(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-525575
(P2023-525575A)
(43)公表日　令和5年6月16日(2023.6.16)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ０１Ｎ	*63/60 (2020.01)*	Ａ０１Ｎ	63/60	２Ｂ０３０
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ　４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	４Ｈ０１１
Ａ０１Ｈ	*5/08 (2018.01)*	Ａ０１Ｈ	5/08	４Ｈ０４５
Ａ０１Ｈ	*5/10 (2018.01)*	Ａ０１Ｈ	5/10	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全145頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-569068(P2022-569068)
(86)(22)出願日　令和3年5月13日(2021.5.13)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月13日(2023.1.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/032334
(87)国際公開番号　WO2021/231791
(87)国際公開日　令和3年11月18日(2021.11.18)
(31)優先権主張番号　63/024,133
(32)優先日　令和2年5月13日(2020.5.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/106,614
(32)優先日　令和2年10月28日(2020.10.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　511152991
グリーンライト バイオサイエンシーズ インコーポレーテッド
ＧＲＥＥＮＬＩＧＨＴ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００
２００ Ｂｏｓｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ，Ｓｕｉｔｅ １０００，Ｍｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ ０２１５５，Ｕ．Ｓ．Ａ．
(74)代理人　110001508
弁理士法人 津国
(72)発明者　ナルヴァ，ケネス・イー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　鱗翅目害虫のＲＮＡベースの防除

(57)【要約】
ＲＮＡ干渉剤を投与することを含む害虫を防除する組成物及び方法が本明細書で開示されるである。具体的に例示されるのは、Ｄｉａｍｏｎｄｂａｃｋｍｏｔｈｓ及びＦａｌｌ ａｒｍｙｗｏｒｍｓなどの鱗翅類の防除である。また、鱗翅目種における特定の遺伝子を標的とするために二本鎖ＲＮＡ分子の使用も開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下：
（ａ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも一つのポリヌクレオチドと、当該鱗翅目害虫を接触させること；又は
（ｂ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも一つのポリヌクレオチドを当該鱗翅目害虫の食餌に提供すること；又は
（ｃ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも一つのポリヌクレオチドを当該鱗翅目害虫の食餌に提供することにより当該鱗翅目害虫の幼虫における死滅又は成長の阻害を引き起こすこと；又は
（ｄ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む組成物を当該植物に局所的に適用すること；又は
（ｅ）当該植物、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む少なくとも一つの当該ポリヌクレオチドを餌とする鱗翅目により、有効量の当該ポリヌクレオチドが摂取されるような方法で、当該植物に少なくとも１つのポリペプチドを局所的に適用すること；又は
（ｆ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するＤＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して本質的に同一であるか又は相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０

％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に対して本質的に同一であるか又は相補的である少なくとも一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当該植物物中に発現すること；又は

（ｇ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するＤＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に対して少なくとも相補的である少なくとも１つの二本鎖、1つの鎖の有効量に当該鱗翅目害虫を接触させることを含む、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法。

【請求項２】

請求項１の方法であって、ここで当該少なくとも１つのポリヌクレオチドが、二本鎖ＲＮＡである、方法。

【請求項３】

請求項２の方法であって、ここで当該二本鎖ＲＮＡが、化学的又は酵素的に合成されるか、又は微生物中での発現又は植物細胞中での発現により産生される、方法。

【請求項４】

請求項２の方法であって、ここで当該二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列の少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な１つの鎖を含む、方法。

【請求項５】

請求項１の方法であって、ここで当該方法が、標的遺伝子又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個、又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチドに対して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当該植物に局所的に適用することを含み、ここで当該標的遺伝子は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６

６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列有し、そして任意選択的に、ここで当該組成物が、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質、有機シリコーン、有機シリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草性分子、非ポリヌクレオチド除草性分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分を更に含む、方法。

【請求項６】

請求項１の方法であって、ここで当該方法が、二本鎖ＲＮＡを含む溶液の有効量を当該鱗翅目害虫に接触させることを含み、ここで前記二本鎖の少なくとも１つの鎖が、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有する遺伝子の少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に対して相補的であり、そしてここでＲＮＡ干渉が誘導され、鱗翅目害虫による死滅が発生する、方法。

【請求項７】

請求項６の方法であって、ここで当該溶液が、有機シリコーン界面活性剤又はカチオン性脂質からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む、方法。

【請求項８】

請求項１の方法であって、ここで前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）又は（ｅ）又は（ｆ）の前記ＤＮＡが、配列番号７、９、２１、２６、２７、２９、８７、９５、又は９９からなる群から選択される配列を有し、又はここで前記（ｇ）の二本鎖が配列番号１２１、１２３、１３５、１４０、１４１、１４３、２０１、２０９、及び２１３からなる群より選択される配列か又は前記選択された配列又は１つの鎖に対して同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列の少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な一つの鎖を含む、方法。

【請求項９】

請求項１の方法であって、ここで当該鱗翅目害虫が、Ｓｐｏｄｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉ

ｐｅｒｄａ及びＰｌｕｔｅｌｌａ ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａｉｋａからなる群より選択される、方法。

【請求項１０】

請求項１～４、６、又は７のいずれか１項の方法であって、ここで前記少なくとも１つの二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列、又は選択された配列又は前記１つの鎖に対して同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は９８％の同一性を有する配列の少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な１つの鎖を含む、方法。

【請求項１１】

請求項１０の方法であって、ここで前記１つの鎖が、前記群より選択される配列の少なくとも約１００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な配列を含む、方法。

【請求項１２】

請求項１～４、６又は７のいずれかの方法であって、ここで前記二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される少なくとも１つの配列、又は少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドのそれらの断片、又は前記二本鎖ＲＮＡ又はその断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列を含む、方法。

【請求項１３】

請求項１０又は１１の方法であって、ここで前記少なくとも１つの二本鎖が、配列番号１１５、１１６、１１９、１２７、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、及び１６８３からなる群より選択される配列に対して少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的である１つの鎖、又は前記配列に対して又は前記１つの鎖に対して同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は９８％の同一性を有する配列を含む、方法。

【請求項１４】

請求項１の方法であって、ここで（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、又は（ｅ）の標的遺伝子、又は（ｆ）のＤＮＡが、配列番号２、５、１３、３６、３７、３９、４４、４７、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９

、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有する、方法。

【請求項１５】

請求項１３又は１４の方法であって、ここで前記鱗翅目害虫がＰｌｕｔｅｌｌａ ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａである、方法。

【請求項１６】

請求項１の方法により提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物、又は当該植物の果実、種子、又は繁殖可能な部分。

【請求項１７】

請求項１６の植物であって、ここで当該植物が作物植物である、植物。

【請求項１８】

以下：

（ａ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの、少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドに対して少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む、殺虫的に有効な量の少なくとも１つのポリヌクレオチド；又は

（ｂ）標的遺伝子又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個又は２５個の連続したヌクレオチド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む殺虫的に有効な量の少なくとも１つのポリヌクレオチドであって、ここで当該標的遺伝子が、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する殺虫的に有効な量の少なくとも１つのポリヌクレオチド；又は

（ｃ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、１５６４～１６２３からなる群より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１８個の連続したヌクレオチド、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡに対して同一又は相補である少なくとも１つのセグメントを含む殺虫的に有効な量の少なくとも１つのＲＮＡ；又は

（ｄ）鱗翅目害虫により摂取又は接触されたとき、当該鱗翅目害虫の死滅又は成長の阻害を引き起こすＲＮＡ分子であって、ここで当該ＲＮＡ分子が、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、１５６４～１６２３からなる群より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１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有する、ＲＮＡ分子；又は

（ｅ）鱗翅目害虫により摂取又は接触されたとき、当該鱗翅目害虫において死滅又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、ここで当該殺虫性二本鎖ＲＮＡ

分子の少なくとも１つの鎖が、標的遺伝子又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチドに対して相補的であり、ここで当該標的遺伝子は配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択される配列を有する、殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子；又は

（ｆ）配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列の少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連側したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に相補的である１つの鎖を含む殺虫的に有効な量の少なくとも１つの二本鎖ＲＮＡ

を含む、鱗翅目害虫を防除するための殺虫性組成物。

【請求項１９】

請求項１８の殺虫性組成物であって、ここで前記（ｅ）の二本鎖ＲＮＡ分子又は（ｆ）の二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列の少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な一本鎖か、又は前記選択された配列又は前記１本鎖と同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列を含む、殺虫性組成物。

【請求項２０】

請求項１９の殺虫性組成物であって、ここで前記一本鎖が、前記群より選択される配列の少なくとも約１００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な配列を含む、殺虫性組成物。

【請求項２１】

請求項１８の殺虫性組成物であって、ここで前記二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される少なくとも１つの配列か、少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個のヌクレオチド又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドのそれらの断片、又は前記二本鎖ＲＮＡ又はその断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列を含む、殺虫性組成物。

【請求項２２】

請求項１９～２１のいずれかの殺虫性組成物であって、ここで前記群が、配列番号１１５、１１６、１１９、１２７、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０

９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、及び１６８３である、殺虫性組成物。

【請求項２３】

請求項１８の殺虫性組成物であって、ここで（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）及び（ｅ）における群が、配列番号２、５、１３、３６、３７、３９、４４、４７、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３である殺虫性組成物。

【請求項２４】

請求項２２及び２３の殺虫性組成物であって、ここで前記鱗翅目害虫が、Ｐｌｕｔｅｌｌａ ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａである、殺虫性組成物。

【請求項２５】

請求項１８～２４のいずれかの殺虫性組成物であって、ここで当該殺虫性組成物が、固体、液体、粉末、懸濁液、エマルション、スプレー、カプセル化、マイクロビーズ、担体粒子、フィルム、マトリックス、種子処理、土壌ドレンチ、移植可能な製剤、及び溝内製剤からなる群より選択される少なくとも１つの形状で存在する、殺虫性組成物。

【請求項２６】

請求項１８～２５のいずれかの殺虫性組成物であって、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される少なくとも１つの成分をさらに含む、殺虫性組成物。

【請求項２７】

請求項１８～２６のいずれかの殺虫性組成物であって、ここで当該殺虫性組成物が、当該鱗翅目害虫により摂取又は接触されたとき、当該鱗翅目害虫における死滅又は成長の阻害を引き起こす殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子を含み、ここで当該殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子が、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択される配列を有するＤＮＡの２１個の連続したヌクレオチドに対して相補的である少なくとも１つのセグメントを含み、そしてここで当該当該二本鎖ＲＮＡ分子の長さは少なくとも５０個の塩基対の長さであるか、又は約１００個の塩基対から約５００個の塩基対の間の長さである、殺虫性組成物。

【請求項２８】

以下：

（ａ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、１５６４～１６２３からなる群より選択される配列を有する標的遺伝子の少なくとも１８個、１９個、２０個、２１個、２５個、５０個、１００個、１５０個又は２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるか、又は当該連続したヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％又は９８％の同一性を有するヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含むＤＮＡ、又は当該標的遺伝子から

転写されたＲＮＡ；又は
（ｂ）配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、１５６４～１６２３からなる群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそれらに対して相補的なＤＮＡ；又は
（ｃ）標的遺伝子又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個の連続したヌクレオチド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コードするＤＮＡであって、ここで当該標的遺伝子が、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より選択される配列を有する、ＤＮＡ；又は
（ｄ）配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列を含むＲＮＡをコードするＤＮＡ
に操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物。
【請求項２９】
請求項１６の組換えＤＮＡ構成物を含む、植物染色体又は色素体又は組換え植物ウイルスベクター又は組換えバキュロウイルスベクター。
【請求項３０】
請求項２８の組換えＤＮＡ構成物をゲノム中に有するトランスジェニック作物植物細胞。
【請求項３１】
請求項３０のトランスジェニック作物植物細胞であって、ここで当該トランスジェニック作物植物細胞が、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をコードするＤＮＡを、前記トランスジェニック作物植物細胞にさらに有する、トランスジェニック作物植物細胞。
【請求項３２】
請求項３０のトランスジェニックナス科植物細胞、又は当該トランスジェニック作物植物の果実、種子、又は繁殖可能部分を含むトランスジェニック作物植物。
【請求項３３】
鱗翅目害虫の防除に使用するためのポリヌクレオチドを製造するための方法であって、前記方法が、以下：
（ａ）細胞性リボ核酸（ＲＮＡ）及びリボヌクレアーゼの反応混合物中でインキュベートして、５’ヌクレオシド－モノホスファート（５’ＮＭＰｓ）を生成するステップ；
（ｂ）リボヌクレアーゼを除去するステップ；及び
（ｃ）前記反応混合物中でインキュベートするか、又は第二の反応混合物である、前記５’ＮＭＰｓ、ポリホスファートキナーゼ、ポリホスファート、ポリメラーゼ、及び配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１

９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３に対して少なくとも８０％の同一性を有するか、又は少なくとも１８個の連続したヌクレオチドを含むセグメントを含むＲＮＡ配列をコードするデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）中でインキュベートするステップ、（ここで前記セグメントは、配列番号１１５、１１６、１１９、１２７、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３の配列のセグメントに対して少なくとも９０％の同一性を有する）中でインキュベートすること、及び関心対象のＲＮＡを生成するステップ、（任意選択的にここでステップ（ｃ）の反応混合物はヌクレオシドキナーゼ、ＮＭＰキナーゼ、及び／又はＮＤＰキナーゼをさらに含む）
を含む、方法。

【請求項３４】

請求項１の方法であって、ここで（ａ）～（ｇ）に引用される前記少なくとも１８個の連続したヌクレオチドが、少なくとも１８個、１９個、２０個、または２１個の連続したヌクレオチドである、方法。

【請求項３５】

請求項１の方法であって、ここで前記方法は、当該ポリペプチドの有効量が当該植物を餌とする鱗翅目害虫により摂取されるような方法で、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物を当該植物に局所的に適用することを含み、当該ポリヌクレオチドは、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる群より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１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又は当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡに相補的であるヌクレオチド配列を含み；ここで当該鱗翅目害虫は、Ｐｌｕｔｅｌｌａ ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａであり；ここで当該標的遺伝子は、配列番号２、５、１３、３６、３７、３９、４４、４７、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、

１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、又は１６２３の配列を有し；又はここで当該ポリヌクレオチドは、配列番号１１５、１１６、１１９、１２７、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、ｏｒ　１６８３からなる群より選択される配列を有する１つの鎖を有する、方法。

【請求項３６】

当該鱗翅目害虫により摂取又は接触されたとき、鱗翅目害虫に死滅又は成長の阻害を引き起こす殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子を含む、鱗翅目害虫を防除するための殺虫性組成物であって、ここで当該殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子の少なくとも１つの鎖が、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列に対して相補的であるか、又は少なくとも１８、１９、２０、２１、２５、５０、１００、１５０又は２００個の連続したヌクレオチドを含有する、又は前記選択された配列又は少なくとも１つの鎖と同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は９８％の同一性を有する配列を含む、殺虫性組成物。

【請求項３７】

請求項３６の殺虫性組成物であって、ここで前記群が、配列番号１１５、１１６、１１９、１２７、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、及び１６８３であるか、又は前記選択された配列又は少なくとも１つの鎖と同等に長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列である、殺虫性組成物。

【請求項３８】

請求項３６の殺虫性組成物であって、ここで前記二本鎖ＲＮＡが、配列番号１１５～２

２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる群より選択される配列の少なくとも約５０個の連続したヌクレオチド、少なくとも約１００個のヌクレオチド、少なくとも約１５０個又は少なくとも約２００個の連続したヌクレオチドに対して相補的な１つ鎖、又は前記選択された配列又は前記１つの鎖と同等の長さのそれらの断片に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％又は９８％の同一性を有する配列を含む、殺虫性組成物。

【請求項３９】

請求項１８の殺虫剤組成物であって、ここで（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）及び（ｅ）における前記群が、配列番号１、２、１３、３６、３７、３９、４７、１０３、３０２、３４０、３４６、３４９、１１２１、１１５７、１１７８、１１７９、１１８５、１３１０、１３１３、１３１８、及び１３２２である、殺虫剤組成物。

【請求項４０】

請求項１８の殺虫剤組成物であって、ここで（ｆ）における前記群が、配列番号１１５、１１６、１２７、１５０、１５１、１５３、１６１、２１７、４３５、４７３、４７９、４８２、１３５１、１３８７、１４０８、１４０９、１４１５、１５４０、１５４３、１５４８、及び１５５２である、殺虫剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本出願に組み込まれている米国仮出願番号６３／０２４、１３３及び米国仮出願番号６３／１０６,６１４の３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．（ｓ）１１９（ｅ）に基づく利益を主張する。

【背景技術】

【０００２】

農作物はしばしば昆虫の攻撃の対象となる。国連食糧農業機関によると、世界的にみて、農家は害虫や病気によって農作物の３０から４０％を失っている。農作物の維持と農作物の健康は、農産物の収量と品質にとって不可欠であり、最終的にそれらは害虫や病気の発生を最小限に抑えるための長期戦略を必要とする。作物の害虫（例えば、鱗翅目、双翅目、甲虫目、半翅目など）を防除するための年間コストは、数千万ドルに上ると推定されており、防除せずに放置した場合、農作物損失の年間コストは、数十億ドルに達すると予測される。

【０００３】

化学殺虫剤は害虫の侵入を根絶するための１つの解決策であったが、より環境に安全な代替の解決策が必要とされる。化学殺虫剤は、環境に有害であり、特異性又は選択性に欠ける場合があり、最終的には非標的効果をもたらす。また、化学殺虫剤の代謝が遅く、化学殺虫剤が蓄積しやすく、耐性が発生しやすい。したがって、より選択的で、環境に安全で、生分解可能な、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が長い間必要とされてきた。

【発明の概要】

【０００４】

本実施態様は、鱗翅目害虫、特に経済的又は農業的に重要な害虫の防除に関する。様々な実施態様では、鱗翅目害虫は、ハスモンヨトウ属（Spodoptera spp）（例えば、S. frugiperda、fall armywormとも呼ばれる）及びコナガ属（Plutella spp）（例えば、P. xylostella、diamondback mothとも呼ばれる）からなる群より選択される少なくとも１つである。

【０００５】

本明細書に記載される組成物及び方法は、組換えポリヌクレオチド分子、例えば、トランスジェニック植物を鱗翅目害虫による侵入に耐性を持たせるための組換えＤＮＡ構成物、及び鱗翅目害虫による植物の侵入を防除又は防止するのに有用な一本鎖又は二本鎖のＤ

ＮＡ又はＲＮＡ分子（本明細書では「トリガー」と呼ぶ）を含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドトリガーは、鱗翅目害虫による植物の侵入を防除又は防止するための局所的に適用される剤として提供される。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドトリガーを発現するトランスジェニック作物植物（種子又は塊茎などの繁殖可能な部分を含む）などの、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する作物植物が提供される。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドトリガー（例えば、ｄｓＲＮＡ分子の溶液を散布した作物植物）を含む組成物で局所的に処理された作物植物（種子又は塊茎などの増殖可能な部分を含む）が提供される。また、鱗翅目害虫、又は鱗翅目害虫による侵入から保護される植物、植物部分、又は種子に局所的に適用されるポリヌクレオチド含有組成物も提供される。

【０００６】

いくつかの実施態様は、ポリヌクレオチドトリガーによる鱗翅目害虫の標的遺伝子の抑制に関する。いくつかの実施態様は、鱗翅目害虫のＲＮＡｉ媒介性防除の効果的な標的となる場合がある鱗翅目標的遺伝子を選択するための方法に関する。いくつかの実施態様では、ＲＮＡｉ媒介性抑制のために選択される標的遺伝子は、鱗翅目害虫ゲノムにおいて非反復かつ非重複な遺伝子、すなわち、低いヌクレオチドの多様性を有するか、又は非同義（Ｋａ）ヌクレオチド変化よりもより同義（Ｋｓ）ヌクレオチド変化を有するように進化的又は機能的に制約されている遺伝子である。本明細書で提供されるのは、本明細書で「標的遺伝子配列群」と呼ばれるヌクレオチド配列であり、その配列は、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる。また、本明細書で「トリガー配列群」と呼ばれるヌクレオチド配列も提供され、その配列は、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる。配列番号は、本明細書で提供される配列リストにおいて提供される配列に関連する。

【０００７】

一態様では、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法は、前記標的遺伝子配列群又はトリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの対応する断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメントが含有される）又はその相補的なＤＮＡを含むポリヌクレオチドと、鱗翅目害虫を接触させることを含む。一実施態様では、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための前記方法は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡの、少なくとも１８個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、鱗翅目害虫を接触させることを含む。いく

つかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記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。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドとの前記接触は、ポリヌクレオチド、又はポリヌクレオチドを含む組成物又は溶液を（例えば、スプレーする、散布する、浸漬することにより）、鱗翅目害虫に直接的な、又は鱗翅目害虫が接触する表面又はマトリックス（例えば、植物又は土壌など）への局所的な適用により達成される。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドとの前記接触は、鱗翅目害虫により摂取されるポリヌクレオチドを提供することにより達成される。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドとの接触は、鱗翅目害虫に対して発現するトランスジェニック植物を提供することにより達成される。

【０００８】

いくつかの実施態様は、標的遺伝子配列群、トリガー配列群から選択される配列を有する、対応するＤＮＡ断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を有するポリヌクレオチドを含む剤を、鱗翅目害虫の食餌（ｄｉｅｔ）の中に提供することにより、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法に関するものであり、そしてここで、前記剤は、鱗翅目害虫による侵入に対して、鱗翅目害虫内の生物学的機能を阻害するように機能し、それにより、鱗翅目害虫の侵入を防除する。一実施態様では、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より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１８個の連続したヌクレオチド、又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡに対して相補的であるヌクレオチド配列、を含むポリヌクレオチドを、鱗翅目害虫の食餌の中に提供することを含む。いくつかの実施態様では、前記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。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドを含む剤は、作物植物の畑に適用するために、例えば噴霧可能な溶液又はエマルジョン、タンク混合物、又は粉末などに製剤化される。いくつかの実施態様では、前記剤は、例えば、微生物発酵産物の形で、又はトランスジェニック植物細胞中で発現するなど、生物学的に産生される。

【０００９】

別の態様では、鱗翅目害虫の幼虫における死滅又は成長の阻害を引き起こす方法が提供される。いくつかの実施態様では、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、鱗翅目害虫の幼虫の食餌の中に提供され、ここで、鱗翅目害虫の幼虫によるＲＮＡの摂取は、鱗翅目害虫の幼虫の死滅又は成長の阻害をもたらす。いくつかの実施態様では、サイレンシング要素は、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子配列の断片に対し

て本質的に同一又は本質的に相補的であり、ここで、前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群における遺伝子からなる群より選択される。一実施態様では、鱗翅目害虫の幼虫における死滅又は成長の阻害を引き起こす方法は、前記標的遺伝子配列群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に対して相補的である少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した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。具体的な実施態様では、前記標的遺伝子は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるか、又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドは二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様は、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子配列の断片に対して本質的に同一又は本質的に相補的な少なくとも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、鱗翅目害虫の食餌の中に提供することを含む、鱗翅目害虫における死滅又はより低い繁殖力を引き起こす方法に関するものであり、ここで鱗翅目害虫によるＲＮＡの接種は、鱗翅目害虫における死滅とより低い繁殖力をもたらす。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群における遺伝子からなる群より選択される。いくつかの実施態様では、前記方法は変態速度の低下又は摂食活動の低下を引き起こす。いくつかの実施態様では、前記方法は、鱗翅目害虫による侵入に対する増加した耐性を有する植物を提供するのに有用である。

【００１０】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群から選択される配列を有する、対応するＤＮＡの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を含む組成物を、植物に局所的に適用することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を提供する方法に関する。一実施態様では、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１

１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より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１８個の連続したヌクレオチド、又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡに対して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、植物に局所的に適用することを含む。一実施態様では、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法は、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物を、植物を餌とする鱗翅目害虫によって有効量のポリヌクレオチドが摂取されるための方法で、植物に局所的に適用することを含み、前記ポリヌクレオチドは、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に対して相補的である少なくとも１８個の連続したヌクレオチド、又はその標的遺伝子から転写されるＲＮＡを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様は、作物植物の畑に適用するために、例えば噴霧可能な溶液又はエマルジョン、タンク混合物、又は粉末などに製剤化されるポリヌクレオチドを含む組成物に関する。

【００１１】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの対応する断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％同一性又は相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を含む少なくとも１つのポリヌクレオチド分子の殺虫的に有効な量を含む、鱗翅目害虫を防除するための殺虫性組成物に関する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド分子は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１

１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より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１８個の連続したヌクレオチド、又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド分子は、組換えポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド分子は、ＲＮＡである。
いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド分子は、二本鎖ＲＮＡである。関連する実施態様は、例えば、噴霧可能な溶液又はエマルジョン、タンク混合物、又は粉末中に、作物植物の畑に適用するために製剤されたポリヌクレオチド分子を含む殺虫性組成物を含み、任意選択的に担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質、有機シリコーン、有機シリコーン界面活性剤、ポリヌクレオチド除草性分子、非ポリヌクレオチド除草性分子、非ポリヌクレオチド殺虫剤、毒性緩和剤、及び昆虫成長制御剤などの１つ以上の追加成分を含む。

【００１２】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの対応する断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％同一性又は相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）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、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法に関する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。

【００１３】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの対応する断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を含む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ＤＮＡ構成物に関する。いくつかの実施態様では、前記ＤＮＡ要素は、二本鎖ＲＮＡをコードする。いくつかの実施態様では、前記二本鎖ＲＮＡは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。関連する実施態様は、植物染色体又は色素体又は組換え植物ウイルスベクター、組換えＤＮＡ構成物を含む組換えバキュロウイルスベクター、又は異種プロモーターを有さないＤＮＡ要素を含む。

【００１４】

いくつかの実施態様は、前記ゲノムに、前記ＲＮＡに接触するか又は摂取する鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現を抑制するＲＮＡをコードする組換えＤＮＡをそのゲノム中に有するトランスジェニック作物植物細胞に関するものであり、ここで、前記ＲＮＡは、標的遺伝子の断片に相補的な１８個以上の連続した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む。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は前記標的遺伝子配列群から選択される。具体的な実施態様は、前記標的遺伝子配列群より選択される１つ以上の標的遺伝子をサイレンシングするためのＲＮＡをコードする組換えＤＮＡをそのゲノム中に有するトランスジェニック作物植物細胞である。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。

【００１５】

いくつかの実施態様は、鱗翅目害虫が摂取又は接触したとき、鱗翅目害虫中で死滅又は

成長の阻害を引き起こす単離された組換えＲＮＡ分子に関するものであり、前記組換えＲＮＡ分子は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの対応する断片に対して本質的に相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメント（例えば、その断片に対して１００％の相補性を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を含む。いくつかの実施態様では、前記組換えＲＮＡ分子は、二本鎖ＲＮＡである。具体的な実施態様は、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列を有する鎖を有する単離された組換え二本鎖ＲＮＡ分子、又はそれらの組み合わせを含む。別の実施態様は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、及び５３９からなる群より選択される配列を有する鎖を有する単離された組換え二本鎖ＲＮＡ分子、又はそれらの組み合わせに関する。

【００１６】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群より選択される標的遺伝子の対応する断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメント（例えば、その断片に対して１００％同一性又は相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）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、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法に関する。一実施態様では、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法は、前記標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個の連続したヌクレオチドと同一か又は相補的な少なくとも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、ここで、標的遺伝子は、標的遺伝子配列群において特定された遺伝子からなる群より選択される。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。

【００１７】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群より選択される標的遺伝子のＤＮＡの同等の長さの対応する断片と本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメント（例えば、１００％同一性又は相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメント）を含むポリヌクレオチドに、鱗翅目害虫を接触させることを含む、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法に関する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様は、植物ゲノム由来又は動物ゲノム（例えば、昆虫及び節足動物）由来のＲＮＡｉ仲介性

サイレンシングのための標的遺伝子を選択する方法に関する。様々な実施態様では、前記方法は、具体的なゲノムにおいて単一又は低コピー数（非反復かつ非重複）で存在するか、又は低いヌクレオチド多様性を有するか、又はＫｓ＞＞Ｋａである、非同義（Ｋａ）ヌクレオチド変化に対する同義（Ｋｓ）の比率を有する、標的遺伝子のサブセットを提供する。

【００１８】

いくつかの実施態様は、本明細書に記載される少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む人工組成物に関する。いくつかの実施態様では、鱗翅目害虫の侵入からの保護を必要とする植物又は物質への局所的適用に有用な製剤が提供される。いくつかの実施態様では、トランスジェニック作物植物細胞及びトランスジェニック作物植物の作成に有用な組換え構成物及びベクターが提供される。いくつかの実施態様では、作物植物、作物植物の種子又は塊茎などの繁殖可能な部分を処理するのに有用な製剤及びコーティングが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドで処理されるか又は含有している、そのような作物植物、種子、又は繁殖可能な部分から産生された商品及び食料品（特に本明細書に記載される検出可能な量のポリヌクレオチドを有する商品及び食料品）が提供される。いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列又は配列の断片によりコードされるタンパク質に結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体に関する。別の態様は、前記トリガー配列群より選択される配列又は配列の断片によりコードされるタンパク質、又はその相補的に結合するポリクローン又はモノクローナル抗体に関する。そのような抗体は、当業者に公知の日常的な方法によって作成される。

【００１９】

本明細書に記載される様々な実施態様では、前記植物は鱗翅目害虫の侵入の対象となるいずれの植物であってもよい。具体的な関心対象は、植物が［植物の属名］である実施態様である。実施例は、［名称が特定される作物植物］からなる群より選択される植物を含む。

実施態様は、植物が、発芽していない作物植物の種子、栄養成長段階の作物植物、繁殖段階の作物植物であるものを含む。

【００２０】

本発明の他の態様及び具体的な実施態様は、以下の詳細な説明において開示される。

【００２１】

詳細な説明

Ｉ．定義

特に定義されない限り、使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。用語が、単数形で提供される場合、本発明者は、その用語の複数形により記述される発明の態様も意図する。参照により組み込まれている参考文献で使用されている用語及び定義に不一致がある場合、本出願で使用される用語は、本明細書に記載される定義を有するものとする。その他の使用される技術用語は、例えば、“The American Heritage(R) Science Dictionary”(Editors of the American Heritage Dictionaries、2011、Houghton Mifflin Harcourt、Boston and New York)、the “McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms”(6th edition、2002、McGraw-Hill、New York)、又はthe “Oxford Dictionary of Biology”(6th edition、2008、Oxford University Press、Oxford and New York)のような、様々な技術分野に特化した辞書に例示されているように、使用される技術分野における通常の意味を有する。本発明者は、作用機序や作用モードに限定されることを意図しない。参照は、例示する目的のためにのみ提供される。

【００２２】

特に明記されていない限り、本明細書の本文中の核酸配列は、左から右に読むと、５’から３’の方向で与えられる。所与のＤＮＡ配列は、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ことを除いて、ＤＮＡ配列と同一である対応するＲＮＡ配列を定義すると理解されることを当業者は認識するであろう。したがって、特定のＤＮＡ配列を提供することは、正確なＲＮＡ等価物を定義すると理解され、そしてＤＮＡ配列に関して用語「同一性」又は「本質的に同一な」は、チミンヌクレオチドがウラシルヌクレオチドに置き換えられることを除いて、これらの基準を満たすＲＮＡ配列を含む。所与の第一のポリヌクレオチド配列は、ＤＮＡであれＲＮＡであれ、その正確な相補的配列である（ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る）、ワトソン－クリック塩基対を形成することによって第一のポリヌクレオチドに対して完全にハイブリダイズする第二のポリヌクレオチドをさらに規定する。ＤＮＡは、ＤＮＡ二本鎖（ハイブリダイズした鎖）である場合、塩基対はアデニン：チミン又はグアニン：シトシンであり；ＤＮＡは、ＲＮＡ二本鎖の場合、塩基対はアデニン：ウラシル又はグアニン：シトシンである。したがって、完全にハイブリダイズしている（鎖間に「１００％の相補性」があるか、又は鎖が「相補的」である）平滑末端の二本鎖ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、ＤＮＡとして与えられるか又はＲＮＡとして与えられるかに関わらず、１つの鎖のヌクレオチド配列を提供することによって明確に定義される。標的遺伝子又は標的遺伝子の断片に対して「本質的に同一」又は「本質的に相補的」とは、ポリヌクレオチド鎖（又は二本鎖ポリヌクレオチドの少なくとも１つの鎖）が、（一般に、生きた植物又は動物細胞に見られるような生理学的条件下で）標的遺伝子又は標的遺伝子の断片、又は標的遺伝子又は標的遺伝子の断片の転写物に対してハイブリダイズするように設計されることを意味し；当業者は、そのようなハイブリダイゼーションは、必ずしも１００％の配列同一性又は相補性を必要としないことを理解するであろう。第一の核酸配列は、第一の核酸配列が、第二の核酸配列と機能的な関係に置かれたときに、第二の核酸配列と「操作可能に」接続されるか、又は「連結」される。例えば、プロモーターがＤＮＡの転写又は発現を提供する場合、プロモーター配列はＤＮＡに「操作可能に連結」される。一般的に、操作可能に連結されたＤＮＡ配列は連続している。

【００２３】

用語「ポリヌクレオチド」は、一般的に複数のヌクレオチドを含むＤＮＡ又はＲＮＡ分子を指し、一般的には「オリゴヌクレオチド」（１８から２５のヌクレオチドの長さのポリヌクレオチド分子）及び２６以上のより長いポリヌクレオチドの両方を指す。ポリヌクレオチドはまた、当該技術分野で一般的に実施されているように、非標準ヌクレオチド又は化学修飾したヌクレオチドを含む複数のヌクレオチドを含有する分子を含む；例えば、技術マニュアル“ RNA Interference (RNAi) and DsiRNAs ”、2011 (Integrated DNA Technologies Coralville、Iowa)に開示されている化学修飾を参照されたい。一般的に、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡか又はその両方かに関わらず、そして一本鎖か二本鎖かに関わらず、１８個以上の連続したヌクレオチド（又は、二本鎖ポリヌクレオチドの場合、少なくとも１８個の連続した塩基対）の少なくとも１つのセグメントを含み、それらは、標的遺伝子又は標的遺伝子のＲＮＡ転写物のＤＮＡと同等の大きさの断片と本質的に同一又は相補的である。本開示全体を通して、「少なくとも１８個の連続した」は「約１８から約１万まで、その間のすべての整数点を含むこと」を意味する。したがって、本発明の実施態様は、１８から２５個（１８mers、１９mers、２０mers、２１mers、２２mers、２３mers、２４mers、又は２５mers）のヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチド、又は２６個以上のヌクレオチドの長さを有する中長ポリヌクレオチド（２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、５０個、５１個、５２個、５３個、５４個、５５個、５６個、５７個、５８個、５９個、６０個、約６５個、約７０個、約７５個、約８０個、約８５個、約９０個、約９５個、約１００個、約１１０個、約１２０個、約１３０個、約１４０個、約１５０個、約１６０個、約１７０個、約１８０個、約１９０個、約２００個、約２１０個、約２２０個、約２３０個、約２４０個、約２５０個、約２６０個、約２７０個、約２８０個、約２９０個、又は約３００個の

ヌクレオチド）、又は約３００個のヌクレオチドよりも長い長さを有する長ポリヌクレオチド（例えば、約３００から約４００個のヌクレオチドの間、約４００から約５００個のヌクレオチドの間、約５００から約６００個のヌクレオチドの間、約６００から約７００個のヌクレオチドの間、約７００から約８００個のヌクレオチドの間、約８００から約９００個のヌクレオチドの間、約９００から約１０００個のヌクレオチドの間、約３００から約５００個のヌクレオチドの間、約３００から約６００個のヌクレオチドの間、約３００から約７００個のヌクレオチドの間、約３００から約８００個のヌクレオチドの間、約３００から約９００個のヌクレオチドの間、約１０００個のヌクレオチドの長さ、又は約１０００個以上のヌクレオチドの長さのポリヌクレオチド、例えば、標的遺伝子のコーディング部分又はノンコーディング部分、又はコーディング部分とノンコーディング部分の両方を含む標的遺伝子の全長まで）を含む。ポリヌクレオチドが二本鎖の場合、その長さは塩基対の観点から同様に記述できる。

【００２４】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、一本鎖（ｓｓ）又は二本鎖（ｄｓ）であり得る。「二本鎖の」は、一般に生理学的に妥当な条件下で、二本鎖核酸構造を形成するに十分な相補的で、逆平行鎖核酸間で生じる塩基対形成を指す。実施態様は、前記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、又はアンチセンスｓｓＲＮＡ；から選択されるものを含み、これらのタイプのいずれのポリヌクレオチドの混合物も使用できる。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡ（内因的に産生されるｓｉＲＮＡ及び成熟ｍｉＲＮＡなど）の典型的な長さよりもより長い二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも約３０個の連続した塩基対の長さの二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドは約５０から約５００塩基対の長さを有する二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドは標準的なリボヌクレオチド以外の成分を含むことができ、例えば、一実施態様は末端デオキシリボヌクレオチドを含むＲＮＡである。

【００２５】

実施態様は、鱗翅目害虫に対する作物植物ための保護を提供する。前記作物植物は、穀物作物植物（例えば、コムギ、エンバク、オオムギ、トウモロコシ、ライムギ、ライコムギ、イネ、キビ、モロコシ、キヌア、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、レンゲ、クローバーなどを含む飼料草や飼料用双子葉植物）；油糧種子作物植物（例えば、ワタ、ベニバナ、ヒマワリ、ダイズ、キャノーラ、菜種、亜麻、ピーナッツ、及びアブラヤシ）；木の実（例えば、クルミ、カシュー、ヘーゼルナッツ、ピーカン、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、サトウキビ、紅茶、コーヒー；木材やパルプを産生する樹木；マメ科植物などの野菜作物植物（例えば、豆類、エンドウ豆、レンズ豆、アルファルファ、ピーナッツ）、レタス、アスパラガス、アーティチョーク、セロリ、ニンジン、ダイコン、アブラナ科（例えば、キャベツ、ケール、マスタード、その他の葉アブラナ、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（例えば、キュウリ、メロン、夏カボチャ、冬カボチャ）、食用ネギ（例えば、タマネギ、ニンニク、ニラ、エシャロット、チャイブ）、ナス科の可食部（例えば、トマト、ナス、ジャガイモ、ピーマン、グラウンドチェリー）、及びアカザ科の可食部（例えば、ビート、チャード、ホウレンソウ、キヌア、アマランス）；例えば、リンゴ、ナシ、柑橘類（例えば、オレンジ、ライム、レモン、グレープフルーツなど）、核果（例えば、アプリコット、モモ、プラム、ネクタリン）、バナナ、パイナップル、ブドウ、キウイフルーツ、パパイヤ、アボカド、及びベリーなどの果実作物植物を含むが、これらに限定されない。

【００２６】

様々な実施態様では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、ＤＮＡ及びＲＮＡ中に存在するような天然に存在するヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ポリヌ

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の組み合わせ（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又は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ポリヌクレオチドか、又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。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、イノシン、チオウリジン、又はプソイドウリジンなどの非標準的なヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記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又はポリヌクレオチドの例は、当該技術分野で周知であり；例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１１／０１７１２８７号、米国特許公開第２０１１／０１７１１７６号、米国特許公開第２０１１／０１５２３５３号、米国特許公開第２０１１／０１５２３４６号、及び米国特許公開第２０１１／０１６００８２号を参照のこと。例示的な例は、スホロチオアート、ホスホロジチオアート、又はメチルホスホナートのヌクレオチド間結合修飾を用いて部分的又は完全に修飾することができる、天然に存在するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのホスホジエステルバックボーンを含むが、これらに限定されず、修飾されたヌクレオシド塩基又は修飾された糖は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド合成に使用することができ、そしてオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは、蛍光部分（例：フルオレセイン又はローダミン）又は他の標識（例えばビオチン）で標識することができる。

【００２７】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性を有する配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡ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。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドの個数は、少なくとも１８個、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はそれ以上である。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、その数が、１８個を超える、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりも多い、連続したヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個（全体を通して使用されているように少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１を参照することは、群のこれらの下限のいずれかを個別化できることを意味する）の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様は、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤ

ＮＡ又は標的遺伝子と同等の長さの断片に対して１００％の同一性を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む一本鎖を有する二本鎖核酸（例えばｄｓＲＮＡ）であり；塩基対として発現する、そのような二本鎖核酸は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対応する、少なくとも１８個の連続した、完全に一致する塩基対、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド中に含まれる各セグメントの長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡに典型的な長さよりもより長く、例えば、各セグメントの長さは、少なくとも約３０個の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドの全長、又はポリヌクレオチド中に含有される各セグメントの長さは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の全長よりも短い。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドの全長は、約５０から約５００のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）又は塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）の間である。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されているいずれかのｄｓＲＮＡトリガーの長さのｄｓＲＮＡのような、約１００から約５００塩基対の間のｄｓＲＮＡである。実施態様は、前記植物中に発現しているポリヌクレオチドが、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有するセグメントを含むＲＮＡか、又はその相補体を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、植物中で発現する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、植物又は鱗翅目害虫の表面に局所的に提供される。

【００２８】

いくつかの実施態様は、鱗翅目害虫標的遺伝子の調節又は抑制を誘導することにより発現を調節するように設計されたポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、鱗翅目害虫標的遺伝子又はｃＤＮＡ（例えば、前記標的遺伝子配列群）のヌクレオチド配列、又はコーディング配列又はノンコーディング配列であり得る鱗翅目害虫標的遺伝子から転写されたＲＮＡの配列に対して本質的に同一か又は本質的に相補的なヌクレオチド配列を有するように設計される。発現を調節するこれらの有効なポリヌクレオチド分子は、本明細書で「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチドトリガー」、「トリガー」、又は「トリガー類」と呼ばれる場合がある。

【００２９】

いずれの大きさの有効なポリヌクレオチドも、本明細書に記載される様々な方法及び組成で、単独又は組み合わせて使用することができる。いくつかの実施態様では、単一のポリヌクレオチドトリガーを使用して組成物（例えば、局所的適用のための組成物、又はト

ランスジェニック植物を作成するために有用な組換えＤＮＡ構成物）を作成する。他の実施態様では、様々なポリヌクレオチドトリガーの混合物又はプールが使用され；そのような場合、前記ポリヌクレオチドのトリガーは、単一の標的遺伝子、又は複数の標的遺伝子に対するものでもよい。

【００３０】

本明細書で使用されるとき、用語「単離された」は、ある分子を、その本来の状態又は自然の状態で結合している他の分子から分離することを指す。したがって、用語「単離された」は、通常は本来の状態又は自然の状態で結合している他のＤＮＡ分子から分離されたＤＮＡ分子を指す場合がある。そのようなＤＮＡ分子は、組換えＤＮＡ分子のように、組換えた状態で存在する場合がある。したがって、例えば組換え技術の結果として、通常は結合していない制御配列又はコーディング配列と融合したＤＮＡ分子は、導入遺伝子として細胞の染色体に組み込まれるか、又は他のＤＮＡ分子と一緒に存在した場合でも、単離されたものと見なされる。

【００３１】

本明細書で使用されるとき、用語「標的遺伝子配列群」は、配列番号１～１１４、２２９～３６１、４９５～５１１、５３０～５３５、５４２～８２２、１１０４～１３３３、及び１５６４～１６２３からなる配列の群をさす。本明細書で使用されるとき、用語「トリガー配列群」は、配列番号１１５～２２８、３６２～４９４、５１２～５２９、５３６～５４１、８２３～１１０３、１３３４～１５６３、及び１６２４～１６８３からなる配列の群を指す。

【００３２】

様々な実施態様では、鱗翅目害虫は、ハスモンヨトウ属及びコナガ族からなる群より選択される少なくとも一種類の昆虫である。ハスモンヨトウの種の例は、Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（ｆａｌｌ ａｒｍｙｗｏｒｍ）を含む。プルテラ属の種の例は、Ｐ．ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａ（ｄｉａｍｏｎｄｂａｃｋ ｍｏｔｈ）を含む。鱗翅目害虫は、いずれの発達段階である場合がある。

【００３３】

いくつかの実施態様は、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ポリヌクレオチドに関する。用語「遺伝子」は、転写物の発現を提供する、又は転写物をコードする核酸のいずれかの部分を指す。「遺伝子」は、プロモーター領域、５’非翻訳領域、イントロン領域を含むことができる転写物コード領域、３’非翻訳領域、又はこれらの領域の組み合わせを含むことができるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含むことができる。他の実施態様では、前記標的遺伝子は、メッセンジャーＲＮＡに対して同一又は相補的な配列を有し、例えば、いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、ｃＤＮＡである。具体的な実施態様では、前記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、その各標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群より選択されるＤＮＡ配列によりコードされる。様々な実施態様では、前記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ており、その各標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列によりコードされ、この群からの複数の標的遺伝子を抑制するように、又はこれらの標的遺伝子の１つ以上の異なる領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの複数のセグメントを含む。そのような場合、各セグメントは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、そして標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、タンデム又は反復配列において複数のセグメントを含み、ここで各セグメントは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１

００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡを含む。いくつかの実施態様では、前記セグメントは、標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば、セグメントは標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができる。いくつかの実施態様では、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドを、セグメント間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【００３４】

その他の定義は、以下の部門において提供される。

【００３５】

ＩＩ．ポリヌクレオチドと接触することにより鱗翅目の侵入を防除すること

本明細書で提供されるのは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性又は相補性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡ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を、鱗翅目害虫に接触させることにより、鱗翅目害虫の植物への侵入を防除するための方法である。一実施態様では、鱗翅目害虫の植物への侵入を防除するための方法は、配列番号：２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する標的遺伝子の対応する断片に対して、１００％の同一性を有する少なくとも１８個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡを含むポリヌクレオチドを、鱗翅目害虫に接触させることを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖ＲＮＡ）は、化学的又は酵素的に合成されるか、又は微生物中の発現又は植物細胞中の発現により産生される。実施態様は、その中で前記ポリヌクレオチドが、前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖を含むｄｓＲＮＡである実施態様を含む。前記方法で使用するポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子に対して設計することができる。本発明の関連する態様は、本方法で使用される単離されたポリヌクレオチド及び本方法により提供される改変された鱗翅目耐性を有する植物を含む。具体的な実施態様は、そこで前記ポリヌクレオチドが、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０

２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列からなるｄｓＲＮＡ、又はその相補的なものである実施態様を含む。他の具体的な実施態様は、前記ポリヌクレオチドが、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８及び５３９からなる群より選択される配列又はそれらの組み合わせを含むｄｓＲＮＡである実施態様を含む。

【００３６】

いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の配列を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して、正確に（１００％）同一である。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の全ての配列を有する。

【００３７】

一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する標的遺伝子の対応する断片に対して、１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の対応する断片に対して１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチドの１つ以上のセグメントに加えて、「中立」配列（配列同一性又は標的遺伝子への相補性を有さない配列）を含み、したがって、前記ポリヌクレオチドは、全体としては、標的遺伝子との全体的な配列同一性ははる

かに低い。

【００３８】

この方法で使用されるポリヌクレオチドの全長は、１８個の連続したヌクレオチドより長いものであり得、そして前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、前記ポリヌクレオチドの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたポリヌクレオチドのセクション又はセグメントの長さよりも長くすることができる。例えば、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することができるか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又はその相補的なＤＮＡ又はＲＮＡと特異的に関連しない（それに対して相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含むことができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群からなる群より選択される配列の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又はその相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの１つ以上のセグメントのすぐ隣に位置する追加のヌクレオチドを含むことができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのようなセグメントの１つを含む。別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、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、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、ポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群から選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡにおける連続したヌクレオチドの配列に対して１００％同一でないか又は相補的でない。例えば、いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡ中に対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【００３９】

この方法で使用されるポリヌクレオチドは、当業者に公知の適切な手段により提供されるものであり、実施態様は、前記ポリヌクレオチドが、化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などのインビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養物（培養で増殖された植物又は昆虫の細胞など）中の発現により産生されるか、植物細胞での発現により産生されるか、又は微生物発酵により産生されるものを含む。

【００４０】

いくつかの実施態様では、この方法で使用されるポリヌクレオチドは、単離されたＤＮＡ又はＲＮＡ断片として提供される。いくつかの実施態様では、この方法で使用されるポ

リヌクレオチドは、発現構成物の一部ではなく、プロモーター又はターミネーター配列のような追加の要素を欠いている。そのようなポリヌクレオチドは、比較的短いもの、例えば約１８個から約３００個の間又は約５０個から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）、又は約１８個から約３００個又は約５０個から約５００個の塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）の一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチドであり得る。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されるｄｓＲＮＡトリガーのいずれかのｄｓＲＮＡトリガーの長さのｄｓＲＮＡのような、約１００個から約５００個の間の塩基対のｄｓＲＮＡである。あるいは、前記ポリヌクレオチドは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物で提供されるか、又は例えば、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれ得る。いくつかの実施態様では、そのような組換え発現構成物又はベクターは、関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性タンパク質）を発現するための発現カセットなどの追加の要素を含むように設計される。

【００４１】

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群において特定された遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子のＤＮＡの同等の長さの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続した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を、鱗翅目害虫と接触させることを含む、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法に関する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有する鎖を有するｄｓＲＮＡを含む。いくつかの実施態様では、本発明は、鱗翅目害虫をトリガー配列群からの二本鎖ＲＮＡを含む有効量の溶液と接触させることを含む、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法を提供し、前記溶液は、有機シリコーン界面活性剤又はカチオン性脂質からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。

【００４２】

前記方法の様々な実施態様では、前記接触は、この方法で使用されるポリヌクレオチドを含む適切な組成物の鱗翅目害虫の表面への適用を含み；そのような組成物は、例えば、固体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル、及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤として、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は種子処理として提供することができる。前記接触は、種子処理の形で、又は「種芋」の塊茎又は塊茎の断片の処理の形で（例えば、種芋を浸漬する、種芋にコーティングする、又は種芋に散布することにより）存在することができる。殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などは、組成物中に任意選択的に含むことができる。いくつかの実施態様では、前記接触は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む組成物中に前記ポリヌクレオチドを提供することを含む。いくつかの実施態様では、前記接触は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む組成中にポリヌクレオチドを提供することを含む。一実施態様では、前記接触は、鱗翅目害虫により摂取されるか又は他の方法で内部に吸収され得る組成物中にポリヌクレオチドを提供することを含む。

【００４３】

この方法で使用される特定のポリヌクレオチド（例えば、実施例に記載される前記ポリ

ヌクレオチドトリガー）の１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせは、ポリヌクレオチド単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される１つ以上のポリヌクレオチド及び１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含有する組成物が、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除の効果をもたらすことが見いだされる。

【００４４】

ＩＩＩ．食餌性ポリヌクレオチドを提供することによる鱗翅目の侵入の防除

本発明の別の態様は、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法であって、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡ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剤を、鱗翅目害虫の食餌の中に提供することを含み、ここで、前記剤は、鱗翅目害虫による摂取により、鱗翅目害虫内の生物学的機能を阻害するように機能し、それによって、鱗翅目害虫による侵入を防除する。前記ポリヌクレオチドは、各ポリヌクレオチドセグメント及び対応するＤＮＡ断片の長さは同等であるが、ポリヌクレオチドが含む１つ又は複数のセグメントよりも長くなることができる。前記方法で使用されるポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子に対して設計することができる。実施態様は、前記剤が、前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖又はその相補的な鎖を含むｄｓＲＮＡ含むか、又は配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡを含む。別の実施態様では、前記剤は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、及び５３９からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。一実施態様では、植物の鱗翅目害虫の侵入を防除するための方法は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７

２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個の連続したヌクレオチドに対して相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、鱗翅目害虫の食餌中に提供することを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド（例：二本鎖ＲＮＡ）は、化学的又は酵素的に合成されるか、又は微生物中の発現によるか又は植物細胞中の発現により産生される。本発明の関連する態様は、本方法で使用される単離されたポリヌクレオチド及び前記方法により提供される改変された鱗翅目耐性を有する植物を含む。

【００４５】

様々な実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、微生物細胞を含むか、微生物中で産生される。例えば、前記剤は、細菌又は酵母細胞を含むか、又は細菌又は酵母細胞中で産生することができる。他の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、トランスジェニック植物細胞を含むか、又は植物細胞（例えば、ポリヌクレオチドを一時的に発現する植物細胞）中で産生され；そのような植物細胞は、植物中の細胞、又は組織培養液又は細胞懸濁液中で増殖した細胞であり得る。

【００４６】

様々な実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、摂取のために適切な形、例えば、固体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル、及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤として、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は種子処理として提供することができる。ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、翅目害虫による侵入の対象となる植物に前記剤を適用することにより、又は前記植物の種に前記剤を適用する、例えば植物にスプレーする、散布する、コーティングすることにより、又は土壌ドレンチの適用により、又は人工的な食餌中に適用することにより提供することができる。ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、鱗翅目害虫を維持するための特定の栄養要求を満たすように製剤化された人工食餌中に提供することができ、ここで、前記人工食餌は、化学合成などの別の供給源から得るか、又は微生物発酵から精製されるポリヌクレオチドのある量が補給され；この実施態様は、例えば、有効なポリヌクレオチド処理レジメンのタイミングと量を決定するために有用であり得る。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、植物細胞の形で、又は植物細胞成分で、又は微生物（例えば、細菌又は酵母）又は微生物発酵産物で、又は合成又は人工の食餌で提供される。一実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫が摂取する餌の形で提供される。ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、種の処理の形で、又は「種芋」の塊茎又は塊茎の断片の処理の形で（例えば、種芋を浸漬する、種芋にコーティングする、又は種芋に散布することにより）提供することができる。殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などは、前記剤に含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１１／０２９６５

５６号の実施例１８に開示されているもの）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド（ｐｅｃｄｙｓｔｅｒｏｉｄｈｙｔｏ）、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。その他のタンパク質は、Toxins (Basel). 2019 Jul 1;11(7)に記載される植物由来のタンパク質を含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、植物中に移植された粒子、ペレット、又はカプセルからなる群より選択される少なくとも１つの移植可能な製剤を含み；そのような実施態様では、前記方法は、移植可能な製剤を植物中に移植することを含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、スプレー、又はドレンチ、又は溝に適用するのに適したその他のいずれかの形状からなる群より選択される少なくとも１つの溝内製剤を含み；そのような実施態様では、前記方法は、溝内製剤を用いる溝内処理を含む。いくつかの実施態様では、前記方法は、ナス科植物の種子、ジャガイモの塊茎、又はジャガイモの塊茎の断片の前記剤を用いた処理含む。

【００４７】

この方法で使用される剤（例えば、実施例に記載されるポリヌクレオチドトリガー）に使用される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は、ポリヌクレオチド単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される１つ以上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を含有する組成物は、鱗翅目害虫に食餌中で提供された場合、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除の効果が見いだされる。

【００４８】

いくつかの実施態様では、この方法で使用されるポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される配列を有するセグメント、又はその相補的セグメントを含むｄｓＲＮＡ又であり、ここで、前記ポリヌクレオチドは、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２

、又は１６８３からなる群より選択される配列によりコードされる。別の実施態様では、前記剤は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８及び５３９からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。

【００４９】

いくつかの実施態様では、連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又はトリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の配列を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して、正確に（１００％）同一である。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して、少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％のすべての配列を有する。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する標的遺伝子の対応する断片に対して１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド又はその相補的ＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含み；いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の対応する断片と１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチドのセグメントに加えて「中立」配列（配列同一性又は標的遺伝子への相補性を有さない配列）を含み、したがって、前記ポリヌクレオチドは、全体としては、標的遺伝子との全体的な配列同一性ははるかに低い。

【００５０】

この方法で使用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る。他の実施態様では、前記標的遺伝子は、メッセンジャーＲＮＡに対して同一又は相補的な配列を有し、例えば、いくつかの実施態様では、標的遺伝子は、ｃＤＮＡである。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、各標的遺伝子が、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。様々な実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、各標的遺伝子が、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されており、そしてこの群からの複数の標的遺伝子を抑制するように、又はこれらの標的遺伝子の１つ以上の異なる領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配

列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドの複数のセグメントを含む。そのような場合、各セグメントは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、そして標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、タンデム又は反復配列において複数のセグメントを含み、ここで各セグメントは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡを含み；前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、そして標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメント間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【００５１】

この方法で使用されるポリヌクレオチドの全長は、１８個の連続したヌクレオチドより長いものであり得、そして前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する連続したヌクレオチド、又はそのいずれかのＲＮＡ転写物、又は前記のいずれかに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、前記ポリヌクレオチドの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたポリヌクレオチドのセクション又はセグメントの長さよりも長くすることができる。例えば、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することができるか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡと特異的に関連しない（それに対して相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含むことができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの１つ以上のセグメントのすぐ隣に位置する追加のヌクレオチド含むことができる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのようなセグメントの１つを含む。別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、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、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、ポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群から選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子における連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの配列に対して１００％同一でないか又は相補的でない。例えば、いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群よ

り選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ中に対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【００５２】

この方法で使用されるポリヌクレオチドは、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施態様は、実施態様は、前記ポリヌクレオチドが、化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などのインビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養（培養で増殖された植物又は昆虫の細胞など）中の発現により産生されるか、植物細胞中の発現により産生されるか、又は微生物発酵により産生されるものを含む。

【００５３】

いくつかの実施態様では、この方法で使用されるポリヌクレオチドは、単離されたＤＮＡ又はＲＮＡ断片として提供される。いくつかの実施態様では、この方法で使用されるポリヌクレオチドは、発現構成物の一部ではなく、プロモーター又はターミネーター配列のような追加の要素を欠いている。そのようなポリヌクレオチドは、比較的短いもの、例えば約１８個から約３００個の間又は約５０個から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）、又は約１８個から約３００個又は約５０個から約５００個の塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）の一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチドであり得る。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されるｄｓＲＮＡトリガーのいずれかのｄｓＲＮＡトリガーの長さのｄｓＲＮＡのような、約１００個から約５００個の間の塩基対のｄｓＲＮＡである。あるいは、前記ポリヌクレオチドは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物で提供されるか、又は例えば、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれ得る。いくつかの実施態様では、そのような組換え発現構成物又はベクターは、関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性タンパク質）を発現するための発現カセットなどの追加の要素を含むように設計される。

【００５４】

ＩＶ．食餌性ＲＮＡを提供することによる鱗翅目の侵入の防除

本発明の別の態様は、前記標的遺伝子配列群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に対して相補的である、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡ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により、鱗翅目害虫の幼虫における死滅又は成長の阻害を引き起こす方法を提供する。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖ＲＮＡ）は、化学的又は酵素的に合成されるか、又は微生物中の発現又は植物細胞中の発現により産生される。一実施態様では、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子配列の断片に対して本質的に同一又は本質的に相補的な少なくとも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、鱗翅目害虫の幼虫の食餌に提供することを含む、鱗翅目害虫の幼虫における死滅又は成長の阻害を引き起こす方法であって、ここで前記標的遺伝子配列は、前記標的遺伝子配列群から選択され、そしてここで鱗翅目害虫の幼虫によるＲＮＡの摂取が、鱗翅目害虫の幼虫の死滅又は成長の阻害をもたらす方法が提供される。本発明の関連する態様は、少なくとも１つのサイレンシング要素を含むＲＮＡであって、ここで少なくとも１つのサイレンシング要素は、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子の断片に対して本質的に同一であるか又は本質的に相補的であり、そしてここで前記標的遺伝子配列が、前記標的遺伝子配列群から選択されるＲＮＡである。

前記ＲＮＡは、各サイレンシング要素及び標的遺伝子配列の対応する断片の長さは同等であるが、サイレンシング要素またはそれが含むサイレンシング要素よりも長くなることができる。前記方法で使用されるＲＮＡは、複数の標的遺伝子に対して設計することができる。実施態様は、ＲＮＡが前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖を有するｄｓＲＮＡを含む。関連する態様では、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子配列の断片に対し

て本質的に同一か又は本質的に相補的な少なくとも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、鱗翅目害虫の食餌の中に提供することを含む、鱗翅目害虫における死滅又はより低い繁殖力を引き起こす方法であって、ここで前記標的遺伝子配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡから選択され、そしてここで鱗翅目害虫によるＲＮＡの摂取は、鱗翅目害虫における死滅又はより低い繁殖力をもたらされる方法が提供される。本発明の関連する態様は、前記方法で使用される単離されたＲＮＡ、及び前記方法により提供される改変された鱗翅目耐性を有する植物が含む。

【００５５】

様々な実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、微生物細胞を含むか、又は微生物中で産生される。例えば、前記ＲＮＡを提供する食餌は、細菌や酵母細胞を含むか、又は、細菌や酵母細胞中で産生され得る。同様の実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、トランスジェニック植物細胞を含むか、又は植物細胞（例えば、ポリヌクレオチドを一時的に発現する植物細胞）中で産生され；そのような植物細胞は、植物の細胞であっても、組織培養液又は細胞懸濁液で増殖した細胞であり得る。

【００５６】

一実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、鱗翅目害虫による侵入の対象となるいずれの植物の形でも提供され、ここで前記ＲＮＡは、前記植物の中又は上に含有される。そのような植物は、ＲＮＡを発現する安定したトランスジェニック植物、又は一時的にＲＮＡを発現する非トランスジェニック植物か、又は例えばスプレーする又はコーティングすることより、ＲＮＡで処理された非トランスジェニック植物である。一般的に安定したトランスジェニック植物は、一般に、そのゲノムに組み込まれたＲＮＡをコードする組換え構造を含有する。具体的な関心対象は、植物が作物植物である実施態様である。

【００５７】

様々な実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、鱗翅目害虫による摂取に適した形状で、例えば、個体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル、及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティング、マトリックスの上又は中に、又は種子処理として提供される。前記ＲＮＡを提供する食餌は、鱗翅目害虫による侵入の対象となる植物にその食餌を適用することにより、例えば、スプレーする、散布する、コーティングすることにより、土壌ドレンチの適用により、又は人工的な食餌中に適用することにより提供され得る。一実施態様では、前記組換えＲＮＡを提供する食餌は、鱗翅目害虫により摂取されるえさの形で提供される。前記ＲＮＡを提供する食餌は、鱗翅目害虫を維持するための特定の栄養要求を満たすように製剤化された人工食餌であり、ここで前記人工食餌は、化学合成などの別の供給源から得られるか、又は微生物発酵から精製されたＲＮＡのある量を補給することができ；この実施態様は、例えば、有効なポリヌクレオチド処理レジメンのタイミング及び量を決定するために有用であり得る。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、植物細胞の形で、又は植物細胞成分中に、又は微生物（細菌や酵母など）又は微生物発酵産物中に、又は合成又は人工の食餌中に提供される。一実施例では、ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、鱗翅目害虫により摂取されるえさの形で提供される。ポリヌクレオチドを含む前記剤は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、種子処理の形で、又は種芋の塊茎は塊茎の断片の処理（例えば、種芋を浸漬する、種芋にコーティングする、又は種芋に散布することにより）の形で提供することができる。殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などは、前記食餌に含むことができる。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、植物中に移植された粒子、ペレット、又はカプセルからなる群より選択される少なくとも１つの移植可能な製剤を含み；そのような実施態様では、前記方法は、移植可能な製剤を植物中に移植することを含む。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡを提供する食餌は、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、スプレー、又はドレンチ、又は溝に適用するのに適したその他のいずれかの形状からなる群より選択される少なくとも１つの溝内製剤を含み；そのような実施態様では、前記方法は、溝内製剤を用いる溝内処理を含む。いくつかの実施態様では、前記方法は、ナス科植物の種子、ジャガイモの塊茎、又はジャガイモの塊茎の断片の前記剤を用いた処理含む。

【００５８】

この方法で使用される特定のＲＮＡ（例えば、実施例に記載される前記ｄｓＲＮＡトリガー）の１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせは、ＲＮＡ単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、１つ以上のＲＮＡとパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含有する組成物は、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除の効果が見いだされる。

【００５９】

この方法で使用されるＲＮＡは、一本鎖（ｓｓ）又は二本鎖（ｄｓ）であり得る。前記方法の実施態様は、前記ＲＮＡが、センス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、アンチセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、又は二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、又はこれ等のタイプの混合物からなる群より選択される少なくとも１つであり得；これ等のタイプのいずれかの混合物も使用することができる。一実施態様では、ＲＮＡは、二本鎖のＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドが使用される。前記ＲＮＡは、標準的なリボヌクレオチド以外の成分を含むことができ、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。

【００６０】

前記ＲＮＡは、少なくとも１つのサイレンシング要素を含み、ここで前記サイレンシング要素は、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子の断片に対して、本質的に同一（ＲＮＡ等価物として）であるか、又は本質的に相補的であり、ここで前記標的遺伝子配列は、前記標的遺伝子配列群から選択される。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性又は相補性を有する配列を有する。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそれらのいずれかに対して相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対して正確に（１００％）同一であるか、又は正確に（１００％）相補的である（ＲＮＡ等価物として）。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素を含むＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性か又は相補性であるすべての配列を有する。

【００６１】

いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子の同等の長さの

断片に対して約９５％から約１００％の同一性又は相補性の配列を有する、１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性又は相補性を有する配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、１８個以上、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はさらにそれ以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、１８個を超える、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりも多い連続したヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む一本鎖を有する二本鎖核酸（例えばｄｓＲＮＡ）であり；塩基対として発現されるそのような二本鎖核酸は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した完全に一致した塩基対、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む、特定の実施態様では、前記ＲＮＡに含有される各サイレンシング要素の長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡに典型的な長さよりもより長く、例えば、各セグメントの長さは、少なくとも約３０個の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡの全長、又は前記ＲＮＡに含有される各サイレンシング要素の長さは、関心対象の配列（前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子）の全長よりも短い。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡの全長は、約５０個から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）又は塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）の間である。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、約１００個から約５００個の塩基対のｄｓＲＮＡであり、例えば、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されているｄｓＲＮＡトリガーのいずれかの長さのｄｓＲＮＡである。実施態様は、前記ＲＮＡが、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５

４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列を有するセグメント又はその組み合わせを含む。別の実施態様では、前記剤は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、及び５３９からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。

【００６２】

この方法で使用される前記ＲＮＡ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る。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含むことができる。他の実施態様では、前記標的遺伝子は、メッセンジャーＲＮＡに対して同一又は相補的な配列を有し、例えば、いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、ｃＤＮＡである。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、各標的遺伝子が、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。様々な実施態様では、前記ＲＮＡは、各遺伝子が前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有する、１つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、この群からの複数の遺伝子を抑制するように、又はこれらの遺伝子の１つ以上の異なる領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記ＲＮＡは、複数のサイレンシング要素を含み、その各々は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性又は１００％の相補性を有する配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。そのような場合、各サイレンシング要素は、大きさ又は配列が同一であるか、又は異なることができ、そして前記標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記ＲＮＡは、タンデム又は反復配列において複数のサイレンシング要素を含むことができ、ここで各サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性又は１００％の相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡを含み；前記セグメントは、標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば、前記セグメントは、標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメントの間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【００６３】

前記ＲＮＡの全長は、１８個を超える連続したヌクレオチドであることができ、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性又は相補性の配列を有するサイレンシング要素に加えた、ヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡを含む

ことができる。言い換えると、前記ＲＮＡの全長は、各標的遺伝子が、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたサイレンシング要素の長さよりも長くすることができ、例えば、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続した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に隣接するヌクレオチドを有することができるか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、又は３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡと特異的に関連しない（それに対して相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性又は相補性の配列を有する、１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡド１つ以上のサイレンシング要素のすぐ隣に位置する追加のヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記ＲＮＡは、サイレンシング要素に隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのようなサイレンシング要素の１つを含む。別の実施態様では、前記ＲＮＡ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、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、ＲＮＡ全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群から選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡにおける連続したヌクレオチドの断片に対して１００％同一でないか又は相補的でない。例えば、いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのサイレンシング要素を含み、ここで（１）前記少なくとも２つサイレンシング要素は、１つ以上のスペーサーヌクレオチドにより分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのサイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ中に対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【００６４】

いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、天然に存在するリボヌクレオチドからなる。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、リボヌクレオチド以外の成分、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又は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を含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、イノシン、チオウリジン、又はプソイドウリジンなどの非標準的ヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。

【００６５】

この方法で使用されるＲＮＡは、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施態様は、前記ＲＮＡが化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などのインビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養物中の発現により産生されるか（培養液中で増殖された植物又は昆虫の細胞など）、植物細胞中の発現により産生されるか、又は微生物発酵により産生されるものを含む。

【００６６】

いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、発現構成物の一部ではなく、そしてプロモーター又はターミネーター配列のような追加の要素を欠いた単離されたＲＮＡとして提供される。そのようなＲＮＡは、比較的短いもの、例えば、約１８から約３００、又は約５０から約５００個（一本鎖ＲＮＡの場合）、又は約１８から約３００、又は約５０から約５００個塩基対（二本鎖ＲＮＡの場合）の一本鎖又は二本鎖ＲＮＡのヌクレオチドである。

あるいは、前記ＲＮＡは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物において提供されるか、又は例えば、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれ得る。いくつかの実施態様では、そのような組換え発現構成物又はベクターは、アプタマー又はリボザイムをコードする追加のＲＮＡ又は関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性タンパク質）を発現するための発現カセットを含むような、追加の要素を含むように設計される。

【００６７】

Ｖ．鱗翅目の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法、及びそのように提供される前記植物、植物部位、及び種子

いくつかの実施態様は、前記標的遺伝子配列群で特定される遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子の断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続した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提供することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法に関する。一実施態様では、本発明は、標的遺伝子又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個の連続したヌクレオチドに対して同一又は相補的である、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、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法を提供し、ここで前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡで特定された遺伝子から選択される。遺伝子を標的とする配列の実施態様は、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃ中の配列番号により特定され、そして前記標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有する遺伝子、並びに関連する害虫からの、例えば他の鱗翅目害虫からのオルソログを含む関連遺伝子を含む関連遺伝子を標的とする配列を含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖ＲＮＡ）は、化学的又は酵素的に合成されるか、又は微生物中の発現又は植物細胞中の発現によって産生される。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖、又はその相補体を有するｄｓＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖を有するｄｓＲＮＡを含む。

【００６８】

関連する態様において、本発明は、前記標的遺伝子配列群において特定された遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子の同等の長さの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続した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中に発現させることにより提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関するものであり、ここで得られた植物は、ポリヌクレオチドが発現されない対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する。関連する態様では、本発明は、前記標的遺伝子配列群において特定された遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子の断片に対して、約９５％から約１００％の同一性又は相補性の配列を有する１８個以上の連続した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中に発現させることにより提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関するものであり、それにより得られた植物は、前記ポリヌクレオチドが発現されない対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する。

【００６９】

本発明のさらに別の態様では、本発明は、この方法により提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物により産生される種子又は繁殖可能な部分（特に、トランスジェニック子孫種子又は繁殖可能な部分）に関する。また、この方法によって提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物によって製造される

コモディティ製品、及びそのような植物のトランスジェニック子孫種子又は繁殖可能な部分から製造されるコモディティ製品も意図される。

【００７０】

本発明の別の態様は、未処理の植物と比較して、ポリヌクレオチド含有組成物で処理された植物が、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を示すような方法で、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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的に適用することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に提供する方法を提供する。一実施態様では、前記少なくとも１つのポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して本質的に同一である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。前記ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の各セグメント及び対応する断片の長さは同等であるが、前記セグメント又はそれが含む複数のセグメントより長くなり得る。一実施態様では、本発明は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より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１８個の連続したヌクレオチド配列、又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡ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的に適用することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法を提供する。一実施態様では、本発明は、有効量のポリヌクレオチドが前記植物を餌とする鱗翅目害虫に摂取されるような方法で、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的に適用することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法を提供し、前記ポリヌクレオチドは、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１

２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子に対して相補的である少なくとも１８個の連続したヌクレオチド、又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡを含む。

【００７１】

この方法で使用するポリヌクレオチドは、複数の標的遺伝子に対して設計することができる。実施態様は、前記組成物が、前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有する鎖を有するｄｓＲＮＡを含むものを含む。本発明の関連する態様は、局所的適用のための組成物及び前記方法で使用される単離されたポリヌクレオチド、及び本方法により提供される改善された鱗翅目耐性を有する植物を含む。

【００７２】

本明細書全体を通して使用されるとき、「局所的適用」とは、例えば植物の表面又は外部、例えば葉、茎、花、果実、新芽、根、種子、塊茎、花類、葯、花粉などの植物の部分の表面への適用、又は植物全体への適用、又は植物の地上部又は地下部への適用などの植物の表面又は外部などの、対象の表面又は外部への適用を意味する。局所的な適用は、例えば土壌に対する、又は鱗翅目害虫がそれにより前記ポリヌクレオチドと接触することができる表面又はマトリックスに対する適用などの非生物表面に対して実施することができる。前記方法の様々な実施態様では、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物は、例えば、固体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤として、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は種子処理として、適切な形で植物に局所的に適用される。前記方法のいくつかの実施態様では、ポリヌクレオチド含有組成物は、例えば、植物の葉、茎、及び開花部分にスプレー又は散布されるように、植物の地上部分に局所的に適用される。

【００７３】

前記方法の実施態様は、葉面スプレー（例えば、液体のポリヌクレオチド含有組成物をナス科植物の葉にスプレーする）又は葉面散布（例えば、粉末又は担体粒子の形状のポリヌクレオチド含有組成物を作物に散布する）の局所的適用を含む。他の実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、例えば土壌ドレンチの手段により、根などの植物の地下部分に局所的に適用される。他の実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、植物中で成長した種子に局所的に適用される。前記局所的適用は、作物植物の果実又は作物植物の果実から得た種子の局所的処理の形で、又は（例えば、種芋を浸漬する、種芋にコーティングする、種芋に散布することにより）塊茎又は塊茎片の局所的処理の形をとることができる。前記ポリヌクレオチド含有組成物は、殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などを任意選択的に含むことができる。

【００７４】

いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、植物に局所的に移植された粒子、ペレット又はカプセルからなる群より選択される少なくとも１つの局所的に移植可能な製剤であり；そのような実施態様では、前記方法は、局所的に移植可能な製剤を植物に局所的に移植することを含む。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、スプレー、又はドレンチからなる群より選択される少なくとも１つの溝内製剤、又は溝に局所的に適用するのに適したいずれか他の形態であり；そのような実施態様では、前記方法は、溝内製剤による溝内処理を含む。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドを含む組成物は、鱗翅目害虫により摂取されるか、又は他の方法で内部に吸収され得る。例えば、前記ポリヌクレオチド含有組成物はえさの形で存在することができる。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有

機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。一実施態様では、前記組成物は、現在、Momentive Performance Materials、Albany、N.Yから入手可能な、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤、例えば、ＣＡＳ番号２７３０６－７８－１及びＥＰＡ番号ＣＡＬ．ＲＥＧ．Ｎｏ．５９０５－５００７３－ＡＡを有するＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性剤などの非イオン性有機シリコーン界面活性剤をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記局所的に適用される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。あるいは、そのような追加の成分又は殺虫剤は、例えば、別々の局所的適用又は植物におけるトランスジェニック発現により、別々に提供することができる。あるいは、前記植物は、前記ポリヌクレオチド含有組成物に加えて前記ポリヌクレオチド含有組成物の有効性を改善する物質の別々の（その前、その後、又はその途中での）適用を用いて局所的に処理される。例えば、植物は、第一の、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤、例えばＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性のような剤非イオン性有機シリコーン界面活性剤を含有する溶液の局所的適用に続く、第二の前記ポリヌクレオチドを含む組成物の局所的適用（逆も可能である）を用いてスプレーされ得る。

【００７５】

前記ポリヌクレオチド含有組成物に有用な特定のポリヌクレオチド（例えば、前記実施例に記載される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が、前記ポリヌクレオチド単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含有する組成物は、鱗翅目害虫に食餌中で提供された場合、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除の効果見いだされる。一実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される非ポリヌクレオチド殺虫剤をコードする１つ以上のポリヌクレオチド及び、１つ以上の遺伝子を発現するトランスジェニック植物として提供され、ここで、トランスジェニック植物は、鱗翅目害虫の侵入に対して改善された耐性を示すことが見出される。

【００７６】

前記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、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施形態は、前記ポリヌクレオチドが化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などのインビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養液中の発現により産生されるか（例えば、培養液中で増殖された植物又は昆虫の細胞）、植物細胞中の発現により産生されるか、又は微生物発酵によって産生されたものを含む。

【００７７】

多くの実施態様では、前記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、単離されたＤＮＡ又はＲＮＡの断片として提供される。いくつかの実施態様では、前記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、発現構成物の一部ではなく、プロモーター又はターミネーター配列などの追加の要素を欠いている）。そのようなポリヌクレオチドは、比較的短いもの、例えば約１８から約３００、又は約５０から約５００ヌクレオチドの一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチド

の場合）、又は約１８から約３００、又は約５０から約５００塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）であり得る。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されるｄｓＲＮＡトリガーのいずれかのｄｓＲＮＡトリガーの長さのｄｓＲＮＡのような、約１００から約５００個の間の塩基対のｄｓＲＮＡである。あるいは、前記ポリヌクレオチドは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物で提供されるか、又は例えば、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれ得る。いくつかの実施態様では、そのような組換え発現構成物又はベクターは、関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性タンパク質）を発現するための発現カセットなどの追加の要素を含むように設計される。

【００７８】

前記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、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを有する。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の配列を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対して正確に（１００％）同一である。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の全ての同一性の配列を有する。

【００７９】

前記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、１８個以上、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はさらにそれ以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記セグメントは、１８個を超える、連続したセグメント、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりも多い連続したヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つの

セグメントを含む。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖核酸が、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対応する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した、完全に一致した塩基対の少なくとも１つのセグメントを含むような塩基対として発現する、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む一本鎖を有する二本鎖核酸（例えばｄｓＲＮＡ）である。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドに含有される各セグメントの長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡに典型的な長さよりもより長く、例えば、各セグメントの長さは、少なくとも約３０の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドの全長、又は前記ポリヌクレオチドに含まれる各セグメントの長さは、関心対象（標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子）の配列の全長よりも短い。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドの全長は、約５０から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）又は塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）の間である。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、表１Ａ、表１Ｂ及び表１Ｃに開示されるｄｓＲＮＡトリガーのいずれかの長さのｄｓＲＮＡのような、約１００から約５００個の間の塩基対のｄｓＲＮＡである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列によってコードされるｄｓＲＮＡ、又はその組み合わせである。別の実施態様では、前記剤は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８及び５３９からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。

【００８０】

局所適用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る。そのような標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含む。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計される。様々な実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、各遺伝子が標的遺伝子配列群から構成物される群より選択される配列を有する、１つ以上の遺伝子を抑制するように設計されており、そしてこの群からの複数の遺伝子を抑制するように、又はこれらの遺伝子の１つ以上の異なる領域を標的とするよう

に設計することができる。一実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、複数のセクション又はセグメントを含み、そのそれぞれが、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。そのような場合、各セクションは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、そして標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、タンデム又は反復配列において複数のセクションを含むことができ、ここで各セクションは、標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含む。

【００８１】

前記局所的に適用されるポリヌクレオチドの全長は、１８個以上の連続したヌクレオチドよりもより長くなることができ、そして前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、局所的に適用されるポリヌクレオチドの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたポリヌクレオチドのセクション又はセグメントの長さよりも長くなることができる。例えば、前記局所的に適用されたポリヌクレオチドは、標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することができるか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡに対して特異的に関連しない（相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含む。

【００８２】

一実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、前記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又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性又は相補性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチドの１つ以上のセグメントに隣接して位置する追加のヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ、又はその両方を有する、そのような１つのセグメントを含む。別の実施態様では、前記局所的に適用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に追加のヌクレオチドを含む二本鎖ＲＮＡ、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子における連続したヌクレオチド又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して１００％同一又は相補的ではない。例えば、いくつかの実施態様では、前記局所的に適用されるポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、の断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド又はそのいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されるか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ中に対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【００８３】
関連する態様において、本発明は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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組成物を植物に局所的に適用することを含むこの方法により提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関するものであり、それにより、前記ポリヌクレオチド組成物で処理された植物は、未処理の植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を示す。

【００８４】
一実施態様は、前記植物に対して、又は前記植物中で成長した種子に対して（又は、前記植物がジャガイモ植物である場合は、ジャガイモ植物中に成長した種芋に対して）、前記トリガー配列群から選択される配列を有するｄｓＲＮＡトリガー又はその相補体、又は配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列によりコードされるｄｓＲＮＡトリガー、又はそれらの組み合わせを局所的に適用することにより提供される、対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する作物植物である。別の実施態様では、別の実施態様では、前記剤は、配列番号４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８及び５３９からなる群より選択される配列によりコードされるポリヌクレオチド又はＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。さらに別の態様では、本発明は、この方法により提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物により産生される種子又は繁殖可能な部分（特に、トランスジェニック子孫種子又は繁殖可能な部分）に関する。またこの方法によって提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物によって製造されるコモディティ製品、及びそのような植物のトランスジェニック子孫種子又は繁殖可能な部分から製造されるコモディティ製品も意図される。

【００８５】
ＶＩ．鱗翅目害虫を防除するための殺虫性組成物
本発明の別の態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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ＲＮＡの殺虫的な効果量を含む、鱗翅目害虫を防除するための殺虫性組成物を提供する。この文脈において、「防除すること」は、成長の阻害、増加した死滅率の増加、繁殖能力の減少、摂食行動又は運動の減少又は停止、又は変態段階の

発育の減少又は停止など、鱗翅目害虫（成虫又は幼虫）における生理的又は行動的変化の誘導を含むが、これらに限定されない。「殺虫的に有効な」とは、例えば、成長の阻害、死滅率の増加、繁殖能力の減少又は繁殖力の減少、摂食行動又は運動の減少又は停止、又は変態段階の発育の減少又は停止など、鱗翅目害虫（成虫又は幼虫）における生理的又は行動的変化を誘導する上で有効であることを意味するが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、殺虫的に有効な量のＲＮＡを植物への適用は、鱗翅目害虫による侵入に対する植物の耐性を改善する。前記ＲＮＡは、標的遺伝子の各セグメント及び対応する断片の長さは同等であるが、セグメント又はそれが含有する複数のセグメントより長くなることができる。前記方法で使用されるＲＮＡは、複数の標的遺伝子に対して設計することができる。

実施態様は、前記殺虫性組成物が、前記標的遺伝子配列群、又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡ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対して相補的である、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチドを含む、殺虫的に有効な量のポリヌクレオチドか；

又は標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも２１個の連続したヌクレオチド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む、殺虫的に有効な量の少なくとも１つのポリヌクレオチド、ここで前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群より選択されるヌクレオチド配列を有するか；

又は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも、１８、１９、２０、２１個の連続したヌクレオチドに対して同一であるか又は相補的である少なくとも１つのセグメントを含む、殺虫的に有効な量の少なくとも１つのＲＮＡか；

又は、鱗翅目害虫が摂取又は接触したとき、鱗翅目害虫に死滅又は成長の阻害を引き起こすＲＮＡ分子、ここで前記ＲＮＡ分子は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、

１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する標的遺伝子、又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡに対して相補的である少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチドを含むか；

又は、鱗翅目害虫が摂取又は接触したとき、鱗翅目害虫に死滅又は成長の阻害を引き起こす、殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子、ここで前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子の少なくとも１つの鎖は、標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡに対して相補的である２１個の連続したヌクレオチドを含み、ここで前記標的遺伝子は、配列番号２２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有するか；

又は前記トリガー配列群より選択される配列を含む、殺虫的に有効な量の少なくとも１つの二本鎖ＲＮＡを含むものである。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチド（例えば、二本鎖ＲＮＡ）は化学的又は酵素的に合成されるか、微生物中の発現によるか又は植物細胞中の発現により産生される。実施態様は、前記トリガー配列群（標的配列群）より選択される配列か、又は、より具体的な実施例では、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列、又はそれらの組み合わせ、又はそれらの相補体を有するｄｓＲＮＡを含む殺虫性組成物を含むものである。

【００８６】

様々な実施態様では、鱗翅目害虫を防除するための前記殺虫性組成物は、固体、液体（溶液などの均質混合物、及び懸濁液、コロイド、ミセル、エマルションなどの非均質混合

物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤からなる群より選択される少なくとも１つの形状で存在し、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は種子処理として存在する。殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などを任意選択的に前記ポリヌクレオチド含有組成物に含むことができる。防除される鱗翅目害虫は、一般に植物に侵入する害虫である。いくつかの実施態様では、前記殺虫性組成物は、植物中に移植された粒子、ペレット、又はカプセルからなる群より選択される少なくとも１つの移植可能な製剤を含み；そのような実施態様では、前記方法は、移植可能な製剤を植物中に移植することを含む。いくつかの実施態様では、前記殺虫性組成物は、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、スプレー、又はドレンチ、又は溝に適用するのに適したその他のいずれかの形状からなる群より選択される少なくとも１つの溝内製剤であり；そのような実施態様では、前記方法は、溝内製剤による溝内処理を含む。一実施態様では、前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫により摂取されるか、又は他の方法で内部に吸収され得る。例えば、前記殺虫性組成物は食餌の形で存在することができる。いくつかの実施態様では、殺虫性組成物は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。一実施態様では、前記殺虫性組成物は、現在、Momentive Performance Materials、Albany、N.Yから入手可能な、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤、例えば、ＣＡＳ番号２７３０６－７８－１及びＥＰＡ番号ＣＡＬ．ＲＥＧ．Ｎｏ．５９０５－５００７３－ＡＡを有するＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性剤などの非イオン性有機シリコーン界面活性剤をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記殺虫性組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。あるいは、そのような追加の成分又は殺虫剤は、例えば、別々の局所的適用又は植物におけるトランスジェニック発現により、別々に提供することができる。あるいは、前記植物は、前記殺虫性組成物を用いて、並びに前記殺虫性組成物の有効性を改善する物質の別々の適用（その前、その後、又はその途中の）を用いて局所的に処理される。例えば、植物は、第一の、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤、例えばＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性のような剤非イオン性有機シリコーン界面活性剤を含有する溶液の局所的適用によりスプレーすることが出き、その後、第二の前記殺虫性組成物の局所的適用によりスプレーすることができる（逆も可能である）。

【００８７】

この方法で使用される特定のＲＮＡ（例えば、実施例に記載される前記ｄｓＲＮＡトリガー）の１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせは、ＲＮＡ単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、１つ以上のＲＮＡとパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤を含有する前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除の効果が見出される。

【００８８】

様々な実施態様では、前記殺虫性組成物は、微生物細胞を含むか、又は微生物中で産生

される。例えば、前記殺虫性組成物は、細菌や酵母細胞を含むか、又は細菌や酵母細胞中で産生することができる。類似の実施態様では、前記殺虫性組成物は、トランスジェニック植物細胞を含むか、又は植物細胞（例えば、ポリヌクレオチドを一時的に発現する植物細胞）中で産生され、そのような植物細胞は、植物中の細胞又は組織培養液又は細胞懸濁液中で増殖した細胞であり得る。

【００８９】

前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、翅目害虫による侵入の対象となる植物又は表面に前記組成物を適用することにより、例えば植物、植物の種子、又は種芋にスプレーする、散布する、又はコーティングすることにより、又は土壌ドレンチの適用により、又は溝内処理により、又は人工的な食餌中に提供することにより提供することができる。前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、鱗翅目害虫を維持するための特定の栄養要求を満たすように製剤化された人工食餌中に提供することができ、ここで、前記人工食餌は、化学合成などの別の供給源から得るか、又は微生物発酵から精製されるＲＮＡのある量が補給され；この実施態様は、例えば、有効なＲＮＡ処理レジメンのタイミングと量を決定するために有用であり得る。いくつかの実施態様では、前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、植物細胞の形で、又は植物細胞成分で、又は微生物（例えば、細菌又は酵母）又は微生物発酵産物で、又は合成のえさで提供される。一実施態様では、前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫により摂取されるえさの形で提供される。前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために、種子（又は種芋）の処理の形で提供することができる。

【００９０】

一実施態様では、前記殺虫性組成物は、鱗翅目害虫による侵入の対象となるいずれかの植物の形で提供され、ここで前記ＲＮＡは、前記植物の中又は上に含有される。そのような植物は、ＲＮＡを発現する安定したトランスジェニック植物、又は一時的に前記ＲＮＡを発現するか、又は例えばスプレー又はコーティングによって前記ＲＮＡで処理された非トランスジェニック植物である。安定したトランスジェニック植物は一般に、そのゲノムに組み込まれたＲＮＡをコードする組換え構造を含有する。

【００９１】

前記殺虫性組成物に有用なＲＮＡは、一本鎖（ｓｓ）又は二本鎖（ｄｓ）であり得る。実施態様は、前記ＲＮＡが、センス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、アンチセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）又は二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）からなる群より選択される少なくとも１つであるものを含み；これらのタイプのいずれのＲＮＡの混合物も使用することができる。一実施態様では、二本鎖ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドが使用される。前記ＲＮＡは、標準的なリボヌクレオチド以外の成分（例えば、一実施態様では末端デオキシリボヌクレオチドを含むＲＮＡ）を含むことができる。

【００９２】

前記殺虫性組成物中のＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを有する。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の配列を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対して正確に（１００％）同一である。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択され

る配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性のすべての配列を有する。

【００９３】

前記殺虫性組成物中のＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは１８個以上、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はそれ以上の１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つを含む。いくつかの実施態様では、前記セグメントは、１８個以上、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりもより多い連続したヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む１つの鎖を有する二本鎖核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ）であり；塩基対として表現される、そのような二本鎖核酸は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対応する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した、完全に一致した塩基対、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡ中に含有される各セグメントの長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡに典型的な長さよりもより長く、例えば、各セグメントの長さは、少なくとも約３０個の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡの全長、又は前記ＲＮＡに含有される各セグメントの長さは、関心対象の配列（前記標的遺伝子配列群から成る群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子）の全長よりも短い。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡの全長は、約５０個から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ＲＮＡの場合）又は塩基対（二本鎖ＲＮＡの場合）の間である。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、長さが約５０個から約５００個の間のヌクレオチドの少なくとも１つのＲＮＡ鎖を含む。

【００９４】

前記殺虫性組成物中のＲＮＡは、一般的に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る。そのような標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含むことができる。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されており、ここで各標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する。様々な実施態様では、前記ＲＮＡは、１つ以上の遺伝子を抑制するように設計されており、ここで各遺伝子は、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有し、そしてこの群からの複数の遺伝子を抑制するように、又はこれらの遺伝子の１つ以上の異なる領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記ＲＮＡは、複数のセクション又はセグメントを含み、そのそれぞれは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。そのような場合、各セクションは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記ＲＮＡは、タンデム又は反復配列において複数のセクションを含むことができ、ここで各セクションは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含み；前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば、前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、そして標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、前記セグメントの間に、又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【００９５】

前記殺虫性組成物中のＲＮＡの全長は、１８個の連続したヌクレオチドよりも長くすることができ、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、前記ＲＮＡの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群及びトリガー配列からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたＲＮＡのセクション又はセグメントの長さよりも長くすることができる。例えば、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することができるか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡに対して特異的に関連しない（それに対して相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの１つ以上のセグメントのすぐ隣に位置する追加のヌクレオチド含む。一実施態様では、前記ＲＮＡは、前記セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのような１つのセグメントを含む。別の実施態様では、前記ＲＮＡ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、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、前記ＲＮＡ全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群から選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子における連続したヌクレオチドの断片に対して１００％同一でないか又は相補的でない。例えば、いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選

択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群中より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ中に、対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【００９６】

様々な実施態様では、前記殺虫性組成物中のＲＮＡは、天然に存在するリボヌクレオチドからなる。実施態様は、例えば、完全にリボヌクレオチドからなる合成ＲＮＡ、又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又は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を含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、イノシン、チオウリジン、又はプソイドウリジンなどの非標準的ヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。（ａ）前記殺虫性組成物中のＲＮＡは、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施態様は、前記ＲＮＡが、化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などの、インビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養液中の発現により産生されるか（培養液中で増殖された植物又は昆虫の細胞など）、植物細胞中の発現により産生されるか、又は微生物発酵によって産生される。

【００９７】

いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、発現構成物の一部ではない単離されたＲＮＡとして提供される。いくつかの実施態様では、前記ＲＮＡは、プロモーター又はターミネーター配列などの追加の要素を欠いている単離されたＲＮＡとして提供される。そのようなＲＮＡは比較的短いものであり得、例えば、一本鎖又は二本鎖ＲＮＡは、約１８から約３００の個の間、又は約５０から約５００個の間のヌクレオチド（一本鎖ＲＮＡの場合）、又は約１８から約３００個の間、又は約５０から約５００個の間の塩基対（二本鎖ＲＮＡの場合）である。あるいは、ＲＮＡは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物で提供されることができ、例えば、組換え植物ウイルスベクター又は組換えバキュロウイルスベクターに含まれ得る。いくつかの実施態様では、そのような組換え発現の構成物又はベクターは、アプタマー又はリボザイムをコードする追加のＲＮＡ、又は目的の遺伝子（例えば、殺虫タンパク質）を発現するための発現カセットを含むなど、追加の要素を含むように設計される。

ＶＩＩ．鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法、及びそのように適用される植物及び種子

【００９８】

本発明の別の態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して、本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供する方法に関連するものであり、それにより得られる植物は、前記ポリヌクレオチドが発現されない対照植物と比較して、鱗翅目害虫に対する改善された耐性を有する。一実施態様では、前記方法は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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、植物内で発現することを含む。一実施態様では、本発明は、配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３

、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有するＤＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチドに対して同一又は相補的である、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中に発現することを含む、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された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する」とは、一般的に「植物中にＲＮＡ転写物を発現する」ことを意味し、例えば、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つの断片に対してアンチセンス又は本質的に相補的であるリボヌクレオチド配列を含むＲＮＡを植物中に発現することを意味する。実施態様は、前記植物中に発現するポリヌクレオチドが、前記トリガー配列群より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又はその相補体であるものを含む。しかし、前記植物中に発現するポリヌクレオチドはまた、ＤＮＡ（例えば、ゲノム複製の間に植物中で産生されるＤＮＡ）、又は、そのようなＤＮＡによりコードされるＲＮＡで有り得る。本発明の関連する態様は、前記方法で使用される単離されたポリヌクレオチド及び前記方法によって提供される改変された鱗翅目耐性を有する植物を含む。

【００９９】

前記方法は、植物において少なくとも１つのポリヌクレオチドを発現させることを含み、ここで前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチドがＤＮＡ（例えば、単離されたＤＮＡ分子の形で、又は発現構成物体として、又は形質転換ベクターとして）の形で植物に提供され、そして前記植物中で発現したポリヌクレオチドは、植物中の第二のポリヌクレオチド（例えば、第一のポリヌクレオチドのＲＮＡ転写物）である。一実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、トランスジェニック発現、すなわち、前記ポリヌクレオチドを植物の１つ又は複数の細胞中に発現できる場所から植物のゲノムに安定的に組み込むことにより、植物中に発現される。一実施態様では、第一のポリヌクレオチド（例えば、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して、本質的に同一であるか相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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ＤＮＡ構成物）が安定的に植物のゲノムに組み込まれ、そこから第二の産生されたポリニクレオチド（例えば、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して、本質的に同一であるか相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントの形質転換物を含むＲＮＡ転写物）が植物の１つ又は複数の細胞で発現する。安定的に形質転換植物を提供する方法は、「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利用」と題された項で提供される。

【０１００】

別の実施態様では、植物で発現した前記ポリヌクレオチドは、一過性の発現（すなわち

、植物のゲノムへの配列の安定した組み込みに起因しない発現）により発現される。そのような実施態様では、前記方法は、当技術分野で公知の日常的な技術によりポリヌクレオチド（例：ｄｓＲＮＡ又はｄｓＤＮＡ）を植物に導入するステップを含むことができる。例えば、一時的な発現は、植物の葉に針のない注射器を使用してポリヌクレオチド溶液を浸透させることにより達成され得る。

【０１０１】

植物中で発現したポリヌクレオチドが、一時的な発現により発現されるいくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡ、又はＲＮＡとＤＮＡの両方の形で植物に提供され、そして二次的に産生された第二のポリヌクレオチドは、植物中で一時的に発現される。いくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチドは、（ａ）一本鎖ＲＮＡ分子（ｓｓＲＮＡ）、（ｂ）自己ハイブリダイズして二本鎖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）自己ハイブリダイズして二本鎖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されたＰｏｌＩＩＩ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ＰｏｌＩＩＩ遺伝子を含む二本鎖ＤＮＡ分子、及び（ｉ）二本鎖で、ハイブリダイズしたＲＮＡ／ＤＮＡ分子、又はそれらの組み合わせから１つ以上選択される。特定の実施態様では、第一のポリヌクレオチドは、例えば、固体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル、及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルジョン、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤などの、適切な形状で、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は作物植物の種子の処理又は種芋の処理の形で、ポリヌクレオチド含有組成物の植物への局所適用により植物に導入される。殺虫剤の製剤化及び種子処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などを任意選択的に組成物に含むことができる。そのような実施態様では、前記ポリヌクレオチド含有組成物は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含むことができ；一実施態様では、前記組成物は、現在、Ｍｏｍｅｎｔｉｖｅ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ、Ａｌｂａｎｙ、Ｎ.Ｙから入手可能な、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤例えば、ＣＡＳ番号２７３０６－７８－１及びＥＰＡ番号ＣＡＬ．ＲＥＧ．Ｎｏ．５９０５－５００７３－ＡＡを有するＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性剤などの非イオン性有機シリコーン界面活性剤をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記局所的に適用される組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。あるいは、そのような追加の成分又は殺虫剤は、例えば、別々の局所的適用又は植物におけるトランスジェニック発現により、別々に提供することができる。あるいは、前記植物は、前記ポリヌクレオチド含有組成物に加えて前記ポリヌクレオチド含有組成物の有効性を改善する物質の別々の（その前、その後、又はその途中での）適用を用いて局所的に処理される。例えば、前記植物は、第一の、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤、例えばＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性のような剤非イオン性有機シリコーン界面活性剤を含有する溶液の局所的適用に続く、第二の前記ポリヌクレオチドを含む組成物の局所的適用（逆も可能である）を用いてスプレーされ得る。

【０１０２】

この方法で使用される特定のポリペプチド（例えば、実施例に記載されるポリヌクレオ

チドトリガー）の１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせは、ポリヌクレオチド単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除の促進された改善をもたらすことが予測される。一実施態様では、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群（例えば、実施例に記載されるポリヌクレオチドトリガー）より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む少なくとも一つのポリヌクレオチドを発現するトランスジェニック植物、及びパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される非ポリヌクレオチド殺虫剤をコードする１つ以上の遺伝子が、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を示すことが見いだされる。

【０１０３】

前記植物中で発現したポリヌクレオチドが一時的な発現により発現されるいくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチドが、ＲＮＡ又はＤＮＡ、又はＲＮＡとＤＮＡの両方の形で植物に提供され、二次的に産生された第二のポリヌクレオチドが植物中に一時的に発現され；第一のポリヌクレオチドの適用の部位は、第二のポリヌクレオチドが一時的に発現する部位と同じである必要はない。例えば、第一のポリヌクレオチドは、葉の上への局所的な適用によるか、又は、茎に注入することにより植物に提供することができ、そして第二のポリヌクレオチドは、植物中の他の場所、例えば、根又は植物全体を通して一時的に発現することができる。前記方法のいくつかの実施態様では、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物は、植物の地上部に局所的に適用され、例えば、植物の葉、茎、及び開花部分に噴霧又は散布される。他の実施態様では、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物は、植物の地下部分に、例えば根などに、例えば土壌トレンチを用いて局所的に適用される。他の実施態様では、少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む組成物を、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に成長した種子（又は、ジャガイモの場合は、種芋に局所的に適用される）に局所的に適用される。いくつかの実施態様では、植物中で発現するポリヌクレオチドはＲＮＡであり、一本鎖（ｓｓ）又は二本鎖（ｄｓ）ＲＮＡ、又はその両方の組み合わせであり得る。

【０１０４】

いくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチド（ＤＮＡ又はＲＮＡ又はその両方）が植物に提供され、その後、第一のポリヌクレオチドに対応する（同一又は相補的な）配列を有する第二のポリヌクレオチドが植物中に発現される。そのような実施態様では、植物中に発現するポリヌクレオチドは、ｓｓＲＮＡ又はｄｓＲＮＡ、又はその両方の組み合わせであり得るＲＮＡ転写物である。前記ポリヌクレオチドが一時的な発現により発現されるいくつかの実施態様では、第一のポリヌクレオチドがＲＮＡ又はＤＮＡ又はＲＮＡとＤＮＡの両方の形で植物に提供され、そして二次的に産生された第二のポリヌクレオチドが植物中で一時的に発現され；そのような実施態様では、前記第一のポリヌクレオチドは、（ａ）一本鎖ＲＮＡ分子（ｓｓＲＮＡ）、（ｂ）自己ハイブリダイズして二本鎖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）自己ハイブリダイズして二本鎖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されたＰｏｌＩＩＩ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ＰｏｌＩＩＩ遺伝子を含む二本鎖ＤＮＡ分子、及び（ｉ）二本鎖で、ハイブリダイズしたＲＮＡ／ＤＮＡ分子、又はそれらの組み合わせの一つ以上から選択される。前記ポリヌクレオチドが一時的な発現により発現されるそのような実施態様では、前記第一のポリヌクレオチドは、ＤＮＡ及びＲＮＡ中に存在するような天然に存在するもののようなヌクレオチドからなり得る。ポリヌクレオチドが一時的な発現により発現されるそのような実施態様では、前記第一のポリヌクレオチドは、化学的に修飾することができ、すな

わち化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。前記第一のポリヌクレオチドは、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施態様は、前記第一のポリヌクレオチドが、化学的又は酵素的に合成されるか（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ又は他のポリメラーゼを使用した転写などのインビトロ転写による）、微生物中又は細胞培養液中（培養液中で増殖した植物又は昆虫の細胞）中での発現により産生されるか、植物細胞中での発現により産生されるか、又は微生物発酵により産生されるものを含む。第一のポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡの断片として提供され得る。あるいは、前記第一のポリヌクレオチドは、より複雑な構成物中で、例えば組換え発現構成物の一部の中で提供されるか、又は、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれることができ；そのような組換え発現構成物又はベクターは、関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性のタンパク質）を発現するための発現カセットなどの追加の要素を含むように設計することができる。

【０１０５】

いくつかの実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、ＲＮＡ分子であり、比較的短いもの、例えば約１８から約３００、又は約５０から約５００ヌクレオチドの一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチド（一本鎖ポリヌクレオチドの場合）、又は約１８から約３００、又は約５０から約５００塩基対（二本鎖ポリヌクレオチドの場合）であり得る。あるいは、前記ポリヌクレオチドは、例えば、組換え発現の構成物の一部として、より複雑な構成物中で、例えば組換え発現構成物の一部の中で提供されるか、又は、組換えベクター中、例えば組換え植物ウイルスベクター中又は組換えバキュロウイルスベクター中に含まれることができる。いくつかのそのような組換え発現構成物又はベクターは、関心対象の遺伝子（例えば、殺虫性のタンパク質）を発現するための発現カセットなどの追加の要素を含むように設計することができる。

【０１０６】

前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又は上記のいずれかの相補的ＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを有する。一実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の配列を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対して、正確に（１００％）同一である。いくつかの実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の全ての配列を有する。

【０１０７】

一般的に、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、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。そのような標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含む。特定の実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されている。様々な実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、各遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有する、１つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、そしてこの群からの複数の遺伝子を抑制するように、又はこれら遺伝子の様々な一つ以上

の領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記植物に発現するポリヌクレオチドは、複数のセクション又はセグメントを含み、その各セグメントは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド、又は上記のいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。そのような場合、各セクションは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、そして標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記植物に発現するポリヌクレオチドは、タンデム又は反復配列において複数のセクションを含むことができ、ここで各セクションは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含み、前記セグメントは、標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば、前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、そして標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメントの間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【０１０８】

前記植物中に発現するポリヌクレオチドの全長は、１８個以上の連続したヌクレオチドよりも長いものであることができ、前記標的遺伝子配列群から選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、前記植物に発現するポリヌクレオチドの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたポリヌクレオチドのセクション又はセグメントの長さよりも長くなることができる。例えば、前記植物で発現しているポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することが出来るか、活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子、又はその相補的なＤＮＡに対して特異的に関連しない（すなわち、相補的でない又は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の又は相補性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチドの１つ以上のセグメントのすぐ隣に位置する追加のヌクレオチドを含む。一実施態様では、前記植物中で発現するポリヌクレオチドは、セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのような１つのセグメントを含む。別の実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、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、例えば、３’オーバーハングを形成するために２つのデオキシリボヌクレオチドを含むｄｓＲＮＡである。したがって、様々な実施態様では、前記植物中で発現するポリヌクレオチド全体のヌクレオチド配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子における連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して１００％同一又は相補的ではない。例えば、いくつかの実施態様では、前記植物中に発現するポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記

標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡにおいて対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【０１０９】

関連する態様では、本発明は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して、本質的に同一又は相補的である１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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で植物中に発現することにより提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関するものであり、それにより得られた植物は、前記ポリヌクレオチドが発現されない対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する。関連する態様において、本発明は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡ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で前記植物に発現させることにより提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物に関するものであり、それにより得られた植物は、ポリヌクレオチドが発現されない対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する。一実施態様は、前記トリガー配列群から選択される配列を有するＲＮＡ、又はその相補体を前記植物に発現することにより提供される、対照植物と比較して改善された鱗翅目害虫の侵入に対する耐性を有する作物植物である。さらに別の態様では、本発明は、この方法により提供される、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物により産生される種子（特にトランスジェニック子孫種子）に関する。また、この方法により提供される鱗翅目害虫に対する改善された耐性を有する植物により産生されるコモディティ製品、及びそのような植物のトランスジェニック子孫種子から産生されるコモディティ製品も意図される。

【０１１０】

ＶＩＩＩ．鱗翅目害虫を防除するための組換えＤＮＡ構成物

本発明の別の態様は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含むＤＮＡ要素に操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物を提供する。いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、（ａ）配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有する標的遺伝子、又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した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；又は（ｂ）配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７

、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性を有する１８、１９、又は２１以上の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡを含むＤＮＡ；又は（ｃ）標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド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コードするＤＮＡであって、ここで前記標的遺伝子が配列番号２、５、７、９、１３、２１、２６、２７、２９、３６、３７、３９、４４、４７、８７、９５、９９、１０３、３０１、３０９、３１８、３１９、３２０、３２１、３２３、３２４、３２８、３４１、３４３、３４６、３５６、３５８、３５９、５０３、５０４、５０５、５０６、５０９、５１０、５３０、５３２、５３３、５４２、５４５、５４６、５４７、５４９、５５１、５５２、５５３、５５９、５６０、５６１、５６３、５６４、５７０、５７２、５７３、５８１、５９３、５９６、６０２、６１１、６１２、６２０、６６５、６６６、６７２、７１７、７３０、７３１、７３６、７３７、７３８、７４０、７４１、７４２、７４３、７４９、７５７、７６０、７６１、７６３、７６６、８０８、８０９、８１０、８１４、８１５、８１７、８１８、８２１、８２２、１１０４、１１０５、１１０６、１１１１、１１１３、１１１６、１１２１、１１２３、１１２４、１１３２、１１３３、１１４７、１１５６、１１５７、１１６３、１１６６、１１８７、１１９０、１１９２、１１９５、１１９６、１２１６、１２１７、１２４０、１２４３、１２５１、１２６３、１２６４、１２６５、１２７０、１２７５、１２７９、１２８３、１２９０、１３０８、１３１０、１３１６、１３１８、１３２０、１５６４、１５６５、１５６９、１６２２、及び１６２３からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ；又は（ｄ）前記トリガー遺伝子配列群又は前記標的遺伝子から転写されるＲＮＡにおける遺伝子より選択される標的遺伝子に対して相補的である少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した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；又は（ｅ）前記トリガー配列群より選択されるヌクレオチド配列又はその相補体、又は鱗翅目害虫由来のオーソロガスヌクレオチド配列に対して相補的である少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチドを含むＲＮＡをコードするＤＮＡであって、ここで前記オーソロガスヌクレオチド配列は、前記トリガー配列群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有し、ここでパーセント配列同一性は同一長にわたって計算される、ＤＮＡ；又は（ｆ）少なくとも１つの二本鎖ＲＮＡ領域、前記トリガー配列群、又はその相補体、又は鱗翅目害虫由来のオーソロガスヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である少なくとも１８、１９、２０若しくは２１個の連続したヌクレオチドを含む少なくとも１つの鎖を含むＲＮＡをコードするＤＮＡであって、ここで前記オーソロガスヌクレオチド配列が、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡより選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有し、そして、ここでパーセント配列同一性は同一長にわたって計算される、ＤＮＡ；又は（ｇ）前記トリガー配列群、又はその相補体より選択されるヌクレ

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る異種のプロモーターを含む。実施態様は、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群より選択される配列を有するＲＮＡをコードするＤＮＡ要素に操作可能に結合された異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物、又はその相補体を含む。

【０１１１】

実施態様は、トリガー配列群より選択される配列を有する鎖、又はその断片、又はそのいずれかの相補体から選択される配列を有する鎖を有するｄｓＲＮＡをコードするＤＮＡに操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物を含む。前記組換えＤＮＡ構成物は、例えば、そのような組換えＤＮＡ構成物の転写物を植物中に発現させることにより、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有する植物を提供するのに有用である。前記組換えＤＮＡ構成物は、鱗翅目害虫の侵入からの保護が必要な植物、種子、繁殖可能な植物の部分、土壌又は畑、又は表面に適用できる組成物を作成するのに有用なポリヌクレオチドの製造にも有用である。本発明の関連する態様は、組換えＤＮＡ構成物を含む組成物；前記組換えＤＮＡ構成物を含む植物染色体又は色素体又は組換え植物ウイルスベクター又は組換えバキュロウイルスベクター；前記組換えＤＮＡ構成物をそのゲノム中に有し、任意選択的にパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をコードするＤＮＡをそのゲノム中に含む、トランスジェニックナス科植物細胞、及びそのような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、又はそのトランスジェニックナス科植物の果実、種子又は繁殖可能な部分；及び組換えＤＮＡ構成物又はそれにコードされたＲＮＡの発現又はそれによる処理により提供される、改善された鱗翅目の耐性を有する植物を含む。

【０１１２】

組換えＤＮＡ構成物は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡ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異種プロモーターを含む。いくつかの実施態様では、前記１８個以上の連続したヌクレオチドのセグメントは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はその相補的なＤＮＡの断片に対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性を有する。いくつかの実施態様では、前記連続したヌクレオチドは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又はその相補的なＤＮＡの同等の長さの断片に対して、正確に（１００％）同一である。

いくつかの実施態様では、前記ＤＮＡは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又はその相補的なＤＮＡに対して約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％の同一性の全ての配列を有する。

【０１１３】

したがって、前記組換えＤＮＡ構成物は、標的遺伝子配列群より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個以上の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡ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異種プロモーターを含む。いくつかの実施態様では、前記ＤＮＡは、少なくとも１８個以上の、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はそれ以上の連続シタヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、前記セグメントは、その数が、１８個を超える、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりもより多い連続したヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記ＤＮＡは、前記標的遺伝子配列群選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡより少なくとも１つのセグメントを含むＲＮＡをコードする。特定の実施態様では、ＤＮＡは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して、１００％の同一性の配列を有する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡを含む１つの鎖を含む一本鎖を有する二本鎖核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ）をコードし；標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対応する、少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した完全に一致した塩基対又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。特定の実施態様では、前記ＤＮＡに含有される各セグメントの長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡの典型的な長さよりも長い。いくつかの実施態様では、各セグメントの長さは、少なくとも約３０個の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。いくつかの実施態様では、前記ＤＮＡの全長、又は前記ポリヌクレオチドに含有される各セグメントの長さは、関心対象（前記標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子）の配列の全長よりも短い。いくつかの実施態様では、前記ＤＮＡの全長は、約５０個から約５００個の間のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施態様では、ＤＮＡは、配列番号１１５、１１６、１１９、１２１、１２３、１２７、１３５、１４０、１４１、１４３、１５０、１５１、１５３、１５８、１６１、２０１、２０９、２１３、２１７、４３４、４４２、４５１、４５２、４５３、４５４、４５６、４５７、４６１、４７４、４７６、４７９、４８９、４９１、４９２、５２１、５２２、５２３、５２４、５２７、５２８、５３６、５３８、５３９、８２３、８２６、８２７、８２８、８３０、８３２、８３３、８３４、８４０、８４１、８４２、８４４、８４５、８５１、８５３、８５４、８６２、８７４、８７７、８８３

、８９２、８９３、９０１、９４６、９４７、９５３、９９８、１０１１、１０１２、１０１７、１０１８、１０１９、１０２１、１０２２、１０２３、１０２４、１０３０、１０３８、１０４１、１０４２、１０４４、１０４７、１０８９、１０９０、１０９１、１０９５、１０９６、１０９８、１０９９、１１０２、１１０３、１３３４、１３３５、１３３６、１３４１、１３４３、１３４６、１３５１、１３５３、１３５４、１３６２、１３６３、１３７７、１３８６、１３８７、１３９３、１３９６、１４１７、１４２０、１４２２、１４２５、１４２６、１４４６、１４４７、１４７０、１４７３、１４８１、１４９３、１４９４、１４９５、１５００、１５０５、１５０９、１５１３、１５２０、１５３８、１５４０、１５４６、１５４８、１５５０、１６２４、１６２５、１６２９、１６８２、又は１６８３からなる群、又はその組み合わせ、又はその相補体より選択される配列を有するＲＮＡをコードする。

【０１１４】

前記組換えＤＮＡ構成物は、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たＤＮＡに操作可能に連結された異種プロモーターを含む。そのような標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含むことができる。特定の実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されている。様々な実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、各遺伝子が標的遺伝子配列群からなる群より選択される配列を有する、１つ以上の遺伝子を抑制するように設計され、そしてこの群からの複数の遺伝子を抑制するように設計されるか、又はこれらの遺伝子の１つ以上の様々な領域を標的とするように設計することができる。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントをそれぞれ含む複数のセクション又はセグメントに操作可能に連結された異種プロモーターを含む。そのような場合、各セクションは、大きさ又は配列が同一であるか又は異なることができ、そして前記標的遺伝子に対してセンス又はアンチセンスであることができる。例えば、一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、タンデム又は反復配列において複数のセクションに操作可能に連結された異種プロモーターを含むことができ、ここで各セクションは、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含み、そのセグメントは、前記標的遺伝子の様々な領域に由来することができ、例えば、前記セグメントは前記標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、そして標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、セグメントの間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる。

【０１１５】

前記組換えＤＮＡ構成物は、１８個の連続したヌクレオチドより長い全長を有することができるＤＮＡに操作可能に連結された異種プロモーターを含み、そして前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントに加えた、ヌクレオチドを含むことができる。言い換えると、前記ＤＮＡの全長は、各標的遺伝子が前記標的遺伝子配列群からなる群より選択されるＤＮＡ配列を有する、１つ以上の標的遺伝子を抑制するように設計されたＤＮＡのセグメントの長さよりも長くなることができる。例えば、前記ＤＮＡは、前記標的遺伝子を抑制する１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントの「活性」セグメントに隣接するヌクレオチドを有することが出来るか、又は活性セグメント間に「スペーサー」ヌクレオチドを含むことができるか、又は５’末端で、３’末端で、又は５’と３’末端の両方で追加のヌクレオチドを有することができる。一実施態様では、前記異種のプロモーターは、前記標的遺伝子配列群、又はその相補的なＤＮＡより選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子に対して特異的に関連しない（すなわち、相補的でない又

は同一でない配列を有する）追加のヌクレオチド、例えば安定化している第二の構造を提供するか、又はクローニング又は製造における利便性を与えるヌクレオチドを含むＤＮＡに操作可能に連結される。一実施態様では、前記異種のプロモーターは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群からなる群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の又は相補性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの１つ以上のセグメントのすぐ隣に位置する追加のヌクレオチドを含むＤＮＡに操作可能に連結される。一実施態様では、前記異種プロモーターは、セグメントに隣接して、追加の５’Ｇ又は追加の３’Ｃ又はその両方を有する、そのような１つのセグメントを含むＤＮＡに操作可能に連結される。別の実施態様では、前記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に操作可能に連結される、したがって、様々な実施態様では、前記異種プロモーターは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子における連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの断片に対して１００％同一又は相補的ではない。例えば、いくつかの実施態様では、前記異種プロモーターは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して１００％の同一性を有する２１個の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡのそれぞれの少なくとも２つのセグメントを含み、ここで（１）前記少なくとも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り分離されているか、又は（２）前記少なくとも２つのセグメントは、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡにおいて対応する断片が存在する順序とは異なる順序で配置される。

【０１１６】

組換えＤＮＡ構成物において、異種プロモーターは、一本鎖（ｓｓ）又は二本鎖（ｄｓ）、又はその両方の組み合わせが可能な転写物をコードするＤＮＡに操作可能に連結される。前記方法の実施態様は、前記ＤＮＡがセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、アンチセンスｓｓＲＮＡ、又は二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を含む転写物、又はこれらのいずれかの組み合わせをコードするものを含む。

【０１１７】

前記組換えＤＮＡ構成物は、当業者に公知の適切な手段により提供される。実施態様は、前記組換えＤＮＡ構成物がインビトロで合成されるか、微生物中又は細胞培養液中（培養で増殖された植物又は昆虫の細胞など）の発現により産生されるか、植物細胞中の発現により産生されるか、又は微生物発酵により産生されるものを含む。

【０１１８】

組換えＤＮＡ構成物において使用する異種プロモーターは、植物において機能するプロモーター、原核生物において機能するプロモーター、真菌細胞において機能するプロモーター、及びバキュロウイルスプロモーターからなる群より選択される。プロモーターの非限定的な例は、「プロモーター」の項に記載される。

【０１１９】

いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、前記ＤＮＡにも操作可能に連結される第二のプロモーターも含む。例えば、１８個以上の連続した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、前記プロモーターが反対方向にコンバージェントな方法で転写するように配置された２つのプロモーターによって隣接して配置することができ、二本鎖ＲＮＡを形成するために互いに相補的かつハイブリダイズすることができるＤＮＡの逆鎖転写物を生成することができる。一実施態様では、前記ＤＮＡは、２つの根特異的プロモーターの間に位置し、これによりＤＮＡの反対方向への転写が可能となり、ｄｓＲＮＡの形成をもたらす。

【０１２０】

いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性

の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド又はその相補的なＤＮＡ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異種プロモーターに加えて、他のＤＮＡ要素を含む。そのようなＤＮＡ要素は、当該技術分野で公知であり、イントロン、リコンビナーゼ認識部位、アプタマー又はリボザイム、に加えてコーディング配列を発現するための（例えば、殺虫性タンパク質又は選択可能なマーカーなどの導入遺伝子を発現させるための）又はノンコーディング配列を発現するための（例えば、追加の抑制要素を発現するための）追加の発現カセットを含むが、これらに限定されない。小分子ＲＮＡ（例えば、特定の細胞又は組織においてのみ発現するｍｉＲＮＡ又はｓｉＲＮＡによる）による結合及び切断するための１つ以上の認識部位を含めることにより、植物におけるより正確な発現パターンが可能となり、ここで前記小分子ＲＮＡが発現する場所で前記組換えＤＮＡ構成物の発現が抑制される。

【０１２１】

いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は組換えベクター中に提供される。「組換えベクター」とは、１つの細胞から別の細胞に遺伝情報を伝達するために使用される組換えポリヌクレオチド分子を意味する。本発明に適した実施態様は、組換えプラスミド、組換えコスミド、人工染色体、及び組換え植物ウイルスベクター及び組換えバキュロウイルスベクターなどの組換えウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。代替的な実施態様は、異種プロモーターを含まないＤＮＡ要素を含む、組換えプラスミド、組換えコスミド、人工染色体、及び組換え植物ウイルスベクター及び組換えバキュロウイルスベクターなどの組換えウイルスベクターを含む。

【０１２２】

いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、植物の染色体又は色素体中、例えば、トランスジェニック植物細胞又はトランスジェニック植物中に提供される。したがって、組換えＤＮＡ構成物をそのゲノム中に有するトランスジェニック植物細胞、並びにそのようなトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物又は部分的トランスジェニック植物も本発明に包含される。部分的トランスジェニック植物は、例えば、前記トランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック根茎に接ぎ木された非トランスジェニック接ぎ穂を含む。実施態様は、トランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニックトマト根茎台木を含む。前記植物は、鱗翅目害虫による侵入の対象であるいずれの植物でもあり得る。具体的な関心対象は、前記植物が作物植物である実施態様である。実施態様は、植物が、発芽していない作物植物の種子、栄養成長段階の作物植物、繁殖段階の作物植物であるものを含む。実施態様は、前記植物が「種芋」であり、新たなジャガイモに繁殖できるジャガイモの塊茎又はジャガイモの塊茎の一部を意味するものを含む。さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載される組換えＤＮＡ構成物がそのゲノム中に有するトランスジェニック植物により産生される種子（特にトランスジェニック子孫種子）に関する。実施態様はまた、本明細書に記載される組換えＤＮＡ構成物をそのゲノムに有するトランスジェニック種芋を包含する。また、そのようなトランスジェニック植物により産生されるコモディティ製品、及びそのようなトランスジェニック植物のトランスジェニック子孫種子から産生されるコモディティ製品も意図される。

【０１２３】

前記組換えＤＮＡ構成物は、植物の又は植物種子の表面への局所適用、又は鱗翅目害虫の侵入からの保護を必要とするいずれかの基質への局所適用のための組成物中に提供することができる。同様に、前記組換えＤＮＡ構成物は、鱗翅目害虫への局所的な適用のための組成物中、又は鱗翅目害虫による摂取ための組成物中に提供することができる。様々な実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有するそのような組成物は、固体、液体（溶液などの均質混合物及び懸濁液、コロイド、ミセル、及びエマルションなどの非均質混合物を含む）、粉末、懸濁液、エマルション、スプレー、カプセル化又はマイクロカプセル化製剤からなる群より選択される少なくとも１つの形状で、提供され、マイクロビーズ又は他の担体粒子の中又は上に、フィルム又はコーティングの中に、又はマトリックスの上又は中に、又は種子処理として提供される。前記局所適用は、ナス科植物の果実又はナス

科植物の果実から得られた種子の局所的処理の形で、又は「種芋」の塊茎又は塊茎の断片の処理の形で（例えば、種芋を浸漬する、種芋にコーティングする、又は種芋に散布することにより）存在することができる。殺虫剤の製剤化及び種処理に関わる当業者に公知の、適切な結合剤、不活性担体、界面活性剤などは、前記組成物中に任意選択的に含むことができる。いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する局所適用のための前記組成物は、前記植物に局所的に移植された粒子、ペレット、又はカプセルからなる群より選択される少なくとも１つの局所的に移植可能な製剤であり；そのような実施態様では、前記方法は、局所的に移植可能な製剤を前記植物中に局所的に移植することを含む。いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する局所適用のための組成物は、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、スプレー、又はドレンチからなる群より選択される少なくとも１つの溝内製剤、又は溝に局所的に適用にするのに適したした他のいずれかの形態であり；そのような実施態様では、前記方法は、溝内製剤を用いた溝内処理を含む。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する局所適用のための組成物は、鱗翅目害虫により摂取されるか、そうでなければ内部に吸収され得る。例えば、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する局所適用のための組成物は、えさの形で存在することができる。いくつかの実施態様では、組換えＤＮＡ構成物を含む組成物は、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤からなる群より選択される１つ以上の成分をさらに含む。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、現在、Momentive Performance Materials, Albany, N.Yから入手可能な、ＳＩＬＷＥＴ（商標登録）ブランドの界面活性剤例えば、ＣＡＳ番号２７３０６－７８－１及びＥＰＡ番号ＣＡＬ．ＲＥＧ．Ｎｏ．５９０５－５００７３－ＡＡを有するＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性剤などの非イオン性有機シリコーン界面活性剤をさらに含む。いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含む前記組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をさらに含む。

【０１２４】

本明細書に記載される特定の組換えＤＮＡ構成物（例えば、実施例中に記載されるポリヌクレオチドトリガーを含む組換えＤＮＡ構成物）の、それがトランスジェニック発現又は局所適用のどちらであろうとも、１つ以上の非ポリヌクレオチド殺虫剤との組み合わせは、トランスジェニックＤＮＡ構成物単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、それがトランスジェニック発現又は局所適用のどちらであろうとも、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除における促進された改善をもたらすことが予想される。一実施態様では、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される非ポリヌクレオチド殺虫剤をコードする、１つ以上のポリペプチド並びに１つ以上のポリヌクレオチドを発現するための組換えＤＮＡ構成物は、組換えＤＮＡ構成物を発現する植物における鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を提供することが見いだされる。一実施態様は、前記トリガー配列群から選択される配列を含むセグメントを含むＲＮＡ並びにパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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

ク質からなる群より選択される非ポリヌクレオチドをコードする１つ以上の遺伝子を発現するための組換えＤＮＡに関する。

【０１２５】

前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、鱗翅目害虫による侵入の対象となる植物又は表面に前記組成物を適用することにより、例えば植物にスプレーすること、散布すること、又はコーティングすることにより、又は土壌ドレンチの適用により、又は人工食餌中に提供することにより、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために提供することができる。前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、鱗翅目害虫を維持するための特定の栄養要求を満たすように製剤化された人工食餌中に、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために提供することができ、ここで、前記人工食餌は、インビトロ合成のような別の供給源から得られた、又は微生物発酵又は他の生物学的供給源から精製された組換えＤＮＡ構成物のいくらかの量で補充され；この実施態様は、例えば、効果的な治療レジメンのタイミング及び量を決定するために有用であり得る。いくつかの実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、植物細胞の形で又は植物細胞成分中に、又は微生物（例えば、細菌又は酵母）中又は微生物発酵産物中に、又は合成食餌中に、鱗翅目害虫による食餌性摂取のために提供される。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、鱗翅目害虫により摂取されるえさの形で提供される。前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、種子処理の形で鱗翅目害虫による食食餌性摂取のために提供することができる。

【０１２６】

様々な実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、微生物細胞を含むか、又は微生物中で産生される。例えば、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、細菌又は酵母細胞を含むことができるか、又は細菌又は酵母細胞中で産生することができる。類似の実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物を含有する組成物は、トランスジェニック植物細胞を含むか、又は植物細胞（例えば、前記組換えＤＮＡ構成物を一時的に発現する植物細胞中）で産生され；そのような植物細胞は、植物中の細胞又は組織培養液又は細胞懸濁液中で増殖した細胞であり得る。

【０１２７】

ＩＸ．トランスジェニック植物細胞

いくつかの実施態様は、鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現を抑制するため、又は鱗翅目の侵入を防除するために、本明細書に記載される方法において有用なポリヌクレオチドを発現するトランスジェニック作物植物細胞に関する。一態様では、本発明は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの断片に対して約９５％から約１００％の同一性の配列を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含むＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノム中に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、鱗翅目害虫の幼虫の標的遺伝子配列の断片に対して本質的に同一又は本質的に相補的な少なくとも１つのサイレンシング要素を含むＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノム中に有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供し、ここで、前記標的遺伝子配列は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡから選択される。一態様では、本発明は、前記ＲＮＡに接触する又は前記ＲＮＡを摂取する鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現を抑制するＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノム中に有するトランスジェニックナス科植物細胞を提供し、ここで、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子の断片に相補的な１８個以上の連続した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、そしてここで前記標的遺伝子は、前記標的遺伝子配列群中の遺伝子からなる群より選択される。具体的な実施態様は、前記ＲＮＡに接触するか又は前記ＲＮＡを摂取する鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現を抑制するＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノム中に有するトランスジェニック作物植物細胞であり、ここで、前記ＲＮＡは、１つ以上の標的遺伝子配列群の断片に相補的な１８個以上の連続した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む。一態様では、

本発明は、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノムに有するトランスジェニック作物植物細胞を提供する。そのようなトランスジェニック作物植物細胞は、そのような植物細胞を欠いている対照植物と比較して、鱗翅目害虫の侵入に対する改善された耐性を有するトランスジェニック作物植物を提供するのに有用である。前記トランスジェニック作物植物細胞は、単離されたトランスジェニックナス科植物細胞、又は培養液中で増殖したトランスジェニックナス科植物細胞、又は鱗翅目害虫による侵入の対象であるいずれかのトランスジェニック作物植物のトランスジェニック細胞であることができる。

【０１２８】

一実施態様では、前記組換えＤＮＡは、前記トランスジェニック作物植物のゲノム中に安定的に組み込まれ、そこから前記トランスジェニックナス科植物の１つ又は複数の細胞中で発現することができる。安定して形質転換した植物を提供する方法は、「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利用」と題された項で提供される。

【０１２９】

いくつかの実施態様は、前記ＲＮＡに接触するか又は前記ＲＮＡを摂取する鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現を抑制するＲＮＡをコードする組換えＤＮＡを、そのゲノム中に有するトランスジェニックナス科植物細胞に関するものであり、ここで前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子に相補的な少なくとも１つのサイレンシング要素を含み、標的遺伝子配列は、標的遺伝子配列群又はその相補体から選択される。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の相補性の配列を有する少なくとも１つの１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡを含む。いくつかの実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群、前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に、インビボでハイブリダイズするか、又は生理的条件下（例えば、鱗翅目害虫の細胞において通常見出される生理的状態）でハイブリダイズすることが可能な少なくとも１つの１８個以上の連続したヌクレオチド、又はそのいずれかに相補的なＤＮＡを含む。前記連続したヌクレオチドの数は、少なくとも１８個、例えば、１８～２４個の間、又は１８～２８個の間、又は２０～３０個の間、又は２０～５０個の間、又は２０～１００個の間、又は５０～１００個の間、又は５０～５００個の間、又は１００～２５０個の間、又は１００～５００個の間、又は２００～１０００個の間、又は５００～２０００個の間、又はそれ以上である。いくつかの実施態様では、前記連続するヌクレオチドは、その数が、１８個を超える、例えば、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、又は３０個を超える、例えば、少なくとも約３５個、少なくとも約４０個、少なくとも約４５個、少なくとも約５０個、少なくとも約５５個、少なくとも約６０個、少なくとも約６５個、少なくとも約７０個、少なくとも約７５個、少なくとも約８０個、少なくとも約８５個、少なくとも約９０個、少なくとも約９５個、少なくとも約１００個、少なくとも約１１０個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１３０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１５０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１７０個、少なくとも約１８０個、少なくとも約１９０個、少なくとも約２００個、少なくとも約２１０個、少なくとも約２２０個、少なくとも約２３０個、少なくとも約２４０個、少なくとも約２５０個、少なくとも約２６０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２７０個、少なくとも約２８０個、少なくとも約２９０個、少なくとも約３００個、少なくとも約３５０個、少なくとも約４００個、少なくとも約４５０個、少なくとも約５００個、又は５００個よりもより多い連続したヌクレオチドである。特定の実施態様では、前記サイレンシング要素は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む

。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性の配列を有する少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む１つの鎖を有する二本鎖核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ）であり；塩基対として発現する、そのような二本鎖核酸は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡ又は標的遺伝子の同等の長さの断片に対応する少なくとも１８個、１９個、２０個、又は２１個の連続した、完全に一致した塩基対、又はその相補的なＤＮＡの少なくとも１つのセグメントを含む。特定の実施態様では、前記ＲＮＡに含有される各サイレンシング要素の長さは、天然に存在する制御性小分子ＲＮＡの典型的な長さよりも長い。いくつかの実施態様では、各セグメントの長さは、少なくとも約３０個の連続したヌクレオチド（又は塩基対）の長さである。特定の実施態様では、前記ＲＮＡの長さは、約５０個から約５００個の間のヌクレオチドの長さである。特定の実施態様では、前記ＲＮＡは、前記トリガー配列群より選択される配列を有する。

【０１３０】

いくつかの実施態様では、トランスジェニック作物植物細胞は、追加の異種のＤＮＡ配列をさらに発現することが可能である。一実施態様では、前記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、植物性エクジステロイド、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より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ＤＮＡをさらに含むゲノムを有する。特定の実施態様では、前記トランスジェニック作物植物細胞は、（ｉ）前記トリガー列群より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ＤＮＡ、及び（ｉｉ）パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤をコードするＤＮＡを、そのゲノム中に安定的に組み込む。

【０１３１】

関連する態様では、本発明は、前記トランスジェニック作物植物細胞、前記トランスジェニック作物植物から産生されるコモディティ製品、及びトランスジェニックナス科植物種子又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繁殖可能部分を含むトランスジェニック作物植物に関する。また、トランスジェニック作物植物により産生されるコモディティ製品、及びそのようなトランスジェニック作物植物のトランスジェニック子孫種子から産生されるコモディティ製品も意図される。

【０１３２】

Ｘ．標的遺伝子を選択する方法

本発明の別の態様は、ＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子の非ランダム選択の方法を提供する。一実施態様では、前記方法は、特定のゲノムにおいて単一又は低コピー数（非反復かつ非重複）で存在する標的遺伝子のサブセットを提供する。そのような標的遺伝子は、植物ゲノム由来の遺伝子、又は動物ゲノムの遺伝子であり得る。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、無脊椎動物の害虫、例えば植物の無脊椎動物害虫又は脊椎動物の無脊椎動物害虫の遺伝子である。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は、植物の昆虫害虫又は植物の線虫害虫の遺伝子である。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子は鱗翅目害虫の遺伝子である。さらなる態様は、本明細書に記載されるいずれかの前記方法により選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングための標的遺伝子に基づくポリヌクレオチド（例えば、実施例に記載されるｄｓＲＮＡトリガーのようなｓｓＲＮＡ又はｄｓＲＮＡトリガー、又はトランスジェニック植物を作成にするのに有用な組換え

ＤＮＡ構成物）を製造することを含む。

【０１３３】

一実施態様では、前記方法は、選択されたゲノムにおける単一コピー数又は低コピー数の遺伝子を特定するステップ、又は別法として、関連する生物由来のオルソログデータベースにおける単一又は低コピー数の遺伝子を特定して、選択された生物においてどの遺伝子が単一／低コピーになるかを予測するステップを含む。低コピー遺伝子、及び特に単一－コピー遺伝子は、ＲＮＡｉ介性サイレンシングのための標的として選択される。一実施態様では、前記単一又は低コピー数の遺伝子の特定は、第一の種由来の遺伝子のセットと第二の種由来の遺伝子のセットとの間の配列比較により実施され、ここで第二の種由来の遺伝子のセットは、第二の種における単一又は低コピー数として特定されている。一実施態様では、前記単一又は低コピー数の遺伝子の特定は、コンピュータにより実行されるアルゴリズムを第一の種の遺伝子のセットに適用して、第一の種由来の遺伝子のセットにおける単一又は低コピー数の遺伝子のサブセットを特定することにより実施され、その後、第二の種由来の遺伝子のセットを第一の種由来の単一又は低コピー数の遺伝子のサブセットと比較して、第二の種由来の対応する単一又は低コピー数の遺伝子を特定することにより実施される。第二の種由来の単一又は低コピー数の遺伝子は、ＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子として有用であり；これらの標的遺伝子の配列は、ポリヌクレオチド（例えば、実施例に記載されるｄｓＲＮＡトリガーのようなｓｓＲＮＡ又はｄｓＲＮＡトリガー、又はトランスジェニック植物を作成するための組換えＤＮＡ構成物）及び第二の種による侵入を防止又は防除するためのその使用方法を設計するために有用である。別の実施態様は、標的の生物に対してオーソロガスなモデル種のためのそのような情報を含有するデータベースを検索することにより、生物の生存に致命的である遺伝子を特定することに関する。

【０１３４】

前記方法の実施態様は、選択された生物の集団における低／単一コピー遺伝子のヌクレオチド多様性を推定し、そして最も低いヌクレオチド多様性をさらに有するそれらの低／単一コピー遺伝子を選択するさらなるステップを含む。低ヌクレオチド多様性をさらに有する低／単一コピー遺伝子は、ＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的として選択される。別の実施態様は、前記標的の生物に対してオーソロガスなモデル種のためのそのような情報を含有するデータベースを検索することにより、前記生物の生存に致命的である遺伝子を特定することに関する。

【０１３５】

前記方法の実施態様は、機能的又は進化的制約の推定値として、非同義（Ｋａ）ヌクレオチド変化に対する同義（Ｋｓ）の比率を比較するさらなるステップを含む。一実施態様では、前記方法は、ＫｓがＫａと同等か又はＫａより大きい遺伝子を選択するステップを含む。一実施態様では、前記方法は、Ｋａ＞＞Ｋａである遺伝子を選択するステップを含む。

【０１３６】

本発明の関連する態様は、本明細書に記載される遺伝子選択方法のいずれかによりゲノムから特定されたＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットである。一実施態様は、該ゲノム由来のより大きな遺伝子のセットから単一又は低コピー数の標的遺伝子を特定することによる、ゲノムより選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。一実施態様は、該無脊椎動物ゲノム由来のより大きな遺伝子のセットから単一又は低コピー数の標的遺伝子を特定することによる、無脊椎動物ゲノムより選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。特定の実施態様は、該鱗翅目のゲノム由来のより大きな遺伝子のセットから単一又は低コピー数の標的遺伝子を特定することによる、鱗翅目のゲノムより選択される鱗翅目害虫におけるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。特定の実施態様は、該鱗翅目のゲノム由来のより大きな遺伝子のセットから単一又は低コピー数の標的遺伝子を特定することによる、鱗翅目のゲノムより選択される鱗翅目害虫におけるＲ

ＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。
【０１３７】
別の実施態様は、該ゲノムを有する害虫の個体の集団における所与の遺伝子のセットのためにヌクレオチド多様性を推定すること、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る、ゲノムより選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。一実施態様は、該ゲノムを有する前記無脊椎動物の個々の集団における所与の遺伝子のセットのヌクレオチド多様性を推定すること、及び前記最も低いヌクレオチド多様性を有するそれらのゲノムを選択することによる、無脊椎動物のゲノムより選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。別の実施態様は、該ゲノムを有する無脊椎動物の個々の集団における低／単一コピー遺伝子のヌクレオチド多様性を推定すること、及び最も低いヌクレオチド多様性をさら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る、無脊椎動物ゲノムより選択されるＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。
【０１３８】
別の実施態様は、該ゲノムの遺伝子において、非同義（Ｋａ）ヌクレオチド変化に対する同義（Ｋｓ）の比率を比較する同義（Ｋｓ）と非同義（Ｋａ）のヌクレオチド変化の比率を比較すること、及びＫｓがＫａと同等か又はＫａより大きい遺伝子を選択することによる、ゲノムより選択されるＲＮＡｉ媒介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。一実施態様では、ＲＮＡｉ媒介性サイレンシングの標的遺伝子のためのセットは、ＫｓがＫａと同等か又はＫａより大きい遺伝子である。一実施態様では、ＲＮＡｉ媒介性サイレンシングのための標的遺伝子のための前記セットは、Ｋｓ＞＞Ｋａである遺伝子である。一実施態様は、無脊椎動物ゲノムより選択され、そこで選択された遺伝子はＫｓ＞＞Ｋａである、ＲＮＡｉ仲介性サイレンシングのための標的遺伝子のセットに関する。
【０１３９】
本発明の更なる態様は、前記トリガー遺伝子配列群、又はその相補体より選択される配列又は配列の断片によりコードされるタンパク質と結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体、及びトリガー配列群及びその相補体より選択される配列又は配列の断片によりコードされるタンパク質と結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はその補体であり；そのような抗体は、例えば、“Antibody Methods and Protocols”(Proetzel and Ebersbach, editors, 2012, Humana Press, New York)又は“Making and Using Antibodies”(Howard and Kaser, editors, 2006, CRC Press, Boca Raton)に記載される日常的なプロトコルを使用して、当業者に公知の日常的な方法により作成される。
【０１４０】
ＸＩ．「タイリング」による有効なポリヌクレオチドの選択
本明細書に記載される実施態様において使用されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子の全長である必要はなく、そして多くの実施態様では、前記標的遺伝子よりもはるかに短い。有効なポリヌクレオチドを選択するのに有用な技術の例は、「タイリング」、すなわち標的遺伝子の隣接又は部分的に重複するセグメントに対応するポリヌクレオチドの評価である。
【０１４１】
いくつかの実施態様では、有効なポリヌクレオチドトリガーは、前記標的遺伝子の長さに沿って、選択された長さの断片、例えば、部分的に重複している領域、（例えば２５個のヌクレオチド）を有する２００個から３００個のヌクレオチドの長さの断片から選択される遺伝子を「タイリング」することにより特定することができる。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドトリガー配列は、前記標的遺伝子に固有である領域（と同一か又はそれに対して相補的な）ヌクレオチドを有するに対応する（ヌクレオチド同一性又は相補性を有する）ように設計される。いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子の選択された領域は、コーディング配列又はノンコーディング配列（例えば、プロモーター領域、３

’非翻訳領域、イントロン等）、又はその両方の組み合わせを含むことができる。

【０１４２】

複数の標的遺伝子を抑制するのに効果的な標的の設計が関心対象である場合、前記複数の標的遺伝子配列は、整列され、そしてポリヌクレオチドトリガーは、複数の標的の間で共通の高い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、複数の標的配列の間の１つを選択的に抑制するのに有効な標的の設計が関心対象である場合、複数の標的遺伝子配列は、整列され、そしてポリヌクレオチドトリガーは、複数の標的の間で共通の配列相同性がないか又は低い相同性を有する領域に対応するように設計される。

【０１４３】

ＸＩＩ．有効なポリヌクレオチドの選択における熱力学的考察

いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチドトリガーは、熱力学的考察を用いて設計するか、又はその配列を最適化できる。例えば、ポリヌクレオチドは、１つの核酸鎖（例えば、ポリヌクレオチドトリガー又は個々のｓｉＲＮＡ）と別の核酸鎖（例えば、標的遺伝子転写物）との間の熱力学的に制御されたハイブリダイゼーションに基づいて選択することができる。

【０１４４】

標的遺伝子のＲＮＡｉ媒介性サイレンシングに有効である場合があるヌクレオチド配列を予測する方法及びアルゴリズムは、当該技術分野で公知である。そのような方法及びアルゴリズムの非限定的な例は、「ｉ－ｓｃｏｒｅ」Ichihara et al. (2007) Nucleic Acids Res., 35(18): 123e；「Ｏｌｉｇｏｗａｌｋ」、rna.urmc.rochester.edu/servers/oligowalkで公開され、Lu et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36:W104-108に記載されている；「Ｒｅｙｎｏｌｄｓ ｓｃｏｒｅ」Khovorova et al. (2004) Nature Biotechnol., 22:326-330に記載される；及び「ｓｉ－Ｆｉ」 Luck et al. (2019) Front. Plant Sciに記載されhttp://www.snowformatics.com/si-fi.htmlに公開されている；及び「ＳｎａｐＤｒａｇｏｎ」Hu et al. (2016) Nucleic Acids Res., 45: D672-D678に記載され、https://www.flyrnai.org/snapdragonに公開されている；及び「Ｅ－ＲＮＡｉ」Horn et al. (2010) Nucleic Acids Res., 38: W332-W339に記載され、https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/に公開されている、を含む。

【０１４５】

ＸＩＩＩ。許容されるミスマッチ

本明細で使用されるとき、「本質的に同一な」又は「本質的に相補的な」は、ポリヌクレオチド（又は二本鎖ポリヌクレオチドの少なくとも１つの鎖）が、標的遺伝子に、又は標的遺伝子から転写された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し、標的遺伝子の発現を抑制する（例えば、標的遺伝子転写物及び／又はコードされたタンパク質のレベル又は活性の低下をもたらす）ことを意味する。本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を抑制するために（例えば、標的遺伝子転写物又はコードされたタンパク質のレベル又は活性の低下をもたらすために、又は鱗翅目害虫の防除を提供するために）、標的遺伝子又は配列に対して、又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡに対して、１００％の同一性又は相補性を有する必要はない。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド又はその一部は、前記標的遺伝子又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡのいずれかにおける少なくとも１８個又は１９個の連続したヌクレオチドの配列と本質的に同一であるか、又は本質的に相補的であるように設計される。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチド又はその一部は、前記標的遺伝子又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡのいずれかにおける２１個の連続したヌクレオチドの１つ以上の配列に対して１００％同一であるか、又は１００％相補的であるように設計される。特定の実施態様では、「本質的に同一の」ポリヌクレオチドは、内因性標的遺伝子又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡのいずれかにおける１８個以上の連続したヌクレオチドの配列と比較して、１００％の配列同一性又は少なくとも約８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の配列

同一性を有する。特定の実施態様では、「本質的に相補的な」ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子又は標的遺伝子から転写されたＲＮＡのいずれかにおける１８個以上の連続したヌクレオチドの配列と比較して、１００％の配列相補性又は少なくとも約８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の配列相補性を有する。

【０１４６】

２つのポリヌクレオチド又はポリペプチドの文脈において本明細書で使用される配列同一性：用語「配列同一性」又は「同一性」は、特定された比較ウィンドウを越える最大の対応で整列されたときに同じである２つの分子の配列における残基を指す。

【０１４７】

本明細書で使用されるとき、用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウを超える分子の２つの最適に整列された配列（例えば、核酸配列又はポリペプチド配列）を比較することにより決定される値を指す場合があり、ここで、比較ウィンドウにおける配列の部分は、２つの配列の最適な整列のための参照配列（追加又は削除を含まない）と比較して追加又は削除（すなわちギャップ）を含む場合がある。前記パーセンテージは、両方の配列において同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を与えること、一致した位置の数を比較ウィンドウにおける位置の合計数で割りこと、及びその結果を１００倍して配列同一性のパーセンテージを与えることにより計算される。参照配列と比較してすべての位置で同一である配列は、参照シーケンスに対して１００％同一であるといい、その逆も同様である。配列長さの数値に関する用語「約」は、１～５％までの＋／－の分散を有する表示値を意味する。たとえば、約３０個の連続したヌクレオチドは、２７～３３個の連続したヌクレオチドの範囲、又はその間のいずれかの範囲を意味する。配列同一性のパーセンテージの数値に関する用語「約」は、最も近い整数に丸めた１～３パーセントまでの＋／－の分散を有する表示値を意味する。例えば、約９０％の配列同一性は、８７～９３％の範囲を意味する。ただし、前記配列同一性のパーセンテージは、１００％を超えることができない。したがって、約９８％の配列同一性は９５～１００％の範囲を意味する。

【０１４８】

標的遺伝子又は転写物に対するミスマッチを含有するポリヌクレオチドは、本明細書に記載される組成物及び方法の特定の実施態様において使用することができる。いくつかの実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子又は標的遺伝子の転写物における同等の長さのセグメントに対して本質的に同一又は本質的に相補的な、少なくとも１８個又は少なくとも１９個又は少なくとも２１個の連続したヌクレオチドを含む。特定の実施態様では、前記標的遺伝子又は標的遺伝子の転写物における同等の長さのセグメントに対して本質的に同一又は本質的に相補的である１８個、１９個、２０個、又は２１個以上の連続したヌクレオチドのポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子又は転写物に対して１つ又は２つのミスマッチ（すなわち、ポリヌクレオチドの２１個の連続したヌクレオチドと、前記標的遺伝子又は標的遺伝子の転写物における同等の長さのセグメントとの間の１つ又は２つのミスマッチ）を有することができる。特定の実施態様では、前記標的遺伝子又は標的遺伝子の転写物における同等の長さの配列に対して同一性又は相補性の長さの連続した１８個、１９個、２０個、又は２１個以上のヌクレオチドスパンを含有する約５０個、１００個、１５０個、２００個、２５０個、３００個、３５０個以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子又は転写物に対して１つ又は２つ以上のミスマッチを有することができる。

【０１４９】

内因性の標的遺伝子に対して又は前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡに対するミスマッチを有するポリヌクレオチドを設計するにおいて、特定のタイプのミスマッチ、及び忍容性が高い特定の位置でのミスマッチを使用することができる。特定の実施態様では、アデニンとシトシンの間又はグアノシンとウラシル残基の間に形成されるミスマッチは、Du et al. (2005) Nucleic Acids Res., 33:1671-1677に記載されるように使用さ

れる。いくつかの実施態様では、１９の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に記載されるように、低許容位置５、７、８又は１１（１９ヌクレオチド標的の５’末端より）に、中許容位置３、４、及び１２－１７（１９ヌクレオチド標的の５’末端より）に、及び／又は相補性領域の両端のいずれか、すなわち位置１、２、１８及び１９（１９ヌクレオチド標的の５’末端より）の高許容位置に位置する。許容されるミスマッチは、日常的なアッセイ例えば、鱗翅目害虫の幼虫に対するインビトロ食餌アッセイにおいて経験的に決定することができる。

【０１５０】

ＸＩＶ．中立（neutral）配列におけるサイレンシング要素の埋め込み

いくつかの実施態様では、前記標的遺伝子に対応する配列を有し、そして観察される前記標的遺伝子の抑制に関与するサイレンス要素は、「中性」配列に埋め込まれる、すなわち、前記標的遺伝子に対して同一な配列又は相補性を有さない追加のヌクレオチドに挿入される。中性配列は、例えば、ポリヌクレオチドの全長を増加させるために望ましいもので有り得る。例えば、製造における安定性、費用対効果、又は生物学的活性などの理由から、ポリヌクレオチドは特定の大きさであることが望ましい場合がある。いくつかの実施態様では、中性配列はまた、ヘアピントリガーにおいてループを形成するのに有用であり、又はトリガー領域間のスペーサーとしても有用である。

【０１５１】

別の鞘翅目の種であるＤｉａｂｒｏｔｉｃａ ｖｉｒｇｉｆｅｒａでは、約６０個の塩基対（ｂｐ）よりも長いか又は同等であるｄｓＲＮＡが、人工的な食餌バイオアッセイにおける生物学的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を参照のこと。したがって、一実施態様では、前記標的遺伝子配列群における標的遺伝子に対応し、鱗翅目の侵入の防除を提供することが見いだされた、２１塩基対のｄｓＲＮＡサイレンシング要素は、追加の３９塩基対の中性配列に埋め込まれ、それにより約６０個の塩基対のポリヌクレオチドを形成する。いくつかの実施態様では、前記ｄｓＲＮＡトリガーは、約６０個から約５００個の間、又は約１００個から約４５０個の間の塩基対の中性配列を含み、そこには、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有する標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性又は１００％の相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントが埋め込まれる。別の実施態様では、標的遺伝子の同等の長さの断片に対して１００％の同一性又は１００％の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、より大きなセクションの中性配列（例えば、総ポリヌクレオチド長が約６０個から約３００個の塩基対である）に埋め込まれた場合に有効であることが見出される。前記ポリヌクレオチドが中性配列の領域を含む実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、前記標的遺伝子と比較して相対的に低い全体的な配列同一性を有し；例えば、追加の１８９個の塩基対の中性配列中に埋め込まれた、（標的遺伝子の２１個のヌクレオチド断片に対して１００％の同一性又は相補性の）単一の２１個の塩基対トリガー（標的遺伝子の２１ヌクレオチド断片と１００％の同一性又は相補性を有する）を含有する、２１０個の塩基対の全長を有するｄｓＲＮＡは、標的遺伝子に対して約１０％の全体的な配列同一性を有する。

【０１５２】

ＸＶ．殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子

本発明の別の態様は、鱗翅目害虫により摂取されるか又は鱗翅目害虫が接触したとき、鱗翅目害虫中に死滅又は成長の阻害を引き起こす殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子を提供し、ここで、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、前記標的遺伝子より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡ（ｃＤＮＡ）の同等の長さのセグメントに対して本質的に同一又は本質的に相補的である１８個以上の連続したヌクレオチドの少なくとも１つのセグメントを含む。いくつかの実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は約５０個から約５００個の塩基対の長さである。いくつかの実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、長さが少なくとも３０個の連続した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

の実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡ（ｃＤＮＡ）の同等な長さのセグメントに対して本質的に同一又は本質的に相補的である１８個以上の連続したヌクレオチドの複数のセグメントを含み、ここで前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々な領域に由来し（例えば、前記セグメントは前記標的遺伝子の様々なエクソン領域に対応することができ、そして標的遺伝子に対応しない「スペーサー」ヌクレオチドは、前記セグメントの間又はセグメントに隣接して任意選択的に使用することができる）に由来するか、又は異なる標的遺伝子に由来する。いくつかの実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有するＤＮＡ（ｃＤＮＡ）の同等の長さのセグメントに対して本質的に同一又は本質的に相補的である１８個以上の連続したヌクレオチドの複数のセグメントを含み、ここで前記セグメントは、前記標的遺伝子の様々な領域に由来し、前記セグメントが標的遺伝子において自然に存在する順序とは異なる順序で、殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子中に配置される。いくつかの実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、前記標的遺伝子配列群より選択される配列を有する標的遺伝子又はＤＮＡ（ｃＤＮＡ）の同等の長さのセグメントに対して１００％の同一性又は１００％の相補性の配列を有する２１個の連続したヌクレオチドのそれぞれの複数のセグメントを含み、ここで前記セグメントは前記標的遺伝子の様々な領域に由来し、前記セグメントが標的遺伝子に自然に存在する順序とは異なる順序で、殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子中に配置される。いくつかの実施態様では、前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、前記トリガー配列群より選択される配列を含む一本鎖、又はその相補体を含む。前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、鱗翅目害虫の侵入を防除又は防止するために、植物に局所的に適用することができる。前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子は、鱗翅目害虫による摂取又は直接接触に適した形、例えば、スプレー又は粉末又はえさの形で提供することができる。前記殺虫性二本鎖ＲＮＡ分子を提供するための他の方法及び適切な組成物は、本発明の他の態様に関して前記先行する段落で説明したものと同様である。

【０１５３】

いくつかの実施態様は、１つ以上の殺虫性ポリヌクレオチド及び水又は他の溶媒を含むタンク混合物に関するものであり、任意選択的にカチオン性脂質又は有機シリコーン界面活性剤、又はその両方を含む。実施態様は、前記ポリヌクレオチドのタンク混合物製剤と、任意選択的にパタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも１つの殺虫剤を含む。そのような組成物の実施態様は、１つ以上の殺虫性ポリヌクレオチドが、細菌、真菌、酵母細胞などの生きた又は死んだ微生物中に提供されるか、又は微生物発酵産物として提供されるか、又は生きた又は死んだ植物細胞中に提供されるか、又は合成組換えポリヌクレオチドとして提供されるものを含む。一実施態様では、前記組成物は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含有する微生物の非病原性菌株を含み；微生物の摂取又は取り込み（intake）は、鱗翅目害虫の成長の阻害又は死滅をもたらし；適切な微生物の非限定的な例は、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｂ．ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｐｈｏｔｏｒｈａｂｄｕｓ ｓｐ．、Ｘｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ ｓｐ．、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｅｎｔｏｍｏｐｈｉｌａ及び関連するＳｅｒｒａｔｉａｓｐ．、Ｂ．ｓｐｈａｅｒｉｃｕｓ、Ｂ．ｃｅｒｅｕｓ、Ｂ．ｌａｔｅｒｏｓｐｏｒｕｓ、Ｂ．ｐｏｐｉｌｌｉａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｉｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ及び他のＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ種、又は他の胞子形成グラム陽性細菌を含む。一実施態様では、前記組成物は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む植物ウイルスベクターを含み；前記植物ウイルスベクターで処理された植物の鱗翅目害虫による摂食は、鱗翅目害虫の成長の阻害又は死滅をもたらす。一実施態様では、前記組成物は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むバキュロウイルスベクターを含み；媒介生物の摂取又は取り込みは、鱗翅目害虫の成長の阻害又は死滅をもたらす。

一実施態様では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、ポリマーなどの合成マトリックスに封入されるか又は微粒子に付着されて、植物の表面に局所的に適用され；局所的に処理された植物の鱗翅目害虫による摂食は、鱗翅目害虫の成長の阻害又は死滅をもたらす。一実施態様では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドを発現する植物細胞（例えば、本発明のトランスジェニックナス科植物細胞）の形で提供され；前記植物細胞又は植物細胞の内容物の鱗翅目害虫による摂食は、鱗翅目害虫の成長の阻害又は死滅をもたらす。

【０１５４】

いくつかの実施態様では、本明細書に記載される１つ以上のポリヌクレオチドは、効率的な葉の被覆に必要な適切な粘着剤及び湿潤剤、並びにｄｓＲＮＡなどのポリヌクレオチドをＵＶ損傷から保護するためのＵＶ保護剤と共に提供される。そのような添加剤は、生物殺虫剤産業で一般的に使用されており、当業者に公知である。土壌適用のための組成物は、鱗翅目害虫の幼虫のためのえさとして役立つ顆粒状製剤を含むことができる。いくつかの実施態様では、本明細書に記載される１つ以上のポリヌクレオチドは、さらに、担体剤、界面活性剤、カチオン性脂質（例えば、参照により本明細書に組み込ま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）、有機シリコーン、有機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、及び昆虫成長制御剤と共にさらに提供される。いくつかの実施態様では、前記組成物は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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つの殺虫剤をさらに含む。

【０１５５】

そのような組成物は、例えば、鱗翅目害虫に直接スプレーするか又は散布するか、又は該鱗翅目害虫による侵入の防止又は防除が望まれる植物又は環境にスプレーするか散布するか、又は植物の表面にコーティングを適用するか、又は種子の植え付けに備えて種子（又は種芋）にコーティングを適用するか、又は該鱗翅目害虫による侵入の防止又は防除が望まれる植物の根の周囲に土壌ドレンチを適用するか、などのいずれかの便利な方法で適用される。

【０１５６】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドの有効量は、鱗翅目害虫の防除を提供するか、又は、鱗翅目害虫による侵入を防ぐ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、日常的なアッセイを使用して行われる。本明細書で提供され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の濃度及び用量に上限はないが、効率及び経済性のために、より低い有効濃度及び用量が一般的に求められる。有効量のポリヌクレオチドの非限定的な実施態様は、１つの植物にスプレーされる液体の形で、１ミリリットルあたり約１０ナノグラムから約１００マイクログラムの範囲のポリヌクレオチド、又は植物の畑に適用された場合、１エーカーあたり約１０ミリグラムから約１００グラムの範囲のポリヌクレオチド、又は鱗翅目害虫の摂食ための人工的なえさにおいて１ミリリットルあたり約０．００１マイクログラムから約０．１マイクログラムの範囲のポリペプチドを含む。本明細書に記載されるポリヌクレオチドが植物に局所的に適用される場合、前記濃度は、植物の葉又は他の植物部位の表面、例えば、花びら、茎、塊茎、果実、葯、花粉、葉、根、又は種に適用するスプレー又は処理の量を考慮して調節することができる。一実施態様では、本明細書に記載される、２５アミノ酸長のポリヌクレオチドを使用する草本植物のための有用な処理は、１植物あたり約１ナノモル（ｎｍｏｌ）のポリヌクレオチド、例えば、１つの植物あたり約０．０５から１ｎｍｏｌのポリヌクレオチドである。草本植物のための他の実施態様は、１つの植物あたり約０．０５から約１００ｎｍｏｌ、又は約０．１から約２０ｎｍｏｌ、又は約１ｎｍｏｌから約１０ｎｍｏｌのポリヌクレオチドの有用な範囲を

含む。特定の実施態様では、約４０から約５０nmolのｓｓＤＮＡポリヌクレオチドが適用される。特定の実施態様では、約０．５nmolから約２nmolのｄｓＲＮＡが適用される。特定の実施態様では、１ミリリットルあたり約０．５から約２．０ミリグラム、又は１ミリリットルあたり約０．１４ミリグラムのｄｓＲＮＡ又はｓｓＤＮＡ（２１ｍｅｒ）を含有する組成物が適用される。特定の実施態様では、１ミリリットルあたり約０．５から約１．５ミリグラムを含有する約５０個から約２００個又はそれ以上のヌクレオチドの本発明のｄｓＲＮＡポリヌクレオチドの組成が適用される。特定の実施態様では、約１から約５ナノモルの本発明のｄｓＲＮＡが１つの植物に適用される。特定の実施態様では、前記植物に局所的に適用されるポリヌクレオチド組成物は、本発明の少なくとも１つのポリヌクレオチドを１ミリリットルあたり約０．０１から約１０ミリグラム、又は約０．０５から約２ミリグラム、又は約０．１から約２ミルグラムの濃度で含有する。非常に大きな植物、樹木、又はつる植物は、それに応じてより大量のポリヌクレオチドを必要とすることができる。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ＤＮＡ分子によりコードされる複数のトリガー）に加工できる本発明の長いｄｓＲＮＡ分子を使用する場合、より低い濃度を使用することができる。有効なポリヌクレオチド処理レジメンの非限定的な例は、１つの植物あたり約０．１から約１nmolのポリヌクレオチド分子、又は１つの植物あたり約１nmolから約１０nmolのポリヌクレオチド分子、又は１つの植物あたり約１０nmolから約１００nmolのポリヌクレオチド分子の処理を含む。

【０１５７】

いくつかの実施態様では、１つ以上のポリヌクレオチドは、局所的に適用されたポリヌクレオチドが生物の細胞に入ることを可能にする剤である「移動剤」と共に提供される。そのような移動剤は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む組成物の一部として組み込むことができるか、又はポリヌクレオチドの適用に先立って、同時に、又はその後に適用することができる。いくつかの実施態様では、移動剤は、鱗翅目害虫による本発明のポリヌクレオチドの取り込みを改善する剤である。いくつかの実施態様では、移動剤は、植物組織、例えば、種子、葉、茎、根、花、又は果実の表面を、ポリヌクレオチドによる植物細胞への透過に対してコンディショニングする剤である。いくつかの実施態様では、前記移動剤は、ポリヌクレオチドが、表皮ワックス障壁、気孔、及び／又は細胞壁又は膜障壁を通して植物細胞に入る経路を可能にする。

【０１５８】

適切な転移剤は、生物の外部の透過性を増加させ、又はポリヌクレオチドに対する生物の細胞の透過性を増加させる剤を含む。適切な移動剤は、化学剤、物理剤、又はその組み合わせを含む。コンディショニング又は移動のための化学薬品は、（ａ）界面活性剤、（ｂ）有機溶媒又は水性の溶剤又は水性の有機溶剤の混合物、（ｃ）酸化剤、（ｄ）酸、（ｅ）塩基、（ｆ）油、（ｇ）酵素、又はそれらのいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチド及び移動剤の適用は、任意選択的にインキュベーションステップ、中和ステップ（例えば、酸、塩基、又は酸化剤を中和するための、又は酵素を不活性化するための）、水洗ステップ、又はそれらの組み合わせを含む。適切な移動剤は、エマルション、逆相エマルション、リポソーム、又は他のミセル様組成物の形態であり得るか、又はポリヌクレオチドをエマルション、逆相エマルション、リポソーム、又は他のミセル様組成物の形態をとるようにさせることができる。移動剤の実施態様は、核酸分子と会合することが知られているカウンターイオン又はその他の分子、例えば、無機アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、リチウムイオン、スペルミン、スペルミジン、又はプトレシン、及び他のポリアミン、及びその他の陽イオンを含む。移動剤の実施態様は、ＤＭＳＯ、ＤＭＦ、ピリジン、Ｎ－ピロリジン、ヘキサメチルホスホロアミド、アセトニトリル、ジオキサン、ポリプロピレングリコール、又は水と混和可能な、又は非水系においてホスホヌクレオチドを溶解する溶剤（例えば合成反応で使用されるもの）を含む。移動剤の実施態様は、界面活性剤又は乳化剤を用いるか又は用いない、天然由来又は合成油、例えば、植物由来の油、作物油（例えば、9th Compendium of Herbicide Adjuvantshにリストされ、9th Compendium of Herbicide Adjuvantsに

オンラインで公開されているもの）、パラフィン油、ポリオール脂肪酸エステル、又はポリエチレンイミン又はＮ－ピロリジンなどのアミド又はポリアミンで修飾された短鎖分子を有する油を含む。

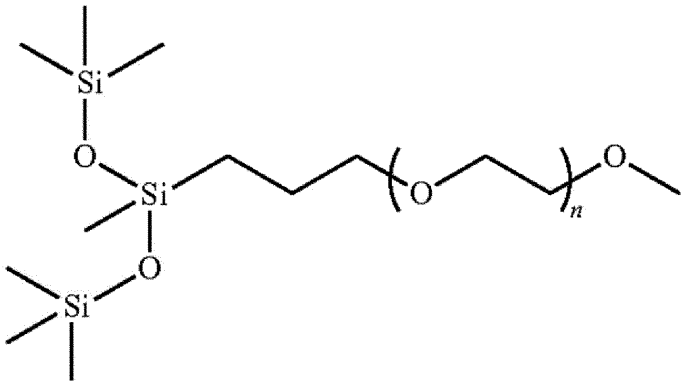
【０１５９】

移動剤の実施態様は、有機シリコーン製剤を含む。例えば、適切な移動剤は、ＣＡＳ番号２７３０６－７８－１及びＥＰＡ番号ＣＡＬ．ＲＥＧ．Ｎｏ．５９０５－５００７３－ＡＡを有するＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランド界面活性剤として市販されており、現在、Momentive Performance Materials, Albany, N.Yから入手可能である、有機シリコーン製剤である。一実施態様は、ポリヌクレオチドと、ＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７などの有機シリコーン製剤を重量で約０．０１５から約２％（重量パーセント）の範囲（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、２．５重量％）で含む移動剤を含む組成物を含む。一実施態様は、本発明のポリヌクレオチドと、ＳＩＬＷＥＴ Ｌ－７７（商標登録）ブランドの界面活性剤を重量で約０．３から約１％（重量パーセント）又は約０．５から約１％（重量パーセント）の範囲で含む移動剤を含む組成物を含む。

【０１６０】

本発明で使用するための移動剤として有用な有機シリコーン化合物は、（ａ）共有結合で連結されるトリシロキサン先端基、（ｂ）共有結合で連結されるｎ－プロピルリンカーを含むがこれらに限定されないアルキルリンカー、（ｃ）共有結合で連結されるポリグリコール鎖、（ｄ）末端基を含む化合物を含むが、これらに限定されない。そのような有機シリコーン化合物のトリシロキサン先端基は、ヘプタメチルトリシロキサンを含むが、これらに限定されない。アルキルリンカーは、ｎ－プロピルリンカーを含むことができるが、これらに限定されない。ポリグリコール鎖は、ポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールを含むが、これらに限定されない。ポリグリコール鎖は、約「７．５」の平均鎖長「ｎ」を提供する混合物を含むことができる。特定の実施態様では、平均鎖長「ｎ」は約５から約１４まで変化することができる。末端基は、メチル基などのアルキル基を含むことができるが、これらに限定されない。移動剤として有用な有機シリコーン化合物は、トリシロキサンエトキシラート界面活性剤又はポリアルキレンオキシド修飾ヘプタメチルトリシロキサンを含まれるが、これらに限定されない。本発明で使用するための移動剤の例は化合物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。

移動剤として有用な有機シリコーン化合物は、例えば、重量で約０．０１５％から約２％（重量パーセント）（例えば、約０．０１、０．０１５、０．０２、０．０２５、０．０

３、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、２．５重量パーセント）の範囲の新たに作成された濃度で使用される。

【０１６１】

移動剤の実施態様は、ポリヌクレオチドを含む組成物中で提供されるか又はポリヌクレオチドを含む組成物と共に使用される、塩化アンモニウム、臭化テトラブチルホスホニウム、硫酸アンモニウムなどの１つ以上の塩を含む。いくつかの実施態様では、塩化アンモニウム、臭化テトラブチルホスホニウム、及び／又は硫酸アンモニウムは、約０．５％から約５％（ｗ/ｖ）、又は約１％から約３％（ｗ/ｖ）、又は約２％（ｗ/ｖ）の濃度で使用される。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、アンモニウム塩を３００ミリモラー以上または同等の濃度で含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、重量で約０．０１５から約２％（重量パーセント）の濃度の有機シリコーン移動剤並びに約８０から約１２００ｍＭ又は約１５０ｍＭから約６００ｍＭの濃度での硫酸アンモニウムを含む。

【０１６２】

移動剤の実施態様は、リン酸塩を含む。ポリヌクレオチドを含む組成物において有用なリン酸塩は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、又はナトリウムのリン酸塩を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、リン酸塩を少なくとも約５ミリモラー、少なくとも約１０ミリモラー、又は少なくとも約２０ミリモラーの濃度で含む。特定の実施態様では、組成物は、ポリヌクレオチドリン酸塩を約１ｍＭ～約２５ｍＭの範囲又は約５ｍＭ～約２５ｍＭの範囲で含む。特定の実施態様では、組成物は、ポリヌクレオチドリン酸ナトリウムを少なくとも約５ミリモラー、少なくとも約１０ミリモラー、又は少なくとも約２０ミリモラーの濃度で含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、リン酸ナトリウムを約５ミリモラー、約１０ミリモラー、又は約２０ミリモラーの濃度で含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、リン酸ナトリウム塩を約１ｍＭ～約２５ｍＭの範囲又は約５ｍＭ～約２５ｍＭの範囲で含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、リン酸ナトリウム塩を約１０ｍＭ～約１６０ｍＭの範囲又は約２０ｍＭ～約４０ｍＭの範囲で含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、ｐＨ 約６．８のリン酸ナトリウム緩衝液を含む。

【０１６３】

移動剤の実施態様は、界面活性剤及び／又はそこに含まれる有効な分子を含む。界面活性剤及び／又はそこに含まれる有効な分子は、脂肪酸のナトリウム塩又はリチウム塩（例えば、獣脂、牛脂脂肪酸又はリン脂質など）及び有機シリコーン界面活性剤を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、核酸分子と会合することが知られているカウンターイオン又は他の分子と共に製剤化される。非限定的な例は、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、及びスペルミン、スペルミジン又はプトレシンなどのポリアミンを含む。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、非ポリヌクレオチド除草剤、例えば、グリホサート、ジカンバ、クロランベン、及びＴＢＡを含むオーキシン様安息香酸除草剤、グルホシナート、フェノキシカルボン酸除草剤を含むオーキシン様除草剤、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、及びベナゾリンエチル除草剤、スルホニル尿素、イミダゾリノン類、ブロモキシニル、デラポン、シクロヘザンジオン、プロトポ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－ピルビン酸－ジオキシゲナーゼ阻害除草剤と共に製剤化される。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドを含む組成物は、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、植物性エクジステロイド、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殺虫タンパク質と共に製剤化される。いくつかの実施態様では、ポリヌクレオチド及び非ポリヌクレオチド殺虫剤を含む組成物は、ポリヌクレオチド単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の防止又は防除において促進された改善を提供する。いくつかの実施態様では、前記トリガー配列群より選択される配列を有する鎖を有する二本鎖ＲＮＡを含む組成物は、非ポリヌクレオチド殺虫剤（パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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）と組み合わせられ、ここで、前記組み合わせは、二本鎖ＲＮＡ単独又は非ポリヌクレオチド殺虫剤単独で得られる効果と比較して、鱗翅目害虫の侵入の改善された防止又は防除に効果があることが見出される。

【０１６４】

ＸＶＩ．関連技術

本明細書に記載されるポリヌクレオチド及び核酸分子の実施は、プロモーター、小分子ＲＮＡ認識部位、アプタマー又はリボザイムに加えて、コーディング配列（例えば、殺虫性タンパク質又は選択マーカーなどの導入遺伝子を発現するための）又はノンコーディング配列（例えば、追加の抑制要素を発現するための）を発現するための追加の発現カセットなどの追加の要素を含むことができる。例えば、本発明の一態様は、前記標的遺伝子配列群又は前記トリガー配列群より選択される配列を有するＤＮＡの同等の長さの断片に対して約９５％から約１００％の同一性を有する１８個以上の連続したヌクレオチド、又はその相補的なＤＮＡ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異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物を提供する。本発明の別の態様は、前記トリガー配列群から選択される群より選択される、配列又は配列の断片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た異種プロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物を提供する。別の実施態様では、（ａ）標的遺伝子配列群より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れたプロモーターを含む組換えＤＮＡ構成物は、前記ＲＮＡアプタマーを含むＲＮＡ転写物及びＲＮＡサイレンシング要素が前記植物の細胞中に発現される場所から、植物のゲノムに安定的に組み込まれ；前記アプタマーは、前記ＲＮＡサイレンシング要素を細胞中の所望の位置に導く役割を果たす。別の実施態様では、小分子ＲＮＡによる（例えば、特定の細胞又は組織にのみ発現するｍｉＲＮＡ又はｓｉＲＮＡにより）結合及び切断のための１つ以上の認識部位を含むことにより、植物におけるより正確な発現パターンが可能となり、ここで小分子ＲＮＡが発現している場所では前記組換えＤＮＡ構成物の発現が抑制される。そのような追加の要素は以下に説明される。

【０１６５】

ＸＶＩＩ．プロモーター

本発明で使用されるプロモーターは、前記構成物が転写されるよう意図されるとする細胞中で機能的である。一般に、これらのプロモーターは、組換え構成物中で使用される異種プロモーターである、すなわち、本明細書に記載される構成物において使用される他の核酸要素に対して操作可能に連結されていることが自然には見出されない。様々な実施態様では、前記プロモーターは、構造的プロモーター、空間的に特異的なプロモーター、時間的に特異的なプロモーター、発生的に特異的なプロモーター、及び誘導性プロモーターからなる群より選択される。多くの実施態様では、前記プロモーターは、例えば、ｐｏｌＩＩプロモーター、ｐｏｌＩＩＩプロモーター、ｐｏｌＶプロモーター、又はｐｏｌＶプロモーターなどの、植物において機能するプロモーターである。

【０１６６】

本発明の組換えＤＮＡ構成物と共に使用するのに適した非構造的プロモーターは、空間

特異的プロモーター、時間特異的プロモーター、及び誘導性プロモーターを含む。空間特異的プロモーターは、細胞小器官、細胞、組織、又は器官特異的プロモーター（例えば、色素体、根、花粉、又は種子のそれぞれにおいて発現するための色素体特異的、根特異的、花粉特異的、又は種子特異的プロモーター）を含む。多くの場合、種子特異的、胚特異的、でんぷん特異的、又は胚乳特異的プロモーターが特に有用である。時間的に特異的なプロモーターは、植物の成長サイクルにおける特定の発達段階、昼夜の異なる時間帯、又は１年の異なる季節で発現を促進する傾向のあるプロモーターを含むことができる。誘導性プロモーターは、化学物質により又は生物的又は非生物的ストレス（例えば、水不足又は干ばつ、暑さ、寒さ、栄養素又は塩分のレベルの高低、光のレベルの高低、害虫又は病原体の感染）などの環境条件（これらに限定されない）により誘導されるプロモーターを含む。マイクロＲＮＡプロモーターは、特に時間的に特異的、空間的に特異的、又は誘導可能な発現パターンを有するものに有用であり；ｍｉＲＮＡプロモーターの例、並びに特定の発現パターンを有するｍｉＲＮＡプロモーターを特定するための方法は、米国特許出願公開第２００６／０２００８７８号、第２００７／０１９９０９５号、及び第２００７／０３００３２９号において提供されており、これらは特に参照により本明細書に組み込まれる。発現特異的プロモーターはまた、一般に構造的に発現されるが、発現の程度又は「強さ」が異なるプロモーターを含むことができ、こともでき、一般に「強いプロモーター」又は「弱いプロモーター」と見なされるプロモーターを含む。

【０１６７】

具体的な関心対象のプロモーターは以下：ＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍのＴ－ＤＮＡから単離されたオパリンシンターゼプロモーター；カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター；例えば、エンハンサー要素に連結した促進されたカリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）３５Ｓプロモーター；米国特許第５，８３７，８４８号、第６，４３７，２１７号及び第６，４２６，４４６号に開示されたもののような根に特異的なプロモーター；米国特許第６，４３３，２５２号に開示されたトウモロコシＬ３オレオシンプロモーター；米国特許出願公開第２００４／０２１６１８９号に開示された色素体局在アルドラーゼをコードする植物核遺伝子のためのプロモーター；米国特許第６，０８４、０８９号に開示された低温誘導性プロモーター；米国特許第６，１４０，０７８号に開示された塩誘導性プロモーター；米国特許第６、２９４、７１４号に開示された光誘導性プロモーター；米国特許第６，２５２，１３８号に開示された病原体誘導性プロモーター；及び米国特許出願公開第２００４／０１２３３４７Ａ１号に開示された水分欠乏誘導性プロモーターの例をふくむ。プロモーター及びその使用、特に植物において機能する組換えＤＮＡ構成物におけるその使用、を開示している上記の特許及び特許公開公報のすべては、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６８】

関心対象の植物の血管又は師部に特異的なプロモーターは、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓのｒｏｌＣ又はｒｏｌＡプロモーター、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ Ｔ－ＤＮＡ遺伝子５のプロモーター、イネスクロースシンターゼＲＳ１遺伝子プロモーター、Ｃｏｍｍｅｌｉｎａ黄斑バドナウイルスプロモーター、ココナッツ葉枯病ウイルスプロモーター、イネツングロ桿菌様ウイルスプロモーター、エンドウグルタミンシンセターゼＧＳ３Ａ遺伝子のプロモーター、ジャガイモインベルターゼ遺伝子のｉｎｖＣＤ１１１及びｉｎｖＣＤ１４１プロモーター、Kertbundit et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:5212-5216によりタバコにおいて師部特異的発現を有することが示されたシロイヌナズナから単離されたプロモーター；ＶＡＨＯＸ１プロモーター領域、エンドウ細胞壁インベルターゼ遺伝子プロモーター、ニンジン由来の酸性インベルターゼ遺伝子プロモーター、硫酸塩トランスポーター遺伝子Ｓｕｌｔｒ１；３のプロモーター、植物ショ糖シンセターゼ遺伝子のプロモーター、及び植物ショ糖トランスポーター遺伝子のプロモーターを含む。

【０１６９】

本発明の組換えＤＮＡ構成物又はポリヌクレオチドとの使用に適したプロモーターは、

ポリメラーゼＩＩＩ（「ｐｏｌＩＩＩ」）プロモーター及びポリメラーゼＩＩＩ（「ｐｏｌＩＩＩ」）プロモーターを含む。ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩは、通常４００個のヌクレオチド長さより短い構造的又は触媒的ＲＮＡを転写し、そしてＴ残基の単純な連続（ｓｉｍｐｌｅ　ｒｕｎ）を終結シグナルとして認識し；ｓｉＲＮＡ二本鎖の転写に用いられている（例えば、Lu et al. (2004) Nucleic Acids Res., 32:e171を参照のこと）。したがって、ＰｏｌＩＩＩプロモーターは、本発明の組換えＤＮＡ構成物から短いＲＮＡ転写物が産生される特定の実施態様に含まれる。一実施態様では、組換えＤＮＡ構成物は、ｐｏｌＩＩＩプロモーターを含み、自己切断性リボザイム配列（例えば、自己切断性ハンマーヘッドリボザイム）に隣接するＲＮＡ転写物を発現して、潜在的に干渉する隣接した配列のない、明確な５’及び３’末端を有する、鱗翅目の標的遺伝子の転写物に結合する一本鎖ＲＮＡのような加工されたＲＮＡをもたらす。別のアプローチは、ｐｏｌＩＩＩプロモーターを使用して、比較的明確な５’及び３’末端を有する転写物を産生する、すなわち、最小の５’及び３’の隣接する配列を有するＲＮＡを転写する。いくつかの実施態様では、ＰｏｌＩＩＩプロモーター（例えば、Ｕ６又はＨ１プロモーター）は、転写されたＲＮＡに２つの塩基対のオーバーハング（ＵＵ）をもたらす短いＡＴリッチな転写終結部位を追加するためのものであり；これは例えばｓｉＲＮＡ型の構成物の発現に有用である。ｓｉＲＮＡ構成物の発現を駆動するためのｐｏｌＩＩＩプロモーターの使用が報告されている；van de Wetering et al. (2003) EMBO Rep., 4: 609-615, and Tuschl (2002) Nature Biotechnol., 20: 446-448を参照のこと。バキュロウイルスポリヘドリン及びｐ１０プロモーターなどのバキュロウイルスプロモーターは、当該技術分野で公知であり、市販されている；例えば、Invitrogen's “Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques”, 2002 (Life Technologies, Carlsbad, Calif.)及びF. J. Haines et al. “Baculovirus Expression Vectors”, undated (Oxford Expression Technologies, Oxford, UK)を参照のこと。

【０１７０】

前記プロモーター要素は、天然に存在するプロモーター又はプロモーター要素又はその同族体ではないが、遺伝子の発現を調節できる核酸配列を含むことができる。そのような「遺伝子に依存しない」制御配列の例は、リガンド結合領域又はアプタマー（下記「アプタマー」を参照のこと）及び調節領域（シスに作用することができる）を含む、天然に存在する又は人工的に設計されたＲＮＡ配列を含む。例えば、Isaacs et al. (2004) Nat. Biotechnol., 22:841-847, Bayer and Smolke (2005) Nature Biotechnol., 23:337-343, Mandal and Breaker (2004) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 5:451-463, Davidson and Ellington (2005) Trends Biotechnol., 23:109-112, Winkler et al. (2002) Nature, 419:952-956, Sudarsan et al. (2003) RNA, 9:644-647, and Mandal and Breaker (2004) Nature Struct. Mol. Biol., 11:29-35を参照のこと。そのような「リボレギュレーター」は、特定の空間的又は時間的特異性のために選択又は設計することができ、例えば所与の濃度の適切なリガンドの存在下（又は非存在下）においてのみ、鱗翅目の標的遺伝子を抑制するためのサイレンシング要素をコードするＤＮＡの翻訳を調節することができる。一例は、ストレス（例えば、水、温度などの非生物的ストレス、又は栄養ストレス、害虫や病原体による付着などの生物的ストレス）を受けたときに植物により産生される内因性リガンド（例えば、ジャスモン酸又はサリチル酸）に応答するリボレギュレーターであり；ストレス下を受けたとき、内因性リガンドのレベルは、鱗翅目の標的遺伝子を抑制するためのサイレンシング要素をコードするＤＮＡの転写をリボレギュレーターが開始するのに十分なレベルに増加する。

ＸＶＩＩＩ．リコンビナーゼ部位

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又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。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、少なくとも１対のｌｏｘＰ部位を含み、ここで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。所望の組換えを達成するためにｌｏｘＰ部位の位置及び相対的な向きが選択され；例えば、前記ｌｏｘＰ部位が同じ向きにある場合、ｌｏｘＰ部位間のＤＮＡは環状に切り出される。別の実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、１つのｌｏｘＰ部位をコードするＤＮＡを含み；ＣｒｅリコンビナーゼとｌｏｘＰ部位を有する別のＤＮＡの存在下で、２つのＤＮＡが組み替えられる。

【０１７１】

ＸＩＸ．アプタマー

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又はポリヌクレオチドは、ＲＮＡアプタマー、すなわち、主にワトソン－クリック塩基対形成に基づかない結合機序を介してリガンドに結合するＲＮＡに加工されるＤＮＡを含む（対照的に、例えば、相補的な反平行核酸鎖間で起こる塩基対形成に対しては二本鎖核酸構造が形成される）。例えば、Ellington and Szostak (1990) Nature, 346:818-822を参照のこと。アプタマーの例は、例えば、公開されているアプタマーデータベースでは、aptamer.icmb.utexas.edu (Lee et al. (2004) Nucleic Acids Res., 32(1):D95-100)でオンラインで入手可能である。しかし、本発明で有用なアプタマーは、１価（単一のリガンドに結合する）又は多価（２つ以上の個々のリガンドと結合する、例えば、２つ以上の異なるリガンドの一つのユニットに結合する）であり得る。

【０１７２】

本発明に有用なリガンドは、主にワトソン－クリック塩基対形成に基づくかない機序により、核酸二次構造により認識され、そして結合することができる任意の分子（又は分子の一部）を含む。このように、リガンドとアプタマーの認識と結合は、抗原と抗体、又は生物学的エフェクターとレセプターの認識と結合に類似している。リガンドは、単一の分子（又は分子の一部）又は２つ以上の分子（又は分子の一部）の組み合わせを含むことができ、そして１つ以上の巨大分子の複合体（例えば、ポリマー、脂質二重層、リポソーム、細胞膜又は他の細胞構造、又は細胞表面）を含むことができる。特定のリガンドの例は、コエンザイムＢ１２及びチアミンピロリン酸などのビタミン、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、コエンザイムＡ、リジン、チロシン、ドーパミン、グルコサミン－６－リン酸、カフェイン、テオフィリン、クロラムフェニコール及びネオマイシンなどの抗生物質、グリホサート及びジカンバなどの除草剤、ウイルス又はファージのコートタンパク質及び無脊椎動物の表皮又は消化管表面タンパク質などのタンパク質、及びウイルスＲＮＡ、トランスファーＲＮＡ（ｔ－ＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、及びＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（ＲｄＲＰ）などのＲＮＡポリメラーゼなどのＲＮＡを含む。本発明に有用なＲＮＡアプタマーの１つのクラスは、リガンドに結合しないが、熱応答性である、すなわち、アプタマーの立体配座が温度によって決定される「熱スイッチ」である；例えば、Box 3 in Mandal and Breaker (2004) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 5:451-463を参照のこと。

【０１７３】

ＸＸ．導入遺伝子転写単位

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又はポリヌクレオチドは、導入遺伝子転写単位を含む。導入遺伝子転写単位は、例えば天然タンパク質又は異種タンパク質のような関心対象の遺伝子をコードするＤＮＡ配列を含む。関心対象の遺伝子は、いずれかの種（細菌及びウイルスなどの非真核生物；菌類、原生生物、植物、無脊椎動物、及び脊椎動物を含むが、これらに限定されない）由来のいずれかのコーディング配列又はノンコーディング配列であり得る。関心対象の特定の遺伝子は、パタチン、植物レクチン、植物性エクジステロイド、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より選択される少なくとも一つの殺

虫剤をコードする遺伝子である。前記導入遺伝子転写単位は、導入遺伝子の転写に必要な５’又は３’配列、又はその両方をさらに含むことができる。

【０１７４】

ＸＸＩ．イントロン

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又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」とは、一般に、エクソン（ＤＮＡのタンパク質をコードするセグメント又は対応する転写されたＲＮＡ）の間に位置するＤＮＡ（又はそのようなセグメントから転写されたＲＮＡ）のセグメントを意味し、ここでメッセンジャーＲＮＡの成熟中に、存在するイントロンは、真核生物中の核において発生する切断／連結プロセスにより酵素的に「スプライシング」されるか、ＲＮＡ鎖から除去される。用語「イントロン」はまた、成熟しているＲＮＡ転写物からスプライシングすることができるＲＮＡセグメントに転写される非コードＤＮＡ配列にも適用されるが、タンパク質をコードするエクソン間に見られるイントロンではない。これらの例の１つは、下流のコーディング配列の植物（場合によっては、特に単子葉植物）での発現を促進す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、いくつかの植物遺伝子の５’非翻訳領域に加えて、いくつかのウイルス遺伝子（例えば、Gallie and Walbot (1992) Nucleic Acids Res., 20:4631-4638)により植物遺伝子のおける促進された発現として説明されるタバコモザイクウイルスリーダー配列又は「オメガ」リーダー中に自然に存在する。これらのスプライシング可能な配列又は「発現を促進するイントロン」は、植物遺伝子のプロモーター間（いずれのタンパク質をコードするエクソンの前ではない）の５’非翻訳領域中に人工的に挿入することができる。そのような発現を促進するイントロンの例は、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｚｍ－Ａｄｈ１）、トウモロコシのブロンズ－１の発現を促進するイントロン、イネのアクチン１（Ｏｓ－Ａｃｔ１）イントロン、シュルンケン－１（Ｓｈ－１）イントロン、トウモロコシのショ糖シンセターゼイントロン、ヒートショックタンパク質１８（ｈｓｐ１８）イントロン、及び８２キロダルトンのヒートショックタンパク質（ｈｓｐ８２）イントロンを含むが、これらに限定されない。参照により特に本明細書組み込まれる米国特許第５，５９３，８７４号及び第５、８５９、３４７号は、遺伝子プロモーターから３’及び第一のタンパク質をコードするエクソンから５’の位置にある非翻訳リーダーにおける、７０キロダルトンのトウモロコシヒートショックタンパク質（ｈｓｐ７０）に由来する発現を促進するイントロンを含むことにより、植物に使用するための組換えＤＮＡ構成物を改良する方法を記載している。

【０１７５】

ＸＸＩＩ．リボザイム

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又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。具体的な関心対象ノリボザイムは、自己切断性リボザイム、ハンマーヘッドリボザイム、又はヘアピンリボザイムを含む。一実施態様では、前記組換えＤＮＡ構成物は、前記転写されたＲＮＡを切断して、鱗翅目の標的遺伝子を抑制するためのサイレンシング要素などの、ＲＮＡの特定のセグメントを提供するのに役立つ１つ以上のリボザイムをコードするＤＮＡを含む。

【０１７６】

ＸＸＩＩＩ．遺伝子抑制要素

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又はポリヌクレオチドは、鱗翅目の標的遺伝子以外の標的遺伝子を抑制するための追加の遺伝子抑制要素をコードするＤＮＡを含む。前記抑制される標的遺伝子は、コーディング配列又はノンコーディング配列、又はその両方を含むことができる。

【０１７７】

適切な遺伝子抑制要素は、米国特許出願公開第２００６／０２００８７８号に詳述されておりその開示は参照により具体的に本明細書に組み込まれており、以下：

（ａ）抑制される前記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）抑制される前記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）抑制される前記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）抑制される前記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り抑制される前記遺伝子を抑制するためのＲＮＡに転写するＤＮＡであって、抑制される前記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、及び抑制される前記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；
（ｆ）単一の二本鎖ＲＮＡを形成することにより抑制される遺伝子を抑制するためのＲＮＡに転写するＤＮＡであって、抑制される前記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したアンチセンスＤＮＡセグメント、及び抑制される前記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したセンスＤＮＡセグメントを含むＤＮＡ。
（ｇ）ＲＮＡの複数の二本鎖を形成することにより抑制される遺伝子を抑制するためのＲＮＡに転写するＤＮＡであって、抑制される前記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、及び抑制される前記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であり、そしてここで前記複数のアンチセンスＤＮＡセグメントと前記複数のセンスＤＮＡセグメントが一連の逆方向反復で配列される、ＤＮＡ；
（ｈ）植物の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）リガンドに結合することが可能なＲＮＡアプタマーに転写するＤＮＡ；及び
（ｋ）リガンドに結合することが可能なＲＮＡアプタマーに転写するＤＮＡ、及び抑制される前記遺伝子の発現を調節することが可能な調節ＲＮＡに転写するＤＮＡであって、ここで前記調節は、調節ＲＮＡの立体配座に依存し、そして前記調節ＲＮＡの立体配座は、ＲＮＡアプタマーの結合状態によりアロステリックに影響を受ける。
の１つ以上を含む。

【０１７８】

いくつかの実施態様では、イントロンは、いずれのタンパク質をコードするエクソン（コーディング配列）も存在しない状態で遺伝子抑制要素を送達するために使用される。一例では、発現を促進するイントロンのようなイントロンは、イントロン内に遺伝子抑制要素を埋め込むことにより割り込まれ、ここで転写時にイントロンから前記遺伝子抑制要素が切り出される。したがって、タンパク質をコードするエクソンは、本明細書に開示される組換えＤＮＡ構成物の遺伝子抑制機能を提供する必要はない。

【０１７９】

ＸＸＩＶ．転写調節要素

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物又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。転写調節要素は、（そのような調節要素が存在しない場合の発現と比較して）本発明の組換えＤＮＡ構成物の発現レベルを調節する要素が含む。適切な転写調節要素の例は、特に参照として本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２００６／０２００８７８号に詳細に詳述されるように、リボスイッチ（シス作用又はトランス作用）、転写物安定化配列、及びｍｉＲＮＡ認識部位を含む。

【０１８０】

ＸＸＩＶ．トランスジェニック植物細胞とトランスジェニック植物の作製と利用

植物の形質転換は、いずれかの周知の方法及び組成を含むことができる。植物の形質転換に適した方法は、ＤＮＡを細胞に導入することができる事実上いずれの方法も含む。植

物の形質転換の１つの方法は、例えば、米国特許第５，０１５，５８０号（ダイズ）、米国特許第５，５３８，８８０号（トウモロコシ）、米国特許第５，５５０，３１８号（トウモロコシ）、米国特許第５，９１４，４５１号（ダイズ）、米国特許第６，１５３，８１２号（コムギ）、米国特許第６，１６０，２０８（トウモロコシ）、米国特許第６，２８８，３１２（イネ）、米国特許第６，３６５，８０７（米）、米国特許第６，３９９，８６１号（トウモロコシ），及び米国特許第６，４０３，８６５号（トウモロコシ）に例示される微粒子銃の照射であり、このいずれもトランスジェニック植物の産生を可能にするために参照として組み込まれている。

【０１８１】

植物の形質転換の別の有用な方法は、二成分Ｔｉプラスミド系を含有するアグロバクテリウムによるアグロバクテリウムが媒介する形質転換であり、ここでアグロバクテリウムは、第一のＴｉプラスミドと野生型Ｔｉプラスミドの少なくとも１つのＴ－ＤＮＡ境界を含有する第二のキメラのプラスミド、形質転換された植物細胞中で機能し、本発明のポリヌクレオチド又は組換えＤＮＡ構成物に操作可能に連結されたプロモーターを保持する。例えば、参照として組み込まれる米国特許第５，１５９，１３５号に記載される２成分系を参照のこと。またDe Framond (1983) Biotechnology, 1:262-269; and Hoekema et al., (1983) Nature, 303:179も参照のこと。そのような二元系では、１つ又は複数のＴ－ＤＮＡの境界を含有する、より小さなプラスミドは、Ｅ．ｃｏｌｉなどの適切な代替宿主中で好都合に構成及び操作することができ、その後Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍに移動する。

【０１８２】

植物、特に作物植物のアグロバクテリウムが媒介する形質転換の詳細な手順は、国特許第５，００４，８６３号、第５，１５９，１３５号、第５，５１８、９０８号（ワタ）；米国特許第５，４１６，０１１号、５，５６９，８３４号、第５，８２４，８７７号及び第６，３８４，３０１号（大豆）；米国特許第５，５９１，６１６号、及び第５，９８１，８４０号（トウモロコシ）；第５，４６３，１７４号（キャノーラを含むアブラナ）、第７，０２６，５２８号（小麦）、及び第６，３２９，５７１号（イネ）、及び米国特許出願公開第２００４／０２４４０７５（トウモロコシ）及び第２００１／００４２２５７Ａ１号（テンサイ）に開示されている手順を含み、これらはすべて、トランスジェニック植物の産生を可能にするために参照により具体的に組み込まれている。米国特許出願公開第２０１１／０２９６５５５号は、実施例５に形質転換ベクター（ベクター配列を含む）及びトウモロコシ、ダイズ、キャノーラ、ワタ、サトウキビを形質転換するための詳細なプロトコルを開示しており、トランスジェニック植物の産生を可能にするために参照により具体的に組み込まれる。同様な方法は、多くの植物種、双子葉植物及び単子葉植物の両方で報告されており、他に、ピーナッツ(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)；小麦(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)を含む。参照により組み込まれる米国特許出願公開第２００３／０１６７５３７Ａ１号において、転写因子がＣａＭＶ３５Ｓプロモーターにより構成的に発現される形質転換されたシロイヌナズナ植物のベクター、形質転換方法、及び産生に関する説明も参照のこと。ナス科植物に特に有用な形質転換法は、当技術分野で周知であり、例えば、トマト(Sharma et al. (2009), J. Biosci., 34:423-433)、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. 257-2

70), “Transgenic Crops of the World: Essential Protocols”, Ian S. Curtis (editor), Springer, 2004)、及びトウガラシ(Li et al. (2003) Plant Cell Reports, 21: 785-788)の公的に記載された形質転換の方法を参照のこと。安定したトランスジェニックジャガイモ、トマト、ナスが様々な領域でで商業的に導入されており；例えばK. Redenbaugh et al. “Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables: A Case Study of the FLAVR SAVR Tomato”, CRC Press, Boca Raton, 1992を参照のこと、及び広範囲な公的に利用可能なＧＭ作物データーベースにおける商業的なトランスジェニック作物に関する文章については；CERA. (2012). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C., 電子的に利用可能なものはavailable electronically at cera-gmc.org/?action=gm_crop_databaseを参照のこと。他の植物種の形質転換の様々な方法は、当技術分野で公知であり、例えば、百科事典の参考文献である“Compendium of Transgenic Crop Plants”, edited by Chittaranjan Kole and Timothy C. Hall, Blackwell Publishing Ltd., 2008；ISBN 978-1-405-16924-0 （mrw.interscience.wiley.com/emrw/9781405181099/hpt/tocで電子的に入手可能）には、穀類及び飼料用草（イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、エンバク、モロコシ、トウジンビエ、シコクビエ、冷期の飼料用草、及びバヒアグラス）、油料種子作物（ダイズ、アブラナ、ヒマワリ、ピーナッツ、亜麻、ゴマ、ベニバナ）、マメ科穀物及び飼料（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、アジアマメ、キマメ、ベッチ、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）、温帯果実及びナッツ（リンゴ、ナシ、モモ、プラム、ベリー類、サクランボ、ブドウ、オリーブ、アーモンド、ペルシャクルミ）、熱帯および亜熱帯果実及びナッツ（柑橘類、グレープフルーツ、バナナ・プランテン、パイナップル、パパイヤ、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、ピーマン、野菜のアブラナ、大根、ニンジン、ウリ、ネギ、アスパラガス、及び葉物野菜）、砂糖、塊茎、及び繊維作物（サトウキビ、テンサイ、ステビア、ジャガイモ、サツマイモ、キャッサバ、及びワタ）、プランテーション作物、観賞植物、及び芝草（タバコ、コーヒー、ココア、茶、ゴムノキ、薬用植物、観賞用植物、及び芝草）、及び森林樹種のための形質転換手順が記載されている。

【０１８３】

安定的に組み込まれた組換えＤＮＡを含有す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を提供するための形質転換法は、好ましくは培地上の組織培養及び制御された環境において実施される。「培地」は、細胞をインビトロ、つまり無傷の生体外で増殖させるために使用される多数の栄養混合物を指す。レシピエント細胞の標的は、分裂組織細胞、カルス、未成熟胚又は胚の一部、及び小胞子、花粉、精子、卵細胞などの配偶子細胞を含むが、これらに限定されない。生殖可能な植物を再生することができるいずれの細胞も、本発明の実施に有用なレシピエント細胞であることが意図される。カルスは、未成熟胚又は胚の一部、苗の先端分裂組織、小胞子などを含むが、これらに限定されない様々な組織源から開始することができる。カルスとして増殖することが可能であるこれらの細胞は、遺伝的形質転換のためのレシピエント細胞として機能することができる。本発明のトランスジェニック植物（例えば、様々な培地及びレシピエントの標的細胞、未成熟胚の形質転換、及びその後の稔性トランスジェニック植物の再生）を作製するための実用的な形質転換方法及び材料は、例えば、米国特許第６，１９４，６３６号及び米国特許出願公開第２００４／０２１６１８９号に開示されており。参照により具体的に組み込まれている。

【０１８４】

一般的な形質転換の実施において、ＤＮＡは、１回の形質転換実験のいずれにおいても、標的細胞に対して少量の割合でしか導入されない。一般的に、マーカー遺伝子は、トランスジェニックＤＮＡ構成物を受け取ること及びゲノムに組み込むことにより安定的に形質転換される細胞を特定するための効率的なシステム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、抗生物質又は除草剤などの選択的剤に耐性を付与する選択的マーカーを提供する。植物細胞がそれに対して耐性を持つ抗生物質又は除草剤のいずれも、選択に対して有用な薬剤となり得る。形質転換された可能性のある細胞は、前記選択的な剤に曝露される。生存細胞の集団では、一般的に、耐性付与遺伝子が細胞の生存を可能にするのに十分なレベルで組み込まれ、かつ発現している細胞が対象となる。細胞はさらに試験されて、組換えＤＮＡの安定した組み込みを確認することができる。一般的に使用される選択的マーカー遺伝子は、カナマイシン又はパロモマイシン（ｎｐｔＩＩ）、ハイグロマイシンＢ（ａｐｈＩＶ）、及びゲンタマイシン（ａａｃ３及びａａｃＣ４）などの抗生物質に対する耐性、又はグルホシネート（ｂａｒ又はｐａｔ）及びグリホサート（ＥＰＳＰＳ）などの除草剤に対する耐性を付与するものを含む。有用な選択的マーカー遺伝子及び選択剤の例は、米国特許第５，５５０，３１８号、第５，６３３，４３５号、第５，７８０，７０８号、第６，１１８，０４７号に例示され、これらのすべては参照により具体的に組み込まれる。形質転換体を視覚的に識別する能力を提供するマーカーのような、スクリーニング可能なマーカー又はレポーターも用いることができる。有用なスクリーニング可能なマーカーの例は、例えば、発色基質（例えば、βグルクロニダーゼ（ＧＵＳ）（ｕｉｄＡ）又はルシフェラーゼ（ｌｕｃ））に作用することにより検出可能な色を生成するか、又は緑色傾向タンパク質（GFP）（gfp）又は免疫原性分子などのそれ自体が検出可能であるタンパク質を発現する遺伝子を含む。当業者は、他の多くの有用なマーカー又はレポーターが使用可能であることを認識するであろう。

【０１８５】

トランスジェニック植物細胞における組換えＤＮＡ構成物の転写を検出すること又は測定することは、タンパク質検出法（例えば、ウェスタンブロット法、ＥＬＩＳＡ法、及び他の免疫化学的方法）、酵素活性の測定、又は核酸検出法（例えば、サザンブロット法、ノーザンブロット法、ＰＣＲ法、ＲＴ－ＰＣＲ法、蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション法）を含むいずれかの適切な方法により達成することができる。

【０１８６】

鱗翅目害虫の標的遺伝子を標的とする本発明の組換えポリヌクレオチドの植物細胞における転写を検出又は測定するのに適した他の方法は、例えば、鱗翅目害虫の成長速度、死滅率、繁殖率、又は補充率など、組換えポリヌクレオチドが存在しない場合に観察される発現レベルと比較して、鱗翅目害虫における標的遺伝子の発現レベルを直接的又は代理的に示す他の形質を測定すること、又は、鱗翅目害虫により侵入された植物又は植物の畑における傷害（例えば、根の損傷）又は収量損失を測定することを含む。一般に、関心対象の組換えポリヌクレオチドの植物細胞における転写を検出又は測定するための適切な方法は、例えば、肉眼的又は顕微鏡的な形態学的形質、成長速度、収量、繁殖率又は補充率、害虫又は病原体に対する耐性、又は生物的又は非生物的ストレス（例えば、水不足ストレス、塩分ストレス、栄養ストレス、暑さ又は寒さのストレス）に対する耐性を含む。そのような方法は、表現型形質の直接測定又は代理的アッセイ（例えば、植物では、これらのアッセイは、非生物的ストレスの耐性を決定するための葉や根のアッセイなどの植物部分アッセイを含む）を使用することができる。そのような方法は、無脊椎動物の害虫又は病原体に対する耐性の直接測定（例えば、植物組織の損傷）、又は代理的アッセイ（例えば、植物収量アッセイ、又は国際公開公報第２００５／１１００６８Ａ２号及び米国特許出願公開第２００６／００２１０８７Ａ１号に記載されており、特に参照により組み込まれているウェスタンコーンルートワーム(Diabrotica virgifera virgifera LeConte)幼虫バイオアッセイ、又はSteeves et al. (2006) Funct. Plant Biol., 33:991-999Ｓに記載されるダイズ包嚢線虫バイオアッセイを含み、ここで、１植物あたりの包嚢、１ｇ根あたりの包嚢、１植物あたりの卵、１ｇ根あたりの卵、及びシ１包嚢あたりの卵が測定される、又は、実施例において本明細書に記載されるコロラドハムシ（Lepidopteran decemlineata）バイオアッセイを含む。

【０１８７】

本発明の組換えＤＮＡ構成物は、例えば、他の遺伝子を発現又は抑制することによって

、追加の形質（例えば、形質転換した植物の場合、除草剤耐性、害虫耐性、低温発芽耐性、水不足耐性などを含む形質）を付与するために、他の組換えＤＮＡと積み重ねることができる。遺伝子発現を減少及び増加で調整した構成物は、米国特許出願公開第２００４／０１２６８４５Ａ１号に開示されており、具体的に参照により組み込まれる。

【０１８８】

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ＤＮＡ構成物を含む本発明のトランスジェニック植物のハイブリッド世代を含む子孫世代を成長させるために使用することができる。したがって、本発明の組換えＤＮＡ構成物を用いた植物の直接形質転換に加えて、組換えＤＮＡを有する第一の植物と、前記構成物を欠いている第二の植物とを交配することによって、本発明のトランスジェニック植物を調製することができる。例えば、前記組換えＤＮＡは、形質転換に適した植物系統に導入して、トランスジェニック植物を産生させ、これを第二の植物系統と交配させて、得られた子孫に組換えＤＮＡを遺伝子移入することができる。本発明のトランスジェニック植物は、１つ以上の追加の形質（例えば、除草剤耐性、病気又は害虫耐性、環境ストレス耐性、改変された栄養素含有量、及び収量の改善を含むが、これらに限定されない）を付与する他の組換えＤＮＡを有する植物系統と交配して、所与の標的配列発現行動及び追加の形質の両方を付与する組換えＤＮＡを有する子孫植物を産生することができる。

【０１８９】

そのような形質を組み合わせた育種では、追加の形質を供与するトランスジェニック植物を雄系統（受粉者）とし、基本形質を保持するトランスジェニック植物を雌系統とすることができる。この交雑の子孫は、ある植物が両方の親の形質のＤＮＡを保持し、ある植物が一方の親の形質のＤＮＡを保持するように分離する、そのような植物は、親の組換えＤＮＡに関連するマーカーによって特定することができ、両方の親の形質のＤＮＡを保持する子孫植物は、例えば通常６世代から８世代のような複数回の雌親系統に戻して交配することができ、一方の元のトランスジェニック親系統と実質的に同じ遺伝子型を有するホモ接合型の子孫植物並びにもう一方のトランスジェニック親系統の組換えＤＮＡを産生することができる。

【０１９０】

本発明のさらに別の態様は、本発明のトランスジェニック種子（ジャガイモの場合は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、前記組換えＤＮＡを含むトランスジェニック種子から直接成長させたトランスジェニック植物、及びトランスジェニック種子から直接成長させたトランスジェニック植物、並びにトランスジェニック種子から成長させなかった第二の植物にトランスジェニック種子から直接成長させたトランスジェニック植物を交配させて作成された近交系又はハイブリッド系を含む子孫世代の植物を意図する。交配は、たとえば次のステップ：

（ａ）第一の親植物（例えば、非トランスジェニック又はトランスジェニック）と本発明に従ったトランスジェニックである第二の親植物の種子を播種するステップ；

（ｂ）第一及び第二の親植物の種を、花をつける植物に成長させるステップ；

（ｃ）第一の親の花に第二の親の花粉を用いて受粉させるステップ；及び

（ｄ）受粉した花を有する親植物に実った種子を収穫するステップ

を含むことができる。

【０１９１】

組換えＤＮＡをエリート品種に、例えば戻し交配により遺伝子移入して、あるソースからの特定の望ましい形質を、その形質を欠く近交系又は他の植物に移すことは、しばしば望ましいことである。これは、例えば、課題の形質に適した遺伝子（本発明に従って調製された構成物）を保持するドナー近交系（「Ｂ」）（非反復親）に対して、第一の優れた近交系（「Ａ」）（反復親）を交配することによって達成することができる。この交配の第一の子孫は、所望の形質が反復しない親「Ｂ」から伝達されるように、得られた子孫中で選択され、次に、選択された子孫は、上位の反復する親「Ａ」に戻し交配される。所望の形質のための選択を用いた戻し交配を５世代以上行った後、前記子孫は、伝達される形

質を制御する遺伝子座については本質的に半接合体であるが、他のほとんど又はほとんどすべての遺伝子については上位の親のようになる。最後の戻し交配世代は、例えば１つ以上の形質転換イベントのように、伝達される遺伝子の純粋な繁殖である子孫を与えるために自殖される。

【０１９２】

一連の育種操作を通して、選択されたＤＮＡ構成物は、さらなる組み換え操作を必要とせずに、ある系統から全く異なる系統に移動させることができる。したがって、１つ以上のＤＮＡ構成物の真の育種ある近交系植物を産生することができる。異なる近交系の植物を交配することにより、ＤＮＡ構成物の様々な組み合わせを有する多数の様々なハイブリッド異なる雑種を作ることができる。このようにして、ハイブリッド頻しばしば関連する望ましい農業特性（「ハイブリッド活力」）、並びに１つ以上のＤＮＡ構成物により付与される望ましい特性を有する植物を産生することができる。

【０１９３】

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、時として、鱗翅目の標的遺伝子の発現も調節しながら、同時に関心対象遺伝子を発現させることが望ましい。したがって、いくつかの実施態様では、前記トランスジェニック植物は、関心対象の少なくとも１つの遺伝子を発現するための遺伝子発現要素をさらに含む組換えＤＮＡを含有し、そして本発明の組換えＤＮＡ構成物の転写は、遺伝子発現要素の同時転写と共に実施される。

【０１９４】

いくつかの実施態様では、本発明の組換えＤＮＡ構成物は、いずれの植物細胞又は組織又はいずれの発生段階の植物全体においても転写することができる。トランスジェニック植物は、作物植物（特にヒトの食料又は動物の飼料に使用される作物植物）、木材又はパルプを産生する樹木、野菜植物、果物植物、及び観賞用植物などの、商業的又は農業的に関心のある植物などのいずれの単子葉植物又は双子葉植物からも得ることができるが、これらに限定されない。関心対象の植物の例は、穀物植物（例えば、コムギ、エンバク、オオムギ、トウモロコシ、ライムギ、ライコムギ、イネ、キビ、モロコシ、キヌア、アマランス、ソバなど）；飼料作物植物（例えば、アルファルファ、ベッチ、クローバーなどを含む飼料草や飼料用双子葉植物など）；油料種子作物植物（ワタ、ベニバナ、ヒマワリ、ダイズ、キャノーラ、菜種、亜麻、落花生、及びアブラヤシ）；木の実（例えばクルミ、カシュー、ヘーゼルナッツ、ピーカン、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、サトウキビ、紅茶、コーヒー；木材やパルプを産生する樹木；マメ科などの野菜作物植物（例えば、豆類、エンドウ豆、レンズ豆、アルファルファ、ピーナッツ）、レタス、アスパラガス、アーティチョーク、セロリ、ニンジン、ダイコン、アブラナ科（例えば、キャベツ、ケール、マスタード、その他の葉アブラナ、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（例えば、キュウリ、メロン、夏カボチャ、冬カボチャ）、食用ネギ（例えば、タマネギ、ニンニク、ニラ、エシャロット、ニラ）、ナス科の可食部（例えば、トマト、ナス、ジャガイモ、ピーマン、グラウンドチェリー）、及びアカザ科の可食部（例えば、ビート、チャード、ホウレンソウ、キヌア、アマランス）；例えば、リンゴ、ナシ、柑橘類（例えば、オレンジ、ライム、レモン、グレープフルーツなど）、核果（例えば、アプリコット、モモ、プラム、ネクタリン）、バナナ、パイナップル、ブドウ、キウイフルーツ、パパイヤ、アボカド、及びベリー；バイオマス又はバイオ燃料（例えば、スキ、スイッチグラス、ジャトロファ、アブラヤシ、及びＢｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ ｂｒａｕｎｉｉ、Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｓｐｐ及びＤｕｎａｌｉｅｌｌａ ｓｐｐなどの真核微細藻類、及びＧｒａｃｉｌａｒｉａ ｓｐｐ、及びＳａｒｇａｓｓｕｍ ｓｐｐなどの真核大型藻類）；及び観賞用草花、観賞用樹木及び低木、観賞用地被類、及び観賞用の草を含む装飾用植物を含む。

【０１９５】

本発明はまた、本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、又は種子から産生されるコモディティ製品を提供し、収穫された葉、根、シュート、塊茎、茎、果実、種子、又は

植物の他の部分、植物のあら粉、油、抽出物、発酵又は消化製品、植物の粉砕又は全粒または種子、又は本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、又は種子から産生されるそのようなコモディティ製品を含む食品又は非食品を含むが、これらに限定されない。本明細書で意図される１つ以上の商品又はコモディティ製品において、本発明の組換えＤＮＡ構成物の１つ以上の核酸配列の検出は、前記商品又はコモディティ製品が、本発明のトランスジェニック植物細胞、植物、又は種子を含有するか、又は由来することの事実上の証拠である。

【０１９６】

一般的に、本発明の組換えＤＮＡ構成物をそのゲノムに有するトランスジェニック植物は、鱗翅目害虫の侵入に対する増加した耐性を示す。様々な実施態様では、例えば、前記トランスジェニック植物が、追加の形質を付与するために他の組換えＤＮＡと積み重ねられた本発明の組換えＤＮＡ構成物を発現する場合、前記トランスジェニック植物は、組換えＤＮＡ構成物を欠いている植物と比較して、以下：

（ａ）改善された非生物的ストレス耐性；
（ｂ）改善された生物的ストレス耐性；
（ｃ）改変された一次代謝産物組成；
（ｄ）改変された二次代謝産物組成；
（ｅ）改変された微量要素、カロテノイド、又はビタミン組成；
（ｆ）改善された収量；
（ｇ）改善された窒素、リン酸、その他の栄養素の使用能力；
（ｈ）改変された農業特性；
（ｉ）改変された成長又は繁殖特性；及び
（ｊ）改善された収穫、貯蔵又は加工品質

からなる形質の群から選択される、少なくとも１つの追加の改変された形質を有する。

【０１９７】

いくつかの実施態様では、トランスジェニック植物は、非生物的ストレス（例えば、水不足や干ばつへの耐性、暑さ、寒さ、最適でない栄養素又は塩分レベル、最適でない光レベル）又は生物的ストレス（例えば、密集、アレロパシー、又は負傷）により；改善された耐性一次代謝産物（例えば、脂肪酸、油、アミノ酸、タンパク質、糖、炭水化物）組成により；改変された二次代謝産物（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、及び混合生合成由来の二次代謝産物）の組成；改変された微量元素（例えば、鉄、亜鉛）、カロテノイド（例えば、β－カロテン、リコペン、ルテイン、ゼアキサンチン、又はその他のカロテノイド及びキサントフィル）、又はビタミン（例えば、トコフェロール）組成；改善された収量（例えば、非ストレス条件下での改善された収量又は生物的又は非生物的ストレス下での改善された収量）；窒素、リン酸、その他の栄養素の改善された使用能力；改変された農業特性（例えば追熟の遅れ；遅発性老化；早晩満期；改変されたシェード許容値；根又は茎の改善された耐倒伏性；茎の「グリーンスナップ」に対する改善された耐性；改変された光周期応答）；改変された成長又は繁殖特性（例えば、意図的矮小化；意図的な雄性不稔、例えば、ハイブリダイゼーションの手順における改善された有用性；改善された栄養成長速度；改善された発芽；改善された雌雄繁殖能力）；改善された収穫、貯蔵、又は加工品質（例えば、貯蔵期間中の害虫に対する改善された耐性、改善された破損に対する耐性、改善された顧客へのアピール）;又はこれらの形質の組み合わせにより特徴づけられる。

【０１９８】

別の実施態様では、トランスジェニック種子、又はトランスジェニック植物によって産生された種子は、改変された一次代謝産物（例えば、脂肪酸、油、アミノ酸、タンパク質、糖、炭水化物）の組成、改変された二次代謝産物組成、改変された微量元素、カロテノイド、又はビタミン組成、改変された収穫、貯蔵、又は加工品質、又はこれらの組み合わせを有する。別の実施態様では、例えば、アレルゲン性タンパク質又は糖タンパク質のレベル又は毒性代謝物のレベルを減少させるために、トランスジェニック植物又はトランス

ジェニック植物の種子の天然成分のレベルを変更することが望ましい場合がある。

【０１９９】

一般的に、トランスジェニック植物細胞から再生されたトランスジェニック植物の集団のスクリーニングは、所望の形質を有するトランスジェニック植物に成長するトランスジェニック植物細胞を特定するために実施される。トランスジェニック植物は、促進された形質、例えば、促進された水使用効率、促進された耐寒性、増加した収量、促進された窒素使用効率、促進された種子タンパク質、及び促進された種子油を検出するためにアッセイされる。スクリーニング方法は、温室又は野外試験での形質の直接スクリーニング、又は代替形質のスクリーニングを含む。そのような分析は、植物の化学組成、バイオマス、生理的特性、又は形態の変化を検出することを目的としている。穀物の栄養組成などの化学組成の変化は、種子の組成及びタンパク質、遊離アミノ酸、油、遊離脂肪酸、デンプン、トコフェロール、又はその他の栄養素の含有量の分析によって検出される。成長又はバイオマス特性の変化は、植物の高さ、茎の直径、節間の長さ、根及びシュートの乾燥重量、及び（トウモロコシ、イネ、又はコムギなど穀物を産生する植物の場合）穂又は種子の頭の長さ及び直径を測定することによって検出される。生理的性質の変化は、例えば、水不足、窒素又はリン酸の欠乏、低温又は高温の生育条件、病原体又は昆虫の攻撃、光の欠乏、又は植物密度の増加などの負荷ストレス条件下でのアッセイなど、ストレス条件に対する応答を評価することにより特定される。その他の選抜的特性は、開花までの日数、花粉の飛散までの日数、果実の成熟までの日数、果実又は塊茎の品質又は産生量、トウモロコシにおける絹糸抽出までの日数、葉の伸長速度、葉緑素含有量、葉の温度、林分、苗の活力、節間長、草丈、葉数、葉面積、分げつ、支柱根、緑色保持、茎の倒伏、根の倒伏、植物の健康、繁殖力、グリーンスナップ、及び害虫耐性を含む。さらに、収穫された果実、種子、又は塊茎の表現型特性を評価することができ；例えば、トマト及びナスでは収穫された果実の総数又は重量、そのような果実の色、酸味、糖度、風味などを含み、ジャガイモでは収穫された塊茎の数や総重量、及びそのような塊茎の品質などを含むことができる。

【０２００】

以下の実施例は説明のために示したものであり、制限として解釈すべきではない。

【実施例】

【０２０１】

標的遺伝子の特定

ＲＮＡｉに使用される標的遺伝子は、標的の鱗翅目害虫のトランスクリプトームを分析して、製品関連の段階で所望のヌクレオチド発現プロファイルを有する遺伝子と、公開されているデータを使用した単一及び低コピー数を特定した。これらの二次確認は、文献検索及びＤａｔａｂａｓｅ ｏｆ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｇｅｎｅｓ（ＤＥＧ）、ｉＢｅｅｔｌｅ、Ｆｌｙｂａｓｅ、Ｌｅｐｂａｓｅなどの公的データベースを使用して実施し、ＲＮＡｉ標的としての重要性を評価した。その後、これらの遺伝子はｄｓＲＮＡトリガーの設計の候補とした。

【０２０２】

効果的なトリガー配列の設計

特定された標的遺伝子は、次に独自のアルゴリズムによって処理され、可能なすべての１８～２５ｂｐの長さのセグメントに分割した。次に、これらのセグメントをＢｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ（ＢＷＡ）ツールにより、それぞれの公開されているトランスクリプトームから得た特定の標的遺伝子のＲＮＡ配列と一致させた。次に、これらの一致するセグメントを解析して、標的遺伝子の１つ以上のサブシーケンスを特定した。その後、これらのサブシーケンスを独自のアルゴリズムと、Ｓｎａｐｄｒａｇｏｎ、Ｅ－ＲＮＡｉ、及びＳｉＦｉ２１などのさまざまな公開されているｄｓＲＮＡ設計ツールに組み合わせて入力することにより、効率的なｄｓＲＮＡトリガーを設計した。次に、設計したトリガーの特異性をＢＬＡＳＴとプロプライエタリなコードを使用して、対象外の種に一致するかどうかをチェックして、この分析からのいずれかのヒットを上記の方法論

を使用して再設計した。

【表１】

表1A

標的遺伝子	モデル種のアクセッション番号	標的種	トリガー ID	配列番号
PGRP	XM_011556718.1	Plutella xylostella	GS144	115
VAT パーゼ E	*NM_001305532.1*	*Plutella xylostella*	*GS146*	*116*
ABCE	XM_011562286.1	Plutella xylostella	GS148	117
TH	NM_001305520.1	Plutella xylostella	GS150	118
ヘモリン	*FJ687752.1*	*Plutella xylostella*	*GS152*	*119*
TH	MF440319.1	Spodoptera frugiperda	GS262	120
ヘモリン	**XP_022819117.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS263**	**121**
vAT パーゼ E	XP_030031453.1	Spodoptera frugiperda	GS264	122
ABCE	**XP_022815393.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS265**	**123**
ABCE	XP_022815393.1	Spodoptera frugiperda	GS266	124
IAP	AFA43941.1	Spodoptera frugiperda	GS267	125
PGRP	XM_011556718.1	Plutella xylostella	GS268	126
vAT パーゼ E	*NM_001305532.1*	*Plutella xylostella*	*GS269*	*127*
ABCE	XM_011562286.1	Plutella xylostella	GS270	128
TH	NM_001305520.1	Plutella xylostella	GS271	129
ヘモリン	FJ687752.1	Plutella xylostella	GS272	130
IAP	AFA43941.1	Plutella xylostella	GS273	131
プロテアゾーム β	XM_022979686.1	Spodoptera frugiperda	GS297	132
RpII 140	XM_022978887.1	Spodoptera frugiperda	GS298	133
Rop (Ras の反対)	XM_022974274.1	Spodoptera frugiperda	GS299	134
電位依存性カリウムチャンネル	**XM_022966217.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS300**	**135**
Rieske	XM_022965227.1	Spodoptera frugiperda	GS301	136
Duox	XM_011560542.1	Spodoptera frugiperda	GS302	137
Domeless	Px009358	Spodoptera frugiperda	GS303	138
PPO	Px002274	Spodoptera frugiperda	GS304	139
TAK1	**Px002003**	**Spodoptera frugiperda**	**GS305**	**140**
Dred	**Px000411**	**Spodoptera frugiperda**	**GS306**	**141**
FADD	Px011635	Spodoptera frugiperda	GS307	142

COPI β のコートマー	**XM_011567740.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS309**	**143**
Cactus	XM_011555277.1	Spodoptera frugiperda	GS311	144
IKK-β	Px005490	Spodoptera frugiperda	GS313	145
Tube	Px003725	Spodoptera frugiperda	GS314	146
Imd	JQ710735.1	Spodoptera frugiperda	GS315	147
PBAN	AY173075.1	Spodoptera frugiperda	GS316	148
β-1、3-グルカン認識タンパク質2	AY135522.1	Spodoptera frugiperda	GS317	149
Dred	*Px000411*	*Plutella xylostella*	*GS318*	*150*
TAK1	*Px002003*	*Plutella xylostella*	*GS319*	*151*
PPO	Px002274	Plutella xylostella	GS320	152
Domeless	*Px009358*	*Plutella xylostella*	*GS321*	*153*
Duox	XM_011560542.1	Plutella xylostella	GS322	154
Rieske	XM_022965227.1	Plutella xylostella	GS323	155
電位依存性カリウムチャンネル	XM_022966217.1	Plutella xylostella	GS324	156
Rop (Ras の反対)	XM_022974274.1	Plutella xylostella	GS325	157
RpII 140	*XM_022978887.1*	*Plutella xylostella*	*GS326*	*158*
プロテアゾーム β	XM_022979686.1	Plutella xylostella	GS327	159
β-1、3-グルカン認識タンパク質2	AY135522.1	Plutella xylostella	GS328	160
PBAN	*AY173075.1*	*Plutella xylostella*	*GS329*	*161*
Imd	JQ710735.1	Plutella xylostella	GS330	162
Tube	Px003725	Plutella xylostella	GS331	163
IKK-β	Px005490	Plutella xylostella	GS332	164
FADD	Px011635	Plutella xylostella	GS333	165
ATF-2	XM_011549568.1	Plutella xylostella	GS334	166
Cactus	XM_011555277.1	Plutella xylostella	GS335	167
p38	XM_011563266.1	Plutella xylostella	GS336	168
COPI β のコートマー	XM_011567740.1	Plutella xylostella	GS337	169
Hopscotch	XM_011569785.1	Plutella xylostella	GS338	170
dorsal	AIA24466.1	Spodoptera frugiperda	GS440	171
Kenny	dme:Dmel_CG16910	Spodoptera frugiperda	GS441	172
Ankyrin	dme:Dmel_CG1651	Spodoptera frugiperda	GS442	173
caspar	dme:Dmel_CG8400	Spodoptera frugiperda	GS443	174
duf	TC002914	Spodoptera frugiperda	GS444	175
htl	TC004713	Spodoptera frugiperda	GS445	176
axed	NP_001356975.1	Spodoptera frugiperda	GS446	177

Rbm24	TC001720	Spodoptera frugiperda	GS447	178
pirk	dme:Dmel_CG15678	Spodoptera frugiperda	GS448	179
bendless	dme:Dmel_CG18319	Spodoptera frugiperda	GS449	180
shadow	QCX08945.1	Spodoptera frugiperda	GS450	181
ABCH1	AKC96438.1	Spodoptera frugiperda	GS451	182
Dumpy	NP_001260042.1	Spodoptera frugiperda	GS452	183
dorsal	AIA24466.1	Plutella xylostella	GS453	184
Kenny	dme:Dmel_CG16910	Plutella xylostella	GS454	185
Ankyrin	dme:Dmel_CG1651	Plutella xylostella	GS455	186
caspar	dme:Dmel_CG8400	Plutella xylostella	GS456	187
duf	TC002914	Plutella xylostella	GS457	188
htl	TC004713	Plutella xylostella	GS458	189
axed	NP_001356975.1	Plutella xylostella	GS459	190
Rbm24	TC001720	Plutella xylostella	GS460	191
pirk	dme:Dmel_CG15678	Plutella xylostella	GS461	192
bendless	dme:Dmel_CG18319	Plutella xylostella	GS462	193
shadow	QCX08945.1	Plutella xylostella	GS463	194
ABCH1	AKC96438.1	Plutella xylostella	GS464	195
Dumpy	NP_001260042.1	Plutella xylostella	GS465	196
AK (アルギニンキナーゼ)	AIY55683.1	Spodoptera frugiperda	GS466	197
VHDL (超高密度リポタンパク質)	XP_021195805.1	Spodoptera frugiperda	GS467	198
AK (アルギニンキナーゼ)	AIY55683.1	Plutella xylostella	GS468	199
VHDL (超高密度リポタンパク質)	XP_021195805.1	Plutella xylostella	GS469	200
利尿ホルモン 31	**NP_523514.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS470**	**201**
利尿ホルモン 31	NP_523514.1	Plutella xylostella	GS471	202
mRNA 前駆体スプライシング因子	XP_022820559.1	Spodoptera frugiperda	GS472	203
PRGP-LE	dme:Dmel_CG8995	Spodoptera frugiperda	GS473	204
COP I γ	TC011806	Spodoptera frugiperda	GS474	205
COP I ζ	NP_648910.1	Spodoptera frugiperda	GS475	206
COP I β prime	NP_524836.2	Spodoptera frugiperda	GS476	207
COP I α	NP_477395.1	Spodoptera frugiperda	GS477	208
COP I δ	**NP_652012.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS478**	**209**
COP I ε	NP_609037.1	Spodoptera frugiperda	GS479	210

verm (vermiform)	TC014101	Spodoptera frugiperda	GS480	211
kr-h1 (kruppel 同族体 1)	TC006419	Spodoptera frugiperda	GS481	212
カルシウム活性化カリウムチャネル	**AAA28651.1**	**Spodoptera frugiperda**	**GS482**	**213**
InR2 (インシュリン受容体 2)	ARD07922.1	Spodoptera frugiperda	GS483	214
tubulin 2	XP_021194879.1	Spodoptera frugiperda	GS484	215
mRNA 前駆体スプライシング因子	XP_022820559.1	Plutella xylostella	GS485	216
COP I γ	*TC011806*	*Plutella xylostella*	*GS486*	*217*
COP I ζ	NP_648910.1	Plutella xylostella	GS487	218
COP Iβ prime	NP_524836.2	Plutella xylostella	GS488	219
COP I α	NP_477395.1	Plutella xylostella	GS489	220
COP I δ	NP_652012.1	Plutella xylostella	GS490	221
COP I ε	NP_609037.1	Plutella xylostella	GS491	222
verm (vermiform)	TC014101	Plutella xylostella	GS492	223
kr-h1 (kruppel 同族体 1)	TC006419	Plutella xylostella	GS493	224
カルシウム活性化カリウムチャネル	AAA28651.1	Plutella xylostella	GS494	225
InR2 (インシュリン受容体 2)	ARD07922.1	Plutella xylostella	GS495	226
tubulin 2	XP_021194879.1	Plutella xylostella	GS496	227
PRGP-LE	dme:Dmel_CG8995	Plutella xylostella	GS497	228

【表２】

表1B

標的種	標的遺伝子	モデル種におけるアクセッション	ユニバーサルID	配列番号
Spodoptera frugiperda	sd	TC032219	GS921	362
Spodoptera frugiperda	Rfabg - レチノイド及び脂肪酸結合糖タンパク	TC034740	GS985	363
Spodoptera frugiperda	Rpb7	TC014109	GS922	364
Spodoptera frugiperda	calypso	TC009963	GS924	365
Spodoptera frugiperda	Rbm24	TC001720	GS917	366
Spodoptera frugiperda	twisted bristles roughened eye	TC000179	GS919	367
Spodoptera frugiperda	surfeit 4	TC000161	GS923	368
Spodoptera frugiperda	Rpn7 調節粒子非 ATP アーゼ 7	TC006375	GS925	369
Spodoptera frugiperda	how - held out wings	TC000827	GS986	370
Spodoptera frugiperda	フェニルアラニル tRNA 合成酵素 β サブユニット	TC032227	GS926	371
Spodoptera frugiperda	twi	TC014598	GS918	372
Spodoptera frugiperda	mbc	TC012454	GS920	373
Spodoptera frugiperda	psc - posterior sex combs	TC005276	GS868	374
Spodoptera frugiperda	Upf1	TC000192	GS872	375
Spodoptera frugiperda	sr	TC004846	GS870	376
Spodoptera frugiperda	Fit1- Fit2	TC010123	GS867	377
Spodoptera frugiperda	RRM ドメイン含有タンパク質	TC010637	GS869	378
Spodoptera frugiperda	Tc croc	TC002813	GS866	379
Spodoptera frugiperda	プロテインキナーゼ	TC000040	GS877	380
Spodoptera frugiperda	Arp3	TC002963	GS876	381
Spodoptera frugiperda	アクチン関連タンパク 2	TC000144	GS878	382
Spodoptera frugiperda	TAR DNA 結合性タンパク質 43 様タンパク質	TC006055	GS865	383
Spodoptera frugiperda	wb	TC014773	GS884	384
Spodoptera frugiperda	TC004745	TC004745	GS987	385

Spodoptera frugiperda	ara	TC031040	GS873	386
Spodoptera frugiperda	Mef2	TC010850	GS885	387
Spodoptera frugiperda	FA エロンガーゼ	TC010977	GS883	388
Spodoptera frugiperda	特徴付けされないタンパク質	TC010693	GS875	389
Spodoptera frugiperda	ミトコンドリア内膜 23 のトランスロカーゼ	TC000047	GS880	390
Spodoptera frugiperda	Pax2	TC003570	GS879	391
Spodoptera frugiperda	Vrp1	TC012341	GS871	392
Spodoptera frugiperda	dre4-CG1828	TC014294	GS882	393
Spodoptera frugiperda	Dhx15	TC000481	GS881	394
Spodoptera frugiperda	CG40470 (最も近い同族体)	TC000165	GS874	395
Spodoptera frugiperda	Rpl40	FBgn0003941	GS932	396
Spodoptera frugiperda	Rps21	FBgn0015521	GS942	397
Spodoptera frugiperda	RpL3	FBgn0020910	GS943	398
Spodoptera frugiperda	Vps28	FBgn0021814	GS944	399
Spodoptera frugiperda	Sec23A	FBgn0262125	GS933	400
Spodoptera frugiperda	Sec6	FBgn0266671	GS934	401
Spodoptera frugiperda	vATP アーゼ-Vha26	FBgn0283535	GS945	402
Spodoptera frugiperda	Vps16A	FBgn0285911	GS946	403
Spodoptera frugiperda	UEV1a	Dmel_CG10640	GS935	404
Spodoptera frugiperda	relish	Dmel_CG11992	GS936	405
Spodoptera frugiperda	diptericin	Dmel_CG12763	GS979	406
Spodoptera frugiperda	spirit	Dmel_CG2056	GS973	407
Spodoptera frugiperda	sphynx	Dmel_CG32382	GS981	408
Spodoptera frugiperda	grass	Dmel_CG5896	GS976	409
Spodoptera frugiperda	pelle	Dmel_CG5974	GS974	410
Spodoptera frugiperda	DIF	Dmel_CG6667	GS977	411
Spodoptera frugiperda	Effete	Dmel_CG7425	GS980	412
Spodoptera frugiperda	spheroide	Dmel_CG9675	GS968	413

Spodoptera frugiperda	Toll	Dmel_CG5490	GS975	414
Spodoptera frugiperda	Tab2	Dmel_CG7417	GS966	415
Spodoptera frugiperda	caudal	NM_001273712	GS971	416
Spodoptera frugiperda	メトニンリッチ貯蔵タンパク質(ヘキサメリン同族体)	JF798635	GS970	417
Spodoptera frugiperda	Insulin receptor 1	KX507134	GS978	418
Spodoptera frugiperda	Sh - Shaker	TC003580	GS965	419
Spodoptera frugiperda	SK 低コンダクタンスのカルシウム活性化カリウム チャネル	TC014196	GS967	420
Spodoptera frugiperda	チキナーゼ 1	JQ653040	GS982	421
Spodoptera frugiperda	ATP アーゼ	JQ653046	GS972	422
Spodoptera frugiperda	Vacuolar ATP アーゼ A	KM591219	GS969	423
Spodoptera frugiperda	メチオニンリッチ貯蔵タンパク質	ABX55887.1	GS1046	424
Spodoptera frugiperda	SK 遺伝子	XP_008193517.1	GS1026	425
Spodoptera frugiperda	troponin	AYD60125.1	GS1048	426
Spodoptera frugiperda	P102	AIE56154.1	GS1045	427
Spodoptera frugiperda	vATP アーゼ	ADN84935.1	GS1036	428
Spodoptera frugiperda	チキナーゼ	AAS18266.1	GS1044	429
Plutella xylostella	sd	TC032219	GS907	430
Plutella xylostella	Rpb7	TC014109	GS910	431
Plutella xylostella	calypso	TC009963	GS914	432
Plutella xylostella	Rbm24	TC001720	GS913	433
Plutella xylostella	**twisted bristles roughened eye**	**TC000179**	**GS909**	**434**
Plutella xylostella	surfeit 4	TC000161	GS912	435
Plutella xylostella	Rpn7	TC006375	GS915	436
Plutella xylostella	how	TC000827	GS911	437
Plutella xylostella	フェニルアラニル tRNA 合成酵素 β サブユニット	TC032227	GS916	438
Plutella xylostella	twi	TC014598	GS908	439
Plutella xylostella	mbc	TC012454	GS983	440
Plutella xylostella	psc - posterior sex combs	TC005276	GS899	441
Plutella xylostella	**Upf1**	**TC000192**	**GS900**	**442**
Plutella xylostella	sr	TC004846	GS894	443
Plutella xylostella	Fit1-2	TC010123	GS897	444
Plutella xylostella	RRM ドメイン含有タンパク質	TC010637	GS903	445
Plutella xylostella	Tc croc	TC002813	GS906	446

Plutella xylostella	プロテインキナーゼ	TC000040	GS889	447
Plutella xylostella	Arp3	TC002963	GS904	448
Plutella xylostella	Arp2	TC000144	GS895	449
Plutella xylostella	TAR DNA-結合性タンパク質 43 様タンパク質	TC006055	GS890	450
Plutella xylostella	**wb**	**TC014773**	**GS898**	**451**
Plutella xylostella	**不明**	**TC004745**	**GS984**	**452**
Plutella xylostella	**ara**	**TC031040**	**GS887**	**453**
Plutella xylostella	**Mef2**	**TC010850**	**GS901**	**454**
Plutella xylostella	FA エロンガーゼ	TC010977	GS902	455
Plutella xylostella	**特徴付けされないタンパク質**	**TC010693**	**GS892**	**456**
Plutella xylostella	**ミトコンドリア内膜 23 のトランスロカーゼ**	**TC000047**	**GS905**	**457**
Plutella xylostella	Pax2	TC003570	GS891	458
Plutella xylostella	Vrp1	TC012341	GS893	459
Plutella xylostella	dre4-CG1828	TC014294	GS886	460
Plutella xylostella	**Dhx15**	**TC000481**	**GS896**	**461**
Plutella xylostella	CG40470	TC000165	GS888	462
Plutella xylostella	Rpl40	FBgn0003941	GS927	463
Plutella xylostella	Rps21	FBgn0015521	GS937	464
Plutella xylostella	RpL3	FBgn0020910	GS938	465
Plutella xylostella	Vps28	FBgn0021814	GS939	466
Plutella xylostella	Sec23A	FBgn0262125	GS928	467
Plutella xylostella	Sec6	FBgn0266671	GS929	468
Plutella xylostella	vATP アーゼ-Vha26	FBgn0283535	GS940	469
Plutella xylostella	Vps16A	FBgn0285911	GS941	470
Plutella xylostella	UEV1a	Dmel_CG10640	GS930	471
Plutella xylostella	relish	Dmel_CG11992	GS931	472
Plutella xylostella	diptericin	Dmel_CG12763	GS963	473
Plutella xylostella	**spirit**	**Dmel_CG2056**	**GS964**	**474**
Plutella xylostella	sphynx	Dmel_CG32382	GS948	475
Plutella xylostella	**grass**	**Dmel_CG5896**	**GS957**	**476**
Plutella xylostella	pelle	Dmel_CG5974	GS953	477
Plutella xylostella	DIF	Dmel_CG6667	GS951	478
Plutella xylostella	**Effete**	**Dmel_CG7425**	**GS958**	**479**
Plutella xylostella	spheroide	Dmel_CG9675	GS960	480
Plutella xylostella	Toll	Dmel_CG5490	GS952	481
Plutella xylostella	Tab2	Dmel_CG7417	GS961	482
Plutella xylostella	caudal	NM_001273712	GS955	483
Plutella xylostella	メトニンリッチ貯蔵タンパク質	JF798635	GS949	484
Plutella xylostella	インスリン受容体 1	KX507134	GS947	485
Plutella xylostella	Sh - Shaker	TC003580	GS950	486

Plutella xylostella	SK 低コンダクタンスのカルシウム活性化カリウム チャネル	TC014196	GS962	487
Plutella xylostella	チキナーゼ 1	JQ653040	GS954	488
Plutella xylostella	**ATP アーゼ**	**JQ653046**	**GS959**	**489**
Plutella xylostella	Vacuolar ATP アーゼ A	KM591219	GS956	490
Plutella xylostella	**メチオニンリッチ貯蔵タンパク質 (ヘキサメリン同族体)**	**ABX55887.1**	**GS1009**	**491**
Plutella xylostella	**チキナーゼ**	**AAS18266.1**	**GS1001**	**492**
Plutella xylostella	troponin	AYD60125.1	GS1249	493
Plutella xylostella	P102	AIE56154.1_P102	GS1256	494
Plutella xylostella	ナトリウム／カリウム輸送 ATP アーゼサブユニット α-B	AT1B_ARTSF	GS989	512
Plutella xylostella	Lac	LACH_DROME	GS990	513
Plutella xylostella	lov	LOV_DROME	GS991	514
Plutella xylostella	jar	MYS9_DROME	GS992	516
Plutella xylostella	Clk	CLOCK_DROME	GS993	517
Plutella xylostella	lap	PICAL_DROME	GS994	518
Plutella xylostella	Atu	ATU_DROME	GS995	519
Plutella xylostella	LUBEL	LUBEL_DROME	GS996	520
Plutella xylostella	**XNP**	**ATRX_DROME**	**GS997**	**521**
Plutella xylostella	**Wnt4**	**WNT4_DROME**	**GS998**	**522**
Plutella xylostella	**Wdr24**	**WDR24_DROME**	**GS999**	**523**
Plutella xylostella	**HSP70B2**	**HSP74_ANOAL**	**GS1002**	**524**
Plutella xylostella	PAN1	PAN1_PICST	GS1003	525
Plutella xylostella	Aplip1	JIP1_DROME	GS1005	526
Plutella xylostella	**Taf5**	**TAF5_MOUSE**	**GS1006**	**527**
Plutella xylostella	**hb**	**HUNB_MANSE**	**GS1007**	**528**
Plutella xylostella	Fur1	FUR11_DROME	GS1008	529
Plutella xylostella	**タンパク質 Wnt-4**	**WNT4_DROME**	**GS998**	**536**
Plutella xylostella	タンパク質 dachsous	DS_DROME	GS1000	537
Plutella xylostella	**CycE**	**CCNE_DROME**	**GS1004**	**538**
Plutella xylostella	**Slc22a3**	**S22A3_RAT**	**GS1010**	**539**
Plutella xylostella	V 型プロトン ATP アーゼサブユニット D	VATD_MANSE	GS1011	540
Plutella xylostella	Eip74EF	E74EB_DROME	GS1070	541

【表３】

表1C

ユニバーサル ID	標的配列番号	標的遺伝子	標的種	トリガー配列番号
GS1713	542	CHCH2_MOUSE	Plutella xylostella	**823**
GS1714	543	LAMA2_HUMAN	Plutella xylostella	824
GS1715	544	RLR73_PLAVT	Plutella xylostella	825
GS1716	545	KGP25_DROME	Plutella xylostella	**826**
GS1717	546	MDM12_CLAL4	Plutella xylostella	**827**
GS1718	547	DCLK_DROER	Plutella xylostella	**828**
GS1719	548	PAR16_HUMAN	Plutella xylostella	829
GS1720	549	RLMD_LEGPL	Plutella xylostella	**830**
GS1721	550	AMGO1_HUMAN	Plutella xylostella	831
GS1722	551	LRC23_MOUSE	Plutella xylostella	**832**
GS1723	552	ANLN_DROME	Plutella xylostella	**833**
GS1724	553	FACR1_ARATH	Plutella xylostella	**834**
GS1725	554	CDC14_EMENI	Plutella xylostella	835
GS1726	555	CBPB1_CANLF	Plutella xylostella	836
GS1727	556	GXCDD_DICDI	Plutella xylostella	837
GS1729	557	MUC18_MOUSE	Plutella xylostella	838
GS1730	558	DVR1_STRPU	Plutella xylostella	839
GS1732	559	BLAB4_ELIME	Plutella xylostella	**840**
GS1733	560	TI110_ARATH	Plutella xylostella	**841**
GS1734	561	TRM1_ELHVK	Plutella xylostella	**842**
GS1736	562	TEKT3_RAT	Plutella xylostella	843
GS1737	563	TOLB_PELUB	Plutella xylostella	**844**
GS1738	564	ATPE_STAA1	Plutella xylostella	**845**
GS1739	565	LUXS_HALH3	Plutella xylostella	846
GS1740	566	HSPB1_POELU	Plutella xylostella	847
GS1741	567	UBP21_SCHPO	Plutella xylostella	848
GS1742	568	MTCH2_HUMAN	Plutella xylostella	849
GS1744	569	KIN82_YEAST	Plutella xylostella	850
GS1745	570	SAHH_ACIAC	Plutella xylostella	**851**
GS1746	571	PI16_HUMAN	Plutella xylostella	852
GS1747	572	GLMM_CELJU	Plutella xylostella	**853**
GS1748	573	TBA1_NEUCR	Plutella xylostella	**854**
GS1749	574	EIF3A_MAGO7	Plutella xylostella	855
GS1750	575	TEN3_DANRE	Plutella xylostella	856
GS1751	576	FBP1_STRPU	Plutella xylostella	857
GS1752	577	TBA_COLOR	Plutella xylostella	858
GS1753	578	NDUB9_MOUSE	Plutella xylostella	859

GS1755	579	SYT_MYXXD	Plutella xylostella	860
GS1756	580	POL3_DROME	Plutella xylostella	861
GS1757	581	CCC1_ORYSJ	Plutella xylostella	**862**
GS1758	582	PTR6_ARATH	Plutella xylostella	863
GS1760	583	DFP_BOMMO	Plutella xylostella	864
GS1761	584	PXDN_HUMAN	Plutella xylostella	865
GS1762	585	GYL1_YEAST	Plutella xylostella	866
GS1765	586	ATPB_BACV8	Plutella xylostella	867
GS1766	587	L_MMVR	Plutella xylostella	868
GS1767	588	SPAN_SHIFL	Plutella xylostella	869
GS1768	589	SUZ2_DROME	Plutella xylostella	870
GS1769	590	BROMI_DANRE	Plutella xylostella	871
GS1770	591	DPOL_ADE12	Plutella xylostella	872
GS1771	592	UBE2S_XENTR	Plutella xylostella	873
GS1772	593	CAD23_HUMAN	Plutella xylostella	**874**
GS1773	594	SHO1_ASPOR	Plutella xylostella	875
GS1774	595	RL15_LACP7	Plutella xylostella	876
GS1775	596	HMDH1_YEAST	Plutella xylostella	**877**
GS1777	597	FMT_ACTSZ	Plutella xylostella	878
GS1783	598	PBCB_SCHGR	Plutella xylostella	879
GS1784	599	FA12_MOUSE	Plutella xylostella	880
GS1785	600	TRPC2_MOUSE	Plutella xylostella	881
GS1786	601	RL18_EXISA	Plutella xylostella	882
GS1787	602	HGFA_MOUSE	Plutella xylostella	**883**
GS1788	603	ARHGC_HUMAN	Plutella xylostella	884
GS1790	604	YCIT_ECOLI	Plutella xylostella	885
GS1791	605	CU19_LOCMI	Plutella xylostella	886
GS1793	606	ADDL_OPITP	Plutella xylostella	887
GS1550	607	TX11A_ETHRU	Plutella xylostella	888
GS1551	608	SYN_DROME	Plutella xylostella	889
GS1555	609	KAD2_ANOGA	Plutella xylostella	890
GS1556	610	60A_DROVI	Plutella xylostella	891
GS1557	611	PCAT_DROME	Plutella xylostella	**892**
GS1559	612	NACH_DROME	Plutella xylostella	**893**
GS1561	613	IPYR_DROME	Plutella xylostella	894
GS1562	614	TRH_DROME	Plutella xylostella	895
GS1563	615	IF4A3_DROME	Plutella xylostella	896
GS1568	616	FUR1C_DROME	Plutella xylostella	897
GS1569	617	GCSH_DROME	Plutella xylostella	898
GS1571	618	UBA5_BOMMO	Plutella xylostella	899
GS1573	619	HSP7E_DROME	Plutella xylostella	900
GS1574	620	COLT_DROME	Plutella xylostella	**901**

GS1575	621	SUH_DROME	Plutella xylostella	902
GS1579	622	PSD11_DROME	Plutella xylostella	903
GS1580	623	MO2B1_AEDAE	Plutella xylostella	904
GS1581	624	NOP14_DROME	Plutella xylostella	905
GS1583	625	S22A7_MOUSE	Plutella xylostella	906
GS1585	626	TITIN_DROME	Plutella xylostella	907
GS1586	627	KLHDB_AEDAE	Plutella xylostella	908
GS1587	628	CU66_HYACE	Plutella xylostella	909
GS1588	629	hexamerine	Plutella xylostella	910
GS1591	630	SY65_DROME	Plutella xylostella	911
GS1596	631	TUD_DROME	Plutella xylostella	912
GS1599	632	CUD5_LOCMI	Plutella xylostella	913
GS1601	633	VP13D_DROME	Plutella xylostella	914
GS1604	634	RFC2_DROME	Plutella xylostella	915
GS1606	635	CPSF2_DROME	Plutella xylostella	916
GS1608	636	METL_DROME	Plutella xylostella	917
GS1609	637	SYDE_DROME	Plutella xylostella	918
GS1610	638	C12B2_DROME	Plutella xylostella	919
GS1612	639	RRF2M_DROVI	Plutella xylostella	920
GS1615	640	NNRD_AEDAE	Plutella xylostella	921
GS1616	641	7LESS_DROVI	Plutella xylostella	922
GS1621	642	CUO8_BLACR	Plutella xylostella	923
GS1623	643	POLY_DROME	Plutella xylostella	924
GS1628	644	PKHF1_DROME	Plutella xylostella	925
GS1629	645	NPRL2_DROME	Plutella xylostella	926
GS1758	646	PTR6_ARATH	Plutella xylostella	927
GS1764	647	CARL2_HUMAN	Plutella xylostella	928
GS1776	648	ODO2_HAEIN	Plutella xylostella	929
GS1789	649	R213B_DANRE	Plutella xylostella	930
GS1941	650	MBF1_YEAST	Plutella xylostella	931
GS1942	651	SKEL2_DROME	Plutella xylostella	932
GS1943	652	SKEL2_DROME	Plutella xylostella	933
GS1944	653	SPA3M_RAT	Plutella xylostella	934
GS1945	654	PCX1_RAT	Plutella xylostella	935
GS1946	655	CL14D_ANOGA	Plutella xylostella	936
GS1947	656	CL14D_ANOGA	Plutella xylostella	937
GS1951	657	LENG9_MOUSE	Plutella xylostella	938
GS1952	658	GLSA_SACD2	Plutella xylostella	939
GS1953	659	S46A3_CHICK	Plutella xylostella	940
GS1954	660	SMAP2_CHICK	Plutella xylostella	941
GS1955	661	POLN_AHEV	Plutella xylostella	942
GS1956	662	ARH_MOUSE	Plutella xylostella	943

GS1958	663	CG057_HUMAN	Plutella xylostella	944
GS1959	664	RELA_HAEIN	Plutella xylostella	945
GS1960	665	QUEC_NITOC	Plutella xylostella	**946**
GS1961	666	CDPKG_ARATH	Plutella xylostella	**947**
GS1966	667	RS20_PARPJ	Plutella xylostella	948
GS1967	668	SCND3_HUMAN	Plutella xylostella	949
GS1970	669	MILT_DROME	Plutella xylostella	950
GS1971	670	RGA1_SCHPO	Plutella xylostella	951
GS1972	671	HSCA_SHEON	Plutella xylostella	952
GS1973	672	DMD_CHICK	Plutella xylostella	**953**
GS1976	673	PLH33_FORAG	Plutella xylostella	954
GS1977	674	HACD3_DANRE	Plutella xylostella	955
GS1978	675	CU27_MANSE	Plutella xylostella	956
GS1979	676	ATM_ASHGO	Plutella xylostella	957
GS1980	677	DS_DROME	Plutella xylostella	958
GS1981	678	LITD1_HUMAN	Plutella xylostella	959
GS1982	679	NRF6_CAEEL	Plutella xylostella	960
GS1983	680	VPC46_MYCTU	Plutella xylostella	961
GS1984	681	DNAK_KORVE	Plutella xylostella	962
GS1985	682	RPOA_ALIF1	Plutella xylostella	963
GS1986	683	Y855_MYCLE	Plutella xylostella	964
GS1990	684	Y855_MYCLE	Plutella xylostella	965
GS1991	685	SPNA_DICDI	Plutella xylostella	966
GS1995	686	ATPD_AERS4	Plutella xylostella	967
GS1996	687	CFA47_HUMAN	Plutella xylostella	968
GS1998	688	YEBS_ECO57	Plutella xylostella	969
GS2000	689	CHI10_DROME	Plutella xylostella	970
GS2001	690	PIPE_DROME	Plutella xylostella	971
GS2002	691	RTXE_DROME	Plutella xylostella	972
GS2003	692	SRS2L_ARATH	Plutella xylostella	973
GS2005	693	RTJK_DROME	Plutella xylostella	974
GS2009	694	APOA_MACMU	Plutella xylostella	975
GS2010	695	YSH1_CANAL	Plutella xylostella	976
GS2012	696	SMYD4_PONAB	Plutella xylostella	977
GS2013	697	ECM5_YEAST	Plutella xylostella	978
GS2014	698	PRMA_HERA2	Plutella xylostella	979
GS2015	699	RS3A_LACBS	Plutella xylostella	980
GS2016	700	PIPE_DROME	Plutella xylostella	981
GS2017	701	MURB_STACT	Plutella xylostella	982
GS2018	702	CU27_MANSE	Plutella xylostella	983
GS2019	703	LEF11_NPVAH	Plutella xylostella	984
GS2020	704	CLIP1_CHICK	Plutella xylostella	985

GS2021	705	YLJ5_CAEEL	Plutella xylostella	986
GS2022	706	ABCG5_HUMAN	Plutella xylostella	987
GS2024	707	DUSP3_DICDI	Plutella xylostella	988
GS2025	708	SAR1_TOBAC	Plutella xylostella	989
GS2026	709	PRS2_METJA	Plutella xylostella	990
GS2027	710	SYI_PROMA	Plutella xylostella	991
GS2029	711	LCA5_HUMAN	Plutella xylostella	992
GS2030	712	RSMA_CHLP8	Plutella xylostella	993
GS2032	713	GRRE1_HUMAN	Plutella xylostella	994
GS2033	714	PGAP6_HUMAN	Plutella xylostella	995
GS2034	715	ARGC_METTH	Plutella xylostella	996
GS2036	716	ITA5_MOUSE	Plutella xylostella	997
GS2038	717	ERV41_SCHPO	Plutella xylostella	**998**
GS2039	718	SYC_MYCMO	Plutella xylostella	999
GS2040	719	NCAM2_MOUSE	Plutella xylostella	1000
GS2041	720	RX_DROME	Plutella xylostella	1001
GS2043	721	HEM1_DELLE	Plutella xylostella	1002
GS2045	722	MON1_YEAST	Plutella xylostella	1003
GS2046	723	KPR5_SCHPO	Plutella xylostella	1004
GS2049	724	YSH1_YEAST	Plutella xylostella	1005
GS2050	725	TULP4_MOUSE	Plutella xylostella	1006
GS2051	726	CU03_LONON	Plutella xylostella	1007
GS2053	727	DRC10_MOUSE	Plutella xylostella	1008
GS2054	728	TSCOT_CANLF	Plutella xylostella	1009
GS2055	729	TSCOT_MOUSE	Plutella xylostella	1010
GS2057	730	PGBM_HUMAN	Plutella xylostella	**1011**
GS2058	731	Z354A_HUMAN	Plutella xylostella	**1012**
GS2059	732	CU27_MANSE	Plutella xylostella	1013
GS2060	733	CU03_LONON	Plutella xylostella	1014
GS2061	734	CLP15_ANOGA	Plutella xylostella	1015
GS2062	735	AMI_XENLA	Plutella xylostella	1016
GS2064	736	RTBS_DROME	Plutella xylostella	**1017**
GS2065	737	K1C14_RAT	Plutella xylostella	**1018**
GS2066	738	SAXO2_HUMAN	Plutella xylostella	**1019**
GS2067	739	FUT9_BOVIN	Plutella xylostella	1020
GS2069	740	NRF6_CAEEL	Plutella xylostella	**1021**
GS2071	741	ICCR_DROME	Plutella xylostella	**1022**
GS2072	742	INDY1_DROME	Plutella xylostella	**1023**
GS2074	743	UREND_METTH	Plutella xylostella	**1024**
GS2078	744	Y028_PYRCJ	Plutella xylostella	1025
GS2083	745	PIPE_DROME	Plutella xylostella	1026
GS2084	746	NS1BP_XENLA	Plutella xylostella	1027

GS2085	747	BEST1_HUMAN	Plutella xylostella	1028
GS2086	748	PABP_SCHPO	Plutella xylostella	1029
GS2087	749	KCAB2_HUMAN	Plutella xylostella	**1030**
GS2088	750	CUD8_SCHGR	Plutella xylostella	1031
GS2089	751	DPOE_ASPFU	Plutella xylostella	1032
GS2090	752	ABCA2_HUMAN	Plutella xylostella	1033
GS2092	753	AMT52_ALTAL	Plutella xylostella	1034
GS2094	754	NIFN_NOSS1	Plutella xylostella	1035
GS2095	755	SPZ4_DROME	Plutella xylostella	1036
GS2096	756	CU14_MANSE	Plutella xylostella	1037
GS2097	757	OACYL_MOUSE	Plutella xylostella	**1038**
GS2098	758	HCN1_RABIT	Plutella xylostella	1039
GS2100	759	COPB_ENTHA	Plutella xylostella	1040
GS2102	760	SYDND_PARUW	Plutella xylostella	**1041**
GS2105	761	MTP2_NEIGO	Plutella xylostella	**1042**
GS2106	762	5HT2B_HUMAN	Plutella xylostella	1043
GS1728	763	XM_011551654	Plutella xylostella	**1044**
GS1731	764	XM_011571056	Plutella xylostella	1045
GS1735	765	XM_038118719	Plutella xylostella	1046
GS1743	766	MG571541	Plutella xylostella	**1047**
GS1754	767	XM_038117076	Plutella xylostella	1048
GS1759	768	XM_011563718	Plutella xylostella	1049
GS1763	769	NA	Plutella xylostella	1050
GS1778	770	XM_038112923	Plutella xylostella	1051
GS1780	771	XM_038106157	Plutella xylostella	1052
GS1781	772	LN594483	Plutella xylostella	1053
GS1782	773	XR_005253948	Plutella xylostella	1054
GS1792	774	XM_038108360	Plutella xylostella	1055
GS1795	775	XM_011565794	Plutella xylostella	1056
GS1948	776	XM_038113609	Plutella xylostella	1057
GS1949	777	XM_038105622	Plutella xylostella	1058
GS1950	778	NA	Plutella xylostella	1059
GS1957	779	LN590690	Plutella xylostella	1060
GS1962	780	XM_038108184	Plutella xylostella	1061
GS1963	781	XM_011565785	Plutella xylostella	1062
GS1964	782	NA	Plutella xylostella	1063
GS1965	783	XM_038110733	Plutella xylostella	1064
GS1968	784	HG992030	Plutella xylostella	1065
GS1969	785	XM_038119701	Plutella xylostella	1066
GS1974	786	XM_038109269	Plutella xylostella	1067
GS1975	787	XM_038105771	Plutella xylostella	1068
GS1988	788	NA	Plutella xylostella	1069

GS1989	789	KY965816	Plutella xylostella	1070
GS1992	790	XM_038114699	Plutella xylostella	1071
GS1994	791	XM_038106632	Plutella xylostella	1072
GS1997	792	FR997851	Plutella xylostella	1073
GS2004	793	XM_038112617	Plutella xylostella	1074
GS2006	794	XM_038114699	Plutella xylostella	1075
GS2007	795	LR990146	Plutella xylostella	1076
GS2008	796	LN590690	Plutella xylostella	1077
GS2023	797	XM_011571033	Plutella xylostella	1078
GS2028	798	LR994581	Plutella xylostella	1079
GS2031	799	XM_038120499	Plutella xylostella	1080
GS2035	800	XM_038121414	Plutella xylostella	1081
GS2037	801	XM_038122197	Plutella xylostella	1082
GS2042	802	XM_011552302	Plutella xylostella	1083
GS2044	803	XM_038111095	Plutella xylostella	1084
GS2047	804	XM_011556613	Plutella xylostella	1085
GS2048	805	XM_038110436	Plutella xylostella	1086
GS2052	806	NA	Plutella xylostella	1087
GS2056	807	XM_011550987	Plutella xylostella	1088
GS2063	808	LN590703	Plutella xylostella	**1089**
GS2068	809	LN590687	Plutella xylostella	**1090**
GS2070	810	NA	Plutella xylostella	**1091**
GS2073	811	XM_038114293	Plutella xylostella	1092
GS2075	812	XM_011552302	Plutella xylostella	1093
GS2076	813	XR_005254795	Plutella xylostella	1094
GS2077	814	XM_038116680	Plutella xylostella	**1095**
GS2079	815	XR_005254795	Plutella xylostella	**1096**
GS2080	816	NA	Plutella xylostella	1097
GS2081	817	LN596718	Plutella xylostella	**1098**
GS2082	818	XM_038107108	Plutella xylostella	**1099**
GS2091	819	XM_038121040	Plutella xylostella	1100
GS2093	820	XM_011554829	Plutella xylostella	1101
GS2103	821	XM_038120174	Plutella xylostella	**1102**
GS2104	822	XM_038113068	Plutella xylostella	**1103**
GS1240	1104	RU17_DICDI	Plutella xylostella	**1334**
GS1241	1105	CSW_DROME	Plutella xylostella	**1335**
GS1243	1106	PHM_DROME	Plutella xylostella	**1336**
GS1244	1107	BDL_DROME	Plutella xylostella	1337
GS1245	1108	NFX1_HUMAN	Plutella xylostella	1338
GS1246	1109	WECH_DROME	Plutella xylostella	1339
GS1247	1110	ENA_DROME	Plutella xylostella	1340
GS1248	1111	TCPD_CAEEL	Plutella xylostella	**1341**

GS1250	1112	HSP74_DROME	Plutella xylostella	1342
GS1251	1113	SEM2A_DROME	Plutella xylostella	**1343**
GS1252	1114	E75_GALME	Plutella xylostella	1344
GS1253	1115	DCTN2_ANOGA	Plutella xylostella	1345
GS1254	1116	VATB_HELVI	Plutella xylostella	**1346**
GS1255	1117	RRF2M_DROGR	Plutella xylostella	1347
GS1258	1118	OSA_DROME	Plutella xylostella	1348
GS1259	1119	BAB2_DROME	Plutella xylostella	1349
GS1260	1120	MDR2_CRIGR	Plutella xylostella	1350
GS1261	1121	PROS_DROME	Plutella xylostella	**1351**
GS1262	1122	RAD54_DROMO	Plutella xylostella	1352
GS1263	1123	SEPT1_DROME	Plutella xylostella	**1353**
GS1265	1124	ACSA_DROME	Plutella xylostella	**1354**
GS1270	1125	RAD54_DROWI	Plutella xylostella	1355
GS1271	1126	MCM7_DROME	Plutella xylostella	1356
GS1272	1127	EF1A_SPOFR	Plutella xylostella	1357
GS1273	1128	PAL1_DROME	Plutella xylostella	1358
GS1274	1129	E75_METEN	Plutella xylostella	1359
GS1275	1130	DJC25_DROME	Plutella xylostella	1360
GS1277	1131	RPA2_DROME	Plutella xylostella	1361
GS1278	1132	YAA4_YEAST	Plutella xylostella	**1362**
GS1281	1133	EGON_DROME	Plutella xylostella	**1363**
GS1282	1134	CPO_DROME	Plutella xylostella	1364
GS1288	1135	POK_DROME	Plutella xylostella	1365
GS1290	1136	KI26L_DROME	Plutella xylostella	1366
GS1291	1137	DRONC_DROME	Plutella xylostella	1367
GS1293	1138	GIL_DROME	Plutella xylostella	1368
GS1294	1139	DDC_DROLE	Plutella xylostella	1369
GS1296	1140	SPAST_DROGR	Plutella xylostella	1370
GS1297	1141	SUV3_DROME	Plutella xylostella	1371
GS1298	1142	RDGC_DROME	Plutella xylostella	1372
GS1300	1143	7UP1_DROME	Plutella xylostella	1373
GS1301	1144	DCTN2_AEDAE	Plutella xylostella	1374
GS1302	1145	HIRA_DROME	Plutella xylostella	1375
GS1305	1146	RPP30_MOUSE	Plutella xylostella	1376
GS1306	1147	MES4_DROME	Plutella xylostella	**1377**
GS1307	1148	RIM2_DROME	Plutella xylostella	1378
GS1308	1149	KL98A_DROME	Plutella xylostella	1379
GS1310	1150	FAS3_DROME	Plutella xylostella	1380
GS1311	1151	ITPR_DROME	Plutella xylostella	1381
GS1312	1152	CNC_DROME	Plutella xylostella	1382
GS1314	1153	LOLA3_DROME	Plutella xylostella	1383

GS1316	1154	HSP83_BOMMO	Plutella xylostella	1384
GS1327	1155	ES8L2_HUMAN	Plutella xylostella	1385
GS1329	1156	BRAT_DROME	Plutella xylostella	**1386**
GS1333	1157	UBIA1_DROME	Plutella xylostella	**1387**
GS1335	1158	DDX41_DROME	Plutella xylostella	1388
GS1338	1159	DDX1_DROME	Plutella xylostella	1389
GS1344	1160	THOC6_DROME	Plutella xylostella	1390
GS1345	1161	ARL8_DROME	Plutella xylostella	1391
GS1352	1162	DRE2_AEDAE	Plutella xylostella	1392
GS1354	1163	HMDH_AGRIP	Plutella xylostella	**1393**
GS1356	1164	TSN7_PONPY	Plutella xylostella	1394
GS1359	1165	TRE12_DROSI	Plutella xylostella	1395
GS1360	1166	RHEB_DROME	Plutella xylostella	**1396**
GS1362	1167	ORB2_DROME	Plutella xylostella	1397
GS1363	1168	PATJ_DROME	Plutella xylostella	1398
GS1364	1169	NU154_DROME	Plutella xylostella	1399
GS1365	1170	TTF2_DROME	Plutella xylostella	1400
GS1366	1171	INO80_DROME	Plutella xylostella	1401
GS1367	1172	RHOL_DROME	Plutella xylostella	1402
GS1368	1173	MCM5_DROME	Plutella xylostella	1403
GS1369	1174	WDR48_AEDAE	Plutella xylostella	1404
GS1370	1175	RRF2M_DROWI	Plutella xylostella	1405
GS1371	1176	VATD1_DROME	Plutella xylostella	1406
GS1372	1177	EF1A_BOMMO	Plutella xylostella	1407
GS1373	1178	CHD1_BOMMO	Plutella xylostella	1408
GS1374	1179	DLISH_DROME	Plutella xylostella	1409
GS1375	1180	DCA10_DROME	Plutella xylostella	1410
GS1376	1181	PP2B2_DROME	Plutella xylostella	1411
GS1377	1182	MMD4_DROME	Plutella xylostella	1412
GS1378	1183	HR3_GALME	Plutella xylostella	1413
GS1379	1184	PUM2_HUMAN	Plutella xylostella	1414
GS1380	1185	CAD99_DROME	Plutella xylostella	1415
GS1381	1186	ATNA_DROME	Plutella xylostella	1416
GS1382	1187	PFKA_DROME	Plutella xylostella	**1417**
GS1383	1188	ETS4_DROME	Plutella xylostella	1418
GS1384	1189	TID_DROVI	Plutella xylostella	1419
GS1385	1190	ORCT_DROME	Plutella xylostella	**1420**
GS1386	1191	SAS10_RAT	Plutella xylostella	1421
GS1387	1192	MY31D_DROME	Plutella xylostella	**1422**
GS1388	1193	SIMA_DROME	Plutella xylostella	1423
GS1389	1194	ARI2_DROME	Plutella xylostella	1424
GS1390	1195	TCAB1_DROME	Plutella xylostella	**1425**

GS1391	1196	BLM_DROME	Plutella xylostella	**1426**
GS1392	1197	NDUBA_BOMMO	Plutella xylostella	1427
GS1393	1198	IF2H_RAT	Plutella xylostella	1428
GS1394	1199	LIS1_DROGR	Plutella xylostella	1429
GS1395	1200	YMEL1_DROME	Plutella xylostella	1430
GS1396	1201	LOLA2_DROME	Plutella xylostella	1431
GS1397	1202	RBP2_BOVIN	Plutella xylostella	1432
GS1398	1203	SYEP_DROME	Plutella xylostella	1433
GS1399	1204	PCNA_BOMMO	Plutella xylostella	1434
GS1400	1205	RS12_DROME	Plutella xylostella	1435
GS1401	1206	RDX_DROME	Plutella xylostella	1436
GS1402	1207	AP3D_DROME	Plutella xylostella	1437
GS1403	1208	MCM3_DROME	Plutella xylostella	1438
GS1404	1209	FBXW7_DROME	Plutella xylostella	1439
GS1409	1210	NAAT1_DROMO	Plutella xylostella	1440
GS1410	1211	CISY2_AEDAE	Plutella xylostella	1441
GS1411	1212	U430_DROME	Plutella xylostella	1442
GS1412	1213	ASAH2_MOUSE	Plutella xylostella	1443
GS1413	1214	CCNB3_DROME	Plutella xylostella	1444
GS1414	1215	TAF5_HUMAN	Plutella xylostella	1445
GS1415	1216	HMCS1_BLAGE	Plutella xylostella	**1446**
GS1416	1217	COG6_DROME	Plutella xylostella	**1447**
GS1417	1218	UNC80_DROME	Plutella xylostella	1448
GS1418	1219	TRET1_CULQU	Plutella xylostella	1449
GS1419	1220	SYAM_DROME	Plutella xylostella	1450
GS1420	1221	PGP2L_DROME	Plutella xylostella	1451
GS1421	1222	PGSC2_DROSI	Plutella xylostella	1452
GS1422	1223	AMY1_DROAN	Plutella xylostella	1453
GS1423	1224	RAS1_DROYA	Plutella xylostella	1454
GS1424	1225	MLC1_DROVI	Plutella xylostella	1455
GS1425	1226	1433E_DROME	Plutella xylostella	1456
GS1426	1227	MAD_DROME	Plutella xylostella	1457
GS1427	1228	GOBP2_EPIPO	Plutella xylostella	1458
GS1428	1229	DOPR1_DROME	Plutella xylostella	1459
GS1429	1230	SPR_DROME	Plutella xylostella	1460
GS1430	1231	GS1_DROME	Plutella xylostella	1461
GS1431	1232	CU21_LOCMI	Plutella xylostella	1462
GS1432	1233	ADT_DROME	Plutella xylostella	1463
GS1433	1234	TTC14_DROME	Plutella xylostella	1464
GS1434	1235	NOI_DROME	Plutella xylostella	1465
GS1435	1236	RT06_DROME	Plutella xylostella	1466
GS1436	1237	NAF1_DROME	Plutella xylostella	1467

GS1437	1238	ASH1_DROME	Plutella xylostella	1468
GS1438	1239	EF1A2_DROME	Plutella xylostella	1469
GS1439	1240	GTR1_DROME	Plutella xylostella	**1470**
GS1440	1241	YELL_DROER	Plutella xylostella	1471
GS1441	1242	EXT2_BOVIN	Plutella xylostella	1472
GS1442	1243	RL11_SPOFR	Plutella xylostella	**1473**
GS1443	1244	KDM5_DROME	Plutella xylostella	1474
GS1444	1245	ESTE_MYZPE	Plutella xylostella	1475
GS1445	1246	L2GL_DROPS	Plutella xylostella	1476
GS1446	1247	DHGL_DROME	Plutella xylostella	1477
GS1447	1248	MRJP1_APIME	Plutella xylostella	1478
GS1448	1249	NCD_DROME	Plutella xylostella	1479
GS1449	1250	ICYA_MANSE	Plutella xylostella	1480
GS1450	1251	MUL1_DROME	Plutella xylostella	**1481**
GS1452	1252	NOG1_DROME	Plutella xylostella	1482
GS1453	1253	YELL_DROME	Plutella xylostella	1483
GS1454	1254	RBGPR_DROME	Plutella xylostella	1484
GS1455	1255	ASPP_AEDAE	Plutella xylostella	1485
GS1456	1256	HTRA2_DROME	Plutella xylostella	1486
GS1458	1257	RIR1_DROME	Plutella xylostella	1487
GS1459	1258	PLXB_DROME	Plutella xylostella	1488
GS1460	1259	CMC_DROME	Plutella xylostella	1489
GS1461	1260	PROML_DROME	Plutella xylostella	1490
GS1462	1261	CANB2_DROME	Plutella xylostella	1491
GS1463	1262	CASP8_DROPS	Plutella xylostella	1492
GS1464	1263	MED14_AEDAE	Plutella xylostella	**1493**
GS1465	1264	GR43A_DROME	Plutella xylostella	**1494**
GS1466	1265	POMT2_DROPS	Plutella xylostella	**1495**
GS1467	1266	NPY6R_MOUSE	Plutella xylostella	1496
GS1468	1267	FICD_CULQU	Plutella xylostella	1497
GS1469	1268	1433Z_BOMMO	Plutella xylostella	1498
GS1470	1269	GPR9_AMPAM	Plutella xylostella	1499
GS1471	1270	PA2_BOMPE	Plutella xylostella	**1500**
GS1472	1271	BRC4_DROME	Plutella xylostella	1501
GS1473	1272	IF4E_DROME	Plutella xylostella	1502
GS1474	1273	PAL2_DROME	Plutella xylostella	1503
GS1475	1274	S39AD_DROME	Plutella xylostella	1504
GS1476	1275	MADD_DROME	Plutella xylostella	**1505**
GS1477	1276	RABL3_DANRE	Plutella xylostella	1506
GS1478	1277	BRM_DROME	Plutella xylostella	1507
GS1479	1278	DIA_DROME	Plutella xylostella	1508
GS1480	1279	41_DROME	Plutella xylostella	**1509**

GS1481	1280	CUD3_SCHGR	Plutella xylostella	1510
GS1482	1281	CDC42_AEDAE	Plutella xylostella	1511
GS1483	1282	SPZ_DROME	Plutella xylostella	1512
GS1484	1283	FYV1_DROME	Plutella xylostella	**1513**
GS1485	1284	ELG_DROME	Plutella xylostella	1514
GS1486	1285	IMPL2_DROME	Plutella xylostella	1515
GS1488	1286	WDR1_DROME	Plutella xylostella	1516
GS1489	1287	PRS6B_MANSE	Plutella xylostella	1517
GS1490	1288	TTKA_DROME	Plutella xylostella	1518
GS1491	1289	IF2G_DROME	Plutella xylostella	1519
GS1547	1290	DHE2_ACHKL	Plutella xylostella	**1520**
GS1548	1291	SPS1_DROME	Plutella xylostella	1521
GS1549	1292	PP2A_DROME	Plutella xylostella	1522
GS1552	1293	MTTF_DROME	Plutella xylostella	1523
GS1553	1294	CAZ_DROME	Plutella xylostella	1524
GS1554	1295	HDAC1_DROME	Plutella xylostella	1525
GS1558	1296	TERA_DROME	Plutella xylostella	1526
GS1560	1297	EXT2_DROME	Plutella xylostella	1527
GS1564	1298	PRIC1_ANOGA	Plutella xylostella	1528
GS1565	1299	DGK2_DROME	Plutella xylostella	1529
GS1566	1300	TCPD_OCHTR	Plutella xylostella	1530
GS1567	1301	RL18_SPOFR	Plutella xylostella	1531
GS1570	1302	PYRG_DROME	Plutella xylostella	1532
GS1572	1303	WHITE_DROME	Plutella xylostella	1533
GS1576	1304	MFRN1_HUMAN	Plutella xylostella	1534
GS1577	1305	PRS8_MANSE	Plutella xylostella	1535
GS1578	1306	DDX49_DROME	Plutella xylostella	1536
GS1582	1307	ADA17_DROME	Plutella xylostella	1537
GS1584	1308	ESN_DROPS	Plutella xylostella	**1538**
GS1589	1309	GLYR1_AEDAE	Plutella xylostella	1539
GS1590	1310	CP301_DROME	Plutella xylostella	**1540**
GS1592	1311	NARF_AEDAE	Plutella xylostella	1541
GS1593	1312	COQ4_BOMMO	Plutella xylostella	1542
GS1594	1313	CP4S3_DROME	Plutella xylostella	1543
GS1595	1314	WLS_DROVI	Plutella xylostella	1544
GS1597	1315	SWS_DROME	Plutella xylostella	1545
GS1598	1316	EVI5_DROME	Plutella xylostella	**1546**
GS1600	1317	H1_DROME	Plutella xylostella	1547
GS1602	1318	EXO1_DROME	Plutella xylostella	**1548**
GS1603	1319	Y2678_METMA	Plutella xylostella	1549
GS1605	1320	PH4H_DROME	Plutella xylostella	**1550**
GS1607	1321	CARME_DROME	Plutella xylostella	1551

GS1611	1322	C12C1_DROME	Plutella xylostella	1552
GS1613	1323	NOSL_BOMMO	Plutella xylostella	1553
GS1614	1324	BXA3_SAMCY	Plutella xylostella	1554
GS1617	1325	GATA_CULQU	Plutella xylostella	1555
GS1618	1326	OPS2_MANSE	Plutella xylostella	1556
GS1619	1327	RL24_PLUXY	Plutella xylostella	1557
GS1620	1328	DCLK_DROSI	Plutella xylostella	1558
GS1622	1329	CUBN_DROME	Plutella xylostella	1559
GS1624	1330	PTTH_BOMMO	Plutella xylostella	1560
GS1625	1331	MED15_AEDAE	Plutella xylostella	1561
GS1626	1332	ERCC3_DROME	Plutella xylostella	1562
GS1627	1333	ECE_LOCMI	Plutella xylostella	1563
GS1249	1564	P36188	Plutella xylostella	**1624**
GS1256	1565	A1L237	Plutella xylostella	**1625**
GS1728	1566	XM_011551654	Plutella xylostella	1626
GS1731	1567	XM_038110302	Plutella xylostella	1627
GS1735	1568	XM_038118719	Plutella xylostella	1628
GS1743	1569	MG571541	Plutella xylostella	**1629**
GS1754	1570	XM_038117076	Plutella xylostella	1630
GS1759	1571	XM_011563718	Plutella xylostella	1631
GS1763	1572	NA	Plutella xylostella	1632
GS1778	1573	XM_038112923	Plutella xylostella	1633
GS1780	1574	XM_038106157	Plutella xylostella	1634
GS1781	1575	XM_038111383	Plutella xylostella	1635
GS1782	1576	XR_005253948	Plutella xylostella	1636
GS1792	1577	XM_038108360	Plutella xylostella	1637
GS1795	1578	XM_011565794	Plutella xylostella	1638
GS1948	1579	XM_038113609	Plutella xylostella	1639
GS1949	1580	XM_038105623	Plutella xylostella	1640
GS1950	1581	NA	Plutella xylostella	1641
GS1957	1582	LN590690	Plutella xylostella	1642
GS1962	1583	XM_038108184	Plutella xylostella	1643
GS1963	1584	XM_011565785	Plutella xylostella	1644
GS1964	1585	NA	Plutella xylostella	1645
GS1965	1586	XM_038110733	Plutella xylostella	1646
GS1968	1587	HG992030	Plutella xylostella	1647
GS1969	1588	XM_038119701	Plutella xylostella	1648
GS1974	1589	XM_038109269	Plutella xylostella	1649
GS1975	1590	XM_038105771	Plutella xylostella	1650
GS1988	1591	NA	Plutella xylostella	1651
GS1989	1592	KY965816	Plutella xylostella	1652
GS1992	1593	XM_038114699	Plutella xylostella	1653

GS1994	1594	XM_038106632	Plutella xylostella	1654
GS1997	1595	MG571541	Plutella xylostella	1655
GS2006	1596	XM_038114699	Plutella xylostella	1656
GS2008	1597	LN590690	Plutella xylostella	1657
GS2023	1598	XM_011571033	Plutella xylostella	1658
GS2028	1599	LR994581	Plutella xylostella	1659
GS2031	1600	XM_038120499	Plutella xylostella	1660
GS2035	1601	XM_038121414	Plutella xylostella	1661
GS2037	1602	MG571541	Plutella xylostella	1662
GS2042	1603	XM_011552302	Plutella xylostella	1663
GS2044	1604	XM_038111095	Plutella xylostella	1664
GS2047	1605	XM_011556613	Plutella xylostella	1665
GS2048	1606	XM_038121712	Plutella xylostella	1666
GS2052	1607	CP020383	Plutella xylostella	1667
GS2056	1608	XM_011550987	Plutella xylostella	1668
GS2063	1609	LN594646	Plutella xylostella	1669
GS2068	1610	LN596087	Plutella xylostella	1670
GS2070	1611	NA	Plutella xylostella	1671
GS2073	1612	XM_038114293	Plutella xylostella	1672
GS2075	1613	XM_011552302	Plutella xylostella	1673
GS2076	1614	XR_005254795	Plutella xylostella	1674
GS2077	1615	XM_038116680	Plutella xylostella	1675
GS2079	1616	XR_005254795	Plutella xylostella	1676
GS2080	1617	NA	Plutella xylostella	1677
GS2081	1618	XM_038107769	Plutella xylostella	1678
GS2082	1619	XM_038107108	Plutella xylostella	1679
GS2091	1620	XM_038121040	Plutella xylostella	1680
GS2093	1621	XM_011554829	Plutella xylostella	1681
GS2103	1622	XM_038120174	Plutella xylostella	**1682**
GS2104	1623	XM_038113068	Plutella xylostella	**1683**

【実施例】

【０２０３】

Ｐ．ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａにおけるＲＮＡｉ致死遺伝子の特定。

一次スクリーニングのバイオアッセイ

ｄｓＲＮＡ分子をＰ．ｘｙｏｓｔｅｌｌａに対する殺虫活性を、人工食餌をベースとしたバイオアッセイで試験した。簡単に説明すると、製剤化していない（例えば裸のｄｓＲＮＡ）又は製剤化した（例えば上記のＶＩ．項を参照のこと）ｄｓＲＮＡを含む人工食餌を４７ｍｍのシャーレに置いた。シャーレ１枚あたり５から７匹のＬ１齢後期ＤＢＭ幼虫を、鉛筆ブラシを用いて加えた。各処理は５つの複製を含んだ。アッセイ開始から２日後に生存した昆虫を試験における昆虫の総数とみなし、この数を死滅率の計算に使用した。７日目に各シャーレに新鮮な処理餌を加え、その後は必要に応じて未処理食を加えた。幼虫の９日目の死滅率を観察した。幼虫がさなぎに成長するまで１４日間観察を続けた。死滅率は、表２及び表３で報告されているように、Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎ－Ｔｉｌｔｏｎの式により補正した。バイオアッセイは以下のようにスコア化した。

【表４】

死滅率%			
0	1-14	15-30	>30
-	+	++	+++

【０２０４】

スコアリングデータを以下の表２と表３に提供する。表２及び表３の各ｄｓＲＮＡ分子は、表１Ａに提供されるトリガーＩＤ及び配列番号と相関するＧＳ番号によって識別される。下線／斜体の配列番号は、表２及び表３に示すデータごとに＋＋又は＋＋＋のスコアを有する配列を表す。

【表５】

表2

ID	修正死滅率 D9
GS144	+
GS146	++
GS148	+
GS150	+
GS152	++
GS268	+
GS269	+++
GS270	+
GS271	+
GS272	+
GS273	+
GS318	++
GS319	++
GS320	+
GS321	+++
GS322	+
GS323	+
GS324	+
GS325	+
GS326	++
GS327	-
GS328	+
GS329	++
GS330	+
GS331	+
GS332	+
GS333	+
GS334	+
GS335	+
GS336	+
GS337	+
GS338	+

【表６】

表3

ID	修正死滅率 D9
GS453	-
GS454	-
GS455	-
GS456	-
GS457	-
GS458	+
GS459	-
GS460	-
GS461	-
GS462	-
GS463	+
GS464	-
GS465	+
GS468	+
GS469	-
GS471	-
GS485	-
GS486	+++
GS487	-
GS488	-
GS489	-
GS490	-
GS491	-
GS492	-
GS493	-
GS494	-
GS495	-
GS496	-
GS497	-

【実施例】

【０２０５】

Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおけるＲＮＡｉ致死遺伝子の特定。

一次スクリーニングのバイオアッセイ

ｄｓＲＮＡ分子のＳ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａに対する殺虫活性を人工食餌ベースのバイオアッセイにより試験した。簡単に説明すると、製剤化しない又は製剤化したｄｓＲＮＡを含有する人工食餌を２４個のウェルプレートに置いた。細い鉛筆ブラシを使用して、１つのウェルあたり１匹のｆａｌｌ ａｒｍｙｗｏｒｍの幼虫を置いた。プレートを市販の半透明のシールで覆った。各処置は、複数の２４ウェルプレート中でランダム化した１６～２４の複製を含んだ。５日目に昆虫を、ｄｓＲＮＡを組み込んだ新鮮な食餌で再処理した。この昆虫の死滅率と成長の阻害（Ｌ３で発育停止）を最長１２日間観察した。緑色蛍光タンパク質と水を標的とするよう設計したｄｓＲＮＡを陰性対照として使用した。バイオアッセイは以下のようにスコア化した。

【表７】

死滅率%			
0	1-14	15-30	>30
-	+	++	+++

【０２０６】

採点データを以下の表４と表５に提供する。表４及び表５の各ｄｓＲＮＡ分子は、表１Ａで提供される配列番号と相関するＧＳ番号により識別される。表１Ａの太字の配列番号は、これ等の配列が＋＋又は＋＋＋．のスコアを有していることを表す。

【表８】

表4

ID	死滅率
GS262	-
GS263	+++
GS264	-
GS265	++
GS266	-
GS267	-
GS297	-
GS298	-
GS299	-
GS300	++
GS301	-
GS302	-
GS303	-
GS304	-
GS305	+++
GS306	++
GS307	-
GS309	+++
GS311	-
GS313	-
GS314	-
GS315	-
GS316	-
GS317	-

【表９】

表5

ID	死滅率
GS440	-
GS441	-
GS442	-
GS443	-
GS444	-
GS445	-
GS446	-
GS447	-
GS448	-
GS449	-
GS450	-
GS451	-
GS452	-
GS466	-
GS467	-
GS470	+++
GS472	-
GS473	-
GS474	-
GS475	-
GS476	-
GS477	-
GS478	+++
GS479	-
GS480	-
GS481	-
GS482	+++
GS483	-
GS484	-

【実施例】

【０２０７】

Ｐ．ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａにおけるＲＮＡｉ致死遺伝子の特定。

ｄｓＲＮＡ分子のＰ．ｘｙｏｓｔｅｌｌａに対する殺虫活性を、人工食餌をベースにしたバイオアッセイで試験した。簡単に説明すると、人工的な食餌プラグに５０μＬの裸のｄｓＲＮＡを１mg/mLで組み込んだ。プラグはそれぞれ４７ｍｍのシャーレに置いた。シャーレ１枚あたりＬ１齢後期の幼虫を５匹置いた。７日目に新鮮な未処理の飼料を加えた。３日間のｄｓＲＮＡ曝露後の生きている昆虫は、死滅率の計算に使用される昆虫の総数である。昆虫の死滅率と成長を１３日間まで監視した。

【０２０８】

スコアリングデータを以下の表６と表７に提供する。死滅率はＨｅｎｄｅｒｓｏｎ Ｔｉｌｔｏｎの式により補正し、修正した死滅率は以下の通りである。表６及び表７の各ｄｓＲＮＡ分子は、表１Ｂに提供される配列番号と相関するＧＳ番号によって識別される。太字の配列番号は、＋＋又は＋＋＋．のスコアを有する配列を表す。

【表１０】

死滅率%					
0	1-14	15-30	>30		
-	+	++	+++		

【表１１】

表6

ID	修正死滅率 D13
GS889	+
GS891	+
GS895	+
GS897	+
GS898	++
GS899	+
GS901	++
GS904	-
GS908	+
GS912	-
GS914	+
GS928	+
GS937	-
GS941	-
GS947	+
GS951	+
GS953	+
GS954	+
GS956	+
GS957	++
GS958	++
GS959	+++
GS960	+
GS961	+
GS962	+
GS963	+
GS964	++
GS984	++
GS1000	+
GS1004	++
GS1009	++
GS1010	++
GS1011	-
GS1070	+

【表１２】

表7

ID	修正死滅率
GS907	-
GS909	+++
GS910	-
GS911	+
GS913	+
GS915	-
GS916	-
GS927	-
GS929	-
GS930	-
GS931	-
GS938	+
GS939	+
GS940	-
GS989	++
GS990	+
GS991	++
GS992	++
GS993	++
GS994	++
GS995	++
GS996	+++
GS997	++
GS998	+++
GS999	++
GS1001	+++
GS1002	++
GS1003	+
GS1005	+
GS1006	+++
GS1007	+++
GS1008	+
GS886	-
GS887	+++
GS888	-

GS890	-
GS892	+++
GS893	-
GS894	-
GS896	+++
GS900	++
GS902	-
GS903	-
GS905	++
GS906	+
GS948	-
GS949	-
GS950	-
GS952	-
GS955	-
GS983	-

【実施例】

【０２０９】

Ｐ．ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａにおけるＲＮＡｉ致死遺伝子の特定。

ｄｓＲＮＡ分子のＰ．ｘｙｏｓｔｅｌｌａに対する殺虫活性を、人工食餌をベースにしたバイオアッセイで試験した。簡単に説明すると、人工的な食餌プラグに５０μＬの裸のｄｓＲＮＡを１mg/mLで組み込んだ。プラグはそれぞれ４７ｍｍのシャーレに置いた。５匹のＬ１齢後期の幼虫をシャーレごとに置いた。７日目に新鮮な未処理飼料を加えた。３日間のｄｓＲＮＡ曝露後の生存している昆虫は、死滅率の計算に使用された昆虫の総数であった。昆虫の死滅率と成長を１４日間まで監視した。スコアリングデータを以下の表９に提供する。死滅率はＨｅｎｄｅｒｓｏｎ Ｔｉｌｔｏｎの式により補正し、修正した死滅率は以下の通りである。表９の各ｄｓＲＮＡ分子は、表１Ｃに提供される配列番号と相関するＧＳ番号によって識別される。表１Ｃの太字の配列は、＋＋又は＋＋＋のスコアを有する配列を表し、そのような配列のそれぞれは、クレームされている方法又は組成において個別に使用される場合がある。

【表１３】

死滅率%			
0	1-14	15-30	>30
-	+	++	+++

【表１４】

表8

ID	死滅率 D14	修正 死滅率 D14
GS1240	+++	++
GS1241	++	++
GS1243	+++	++
GS1244	++	+
GS1245	++	-
GS1246	++	+
GS1247	++	-
GS1248	+++	++
GS1249	+++	++
GS1250	++	+
GS1251	+++	++
GS1252	++	+
GS1253	++	+
GS1254	+++	++
GS1255	++	+
GS1256	+++	++
GS1258	++	+
GS1259	++	+
GS1260	++	+
GS1261	+++	++
GS1262	+++	+
GS1263	+++	++
GS1265	+++	+++
GS1270	++	+
GS1271	+	+
GS1272	++	+
GS1273	++	+
GS1274	++	-
GS1275	+	-
GS1277	++	+
GS1278	+++	++
GS1281	+++	++
GS1282	++	+
GS1288	++	+
GS1290	++	-
GS1291	++	+

GS1293	++	+
GS1294	++	+
GS1296	++	-
GS1297	++	-
GS1298	++	+
GS1300	++	-
GS1301	++	-
GS1302	+	-
GS1305	+	-
GS1306	+++	++
GS1307	+	-
GS1308	++	+
GS1310	+	-
GS1311	+	-
GS1312	++	+
GS1314	++	+
GS1316	+	-
GS1327	-	-
GS1329	++	++
GS1333	++	++
GS1335	+	+
GS1338	+	-
GS1344	+	+
GS1345	+	+
GS1352	+	-
GS1354	+++	++
GS1356	+	+
GS1359	++	+
GS1360	++	++
GS1362	+	+
GS1363	-	-
GS1364	++	+
GS1365	++	+
GS1366	+	-
GS1367	+	-
GS1368	++	+
GS1369	++	+
GS1370	+	-
GS1371	++	+
GS1372	++	+
GS1373	++	+
GS1374	+	-

GS1375	++	+
GS1376	++	+
GS1377	++	+
GS1378	+	-
GS1379	++	+
GS1380	++	+
GS1381	++	+
GS1382	++	++
GS1383	++	+
GS1384	+	-
GS1385	+++	++
GS1386	+	-
GS1387	++	++
GS1388	++	+
GS1389	+	-
GS1390	+++	++
GS1391	+++	++
GS1392	++	+
GS1393	+	-
GS1394	++	+
GS1395	+	-
GS1396	++	+
GS1397	+	-
GS1398	+	-
GS1399	+	-
GS1400	+	-
GS1401	++	+
GS1402	+	-
GS1403	++	+
GS1404	++	+
GS1419	-	-
GS1425	+	-
GS1431	+	-
GS1437	+	-
GS1443	-	-
GS1449	-	-
GS1455	-	-
GS1456	+	+
GS1461	+	+
GS1462	+	+
GS1467	+	+
GS1468	+	-

GS1473	+	+
GS1474	+	+
GS1475	+	-
GS1479	+	-
GS1480	++	++
GS1485	+	+
GS1486	+	+
GS1491	+	+
GS1409	+	+
GS1410	+	+
GS1411	+	+
GS1412	-	-
GS1413	+	+
GS1414	-	-
GS1415	++	++
GS1416	++	++
GS1417	+	+
GS1418	+	+
GS1420	+	+
GS1421	+	+
GS1422	+	+
GS1423	+	+
GS1424	+	+
GS1426	+	+
GS1427	+	+
GS1428	+	+
GS1429	+	+
GS1430	+	+
GS1432	+	+
GS1433	+	+
GS1434	+	+
GS1435	+	+
GS1436	+	+
GS1438	+	+
GS1439	++	++
GS1440	+	+
GS1441	+	+
GS1442	++	++
GS1444	+	+
GS1445	+	+
GS1446	-	-
GS1447	+	+

GS1448	+	+
GS1450	++	++
GS1452	+	+
GS1453	-	-
GS1454	+	+
GS1458	+	+
GS1459	+	+
GS1460	+	+
GS1463	+	+
GS1464	+++	+++
GS1465	++	++
GS1466	++	++
GS1469	+	+
GS1470	+	+
GS1471	+++	+++
GS1472	+	+
GS1476	++	++
GS1477	+	+
GS1478	-	-
GS1481	+	+
GS1482	+	+
GS1483	+	+
GS1484	++	++
GS1488	+	+
GS1489	+	+
GS1490	-	-
GS1547	++	++
GS1548	+	+
GS1549	+	+
GS1552	-	-
GS1553	+	+
GS1554	+	+
GS1558	-	-
GS1560	+	+
GS1564	+	+
GS1565	+	+
GS1566	+	+
GS1567	+	+
GS1570	-	-
GS1572	-	-
GS1576	+	+
GS1577	+	+

GS1578	+	+
GS1582	+	+
GS1584	++	++
GS1589	+	+
GS1590	++	++
GS1592	+	+
GS1593	+	+
GS1594	+	+
GS1595	-	-
GS1597	+	+
GS1598	++	++
GS1600	+	+
GS1602	++	++
GS1603	-	-
GS1605	++	++
GS1607	+	+
GS1611	+	+
GS1613	+	+
GS1614	+	+
GS1617	+	+
GS1618	+	+
GS1619	+	+
GS1620	+	+
GS1622	+	+
GS1624	+	+
GS1625	+	+
GS1626	+	+
GS1627	+	+
GS1713	+++	++
GS1714	++	+
GS1715	+	-
GS1716	+++	+++
GS1717	+++	+++
GS1718	+++	++
GS1719	++	-
GS1720	++	++
GS1721	++	+
GS1722	+++	++
GS1723	+++	++
GS1724	+++	+++
GS1725	++	+
GS1726	++	+

GS1727	++	+
GS1728	+++	++
GS1729	++	+
GS1730	++	-
GS1731	++	-
GS1732	+++	+++
GS1733	+++	+++
GS1734	+++	++
GS1735	++	+
GS1736	+	-
GS1737	+++	++
GS1738	+++	+++
GS1739	++	+
GS1740	+	-
GS1741	++	-
GS1742	++	+
GS1743	+++	+++
GS1744	++	+
GS1745	+++	++
GS1746	++	+
GS1747	+++	++
GS1748	+++	+++
GS1749	++	+
GS1750	+	-
GS1751	+	-
GS1752	+	-
GS1753	++	+
GS1754	++	+
GS1755	++	+
GS1756	+	-
GS1757	++	++
GS1758	+	-
GS1759	+	-
GS1760	++	+
GS1761	+	-
GS1762	++	+
GS1763	+	+
GS1765	+	-
GS1766	+	+
GS1767	++	+
GS1768	++	+
GS1769	++	+

GS1770	++	+
GS1771	++	+
GS1772	+++	+++
GS1773	++	+
GS1774	++	+
GS1775	++	++
GS1777	+	+
GS1778	++	+
GS1780	++	+
GS1781	++	+
GS1782	++	+
GS1783	+	-
GS1784	+	+
GS1785	+	-
GS1786	+	-
GS1787	++	++
GS1788	+	-
GS1790	+	-
GS1791	++	+
GS1791	+	-
GS1792	++	+
GS1793	+	-
GS1550	++	+
GS1551	+	-
GS1555	+	-
GS1556	++	+
GS1557	++	++
GS1559	++	++
GS1561	+	-
GS1562	++	+
GS1563	++	+
GS1568	+	+
GS1569	++	+
GS1571	+	+
GS1573	++	+
GS1574	++	++
GS1575	++	+
GS1579	++	+
GS1580	+	-
GS1581	++	+
GS1583	-	-
GS1585	+	-

GS1586	+	-
GS1587	+	-
GS1588	+	-
GS1591	+	-
GS1596	-	-
GS1599	+	-
GS1601	+	-
GS1604	+	+
GS1606	+	-
GS1608	-	-
GS1609	-	-
GS1610	+	-
GS1612	+	-
GS1615	+	-
GS1616	+	-
GS1621	+	-
GS1623	+	-
GS1628	-	-
GS1629	+	-
GS1758	+	-
GS1764	+	-
GS1776	++	+
GS1789	-	-
GS1795	+	-
GS1941	++	-
GS1942	+	-
GS1943	+	+
GS1944	++	-
GS1945	++	-
GS1946	++	+
GS1947	+	+
GS1948	++	+
GS1949	++	+
GS1950	+	+
GS1951	++	+
GS1952	+	+
GS1953	++	+
GS1954	++	-
GS1955	++	+
GS1956	++	+
GS1957	+	+
GS1958	++	-

GS1959	-	+
GS1960	+	++
GS1961	+	++
GS1962	+	+
GS1963	+	-
GS1964	+	-
GS1965	-	-
GS1966	+	+
GS1967	+	+
GS1968	+	+
GS1969	+	-
GS1970	-	+
GS1971	-	+
GS1972	+	+
GS1973	+	++
GS1974	+	-
GS1975	+	-
GS1976	+	-
GS1977	+	-
GS1978	-	+
GS1979	+	-
GS1980	+	+
GS1981	+	-
GS1982	++	-
GS1983	++	-
GS1984	++	-
GS1985	+	-
GS1986	+	-
GS1988	++	-
GS1989	+	-
GS1990	+	-
GS1991	++	+
GS1992	++	-
GS1994	+	-
GS1995	+	-
GS1996	++	-
GS1997	+	-
GS1998	+	-
GS2000	++	+
GS2001	+	-
GS2002	+	-
GS2003	+	-

GS2004	++	-
GS2005	++	-
GS2006	+	-
GS2007	+	-
GS2008	++	-
GS2009	++	-
GS2010	++	+
GS2012	+	-
GS2013	+	-
GS2014	+	-
GS2015	+	-
GS2016	++	-
GS2017	+	-
GS2018	+	-
GS2019	++	-
GS2020	+	-
GS2021	++	-
GS2022	++	+
GS2023	+	-
GS2024	+	-
GS2025	++	-
GS2026	+	-
GS2027	++	-
GS2028	+++	+
GS2029	+	-
GS2030	++	-
GS2031	++	-
GS2032	++	-
GS2033	++	-
GS2034	++	-
GS2035	+	-
GS2036	++	-
GS2037	+++	+
GS2038	+++	++
GS2039	++	-
GS2040	++	-
GS2041	++	+
GS2042	+++	+
GS2043	++	-
GS2044	++	-
GS2045	+++	+
GS2046	+++	+

GS2047	++	-
GS2048	+++	+
GS2049	+++	+
GS2050	++	-
GS2051	++	-
GS2052	++	-
GS2053	++	-
GS2054	++	-
GS2055	++	-
GS2056	+++	+
GS2057	+++	++
GS2058	+++	++
GS2059	+++	+
GS2060	++	-
GS2061	++	+
GS2062	++	-
GS2063	++	++
GS2064	++	++
GS2065	+++	++
GS2066	+++	++
GS2067	++	+
GS2068	+++	+++
GS2069	+++	+++
GS2070	++	++
GS2071	+++	+++
GS2072	++	++
GS2073	++	+
GS2074	+++	+++
GS2075	++	+
GS2076	++	+
GS2077	+++	+++
GS2078	++	+
GS2079	++	++
GS2080	++	+
GS2081	++	++
GS2082	+++	+++
GS2083	++	+
GS2084	+	-
GS2085	++	+
GS2086	+	+
GS2087	+++	+++
GS2088	++	+

GS2089	+	+
GS2090	+	+
GS2091	++	+
GS2092	++	+
GS2093	++	+
GS2094	++	+
GS2095	+	-
GS2096	++	+
GS2097	++	++
GS2098	++	+
GS2100	++	+
GS2102	++	++
GS2103	++	++
GS2104	+++	+++
GS2105	+++	++
GS2106	++	+

【実施例】

【０２１０】

Ｐ．ｘｙｌｏｓｔｅｌｌａにおけるｄｓＲＮＡのマイクロインジェクション研究

ＤＢＭインジェクションプロトコール

スコアリングデータを以下の表９に提供する。表１Ｃの各ｄｓＲＮＡ分子は、表１Ａ～１Ｃに提供される配列番号と相関するＧＳ番号により識別される。上記の食餌アッセイで３０％を超える死滅率を示す特定の配列をマイクロインジェクションにより試験し、有効な配列をさらに特定した結果を、下記の表９に示す。Ｐ．ｘｌｏｓｔｅｌｌａ幼生には、Knorr et al. (2018) Scientific Reports 8:2061 at 11 “Gene silencing in Tribolium castaneum as a tool for the targeted identification of candidate RNAi targets in crop pests”に記載されるものと同様のインジェクションバイオアッセイで特定された配列のｄｓＲＮＡを、種に応じた飼料と共に注入した。結果は表９に示し、５０％～６３％の死滅率のスコアは＋＋、６４％以上の死滅率のスコアは＋＋＋である。

【表１５】

表9

露出方法		マイクロインジェクション			
評価 dsRNA 曝露		0.05 ug/ 昆虫			
			++ >50% +++ >64%		
ウェーブ 1	GS144		++		
	GS146		++		
	GS269		++		
	GS318		+++		
	GS319		+++		
	GS321		++		
	GS329		+++		
	GS486		++		
ウェーブ 2.1	GS901		-		
	GS947		-		
	GS953		-		
	GS954		-		
	GS957		-		
	GS958		+++		
	GS959		-		
	GS963		++		
	GS964		-		
	GS984		-		
	GS961		+++		
ウェーブ 2.2	GS1265		-		
	GS1254		-		
	GS1256		-		
	GS1261		++		
	GS1263		-		
	GS1281		-		
ウェーブ 3	GS889		+++		
	GS912		+++		
	GS1333		++		
	GS1373		++		
	GS1374		++		
	GS1380		++		
	GS1464		-		
	GS1590		+++		
	GS1594		+++		
	GS1602		+++		
	GS1611		+++		
	GS1618		-		
対照	GS134		-		

【配列表】
2023525575000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/32334

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/32334

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 13, 15, 24-27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-12, 14, 16-23, 28-34, 35a, 35b-39; SEQ ID NO: 1 (nucleotide seq.)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/32334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A01N 63/60; C12N 15/82; A01N 25/00; A61K 31/713; C12N 15/113 (2021.01)

CPC - A01N 63/60; C12N 15/8286; A01N 25/006; C12N 15/113; A61K 31/713

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/204398 A1 WO 2018/204398 A1 (DONALD DANFORTH PLANT SCIENCE CENTER) 8 November 2018; paragraphs [0009], [0019], [0020], [0028], [0033], [0034], [0070], [0088], [0105], [0110], [0114], [0120], [0122], [0161], [0166]	1-3, 9, 16-18, 28-32, 34-35a, 38
A	WO 2020/081486 A1 WO 2020/081486 A1 (GREENLIGHT BIOSCIENCES, INC.) 23 April 2020; abstract; page 1, lines 27-31; page 3, lines 1-13; page 4, lines 12-22; page 8, lines 20-21; page 11, lines 3-7; page 13, lines 5-12; page 14, lines 19-20; page 22, lines 18-20; page 23, lines 10-13; page 27, lines 18-19; page 30, lines 18-26; page 31, lines 16-17	1-3, 9, 16-18, 28-32, 34-35a, 38
A -	(NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) PREDICTED: Helicoverpa armigera peptidoglycan-recognition protein LB-like(LOC110370939), transcript variant X2, Mrna. Genbank entry (online). 1 June 2017 [retrieved on 24 September 2021]. Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_021326957.1/]; pages 1-2	1-3, 9, 16-18, 28-32, 34-35a, 38
A -	(TIAN, H et al.) Developmental Control of a Lepidopteran Pest Spodoptera exigua by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. PLoS One. 13 July 2009, Vol. 4, No. 7; pages 1-13; abstract; page 10, 1st column, 5th paragraph; page 11, 1st column, 3rd paragraph and 2nd column, 2nd paragraph; DOI: 10.1371/journal.pone.0006225	1-3, 9, 16-18, 28-32, 34-35a, 38
A -	(TERENIUS, O et al.) RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. Journal of Insect Physiology. February 2011, Vol. 57, No. 2; pages 231-245; DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.006	1-3, 9, 16-18, 28-32, 34-35a, 38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 September 2021 (28.09.2021)	DEC 21 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/32334

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-12, 14, 16-23, 28-34, 35a, 35b-39 and SEQ ID NO: 1 (nucleotide sequence) are directed toward methods and compositions for controlling Lepidopteran pests in plants, and associated recombinant polynucleotides and methods for producing the recombinant polynucleotides.

The methods, compositions, plants, and recombinant polynucleotides will be searched to the extent they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary nucleotide sequence). Applicant is invited to elect additional polynucleotide(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable nucleobases or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional polynucleotide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3 (each in-part), 9 (in-part), 16-18 (each in-part), 28-32 (each in-part), 34 (in-part), 35a (in-part), and 38 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (nucleotide sequence). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected polynucleotide sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (nucleotide sequence).

No technical features are shared between the polynucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a method for controlling a Lepidopteran pest infestation of a plant comprising: (a) contacting said Lepidopteran pest with at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene, or an RNA transcribed from said target gene; or (b) providing in the diet of said Lepidopteran pest at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene, or an RNA transcribed from said target gene; or (c) causing mortality or stunting in larvae of said Lepidopteran pest by providing in the diet of said larvae at least one polynucleotide comprising at least one silencing element comprising at least 18, 19, 20, 21, or 25 contiguous nucleotides that are complementary to a target gene, or an RNA transcribed from said target gene; or (d) topically applying to said plant a composition comprising at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene, or an RNA transcribed from said target gene; or (e) topically applying to said plant a composition comprising at least one polynucleotide in a manner such that an effective amount of said polynucleotide is ingested by Lepidopteran species feeding on said plant, said at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene, or an RNA transcribed from said target gene; or (f) expressing in said plant at least one polynucleotide comprising at least one segment that is essentially identical or complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or essentially identical or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a DNA; or (g) contacting said Lepidopteran pest with an effective amount of at least one double-stranded RNA, one strand of which is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a sequence; a plant having improved resistance to a Lepidopteran pest infestation, provided by the method, or a fruit, seed, or propagatable part of said plant; an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest, comprising: (a) an insecticidally effective amount of any of the polynucleotides; a recombinant DNA construct comprising a heterologous promoter operably linked to: any of the polynucleotides; a plant chromosome or a plastid or a recombinant plant virus vector or a recombinant baculovirus vector comprising the recombinant DNA construct; a transgenic crop plant cell having in its genome the recombinant DNA construct; a transgenic crop plant comprising the transgenic solanaceous plant cell, or a fruit, seed, or propagatable part of said transgenic crop plant; a method for producing a polynucleotide for use in Lepidopteran pest control, the method comprising: (a) incubating in a reaction mixture cellular ribonucleic acid (RNA) and a ribonuclease and producing 5' nucleoside monophosphates (5' NMPs); (b) eliminating the ribonuclease; and (c) incubating in the reaction mixture, or in a second reaction mixture, the 5' NMPs, a polyphosphate kinase, a polyphosphate, a polymerase, and a deoxyribonucleic acid (DNA) template, or encoding an RNA sequence that comprises a segment that comprises at least 18 contiguous nucleotides, and producing the RNA of interest; and an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest, comprising an insecticidal double-stranded RNA molecule that causes mortality or stunting of growth in a Lepidopteran pest when ingested or contacted by said Lepidopteran pest, wherein at least one strand of said insecticidal double-stranded RNA molecule comprises at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides that are complementary to a sequence.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2009/0307803 A1 to Baum, et al. (hereinafter 'Baum'), in view of US 2018/0087045 A1 to GreenLight Biosciences, Inc. (hereinafter 'Greenlight').

Baum discloses a method for controlling a Lepidopteran pest infestation of a plant (a method for controlling a Lepidopteran pest infestation of a plant; abstract, paragraphs [0023], [0111]) comprising: (a) contacting said Lepidopteran pest with at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence (comprising: (a) contacting said Lepidopteran pest with at least one polynucleotide comprising a nucleotide sequence; paragraphs [0041], [0047], [0111]) that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene (that is complementary to at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides, or complementary to a nucleotide sequence having at least 90 percent, 95 percent or 98 percent identity with said contiguous nucleotides, of a target gene; paragraph [0016]); a plant having improved resistance to a Lepidopteran pest infestation (a plant having improved resistance to a Lepidopteran pest infestation; paragraphs [0019], [0022], [0111]), provided by the method

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/32334

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

(provided by the method; paragraphs [0019], [0022], [0023], [0111]); an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest (an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest; abstract, paragraphs [0026], [0111]), comprising: (a) an insecticidally effective amount of any of the polynucleotides (comprising: (a) an insecticidally effective amount of any of the polynucleotides; abstract, paragraphs [0023], [0026]); a recombinant DNA construct comprising a heterologous promoter operably linked to: any of the polynucleotides (a recombinant DNA construct comprising a heterologous promoter operably linked to: any of the polynucleotides; paragraphs [0018], [0019]); a recombinant plant virus vector or a recombinant baculovirus vector comprising the recombinant DNA construct (a recombinant plant virus vector or a recombinant baculovirus vector comprising the recombinant DNA construct; paragraphs [0030], [0179]); a transgenic crop plant cell having in its genome the recombinant DNA construct (a transgenic crop plant cell having in its genome the recombinant DNA construct; paragraphs [0022], [0023]); a transgenic crop plant comprising the transgenic solanaceous plant cell (a transgenic crop plant comprising the transgenic solanaceous plant cell; paragraphs [0019],[0023], [0304], [0305]; wherein the target is the Colorado Potato Beetle); and an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest (an insecticidal composition for controlling a Lepidopteran pest; paragraphs [0023], [0026], [0111]), comprising an insecticidal double-stranded RNA molecule that causes mortality or stunting of growth in a Lepidopteran pest when ingested or contacted by said Lepidopteran pest (comprising an insecticidal double-stranded RNA molecule that causes mortality or stunting of growth in a Lepidopteran pest when ingested or contacted by said Lepidopteran pest; paragraphs [0010], [0111]), wherein at least one strand of said insecticidal double-stranded RNA molecule comprises at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides that are complementary to a sequence (wherein at least one strand of said insecticidal double-stranded RNA molecule comprises at least 18, 19, 20, 21, 25, 50, 100, 150 or 200 contiguous nucleotides that are complementary to a sequence; paragraph [0016]).

Baum does not disclose a method for producing a polynucleotide for use in Lepidopteran pest control, the method comprising: (a) incubating in a reaction mixture cellular ribonucleic acid (RNA) and a ribonuclease and producing 5' nucleoside monophosphates (5' NMPs); (b) eliminating the ribonuclease; and (c) incubating in the reaction mixture, or in a second reaction mixture, the 5' NMPs, a polyphosphate kinase, a polyphosphate, a polymerase, and a deoxyribonucleic acid (DNA) template, or encoding an RNA sequence that comprises a segment that comprises at least 18 contiguous nucleotides, and producing the RNA of interest

Greenlight discloses a method for producing a polynucleotide (a method for producing a polynucleotide; paragraph [0006]), the method comprising: (a) incubating in a reaction mixture cellular ribonucleic acid (RNA) and a ribonuclease and producing 5' nucleoside monophosphates (5' NMPs) (the method comprising: (a) incubating in a reaction mixture cellular ribonucleic acid (RNA) and a ribonuclease and producing 5' nucleoside monophosphates (5' NMPs); paragraphs [0004], [0006]); (b) eliminating the ribonuclease (eliminating the ribonuclease; paragraph [0004]); and (c) incubating in the reaction mixture, or in a second reaction mixture, the 5' NMPs, a polyphosphate kinase, a polyphosphate, a polymerase, and a deoxyribonucleic acid (DNA) template (incubating in the reaction mixture, or in a second reaction mixture, the 5' NMPs, a polyphosphate kinase, a polyphosphate, a polymerase, and a deoxyribonucleic acid (DNA) template; paragraphs [0005], [0006]), and producing the RNA of interest (and producing the RNA of interest; pra [0006]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Baum to have used the RNA-synthesis procedures of Greenlight to produce the RNA molecules of interest in high volume for a composition by using the RNA present in cells without the cost of mixing purified ribonucleic acid triphosphates.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Baum and Greenlight references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/83*	*(2006.01)*	C12N	15/83	Z	
A01H	*1/00*	*(2006.01)*	A01H	1/00	A	
A01H	*6/00*	*(2018.01)*	A01H	6/00		
A01P	*7/04*	*(2006.01)*	A01P	7/04		
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*15/29*	*(2006.01)*	C12N	15/29		
C07K	*14/42*	*(2006.01)*	C07K	14/42		

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

０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 スリドハラン，クリシュナクマール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 デヴィシェティ，ウペンドラ・クマール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 バロス・ロドリゲス，タイス
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 オッペルト，クリス
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 デーサーイー ，サレシュ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 ミシュラ，サムビット・クマール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

(72)発明者 ヴァン・エカート，エフェリーン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 ０２１５５、メドフォード、ボストン アヴェニュー ２００、スイート １０００

Ｆターム（参考） 2B030 AA02 AB03 AD05 CA17
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA48
4H011 AC01 BB19 BB21 BB23 DD03 DG13
4H045 AA10 AA30 BA09 CA30 DA80 EA06 FA74