(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3878209号
(P3878209)
(45)発行日　平成19年2月7日(2007.2.7)　(24)登録日　平成18年11月10日(2006.11.10)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 15/00 (2006.01)　　C12N 15/00
C07K 14/325 (2006.01)　　C07K 14/325

請求項の数 2　(全 37 頁)

(21)出願番号　特願平7-529046
(86)(22)出願日　平成7年5月5日(1995.5.5)
(65)公表番号　特表平10-500292
(43)公表日　平成10年1月13日(1998.1.13)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/005431
(87)国際公開番号　WO1995/030753
(87)国際公開日　平成7年11月16日(1995.11.16)
審査請求日　平成14年4月15日(2002.4.15)
(31)優先権主張番号　08/239,476
(32)優先日　平成6年5月6日(1994.5.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
マイコジェン　コーポレーション
アメリカ合衆国　カルフォルニア州　サン　ディエゴ　オバーリン　ドライブ　５５０１
(74)代理人
弁理士　清水　初志
(72)発明者　トンプソン　マーク
アメリカ合衆国　カルフォルニア州　サン　ディエゴ　カミニト　アルバレス　１０５４９
(72)発明者　スクワブ　ジョージ　イー.
アメリカ合衆国　カルフォルニア州　エンシニタス　ウォルナットビュー　１３５１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シュードモナス・フローレセンスにおけるキメラデルタ－内毒素の発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

キメラバチルス・チューリンギエンシス毒素をコードするヌクレオチド配列を含み、該バチルス・チューリンギエンシス毒素が、cryIFコアN末端側毒素部分と、cryIA(b)またはcryIA(c)/cryIA(b)の異種プロ毒素部分とを含むキメラ毒素である、単離されたポリヌクレオチド分子であって、該毒素が590アミノ酸以上かつ1100アミノ酸以下のcryIFコアN末端側配列を含み、cryIA(b)またはcryIA(c)/cryIA(b)プロ毒素部分が該毒素のC末端側に少なくとも100アミノ酸を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項２】

590アミノ酸以上かつ1100アミノ酸以下のcryIFコアN末端側配列を含むcryIFコアN末端側毒素部分と、cryIA(b)毒素またはcryIA(c)/cryIA(b)キメラ毒素由来の異種のC末端側プロ毒素部分とを含む、実質的に純粋なキメラバチルス・チューリンギエンシス毒素であって、cryIA(b)またはcryIA(c)/cryIA(b)のプロ毒素部分が該毒素のC末端側に少なくとも100アミノ酸を含む、キメラバチルス・チューリンギエンシス毒素。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

土壌細菌バチルス・チューリンギエンシス（Bacillus thuringiensis）(B.t.)は、グラム陽性で、胞子を形成する細菌であり、パラ胞子的（parasporal）な結晶性蛋白質の封入体を特徴とする。これらの封入体は、しばしば、特殊な形状の結晶として顕微鏡で見ることができる。この蛋白質は、病原生物に対して非常に毒性が強く、特異的な毒素活性を示す

ことがある。ある種のB.t.毒素遺伝子が単離されて配列が決定されており、組み換えDNAによるB.t.産物が製造され、使用が認められている。さらに、遺伝子工学技術を用いてこれらのB.t.内毒素を農業環境に取り入れさせるために、害虫抵抗性に関する内毒素遺伝子を用いて遺伝子工学的に改良した植物を用いたり、安定化した微生物細胞そのものをB.t.内毒素の運搬体として用いることを含む、新しい方法が開発中である(Gaetner, F.H., L. Kim［1988］TIBTECH 6:S4-S7)。このように、単離されたB.t.内毒素が、商業上の価値を持ちつつある。

10年前まで、B.t.農薬の商業的な利用は、鱗翅目(毛虫)の害虫に対してだけという、狭い範囲に大きく制限されていた。バチルス・チューリンギエンシス・クルスタキ亜種（Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki）から調製された胞子および結晶が、長い間、鱗翅目(毛虫)用の殺虫剤として商業的に用いられてきた。例えば、B.チューリンギエンシス・クルスタキHD-1変種（B. thuringiensis var. kurstaki HD-1）は、多くの鱗翅目昆虫の幼虫に対して毒素を示すδ-内毒素の結晶を産生する。

しかし、近年になって、研究者たちは、ずっと広い範囲の害虫に特異性をもつB.t.農薬を発見した。例えば、別のB.t.種、すなわちイスラエレンシス（israelensis）およびテネブリオニス（tenebrionis）(B.t.M-7、B.t. san diegoとしても知られている)が、それぞれ、双翅目とコレオプテラ（Coleoptera）目の昆虫を抑制するために商業的に用いられてきた(Gaetner, F.h.,［1989］作物防御剤の制御的輸送「殺虫蛋白質の細胞内運搬系：生存微生物と非生存微生物」（"Cellular Delivery Systems for Insecticidal Proteins:Living and Non-Living Microorganisms", in Conntrolled Delivery of Crop Protection Agents）R.M. Wilkins, ed., Taylor and Francis, New York and London, 1990, pp.245-255)。また、「Couch, T.L.（1980）"バチルス・チューリンギエンシス・イスラエレンシス変種の蚊に対する病原性（Mosquito Pathogenicity of Bacillus thuringiensis var.israelensis）", Developments in Industrial Microbioilogy 22;61-76」、「Beegle, C.C.(1978)"農業環境系における昆虫に発生する細菌の使用（Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems）"Developments in Industrial Microbioilogy 20:97-104」も参照のこと。「Krieg, A., A.M. Huger, G.A.Langenbruch, W. Schnetter（1983）Z.ang.Ent. 96:500-508」は、バチルス・チューリンギエンシス・テネブリオニス変種（Bacillus thuringiensis var. tenebrionis）について述べ、これが鞘翅目の２種の甲虫に対して活性があることを報告している。それらは、コロラド・ジャガイモ甲虫のレプチノタルサ・デセムリネアタ（Leptinotarsa decemlineata）およびアゲラスチカ・アルニ（Agelastica alni）である。

最近、新しいB.t.の亜種が同定され、活性δ内毒素蛋白質をコードする遺伝子が単離された(Hofte, H., H.R. Whiteley［1989］Microbiological Reviews 52(2):242-255)。ヘフテ（Hofte）およびウィトリー（Whiteley）は、B.t.結晶蛋白質遺伝子を４種類に大別した。これらは、CryI(鱗翅目特異的)、CryII(鱗翅目および双翅目特異的)、CryIII(鞘翅目特異的)、およびCryIV(双翅目)である。他の害虫に特異的に有毒な菌株が発見されたことも報告されている(Feitelson, J.S., J.Payne, L. Kim［1992］Bio/Technology 10:271:275)。

B.t.結晶蛋白質遺伝子の大腸菌におけるクローニングおよび発現が、発表文献に開示されている(Schnepf, H.E., H.R. Whiteley［1981］Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2893-2897)。米国特許第4,448,885号および米国特許第4,467,036号はいずれも、B.t.結晶蛋白質の大腸菌における発現を開示している。毒性を強化し、標的害虫に対する宿主範囲の拡大を示すハイブリッドB.t.結晶蛋白質が作成されている。米国特許第5,238,130号および第5,055,294号を参照のこと。米国特許第4,797,276号および第4,853,331号は、さまざまな環境で鞘翅目を抑制するために用いることができるB.チューリンギエンシス（B. thuringiensis）の菌系テネブリオニ（スtenebrionis）(M-7、B.t. san diegoとしても知られている)を開示している。米国特許第4,918,006号は、双翅目に対する活性をもつB.t.毒素を開示している。米国特許第4,849,217号は、アルファルファ・ゾウムシ（alfalfa weevil）に対して活性をもつB.t.単離物を開示している。米国特許第5,208,077号は、活性バチル

ス・チューリンギエンシス単離物を開示している。米国特許第5,151,363号および米国特許第4,948,734号は、線虫に対する活性をもつB.t.単離物を開示している。多くの研究と資源の投入の結果、新しいB.t.単離物およびB.t.単離物の新しい利用に関する他の特許が発行されている。しかし、新しいB.t.単離物の発見と、既知のB.t.単離物の新しい利用は、依然として経験に依存する予測不可能な技術のままである。

バチルス・チューリンギエンシスのδ-内毒素結晶蛋白質分子は、二つの機能部分からなる。プロテアーゼ抵抗性コア毒素が第一の部分で、蛋白質分子の前方の約半分に相当する。cryIIIA B.t.δ-内毒素のコア部分の三次元構造が明らかにされており、すべての関連毒素が同じ全体構造をもつと云われている(Li, J., J. Carroll, D.J. Ellar［1991］Nature 353:815-821)。この分子の後ろの半分が第二の部分である。本願のため、本明細書において、この第二の部分を「プロ毒素分節」と呼ぶことにする。プロ毒素分節は、毒素の結晶形成に関与すると考えられている(Arvidson, H., P.E. Dunn, S. Strand, A.I. Aronson［1989］Molecular Microbiology 3:1533-1534;Choma, C.T., W.K.Surewicz, P.R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor, H. Kaplan［1990］Eur. J.Biochem. 189:523-527)。全長130kDa毒素分子は、昆虫の腸の中でプロテアーゼにより速やかに処理されて、抵抗性コア分節になる。このように、プロ毒素分節は、毒素分子をプロセシングするプロテーゼを減少させ、コア部分が昆虫に接近しにくくすることによって(Haider, M.Z., B.H. Knowles, D.J. Ellar［1986］Eur. J. Biochem.156:531-540)、または毒素の可溶性を低下させることによって(Aronson, A.I., E.S. Han, W. McGaughey, D. Johnson［1991］Appl. Environ. Microbio.57:981-986)、毒素に対する昆虫の特異性を部分的に担っているのかもしれない。

毒素ドメインで結合したキメラ蛋白質が、CryICとCryIA(b)の間で報告されている(Honee, G., D. Convents, J. Van Rie, S. Jansens, M. Perferoen, B. Visser［1991］Mol. Microbiol. 5:2799-2806)が、これらのキメラ蛋白質の活性は、適当な昆虫に対するCryICと較べると、非常に低いか、検出できないほどである。

ハニーら(Honee, G.,W. Vriezen, B. Visser［1990］Appl. Environ, Microbiol. 56:823-825)はまた、CryICおよびCryIA(b)の毒素ドメインを直列に連結することによるキメラ融合蛋白質の作出を報告した。その結果できた蛋白質は、各毒素の活性を組み合わせた活性に相当する、広い活性スペクトルを示した。しかし、そのキメラの活性は、標的昆虫のいずれに対しても増加しなかった。

発明の概要

本発明は、B.t.毒素をコードする遺伝子を改変して、シュードモナス（Pseudomonas）におけるバチルス・チューリンギエンシス(B.t.)δ-内毒素の発現を実質的に改良することができるという発見に関する。特に、天然のプロ毒素をコードする部分を別のプロ毒素分節で置き換えてキメラ遺伝子を作出するように遺伝子を再構築することによって、P.フローレセンス（P.fluorescens）におけるB.t.内毒素の発現を改善できる。

本発明の特異的な態様において、天然のcryIFプロ毒素分節を異種のプロ毒素分節で置き換えて、キメラ遺伝子を組み立てることができる。特に、天然のcryIF毒素に相当するプロ毒素をコードする領域の全部または一部の代わりに、cryIA(b)遺伝子のプロ毒素をコードする領域の全部または一部を用いることができる。同様に、cryIF毒素のプロ毒素の全部または一部をコードする領域を、cryIA(c)/cryIA(b)キメラ遺伝子のプロ毒素の全部または一部をコードするDNAによって置き換えたキメラ遺伝子を構築することができる。特異的な態様において、cryIA(c)/cryIA(b)キメラ遺伝子は、436と表示されており、米国特許第5,128,130号で説明されている。この遺伝子は、P.フローレセンスMR436の中のプラスミドから得ることができる。

本発明は、また、請求の範囲の毒素をコードするキメラ遺伝子を利用することを含む。広い範囲の微生物や植物の宿主に、キメラ遺伝子を導入することができる。キメラ遺伝子を発現する形質転換された宿主を、本発明の鱗翅目に作用する毒素を産生するために用いることができる。殺虫性毒素を産生するために、形質転換宿主を用いることができ、また、毒素を産生するように形質転換された植物細胞の場合には、植物が昆虫の攻撃に対して抵

抗性になる。本発明は、さらに、鱗翅目の害虫を抑制するための方法において、キメラ遺伝子またはキメラ毒素をコードする遺伝子をもつ宿主の利用に関する。
またさらに本発明は、本発明のキメラ毒素を産生する、実質的に完全な組み換え細胞を処理することを含む。実質的に完全な細胞を標的害虫の環境に適用する際、鱗翅目に対する活性の期間を伸ばすために細胞を処理する。この処理は、選択した方法が殺虫剤の性質に有害な影響を及ぼさず、細胞の殺虫因子を保護する機能を奪わない限り、化学的方法によっても、物理的方法によっても、化学的方法と物理的方法とを組み合わせた方法によってもよい。処理された細胞は、殺虫毒素の保護外被の作用をする。毒素は、標的昆虫に摂取されて活性化する。

【図面の簡単な説明】

図１－pMYC1050からBamHI部位を除去して、クレノウポリメラーゼで平滑化し、プラスミドpMYC1050ΔBamHIを作成する。クローニングを効率的に行うため、毒素のオープンリーディングフレームの大部分を含むNsiI DNA断片をpGEM5中にクローニングする。得られるプラスミドをpGEMtoxと名付ける。C＝ClaI、H＝HindIII。
図２－スプライス・オーバーラップ伸長反応(SOE)技術によって、毒素DNAにBamHIおよびPvuIクローニング部位を導入した。新しい部位をもつDNA断片をpGEMtoxの相同なDNA断片に置き換えるために用いる。得られるプラスミドは、pGEMtox BamHIまたはpGEMtoxPvuIである。矢印の下のAからGの文字は、本文中のオリゴヌクレオチドプライマーに相当する。縦線の上の文字は、制限酵素部位に相当する。B＝BamHI、C＝ClaI、H＝HindIII、P＝PvuI、S＝SacI。
図３－pGEMtox PvuIの相同配列と入れ換えるため、BamHI変異を含むDNA断片を用いる。得られる両方のクローニング部位をもつプラスミドを、pGEMtox BamHI/PvuIとする。発現プラスミドを作成するために、毒素を含むNsiI断片を切り出して、広範な宿主域をもつベクターpTJS260中にクローニングする。B＝BamHI、C＝ClaI、H＝HindIII、P＝PvuI。
図４－新しい制限酵素部位をもつ、NsiI毒素を含む断片を、pMYC1050ΔBamHIから採ったベクターを含むDNAにライゲーションしてpMYC2244と名付けた。BamHI-PvuI PCR由来のDNA断片で、cryIF毒素を含む断片をpMYC2244の同じ部位の断片と入れ換える。できたキメラをpMYC2239と名付けた。B＝BamHI、C＝ClaI、H＝HindIII、N＝NsiI、P＝PvuI。
図５－pMYC2047のApaI小DNA断片を、pMYC2239の相同領域と置換して、プラスミドpMYC2244を作製する。このキメラは、毒素領域のcryIFとプロ毒素領域のcryIA(b)からなる。C＝ClaI、H＝HindIII、N＝NsiI、P＝PvuI。
図６－SOEによってcryIF毒素に、アミノ酸を変えないコドンの変更を導入する。変更したSpeI-KpnI PCR DNA断片で、相同な、毒素を含むpMYC2047の断片を置き換える。その結果できるプラスミドがpMYC2243である。矢印の下のHからKは、本文中のオリゴヌクレオチドプライマーに相当する。
図７－pMYC2243のApaI小DNA断片をもつ相同な断片で置換することによって、pMYC2244に、アミノ酸を変えない(サイレントな)コドンの変更を導入する。最後にできたプラスミドがpMYC2523である。P＝PvuI。
図８－PCRで作製したPvuI-BstEIIプロ毒素DNAで、pMYC2523中の相同的な断片を置換することによって、436プロ毒素を含むキメラ毒素を構築する。最後にできたプラスミドがpMYC2254である。矢印の下のFとMは、本文中のオリゴヌクレオチドプライマーに相当する。
図９－cryIF/cryIA(b)キメラ蛋白質の配列と残基毎の置換。'Cons'の行は、cryIF/cryIA(b)キメラ配列を示す。'Alt'の行は、cryIA(b)変異蛋白質とcryIFプロ毒素からなる436蛋白質中に見られる残基毎の置換を示す。

配列の簡単な説明

配列番号１は、オリゴヌクレオチド・プライマー「A」である。
配列番号２は、オリゴヌクレオチド・プライマー「B」である。
配列番号３は、オリゴヌクレオチド・プライマー「C」である。
配列番号４は、オリゴヌクレオチド・プライマー「D」である。
配列番号５は、オリゴヌクレオチド・プライマー「E」である。

配列番号６は、オリゴヌクレオチド・プライマー「F」である。
配列番号７は、オリゴヌクレオチド・プライマー「G」である。
配列番号８は、オリゴヌクレオチド・プライマー「L」である。
配列番号９は、オリゴヌクレオチド・プライマー「N」である。
配列番号10は、オリゴヌクレオチド・プライマー「O」である。
配列番号11は、オリゴヌクレオチド・プライマー「H」である。
配列番号12は、オリゴヌクレオチド・プライマー「I」である。
配列番号13は、オリゴヌクレオチド・プライマー「J」である。
配列番号14は、オリゴヌクレオチド・プライマー「K」である。
配列番号15は、オリゴヌクレオチド・プライマー「P」である。
配列番号16は、オリゴヌクレオチド・プライマー「Q」である。
配列番号17は、オリゴヌクレオチド・プライマー「M」である。
配列番号18は、pMYC2224の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号19は、pMYC2224によってコードされる毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号20は、pMYC2239の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号21は、pMYC2239によってコードされる毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号22は、cryIF/cryIA(b)キメラ毒素をコードするpMYC2244の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号23は、pMYC2244によってコードされるcryIF/cryIA(b)キメラ毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号24は、pMYC2243の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号25は、pMYC2243によってコードされる毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号26は、コドンの再加工をしたcryIF/cryIA(b)キメラ毒素をコードするpMYC2523の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号27は、pMYC2523によってコードされる毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号28は、cryIF/436キメラ毒素をコードするpMYC2254の、毒素をコードするDNA配列を示す。
配列番号29は、pMYC2254によってコードされる毒素のアミノ酸の推定配列を示す。
配列番号30は、cryI毒素の特徴的な配列である。この配列は、配列番号30の601残基目で終わる。
配列番号31は、配列番号23の1043番目のアミノ酸の前の8個のアミノ酸である。
配列番号32は、天然のcryIF毒素のアミノ酸配列を示す。
配列番号33は、天然のcryIA(b)毒素のアミノ酸配列を示す。
配列番号34は、cryIA(c)/cryIA(b)毒素のアミノ酸配列を示す。

発明の詳細な開示

本発明は、B.t.毒素をコードするあるキメラ遺伝子が、組み換えシュードモナス・フローレセンス（Pseudomonas fluorescens）での発現を増進させたという発見に関する。キメラ遺伝子は、天然のプロ毒素分節の全部または一部を、別のB.t.毒素のプロ毒素分節の全部または一部で置き換えた毒素をコードする。本明細書に開示されるような、cryIA(b)毒素またはcryIA(c)/cryIA(b)毒素のいずれかに由来するプロ毒素分節に結合した、cryIFコアN末端毒素部分から本質的になるB.t.毒素をコードする遺伝子が、本明細書に特に例示される。本明細書において用いられるように、「コア」毒素部分とは、プロ毒素のことではなく、毒素の殺虫活性に関係する全長B.t.毒素部分のことをいう。
本発明による有用なプラスミドを保有する細菌は、以下の通りである。

培養	寄託番号	米国特許番号
P.フローレセンス	NRRL B-18332	5,055,294
P.フローレセンスMR436	NRRL B-18292	5,128,130
(pM2,16-11,pMYC436としても知られる)		
大腸菌 NM522 (pMYC1603)	NRRL B-18517	5,188,960

寄託物の利用可能性は、本発明を実施するための実施権の一部を構成し、行政行為によって認められた特許権を減損するものではないと理解されるべきである。

図１～８のフローチャートは、本発明にしたがって実施できるベクター構築の一般的な概略図である。スプライス・オーバーラップ伸長(SOE)のPCR技術を用いた突然変異誘発によって(Horton, R.M., H.D., Hunt, S.N. Ho, J.K. Pullen, L.R. Pease［1989］Gene 77:61-68)、BamHIおよびPvuIクローニング部位をcryIA(c)/cryIA(b)キメラ毒素遺伝子に導入することができ、pMYC2224が作製された。pMYC1260などのcryIF含有プラスミドから採ったcryIF遺伝子の領域をPCRによって作成して、pMYC2224のcryIA(c)/cryIA(b)遺伝子のBamHI-PvuI断片と置き換えることができる。pMYC2239と名付けた新しいプラスミドは、毒素/プロ毒素分節の接合部にcryIFが続くcryIA(c)の短い分節を含んでいた。このように、プロ毒素分節は、cryIA(b)(pMYC1050)由来であった。cryIFクローン(pMYC2047)に由来するApaI断片で、pMYC2239のApaI断片を置き換えた。この結果できたクローン(pMYC2244)は、開始メチオニンから毒素/プロ毒素分節の接合部までがcryIFで、コーディング領域の終わりまでがcryIA(b)となる。クローンpMYC2243は、限定された領域にサイレントなコドン変更を導入するため、SOEによって構築された。サイレントな変異をもつpMYC2243のApaI断片で、pMYC2244のApaI断片を置き換えクローンpMYC2523を作製した。キメラpMYC2523はpMYC2243よりも高い発現を示したが、cryIF蛋白質の配列には変化がない。

cryIF/436キメラは、pMYC2523の断片でPvuI-BstEIIの蛋白質部分を含む部分を、cryIA(c)/cryIA(b)遺伝子をもつプラスミドからPCRで作製した等価的な断片と置き換えることによって作製された。このような遺伝子の一つが436遺伝子である(例えば、米国特許第5,128,130号および第5,169,760号で開示されているpMYC467)。この構築物も、天然のcryIF蛋白質配列に較べて高い発現を示す。

本発明のキメラ毒素は、B.t.毒素の全長コアN末端毒素部分を含み、この蛋白質は、毒素部分の終点を越えたある部位で、異種のプロ毒素配列に移行する。毒素/プロ毒素接続部位付近で異種のプロ毒素分節への移行が起こるようにしてもよく、または異種プロ毒素への移行をもっと下流で起こるようにして、本来のプロ毒素の一部(毒素部分を越えて延びる部位)を維持してもよい。実施例として、本発明のキメラ毒素の一つは、cryIFの全毒素部分(アミノ酸1～601)と異種のプロ毒素部分(アミノ酸602からC末端まで)をもつ。好ましい態様において、プロ毒素の異種部分は、cryIA(b)毒素または436毒素に由来する。

当業者は、B.t.毒素の、毒素部分からプロ毒素部分へ移行するまでの長さや正確な位置は、たとえcryIFなどの一定のクラス内においても、ある程度は異なっていることを認識するであろう。典型的には、cryIA(b)毒素およびcryIF毒素は、およそ1150アミノ酸から1200アミノ酸の長さである。毒素部分からプロ毒素部分への移行は、典型的には、毒素全長の約50%から60%の間で起こる。本発明のキメラ毒素は、このN末端側のコア毒素部分の全範囲を含む。したがって、キメラ毒素は、全長cryIF B.t.毒素の少なくとも約50%を含む。これは、典型的には少なくとも約590アミノ酸である。プロ毒素部分に関しては、cryIA(b)プロ毒素部分の全範囲が、毒素部分の終わりから分子のC末端まで延びている。この部位の終わりの100から150アミノ酸を、本発明のキメラ毒素に含ませることが最も重要である。本明細書において特に例示されたキメラ毒素において、cryIA(b)分子の、少なくともアミノ酸の1043(配列番号23)からC末端までが利用されている。配列番号23のアミノ酸1043の前には、Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys(配列番号31)の配列がある。このアミノ酸配列は、キメラ毒素の中のその後の位置でいつも異種のアミノ酸に変わる、分子のプロ

毒素分節の位置を示している。別の実施例において、配列番号31で示されるペプチドがアミノ酸1061から1068に存在する。この場合、アミノ酸1069からC末端までが、好ましくは異種のものである(配列番号29)。配列番号31に示されているペプチドは、図９の1061から1068の位置に見られる。このように、少なくとも、全B.t.蛋白質の末尾の約5%から10%が、本発明のキメラ毒素に含まれる異種DNA(cryIFコアN末端毒素部分)を含まなければならない。本明細書に含まれる特別な実施例において、異種プロ毒素配列は、アミノ酸640からC末端までに存在する。

このようにして、本発明の好ましい態様は、約1150アミノ酸から1200アミノ酸の長さのキメラB.t.毒素で、このキメラ毒素は、全cryIF分子の約50から60%以上を含むが、約90から95を超えない、cryICのコアN末端毒素部分を含むものである。キメラ毒素は、さらに、cryIA(b)または436分子の少なくとも約5%から10%を含むcryIA(b)または436プロ毒素のC末端部位を含む。このように、cryIFからcryIA(b)または436配列への移行は、分子全体に対して、約50%と95%の間の、プロ毒素分節の中(または毒素分節とプロ毒素分節の接続部位)で起きる。本明細書において提供された特別な例において、cryIF配列から異種のプロ毒素配列への移行は、配列番号31に示されるペプチド配列の末端の前で起きる。

本発明の特別な態様は、図９で示されるキメラ毒素である。本明細書において提供された開示によって利益を受ける当業者が、別の構築物を作成し、用するかもしれない。cryI蛋白質のコア毒素分節は特徴的な末端の配列、Val/Leu Tyr/IleIle Asp Arg/Lys Ile/Phe Glu Ile/Phe/Leu Ile/Leu/Val Pro/Leu Ala/Val Glu/Thr/Asp(配列番号30)をもち、配列番号23の601番目の残基で終わる。さらに、cryI毒素のプロ毒素分節(601残基目に続く部分)は、毒素分節よりも配列類似性が高い。この配列類似性によって、当業者は、cryIF配列とcryIA(b)または436配列との間でキメラ蛋白質を作るために、プロ毒素分節の移行部位を容易に判定することができる。cryI遺伝子の部分的な蛋白質分解に関するデータを調べると、cryIプロ毒素の保存的配列、図９の部位1061～1068位の後部に、異種の保存性が低いアミノ酸領域が見られる。

したがって、本発明のキメラ毒素は、全cryIF毒素と、毒素分節(上で定義されている)の終わりと配列番号31で示されるペプチド配列の間のいずれかのcryIA(b)または436配列に移行しているcryIFプロ毒素の一部を含むことができる。好ましくは、キメラ毒素のC末端側のアミノ酸配列は、cryIA(b)配列もしくは436遺伝子の配列、またはこれらのいずれかと同等の配列を含む。

CryIF毒素、およびこれらの毒素をコードする遺伝子は、当業者によく知られている。CryIF遺伝子および毒素は、例えば「Chambers et al., (1991) J. Bacteriol. 173:3966」に開示されている。cryIA(b)遺伝子および毒素は、例えば「Hoefte et al. (1986) Eur. J. Biochem. 161:273」、「Geiser et al. (1986) Gene 48:109」、および「Haider et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10927」で説明されている。本明細書に包含される開示の利益を受ける当業者はcryIF分子のN末端毒素部分およびcryIA(b)毒素のC末端側プロ毒素部分をコードするDNAを容易に同定し用いることができるであろう。

図９は、本発明の毒素で用いられたアミノ酸置換の例を提供している。毒素の活性を変えることなく、さまざまな突然変異を毒素の配列中に作出することができることも当業者によく知られている。さらに、遺伝子コードの縮退により、一つの毒素をコードするさまざまなDNA配列を用いることもできる。当業における熟練者は、本発明にしたがって、このような代替的DNAおよびアミノ酸配列を用いることができる。

本発明のプロ毒素置換技術は、他の種類のB.t.内毒素によって、毒素の発現を促進するために用いることができる。この技術は、配列番号30に示された特徴的な配列をもつ、他のB.t.毒素に対して最も応用性が高いであろう。

本発明は、新規なキメラ毒素およびそれらの毒素をコードする遺伝子を含むだけでなく、これら新規な毒素および遺伝子の利用をも含む。例えば、本発明の遺伝子は、宿主細胞の形質転換に用いることができる。遺伝子を発現し、キメラ毒素を産生するこれらの宿主細胞は、殺虫用組成物に用いることができ、または形質転換された植物細胞の場合には、形質転換細胞それ自体に害虫抵抗性を与えるために用いることが可能である。

遺伝子と毒素　本発明による有用な遺伝子および毒素は、開示された全長配列だけでなく、本明細書において特に例示された毒素の殺虫活性特性を保持している、これらの配列の断片、異型、および変異体も含む。本明細書において用いられるように、遺伝子の「異型」または「変異」という語は、同じ毒素をコードするヌクレオチド配列、または同等の殺虫活性をもつ毒素をコードするヌクレオチド配列を意味する。本明細書において用いられるように、「等価的毒素」という語は、標的害虫に対して、請求の範囲の毒素と同じか、本質的に同じ生物学的活性をもつ毒素を意味する。

いくつかの方法を用いて、活性毒素をコードする遺伝子を同定し得ることができることは、当業者に明らかであろう。本発明による有用な特異的遺伝子(または、毒素またはプロ毒素ドメインをコードするその一部)は、上記の培養細胞寄託機関に寄託されている組み換え単離物から得てもよい。また、これらの遺伝子、またはその一部もしくは変異体を、例えば遺伝子合成機を用いて合成して作成することもできる。遺伝子の変異体は、点突然変異を作出する標準的な技術を用いて、容易に構築することができる。また、標準的な手順にしたがって、市販のエクソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを用いて、これらの遺伝子の断片を作成することもできる。例えば、これらの遺伝子の末端からヌクレオチドを規則正しく切り出すBal31のような酵素を用いることができる。または、部位特異的突然変異誘発を用いることができる。また、さまざまな制限酵素を用いて、活性断片をコードする遺伝子を得ることもできる。これらの毒素の活性断片を直接的に得るために、プロテアーゼを用いてもよい。

例示された毒素の殺虫活性を保持している断片および等価物も、本発明の範囲内にある。また、遺伝子コードの縮重のため、さまざまな異なるDNA配列が、本明細書に開示されたアミノ酸配列をコードすることができる。同じ毒素、または本質的に同じ毒素をコードする代替DNA配列を作成することは、当業者の技術の範囲内に当然含まれる。これらの変異DNA配列は、本発明の範囲内にある。本明細書において用いられるように「本質的に同じ」配列という語は、アミノ酸の置換、欠失、付加、または挿入を有する、殺虫活性または発現レベルに実質的に影響しない配列を意味する。殺虫活性を保持している断片もまた、この定義に含まれる。

本発明の毒素および遺伝子を同定するための、さらに別の方法は、オリゴヌクレオチドプローブを用いることによる。これらのプローブは、検出可能なヌクレオチド配列である。これらの配列は、適当な標識によって検出可能にすることができ、または国際出願番号WO93/16094で開示されているように、最初から蛍光を発するようにしてもよい。当業者によく知られているように、プローブ分子と核酸試料部分が、二分子間で強い結合を形成することによりハイブリダイズすれば、プローブと試料部分は、実質的に相同であるということが合理的に推定できる。好ましくは、例えば「Keller, G.H., M.M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, NY., pp.169-170」で述べられているような、当技術分野において公知の技術によって、厳密な条件下でハイブリダイゼーションを行なう。プローブの検出は、ハイブリダイゼーションが起きたか否かを既知の条件で判定するための方法を提供する。このようなプローブ解析は、本発明の毒素をコードする遺伝子を同定するための迅速な方法を提供する。好ましくは、このような遺伝子は、本発明によるキメラ遺伝子を作出するために、そのコア毒素をコードする部位が、cryIA(b)または436プロ毒素をコードする部位とともに用いられるcryIF遺伝子であろう。本発明によるプローブとして用いられるヌクレオチド分節は、DNA合成機を用いて、標準的な手順で合成することができる。これらのヌクレオチド配列は、本発明の遺伝子を増幅するためのPCRプライマーとして用いることもできる。

本発明の一定のキメラ毒素が、本明細書において特に例示されてきた。本発明が、例示されている毒素と同じか、または類似した殺虫活性をもつ変異体毒素または等価的毒素(および等価的毒素をコードするヌクレオチド配列)を含むことは、いうまでもなく明らかであろう。等価的毒素は、例示されている毒素とアミノ酸相同性を有するものであろう。このアミノ酸相同性は、典型的には75%を超え、好ましくは90%を超え、最も好ましくは95%を超える。生物学的活性の原因となるか、または最終的に生物学的活性に関係する三次

元構造の決定に関与する、重要な毒素領域で、アミノ酸の相同性が最も高い。この点に関して、活性に対して重要ではない領域にあるか、分子の三次元構造に影響しないような保存的アミノ酸の置換である場合には、そのようなアミノ酸置換は受容され、期待される。例えば、アミノ酸は、次のように分類できよう。すなわち、非極性、非荷電極性、塩基性、および酸性。同じ分類の別のアミノ酸で置換される保存的置換は、置換によって化合物の生物学的活性が実質的に変化しない限り、本発明の範囲に含まれる。表１に、それぞれの分類に属するアミノ酸の例を列挙する。

表１

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

場合によっては、非保存的な置換が行われることもある。重要な要素は、これらの置換によって、毒素の生物学的活性が有意に損なわれてはならないということである。

組み換え宿主　本発明のキメラ毒素をコードする遺伝子は、広い範囲の微生物または植物の宿主に導入することができる。毒素遺伝子を発現させると、殺虫性のキメラ毒素が、直接的または間接的に細胞内で産生され、維持される。例えば、シュードモナスなどの適当な微生物宿主を用いて、該微生物を害虫のいる場所に適用し、そこで増殖させ、摂取させることができる。その結果、害虫を制御できる。または、毒素遺伝子を宿している微生物を、毒素活性を持続させ、細胞を安定させる条件の下で処理することができる。

キメラ毒素をコードする遺伝子を、適当なベクターによって微生物宿主に導入し、該宿主を生きたままの状態で環境中に適用する際には、一定の宿主微生物を用いることが重要である。一つまたは複数の目的の作物の「植物圏(phytosphere)」(葉面、葉圏、根圏および/または根面)に居住することが知られている微生物宿主が選択される。これらの微生物は、特定の環境(作物および他の昆虫の生育場所)の中で、野生型の微生物とうまく競合でき、ポリペプチド殺虫剤を発現する遺伝子の安定した維持と発現を提供し、そして好ましくは、周囲の環境の作用による分解および不活化から殺虫剤をよりよく保護できるように選択される。

多数の微生物が、さまざまな重要作物の葉表面(植物の葉の表面)および/または根圏(植物の根の回りの土)に生息していることが知られている。これらの微生物には、細菌、藻類、および菌類が含まれる。特に興味深い微生物は、例えば細菌では、シュードモナス（Pseudomomas）属、エルウィニア（Erwinia）属、セラチア（Serratia）属、クレブシエアラ（Klebsiella）属、キサントモナス（Xanthomonas）属、ストレプトミセス（Streptomyces）属、リゾビウム（Rhizobium）属、ロドシュードモナス（Rhodopseudomonas）属、メチロフィルウス（Methylophilius）属、アグロバクテリウム（Agrobacterium）属、アグロバクター（Agrobacter）属、ラクトバチルス（Lactobacillus）属、アースロバクター（Arthrobacter）属、アゾトバクター（Azotobacter）属、ロイコノストック（Leuconostoc）属、およびアルカリジェネス（Alcaligenes）属、また菌類では、特に酵母、例えばサッカロミセス（Saccharomyces）属、クリプトコッカス（Cryptococcus）属、クルイベロミセス（Kluyveromyces）属、スポロボロミセス（Sporobolomyces）属、ロドトルラ（Rhodotorula）属、およびオウレオバシディウム（Aureobasidium）属である。特に興味深い植物居住性細菌の種は、シュードモナス・シリンゲ（Pseudomonas Syringae）、シュードモナス・フローレセンス（Pseudomonas Fluorescens）、セラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）、アセトバクター・キシリナム（Acetobacter xylinum）、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）、ロドシュードモナス・ス

フェロイデス（Rhodopseudomonas spheroides）、キサントモナス・カンペストリス（Xanthomonas campestris）、リゾビウム・メリオチ（Rhizobium melioti）、アルカリジェネス・エントロファス（Alcaligenes entrophus）、およびアゾトバクター・ビンランディ（Azotobacter vinlandii）であり、植物居住性酵母の種は、ロドトルラ・ルブラ（Rhodotorula rubra）、R.グルチニス（R. glutinis）、R.マリナ（R. marina）、R.アウランチアカ（R. aurantiaca）、クリプトコッカス・アルビダス（Cryptococcus albidus）、C.ディフルエンス（C. diffluens）、C.ラウレンティ（C. laurentii）、サッカロミセス・ロゼイ（Saccharomyces rosei）、S.プレトリエンシス（S. pretoriensis）、S.セレビシエ（S. cerevisiae）、スポロボロミセス・ロセウス（Sporobolomyces roseus）、S.オドラス（S. odorus）、クルイベロミセス・ベロネ（Kluyveromyces veronae）、およびアウレオバシディウム・ポルランス（Aureobasidium pollulans）である。特に重要なのは、色素性細菌である。

遺伝子の維持と発現を安定させる条件の下で、キメラ毒素をコードする遺伝子を、微生物の宿主の中に導入するために、さまざまな方法が利用できる。これらの方法は、当業者によく知られており、例えば米国特許第5,135,867号に開示されており、これは本明細書に参照として包含される。

細胞の処理　上述したように、毒素活性の持続期間を延ばし、細胞を安定化させるために、本発明のキメラ毒素を産生する組み換え細胞を処理することができる。生成される殺虫剤の微小カプセルは、細胞構造内にB.t.毒素を含む。細胞構造は、安定化され、微小カプセルが標的害虫の環境に適用された際に毒素を保護する。適当な宿主細胞には原核生物も真核生物も含まれるが、通常、哺乳類などの高等生物に毒素がある物質を産生しない細胞に制限される。しかし、毒素物質が不安定であるか、または適用されるレベルが非常に低いため哺乳類宿主に対して毒性をもつ可能性がない場合には、高等生物に毒性がある物質を産生する生物が用いられることもある。宿主として、特に重要なのは原核生物、および菌類のような下等真核生物である。

処理を行うとき、場合によっては胞子が用いられることもあるが、細胞は通常、完全な状態の、胞子状態ではなく実質的に増殖形態にある細胞である。

例えば、本発明のキメラ毒素をコードする遺伝子を含む微生物などの微生物細胞の処理は、毒性の性質を損なうような効果を与えたり、毒素を保護する細胞の能力を失わせたりしない限り、化学的方法、物理的方法、または、化学的および/または物理的方法を組み合わせた方法により行うことができる。化学薬品の例はハロゲン化試薬で、特に原子番号17～80のハロゲンである。より特定すると、ヨウ素を用いると、穏やかな条件の下で十分な時間をかければ、所望の結果を得ることができる。他の適当な技術には、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド類、塩化ゼフィラン、塩化セルピリジニウムなどの抗感染薬、イソプロピルおよびエタノールなどのアルコール類、ルゴールヨウ素、ブワン固定液、さまざまな酸、ヘリー固定液（Helly's fixatives）などの組織固定剤(Humason, Gretchen L., 動物組織技術(Animal Tissue Techniques),W.H. Freeman and Company, 1967)、または細胞が宿主の環境に投与されたとき細胞で産生される毒素の活性を保護し活性を引き延ばす、物理的(熱による)薬剤と化学薬剤との組み合わせなどがある。物理的方法の例としては、ガンマ線照射およびX線照射などの短波長放射線、凍結、UV照射、凍結乾燥などがある。微生物細胞の処理に関する方法は、米国特許第4,695,455号および第4,695,462号に開示されており、これらは本明細書に参照として包含される。

細胞は、通常、環境条件に対する抵抗性が増すように、構造的な安定性を強化できる。殺虫剤は前駆体で存在しているため、細胞処理方法は、標的病原害虫によって前駆体をプロセッシングして成熟した殺虫剤の状態になるのを阻害しないようのものを選択すべきである。例えば、ホルムアルデヒドは、蛋白質を架橋させてしまうために、ポリペプチド殺虫剤前駆体のプロセシングを阻害する可能性がある。処理方法は、少なくとも毒素の生物学的利用能または生物活性の実質的な部位を保持するものでなければならない。

宿主細胞を作出するという目的で宿主を選択するに当たって特に重要な特性には、宿主への遺伝子導入の容易性、発現系の利用可能性、発現効率、宿主中での殺虫剤の安定性、お

よび補助的な遺伝的因子の存在が含まれる。殺虫用微小カプセルとして用いらるための重要な特性には、厚い細胞壁、色素形成、細胞内パッケージングまたは封入体形成などの殺虫剤を保護する特質、水中環境でも生存すること、哺乳類に対する毒性がないこと、害虫が摂食に誘引されること、毒素を損なうことなく殺しやすく固定しやすいことなどが含まれる。他の考慮すべき事項には、処方および取り扱いの容易性、経済性、貯蔵安定性などが含まれる。

細胞の増殖　本発明のキメラ毒素をコードする遺伝子を含む細胞性宿主は、組み換え遺伝子をもつ細胞のすべて、または実質的にすべてが選択できるような選択培地を提供して、DNA構造物が有利な選択性を備えているような都合のよい栄養培地中で増殖させてもよい。次に、これらの細胞を従来からの方法に従って回収する。または、回収前に細胞を処理してもよい。

処方　本明細書に開示されたキメラ毒素をコードする遺伝子を含む組み換え微生物は、餌用の顆粒にして土を撒くことができる。処方した産物は、種子の被覆または根の処理剤として利用することもでき、また作物の生活史のもっと後の段階で全植物体を処理するときに用いることもできる。植物および土壌処理剤は、無機質(葉珪酸塩、炭酸塩、硫酸塩、リン酸塩など)または植物性物質(粉末にしたトウモロコシの穂軸、イネの籾殻、クルミの殻など)などのさまざまな不活性物質と混ぜて、可溶性の粉末、顆粒または粉剤の形で用いられる。この処方剤には、展着増強剤、安定化剤、他の殺虫性添加剤、または界面活性剤が含まれていてもよい。液体処方薬は、水性でも非水性でもよく、泡状、ゲル状、懸濁液、乳化濃縮液などの形で用いられる。成分には、流動剤、界面活性剤、乳化剤、分散剤、またはポリマーが含まれていてもよい。

当業者にはよく認識されているように、殺虫効果がある濃度は、それぞれの処方の性質によって大きく異なり、特に、濃縮して用いるか、直接用いるかによって異なる。殺虫剤は、重量にして1%以上であるが、重量にして100%のこともある。乾燥処理剤では、殺虫剤が重量にして約1～95%あるが、液体処方剤では、一般的に、水相中の固体の重量で1～60%である。処方剤は、一般的に、約10^2から約10^4細胞数/mgである。これらの処方剤を、1ヘクタール当たり約50mg(液体か乾燥重で)から1kg以上散布する。

処方剤は、例えば土壌および葉などの害虫のいる環境に、噴霧や粉末散布、散水などによって散布することができる。

材料と方法

電気溶出したDNAの精製には、NACS(ベセスダ研究所（Bethesda Research Labs）、メリーランド州ゲティスバーグ)カラム・クロマトグラフィーを用いた。精製は、緩衝液を、結合には0.5X TBE/0.2M NaCl、溶出には0.5X TBE/2.0M NaClに修正した点を除いて、製造業者の指示に従って行なった。

α-[^{32}P]dATPによるDNAのランダムプライマー標識を、製造業者の指示に従い、キット(ベーリンガー・マンハイム・バイオケミカルズ(Boehringer Mannheim Biochemicals)、インディアナ州インディアナポリス)を用いて行なった。

ゲル精製とは、選択したDNA断片について、アガロース-TBEゲル電気泳動、電気溶出、およびNACSカラムクロマトグラフィーを連続して行うことを云い、これらの方法は当業者において周知のものである。

DNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅は、パーキン-エルマー社(コネティカット州ノーウォーク)のサーマルサイクラーで、以下のサイクル変数に従って25サイクル行なった。すなわち、94℃で1分間、37℃で2分間、72℃で3分間(72℃のサイクルのときは、それぞれ5秒間の伸長時間を設ける)。PCR DNA産物は、クローニング効率を上げるためにプロテアーゼKで処理した(Crowe, J.S., Cooper, H.J., Smith, M.A.,Sims, M.J., Parker, D., Gewert, D.［1991］Nucl. Acids Res. 19:184)。

オリゴデオキシリボヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)を、アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems)(カリフォルニア州フォスター・シティー)のモデル381ADNA合成機で合成した。必要に応じて、製造業者の指示に従ってネンソーブ（Nensorb）カラム(ニューイングランドヌクレア-デュポン社（New England Nuclear-Dupont）、デラウエア

州ウィルミントン)で精製を行なった。
シュードモナス・フローレセンスのエレクトロポレーションは、回転振とう機上、L-ブロス(LB)中30℃で増殖させた対数増殖期の細胞を用いて行なった。氷冷した滅菌蒸留水で細胞を2、3回洗って、滅菌水で最初の容量の0.03倍に濃縮した。1～20μlのDNAを50～300μlの細胞と混ぜた。バイオラドジーンパルサー（Biorad Gene Pulser）(バイオラド社、カリフォルニア州リッチモンド)のために選ばれたパラメーターは、0.2cmの電極間隔をもつキュベットにおいて、200オーム、25μファラッド、2.25キロボルトであった。エレクトロポレーションの後、1ミリリットルのLBを加え、少なくとも2分間氷上に置いた。そして、2時間から一晩、30℃で静置培養した。
P.フローレセンスにおけるB.t.毒素の発現は、「一般細菌学のための実験マニュアル（Manual of Methods for General Bacteriology）」(P. Gerhardt et al., 1981, American Society for Microbiology, Washington,D.C.)に記載されている推奨培地で行なった。グルコースの代わりにグリセロールを用いた。水道水で調製し、pHは7.2に合わせた。シードフラスコはL-ブロスから作製した。以下の調製物を用いた。

基本培地(1リットル当たり)

グリセロール	65 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
Na_2HPO_4	5.24g
KH_2PO_4	2.77g
酵母抽出物	5.0 g
カザミノ酸	1.0 g

金属44(100ml当たり)

EDTA	250 mg
$ZnSO_4・7H_2O$	1095 mg
$FeSO_4・7H_2O$	500 mg
$MnSO_4・H_2O$	154 mg
$CuSO_4・5H_2O$	39.2mg
$Co(NO_3)_2・6H_2O$	24.8mg
$Na_2B_4O_7・10H_2O$	17.7mg

沈殿を遅らせるために、6N H_2SO_4を数滴加える。

ハンターの無機混合液(1リットル当たり)

酢酸ニトリル(溶解して、KOHで中和する)	10 g
$MgSO_4・7H_2O$	14.45g
$CaCl_2・2H_2O$	3.33g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}・4H_2O$	9.25g
$FeSO_4・7H_2O$	99 mg
金属44	50 ml

pHを6.6～6.8に調整する。
B.t.毒素の発現を解析するための接種をする時に、培地200ml当たり4mlのハンターの無機混合液を加えた。一晩培養した培地の容量に対して2%の接種原を、フラスコに加えた。培養液を24時間、32℃で200rpm以上で振とうしながら増殖させた。この時点で、0.75mMのIPTGを発現誘導を行ない、2gの酵母抽出物を補充した。48時間後と72時間後に採った試料部分を蛋白用ゲルで泳動した。レーザー・デンシトメーターによって、約130kDaの蛋白質を定量した。
以下は、本発明を実施するための最良の態様を含む、実験方法を例示した実施例である。これらの実施例は、本発明を制限するものではない。別記されない限り、すべてのパーセントは重量比であり、溶液の割合は容量比である。

実施例１－スプライスオーバーラップ伸長（SOE）による発現ベクターの改変

クローニングベクターを、RSF1010(pTJS260は、U.C.サンディエゴ校のドナルド・ヘリンスキー博士（Dr.Donald Helinski）から入手可能)由来の、広範な宿主域を有するプラス

ミドpTJS260を基本として構築することができる。ベクター構築に用いられる系の例は、EP0特許出願0 471 564に見られる。本明細書において436遺伝子および毒素と名付けたcryIA(c)/cryIA(b)遺伝子は、米国特許第5,055,294号に開示されている。pMYC1050と名付けたプラスミドは、420遺伝子として知られているcryIA(c)/cryIA(b)キメラ遺伝子を含む。pMYC1050は、毒素遺伝子およびpM3,130-7(米国特許第5,055,294号で開示されている)を、当業で周知の方法によって、pMYC467(米国特許第5,169,760号で開示されている)などのpTJS260から作ったベクターに再クローニングして構築された。特に、pM3,130-7プロモーターおよび毒素遺伝子をBamHI-NdeI断片として得て、この断片を同じ部位(12100塩基目付近のBamHIと8000塩基目付近のNdeI)に結合した断片と入れ換えて、pMYC467プラスミドの中に入れることができる。

改良ベクターは、理想的には1個だけBamHIクローニング部位をもつ。プラスミドのBamHI部位はtacプロモーター(Ptac)の上流にあるが、クレノウ酵素で平滑末端化し、ライゲーションし直すことによって除去することができる(図１)。この部位がなくなったことは、制限酵素消化によって確認できる。この手順に従って、作出したプラスミドをpMYC1050ΔBamHIと呼ぶ。構築物には、SOE突然変異誘発によって、BamHI部位がプラスミドに付け加えられている。SOE突然変異誘発は、プラスミドから毒素を含むNsiI DNA断片を、選抜マーカーとしてアンピシリン抵抗性(bla)遺伝子を用いる、より小さなpGEM5（Promega Corp.,Madison,WI）中にサブクローニングにすることによって効率的に行うことができる(図１)。断片は制限酵素消化によって方向性を決定することができる。このような処理によって作成されたプラスミドをpGEMtoxと名付けた。

毒素をコードする領域にあるDNAに、SOEのPCRが介在する技術によって、図２に示したような制限酵素クローニング部位を導入するために突然変異を起こさせた。プライマーとして用いられたオリゴヌクレオチドを下に示す。

「A」（配列番号1）
5’ GCATACTAGTAGGAGATTTCCATGGATAACAATCCGAAC3’

「B」（配列番号2）
5’ GGATCCGCTTCCCAGTCT3’

「C」（配列番号3）
5’ AGAGAGTGGGAAGCGGATCCTACTAATCC3’

「D」（配列番号4）
5’ TGGATACTCGATCGATATGATAATCCGT3’

「E」（配列番号5）
5’ TAATAAGAGCTCCTATGT3’

「F」（配列番号6）
5’ TATCATATCGATCGAGTATCCAATTTAG3’

「G」（配列番号7）
5’ GTCACATAGCCAGCTGGT3’

pMYC1050のDNAを、プライマーセットA/B、C/D、E/DおよびF/Gを使用したPCR増幅のための鋳型として用いた。増幅したDNA断片をAB、CD、EDおよびFGと名付けた。増幅したDNAは、当技術分野において周知のアガロース-TBEゲル電気泳動、電気溶出、およびNACSカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した鋳型DNAを、２回目のPCR反応に用いた。断片ABとCDを混合し、プライマーAおよびDで増幅した。別の反応において断片EDとFGを混ぜて、プライマーEおよびGを用いて増幅した。増幅されたDNAをアガロース-TBEゲル電気泳動によって解析し、相当してサイズが増加した断片を切り出し、電気溶出し、当業において周知の方法によって、NACSカラムにかけて精製した。増幅したDNA断片は、参照のためにADまたはEGと呼ばれる。

新しい制限酵素部位をもつDNA断片ADまたはEGを、いくつかのサブクローニング実験によって毒素を含むDNAの中に取り込んだ(図２および３)。pGEMtoxをClaIまたはHindIIIで制限酵素消化した。ベクターを含むDNAをゲル精製した。断片ADをCalI消化して、ClaI消化したpGEMtoxベクターDNAとライゲーションした。断片EGをHindIIIで制限酵素消化して、H

indIII消化したpGEMtoxベクターDNAライゲーションした。ライゲーション混合液で大腸菌株NM522を形質転換した。単離されたコロニー由来のプラスミドDNAを制限酵素消化することにより、正しく構築された構築物を同定した。新しいBamHI部位をもつプラスミドをpGEMtoxBamHIと名付けた。新しいPvuI部位をもつプラスミドをpGEMtox PvuIと名付けた。プラスミドpGEMtox BamHI由来のBamHI部位をもつClaI断片を、pGEMtox PvuI由来のClaI部位で切断したベクターを含む断片をフォスファターゼ処理したものとライゲーションした。ライゲーション混合液で大腸菌株NM522を形質転換した。プライマーセットC/DによるPCR解析および制限酵素消化によって、正しく構築された構築物を同定した。新しい制限酵素部位をもつプラスミドをpGEMtox BamHI/PvuIと名付けた。

pGEMtoxBamHI/PvuIからの挿入配列とpMYC1050ΔBamHIからのベクターを構築して発現ベクターを完成した(図３および４)。ゲル精製した挿入配列を、(混入したベクターを除去するため)NsiI消化およびScaI消化によって、pGEMtoxBamHI/PvuIから調製した。これを、ゲル精製したNsiIで消化したベクターを含むpMYC1050ΔBamHI DNAライゲーションした。ライゲーション混合液で大腸菌株NM522を形質転換し、形質転換混合液を、テトラサイクリンを12μg/mlの濃度で含むLB寒天培地に塗布した。NsiI挿入配列を含むコロニーを、コロニーハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーによって同定した。NsiIクローニング部位の両側に位置するプライマーセットA/Dを用いて、PCRによって挿入配列の方向を決め、アガロース-TBEゲル電気泳動をした。正しく組み立てられたプラスミドをpMYC2224と名付けた。毒素のDNAおよび蛋白質の配列を、それぞれ配列番号18および19に示す。ラクトースで誘導できるP.フローレセンスの菌株に正しく組み立てられたプラスミドをエレクトロポレーションした。形質転換混合液を、テトラサイクリンを20μg/mlの濃度で含むLB寒天培地に塗布した。次のクローニング実験に用いるために、P.フローレセンスからプラスミドDNAを調製した。

実施例２－cryIF超可変領域のpMYC2224へのサブクローニング

cryIF(pMYC1260)由来の超可変領域を含むDNA断片を、pMYC2224由来の毒素を含むBamHI－PvuI DNA断片と入れ換えた(図４)。コーディング配列にはすでにBamHI部位が存在するため、クローニングにはBglI部位を選択した。4塩基の突出配列がBamHIとBglIで共通なため、この二つの部位が結合部分から失われることにはなるが、ライゲーションすることが可能である。PCR用に新しいプライマーを合成する必要があった。

「L」(配列番号8)

5’GAGTGGGAAGCAGATCTTAATAATGCACAATTAAGG3’

pMYC1260と鋳型にし、プライマーL/Dを用いたPCRによって、毒素を含むDNA断片を作製した。サブクローニングのために、DNAをBglIIとPvuIで消化した。tetAR遺伝子は、多数のPvuI部位を含むため、二つの別々の断片から、ベクターを含むDNAを単離する必要があった。第一の断片を得るため、pMYC2224をBamHIおよびBstEIIで消化して、Ptac-tetAR遺伝子座rep機能を含む大きなDNA断片をゲル精製した。第２の断片を得るために、pMYC2224をBstEIIおよびPvuIで消化して、ベクター－プロ毒素分節を含むDNA断片をゲル精製した。3つの断片のライゲーションが行われ、大腸菌株NM522が形質転換に用いられた。BamHI/BglI融合部位の両側に位置する、プライマーセットN/Oを用いたPCR解析およびアガロース－TBEゲル電気泳動によって、大体正しいプラスミドを同定した。

「N」(tacプロモーター)(配列番号9)

5’TTAATCATCGGCTCGTA3’

「O」(配列番号10)

5’ACTCGATCGATATGATA(GA)TCCGT3’

正しいプラスミドにpMYC2239という名前を付けた。このプラスミドは、アミノ末端にcryIA(c)、毒素/プロ毒素接続部までcryIF、プロ毒素分節にcryIA(b)を含む。毒素のDNAおよび蛋白質の配列を、それぞれ配列番号20および21に示す。

実施例３－P.フローレセンス発現プラスミドpMYC1260およびpMYC2047の構築

P.フローレセンスで発現させるために、クローン化された毒素遺伝子CryIFを以下のようにして改変した。

１．pTJS260由来のベクター(Dr. Donald Helinski, U.C. San Diego)の中のpKK223-3 rrnB終結配列を含むプラスミドは、pKK223-3(ファルマシア社の大腸菌ベクター)由来のPtacプロモーターおよびrrnBターミネーターを含むBamHI-ScaI断片を、pMYC1197（EP 0 417 564で説明されている）の、BamHIから平滑化したKpnIまでの断片とライゲーションすることにより作製できる。構築されたプラスミドは、大腸菌を形質転換して、テトラサイクリン選択条件下で培養した後、回収する。

２．pMYC1603(NRRL B-18517)からの約3800bpの、毒素遺伝子を含むNdeI-NdeI断片(DNAポリメラーゼおよびdNTPを用いて末端を平滑化してある)を、pKK223-3のEcoRIおよびHindIII部位を平滑化したものとライゲーションして、Ptacプロモーター付きのcryIF毒素遺伝子を含むプラスミドを作製することができる。大腸菌を形質転換した後、アンピシリン選択条件下で増殖させ、当技術分野においてよく知られている技術によって、Ptacプロモーターからの発現のための正しい方向に挿入配列が入っているプラスミドをスクリーニングして、Ptacプロモーター付きのcryIF毒素プラスミドを回収することができる。

３．プラスミドpTJS260由来のBamHIおよびApaI末端を有する2.4kbのDNA断片、上記段階１のプラスミドの複製領域を含む8.5kbのApaIからHindIIIまでの断片、および上記段階２のPtacプロモーターおよびcryIF毒素遺伝子を含むHindIIIから部分消化したBamHIまでの断片を用いた、3断片ライゲーションによって、Ptacプロモーター付きのcryIF毒素を、pTJS260由来のベクターへと構築することができる。

この結果できるpTJS260由来のcryIF毒素発現プラスミド(pMYC1260)を、エレクトロポレーションによって、P.フローレセンスへと導入することができる。

４．プライマーHおよびKを用いた、適当なcryIF鋳型のPCRによって得られるSpeIからKpnIまでの断片をSpeIとKpnIで消化しゲル精製したもの、段階３のプラスミド由来の約10kbのApaIからKpnIまでの断片、およびPtacプロモーターを含むpYMC1197から約2600bpのApaIからSpeIまでの断片をライゲーションすることにより、pYMC2047を構築することができる。プラスミドを制限酵素消化して正しいcryIF毒素発現プラスミドを判定した後、エレクトロポレーションによって、P.フローレセンスに導入する。

実施例４－cryIF/cryIA(b)キメラの構築

簡単で単純な交換によって、アミノ末端側のcryIA(c)分節を、cryIFをコードする配列に置き換えることができる(図５)。tetAR座位にもcryIFコーディング配列にもApaI部位が含まれている。tetAR遺伝子の一部およびcryIFのN末端側を含む、ApaI小断片をpMYC2047から単離して、pMYC2239由来のベクターを含むApaI大断片とライゲーションすることができる。ライゲーション混合液をP.フローレセンスのラクトース誘導系統にエレクトロポレーションして、テトラサイクリンを20μg/ml含むLB寒天培地に塗布することができる。ラクトース誘導系統は、当業者に知られており、例えば米国特許第5,169,760号に開示されている。ApaI断片が正しい方向に入っていれば、再びテトラサイクリン抵抗性になる。このような方法で作出されたクローンが、大体正しいことを、制限酵素消化で確認し、pMYC2244と名付けた。毒素DNAの配列が、配列番号22に示されており、推定蛋白質配列が配列番号23に示されている。

実施例５－cryIFの限定されたコドン再加工物の構築

GenBank/EMBL配列ライブラリーの遺伝子を解析して決定したところ、トリプレットコドンのゆらぎ位置におけるシュードモナス種のコドン使用は、GまたはCが適している。SOEによって、サイレントな好ましいゆらぎ位置変化を導入してcryIF遺伝子の限定された領域を再加工した(図６)。用いられたオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

「H」(配列番号11)

5’ GGACTAGTAAAAAGGAGATAACCATGGAAAATAATATTCAAAATC3’

「I」(配列番号12)

5’ TCCAGCGGCAGGCGGCCGGTGCTGCGTTCTTCGTTCAGTATTTCTACTTCAGGATTATTTAAAC3’

「J」(配列番号13)

5’ AACGCAGCACCGGCCGCCTGCCGCTGGACATCAGCCTGAGCCTTACACGTTTCCTTTTGAGTGAA3’

「K」(配列番号14)

5’ CATCAAAGGTACCTGGT3’

プライマーセットH/IまたはJ/Kによって、pMYC2047を鋳型とする、二つのPCR反応を別々に行なった。断片HIとJKを混ぜ、プライマーセットH/KでPCR増幅することにより、第二のPCR反応を行なった。大きい方のSOE DNAをゲル精製し、SpeIおよびKpnIで消化した。SpeI-ApaI Ptac-tetAR座位のDNA、ApaI-KpnIベクター－プロ毒素のモジュールDNA、およびSpeI-KpnI PCR DNAを用いる3断片ライゲーションを行なった。ライゲーション混合液をP.フローレセンスのラクトース誘導系統にエレクトロポレーションする。プライマーセットP/Qを用いたPCR解析およびアガロース-TBEゲル電気泳動によって、大体正しいクローンを同定することができる。オリゴP(配列番号15)は、野生型遺伝子と再加工遺伝子を区別できるように設計されている。

「P」(配列番号15)

5’ TGCCGCTGGACATCAGCCTGAG3’

「Q」(配列番号16)

5’ TCTAGAGCGGCCGCTTATAC(CT)CGATCGATATGATA(GA)TCCGT3’

完成したプラスミドをpMYC2243と名付けた。毒素のDNA配列が配列番号24に示されている。毒素蛋白質の配列は変化しないと推定されるが、配列番号25に示される。

実施例６－限定的なコドン再加工物を含むcryIF/cryIA(b)キメラの構築

上記pMYC2244(cryIF/cryIA(b))で述べた、同じApaI断片の交換法を用いて、構築物を組み立てた(図７)。毒素-tetAR座位の、小さなApaI DNA断片をpMYC2243からゲル精製した。大きい方のベクター-プロ毒素モジュールApaI DNA断片は、pMYC2244からゲル精製した。完成したプラスミドをpMYC2523と名付けた。推定されるDNAおよび蛋白質の配列を、それぞれ配列番号26および27に示す。

実施例７－pMYC2243およびpMYC2523からの毒素発現の比較

P.フローレセンスにおける毒素の発現を上記のようにして解析した。誘導後24時間目と48時間目では、pMYC2523を含む菌株の方が、pMYC2243を含む菌株よりも多くの毒素を産生した。スポドプテラ・エキシグア（Spodoptera exigua）に対する毒素特異的な活性は、統計的には変化していなかった。

実施例８－限定的なコドン再加工物を含むcryIF/436キメラの構築

pMYC2523のcryIA(b)プロ毒素を436プロ毒素モジュールに置き換えて、第二の型のキメラ毒素を組み立てた(図８)。436プロ毒素配列は、ちょうどC末端を除いて、cryIA(c)配列から構成される(米国特許第5,128,130号および第5,169,760号を参照、これらは本明細書に全体が参照として包含される)。pMYC467(米国特許第5,169,760号)などのプラスミドを鋳型に用いて、プライマーセットF/Mを用いたPCRによって、クローニングのためのプロ毒素DNAを作製した。

「M」(配列番号17)

5’ AGGCTTCCATAGATACCTTGTGCG3’

PvuIおよびBstEIIでPCR DNAを消化した。pMYC2523由来のSpeI-PvuI毒素DNA、pMYC2523由来のSpeI-BstEIIベクターDNA、およびPvuI-BstEII PCRプロ毒素モジュールDNAを用いて3断片ライゲーションを行なった。ライゲーション混合液をP.フローレセンスのラクトース誘導系統にエレクトロポレーションした。プライマーセットF/Gを用いたPCR解析およびアガロース-TBEゲル電気泳動によってサイズが少し大きくなったものをスクリーニングすることによって、大体正しいクローンを同定した。構築物にpMYC2254という名前を付けた。推定されるDNAおよび蛋白質の配列を、それぞれ配列番号28および29に示す。

実施例９－pMYC2243とpMYC2254からの毒素発現の比較

上述のようにして、P.フローレセンスにおける毒素発現を解析した。pMYC2254からの毒素発現は、pMYC2243の発現よりも高くなっていた。

実施例10－キメラ毒をコードする遺伝子の植物への挿入

本発明の一つの面は、殺虫性毒素をコードする遺伝子で植物を形質転換することである。形質転換された植物は、標的害虫による攻撃に対して抵抗性になる。

本明細書に開示されているように、当技術分野においてよく知られているさまざまな技術

を用いて、キメラ毒素をコードする遺伝子を植物細胞に導入することができる。例えば、高等植物に外来遺伝子を挿入するための調製物として、大腸菌での複製系および形質転換細胞の選抜を可能にするマーカーを含む、多数のクローニングベクターが利用できる。ベクターには、例えばpBR322、pUC系、M13mp系、pACYC184などが含まれる。それぞれに応じて、B.t.毒素をコードする配列を、適当な制限酵素部位でベクターに挿入することができる。できたプラスミドを、大腸菌の形質転換に用いる。大腸菌の細胞を適当な栄養培地で培養してから、回収して溶菌する。プラスミドを回収する。配列解析、制限酵素解析、電気泳動、その他の生化学-分子生物学的方法が、解析方法として一般的に行われる。各操作の後、用いたDNA配列を切断して、次のDNA配列につなげる。それぞれのプラスミドの配列は、同じプラスミドまたは別のプラスミド中にクローニングすることができる。目的の遺伝子を植物に挿入する方法によっては、別のDNA配列が必要になることもある。もし、例えば、TiまたはRiプラスミドを植物細胞の形質転換に用いるのであれば、TiまたはRiプラスミドT-DNAの少なくとも右側の境界配列、多くの場合左右の境界配列を、挿入される遺伝子に隣接して結合しておかなければならない。

植物細胞の形質転換のためのT-DNAの使用が、熱心に研究され、EP 0 120 516に十分に開示されている。Hoekema (1985) In:バイナリー植物ベクター系(The Binery Plant Vector System), Offset-durkkerij Kanters B.V.,Alblasserdam, Chapter 5；Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4:1-46; An et al., (1985) EMBO J. 4:277-287。

挿入DNAは一旦ゲノムに取り込まれると、通常は、比較的安定に存在し、再び出てくることはない。普通、挿入DNAは、殺生剤または抗生物質、とりわけカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、またはクロラムフェニコールなどに対する抵抗性を、形質転換した植物細胞に付与する選抜マーカーを持っている。よって、それぞれの場合に用いられるマーカーは、挿入DNAを持たない細胞を選抜するのではなく、形質転換細胞を選抜できるものでなければならない。

DNAを植物宿主細胞に挿入するために多数の技術が利用できる。これらの技術には、形質転換体としてアグロバクテリウム(アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）またはアグロバクテリウム・リゾゲネス（Agrobacterium rhizogenes）)を用いるT-DNAによる形質転換、細胞融合、インジェクション、またはエレクトロポレーションが含まれ、その他の方法も可能である。形質転換にアグロバクテリウムを用いるのであれば、挿入されるDNAを特別のプラスミド、すなわち中間ベクターまたはバイナリーベクターにクローニングしておかなければならない。中間ベクターは、T-DNA中の配列に相同な配列によって起こる相同的な組み換えにより、TiまたはRiプラスミドの中に組み込まれることができる。また、TiまたはRiプラスミドには、T-DNAの移行に必要なvir領域が含まれている。中間ベクター自体は、アグロバクテリウムの中で複製することはできない。中間ベクターは、ヘルパープラスミドという手段(接合)でアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）の中に移行して行くことができる。バイナリーベクターは、それ自体、大腸菌でもアグロバクテリウムの中でも複製することができる。バイナリーベクターは、選抜マーカー遺伝子とT-DNAの左右の境界領域によって区切られるリンカーまたはポリリンカーを含む。バイナリーベクターは、アグロバクテリウムを直接形質転換することができる(Holsters et al., [1987] Mol. Gen. Genet. 163:181-187)。宿主細胞として用いられるアグロバクテリウムは、vir領域をもつプラスミドを含むはずである。vir領域は、T-DNAが植物細胞に移行するのに必要とされる。付加的なT-DNAが含まれていてもよい。このようにして形質転換された細菌が、植物細胞の形質転換に用いられる。植物細胞にDNAを移行させるために、植物の外植片をアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）またはアグロバクテリウム・リゾゲネス（Agrobacterium rhizogenes）とともに都合よく培養することができる。そして、選抜のための抗生物質ないし殺生剤を含む適当な培地中で、感染した植物材料(例えば、葉の切片、茎の分節、根、さらにプロトプラストまたは懸濁培養細胞)から全植物体を再生することができる。つぎに、このようにして得られた植物体に挿入DNAが存在することを調べることができる。インジェクションとエレクトロポレーションの場合には、プラスミドに

特別に必要とされる条件はない。例えば、pUC誘導体などの通常のプラスミドを使用することが可能である。
形質転換された細胞は、植物体の中で通常の方法で成長する。それらは、生殖細胞を形成し、後代植物に形質転換した形質を伝達することができる。このような植物を通常の条件で成育させ、同じように形質転換された遺伝的因子をもつ植物または他の遺伝的因子をもつ植物と交配することができる。その結果できる雑種個体はそれぞれに対応する表現形質をもつ。
本発明の好ましい態様において、コドン使用が植物にとって最適化されている遺伝子で植物を形質転換する。また、短縮毒素をコードする植物を用いるのが有利である。短縮毒素は、典型的には、全長毒素の約55%から約80%をコードする。植物で用いるための合成遺伝子を作出する方法は、当技術分野において知られている。
実施例11－キメラ毒素をコードする遺伝子の昆虫ウイルスへのクローニング
多くのウイルスが昆虫に感染することが知られている。これらのウイルスには、例えば、バキュロウイルス（baculoviruses）およびエントモポックスウイルス(entomopoxviruses)が含まれる。本発明の一つの態様において、殺虫性毒素をコードする遺伝子を、本明細書に開示されているようにして昆虫ウイルスのゲノムの中に入れることができ、それによってウイルスの病原性を高めることができる。キメラ毒素遺伝子をもつ昆虫ウイルスを構築する方法については、よく知られており、当業者において容易に実施することができる。これらの実験手順については、例えば、メリーウェザーら(Merryweather, A.T., U. Weyer, M.P.G. Harris, M. Hirst, T. Booth, R.D. Possee (1990) J. Gen. Virol.71:1535-1544)やマルタンズら(Martens J.W.M., G. Honee, D. Zuidema, J.W.M. vanLent, B. Visser, J.M. Vlak (1990) Appl. Environmental Microbiol.56(9):2764-2770)によって説明されている。
本明細書に開示された実施例および態様は、具体例を示すことのみを目的とするものと理解されるべきで、当業者は、これらを考慮することによりさまざまな修正や変更を思いつくはずであるが、それらも本願の本旨および範囲に含まれ、添付の請求の範囲に含まれるものと理解されるべきである。
配列表
（1）一般情報:
（i）出願人:
宛名:MYCOGEN CORPORATION
街路名:5501 Oberlin Drive
市名:San Diego
州名:California
国名:US
郵便番号:92121
電話番号:(619) 453-8030　　ファックス:(619)453-6991
テレックス:
（ii）発明の表題:Chimeric Delta-Endotoxin Expression in Pseudomonas fluorescens
（iii）シーケンス数:21
（iv）文書通信住所:
（A）宛名:David R. Saliwanchik
（B）街路名:2421 N.W. 41st Street, Suite A-1
（C）市名:Gainesville
（D）州名:Florida
（E）国名:USA
（F）郵便番号:32606
（v）コンピーター読み取りフォーム:
（A）メディア形式:Floppy disk
（B）コンピューター:IBM PC compatible

(C) 運転システム:PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア:PatentIn Release #1.0, Version #1.25
(vi) 現行出願情報:
(A) 出願番号:US
(B) 出願日:
(C) 分類:
(viii) 弁護士／代理人情報:
(A) 氏名:Saliwanchik, David R.
(B) 登録番号:31,794
(C) 参照／明細書番号:MA83
(ix) 電気通信情報:
(A) 電話:(904) 375-8100
(B) ファックス:(904) 372-5800
(2) 配列番号:1の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:39塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:1:
GCATACTAGT AGGAGATTTC CATGGATAAC AATCCGAAC 39

(2) 配列番号:2の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:18塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:2:
GGATCCGCTT CCCAGTCT 18

(2) 配列番号:3の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:29塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:3:
AGAGAGTGGG AAGCGGATCC TACTAATCC 29

(2) 配列番号:4の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:28塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:4:
TGGATACTCG ATCGATATGA TAATCCGT 28

(2) 配列番号:5の情報:

(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:18塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:5:
TAATAAGAGC TCCTATGT 18

(2) 配列番号:6の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:28塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:6:
TATCATATCG ATCGAGTATC CAATTTAG 28

(2) 配列番号:7の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:18塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:7:
GTCACATAGC CAGCTGGT 18

(2) 配列番号:8の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:36塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:8:
GAGTGGGAAG CAGATCTTAA TAATGCACAA TTAAGG 36

(2) 配列番号:9の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:17塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:9:
TTAATCATCG GCTCGTA 17

(2) 配列番号:10の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:23塩基
(B) 配列の型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:10:
ACTCGATCGA TATGATARTC CGT 23

(2) 配列番号:11の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:45塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:11:
GGACTAGTAA AAAGGAGATA ACCATGGAAA ATAATATTCA AAATC 45

(2) 配列番号:12の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:64塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:12:
TCCAGCGGCA GGCGGCCGGT GCTGCGTTCT TCGTTCAGTA TTTCTACTTC AGGATTATTT 60
AAAC 64

(2) 配列番号:13の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:65塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:13:
AACGCAGCAC CGGCCGCCTG CCGCTGGACA TCAGCCTGAG CCTTACACGT TTCCTTTTGA 60
GTGAA 65

(2) 配列番号:14の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:17塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:14:
CATCAAAGGT ACCTGGT 17

(2) 配列番号:15の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:22塩基
(B) 配列の型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:15:
TGCCGCTGGA CATCAGCCTG AG 22

(2) 配列番号:16の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:41塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:16:
TCTAGAGCGG CCGCTTATAC YCGATCGATA TGATARTCCG T 41

(2) 配列番号:17の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:24塩基
(B) 配列の型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:DNA (synthetic)
(xi) 配列の記載:配列番号:17:
AGGCTTCCAT AGATACCTTG TGCG 24

(2) 配列番号:18の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:12アミノ酸
(B) 配列の型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:ペプチド
(ix) 配列の特徴
(D) 他の情報:1位のXaaは、ValまたはLeuである；2位のXaaは、TyrまたはIleである；5位のXaaは、ArgまたはLysである；6位のXaaは、IleまたはPheである；8位のXaaは、Ile、Phe、またはLeuである；9位のXaaは、Ile、Leu、Valである；10位のXaaは、ProまたはLeuである；11位のXaaはAlaまたはValである；12位のXaaはGlu、Thr、またはAspである。
(xi) 配列の記載:配列番号:18:
Xaa Xaa Ile Asp Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
5 10

(2) 配列番号:19の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:8アミノ酸
(B) 配列の型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:ペプチド
(xi) 配列の記載:配列番号:19:
Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys
5

(2) 配列番号:20の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:1148アミノ酸
(B) 配列の型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:ペプチド
(xi) 配列の記載:配列番号:20:

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15
Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30
Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45
Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60
Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
195 200 205
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
210 215 220
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
225 230 235 240
Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
245 250 255
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
260 265 270
Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
275 280 285
Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
290 295 300
Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
305 310 315 320
Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
325 330 335
Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro

340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly

355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln

370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile

385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp

405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro

420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp

435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile

450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr

465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr

485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu

500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu

515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe

530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser

545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser

565 570 575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
580 585 590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
595 600 605

Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser
610 615 620

Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
625 630 635 640

Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
645 650 655

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
660 665 670

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
675 680 685

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
690 695 700

Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
705 710 715 720

Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
725 730 735

Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
740 745 750

Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
755 760 765

Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
770 775 780

Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
785 790 795 800

Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe

805 810 815

Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe

820 825 830

Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg

835 840 845

Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr

850 855 860

Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val

865 870 875 880

Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile

885 890 895

His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro

900 905 910

Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu

915 920 925

Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val

930 935 940

Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys

945 950 955 960

Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val

965 970 975

Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro

980 985 990

Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly

995 1000 1005

Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu

1010 1015 1020

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn

1025 1030 1035

Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu
1040 1045 1050
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu
1055 1060 1065
Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu
1070 1075 1080
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn
1085 1090 1095
Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr
1100 1105 1110
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu
1115 1120 1125
Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu
1130 1135 1140
Leu Leu Met Glu Glu
1145

(2) 配列番号:21の情報:
(i) 配列の特性:
(A) 配列の長さ:1174アミノ酸
(B) 配列の型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直鎖状
(ii) 分子の型:ペプチド
(xi) 配列の記載:配列番号:21:

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15
Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45
Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60
Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110
Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
195 200 205
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
210 215 220
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
225 230 235 240
Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
245 250 255
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu

260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu

275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe

290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu

305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr

325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro

340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly

355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln

370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile

385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp

405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro

420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp

435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile

450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr

465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr

485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
565 570 575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
580 585 590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
595 600 605

Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser
610 615 620

Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
625 630 635 640

Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
645 650 655

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
660 665 670

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
675 680 685

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
690 695 700

Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
705 710 715 720

Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu

725 730 735

Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln

740 745 750

Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val

755 760 765

Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro

770 775 780

Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Leu Glu Trp

785 790 795 800

Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His

805 810 815

His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu

820 825 830

Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp

835 840 845

Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu

850 855 860

Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg

865 870 875 880

Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu

885 890 895

Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg

900 905 910

Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg

915 920 925

Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro

930 935 940

Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr

945 950 955 960

Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe
965 970 975

Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu
980 985 990

Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala
995 1000 1005

Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile
1010 1015 1020

Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val
1025 1030 1035

Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser
1040 1045 1050

Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys
1055 1060 1065

Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr
1070 1075 1080

Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser
1085 1090 1095

Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr
1100 1105 1110

Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly
1115 1120 1125

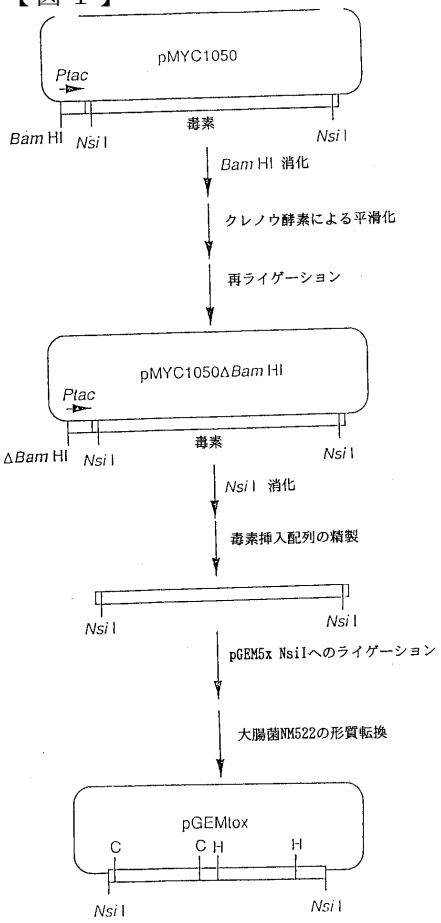
Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu
1130 1135 1140

Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr
1145 1150 1155

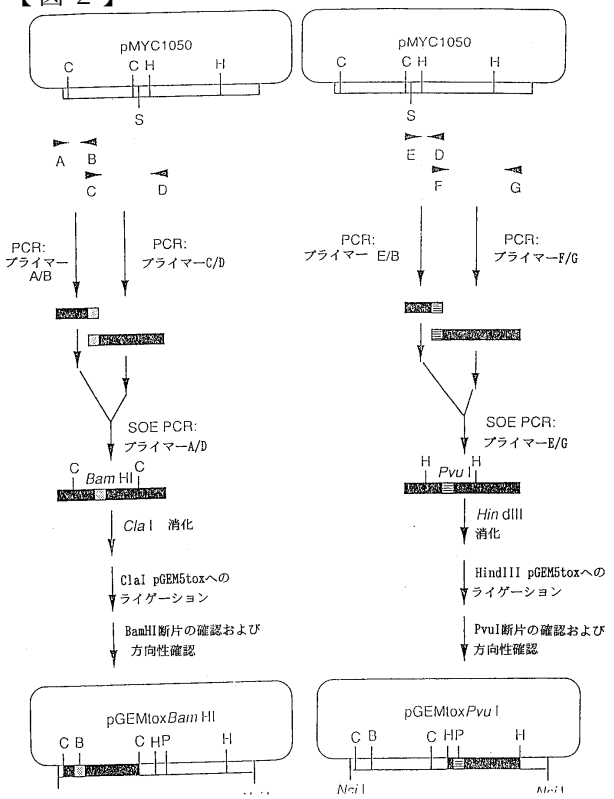
Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu
1160 1165 1170

Glu

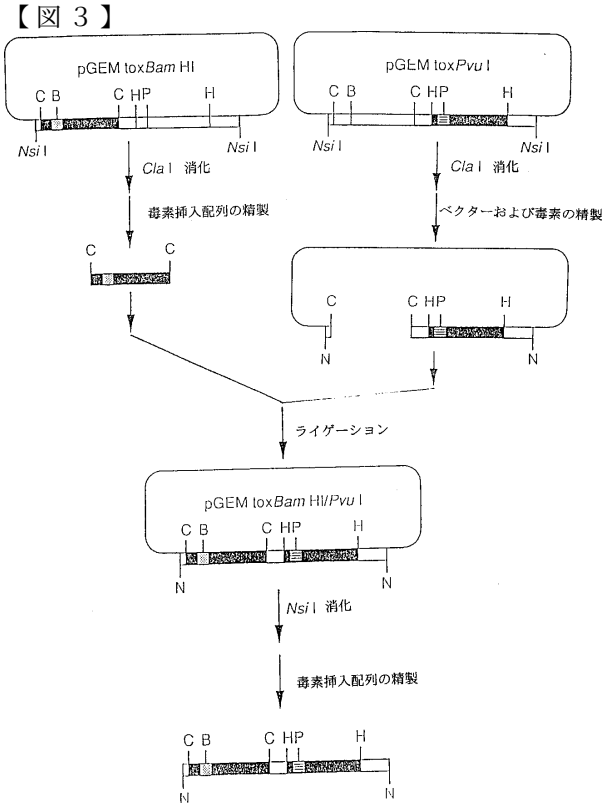
【図１】


pMYC1050
Ptac
毒素
Bam HI
Nsi I
Nsi I
Bam HI 消化
クレノウ酵素による平滑化
再ライゲーション
pMYC1050ΔBam HI
Ptac
毒素
ΔBam HI
Nsi I
Nsi I
Nsi I 消化
毒素挿入配列の精製
Nsi I
Nsi I
pGEM5x NsiIへのライゲーション
大腸菌NM522の形質転換
pGEMtox
C
C H
H
Nsi I
Nsi I

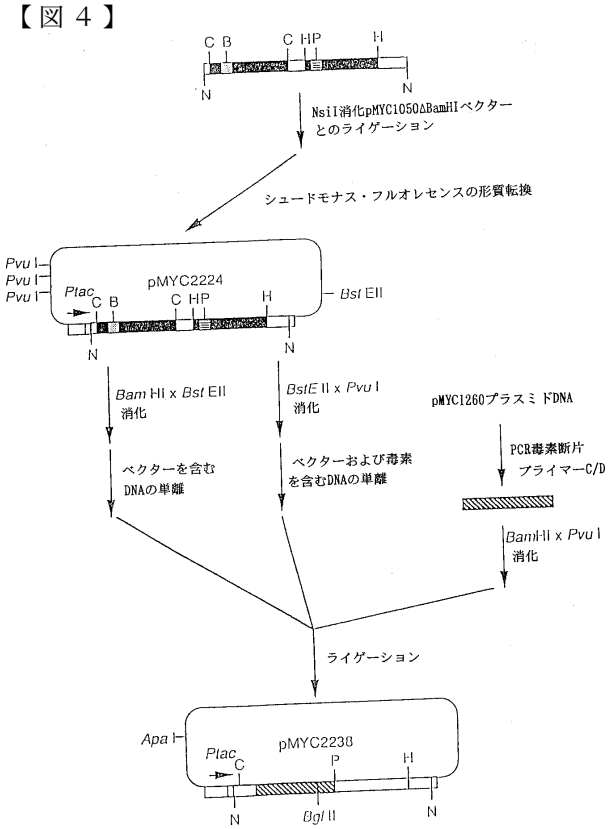
【図２】


pMYC1050
C
C H
H
S
A
B
C
D
PCR:
プライマー
A/B
PCR:
プライマーC/D
SOE PCR:
プライマーA/D
C
Bam HI
C
ClaI 消化
ClaI pGEM5toxへの
ライゲーション
BamHI断片の確認および
方向性確認
pGEMtoxBam HI
C B
C HP
H
pMYC1050
C
C H
H
S
E
D
F
G
PCR:
プライマー E/B
PCR:
プライマーF/G
SOE PCR:
プライマーE/G
H
Pvu I
H
Hin dIII
消化
HindIII pGEM5toxへの
ライゲーション
PvuI断片の確認および
方向性確認
pGEMtoxPvu I
C B
C HP
H
Nsi I

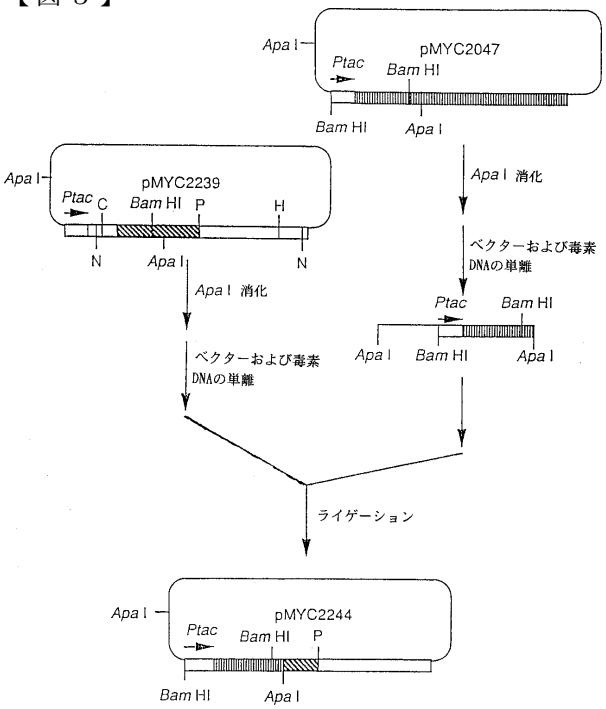
【図３】


pGEM toxBam HI
C B
C HP
H
Nsi I
Nsi I
pGEM toxPvu I
C B
C HP
H
Nsi I
Nsi I
Cla I 消化
毒素挿入配列の精製
Cla I 消化
ベクターおよび毒素の精製
C
C
C
C HP
H
N
N
ライゲーション
pGEM toxBam HI/Pvu I
C B
C HP
H
N
N
Nsi I 消化
毒素挿入配列の精製
C B
C HP
H
N
N

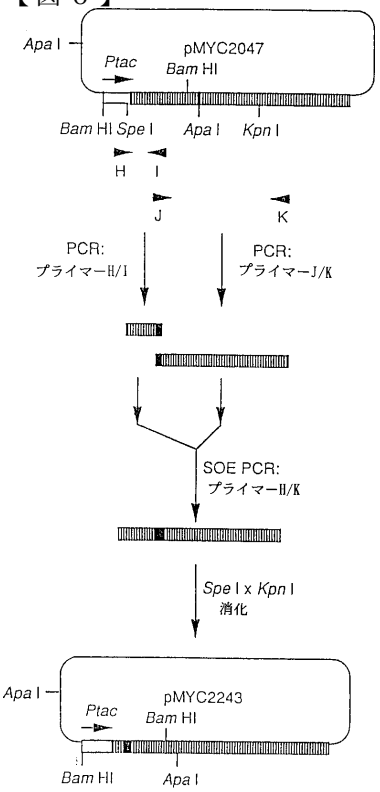
【図４】


C B
C HP
H
N
N
NsiI消化pMYC1050ΔBamHIベクター
とのライゲーション
シュードモナス・フルオレセンスの形質転換
Pvu I
Pvu I
Pvu I
Ptac
pMYC2224
C B
C HP
H
Bst EII
N
N
Bam HI x Bst EII
消化
BstE II x Pvu I
消化
pMYC1260プラスミドDNA
PCR毒素断片
プライマーC/D
ベクターを含む
DNAの単離
ベクターおよび毒素
を含むDNAの単離
BamHI x Pvu I
消化
ライゲーション
Apa I
Ptac
pMYC2238
C
P
H
N
Bgl II
N

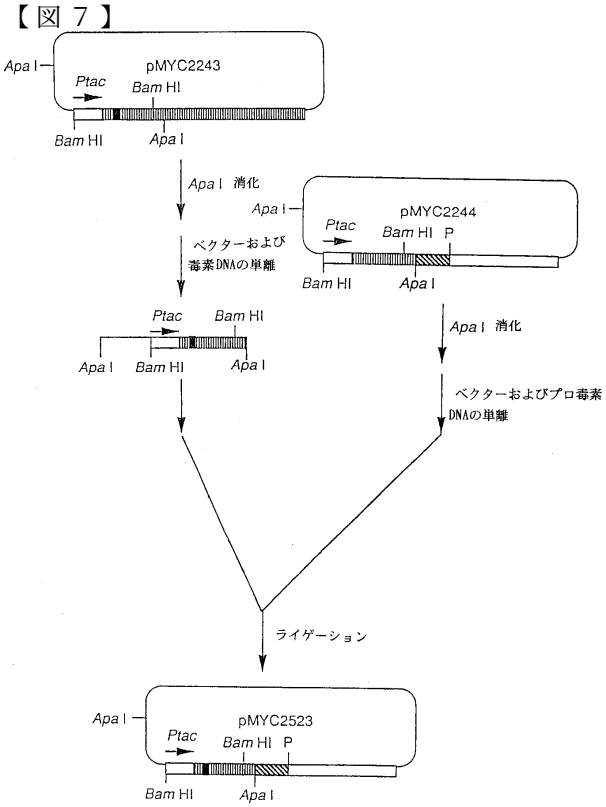
【図５】


Apa I
pMYC2047
Ptac
Bam HI
Bam HI
Apa I
Apa I 消化
ベクターおよび毒素DNAの単離
pMYC2239
Ptac
C
Bam HI
P
H
N
Apa I
N
Apa I 消化
ベクターおよび毒素DNAの単離
Ptac
Bam HI
Apa I
Bam HI
Apa I
ライゲーション
pMYC2244
Ptac
Bam HI
P
Bam HI
Apa I

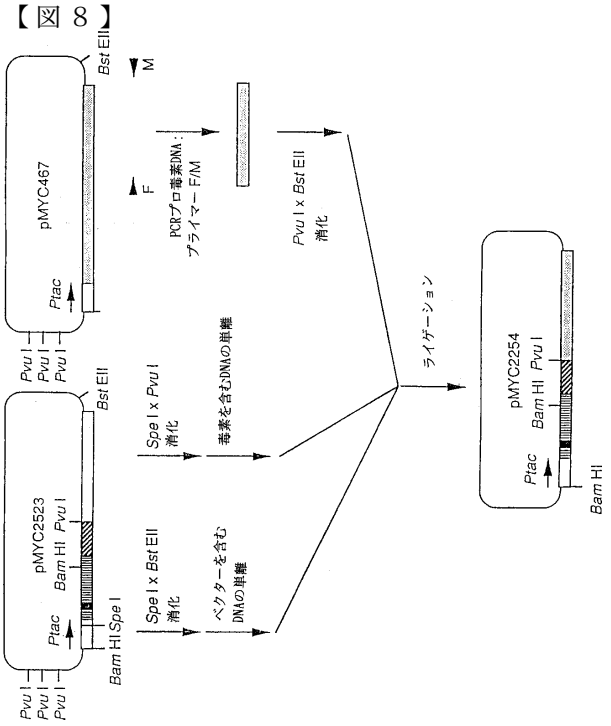
【図６】


Apa I
pMYC2047
Ptac
Bam HI
Bam HI
Spe I
Apa I
Kpn I
H
I
J
K
PCR:
プライマーH/I
PCR:
プライマーJ/K
SOE PCR:
プライマーH/K
Spe I x Kpn I
消化
pMYC2243
Ptac
Bam HI
Bam HI
Apa I

【図７】


Apa I
pMYC2243
Ptac
Bam HI
Bam HI
Apa I
Apa I 消化
ベクターおよび毒素DNAの単離
pMYC2244
Ptac
Bam HI
P
Bam HI
Apa I
Ptac
Bam HI
Apa I
Bam HI
Apa I
Apa I 消化
ベクターおよびプロ毒素DNAの単離
ライゲーション
pMYC2523
Ptac
Bam HI
P
Bam HI
Apa I

【図８】


Bst EII
M
pMYC467
Ptac
F
PCRプロ毒素DNA：プライマー F/M
Pvu I
Pvu I
Pvu I
Pvu I x Bst EII
消化
Spe I x Pvu I
消化
毒素を含むDNAの単離
ライゲーション
pMYC2254
Pvu I
Bam HI
Ptac
Bam HI
Bst EII
pMYC2523
Pvu I
Bam HI
Ptac
Bam HI
Spe I
Pvu I
Pvu I
Pvu I
Spe I x Bst EII
消化
ベクターを含むDNAの単離

【図９Ａ】

```
                                                
```

フロントページの続き

審査官　植原　克典

(56)参考文献　欧州特許出願公開第０４７１５６４（ＥＰ，Ａ１）
欧州特許出願公開第０４１０６５５（ＥＰ，Ａ１）
JOURNAL OF BACTERIOLOGY，１９９１年，173(13)，3966-3976

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09 ZNA
C07K 14/325
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)