのための化学剤または移送剤としては、(a) 界面活性剤、(b) 有機溶媒若しくは水溶液若しくは有機溶媒の水溶性混合物、(c) 酸化剤、(d) 酸、(e) 塩基、(f) 油、(g) 酵素またはそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、任意によりポリヌクレオチド及び移送剤を投与することには、インキュベーションステップ、中和ステップ（たとえば酸、塩基、若しくは酸化剤を中和するまたは酵素を不活性化する）、すすぎステップ、またはそれらの組み合わせを含む。好適な移送剤は、乳剤、逆乳剤、リポソーム若しくは他のミセル様組成物の形態であってもよく、若しくはまたは、ポリヌクレオチドが乳剤、逆乳剤、リポソーム若しくは他のミセル様組成物の形態を取るようにすることができる。移送剤の実施形態としては、対イオンまたは核酸分子と結合することが知られている他の分子、例えば、無機アンモニウムイオン類、アルキルアンモニウムイオン類、リチウムイオン類、ポリアミン類（例えば、スぺルミン、スぺルミジン、またはプトレッシンなど）、及び他の陽イオン類が挙げられる。移送剤の実施形態としては、DMSO、DMF、ピリジン、N-ピロリジン、ヘキサメチルホスホルアミド、アセトニトリル、ジオキサン、ポリプロピレングリコールなどの有機溶媒、その他の水混和性溶媒または非水性系でホスホヌクレオチドを溶解するその他の溶媒（合成反応において使用されるなど）が挙げられる。移送剤の実施形態としては、界面活性剤若しくは乳化剤を有する若しくは有していない天然由来油または合成油、例えば、植物源の油、作物油（Herbicide. adjuvants. comで一般公開されている、9th Compendium of Herbicide Adjuvantsに列挙されているものなど）、パ

10

20

30

40

50

ラフィン系オイル類、ポリオール脂肪酸エステル類、またはポリエチレンイミン若しくはN-ピロリジンなどのアミド若しくはポリアミンで修飾された短鎖分子を有する油が挙げられる。

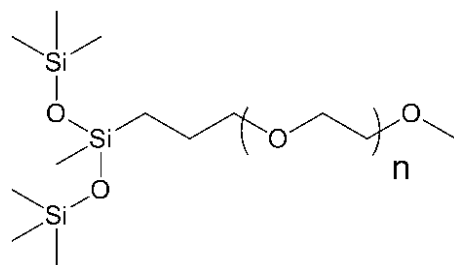
【0191】

移送剤の実施形態としては、オルガノシリコーン調製物が挙げられる。例えば、好適な移送剤としては、CAS番号27306-78-1及びEPA番号：CAL. REG. NO. 5905-50073-AAを有するSILWET L-77（登録商標）界面活性剤、（現在、Momentive Performance Materials, Albany, New Yorkより市販）など、オルガノシリコーン調製物である。一実施形態としては、約0.015～約2重量パーセント（wt%）の範囲（たとえば約0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.5wt%）のSilwet L-77などのオルガノシリコーン調製物など、ポリヌクレオチド及び移送剤を含む組成物が含まれる。一実施形態としては、約0.3～約1重量%（wt%）または約0.5～約1重量%（wt%）の範囲で本発明のポリヌクレオチド及び移送剤（商品名SILWET L-77（登録商標）界面活性剤）を含む組成物が挙げられる。

【0192】

本発明で用いるための移送剤として有用なオルガノシリコーン化合物としては、これらに限定されるものではないが、（a）共有結合により結合されるトリシロキサン頭部基、（b）これに限定されないが、共有結合により結合されるn-プロピルリンカーなどのアルキルリンカー、（c）共有結合により結合されるポリグリコール鎖、（d）末端基を含む組成物が挙げられる。こうしたオルガノシリコーン化合物のトリシロキサン頭部基としては、これらに限定されないが、ヘプタメチルトリシロキサンが挙げられる。アルキルリンカーとしては、n-プロピルリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。ポリグリコール鎖としては、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。ポリグリコール鎖は、約「7.5」である平均鎖長「n」を提供する混合物を含み得る。特定の実施形態において、平均鎖長「n」は、約5～約14で変動し得る。末端基としては、メチル基などのアルキル基を挙げることができるが、これらに限定されない。移送剤として有用なオルガノシリコーン化合物としては、トリシロキサンエトキシ化界面活性剤またはポリアルキレンオキシドにより修飾されたヘプタメチルトリシロキサンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明で用いるための移送剤の例としては、化合物I：

【化1】



（化合物I：ポリアルキレンオキシドヘプタメチルトリシロキサン、平均n=7.5）である。

【0193】

移送剤として有用なオルガノシリコーン化合物は、例えば、新たに産生された濃度として、約0.015～約2重量%（wt%）（例えば、約0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.5wt%）の範囲で使用される。

【0194】

移送剤の実施形態としては、塩化アンモニウム、臭化テトラブチルホスホニウム、及び硫酸アンモニウムなど、ポリヌクレオチド含有組成物中に提供されるか、またはポリヌクレオチド含有組成物と共に使用される1つ以上の塩が挙げられる。いくつかの実施形態において、塩化アンモニウム、臭化テトラブチルホスホニウム、及び／または硫酸アンモニウムは、約0.5%～約5% (w/v)、または約1%～約3% (w/v)、または約2% (w/v)の濃度で使用される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、300ミリモル以上の濃度のアンモニウム塩が挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、濃度約0.015～約2重量% (wt%)のオルガノシリコーン移送剤並びに約80～約1200mMまたは約150mM～約600mMの濃度の硫酸アンモニウムが挙げられる。

10

【0195】

移送剤の実施形態としては、リン酸塩が挙げられる。ポリヌクレオチド含有組成物において有用なリン酸塩としては、これらに限定されるものではないが、カルシウム、マグネシウム、カリウム、またはリン酸ナトリウムが挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、少なくとも約5ミリモル、少なくとも約10ミリモルまたは少なくとも約20ミリモルの濃度のリン酸塩が挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物、約1mM～約25mMの範囲または約5mM～約25mMの範囲のリン酸塩。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物少なくとも約5ミリモル、少なくとも約10ミリモル、または少なくとも約20ミリモルの濃度のリン酸塩。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、約5ミリモル、約10ミリモル、または約20ミリモルの濃度のリン酸ナトリウムが挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、約1mM～約25mMの範囲または約5mM～約25mMの範囲のリン酸塩ナトリウムが挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、約10mM～約160mMの範囲または約20mM～約40mMの範囲のリン酸塩ナトリウムが挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物としては、pH約6.8のリン酸ナトリウム緩衝液が挙げられる。

20

【0196】

移送剤の実施形態としては、界面活性剤及び／またはその中に含まれる有効分子が挙げられる。界面活性剤及び／またはその中に含まれる有効分子としては、これに限定されないが、脂肪酸のナトリウム塩またはリチウム塩（獣脂若しくは獣脂アミンまたはリン脂質など）及びオルガノシリコーン界面活性剤が挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、対イオンまたは核酸ヌクレオチドと結合することが既知である他の分子と共に配合される。非限定例としては、テトラアルキルアンモニウムイオン、トリアルキルアンモニウムイオン、スルホニウムイオン、リチウムイオン、及びスベルミン、スベルミジンまたはプトレシンなどのポリアミンが挙げられる。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、グリフォサートなどの非ポリヌクレオチド除草剤、ジカンバ、クロランベン、TBA、グルホシネートなどのオーキシシン様安息香酸除草剤、フェノキシカルボン酸除草剤、ピリジンカルボン酸除草剤、キノリンカルボン酸除草剤、ピリミジンカルボン酸除草剤及びベナゾリンーエチル除草剤などのオーキシシン様除草剤、スルホニル尿素、イミダゾリノン、プロモキシニル、デラポン、シクロヘザネジオン (cyclohezanedione)、プロトボルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤、及び4-ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ阻害型除草剤と共に調合される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物は、例えば、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質など、非ポリヌクレオチド殺虫薬と共に配合される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド含有組成物及び非ポリヌクレオチド殺虫薬は、ポリヌクレオチド単独または非ポリヌクレオチド殺虫薬単独により得られた効果と比較すると、*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除において相乗的改善を提供する。いくつかの実施形態において、トリガー配列群からなる群から選択される配列を有する鎖を有

30

40

50

する二本鎖RNAを含む組成物は、非ポリヌクレオチド殺虫薬（例えば、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis*殺虫タンパク質、*Xenorhabdus*殺虫タンパク質、*Photorhabdus*殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous*殺虫タンパク質、及び*Bacillus sphaericus*殺虫タンパク質など）と混ぜ合わせ、この組成物は、二本鎖RNA単独または非ポリヌクレオチド殺虫薬単独により得られた効果と比較すると、相乗的に改善された*Leptinotarsa*種の侵入の阻止または防除を成し遂げることがわかっている。

関連技術

【0197】

本明細書に記載されるようなポリヌクレオチド及び核酸分子の実施形態としては、追加の要素（プロモーター、小分子RNA認識部位、アプタマー若しくはリボザイムなど）、コード配列を発現させるための追加の及び追加の発現カセット（例えば、殺虫性タンパク質若しくは選択マーカーなどの導入遺伝子を発現させるため）、または非コード配列（例えば、追加の抑制要素を発現させるため）を挙げることができる。例えば、本発明の態様は、標的遺伝子配列群またはそれらのDNA補体から選択される配列を有するDNAの同等の長さのフラグメントと約95%～約100%の同一性の配列を有する18以上の近接ヌクレオチドのうちの少なくとも1つのセグメントを含むDNAに操作可能に連結する異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体を提供する。本発明の別の態様は、トリガー配列群から選択される群から選択される、配列または配列のフラグメントを有するアンチセンス領域を有するRNAヘアピンをコードするDNAに操作可能に連結される異種プロモーターを含む組換え型DNA構造体を提供する。別の実施形態において、（a）表1）に同定されている遺伝子からなる群から選択される標的遺伝子を抑制するためのRNAサイレンシング要素、及び（b）アプタマーをコードするDNAに操作可能に連結させるプロモーターを含む組換え型DNA構造体は、RNAアプタマーなどのRNA転写物及びRNAサイレンシング要素が植物細胞中に発現する植物ゲノムに安定して一体化させ、アプタマーは、RNAサイレンシング要素を細胞中の所望の位置に誘導するために機能する。別の実施形態において、小分子RNA（例えば、特定の細胞または組織のみに発現するmiRNAまたはsiRNAによる）による結合及び切断のために1つ以上の認識部位を包含することによって、植物中において更に正確な発現パターンが可能であり、小分子RNAが発現する場合、組換え型DNA構造体の発現が抑制される。このような追加の要素は、以下に説明する。

プロモーター

【0198】

本発明において有用なプロモーターは、構造体が転写されることが意図される細胞中において機能的である。一般に、これらのプロモーターは、組換え型構造体で使用されるような異種プロモーターである。すなわち、自然に本明細書に記載の構造体で使用される他の核酸要素に操作可能に連結されることがわかるものではない。さまざまな実施形態において、プロモーターは、構成的プロモーター、空間特異的プロモーター、一時的に特異的プロモーター、発生的特異的プロモーター、及び誘導性プロモーターからなる群から選択される。多くの実施形態において、プロモーターは、植物中で機能的であるプロモーター、例えば、*pol* IIプロモーター、*pol* IIIプロモーター、*pol* IVプロモーターまたは*pol* Vプロモーターなどである。

【0199】

本発明の組換え型DNA構造体と共に使用するのに好適な非構成的プロモーターとしては、空間特異的プロモーター、一時的に特異的プロモーター、誘導性プロモーターが挙げられる。空間特異的プロモーターとしては、オルガネラ特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、器官特異的プロモーター（例えば、それぞれ、色素体、塊根、花粉または種子内で発現するための色素体特異的プロモーター、塊根特異的プロモーター、花粉特異的プロモーター、または種子特異的プロモーター）を挙げることができる。多くの場合、種子特異的プロモーター、胚特異的プロモーター、アリューロン特異的プロモーター、または内胚乳特異的プロモーターが特に有用である。一時的な特異

的プロモーターとしては、植物の成長サイクルにおいて、または日中または夜の異なる時間中、または1年うちの異なる季節において特定の発生段階中発現が促進される傾向にあるプロモーターを挙げることができる。誘導性プロモーターとしては、これに限定するものではないが、生物学的ストレスまたは非生物ストレス（例えば、水分欠乏、乾燥、熱、寒冷、高栄養レベル若しくは低栄養レベルまたは高塩レベル若しくは低塩レベル、または有害生物若しくは病原体感染）など化学物質または環境条件によって誘発されるプロモーターが挙げられる。ミクロRNAプロモーター、特に、一時的特異的パターン、空間特異的パターン、誘導発現パターンを有するものが有用であり、特異的発現パターンを有するmiRNA並びにmiRNAプロモーターの同定方法の例は、米国特許出願公開第2006/0200878号、同2007/0199095号、同2007/0300329号に提供され、これらは、具体的には、参照によって本明細書に援用される。発現特異的プロモーターとしては、概して、構成的に発現するが、通常、「強いプロモーター」または「弱いプロモーター」としてみなされるプロモーターなど、異なる発現度または発現「強度」でのプロモーターを挙げることができる。

【0200】

特定の対象のプロモーターとしては、以下の例が挙げられる：アグロバクテリウムのT-DNAから単離された乳白合成酵素プロモーター；カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター；エンハンサー要素（Zea maysの熱ショック性タンパク質70由来のイントロン）に連結される向上カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35Sプロモーターなどの向上プロモーター要素またはキメラプロモーター要素；米国特許明細書第5, 837, 848号；同6, 437, 217号及び同6, 426, 446号に開示されているものなど、根特異的プロモーター；米国特許明細書第6, 433, 252号に開示されているトウモロコシL3オレオシンタンパク質；米国特許公開出願第2004/0216189号に開示されている色素体局所アルドラーゼをコードする植物核遺伝子のプロモーター；米国特許明細書第6, 084, 089号に開示されている低温誘導プロモーター；米国特許明細書第6, 140, 078号に開示されている塩誘導プロモーター；米国特許明細書第6, 294, 714号に開示されている光誘導プロモーター；米国特許明細書第6, 252, 138号に開示されている病原体誘導プロモーター；米国特許公開出願第2004/0123347 A1号に開示されている水欠乏誘導プロモーター。特に、植物での組換え型DNA構造体機能においてプロモーター及びその使用を公開している上述の特許明細書及び特許明細書公開をすべてが本明細書に参照によって援用される。

【0201】

対象の植物脈管または師部特異的プロモーターとしては、アグロバクテリウムリゾゲネスのrolC若しくはrolAプロモーター、アグロバクテリウムチュメファシエンスト-DNA遺伝子5プロモーター、イネスクロース合成酵素RSs1遺伝子プロモーター、コメリナイエローモットルバドナウイルスプロモーター、ココナツ葉面減衰ウィルスプロモーター、ライストングロかん菌状ウィルスプロモーター、エンドウマメグルタミン合成酵素GS3A遺伝子プロモーター、ジャガイモスクラーゼ遺伝子のinvCD111及びinvCD141プロモーター、タバコ中に師部特異的発現を有することが明かであるシロイヌナズナ（Kertbundit et al, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , 88:5212-5216）から単離されたプロモーター、VAHOX1プロモーター領域、エンドウマメ細胞壁転化酵素遺伝子プロモーター、ニンジン由来の酸性転化酵素遺伝子プロモーター、硫酸トランスポーター遺伝子Sultr1;3プロモーター、植物スクロース合成酵素遺伝子プロモーター、及び植物スクローストランスポーター遺伝子プロモーターが挙げられる。

【0202】

本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドと使用するのに好適なプロモーターとしては、ポリメラーゼII（「pol II」）プロモーター、及びポリメラーゼIII（「pol III」）プロモーターが挙げられる。RNAポリメラーゼIIは、通常、400ヌクレオチドの長さよりも短い構造的RNAまたは触媒性RNAを転写し、終結シグナルとしてT残基の単純なラン（run）を認識し、また、siRNA二重鎖の転写に使用されている（例えば、Lu et al. (2004) Nucleic Acids Res., 32:e171を参照されたい）。このため、Pol IIプロモーターは、短いRNA転写物が本発明の組換え型DNAから産生されるような特定の実施形態

である。一実施形態において、組換え型DNA構造体は、RNA転写物を発現させるために、自己切断リボザイム配列（例えば、自己切断ハンマーヘッド型リボザイム）が隣接したpol

IIプロモーターを含み、その結果、*Leptinotarsa*標的遺伝子の転写物に結合する一本鎖RNAなど、5'末端及び3'末端が画定された、フランキング配列との干渉が潜在的にない処理されたRNAとなる。代替的方法では、pol IIIプロモーターを使用して、5'末端及び3'末端が相対的に画定された転写物を産生する。すなわち、最小5'及び3'フランキング配列を有するRNAを転写する。いくつかの実施形態において、Pol IIIプロモーター（例えば、U6またはH1プロモーター）は、転写RNAにおいて2つの塩基対オーバーハング（UU）となる短いAT-リッチ転写終結部位を追加するためであり、これは、例えば、siRNA型構造体の発現に有用である。siRNA構造体の発現の駆動にpol IIIプロモーターを使用することが報告されている（van de Wetering et al. (2003) EMBO Rep., 4:609-615及びTuschl (2002) Nature Biotechnol., 20:446-448を参照されたい）。バキュロウィルスポリヘドリンなどのバキュロウィルスプロモーター及びp10プロモーターは、当技術分野において既知であり、入手可能である（例えば、Invitrogen's「Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques」2002（Life Technologies, Carlsbad, CA）及びF. J. Haines et al.「Baculovirus Expression Vectors」日付なし（Oxford Expression Technologies, Oxford, UK）を参照されたい）。

【0203】

プロモーター要素としては、天然プロモーターまたはプロモーター要素またはそれらの相同体ではないが、遺伝子の発現を調節できる核酸配列を挙げることができる。こうした「遺伝子非依存性」調節配列の例としては、リガンド結合領域またはアプタマー（以下の「アプタマー」を参照されたい）及び調節領域（シス作用性であってもよい）を含む天然RNA配列または人工設計されたRNA配列が挙げられる。例えば、Isaacs et al. (2004) Nat. Biotechnol., 22:841-847, Bayer and Smolke (2005) Nature Biotechnol., 23:337-343, Mandal とBreaker (2004) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 5:451-463, DavidsonとEllington (2005) Trends Biotechnol., 23:109-112, Winkler et al. (2002) Nature, 419:952-956, Sudarsan et al. (2003) RNA, 9:644-647, 及びMandalandBreaker (2004) Nature Struct. mol. Biol., 11:29-35を参照されたい。こうした「リボレギュレーター」は、適切なりガンドの所与の濃度の存在下（または不在下）においてのみ*Leptinotarsa*標的遺伝子を抑制するためにサイレンシング要素をコードするDNA転写を調節するため、特定の空間特異性または一時的特異性向けに選択されるか、または設計される可能性もある。一例として、ストレス下（例えば、水、温度、栄養素によるストレスなどの非生物性ストレスまたは有害生物または病原体による攻撃などの生物性ストレス）で、植物から産生される内因性リガンド（例えば、ジャスモン酸またはサリチル酸）に応答するリボレギュレーターであり、ストレス下で*Leptinotarsa*標的遺伝子を抑制するために、内因性リガンドレベルはリボレギュレーターがサイレンシング要素をコードするDNAの転写を開始するのに十分なレベルまで上昇させる。

リコンビナーゼ部位

【0204】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、1つ以上の部位特異的リコンビナーゼ認識部位をコードするDNAを含む。一実施形態において、組換え型DNA構造体は、少なくとも一対のloxP部位を含み、loxP部位間のDNAの部位特異的組換えは、Creリコンビナーゼによって媒介される。LoxP部位の位置及び相対的配向は、所望の組換えを達成するために選択される。例えば、loxP部位が同じ配列にあるとき、loxP部位間のDNAは、環状に切り出される。別の実施形態において、組換えDNA構造体は、Creリコンビナーゼ及びloxP部位を有する別のDNAの存在下において1つのloxP部位をコードするDNAを含み、2つのDNAの組換えが行われる。

アプタマー

【0205】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、RNAアプタマー、すなわち、ワトソン・クリック塩基対形成（例えば、二本鎖核酸構造を形成するにあたって、相補的逆平行性核酸鎖との間で発生する塩基対形成に反して）に主に基づくものではない結合機構を介してリガンドに結合するRNAに処理されたDNAを含む。例えば、Ellington and Szostak (1990) *Nature*, 346: 818-822を参照されたい。アプタマーの例は、例えば、公的アプタマーデータベース (aptamer. icmb. utexas. edu) にてオンラインで閲覧可能 (Lee et al. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32 (1) : D95-100)) で見ることができる。しかし、本発明で有用なアプタマーは、一価（単一のリガンドと結合する）または多価（二つ以上の個々のリガンドと結合する、例えば、2つまたはそれ以上の異なるリガンドの1つのユニットと結合するなど）であり得る。

10

【0206】

本発明で有用なリガンドとしては、主にワトソン・クリック塩基形成に基づくものではないメカニズムにより、核酸二次構造によって認識され、制約されることが可能な任意の分子（または分子の一部）が挙げられる。このような方法では、リガンド及びアプタマーの認識及び結合は、抗原及び抗体または生物学的エフェクター及びレセプターの認識及び結合に類似している。リガンドは、1つの分子（または分子の一部）、2つまたはそれ以上の分子（または分子の一部）の組み合わせを含むことができ、また、1つ以上の巨大分子錯体（例えば、ポリマー、脂質二重層、リポソーム、細胞膜または他の細胞組織、または細胞表面）を含むことができる。特異的リガンドの例としては、ビタミン（補酵素B₁₂、チアミンピロリン酸塩、フラビンモノヌクレオチド、グアニン、アデノシン、S-アデノシルメチオニン、S-アデノシルホモシステイン、補酵素A、リシン、チロシン、ドパミン、グルコサミン-6-リン酸、カフェイン、テオフィリン）、抗生物質（例えばクロラムフェニコール、及びネオマイシン）、除草剤（例えば、グリフォサート、及びジカンバ）、ウィルス、またはファージ・コートタンパク質、及び無脊椎表皮または消化管表面タンパク質などのタンパク質、及びRNA（ウィルスRNA、転移-RNA (t-RNA)、リボソームRNA (rRNA) など）及びRNAポリメラーゼ（RNA-依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) など）が挙げられる。本発明で有用なRNAアプタマーの1つのクラスは、リガンドとは結合しないが、熱応答性である「感温スイッチ」である。つまり、アプタマーのコンフォメーションは、温度によって決定される。例えば、Box 3 in Mandal and Breaker (2004) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 451-463を参照されたい。

20

30

導入遺伝子転写ユニット

【0207】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、導入遺伝子転写ユニットを含む。導入遺伝子転写ユニットは、例えば、天然タンパク質または異種タンパク質などの対象遺伝子をコードするDNA配列を含む。対象遺伝子は、任意の種からの任意のコード配列または非コード配列であってもよい（これに限定するものではないが、非細菌及びウィルスなどの非真核生物、真菌、原生生物、植物、無脊椎動物及び脊椎動物などが挙げられる。特定の対象の遺伝子は、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、植物エクジステロイド、*Bacillus thuringiensis* 殺虫タンパク質、*Xenorhabdus* 殺虫タンパク質、*Photorhabdus* 殺虫タンパク質、*Bacillus laterosporous* 殺虫タンパク質、及び *Bacillus sphaericus* 殺虫タンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの殺虫剤をコードする遺伝子である。導入遺伝子転写ユニットは、5' または 3' 配列またはその両方を、導入遺伝子の転写の必要に応じて更に含み得る。

40

イントロン

【0208】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、スプライシング可能なイントロンをコードするDNAを含む。「イントロン」は、概して、エクソン間（DNAのタンパク質コードセグメントまたは対応する転写RNA）に配置されるDNAのセグメント（またはこうしたセグメントから転写されたRNA）を意味し、メッセンジャーRNAが成熟する間、真核生物の原子核中に生じる切断／ライゲーションプロセスによ

50

り、イントロンの存在が、酵素的に「スプライシング」されるか、またはRNA鎖から取り外される。また、用語「イントロン」は、成熟RNA転写物をスプライシング可能であるが、タンパク質コードエクソン間に見出されるイントロンではないRNAセグメントに転写される非コードDNA配列にも使用する。これらの一例としては、下流コード配列の植物中において（いくつかの場合、特に単子葉類において）発現を向上させる能力を有するスプライシング可能な配列であり、これらのスプライシング可能な配列は、自然に、いくつかの植物遺伝子の5'非翻訳領域並びにいくつかのウィルス領域（例えば、タバコモザイクウイルス5'リーダー配列または植物遺伝子における促進発現として記述されている（Gallie and Walbot (1992) Nucleic Acids Res., 20:4631-4638）「オメガ」リーダーに配置される。これらのスプライシング可能配列または「発現促進イントロン」は、プロモーター間ではあるが、タンパク質コードエクソンの前の植物遺伝子の5'非翻訳領域に人工的に挿入することができる。こうした発現促進イントロンの例としては、これに限定されるものではないが、トウモロコシアルコール脱水素酵素（Zm-Adh1）、トウモロコシBronze-1発現-促進イントロン、イネアクチン1（Os-Act1）イントロン、Shrunken-1（Sh-1）イントロン、トウモロコシスクロース合成酵素イントロン、熱ショックタンパク質18（hsp18）イントロン、及び82キロダルトン熱ショックタンパク質（hsp82）イントロンが挙げられる。米国特許明細書第5, 593, 874号及び同第5, 859, 347号（具体的には、本明細書に参照によって援用される）は、遺伝子プロモーターの3'及び第1のタンパク質コードエクソンの5'に配置された非翻訳リーダー中に70キロダルトンのトウモロコシ熱ショックタンパク質（hsp70）由来の発現促進イントロンを包含することによって、植物中で使用するための組換え型DNA構造体の改善方法について記述している。

リボザイム

【0209】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、1つ以上のリボザイムをコードするDNAを含む。特定の対象のリボザイムとしては、自己切断リボザイム、ハンマーヘッド型リボザイムまたはヘアピンリボザイムが挙げられる。一実施形態において、組換え型DNA構造体は、Leptinotarsa標的遺伝子の抑制を目的としたサイレンシング要素など、転写RNAを切断し、RNAの画定されたセグメントを提供するのに有用である1つ以上のリボザイムをコードするDNAを含む。

遺伝子抑圧要素

【0210】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、Leptinotarsa標的遺伝子以外の標的遺伝子を抑制することを目的とした追加の遺伝子抑圧要素をコードするDNAを含む。抑制される標的遺伝子としては、コード配列若しくは非コード配列またはその両方を挙げることができる。

【0211】

好適な遺伝子抑圧要素は、米国特許出願公開第2006/0200878号に詳細に記述されており（具体的には参照によって本明細書に援用され）、以下の1つ以上を含む。

(a) 抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントに対してアンチセンスである少なくとも1つのアンチセンスDNAセグメントを含むDNA、

(b) 抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントに対してアンチセンスである少なくとも1つのアンチセンスDNAセグメントの複数のコピーを含むDNA、

(c) 抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントである少なくとも1つのセンスDNAセグメントを含むDNA、

(d) 抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントである少なくとも1つのセンスDNAセグメントの複数のコピーを含むDNA、

(e) 二本鎖RNAを形成することによって抑制される遺伝子の抑制のためにRNAに転写するDNAであって、少なくとも1つのアンチセンスDNAセグメントを含み、抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメント及び抑制される遺伝子の少なくとも1つである少なくとも1つのセンスDNAセグメントに対してアンチセンスであるDNA、

(f) 1本の二本鎖RNAを形成することによって、抑制される遺伝子の抑制のためにRNAに転写するDNAであって、抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントに対してアンチセンスである複数の連続アンチセンスDNAセグメント及び抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントである複数の連続センスDNAセグメントを含むDNA、

(g) 複数の二本鎖RNAを形成することによって抑制される遺伝子の抑制のためにRNAに転写するDNAであって、抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントに対してアンチセンスである複数のアンチセンスDNAセグメント及び抑制される遺伝子の少なくとも1つのセグメントである複数のセンスDNAセグメントを含むDNAであって、複数のアンチセンスDNAセグメント及び複数のセンスDNAセグメントが一連の逆方向反復で配置されるDNA、

(h) 植物miRNA由来のヌクレオチドを含むDNA、

(i) siRNAのヌクレオチドを含むDNA、

(j) リガンドと結合可能なRNAアプタマーに転写するDNA、及び

(k) リガンドと結合可能なRNAアプタマーに転写するDNA、及び抑制される遺伝子の発現を調節可能な調節RNAに転写するDNAであって、この調節は、調節RNAのコンフォメーションに依存し、調節RNAのコンフォメーションがRNAアプタマーの結合状態によって、アロステリック性の影響を受けるDNA。

【0212】

いくつかの実施形態において、イントロンは、いかなるタンパク質コードエクソン（コード配列）も不在である遺伝子抑圧要素の運搬に使用される。一例では、発現促進イントロンなどのイントロンは、イントロン内に遺伝子発現要素が包埋されることによって分断され、転写時に遺伝子抑圧要素はイントロンから切除される。このため、タンパク質コードエクソンは、本明細書に開示の組換え型DNA構造体の遺伝子抑圧機能を提供する必要はない。

転写調節要素

【0213】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体またはポリヌクレオチドは、転写調節要素をコードするDNAを含む。転写調節要素としては、本発明の組換え型DNA構造体の発現レベル（こうした調節要素不在下でのその発現に対して）を調節する要素が挙げられる。好適な転写調節要素の例としては、米国特許出願公開第2006/0200878号（具体的には、参照によって本明細書に援用される）に詳細に記述されているとおり、リボスイッチ（シス作用性またはトランス作用性）、転写安定化配列及びmiRNA認識部位が挙げられる。

トランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物の作製及び使用

【0214】

植物の形質転換としては、任意のいくつかの既知の方法及び組成物を挙げるができる。植物の形質転換に好適な方法としては、DNAを細胞内に取り込むことが可能な任意の方法が実質上挙げられる。植物の形質転換の1つの方法は、微粒子銃（例えば、米国特許明細書第5,015,580号（ダイズ）、同第5,538,880号（トウモロコシ）、同第5,550,318（トウモロコシ）号、同第5,914,451号（ダイズ）、同第6,153,812号（コムギ）、同第6,160,208（トウモロコシ）号、同第6,288,312号（イネ）、同第6,365,807号（イネ）、同第6,399,861号（トウモロコシ）及び同第6,403,865号（トウモロコシ）（いずれも、トランスジェニック植物の産生が可能であるために、参照によって援用されている）に記述されている）である。

【0215】

別の有用な植物形質転換方法は、バイナリーTiプラスミド系を含むAgrobacteriumによるAgrobacterium媒介形質転換であり、アグロバクテリウムは、第1のTiプラスミド及び野生型Tiプラスミドの少なくとも1つのT-DNA境界を含む第2のキメラプラスミド、形質転換植物細胞において機能し、本発明のポリヌクレオチドまたは組換え型DNA構造体に操作可能に連結されるプロモーターを運搬する。例えば、米国特許明細書第5,159,135号（参照によって援用される）に記載のバイナリー系を参照されたい。また、De Framond (198

10

20

30

40

50

3) Biotechnology, 1:262-269; and Hoekema et al., (1983) Nature, 303:179を参照されたい。このようなバイナリー系では、T-DNA境界（複数可）を含む、より小さいプラスミドは、都合よく構成することができ、また、大腸菌など、好適な代替宿主において処置し、アグロバクテリウムに移送することができる。

【0216】

トランスジェニック植物の産生を可能にするための詳細な植物（特に作物）のアグロバクテリウム媒介形質転換手順としては、米国特許明細書第5,004,863号、同第5,159,135号、及び同第5,518,908号（綿）、同第5,416,011号、同第5,569,834号、同第5,824,877号及び同第6,384,301号（ダイズ）、同第5,591,616号及び同第5,981,840号（トウモロコシ）、同第5,463,174号（アブラナなどのブラシカステロール）、同第7,026,528号（コムギ）及び同第6,329,571号（イネ）及び米国特許出願公開第2004/0244075号（トウモロコシ）及び同第2001/0042257 A1号（サトウダイコン）（そのすべてが詳細には、参照によって援用され）に記載の手順が挙げられる。米国特許出願公開第2011/0296555号は、実施例5の形質転換ベクター（ベクター配列など）及びトウモロコシ、ダイズ、アブラナ、綿及びサトウキビの形質転換用の詳細なプロトコールに開示され、トランスジェニック植物の産生を可能にするために、詳細には、参照によって援用される。双子葉類及び単子葉類のいずれも、その中でも落花生（Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep., 15:653）；アスパラガス（Bytebier et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84:5345）；オオムギ（Wan and Lemaux (1994) Plant Physiol., 104:37）；イネ（Toriyama et al. (1988) Bio/Technology, 6:10；Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep., 7:379；コムギ（Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10:667；Becker et al. (1994) Plant J., 5:299）；アルファルファ（Masoud et al. (1996) Transgen. Res., 5:313）；及びトマト（Sun et al. (2006) Plant Cell Physiol., 47:426-431）など多くの植物種に関して類似の方法が報告されている。また、米国特許出願公開第2003/0167537 A1（参照によって援用）号のベクター、形質転換方法及び転写因子をCaMV35Sプロモーターによって構成的に発現させている形質転換シロイヌナズナ植物の産生に関する詳細を参照されたい。ナス科植物の特により有用な形質転換方法は、当該技術分野において周知である。例えば、公的に記述されている形質転換方法は、トマト（Sharma et al. (2009) J. Biosci., 34:423-433）、ナス（Arpaia et al. (1997) Theor. Appl. Genet., 95:329-334）、ジャガイモ（Bannerjee et al. (2006) Plant Sci., 170:732-738；Chakravarty et al. (2007) Amer. J. Potato Res., 84:301-311、S. Millam「Agrobacterium-mediated transformation of potato」Chapter 19 (pp. 257 - 270)、「Transgenic Crops of the World: Essential Protocols」Ian S. Curtis (editor), Springer, 2004）及びペッパー（Li et al. (2003) Plant Cell Reports, 21:785-788）を参照されたい。安定したトランスジェニックジャガイモ、トマト及びナスは、商業的に様々な領域に導入した。例えば、K. Redenbaugh et al.「Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables: A Case Study of the FLAVR SAVRTM Tomato」、CRC Press, Boca Raton, 1992及びGM Crop Database内の商業的遺伝子操作作物の広範囲にわたり公的に入手可能な文書、CERA. (2012). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D. C., (www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_databaseより閲覧可能）を参照されたい。他の植物種のさまざまな形質転換方法は、当業者に既知で有り、例えば、百科事典的参考文献「Compendium of Transgenic Crop Plants」編Chittaranjan Kole and Timothy C. Hall, Blackwell Publishing Ltd., 2008；ISBN 978-1-4051-6924-0（電子版mrw.interscience.wiley.com/emrw/9781405181099/hpt/tocにて閲覧可能）を参照し、これらは、穀類及び飼料草（イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、オートムギ、モロコシ、トウジンヒエ、シコクビエ、冬型飼料草、及びバヒアグラス）、油糧種子作物（ダイズ、油糧種子ブラシカス、ヒマワリ、落花生、アマ

10

20

30

40

50

、ゴマ、及びベニバナ)、豆果穀類及び飼料(インゲンマメ、ササゲ、エンドウ、ソラマメ、レンズ豆、テパリービーン、アジア豆、キマメ、カラスノエンドウ、ヒヨコマメ、ハウチワマメ、アルファルファ、及びクローバー)、温帯果物及びナッツ(リンゴ、西洋ナシ、桃、プラム、ベリー作物、サクランボ、ブドウ、オリーブアーモンド、及びペルシャグルミ)、熱帯及び亜熱帯果物及びナッツ(柑橘類、グレープフルーツ、バナナ、及びオオバコ、パイナップル、パパイア、マンゴー、アボカド、キウイフルーツ、パッションフルーツ、及び柿)、野菜作物(トマト、ナス、ペッパー、野菜アブラナ、ラディッシュ、ニンジン、ウリ科植物、ネギ属植物、アスパラガス、及び葉菜)、糖、塊茎、及び繊維作物(サトウキビ、サトウダイコン、ステビア、ジャガイモ、サツマイモ、カサバ及び綿)、栽培作物、装飾物、及び芝草(タバコ、コーヒー、ココア、茶、ゴムの木、薬用植物、装飾物、及び芝草)、並びに、林木種の形質転換方法について記述されている。

10

【0217】

トランスジェニック植物細胞及び安定して一体化される組換え型DNAを含むトランスジェニック植物を提供する形質転換方法は、好ましくは、媒体での組織培養中内で及び制御された環境内で実施される。「培地」は、インビトロ、すなわち、無傷の生体外での細胞の成長に使用される多数の栄養混合物を指す。レシピエント細胞標的としては、これに限定するものではないが、分裂組織細胞、カルス、未熟胚または胚の一部、及び配偶子細胞(小孢子、花粉、精子及び卵細胞など)が挙げられる。稔性植物を再生され得る任意の細胞は、本発明を実践するための有用なレシピエント細胞として意図される。カルスは、これに限定されないが、未熟胚嚢または胚嚢の一部、幼苗頂端分裂組織、小孢子など、さまざまな組織源から開始し得る。カルスとして増殖可能なこれらの細胞は、遺伝的形質転換のレシピエント細胞として機能し得る。本発明のトランスジェニック植物を産生するための実用的な形質転換方法及び材料(例えば、さまざまな培地及びレシピエント標的細胞、未熟胚嚢の形質転換及びその後の稔性トランスジェニック植物の再生など)が、例えば、米国特許明細書第6, 194, 636号及び同第6, 232, 526号並びに米国特許出願公開第2004/0216189号に開示され、これらは、詳細には、参照によって援用される。

20

【0218】

一般的な形質転換の実践では、DNAは、任意の1つの形質転換実験において、標的細胞をわずかな比率でのみ取り込まれる。マーカー遺伝子は、概して、トランスジェニックDNA構造体を受領し、それらのゲノム内に一体化することによって安定して形質転換されるこれらの細胞を同定するにあたって、効率のよい系を提供するために使用される。好ましいマーカー遺伝子は、抗生剤または除草剤など、選択剤に耐性を与える選択マーカーをもたらす。植物細胞が耐性のある抗生剤または除草剤のいずれかが、選択するための薬剤として有用であり得る。潜在的形質転換細胞は、選択剤に曝露される。こうした細胞である生存細胞の集団内では、耐性付与遺伝子は十分なレベルで組込まれ、発現され、細胞生存が可能となる。安定的な組換え型DNAの組込みを確認するために、細胞の試験を更に行うことができる。一般に使用される選択マーカー遺伝子としては、カナマイシン若しくはパロモマイシン(nptII)、ハイグロマイシンB(aph IV)及びゲンタマイシン(aac3及びaac C4)など抗生物質に対する耐性、またはグルホシネート(bar若しくはpat)及びグリホサート(EPSPS)などの除草剤に対する耐性が付与されているものを含む。有用な選択マーカー遺伝子及び選択剤の例としては、米国特許明細書第5, 550, 318号、同第5, 633, 435号、同第5, 780, 708号及び同6, 118, 047号に記述されており、これらは、詳細にはすべて参照によって援用される。形質転換体を可視により同定する能力を提供するマーカーなどのスクリーニングマーカーまたはリポーターも、使用することができる。有用なスクリーニングマーカーの例としては、例えば、発色性基質(例えば、βグルクロニダーゼ(GUS)(uidA)またはルシフェラーゼ(luc))に作用することによって検出可能な色を作り出すタンパク質を発現させる遺伝子か、または、緑色蛍光タンパク質(GFP)(gfp)または免疫原性分子など、それ自体が検出可能である遺伝子が挙げられる。当業者は、多くの他の有用なマーカーまたはリポーターが使用可能であることが認識される。

30

40

【0219】

50

トランスジェニック植物細胞中の組換え型DNA構造体の転写を検出または測定は、タンパク質検出方法（例えば、ウエスタンブロット法、ELISA法及び他の免疫化学方法）、酵素活性の測定、または、核酸検出方法（例えばサザンブロット法、ノーザンブロット法、PCR、RT-PCR、蛍光性インサイチューハイブリダイゼーション）など、任意の好適な方法によって行うことができる。

【0220】

Leptinotarsa種の標的遺伝子を標的とする本発明の組換え型ポリヌクレオチドの植物細胞での転写の他の好適な検出方法または測定方法としては、Leptinotarsa種において組換え型ポリヌクレオチドの不在で観察される発現レベルに対して、標的遺伝子の発現レベルの直接的表示、または代理的表示である他のあらゆる形質の測定（例えば、Leptinotarsa種の成長速度、死亡率または生殖速度または動員速度）、または、損傷（例えば、塊根の損傷）の測定、または、Leptinotarsa種によって侵入される植物若しくは植物用土地の収率損失の測定が挙げられる。概して、対象の組換えポリヌクレオチドの植物細胞中での転写の好適な検出方法及び測定方法としては、例えば、肉眼的または顕微鏡的形態学的特徴、成長率、収率、生殖速度、動員速度、有害生物若しくは病原体への耐性、生物性ストレス若しくは非生物性ストレスへの耐性（例えば、水欠乏ストレス、塩ストレス、栄養素ストレス、熱ストレス若しくは寒冷ストレス）などが挙げられる。このような方法は、表現型形質の直接測定またはプロキシアッセイ（例えば、植物中において、これらのアッセイには、非生物性ストレスの耐性を測定するための葉アッセイまたは塊根アッセイなどの植物部分アッセイを含む）を用いることができる。こうした方法としては、無脊椎有害生物または病原体に対する耐性（例えば、植物組織への損傷）の直接測定、またはプロキシアッセイ（例えば、植物収率アッセイ、または詳細には参照によって援用される、国際特許出願公開W02005/110068 A2号及び米国特許出願公開US2006/0021087A1号に記載のウエスタン・コーン・ルーツワーム（*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte）の幼虫のバイオアッセイなどのバイオアッセイ、または一植物当たりの嚢胞、1グラム根塊当たりの嚢胞、一植物当たりの卵、1グラム根塊当たりの卵、嚢胞当たりの卵が測定されるダイズシストセンチュウバイオアッセイ（Steeves et al. (2006) *Funct. Plant Biol.*, 33: 991-999に記述）、または本明細書の実施例に記載のコロラドハムシ（*Leptinotarsa decemlineata*）バイオアッセイが挙げられる。

【0221】

本発明の組換え型DNA構造体は、例えば、他の遺伝子を発現または抑制させることによって、追加の形質（例えば、形質転換植物の場合、除草剤耐性、有害生物耐性、寒冷発芽耐性、水欠乏耐性などの形質）を付与するために他の組換え型DNAと積層され得る。遺伝子発現の増減を調節している構造体は、米国特許出願公開第2004/0126845 A1号に開示され、詳細には参照によって援用されている。

【0222】

稔性トランスジェニック植物の種子は、収穫し、そのゲノム中に組換え型DNA構造体を含む本発明のトランスジェニック植物の種ハイブリッド世代など後代の成長に使用することができる。このため、植物と本発明の組換え型DNA構造体との直接的形質転換に加えて、本発明のトランスジェニック植物は、組換え型DNAを有する第1の植物をその構造体を有さない第2の植物と交雑することによって、調製することができる。例えば、形質転換体に受け入て、トランスジェニック植物を産生することができる組換え型DNAを植物株に取り込むことができ、第2の植物株と交雑させて、組換え型DNAを得られた後代に移入することができる。1つ以上の追加の形質（複数可）（これに限定されないが、除草剤耐性、有害生物または疾病耐性、環境ストレス耐性、改変栄養分及び収率改善など）を与える他の組換え型DNAを有する植物株と交雑させて、所望の標的配列発現挙動及び追加の形質（複数可）をいずれも与える組換え型DNAを有する後代植物を産生することができる。

【0223】

形質を組合せるこうした品種改良では、追加の形質を供与するトランスジェニック植物は、雄株（花粉媒介）であってもよく、また、基本的形質を担持するトランスジェニック

植物は、雌株であってもよい。いくつか種類の植物など、このような交雑分離系の後代は、いずれの親形質のDNAを担持することになり、いくつかは、1つの親形質のDNAを担持することになる。こうした植物は、親組換え型DNAと関連しているマーカーによって同定され得る。いずれの親形質のDNAを担持する後代植物は、雌親株に複数回（例えば、通常、6代～8代）戻し交雑させて、1つの元のトランスジェニック親株並びに他のトランスジェニック親株の組換え型DNAと実質的に同じ遺伝子型とのホモ接合性後代植物を産生することができる。

【0224】

本発明の更に別の態様は、本発明のトランスジェニック種子（または、ジャガイモの場合、トランスジェニック種芋）から成長させたトランスジェニック植物である。本発明は、トランスジェニック種子から直接成長したトランスジェニック植物と同一のトランスジェニック種子から成長していない第2の植物との交雑によって産生された、組換え型DNA並びに植物の後代（同系またはハイブリッド植物株など）を含有するトランスジェニック種子から直接成長したトランスジェニック植物を意図する。交雑としては、例えば、以下のステップを含む：

(a) 第1の親植物（例えば、非トランスジェニックまたはトランスジェニック）及びトランスジェニックである第2の親植物の種子を本発明により植えること、

(b) 第1の親植物及び第2の親植物の種子を、花を支持する植物に成長させること、

(c) 第2の親由来の花粉を第1の親由来の花に授粉すること、及び

(d) 受精した花を支持する親植物に産生された種子を収穫すること。

【0225】

多くの場合、例えば、戻し交雑などによって、組換え型DNAを優良品種に移入交雑させ、特定の所望の形質を1つの源からその形質を保持していない同系植物または他の植物に転移させることが所望される。これは、例えば、まず、上位同系（「A」）（反復親）を供与同系（「B」）（非反復親）と交雑させることによって達成することができ、例えば、現在の発明によって作製された構造体など、問題の形質について適切な遺伝子（複数可）を運搬する。まず、こうした代の交雑の後代が非反復親「B」から転移された所望の形質に関して結果として生じた後代において選択され、次に選択された後代を上位反復親「A」に戻し交配させる。所望の形質を選択している5代以上の戻し交雑世代後、移行される特性が制御されている遺伝子座については、後代は本質的に半接合性であり得るが、ほとんどまたはほとんどすべての他の遺伝子に関しては、上位親と同様である。最後の戻し交雑世代は、自家受粉して、移入される遺伝子（複数可）に関して純粋種である後代（例えば、1つ以上の形質転換事象）をもたらす。

【0226】

一連の品種改良操作ではあるが、選択されたDNA構造体は、更なる組換え操作を行う必要なく、1つの株から完全に異なる株に移動させ得る。このため、1つ以上のDNA構造体の純粋種である同系植物を産生し得る。異なる同系植物を交雑させることによって、DNA構造体の異なる組み合わせを有する大量の異なるハイブリッド体を産生することができる。このような方法では、ハイブリッド形成と関連の高い所望の農学的性質（「雑種強勢」）並びに1つ以上のDNA構造体によって付与される所望の特性を有する植物を産生し得る。

【0227】

本発明の特定のトランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物では、対象遺伝子を同時に発現させると共に標的遺伝子の発現を調製することが所望される場合もある。したがって、いくつかの実施形態において、トランスジェニック植物は、少なくとも1つの対象遺伝子を発現させる遺伝子発現要素を更に含む組換え型DNAを含み、本発明の組換え型DNA構造体の転写は、遺伝子発現要素の同時転写による影響を受ける。

【0228】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え型DNA構造体は、任意の植物細胞若しくは組織においてまたは任意の発育段階の植物全体において転写され得る。トランスジェニック植物は、これに限定するものではないが、商業的対象若しくは農業的対象の植物（作

10

20

30

40

50

物など（特にヒトの食料若しくは家畜飼養に使用される作物）、木材若しくはパルプ産生の木、野菜用植物、果物用植物及び装飾用植物など、任意の単子葉類若しくは双子葉植物から誘導することができる。対象の植物の例としては、穀物作物植物（例えば小麦、オート麦、オオムギ、トウモロコシ、ライ麦、ライ小麦、米、雑穀、モロコシ、キノア、アマランス、及びソバ）；飼料作物植物（例えば、アルファルファ、ソラマメ、クローバーなどの飼料草及び飼料双子葉植物）；脂肪種子作物植物（例えば綿、ペニバナ、ヒマワリ、ダイズ、カノーラ、菜種、アマ、落花生及びギニアアブラヤシ）；木の実（例えばクルミ、カシュー、ヘイゼルナッツ、ペカン、アーモンドなど）；サトウキビ、ココナッツ、ナツメヤシ、オリーブ、サトウダイコン、茶及びコーヒー；材木、またはパルプ産生用材木；マメ科植物（例えば、豆、エンドウ、レンズ豆、アルファルファ、南京豆）、レタス、アスパラガス、アーティチョーク、セロリ、ニンジン、ラディッシュ、アブラナ（例えば、キャベツ、ケール、マスタード及び他の葉の多いアブラナ、ブロッコリー、カリフラワー、芽キャベツ、カブ、コールラビ）、食用ウリ科植物（例えば、キュウリ、メロン、夏カボチャ、冬カボチャ）、食用ネギ属植物（例えば、タマネギ、ニンニク、ニラネギ、エシャロット、エゾネギ）、食用ナス科材（例えば、トマト、ナス、ジャガイモ、ペッパー、ホオズキ）、及び食用アカザ科材（例えば、ビート、フダンソウ、ハウレンソウ、キノア、アマランス）などの野菜作物植物；リンゴ、西洋ナシ、かんきつ類（例えば、オレンジ、ライム、レモン、グレープフルーツなど）などの果実作物植物、石果（例えば、アプリコット、桃、深紫、ネクタリン）、バナナ、パイナップル、ブドウ、キウイ、パパイア、アボカド、及びベリー；バイオマスまたはは生物燃料用植物（例えば、ススキ草、スイッチグラス、ジャトロファ属、ギニアアブラヤシ、真核生物微細藻類（例えば *Botryococcus braunii*、クロレラ種及び *Dunaliella* 種）、及び真核生物大藻類（例えばオゴノリ種、及びホンダワラ種類）；並びに観賞用顕花植物、観賞樹及び灌木などの観賞植物、観賞用地被植物、並びに観賞用草が挙げられる。

【0229】

本発明は更に、収穫された葉、塊根、茎頂、塊茎、茎部、果実、種子、または植物の他の部分、荒粉、油、抽出物、発酵物若しくは消化物、植物の粉碎穀粒若しくは種子または全穀粒若しくは種子、または本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、または種子から産生される商品生産物など任意の食品若しくは非食品など、本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、または種子から産生される商品生産物を提供する。本明細書で意図される1つ以上の商品若しくは商品生産物中で本発明の組換え型DNA構造体の1つ以上の核酸配列を検出するには、商品若しくは商品生産物が本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、または種子を含むか、または本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、または種子から誘導されるという事実上のエビデンスである。

【0230】

概して、そのゲノム内に本発明の組換え型DNA構造体を有するトランスジェニック植物は、*Leptinotarsa* 種の侵入に対する耐性の増大を示す。さまざまな実施形態において、例えば、トランスジェニック植物では、追加の形質を付与するために他の組換え型DNAと積層されている本発明の組換え型DNA構造体が発現する場合、トランスジェニック植物は、以下からなる形質の群から選択された、組換え型DNA構造体を有していない植物に対して、少なくとも1つの追加の変更形質を有する：

- (a) 改善された非生物性ストレス耐性、
- (b) 改善された生物性ストレス耐性、
- (c) 変性一次代謝組成物、
- (d) 変性二次代謝組成物、
- (e) 変性微量栄養元素、カロチノイドまたはビタミン組成物、
- (f) 改善された収率、
- (g) 窒素、リン酸塩または他の栄養素を使用するにあたって改善された能力、
- (h) 変性農学的特性、
- (i) 改良された成長特性または生殖特性、及び

(j) 改善された収穫品質、貯蔵品質または加工品質。

【0231】

いくつかの実施形態において、遺伝子導入植物は以下によって特徴づけられる。変性一次代謝（例えば、脂肪酸、油、アミノ酸、タンパク質、糖、または炭水化物）組成物、変性二次代謝（例えば、アルカロイド、テルペノイド、ポリケチド、非リボソームペプチド、及び混合性生合成源の二次代謝産物）組成物、変性微量栄養元素（例えば、鉄、亜鉛）、カロチノイド（例えば、ベータカロチン、リコペン、ルーチン、ゼアキサンチン、若しくは他のカロチノイド及びキサントフィル）、またはビタミン（例えば、トコフェロール）組成物による改善された非生物学的ストレス（例えば、水分欠乏または乾燥、熱、寒冷、非最適栄養素レベル、若しくは塩レベル、非最適光源レベル）への耐性）、または生物学的ストレス（叢生、アレロパシー、若しくは損傷）に対する耐性、改善された収率（例えば、非ストレス条件下での改善された収率、若しくは非生物的ストレス下または非生物学的ストレス下での改善された収率）、窒素、リン酸または又は他の栄養素を使用する改善された能力、改質された農学的特性（例えば、成熟の遅延、老化の遅延、より早期の若しくはより後期の成熟、改善された耐陰性、塊根若しくは柄の倒伏に対する改善された耐性、茎部のグリーンスナップ（green snap）に対する改善された耐性、改質された光周期応答）、改質された成長特性、若しくは生殖特性（例えば、意図的な矮化、例えば、改善されたハイブリッド形成手技において有用な意図的な雄性不稔性、改善された植物性成長速度、改善された発芽、改善された雄性不稔性、または雌性不稔性）、改善された収穫品質、貯蔵または、又は加工品質（例えば、貯蔵中の有害生物に対する改善された耐性、切断に対する改善された耐性、消費者への改善された訴えなど）、または、これらの形質のあらゆる組合せ。

10

20

【0232】

別の実施形態において、トランスジェニック種子またはトランスジェニック植物によって産生された種子は、変性一次代謝（例えば、脂肪酸、油、アミノ酸、タンパク質、糖または炭水化物）組成物、変性第二代謝組成物、変性微量栄養元素、カロチノイドまたはビタミン組成物、改善された収穫品質、貯蔵品質若しくは加工品質またはこれらを組み合わせたものを有する。別の実施形態において、例えば、アレルギー誘発性タンパク質若しくは糖タンパク質のレベルまたは毒性代謝物レベルを低下させるために、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種子の未変性成分のレベルの変化が所望され得る。

30

【0233】

概して、トランスジェニック植物の集団（それぞれ、トランスジェニック植物細胞から再生される）のスクリーニングが行われ、所望の形質を有するトランスジェニック植物に発育するトランスジェニック植物細胞を同定する。トランスジェニック植物のアッセイを行って、例えば、水利用効率の向上、寒冷耐性の向上、収率の上昇、窒素使用効率の向上、種子タンパク質の向上及び種子油の向上など、向上された形質を検出する。スクリーニング方法としては、温室若しくは野外試験での形質の直接スクリーニングまたは代理形質のスクリーニングが挙げられる。このような分析は、植物の化学組成、バイオマス、生理学的性質、または形態学の変化を検出するように指示される。穀類の栄養組成などの化学組成の変化は、種子組成物及びタンパク質、遊離アミノ酸、油、遊離脂肪酸、デンプン、トコフェロールまたは他の栄養素の含量の分析によって検出される。成長またはバイオマス特性の変化は、草高、茎直径、節間長、塊根及び茎頂の乾燥重量、及び（トウモロコシ、イネまたはコムギなどの穀物産生植物）耳部または種子頭の長さ及び直径を測定することによって検出される。生理学的特性の変化は、水欠乏、窒素欠損またはリン酸塩欠損、寒冷または温帯成長条件、病原体または昆虫類の攻撃、光源欠失または植物密度の上昇などの強制ストレス条件でのアッセイなど、ストレス条件に対する応答を評価することにより識別される。他の選択特性としては、開花までの日数、花粉までの日数、果実成熟までの日数、産生される果実または塊茎の品質または量、トウモロコシのシルキングまでの日数、葉の拡張率、葉緑素含量、葉温、植分、実生生育量、節間長、草高、葉齢、葉面積、

40

50

分げつ、支柱根、持久緑、柄の倒伏、茎の倒伏、植物の健全性、不稔性、グリーンスナップ及び有害生物耐性などが挙げられる。加えて、収穫された果実、種子または塊茎の表現型特性は、評価することができる。これには、例えば、トマト及びナスでは、収穫された果実の総数または総重量、またはこうした果実の色、酸度、糖含有量若しくは香り並びにジャガイモでは、収穫された塊茎の総数または総重量及びこれらの塊茎の品質を挙げることができる。

【0234】

本発明の組成物及び方法を用いる特定のアッセイは、ナス科植物（ハイブリッド系または同系のいずれであってもジャガイモ、トマト、ナス及びペッパー）で実施することができる、例えば、コロラドハムシ（幼虫または成虫）に対して改善された耐性を有する植物を同定若しくは選択するために、殺虫剤として有用な所与の組成物の量を決定するため、または有効な処置計画を決定するためにこうしたアッセイは有用である。こうしたアッセイの非限定例としては以下が挙げられる。

【0235】

1回の処置当たり6つの複製を有するトマト植物において、in plantaコロラドハムシ（幼虫または成虫）アッセイを行う。14-14-14肥料6ポンド／立方ヤードを含むReadi-Earthの土壤にビッグチェリートマト植物を接種し、27度、相対湿度50%の生育箱で3週間保持する。アッセイの日、二本鎖RNAは、25ミリリットルの噴霧溶液（20ミリモルリン酸塩緩衝液（pH6.8）、任意により例えば0.2%Silwet L77などの界面活性剤を含む）を所望の濃度に希釈し、トラック噴霧器を用いて15ガロン／エーカで植物に投与する。濃度が高いほど（例えば、100マイクログラム／ミリリットル）は、最初は、ポリヌクレオチドの活性に関するアッセイにて使用可能であり、より低い濃度では（例えば、約0.1から約1マイクログラム／ミリリットル）、さまざまなポリヌクレオチドの相対効果を判定するためのアッセイなど、その後のアッセイにて使用することができる。植物をそれぞれメッシュスリーブを用いて閉じ込め、12匹の新生Leptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ）幼虫を侵入させる。侵入植物は、12～14日間生育箱でインキュベート（27度、50%相対湿度）させる。この周期の最後に、「防除率」として評価される落葉レベルに関して植物を評価し、植物及び土壤から昆虫類を収集し、「成育可能な再生昆虫率」及び「成育可能な再生昆虫の平均重量」を評価する。

【0236】

In plantaコロラドハムシ（幼虫または成虫）アッセイを1回の処理当たり9つの複製を有するジャガイモ植物において、実施する。最も年齢の低い成長から2番目の節未満の角度で茎部を切断することによって、挿し木を成熟大西洋岸トマト植物から作製する。挿し木を発根ホルモン（Rhizopon #1、0.1%IBA）に浸漬し、直後に6ポンド／立方ヤードの14-14-14肥料含有湿潤Readi-Earth土壤に挿入する。挿し木の平坦部分をカバーして、露光を減少させ、密封したプラスチック袋に入れて、湿度を低下させる。次の週にカバーを外して、プラスチック袋から平坦部分を取り除く。草高が6～9インチの植物（通常、挿し木日から3週間）をアッセイ中で使用する。アッセイの日、二本鎖RNAは、25ミリリットルの噴霧溶液（20ミリモルリン酸塩緩衝液（pH6.8）、任意により例えば0.2%Silwet L77などの界面活性剤を含む）を所望の濃度に希釈し、トラック噴霧器を用いて15ガロン／エーカで植物に投与する。濃度が高いほど（例えば、100マイクログラム／ミリリットル）は、最初は、ポリヌクレオチドの活性に関するアッセイにて使用可能であり、より低い濃度では（例えば、約0.1から約1マイクログラム／ミリリットル）、さまざまなポリヌクレオチドの相対効果を判定するためのアッセイなど、その後のアッセイにて使用することができる。植物をそれぞれメッシュスリーブを用いて閉じ込め、6匹の新生Leptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ）幼虫を侵入させる。侵入植物は、12～14日間生育箱でインキュベート（27度、50%相対湿度）させる。この周期の最後に、「防除率」として評価される落葉レベルに関して植物を評価し、植物及び土壤から昆虫類を収集し、「成育可能な再生昆虫率」及び「成育可能な再生昆虫の平均重量」を評価する。

【0237】

以下の実施例は、説明を目的として与えられるものであって、限定するものとして解釈されるべきではない。

実施例

実施例1: *Leptinotarsa* cDNAライブラリの生成

【0238】

以下のとおり、*Leptinotarsa decemlineata* (コロラドハムシ「CPB」) 新生幼虫からcDNAライブラリを生成した。光学LiCL調製法によりAmbionの全RNA単離キット (カタログ番号AM1910, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて、800匹の三齢*Leptinotarsa decemlineata*幼虫 (全身) の全RNAを単離した。ポリA RNAは、Ambion MicroPoly (A) Purist (カタログ番号AM1919, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて単離した。Superscript Double-Stranded cDNA synthesisキット (カタログ番号11917-010, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて、random hexamerキット (カタログ番号12328-032, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて、ランダム化プライムcDNA合成を行った。Margulies et al. (2005) Nature, 437: 376-380に記載されているとおり、市販の454 technology (454 Life Sciences, 15 Commercial St., Branford, CT 06405, USA) を用いて、高性能配列解読によってcDNAライブラリを得た。これにより1, 446, 014の読み値 (平均、長さ350塩基対以上) がもたらされ、公的に入手可能なNCBIの*Leptinotarsa decemlineata*配列データから (8, 835の発現配列タグ配列、150の全長cDNA、839, 061ハイスループットDNA及びRNA得られた配列の読み値など) により捕捉され、合計2294087の組み合わせた読み値が得られた。Newbler (バージョン2. 3) ソフトウェアパッケージ (454 Life Sciences, 15 Commercial St., Branford, CT 06405, USA) を用いて、アセンブルした配列データを新規のコンティグにアセンブリングした。約38, 164のアセンブルコンティグは、配列データから同定した。

実施例2: 低コピー標的遺伝子の選択

【0239】

RNAi-媒介サイレンシングに有効な標的を予測した*Leptinotarsa*標的遺伝子配列を以下のように同定した。低コピー遺伝子及び特に単一のコピー遺伝子は、パラログによって再利用される機能を有する可能性がないため、RNAi-媒介サイレンシング用遺伝子として選択した。公的データベース (cegg. unigene. ch/orthodb6にて閲覧可能。及びWaterhouse et al. (2012) Nucleic Acids Res., PMID: 23180791; doi: 10. 1093/nar/gks1116に記載) のオルソログ遺伝子OrthoDB6を濾過し、コクヌストモドキ (甲虫類種) の単一コピーまたは低コピーである766の遺伝子のサブセット並びにデータベース内のすべての入手可能な節足動物遺伝子内の単一コピーまたは低コピー (本明細書が出願された時点で33個の他の節足動物ゲノムが得られた) を選択した。*Tribolium castaneum*は甲虫種であり、このため、*Leptinotarsa*にかなり関連して、また、単一コピー遺伝子または低コピー遺伝子が*Tribolium castaneum*のゲノムデータベースに存在する可能性が高くなり、また、*Leptinotarsa decemlineata*ゲノム、2つの有機体で少なくとも高配列相同性遺伝子において、単一コピー遺伝子または低コピー遺伝子である。*Leptinotarsa decemlineata* (コロラドハムシ、CPB) 配列決定及び実施例1に記載のアセンブリから得た38, 164個のunigeneから、翻訳ヌクレオチドBLAST search (tblastx) を用いて、OrthoDBデータベースにおいて766個の単一コピーまたは低コピー*Tribolium castaneum*遺伝子に対して高い配列相同性 (有意性または 1×10^{-15} 以下のe値) を有する遺伝子として、725個の遺伝子のサブセットを同定した。

【0240】

配列のアノテーションとして、NCBIのBlastall 2. 2. 21ソフトウェアを用いて、Smart Blast annotationを実施し、公的に閲覧可能なuniref90. fasta database (ftp. uniprot. org/pub/databases/uniprot/current_release/uniref/uniref90/) にて*Leptinotarsa decemlineata*コンティグを検索した。Blastxモードでblast searchを実施した (uniref90タンパク質データベースに対して翻訳*Leptinotarsa decemlineata*ヌクレオチドクエリを検索した)。E値が $9e-9$ 以下のblastヒットでのみ保持された。各*Leptinota*

rsa decemlineataコンティグでは、uniref90ベストヒットの記述行をアノテーションとして用いた。SmartBlastヒットが見つからなかった場合、この配列は、補足的Pfam searchを行った。これを行うために、各Leptinotarsa decemlineataコンティグについて最も長い開いた読み枠（ORF）を同定し、公的に閲覧可能なPfam-Aデータベース（ftp. sanger. ac. uk/pub/databases/Pfam/current_release）公的に入手可能なHMMER3. 0ソフトウェアパッケージ（hmm. janelia. org/）でクエリを実行するために使用した。E値1e〜5以下のPfamヒットのLeptinotarsa decemlineataコンティグについて、タンパク質ファミリー名及びPfam識別子を用いてアノテーションした。SmartBlast若しくはPfamヒットのいずれも有さないLeptinotarsa decemlineataコンティグは、「新規タンパク質」としてアノテーションした。

10

【0241】

上記のとおり、単一コピーまたは低コピーTribolium castaneum遺伝子に対して高い配列相同性を有するとして同定されている725個のLeptinotarsa decemlineata遺伝子は、配列番号：1〜725として提供され、各遺伝子は、Tribolium castaneum配列及び／若しくはOrthoDB配列に対する配列相同性に基づいて、または保存されたPfamドメインによってアノテーションした。各Leptinotarsa decemlineata遺伝子については、各対に対して相同性e値と共に、相同性Tribolium castaneum遺伝子もアノテーション中に同定する。

実施例3：Leptinotarsa標的遺伝子の選択

【0242】

RNAi-媒介サイレンシングによるLeptinotarsa種の防除に有用な標的遺伝子に対応するcDNA配列は、Leptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ、CPB）配列決定及び実施例1に記載のアセンブリより得られた配列から選択された。このcDNA配列のサブセットまたは標的遺伝子は、配列番号：726〜830に提供される。類似配列は、本明細書で参照される任意の他のLeptinotarsa種より得ることができることが認識される。

20

実施例4：「タイリング」によるポリヌクレオチドトリガーの選択

【0243】

トランスジェニック植物中に発現させるため、またはトランスジェニック植物若しくは非トランスジェニック植物の表面への局所投与用の組成物中に使用するためのポリヌクレオチドトリガーの選択方法の一非限定的実施例としては、全遺伝子（若しくは全長基準配列）タイリングアレイ法を用いる、有効なポリヌクレオチド配列（または配列のセグメント）のマッピングが挙げられる。配列番号：1〜725及び配列番号：726〜830及び配列番号：1087〜1094から選択される配列は、選択される標的配列の全体の長さに沿って、「タイリング」配列または200〜300の近接ヌクレオチドのセグメントに分割される。タイリング配列は、選択された配列の重なりのない近接セグメントであるように、または選択された配列の近接セグメントにおいて約18、19、20、21、22、23、24または25のヌクレオチドが重なり合うように設計され得る。各200〜300のヌクレオチドタイリング配列（センス配列、アンチセンス配列、またはセンス配列及びアンチセンス配向の両方）に対応するポリヌクレオチドトリガーは、有効なスクリーニングを行うために合成される。

30

【0244】

Leptinotarsa種の標的遺伝子のサイレンシングに有効な任意の便利な方法によって、ポリヌクレオチドトリガーの試験を行う。好適な試験の例としては、実施例5及び実施例6に記載されているような食餌バイオアッセイである。別の公的な試験としては、直接Leptinotarsa個体へ、またはLeptinotarsa種の侵入から保護する植物の表面へのポリヌクレオチドトリガーの局所投与が挙げられる。ポリヌクレオチドトリガーを用いた処置による1つの所望の結果は、これに限定されないが、例えば、成長の阻害、死亡率の上昇、生殖能力の低下、摂食行動若しくは摂食動作の減少若しくは停止、または変態段階の発生の減少若しくは停止など、Leptinotarsa昆虫中に生理学的変化または挙動の変化を引き起こすことによるLeptinotarsa種の侵入の保護または防除である。ポリヌクレオチドトリガーによる処置の別の所望の結果としては、Leptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ、CPB）または他のLeptinotarsa種による侵入に対して改善された耐性を示すジャガイモ植物、ト

40

50

マト植物、ナス植物またはペッパー植物など、*Leptinotarsa*種の侵入に対する改善された耐性を示すナス科植物を提供することである。ポリヌクレオチドトリガーは、まとめてスクリーニングしてもよい。例えば、5つの個々のポリヌクレオチドトリガーのセットは、1つのポリヌクレオチド組成物に貯留し、植物に局所投与される。次いで、良好な有効性を示すこれらのセットは、有効性に関する個々の成分ポリヌクレオチドトリガーの試験によって更にスクリーニングされる。

【0245】

タイリング法は、所望の場合、反復して行うことができる。所望の活性を付与することが明かであるポリヌクレオチドトリガーは、それ自体タイリングすることができる。親ポリヌクレオチドトリガーは、親ポリヌクレオチドトリガーの長さに沿って更に小さい重なりセグメントまたは非重なりセグメントに分割される。例えば、親ポリヌクレオチドトリガーは、親ポリヌクレオチドトリガーの全長に沿って長さ50~60のヌクレオチドのセグメントに分割される。各50~60のヌクレオチドタイリング配列（センス配向、アンチセンス配向、またはセンス配向及びアンチセンス配向の両方）によるポリヌクレオチドトリガーは、有効なスクリーニングを行うために合成される。タイリング解析の追加の切り捨てを行うことができ、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドほどの短いトリガーの試験を行う。

【0246】

任意のサイズの有効なポリヌクレオチドトリガーを使用して、局所投与用組成物またはトランスジェニック植物の産生に有用な組換え型DNA構造体を産生する。

実施例5

【0247】

この実施例では、ポリヌクレオチドトリガーの*Leptinotarsa*防除効率の評価に有用な非限定的アッセイを示す。更に具体的には、この実施例は、*Leptinotarsa*標的遺伝子（例えば、標的遺伝子配列群から選択される標的遺伝子または配列番号：1~725及び配列番号：726~830及び配列番号：1087~1094またはそれらのDNA補体からなる群から選択されるDNA配列を有する標的遺伝子）の少なくとも21の近接ヌクレオチドに相補的であるヌクレオチド配列を含む二本鎖RNAトリガー及びこれらのdsRNAトリガーの*Leptinotarsa*防除有効性の評価に有用なバイオアッセイを示す。

【0248】

長さ約50~約500塩基対（更に具体的には、約100~約450塩基対）のトリガーは、*Leptinotarsa*標的遺伝子として設計した（実施例2及び実施例3を参照されたい）。表1に列挙した標的遺伝子に関して、配列番号：831~1085に提供されるアンチセンス鎖配列を有する平滑末端化二本鎖RNA（dsRNA）を産生した。

【0249】

ポリヌクレオチドトリガーの接触または摂取による*Leptinotarsa decemlineata*幼虫の死滅率または阻害を分析する以下の方法論を用いて、*Leptinotarsa*標的遺伝子の抑制に関するdsRNAトリガー（表1）の試験を行った。コロラドハムシ（CPB）、*Leptinotarsa decemlineata*を用いるバイオアッセイは、寒天1リットル当たり13.2グラム（Serva11393）、Bio-Serve pre-mix（F9380B）1リットル当たり140.3グラム、KOHリットル当たり5ミリリットル（18.3%w/w）及びホルマリン1リットル当たり1.25ミリリットル（37%）から構成される人工食餌を用いて行った。食餌を、96ウェルプレートで200マイクロリットルアリコートに分取し、サンプル投与前に短時間で乾燥させた。試験サンプルの20マイクロリットルを未処置対象（UTC）として機能する滅菌水と共に各ウェルに入れた。プレートは、昆虫類の幼虫を加える前に乾燥させた。微細な塗装ばけを用いて、1匹の新生CPB幼虫を各ウェルに入れた。プレートをマイラー（Mylar）で密閉し、昆虫ピンを用いて通気させた。1回の処理に対して32匹の幼虫の試験を行った。バイオアッセイプレートは、27℃、相対湿度60%で、10~12日間、完全な暗所にてインキュベートした。幼虫の阻害及び死滅に関して、プレートの採点を行った。JMP（著作権）4統計ソフトウェア（SAS Institute, 1995）を用いてデータを解析し、Dunnet検定により要因ANOVAを行い、未処理対照

10

20

30

40

50

群 ($P < 0.05$) と比較して処理効果を求めた。Tukey-Kramer post hoc検定を行い、処理群の全塩基対 ($P < 0.05$) を比較した。この結果を表1に示す。

【表 1 - 1】

表1

配列番号*	標的遺伝子	標的遺伝子の配列番号	CPB食餌バイオアッセイ結果**	dsRNA濃度 (ppm)	エクソン番号
831	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	(+)	0.1	1
832	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	(-)	0.1	1
833	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	(-)	0.1	1
834	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	(-)	0.1	1
835	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	(-)	0.1	2
836	アクチン	821	(-)	0.1	1
837	アクチン	821	(-)	0.1	1
838	アクチン	821	(-)	0.1	1
839	アクチン	821	(-)	0.1	1
840	アクチン	821	(-)	0.1	1
841	コートマーサブユニット β	822	(-)	0.1	1
842	コートマーサブユニット β	822	(+)	0.1	1
843	コートマーサブユニット β	822	NT	0.1	1
844	コートマーサブユニット β	822	NT	0.1	1
845	コートマーサブユニット β	822	(-)	0.1	1
846	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(-)	0.1	1
847	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(-)	0.1	1
848	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(-)	0.1	1
849	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(+)	0.1	1
850	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(-)	0.1	2?

10

20

30

40

【表 1 - 2】

851	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	(-)	0.1	1
852	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	(-)	0.1	1
853	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	NT	0.1	2?
854	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	NT	0.1	1
855	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	NT	0.1	1
856	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	(-)	0.1	1
857	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	(-)	0.1	1
858	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	NT	0.1	1
859	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	NT	0.1	1
860	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	NT	0.1	1
861	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	(-)	0.1	1
862	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	(-)	0.1	1
863	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	NT	0.1	1
864	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	NT	0.1	1
865	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	NT	0.1	1

10

20

30

40

【表 1 - 3】

866	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(-)	0.1	1
867	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(-)	0.1	2?
868	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(-)	0.1	2
869	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(-)	0.1	1
870	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(-)	0.1	1
871	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	(-)	0.1	1
872	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	NT	0.1	2
873	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	NT	0.1	1
874	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	NT	0.1	1
875	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	NT	0.1	1
876	26Sプロテアーゼ調節サブユ ニット8	811	NT	0.1	1
877	26Sプロテアーゼ調節サブユ ニット8	811	NT	0.1	1
878	26Sプロテアーゼ調節サブユ ニット8	811	NT	0.1	2?
879	26Sプロテアーゼ調節サブユ ニット8	811	(-)	0.1	1
880	26Sプロテアーゼ調節サブユ ニット8	811	(-)	0.1	1
881	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	NT	0.1	2
882	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	NT	0.1	1
883	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	(-)	0.1	1

10

20

30

40

【表 1 - 4】

884	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	(-)	0.1	1
885	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	(-)	0.1	1
886	推定未同定タンパク質	813	NT	0.1	1
887	推定未同定タンパク質	813	NT	0.1	1
888	推定未同定タンパク質	813	(-)	0.1	1
889	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	NT	0.1	1
890	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	NT	0.1	1
891	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	(-)	0.1	1
892	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	(-)	0.1	1
893	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	NT	0.1	1
894	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	NT	0.1	1
895	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	NT	0.1	1
896	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	NT	0.1	1
897	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	NT	0.1	2?
898	Sec24タンパク質、推定	816	(+)	0.1	2
899	Sec24タンパク質、推定	816	(-)	0.1	2?
900	Sec24タンパク質、推定	816	(-)	0.1	2?
901	Sec24タンパク質、推定	816	(-)	0.1	2?
902	Sec24タンパク質、推定	816	(-)	0.1	1

10

20

30

40

【表 1 - 5】

903	タンパク質輸送タンパク質S ec24B	817	(-)	0.1	1
904	タンパク質輸送タンパク質S ec24B	817	(-)	0.1	1
905	タンパク質輸送タンパク質S ec24B	817	(-)	0.1	1
906	タンパク質輸送タンパク質S ec24B	817	(-)	0.1	1
907	タンパク質輸送タンパク質S ec24B	817	(-)	0.1	1
908	タンパク質輸送タンパク質se c31A	818	(-)	0.1	1
909	タンパク質輸送タンパク質se c31A	818	(-)	0.1	1
910	タンパク質輸送タンパク質se c31A	818	(+)	0.1	1
911	タンパク質輸送タンパク質se c31A	818	(-)	0.1	2?
912	タンパク質輸送タンパク質se c31A	818	(-)	0.1	1
913	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	(-)	0.1	1
914	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	(-)	0.1	1
915	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	NT	0.1	2
916	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	NT	0.1	1
917	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	NT	0.1	1
918	タンパク質輸送タンパク質se c13	820	(-)	0.1	2
919	タンパク質輸送タンパク質se c13	820	(-)	0.1	1
920	タンパク質輸送タンパク質se c13	820	(-)	0.1	1
921	タンパク質輸送タンパク質se c13	820	(-)	0.1	1
922	リボソームタンパク質L13A	741	NT	1.0	2
923	リボソームタンパク質L13A	741	NT	1.0	2
924	60Sリボソームタンパク質L5	728	NT	1.0	2

10

20

30

40

【表 1 - 6】

925	60Sリボソームタンパク質L5	728	(+)	1.0	2?
926	リボソームタンパク質S7	776	NT	1.0	1
927	リボソームタンパク質S7	776	(-)	1.0	1
928	リボソームタンパク質L9	735	(+)	1.0	2
929	リボソームタンパク質L9	735	NT	1.0	1
930	リボソームタンパク質L3	726	NT	1.0	2
931	リボソームタンパク質L3	726	(+)	1.0	2
932	60Sリボソームタンパク質L3 2	755	(+)	1.0	3
933	リボソームタンパク質L8	734	NT	1.0	2
934	リボソームタンパク質L8	734	NT	1.0	2
935	リボソームタンパク質S15	785	NT	1.0	2
936	リボソームタンパク質S15	785	NT	1.0	2
937	リボソームタンパク質L7A	732	(+)	1.0	3
938	リボソームタンパク質L7A	732	(+)	1.0	3
939	40Sリボソームタンパク質S1 4	784	NT	1.0	2
940	40Sリボソームタンパク質S1 4	784	(+)	1.0	2
941	40Sリボソームタンパク質S2 4	796	(+)	1.0	2?
942	60Sリボソームタンパク質L1 0A	737	(+)	1.0	1
943	リボソームタンパク質L13	740	(+)	1.0	1
944	リボソームタンパク質L13	740	(+)	1.0	1
945	リボソームタンパク質S13	783	(+)	1.0	3
946	リボソームタンパク質S13	783	NT	1.0	2
947	リボソームタンパク質L4e	727	(+)	1.0	3
948	リボソームタンパク質L4e	727	(+)	1.0	2
949	リボソームタンパク質S30	803	(+)	1.0	2
950	リボソームタンパク質S30	803	(+)	1.0	2
951	リボソームタンパク質L26	749	(+)	1.0	2?
952	リボソームタンパク質L26	749	(+)	1.0	2?
953	リボソームタンパク質L31	754	NT	1.0	3
954	60Sリボソームタンパク質L1 0	736	NT	1.0	2

10

20

30

40

【表 1 - 7】

955	60Sリボソームタンパク質L10	736	(+)	1.0	2
956	リボソームタンパク質S4	772	(+)	1.0	3
957	リボソームタンパク質S4	772	(+)	1.0	2
958	リボソームタンパク質L11e	738	(+)	1.0	2
959	リボソームタンパク質S6	774	(-)	1.0	1
960	リボソームタンパク質S11	782	(+)	1.0	3
961	リボソームタンパク質S11	782	(+)	1.0	3
962	リボソームタンパク質S11	781	NT	1.0	3
963	リボソームタンパク質S11	781	NT	1.0	3
964	リボソームタンパク質L12e	739	(+)	1.0	2
965	リボソームタンパク質L12e	739	NT	1.0	2
966	リボソームタンパク質S5	773	(+)	1.0	2
967	リボソームタンパク質S5	773	(+)	1.0	3
968	リボソームタンパク質S18	790	(+)	1.0	2
969	リボソームタンパク質S18	790	(+)	1.0	2
970	リボソームタンパク質L23A	747	(+)	1.0	2
971	リボソームタンパク質L23A	747	(+)	1.0	2
972	リボソームタンパク質L35A	759	NT	1.0	1
973	リボソームタンパク質L35A	759	(+)	1.0	2
974	リボソームタンパク質L21	746	NT	1.0	2?
975	リボソームタンパク質L21	746	NT	1.0	2?
976	リボソームタンパク質L21	745	(+)	1.0	1
977	リボソームタンパク質L21	745	(-)	1.0	2?
978	リボソームタンパク質S8	777	(+)	1.0	2
979	リボソームタンパク質S8	777	(+)	1.0	3
980	リボソームタンパク質S16	788	NT	1.0	1
981	リボソームタンパク質S16	799	NT	1.0	2
982	リボソームタンパク質L18Ae	744	(+)	1.0	2
983	リボソームタンパク質S6	775	(+)	1.0	1
984	リボソームタンパク質S3	768	NT	1.0	2
985	リボソームタンパク質S3	768	(+)	1.0	2
986	リボソームタンパク質S17	789	NT	1.0	2
987	リボソームタンパク質S15A	786	(+)	1.0	2
988	リボソームタンパク質L7	730	(+)	1.0	2?
989	リボソームタンパク質L7	730	(+)	1.0	2

10

20

30

40

【表 1－8】

990	リボソームタンパク質S4	771	NT	1.0	2
991	リボソームタンパク質S4	771	(+)	1.0	2
992	40Sリボソームタンパク質S3A	769	(+)	1.0	1
993	40Sリボソームタンパク質S3A	769	NT	1.0	1
994	リボソームタンパク質L36	760	(+)	1.0	1
995	リボソームタンパク質L37	762	(+)	1.0	2
996	リボソームタンパク質L37	763	(+)	1.0	2
997	リボソームタンパク質S19	792	(+)	1.0	1
998	リボソームタンパク質S19	792	NT	1.0	1
999	リボソームタンパク質S19	792	(+)	1.0	1
1000	リボソームタンパク質S20	794	NT	1.0	1
1001	リボソームタンパク質L15	743	NT	1.0	2
1002	リボソームタンパク質L35A	758	NT	1.0	1
1003	リボソームタンパク質L35A	758	NT	1.0	1
1004	40Sリボソームタンパク質S21	795	NT	1.0	3
1005	リボソームタンパク質S29	802	NT	1.0	1
1006	リボソームタンパク質S8	778	(+)	1.0	1
1007	40Sリボソームタンパク質S3A	770	(+)	1.0	1
1008	リボソームタンパク質L24	748	(+)	1.0	2
1009	リボソームタンパク質S16	787	(+)	1.0	2
1010	リボソームタンパク質L7A	733	(+)	1.0	1
1011	40Sリボソームタンパク質S9	780	NT	1.0	2
1012	40Sリボソームタンパク質SA	804	NT	1.0	1
1013	40Sリボソームタンパク質SA	804	(+)	1.0	1
1014	リボソームタンパク質L37Ae	764	(－)	1.0	2?
1015	60Sリボソームタンパク質L23	797	NT	1.0	1
1016	リボソームタンパク質L7	731	NT	1.0	2
1017	リボソームタンパク質L36	761	NT	1.0	1
1018	40Sリボソームタンパク質S9	779	(+)	1.0	2?
1019	リボソームタンパク質S26	798	(+)	1.0	3
1020	リボソームタンパク質L34A	756	(+)	1.0	2

10

20

30

40

【表 1 - 9】

1021	リボソームタンパク質L27Ae	751	NT	1.0	1
1022	リボソームタンパク質L27Ae	751	(+)	1.0	1
1023	40Sリボソームタンパク質S28	801	(-)	1.0	2?
1024	リボソームタンパク質L29	753	(-)	1.0	3
1025	リボソームタンパク質L28	752	(+)	1.0	4
1026	リボソームタンパク質L28	752	NT	1.0	4
1027	リボソーム生合成タンパク質RLP24	765	NT	1.0	2
1028	リボソーム生合成タンパク質RLP24	765	(-)	1.0	1
1029	リボソームタンパク質L27	750	(+)	1.0	2
1030	リボソームタンパク質L27	750	(+)	1.0	2
1031	39Sリボソームタンパク質L13	766	(-)	1.0	3
1032	39Sリボソームタンパク質L13	766	(-)	1.0	3
1033	リボソームタンパク質S2	767	(+)	1.0	1
1034	40Sリボソームタンパク質S28	800	(-)	1.0	2?
1035	リボソームタンパク質L14	742	(+)	1.0	2
1036	リボソームタンパク質L6	729	(+)	1.0	2
1037	コートマーサブユニット β	822	(+)	1.0	2
1038	コートマーサブユニット γ	828	(+)	1.0	2
1039	ミオシンVIIa	824	(+)	1.0	2
1040	ミオシンVIIa	823	(+)	1.0	1
1041	アクチン	821	(+)	1.0	1
1042	26Sプロテアソーム非ATPase調節サブユニット1	826	(+)	1.0	2
1043	26Sプロテアソーム非ATPase調節サブユニット1	825	(+)	1.0	2
1044	首曲がり	830	NT	1.0	1
1045	首曲がり	829	(+)	1.0	2
1046	予測された推定タンパク質	827	(+)	1.0	2
1047	26Sプロテアソーム非ATPase調節サブユニット2	805	(+)	1.0	2

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

1048	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット、推定	806	(-)	1.0	2
1049	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	(+)	1.0	1
1050	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	(+)	1.0	2
1051	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	NT	1.0	2
1052	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	(-)	1.0	3
1053	26Sプロテアーゼ調節サブユニット8	811	(+)	1.0	3
1054	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	(+)	1.0	3
1055	推定未同定タンパク質	813	(-)	1.0	2
1056	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	(-)	1.0	2
1057	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	(-)	1.0	2?
1058	Sec24タンパク質、推定	816	(+)	1.0	2
1059	タンパク質輸送タンパク質Sec24B	817	(-)	1.0	1
1060	タンパク質輸送タンパク質Sec31A	818	(+)	1.0	2
1061	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	(+)	1.0	2
1062	タンパク質輸送タンパク質Sec13	820	(-)	1.0	2?
1063	Sec24Bタンパク質	817	(-)	1.0	1
1064	コートマーサブユニット β	822	(+)	1.0	2
1065	コートマーサブユニット γ	828	(+)	1.0	2
1066	ミオシンVIIa	824	(+)	1.0	2
1067	ミオシンVIIa	823	(+)	1.0	2
1068	アクチン	821	(+)	1.0	1

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

1069	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット1	825	NT	1.0	2
1070	首曲がり	829	(+)	1.0	2
1071	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	805	(-)	1.0	2
1072	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット12	806	(-)	1.0	2
1073	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	(+)	1.0	1
1074	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	(+)	1.0	2
1075	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット2	809	(+)	1.0	2
1076	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット4	810	(-)	1.0	2
1077	26Sプロテアーゼ調節サブユニット8	811	(+)	1.0	3
1078	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	(+)	1.0	3
1079	ADP-リボシル化因子GTPase-活性化タンパク質、推定	814	(-)	1.0	2
1080	ゴルジ特異的ブレフェルジンA-耐性グアニンヌクレオチド交換因子、推定	815	(+)	1.0	1
1081	Sec24タンパク質、推定	816	(+)	1.0	1
1082	タンパク質輸送タンパク質Sec24B	817	(+)	1.0	1
1083	タンパク質輸送タンパク質Sec31A	818	(-)	1.0	1
1084	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	(+)	1.0	1
1085	タンパク質輸送タンパク質Sec13	820	(+)	1.0	1

* dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

** (+) 水処理対照と比較して有意な阻害または死滅率、(-) 水処理対照と比較して有意でない阻害または死滅率、NT = (1) トリガーについては試験を行っていない、または (2) 以下のいずれも発生：当該試験において、サンプルでは、有意な阻害／死滅がもたらされなかった。及び陽性対照では、有意な阻害／死滅がもたらされなかった。本アッセイで使用した陽性対照は、以前、米国特許明細書第7, 943, 819号で配列番号：880として開示されているとおり、βコアトマーを標的にし、配列番号：1086のセンス鎖配列を有するdsRNAトリガーであった。

【0 2 5 0】

入手可能なゲノム配列データが認可される場合、所与のトリガー配列によってスパンされたエクソンの数を測定して、表1に記載している：「1」はトリガー配列が1つの近接ゲノム遺伝子座内に含有されと考えられることを示し、「2?」は、トリガー全長がゲノムに整列するものではないことを示し、少なくとも40の塩基対が欠失し、これにより、利用可能なゲノム配列データの不完全性が示され得る。

【0251】

Leptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ、CPB）エクソシスト複合対のサブユニットコードする追加のcDNA配列をLeptinotarsa標的遺伝子としての別の配列決定プロジェクト及びアセンブリプロジェクトから同定した。これらのLeptinotarsaエクソシスト標的遺伝子、配列番号：1087～1094は、エクソシスト標的遺伝子に相補的な少なくとも21の近接ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドトリガーの設計に有用であり、並びにLeptinotarsa種の侵入の防除及びLeptinotarsa種の侵入への耐性のためにこうしたポリヌクレオチドトリガーを発現させるトランスジェニック植物の産生に有用である。

【0252】

Leptinotarsaエクソシスト標的遺伝子（配列番号：1087～1094）のそれぞれに対して、実施例4に示すとおり、長さ約50～約500塩基対の間（更に具体的には、約100～約450塩基対の間）のトリガーを設計する。表1のポリヌクレオチドに関して前述であるものと同じ方法論を用いて、これらのトリガーの試験を行う。

【0253】

非限定的実施例では、ポリヌクレオチドトリガーは、Leptinotarsa decemlineata Exo70遺伝子（配列番号：1093）を標的にするように設計され、配列番号：1095のアンチセンス鎖配列を有する平滑末端化二本鎖RNAとして産生された。このトリガーにより、上述の方法論を用いたいずれの試験濃度でも有意な阻害及び有意な死滅がもたらされた。この結果を表2に示す。

【表2】

表2

配列番号*	トリガー長 (bp)	標的遺伝子	配列番号標的 遺伝子	CPB食餌 バイオ アッセイ結果*	dsRNA濃度 (ppm)
1095	277	Exo70	1093	(+)	0.1
1095	277	Exo70	1093	(+)	0.033

*dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

**（+）水処理対照と比較して有意な阻害または死滅率、（-）水処理対照と比較して有意でない阻害または死滅率、NT＝（1）トリガーについては試験を行っていない、または（2）以下のいずれも発生：当該試験において、サンプルでは、有意な阻害／死滅がもたらされなかった。及び陽性対照では、有意な阻害／死滅がもたらされなかった。本アッセイで使用した陽性対照は、以前、米国特許明細書第7,943,819号で配列番号：880として開示されているとおり、βコアトマーを標的にし、配列番号：1086のセンス鎖配列を有するdsRNAトリガーであった。

実施例6

【0254】

この例では、本発明のポリヌクレオチドの非限定的実施形態、Leptinotarsa種を防除するための殺虫性組成物、及びこうしたポリヌクレオチドのLeptinotarsa防除効果の評価に有用な代理アッセイを示す。

【0255】

ポリヌクレオチドトリガーの接触または摂取によるLeptinotarsa decemlineata幼虫の死滅または阻害を解析するために、以下の葉片方法論を用いて、Leptinotarsa標的遺伝子を抑制するための5つのdsRNAトリガー（配列番号：989、1049、1050、1078及び1084のアンチセンス鎖配列を有する、表1を参照されたい）の試験を行った。

【0256】

成虫を用いる葉片バイオアッセイについては、新規発生コロラドハムシ（CPB、Leptino

10

20

30

40

50

tarsa decemlineata) 成虫を収集して、最長7日間ジャガイモ葉に保持し、その後、バイオアッセイを始める前に6～8時間絶食させた。1回の処理当たり15匹の成虫（トリガー／用量）を用いた。0.1%Silwet L77溶液／UltraPure water (Invitrogen) 中にdsRNAトリガーを250、83.3、27.8、または9.3ナノグラム含有している10マイクロリットルを直径15ミリメートルのジャガイモ（アトランティック種）の葉片に投与し、防除葉片は、配合物0.1%Silwet L77溶液または緑色蛍光タンパク質（GFP）をサイレンシングするために設計された陰性対照トリガーのいずれかで処理した。処理した葉片は、それぞれ、凝固2%寒天／蒸留水基質2ミリリットル／ウェルの入った6ウェルクラスタープレートに入れた。一匹のCPB成虫を各ウェルに入れて、一晩インキュベートし、葉片を消費させ、葉片が完全に消費されなかった場合、昆虫が死滅するか、または取り扱いによる損傷する可能性が高く、アッセイから除外した。次の日、所与のトリガー／用量で処理したCPB成虫はまとめて、その床にろ紙を並べ、鮮度を保つために水の入ったチューブに挿入された茎部の付いたジャガイモ葉（アトランティック種）を含有したカバー付通気半透明プラスチック容器（16オンス）から構成される給餌アリーナに移した。昆虫は、必要に応じて補充されるジャガイモ葉の入った環境チェンバ（27℃、60%相対湿度、16時間露光／8時間暗所）で給餌アリーナでインキュベートした。昆虫の生存度を毎日観察した。昆虫を活性（生存）、死滅しかけている（その背部に置いた10秒後、脚に戻らない）または死滅として記録した。生存度結果を表3に示す。

【表3－1】

表3

処理	CPB標的遺伝子の 配列番号	処理後日数								
		5	6	7	8	9	10	12	14	16
配合物－1	n/a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
配合物－2	n/a	93	93	93	93	93	93	86	86	86
配列番号1115, GFP－1	n/a	100	100	100	100	100	100	80	80	60
配列番号1115, GFP－2	n/a	93	93	87	87	80	80	80	80	80
配列番号989*, 2 50 ng	730	87	87	80	33	0	0	0	0	0
配列番号989*, 8 3 ng	730	100	100	79	43	29	7	0	0	0
配列番号989*, 2 8 ng	730	100	100	80	47	27	0	0	0	0
配列番号989*, 9 ng	730	93	93	73	60	33	0	0	0	0
配列番号1049*, 250 ng	807	40	13	0	0	0	0	0	0	0
配列番号1049*, 83 ng	807	80	7	7	7	0	0	0	0	0
配列番号1049*, 28 ng	807	80	13	13	13	13	7	13	7	7

【表 3 - 2】

配列番号1049*, 9 ng	807	87	73	60	60	60	60	53	53	53
配列番号1050*, 250 ng	808	60	13	0	0	0	0	0	0	0
配列番号1050*, 83 ng	808	60	20	0	0	0	0	0	0	0
配列番号1050*, 28 ng	808	86	29	29	14	14	14	14	14	14
配列番号1050*, 9 ng	808	80	60	60	53	53	53	47	40	40
配列番号1078*, 250 ng	812	67	27	20	0	0	0	0	0	0
配列番号1078*, 83 ng	812	60	13	7	7	7	7	7	7	7
配列番号1078*, 28 ng	812	73	33	20	13	13	13	13	13	13
配列番号1078*, 9 ng	812	100	80	80	67	60	60	53	47	47
配列番号1084*, 250 ng	819	33	0	0	0	0	0	0	0	0
配列番号1084*, 83 ng	819	73	33	7	0	0	0	0	0	0
配列番号1084*, 28 ng	819	73	40	33	33	33	33	20	20	20
配列番号1084*, 9 ng	819	80	60	53	53	53	53	47	47	40

*他に記載がない限り、dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

「配合物-1」及び「配合物-2」は、ヌル対照群（0.1%Silwet/水）の複製物である。「GFP-1」及び「GFP-2」は、緑色蛍光タンパク質（GFP）を標的にし、配列番号：1115のセンス鎖配列を有する377bpのdsRNAトリガーを用いる陰性対照の複製物である。「n/a」=該当なし。

【0257】

幼虫を用いた葉片バイオアッセイについては、バイオアッセイの24時間以内に孵化させた新生コロラドハムシ（CPB, *Leptinotarsa decemlineata*）幼虫を使用した。1回の処理当たり幼虫16匹（トリガー/容量）を使用した。0.1%Silwet L77溶液/UltraPure water（Invitrogen）中のdsRNAトリガー250、83、3、27、8または9.3ナノグラムを含む2マイクロリットルを直径7ミリメートルのジャガイモ（アトランティック種）葉片に投与し、配合0.1%Silwet L77溶液、または緑色蛍光タンパク質（GFP）のサイレンシングを行うために設計された陰性対照トリガーのいずれかで対照葉片を処理した。処理済み葉片は、それぞれ、凝固2%寒天/蒸留水基質0.5ミリリットル/ウェルの入った128ウェルクラスタプレートのウェルに入れた。1匹の新生CPBを各ウェルに入れ、一晩インキュベートし、葉片を消費させた。葉片が完全に消費された場合、措置により昆虫が死滅または損傷する可能性が高く、アッセイの対象外とした。次の日、所与のトリガー/用量で処理したCPB幼虫はまとめて、その床にろ紙を並べ、鮮度を保つために水の入ったチューブに挿入された茎部の付いたジャガイモ葉（アトランティック種）を含有したカバー付通気半透明プラスチック容器（16オンス）から構成される給餌アリーナに移した。昆虫は、必要に応じて補充されるジャガイモ葉の入った環境チェンバ（27℃、60%相対湿度、16時間露光/

8時間暗所)で給餌アリーナでインキュベートした。幼虫の生存度を毎日観察した。幼虫の生死を記録した。生存度結果を表4に示す。

【表4-1】

表4

処理	CPB標的遺伝子の配列番号	処理後日数								
		5	6	7	8	9	10	12	14	16
配合物-1	n/a	100	100	100	100	100	100	92	54	15
配合物-2	n/a	87	87	87	87	73	73	73	27	20
配列番号1115, GFP-1	n/a	69	69	69	69	69	69	69	50	38
配列番号1115, GFP-2	n/a	100	100	94	94	75	75	56	19	19
配列番号989*, 250 ng	730	44	38	31	13	13	0	0	0	0
配列番号989*, 83 ng	730	19	19	13	0	0	0	0	0	0
配列番号989* 28 ng	730	69	50	38	13	13	6	6	6	6
配列番号989*, 9 ng	730	38	13	13	13	6	6	6	6	6
配列番号1049*, 250 ng	807	20	7	7	7	7	0	0	0	0
配列番号1049*, 83 ng	807	38	13	13	13	13	13	13	13	13
配列番号1049*, 28 ng	807	38	13	13	6	6	6	6	6	6
配列番号1049*, 9 ng	807	57	21	21	21	21	21	21	21	14
配列番号1050*, 250 ng	808	44	31	31	25	19	19	19	0	0
配列番号1050*, 83 ng	808	38	19	19	6	0	0	0	0	0
配列番号1050*, 28 ng	808	13	13	13	13	13	13	0	0	0
配列番号1050*, 9 ng	808	0	0	0	0	0	0	0	0	0
配列番号1078*, 250 ng	812	19	13	0	0	0	0	0	0	0

【表4-2】

配列番号1078*, 83 ng	812	29	14	14	7	7	0	0	0	0
配列番号1078*, 28 ng	812	50	31	19	13	13	6	6	0	0
配列番号1078*, 9 ng	812	60	47	40	27	27	27	7	27	13
配列番号1084*, 250 ng	819	79	43	43	43	29	21	2	14	14
配列番号1084*, 83 ng	819	56	38	19	19	19	13	1	13	13
配列番号1084*, 28 ng	819	50	38	25	19	19	19	1	19	19
配列番号1084*, 9 ng	819	75	50	44	44	38	38	3	31	31

*他に記載がない限り、dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

「配合物-1」及び「配合物-2」は、ヌル対照群(0.1%Silwet/水)の複製物である。「GFP-1」及び「GFP-2」は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を標的にし、配列番号:1115のセンス鎖配列を有する377bpのdsRNAトリガーを用いる陰性対照の複製物である。「n/a」=該当なし。

実施例7

【0258】

本実施例は、Leptinotarsa標的遺伝子の抑制に関するポリヌクレオチドトリガーの非限定的実施形態を示す。より具体的には、本実施例は、センス鎖及び別個のアンチセンス鎖からなる平滑末端化dsRNAトリガーの実施形態並びにヘアピン（センス領域及びアンチセンス領域をいずれも含む1つのRNA転写物）の形態におけるdsRNAトリガーの実施形態を示す。

【0259】

表5は、「親トリガー」（表1を参照されたい）に関連する配列を有する平滑末端化dsRNAトリガーを提供し、親トリガーは、Leptinotarsa decemlineata（表1、3及び4を参照されたい）に対する殺虫性活性を有することが決定され、誘導体トリガーは、親トリガーのサブ領域に対応する平滑末端化dsRNAである。

【表5-1】

表5

トリガー配列番号:*	標的遺伝子名	標的遺伝子の配列番号	親トリガー配列番号:	食餌活性対CPB(0.1 ppm)	食餌活性対CPB (0.025 ppm)
1096	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	1084	(-)	(-)
1097	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	1084	(-)	(-)

【表5-2】

1098	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	1084	(+)	(-)
1099	GTP-結合タンパク質SAR1B	819	1084	(+)	(-)
1100	ポータブル26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット3	807	1049	(-)	(-)
1101	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット7	808	1050	(-)	(-)
1102	26Sプロテアソーム非ATPase 調節サブユニット13	812	1078	(-)	(-)
1103	リボソームタンパク質L7	730	989	(-)	(-)
1104	リボソームタンパク質L7	730	989	(+)	(-)

* dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

【0260】

表6は、「親トリガー」から由来するか、または「親トリガー」に関連している（表1を参照されたい）配列を有するヘアピン（dsRNAを形成するためにハイブリッド形成するセンス領域及びアンチセンス領域をいずれも含有する1つのRNA転写物）の形態でdsRNAトリガーを提供し、親トリガーは、Leptinotarsa decemlineataに対して殺虫力を有すると判断された（表1、表3及び表4を参照されたい）。ヘアピントリガーは、例えば、細菌細胞内または植物細胞内で発現させるために、適切なプロモーターまたは他の要素を有する発

現構造体に提供されるとき、インビトロ発現またはインビボ発現に好適である。表6に開示される非限定的実施形態は、それぞれT7プロモーター（各ヘアピン配列においてヌクレオチド位置1～17に配置される）、及びセンス領域とアンチセンス領域との間に配置される「ループ」またはスペーサーを含み、ループは、非特異的（標的遺伝子のいかなる部分にも相補的でないまたは同一でない）ヌクレオチドを含む。当業者は、所与の細胞型中での発現に好適な異なるプロモーターと異なるスペーサー配列若しくはループ配列との組み合わせで、ヘアピンのセンス領域及びアンチセンス領域が有用であること（さもないと、センス領域及びアンチセンス領域の接合部のヌクレオチドがヘアピン内で必要な「回転」若しくは最小ループを形成する場合は全くないこと）は、すぐに理解するであろう。また、当業者は、類似の組換え型DNA構造体が、表1～5に提供された平滑末端化dsRNAトリガーに対応するヘアピンdsRNAトリガーをコードするか、または標的遺伝子配列群に提供される標的遺伝子を標的にするように容易に設計されることは理解するであろう。

【表6】

表6

ヘアピントリガー配列番号: [*]	ヘアピン内のトリガーアンチセンス領域のヌクレオチド位置	ヘアピン内のトリガーアンチセンス領域配列番号:	ヘアピン内のループまたはスペーサーのヌクレオチド位置	ヘアピン内のトリガーセンス領域のヌクレオチド位置	平滑末端化dsRNAトリガー配列番号:	CPB標的遺伝子の配列番号:
1105	21-417	1110	418-566	567-963	989 ^{**}	730
1106	21-300	1111	301-450	451-730	1086	
1107	21-453	1112	454-603	604-1036	1084 ^{**}	819
1108	21-458	1113	459-608	609-1046	1050 ^{**}	808
1109	21-448	1114	449-598	599-1026	1038 ^{**}	828

^{*}ヘアピンdsRNAトリガーをコードするDNA構造体配列

^{**}dsRNAトリガーのアンチセンス鎖配列

米国特許明細書第7, 943, 819号に配列番号: 880としてこれまでに開示されているように、配列番号: 1086は、βコアトマーを標的にしている平滑末端化dsRNAのセンス鎖配列に対応している。

【0261】

組換え型RNA単独または非ポリヌクレオチド殺虫剤単独にて得られた効果と比較すると、本明細書に記載の特定の組換え型RNA（例えば、表1～6に記載dsRNAトリガー若しくはそれらのヘアピン等価物、またはこれらのトリガーの活性フラグメント）と1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせにより、Leptinotarsa種の侵入の阻止または防除において相乗的向上が得られるであろうことが予測される。本明細書に記載の人工食餌を用いるバイオアッセイなど、ルーチン昆虫バイオアッセイは、ポリヌクレオチドトリガーと1つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤（例えば、パタチン、植物レクチン、植物エクジステロイド、Bacillus thuringiensis殺虫タンパク質、Xenorhabdus殺虫タンパク質、Phot orhabdus殺虫タンパク質、Bacillus laterosporous殺虫タンパク質、及びBacillus sph aericus殺虫タンパク質など）との組み合わせを用いて幼虫の死滅または成長阻害に関する用量反応を規定するのに有用である。当業者は、ルーチンバイオアッセイにおいてポリヌクレオチドと非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせの試験を行い、Leptinotarsa種の侵入から植物を保護するために使用するために、相乗的生理活性と所望の生理活性との組み合わせを識別することができる。

実施例8: Leptinotarsa decemlineataのRNAi-媒介防除の現場有効性

【0262】

現場条件下において、局所投与されたdsRNAトリガーによるジャガイモ植物のLeptinota

10

20

30

40

50

rsa decemlineata（コロラドハムシ、CPB）の侵入の防除への有効性の試験を行う現場試験を実施した。以下の局所（葉面散布）投与を用いて3つのdsRNAトリガーの試験を行った：リボソームタンパク質L7（配列番号：730によってコードされている）を標的にしている配列番号：989のアンチセンス鎖配列を有する平滑末端化dsRNA；ポータブル26Sプロテオソーム非ATPase調節サブユニット3（配列番号：807によってコード）を標的にする配列番号：1049のアンチセンス鎖配列を有する平滑末端化dsRNA；及びリボソームタンパク質L7（配列番号：730によりコード）を標的にする配列番号：1105のDNA構造体によってコードされるヘアピンdsRNA。配列番号：1105は、配列番号：989（実施例7を参照されたい）に対応するアンチセンス鎖を有するヘアピンdsRNAをコードする。実験は、4つの反復に対してランダムな完全ブロック設計に配置された11の処理により設計された。春に接種させたジャガイモ植物（「Superior」種）から構成される試験プロットは、中央で離間させた2つの20フィートの列及び6フィートの列に植え付け、標準的な市販の成長手法に従って、プロットを保持した。葉面噴霧処理を2回：1回目の処理は、植え付け後36日、第2回目の処理は植え付け後43日に行った。20インチに離間させた110003VSノズルチップを備えた4ノズルブームを用いて、二酸化炭素動力バックパック噴霧器によって2列同時に噴霧して全葉面処理を行い、平方インチ当たり40ポンド、38ガロン／エーカを送達させた。無作為に選択された1プロット当たり10個の茎部に関して、コロラドハムシのすべての世代を以下の3つの時点で記録した：第1の葉面噴霧処理（植え付け後39日）後3日、第1の葉面噴霧処理後（植え付け後43日）7日及び第2の葉面噴霧処理（植え付け後46日）3日後。主に小さい幼虫によって引き起こされる第1の葉面噴霧処理後9日目（植え付け後45日）に落葉を計測した。2つの市販の合成（小分子）殺虫剤は、陽性対照として使用した。Coragen（登録商標）（chlorantraniliprole, DuPont）及びRadiant（登録商標）（spinetoram, Dow AgroSciences）。結果は、表7に示す。異なる統計値は異なる文字（a、b、c、d、e）によって示す。例えば、未処理対照と5グラム／エーカの配列番号：989による処理など、「a」文字を共有している第1の噴霧後3日目の処理は統計的に異なっていないが、例えば、未処理対照及びCoragen（登録商標）処理の第1の噴霧後3日目の文字を共有していないこれらの処理は、統計的に異なる。dsRNAトリガーの影響は時間の経過と共に増大し、用量依存性反応を示し、第2の葉面噴霧後3日目で、dsRNAトリガー処理のすべて（配列番号：1049のアンチセンス鎖配列を有する最低用量のdsRNAトリガーを除く）により、大きな幼虫が減少し、これは、合成殺虫剤陽性対照（Coragen（登録商標）及び放射処理）とは有意に異なることはなく、未処理対照とは有意に異なる。また、落葉により、dsRNA処理に対する用量依存性反応が示され、いくつかのdsRNA処理は、未処理対照群とは有意に異なり、最高試験用量でのdsRNAトリガーのすべてにより、合成殺虫剤陽性対照（Coragen（登録商標）及び放射処理）によって提供されるものとは有意に異なることはない落葉の保護が提供された。幼虫数の減少及び落葉または植物損傷の減少により、dsRNA処理済みジャガイモ植物のLeptinotarsa decemlineataへの改善された耐性が示され、Leptinotarsa decemlineata に対する改善された耐性を有するこれらの植物は収率の改善が示されることが予期される（収穫可能な塊茎の減少）。

10

20

30

【表 7 - 1】

表7

		茎部10個当たりのコロラドハムシ中央値						
		小型幼虫			大型幼虫			
処理	比率(グラム/エーカー)	第1の噴霧後3日目	第1の噴霧後7日目	第2の噴霧後3日目	第1の噴霧後3日目	第1の噴霧後7日目	第2の噴霧後3日目	%落葉
未処理対照	n.a.	115.8 a	201.3 a	72.0 a b	0	45.3 ab	108.0 a	72.5 a
配列番号：989*	5	63.5 ab	146.5 a b	98.0 a b	3	8.5 bcd	8.3 b	9.8 de
配列番号:989*	1	93.3 ab	159.5 a	144.5 a	1.3	33.0 ab cd	21.8 b	28.8 cd
配列番号:989*	0.2	87.8 ab	116.0 a bc	118.0 a	0	25.3 ab cd	33.8 b	45.0 abc
配列番号:1049*	5	66.5 ab	135.5 a bc	126.0 a	0	2.0 cd	12.8 b	15.0 cde
配列番号:1049*	1	91.0 ab	175.0 a	102.5 ab	0	41.3 ab c	33.8 b	32.5 bcd
配列番号:1049*	0.2	93.5 ab	113.8 a bc	99.3 a b	0.8	59.0 a	80.0 a	68.8 ab
配列番号:1105*	5	61.0 ab	91.3 ab c	117.8 a	0	9.0 bcd	14.0 b	12.5 cde
配列番号:1105*	1	72.3 ab	104.8 a bc	87.3 a b	0	17.8 bc d	8.8 b	18.8 cd

【表 7 - 2】

Coragen (登録商標)	5**	9.8 b	6.0 c	0.3 b	0	0.0 d	0.0 b	0.0 e
放射	8**	1.3 b	16.8 bc	0.0 b	0	0.5 d	0.0 b	0.0 e
Anova の P 値	3	0.005	0.0004	0.0009	ns	0.0001	<0.0001	<0.0001

n.a.、該当なし

ns、有意差なし

*1600ミリリットルの水当たり3ミリリットルの市販の噴霧アジュバントTACTIC（商標）（

10

20

30

40

50

Loveland Products, Loveland, CO 80538) を含有する配合物に入ったdsRNAトリガー

** 液量オンス／エーカ

実施例9

【0263】

以下の表8は、追加で設計および産生されたトリガー配列（配列番号：1116～1126）を示す。

【表8－1】

表8

配列番号	ヌクレオチド配列
1116 (配列 番号：989 の相補配列)	1 GGCCGAACAG UAUGUUAAG AAUACCGGCU CAAAGAAAGA GAUGAAGUUA GGUUGAUCCG
	61 ACAAGCUAAA ACCAGAGGAA ACUUUUACGU UCCCGCUGAA GCCAAGUUGG CAUUCGUAAU
	121 UCGUAUAAAG GGUAUCAACA AAGUAGCUCC UAAAGUACGC AAGGUUCUCC AAUUGUCCG
	181 GCUCCUUCAA AUCAACAAUG GUGUCUUUGU CAAGCUCAAC AAAGCUACCA UCAACAUGCU
	241 CAGAAUAUGC GAACCUUACA UCACUUGGGG AUACCCUAAC UUGAAAUCUG UCAGAGAACU
	301 GAUUUAUAAG AGAGGUUUCG CCAAGGUGAA CGGCCAAAGG GUGCCAAUCA CUAGCAAUCA
	361 AAUCAUCGAA GACAAAUUAG GAAAGUCCGA CAUCAUC
	1 GGCCGAACAG UAUGUUAAG AAUACCGGCU CAAAGAAAGA GAUGAAGUUA GGUUGAUCCG
	61 ACAAGCUAAA ACCAGGGGAA ACUUUUAAGU UCCCGCUGAA GCCAAGUUAG CAUUCGUAAU
	121 UCGUAUAAAG GGUAUCAACA AAGUAGCUCC UAAAGUACGC AAGGUUCUCC AAUUGUCCG
1117	181 GCUCCUUCAA AUCAACAAUG GUGUCUUUGU CUAGCUCAAC AAAGCUAACA UCAACAUGCU
	241 CAGAAUAUGC GAACCUUACA UCACUUGGGG AUACCCUAAC UUGAAAUCUG UCAGAGAACU
	301 GAUUUAUAAG AGAGGUUUCG CCAAGGUGAA CGGCCAAAGG GUGCCAAUCA CUAGCAAUCA
	361 AAUCAUCGAA GACAAAUUAG GAAAGUCCGA CAUCAUC

10

20

30

【表 8 - 2】

1118	1 GGCCGAACAG UAUGUUAAG AAUACCGGCU CAAAGAAAGA GAUGAAGUUA GGUUGAUCCG 61 ACAAGCUAAA ACCAGGGGAA ACUUUUACGU UCCCGCUGAA GCCAAGUUGG CAUUCGUAAU 121 UCGUAUAAAG GGUUAUACA AAGUAGCUCC UAAAGUACGC AAGGUUCUCC AAUUGUCCG 181 GCUCCUCAA AUCAACAAUG GUGUCUUUGU CAAGCUCAAC AAAGCUACCA UCAACAUGCU 241 CAGAAUAUGC GAACCUUACA UCACUUGGGG AUACCCUAAC UUGAAAUCUG UCAGAGAACU 301 GAUUUAUAG AGAGGUUUCG CCAAGGUGAA CGGCCAAAGG GUGCCAAUCA CUAGCAAUCA 361 AAUCAUCGAA GACAAAUUAG GAAAGUCCGA CAUCAUC	10
1119	1 GGCCGAACAG UAUGUUAAG AAUACCGGCU CAAAGAAAGA GAUGAAGUUA GGUUGAUCCG 61 ACAAGCUAAA ACCAGGGGAA ACUUUUUAGU UCCCGCUGAA GCCAAGUUAG CAUUCGUAAU 121 UCGUAUAAAG GGUUAUACA AAGUAGCUCC UAAAGUACGC AAGGUUCUCC AAUUGUCCG 181 GCUCCUCAA AUCAACAAUG GUCUCUUUGU CUAGCUCAAC AAAGCUAACA UCAACAUGCU 241 CAGAAUAUGC GAACCUUACA UCACUUGGGG AUACCCUAAC UUGAAAUCUG UCAGAGAACU 301 GAUUUAUAG AGAGGUUUCG CCAAGGUGAA CGGCCAAAGG GUGCCAAUCA CUAGCAAUCA 361 AAUCAUCGAA GACAAAUUAG GAAAGUCCGA CAUCAUC	20
1120 (配列 番号 : 1049 の相補配列)	1 GGGCAAGAUU UUUUAUUAU UUAGGUCGUA UCAAAGCGGC UCGGUUAGAG UAUAGUGUUG 61 CUCAGAAACA UCUUGUACAA GCUAUGAGGA AAGCGCCUCA GAACGCUGCU AUUGGAUCC 121 GCCAAACAGU GCAAAAACUC ACCGUCGUAG UUGAGCUCCU UCUGGGAGAU AUACCGGAAA 181 GGCAGAUUU CAGACAGUCC AGUAUGAGGC AUUCUUUGGC UCCAUAUUUU CAGUUGACUC 241 AAGCUGUCCG UAUGGGAAAU UUACAACGAU UCGGCGAGGU GUUGGAGAAU UUUGGACCGC 301 AGUUCAGGCA AGACCAUACA UUCACGCUGA UUUUACGUUU ACGUCACAAU GUCAUUAAAA 361 CGGCAUAAG AUCCAUCGGA UUAUCUUACU CGAGAAUUUC UCCUCAAGAU AUUGCCAAGA 421 AACUGGGAC	30

【表 8 - 3】

1121	1 GGGCAAGAUU UUUAUACUUA UUAGGUCGUA UCAAAGCGGC UCGAUUAGAG UAUAGUGUUG 61 CUCAGAAACA UCUUGUACAA GCUAUGAGGA AAGCGCCUCA GAACGCUGCU AUUGGAUUCC 121 GCCAAACAGU GCAAAAACUC ACCGUCGUAG UUGAGCUCCU UCUGGGAGAU AUACCGGAAA 181 GGCAGAUUU CAGACAGUCC AGUAUGAGGC AUUCUUUGGC UCCAUAUUUU CAGUUGACUC 241 AAGCUGUCCG UAUGGGAAAU UUACAACGAU UCGGCGAGGU GUUGGAGAAU UUUGGACCGC 301 AGUUCAGGCA AGACCAUACA UUCACGCUGA UUUUACGUUU ACGUCACAAU GUCAUUA AAAA 361 CGGCAUAAG AUCCAUCGGA UUAUCUUACU CAAGAAUUUC UCCUCAAGAU AUUGCCAAGA 421 AACUGGGAC	10
1122	1 GGGCAAGAUU UUUAUACUUA UUAGGUCGUA UCAAAGCGGC UCGAUUAGAG UAUAGUGUUG 61 CUCAGAAACA UCUUGUACAA GCUAUGAGGA AAGCGCCUCA GAACGCUGCU AUUGGAUUCC 121 GCCAAACAGU GCAAAAACUC ACCGUCGUAG UUGAGCUCCU UCUGGGAGAU AUACCGGAAA 181 GGCAGAUUU CAGACAGUCC AGUAUGAGGC AUUCUUUGGC UCCAUAUUUU CAGUUGACUC 241 AAGCUGUCCG UAUGGGAAAU UUACAACGAU UCGGCGAGGU GUUGGAGAAU UUUGGACCGC 301 AGUUCAGGCA AGACCAUACA UUCACGCUGA UUUUACGUUU ACGUCACAAU GUCAUUA AAAA 361 CGGCAUAAG AUCCAUCGGA UUAUCUUACU CGAGAAUUUC UCCUCAUGAU AUUGCCAAGA 421 AACUGGGAC	20
1123	1 GGGCAAGAUU UUUAUACUUA UUAGGUCGUA UCAAAGCGGC UCGAUUAGAG UAUAGUGUUG 61 CUCAGAAACA UCUUGUACAA GCUAUGAGGA AAGCGCCUCA GAACGCUGCU AUUGGAUUCC 121 GCCAAACAGU GCAAAAACUC ACCGUCGUAG UUGAGCUCCU UCUGGGAGAU AUACCGGAAA 181 GGCAGAUUU CAGACAGUCC AGUAUGAGGC AUUCUUUGGC UCCAUAUUUU CAGUUGACUC 241 AAGCUGUCCG UAUGGGAAAU UUACAACGAU UCGGCGAGGU GUUGGAGAAU UUUGGACCGC 301 AGUUCAGGCA AGACCAUACA UUCACGCUGA UUUUACGUUU ACGUCACAAU GUCAUUA AAAA 361 CGGCAUAAG AUCCAUCGGA UUAUCUUACU CAAGAAUUUC UCCUCAUGAU AUUGCCAAGA 421 AACUGGGAC	30

10

20

30

40

【表 8 - 4】

1124 (Sar1 標的性)	1	GGGAUUGGUU UACCGGUGUA CUUGGUUACU UGGGAUU AUG
		GAAGAAAUCA GGCAAGCUGC
	61	UUUCCUAGG UCUGGACAAU GCUGGAAAA CAACUUUACU
		GCAUAUGCUC AAAGAUGAUA
	121	GGCUGGCACA GCAUCUUCCC ACUUUACAUC CUACAUCAGA
		AGAAUUGUCA AUCGGCAGCA
	181	UGAGGUUCAC GACUUUUGAU UUGGGAGGCC AUUCACAAGC
		AAGGCGAGUG UGGAAGGACU
	241	ACUCCCUGC UGUUGACGCC AUUGUCUUUU UAGUAGAUGC
		CAAUGAUAGG AACAGAUUCA
	301	AAGAGAGUAA ACAAGAAUUG GAUUCGCUAC UCACAGACGA
		GACUCUUUCG AAUUGUCCGG
	361	UUCUUUAUU AGGUAACAAA AUUGAUUUGC CUCAAGCAGC
		UUCGGAAGAC GAACUAAGAA
	421	AUUACUAUGC CUUGUAUGGC C

【表 8 - 5】

1125	1	GGGAUUGGUU UACCGGUGUA CUUGGUUACU UGGGAUUAUG	
		GAAGAAAUCA GGCAAGCUGC	
	61	UUUCCUAGG UCUGGUCAAU GCUGGAAAA CAACUUUACU	
		GCAUAUGCUC AAAGAUGAUA	
	121	GGCUGGCACA GCAUCUUCCC ACUUAACAUC CUACAUCAGA	
		AGAAUUGUCA AUCGGCAGCA	
	181	UGAGGUUCAC GACUUAUGAU UUGGGAGGCC AUUCACAAGC	
		AUGGCGAGUG UGGAAGGACU	
	241	ACUCCCUGC UGUUGACGCC AUUGUCUUUU UAGUAGAUGC	10
		CAAUGAUAGG AACAGAUUCA	
	301	AAGAGAGUAA ACAAGAAUUG GAUUCGCUAC UCACAGACGA	
		GACUCUUUCG AAUUGUCCGG	
	361	UUCUUAUAUU AGGUAACAAA AUUGAUUUGC CUCAAGCAGC	
		UUCGGAAGAC GAACUAAGAA	
	421	AUUACUAUGC CUUGUAUGGC C	
	1	GGGAUUGGUU UACCGGUGUA CUUGGUUACU UGGGAUUAUG	
		GAAGAAAUCA GGCAAGCUGC	
	61	UUUCCUAGG UCUGGUCAAU GCUGGAAAA CAACUUUACU	
		GCAUAUGCUC AAAGAUGAUA	
	121	GGCUGGCACA GCAUCUUCCC ACUUAACAUC CUACAUCAGA	20
		AGAAUUGUCA AUCGGCAGCA	
	181	UGAGGUUCAC GACUUAUGAU UUGGGAGGCC AUUCACAAGC	
		AUGGCGAGUG UGGAAGGACU	
	241	ACUCCCUGC UGUUGACGCC AUUGUCUUUU UAGUAGAUGC	
		CAAUGAUAGG AACAGAUUCA	
	301	AAGAGAGUAA ACAAGAAUUG GAUUCGCUAC UCACAGACGA	
		GACUCUUUCG AAUUGUCCGG	
	361	UUCUUAUAUU AGGUAACAAA AUUGAUUUGC CUCAAGCAGC	
		UUCGGAAGAC GAACUAAGAA	
	421	AUUACUAUGC CUUGUAUGGC C	
	1	GGGAUUGGUU UACCGGUGUA CUUGGUUACU UGGGAUUAUG	
		GAAGAAAUCA GGCAAGCUGC	
	61	UUUCCUAGG UCUGGUCAAU GCUGGAAAA CAACUUUACU	
		GCAUAUGCUC AAAGAUGAUA	
	121	GGCUGGCACA GCAUCUUCCC ACUUAACAUC CUACAUCAGA	30
		AGAAUUGUCA AUCGGCAGCA	
	181	UGAGGUUCAC GACUUAUGAU UUGGGAGGCC AUUCACAAGC	
		AUGGCGAGUG UGGAAGGACU	
	241	ACUCCCUGC UGUUGACGCC AUUGUCUUUU UAGUAGAUGC	
		CAAUGAUAGG AACAGAUUCA	
	301	AAGAGAGUAA ACAAGAAUUG GAUUCGCUAC UCACAGACGA	
		GACUCUUUCG AAUUGUCCGG	
	361	UUCUUAUAUU AGGUAACAAA AUUGAUUUGC CUCAAGCAGC	
		UUCGGAAGAC GAACUAAGAA	
	421	AUUACUAUGC CUUGUAUGGC C	40

【表 8－6】

1126 (CPB vATPase 標的性)	1	GCUUUGGAUG AUUUCUAUGA CAAAAACUUC CCUGAAUUUA
		UACCGCUAAG AACCAAAGUU
	61	AAAGAAAUCC UUCAAGAAGA AGACGACCUU ACGGAAAUCG
		UGCAGCUGGU AGGAAAAGCU
	121	UCAUUAGCUG AAGCUGAUAA GAUUACAUUG GAAAUCGCCA
		AGCUGUUGAA AGAAGAUUUC
	181	CUGCAACAGA ACUCGUACUC AUCGUACGAU AGAUUCUGUC
		CCUUCUACAA AACCGUGGGU
	241	AUGUUGAAGA ACAUGAUUGG GAUGUAC

10

【0264】

これらのトリガーは、平滑末端化dsRNAとして、並びにヘアピンバージョンにおいて試験され、細菌または酵母などの組換え系において産生されたものである。

実施例10

【0265】

リボソームタンパク質L7（配列番号：730）を標的とするように設計され、配列番号：989、1117、及び1118からなる群から選択される配列を有する鎖を含む平滑末端化二本鎖RNA（dsRNA）トリガー分子の有効性を、植物全体アッセイにおいて試験した。第1のアッセイ群は、以下のように実施した。植物としては、アトランティック種のジャガイモを使用した。植物を生育させ、明期を16時間、暗期を8時間としたサイクルを使用し、生育箱においてアッセイを実施した。明期サイクルの間は、温度範囲を23～27℃とし、暗期サイクルの間は、温度範囲を20～22℃とした。相対湿度は、50～75％に維持した。葉面投与の日に、濃縮保存溶液を希釈し、所望の最終濃度（0.0625または0.25マイクログラム／ミリリットル）とすることによって、平滑末端化二本鎖RNA（dsRNA）トリガー分子の試験配合物を調製した。試験配合物には、展着剤として1％（v／v）のTween－85を含めた。SS9501Eノズルを使用して、二本鎖RNAトリガー含有配合物を30ガロン／エーカーの速度で植物に投与した。各セットにつき9連の植物を、1回の処理当たり2セット使用した。処理の後、各植物に個々に覆いをかけて、新生のLeptinotarsa decemlineata（コロラドハムシ、CPB）幼虫を12匹侵入させてから、生育箱に戻し、12～14日間生育させた。この期間の終了時点で、植物の覆いを外し、落葉率（表9）及び生存昆虫の回収率（表10）を、汚染させずに覆いをかけた対照と比較して決定した。配列番号：989、1117、及び1118からなる群から選択される配列を有する鎖を含むdsRNAトリガーを、0.25マイクログラム／ミリリットルで葉面投与することで、処理した植物における昆虫被害が減少すると共に、生存昆虫の回収率も減少した。

20

30

【表 9】

表9：落葉率

処理セット	配列番号:	マイクログラム／ミリリットル					
		0		0.0625		0.25	
		平均値	SD*	平均値	SD*	平均値	SD*
対照	なし (1%のTween-85)	55	31.5				
1	1118			49.4	24.4	10.6	3.9
	1117			45.0	22.1	10.6	3.0
	989			49.4	16.7	7.2	2.6
2	1118			52.2	20.3	9.4	5.3
	1117			45.0	15.8	8.9	5.5
	989			31.1	10.2	8.9	3.3

10

* SD＝標準偏差であり、分散の平方根として計算。

【表 10】

表10：生存昆虫の回収率

20

処理セット	配列番号:	マイクログラム／ミリリットル					
		0		0.0625		0.25	
		平均値	SD*	平均値	SD*	平均値	SD*
対照	なし (1%のTween-85)	66.7	20.4				
1	1118			71.3	15.1	11.1	10.2
	1117			72.2	13.8	18.6	13.0
	989			68.5	22.0	18.6	15.5
2	1118			75.0	16.7	9.3	7.7
	1117			58.3	19.5	15.7	9.7
	989			56.5	18.5	13.9	14.4

30

* SD＝標準偏差であり、分散の平方根として計算。

【0 2 6 6】

第2のアッセイ群は、配列番号：989、1117、及び1118からなる群から選択される配列を有する鎖を含む平滑末端化dsRNAトリガーを用いて実施し、その際、同一のプロトコールを使用した。最終濃度は、0.125マイクログラム／ミリリットル（第1セットのアッセイで使用した2つの濃度の中間）とした。このアッセイ群では、配列番号：989の配列を有する鎖を含むdsRNAトリガーの合成バッチが異なるものを含む配合物を使用して、第3の処理セットも実施した。第1のアッセイセットと同様に、落葉率及び生存昆虫の回収率を、汚染させずに覆いをかけた対照と比較して決定し、さらに、昆虫重量も測定した。結果は、表11に示される。配列番号：989、1117、及び1118からなる群から選択される配列を有する鎖を含むdsRNAトリガーを、0.125マイクログラム／ミリリットルで葉面投与することで、処理した植物における昆虫被害が減少すると共に、生存昆虫の回収率も減少した。

40

【表 1 1】

表11

処理セット	配列番号：	0.125マイクログラム／ミリリットル					
		落葉率		生存昆虫の回収率		昆虫重量	
		平均値	SD*	平均値	SD*	平均値	SD*
対照	なし (1%のTween-85)	96.5	5.3	75.83	12.7	1.097	0.27
1	1118	57.5	21.2	64.17	11.8	0.596	0.16
	1117	47	19.0	58.33	20.8	0.520	0.09
	989	36	12.9	53.33	16.8	0.495	0.22
2	1118	35	12.0	58.33	15.2	0.527	0.13
	1117	35.5	22.0	45	11.9	0.343	0.12
	989	38	22.9	54.17	17.2	0.459	0.25
3	989	29.5	19.4	37.5	15.8	0.218	0.13

10

* SD＝標準偏差であり、分散の平方根として計算。

20

【0 2 6 7】

これらのデータによって、配列番号：989、1117、及び1118からなる群から選択される配列を有する鎖を含むdsRNAトリガーを試験し、そのいずれにおいても、有効量で葉面投与すると、処理した植物における昆虫被害が減少し、生存昆虫の回収率が減少し、及び昆虫重量が減少することが示された。

【0 2 6 8】

本明細書で開示し、請求しているすべての材料及び方法は、上記開示に教示されているように、不当な実験法を用いることなく産生され、使用することができる。本発明の材料及び方法は、実施形態及び例示の実施例に関して記述されているが、本発明の概念、趣旨及び範囲に逸脱することなく、変化形態を本明細書に記載された材料及び方法に使用することができることは、当業者に明かである。当業者に明かであるこうした類似の代替及び変更形態はすべて、添付に請求項に規定されているとおり、本発明の趣旨、範囲及び概念内であると考えられる。

30

【配列表】

0006942632000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 0 1 N	57/16	(2006.01)	A 0 1 N 57/16 1 0 4 C
A 0 1 P	7/04	(2006.01)	A 0 1 P 7/04
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	15/82	(2006.01)	C 1 2 N 15/82 Z

- (72)発明者 ジョディ・リン・ピーティー
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・ブルーバード 8 0 0 番
- (72)発明者 マイケル・ジョン・クロフォード
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0 番
- (72)発明者 ブライアン・ドノバン・イーズ
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0 番
- (72)発明者 レックス・エバン・フラゲル
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0 番
- (72)発明者 マハク・カプール
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0 番
- (72)発明者 クリスティーナ・マリー・テイラー
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・ブルーバード 8 0 0 番

審査官 馬場 亮人

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 5 6 5 0 (WO, A 2)
国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 0 6 9 1 (WO, A 1)
特表 2 0 0 9 - 5 0 8 4 8 1 (JP, A)
特表 2 0 1 6 - 5 3 2 4 4 0 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
A 0 1 H 1 / 0 0
A 0 1 H 5 / 0 0
A 0 1 H 5 / 0 8
A 0 1 H 5 / 1 0
A 0 1 N 5 7 / 1 6
A 0 1 P 7 / 0 4
C 1 2 N 5 / 1 0
C 1 2 N 1 5 / 8 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)