

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6236531号
(P6236531)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/42 (2006.01)	C O 7 K 16/42
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
A O 1 P 7/04 (2006.01)	A O 1 P 7/04
A O 1 N 63/02 (2006.01)	A O 1 N 63/02 Z

請求項の数 6 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2016-535242 (P2016-535242)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月9日(2015.1.9)
 (65) 公表番号 特表2017-505109 (P2017-505109A)
 (43) 公表日 平成29年2月16日(2017.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/070420
 (87) 国際公開番号 W02015/109951
 (87) 国際公開日 平成27年7月30日(2015.7.30)
 審査請求日 平成28年5月27日(2016.5.27)
 (31) 優先権主張番号 201410037000.9
 (32) 優先日 平成26年1月26日(2014.1.26)
 (33) 優先権主張国 中国(CN)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 516158068
 江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院
 J I A N G S U A C A D E M Y O F
 A G R I C U L T U R A L S C I E N C
 E S
 中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鍾▼▲靈▼
 街50号食品▲質▼量安全与▲検▼▲測▼
 研究所
 I n s t i t u t e o f F o o d S
 a f e t y a n d M o n i t o r i n
 g T e c h n o l o g y , N o . 5
 O , Z h o n g l i n g R o a d ,
 X u a n w u N a n j i n g , J i a
 n g s u , C H I N A

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト耐虫遺伝子およびそれによりコードされた抗C r y 1 A b毒素イデオタイプ一本鎖抗体ならびに用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヌクレオチド配列が配列番号1で示されるヒト耐虫遺伝子。

【請求項 2】

アミノ酸配列が配列番号2で示される、請求項1に記載のヒト耐虫遺伝子によりコードされた抗C r y 1 A b毒素イデオタイプ一本鎖抗体。

【請求項 3】

請求項1に記載のヒト耐虫遺伝子を含有する原核細胞用発現ベクター。

【請求項 4】

請求項1に記載のヒト耐虫遺伝子を含む農業害虫防除剤。

【請求項 5】

請求項1に記載のヒト耐虫遺伝子を、農業害虫を防除するために使用する農業害虫防除方法。

【請求項 6】

請求項2に記載の抗C r y 1 A b毒素イデオタイプ一本鎖抗体を含む殺虫剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子工学および生物的防除の分野に関し、特にヒト耐虫遺伝子およびそれ

によりコードされた抗Cry1Ab毒素イディオタイプ一本鎖抗体ならびに用途に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、病害虫の生物的防除に世界的に広範に用いられている殺虫遺伝子は、バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*, Bt) のBt毒素遺伝子 (例えば、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C、Cry1Fなど) である。バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*, Bt) は、昆虫性病原細菌であり、産生されるBt毒素は、多種の農林害虫に対して特異的な毒殺作用を有する。1987年に、ベルギーのプラントジェネティックシステムズ社 (Plant Genetic Systems) が、Bt遺伝子導入耐虫タバコの取得に成功したことを世界で初めて報告し、現在に至るまで、Bt遺伝子は、すでにトウモロコシ、イネ、ワタ、トマト、ジャガイモ、タバコなどの世界の主要農作物に遺伝子導入されている。2012年国際アグリバイオ事業団の統計によれば、中国で栽培されているBt導入ワタの面積は、すでに390万ヘクタールを超えており、ワタ栽培総面積の71.5%を占める。しかしながら、Bt遺伝子導入作物の使用および普及に伴い、遺伝子流動、土壌微生物の生態構造の改変、種の薬剤耐性および正常な免疫系への危害などの面で存在する可能性のある潜在的な危害が、社会的な注目を集めている。「Bt遺伝子導入トウモロコシの根圏微生物および細菌生理群の多様性」(王敏ら、生態学雑誌、2010年03期) および「Bt遺伝子導入トウモロコシの土壌細菌数の多様性に対する影響」(劉玲ら、生態・農村環境学報、2011年03期) は、それぞれ屋内、屋外でBt導入トウモロコシを栽培した土壌について、細菌数および多様性の分析を行い、その結果、いずれも、Bt導入トウモロコシを栽培した群とブランク対照群とを比較し、有意差が認められることがわかった。

【0003】

「Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine」(Vazquez-Padronら、Biochem Biophys Res Commun、2000年01期) は、動物実験において、マウスが摂取したBt内毒素、外毒素が10mg/kgおよび100mg/kgに達したときに、マウスのT細胞ANAE陽性率、脾臓指数およびマクロファージの食作用に、いずれも著しい抑制反応が認められ、摂取量の増加に伴い、こうした抑制作用が著しくなることがわかった。この試験の結果、動物体内のBt毒素の蓄積係数が6.24を上回ったときに、肝臓、腎臓および消化管などの損傷がもたらされ、肝臓および腎臓において、細胞膨張および空胞変性といった異常が観察され、糸球体血管上皮細胞の病変がもたらされることがさらにわかった。当然ながら、免疫反応によってもたらされたことを排除することはできない。長期的に大用量でBt毒素タンパク質を使用すると、動物白血球総数およびヘモグロビン含量が著しく低減し、このことも、Bt毒素タンパク質が著しい免疫抑制毒性を有していることを説明している。Bt毒素生物活性を有する代替的生物エフェクター (例えば、抗イディオタイプ抗体) を開拓することは、生物農薬開発分野の研究の焦点となっている。

【0004】

ヒト化された抗体遺伝子は、ヒトに由来するため、ヒトの免疫系遺伝子と同源であるという長所を有し、その製剤の散布または遺伝子導入発現後に、食品中の残留により人体の免疫系に危害をもたらすことを回避することができる。

【0005】

1974年に、デンマークの免疫学者Jerneが、その「免疫ネットワーク理論 (Immune Network Theory)」において、抗イディオタイプ抗体の概念を初めて提出した。抗イディオタイプ抗体 (Anti-idiotypic antibody、以下、Anti-Idという) とは、抗体分子可変領域に位置するイディオタイプ

(I d i o t y p e, I d) によって産生される特異的な抗体を指す。B o n a らは、I d と A n t i - I d の血清学的反応および A I d の機能に基づき、抗イディオタイプ抗体を4種類 (α 、 β 、 γ および ϵ) に分けている。 β 型抗イディオタイプ抗体は、「インターナルイメージ」作用を有する、すなわち、(半) 抗原と同じ抗原決定基を有するため、抗原の機能および生物活性を有することができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現在、ファージディスプレイ技術を用いて、ファージ抗体ライブラリを構築することによって、特異的な選択を経て、標的抗原類似効果を有する抗イディオタイプ抗体を得ることができると普遍的に考えられている。ファージディスプレイ技術を用いて特異的な抗体を選択するプロセスは、「パンニング (P a n n i n g)」と呼ばれ、主に、結合、洗浄、溶出および増幅の4つのステップを含む。R a a t s らは、抗コルチゾールモノクローナル抗体を用いて被覆し、固相抗原として直接選択を行い、選択を行う前に、同じ種属の陰性モノクローナル抗体を用いて負の選択を行い、抗体定常領域と結合した組換え抗体セグメントを選択することを回避し、コルチゾールに対する A n t i - I d の選択に最終的に成功した。G o l e t z らは、同様に、ファージ抗体ディスプレイシステムを用いて、異なる溶出方法の抗イディオタイプ抗体セグメント選択結果に対する影響を研究して比較し、最終的に選択した96個のクローンのうち、28個が抗イディオタイプ特性を有する陽性クローンであった。現在、代替可能なBt毒素活性エフェクター、特に抗Bt毒素タイプの抗イディオタイプ一本鎖抗体(以下、A n t i - I d S c F v s という)などの関連材料および製品について、報告はない。

【課題を解決するための手段】

【0007】

現在のBt毒素導入作物およびその毒素製剤の広範な使用に存在している安全面でのリスクおよび過敏反応などの問題について、Bt毒素生物活性を有する代替可能な生物エフェクターを開拓し、害虫の生物的防除に用いることを、本発明は次の通り実現する。

ヌクレオチド配列が配列番号1で示される、ヒト耐虫遺伝子。

アミノ酸配列が配列番号2で示される、本発明における、配列番号1によりコードされた抗C r y 1 B毒素イディオタイプ一本鎖抗体。

本発明における、ヒト耐虫遺伝子配列番号1を含有する原核細胞用発現ベクター。

本発明における、ヒト耐虫遺伝子配列番号1の農業害虫防除の面の用途。

本発明における、アミノ酸配列が配列番号2で示される抗C r y 1 B毒素イディオタイプ一本鎖抗体を含む殺虫剤。

【0008】

本発明は、公開されているヒト遺伝子プールにおいて、殺虫活性を有する「 β 」タイプの抗C r y 1 A b毒素イディオタイプ一本鎖抗体を選択して取得し、この一本鎖抗体は、原核系発現を経て、その初代培養物はコブノメイガ中腸囲食膜特異性受容体B B M Vとの結合活性を有し、本発明は、動物免疫を経ずに「 β 」タイプの抗C r y 1 A b毒素イディオタイプ一本鎖抗体を得ることができ、調製周期は短く、アミノ酸配列は小さく、体外での大規模生産に適している。また、本発明を新しい新耐虫遺伝子資源とし、Bt毒素を模した生物活性を有する新型耐虫遺伝子資源を探索して開拓し、従来のBt毒素の広範な使用に存在する各種の安全面でのリスクを低減し、ひいては、今後、Btに代わって農業害虫の生物的防除に用いられる可能性があり、殺虫剤の使用の減少などに対し、重要な科学および現実的な意義を有する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】B12のE L I S A測定結果の概略図である。

【図2】B12の生物学的測定結果の概略図である。

【図3】それぞれB12、CK+、CK-に浸したイネの葉を与えた後のコブノメイガ三齢幼虫の死亡状況の概略図である。

【図4】それぞれB12、CK+、CK-に浸したキャベツを与えた後のコナガ三齢幼虫の死亡状況の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

実施例で用いた試薬および培地の配合：

(1) 2×TY液体培地：

再蒸留水900mLにトリプトン16g、酵母抽出物10gおよびNaCl 5gを加え、攪拌して均等に混合し、再蒸留水で1Lに定容し、オートクレーブに入れ、121℃で20分間滅菌し、冷却した後、使用に備えて4℃で保存した。

(2) 2×TY-AG液体培地：

2×TYの培地に最終濃度100μg/mlのアンピシリンおよび質量比1%のグルコースを加えた。

(3) 2×TY-AK液体培地：

2×TYの培地に最終濃度100μg/mlのアンピシリン、50μg/mlのカナマイシンを加えた。

(4) 2×TY-AKG液体培地：

2×TYの培地に最終濃度100μg/mlのアンピシリン、50μg/mlのカナマイシンおよび質量比1%のグルコースを加えた。

(5) TYE寒天培地：

再蒸留水900mlにアガロース15.0g、NaCl 8g、トリプトン10g、酵母抽出物5gを加え、再蒸留水で1Lに定容し、オートクレーブに入れ、121℃で20分間滅菌し、冷却した後、使用に備えて4℃で保存した。

(6) TYE-AG寒天培地：

TYE寒天培地に最終濃度100μg/mlのアンピシリンおよび質量比1%のグルコースを加えた。

【0011】

(7) PBS溶液

NaCl 8.0g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2gを秤取し、それぞれ蒸留水の中に加え、充分に溶解した後、1Lに定容した。

(8) PBST溶液

PBS溶液に体積比0.05%のTween-20を加えた。

(9) PEG/NaCl溶液：

PEG 8000 20g、NaCl 14.61gを秤取し、脱イオン水80mlを加え、100mlに定容し、オートクレーブに入れ、121℃で20分間滅菌し、冷却した後、使用に備えて4℃で保存した。

(10) クエン酸塩緩衝液(CPBS、pH=5.5)：

C₆H₇O₈ (クエン酸) 21g、Na₂HPO₄・12H₂O 71.6gを取り、それぞれ蒸留水に加え、充分溶解した後、1Lに定容した。

(11) テトラメチルベンジジン(TMB)溶液：

テトラメチルベンジジン10mgを秤取してジメチルスルホキシド1mlに溶かし、光を避け、使用に備えて4℃で保存した。

(12) 基質呈色溶液：

10ml配合成分：CPBS 9.875ml、TMB溶液 100μl、体積比が20%のH₂O₂ 25μl。

実施例で用いた材料の入手先：

抗Cry1Abポリクローナル抗体、BBMV、関連しない抗イデオタイプ一本鎖抗体、「β」タイプ以外のAnti-Id ScFv、キャベツの葉、コナガ三齢幼虫は、

いずれも江蘇省農業科学院農業部農産品品質安全制御技術・規格重点実験室が提供した。

ヒト化されたファージ抗体ライブラリ、T G 1 細菌およびヘルパーファージ K M 1 3 は、英国 S o u r c e B i o S c i e n c e 社から購入した。

H R P - ヤギ抗 M 1 3 - I g G は、武漢博士徳社から購入した。

C r y 1 A b 毒素は、上海佑隆生物科技有限公司から購入した。

イネの葉およびコブノメイガ三齢幼虫は、揚州緑源生物化工有限公司が提供した。

【0012】

実施例1 抗C r y 1 A b 毒素イディオタイプ一本鎖抗体の選択

(1) ヒト化されたファージ抗体ライブラリ菌液 20 μ l を取り、2 $\times$ T Y - A G 液体培地 200 m l に加え、O D₆₀₀ が 0.4 になるまで 37 $^{\circ}$ C で恒温培養し、菌液 50 m l を取り、1 $\times$ 10¹² p f u ヘルパーファージ K M 1 3 を加え、重複感染を行い、37 $^{\circ}$ C で 30 分間培養した後、3300 g で 10 分間遠心し、上澄液を廃棄し、2 $\times$ T Y - A K G 液体培地 100 m l で再懸濁して沈殿させ、30 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌日、3300 g で 30 分間遠心し、上澄液を収集し、P E G / N a C l 溶液 20 m l を加え、1 時間氷浴した後、再び 3300 g で 30 分間遠心し、P B S 4 m l を用いて再懸濁して沈殿させた。再懸濁液を 11600 g で 10 分間遠心し、上澄液を増幅したファージ抗体ライブラリとした。

【0013】

(2) ステップ1で得た増幅したファージ抗体ライブラリを取り、4 回のパンニングを行った。1 回目のパンニングでは、100 μ g / m l の抗C r y 1 A b ポリクローナル抗体 4 m l で細胞培養ボトルの底部を被覆し、4 $^{\circ}$ C で一晚置き、翌日、それぞれ P B S 1 m l で細胞培養ボトルを 3 回洗浄した後、均等に混合した増幅したファージ抗体ライブラリ 1 m l および 3 % の M P B S 溶液 4 m l を加え、シェーカーに置き、室温でゆっくりと 1 時間振盪し、さらに 1 時間静置した後、培養ボトルの中の液体を注ぎ出し、それぞれ P B S T 溶液 1 m l でボトルを 20 回洗浄し、10 m g / m l のトリプシン (T r y p s i n) 1 m l を加えて、特異的に結合したファージ抗体を溶出し、溶出液を 1 回目のパンニングのファージ抗体とした。2 回目、3 回目、4 回目のパンニングで被覆した抗C r y 1 A b ポリクローナル抗体の濃度は、それぞれ 50 μ g / m l、25 μ g / m l、10 μ g / m l であり、用いたファージ抗体は、前回のパンニングで得られたファージ抗体であり、パンニング方法は、1 回目と同じとした。4 回目のパンニングのファージ抗体 10 μ l を取り、対数増殖期にある T G 1 細菌 1 m l に感染させ、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した後、T Y E - A G 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌日、シングルコロニーを無作為にピックアップし、100 μ l / ウェルの 2 $\times$ T Y - A G 液体培地を含む 96 ウェルプレートに接種し、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌日、ウェルの中から菌液を 2 μ l 吸い出し、新しい 96 ウェルプレートのウェルの中に移し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養した。各ウェルに力価 10¹² のヘルパーファージ K M 1 3 を 25 μ l 加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間培養し、1800 g で 10 分間遠心し、2 $\times$ T Y - A K 液体培地 150 μ l で再懸濁し沈殿させた後、30 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌日、1800 g で 30 分間遠心し、それぞれ上澄液を取った。

【0014】

(3) 4 μ g / m l の抗C r y 1 A b ポリクローナル抗体を取り、96 ウェルプレートの中に加え、100 μ l / ウェルで、4 $^{\circ}$ C で一晚置き、翌日、各ウェルにそれぞれステップ2で得た上澄液 100 μ l を加え、陰性対照は、2 $\times$ T Y - A K 液体培地を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間水浴し、各ウェルを P B S T 250 μ l で洗浄した後、各ウェルに 1 : 5000 で希釈した H R P - ヤギ抗 M 1 3 - I g G を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養した。各ウェルに基質呈色溶液を 100 μ l 加え、青色が現れるまで室温で 10 ~ 20 分間反応させ、最後に各ウェルに濃度 2 m o l / L の H₂ S O₄ を 50 μ l 加え、反応を素早く終了させた後、マイクロプレートリーダーで O D₄₅₀ 値を測定した。溶液の O D₄₅₀ 値 / 陰性対照の O D₄₅₀ 値が 2.1 を上回った場合、陽性と判断し、この溶液に対応するステップ2の上澄液を、選択された抗C r y 1 A b 毒素イディオタイプ一本鎖抗体を含有する上澄液とした。

10

20

30

40

50

【0015】

サンガーシーケンシング法で、選択された抗Cry1Ab毒素イデオタイプ一本鎖抗体を測定し、ヌクレオチド配列が配列番号1であるものは次の通りであった。

```

c a g g a a a c a g   c t a t g a c c a t   g a t t a c g c c a   a g c t t g c
a t g   c a a a t t c t a t   t t c a a g g a g a   6 0
c a g t c a t a a t   g a a a t a c c t a   t t g c c t a c g g   c a g c c g c
t g g   a t t g t t a t t a   c t c g c g g c c c   1 2 0
a g c c g g g c c a t   g g c c g a g g t g   c a g c t g t t g g   a g t c t g g
g g g   a g g c t t g t a c   a g c c t g g g g g   1 8 0
g g t c c c t g a g   a c t c t c c t g t   g c a g c c t c t g   g a t t c a c   10
c t t   t a g c a g c t a t   g c c a t g a g c t   2 4 0
g g g t c c g c c a   g g c t c c a g g g   a a g g g g c t g g   a g t g g g t
c t c   a t a t a t t t c g   a a t g a g g g t a   3 0 0
c g a c g a c a a t   g t a c g c a g a c   t c c g t g a a g g   g c c g g t t
c a c   c a t c t c c a g a   g a c a a t t c c a   3 6 0
a g a a c a c g c t   g t a t c t g c a a   a t g a a c a g c c   t g a g a g c
c g a   g g a c a c g g c c   g t a t a t t a c t   4 2 0
g t g c g a a a c c   t t g g t c g g c g   t t t g a c t a c t   g g g g c c a
g g g   a a c c c t g g t c   a c c g t c t c g a   4 8 0
g c g g t g g a g g   c g g t t c a g g c   g g a g g t g g c a   g c g g c g g   20
t g g   c g g g t c g a c g   g a c a t c c a g a   5 4 0
t g a c c c a g t c   t c c a t c c t c c   c t g t c t g c a t   c t g t a g g
a g a   c a g a g t c a c c   a t c a c t t g c c   6 0 0
g g g c a a g t c a   g a g c a t t a g c   a g c t a t t t a a   a t t g g t a
t c a   g c a g a a a c c a   g g g a a a g c c c   6 6 0
c t a a g c t c c t   g a t c t a t g c t   g c a t c c c g g t   t g c a a a g
t g g   g g t c c c a t c a   a g g t t c a g t g   7 2 0
g c a g t g g a t c   c t g g g a c a g a   t t t c a c t c t c   a c c a t c a
g c a   g t c t g c a a c c   t g a a g a t t t t   7 8 0
g a a c t t a c t a   c t g t c a a c a g   a c t t c t c a t c   c t c c t c t   30
g a c   g t t c g g c c a a   g g g a c c a a g g   8 4 0
t g g a a a t c a a   a c g g g c g g c c   g c a c a t c a t c   a t c a c c a
t c a   c g g g g c c g c a   g a a c a a a a a c   9 0 0
t c a t c t c a g a   a g a g g a t c t g   a a t g g g g c c g   c a t a g   9
3 5

```

【0016】

サンガーシーケンシング法で、選択された抗Cry1Ab毒素イデオタイプ一本鎖抗体を測定し、ヌクレオチドの翻訳後のアミノ酸配列が配列番号2であるものは次の通りであった。

```

H-CDR1
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L
R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R   6 0
H-CDR2
Q A P G K G L E W V S R I H T S G D S T Q Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K   1 2 0
H-CDR3
D Y R W F D Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q
S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S   1 8 0
L-CDR1
Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A S T L Q S G V P S R F S G S G   50

```

S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y 2 4 0

L - C D R 3 H i s - t a g

Y C Q Q A S E A P S T F G Q G T K V E I K R A A A H H H H H G A A E Q K L I S
E E D L N G A A S T P 2 9 1

本出願人は、この抗C r y 1 A b毒素イディオタイプ一本鎖抗体を自らB 1 2と命名した。

【0017】

実施例2 B 1 2の初代培養物の調製

(1) 実施例1で選択された抗C r y 1 A b毒素イディオタイプ一本鎖抗体を含有する上澄液を、体積比1：100で2×TY-A G液体培地10mlの中に移し、37℃で2時間培養し、力価 10^{12} のヘルパーファージKM13を100μl加えて救援し、30℃で2時間培養し、1800gで10分間遠心し、上澄液を除去し、2×TY-A K液体培地を用いて再懸濁して菌種を沈殿させ、30℃、250rpmで振盪し、一晚培養した。翌日、1800gで30分間遠心し、その上澄液を、B 1 2初代培養物を含有する上澄液とした。

【0018】

実施例3 B 1 2の亜型同定

(1) 競合抑制E L I S A測定試験

試験は、6個の試験群と対応する対照群に分け、それぞれ表1により溶液を調製した。

【0019】

【表1】

表1 競合抑制E L I S A測定試験溶液の調製

群	B12	関連しない抗イディオタイプ一本鎖抗体	2×TY液体培地
試験群1	5μl		45μl
対照群1		5μl	45μl
試験群2	10μl		40μl
対照群2		10μl	40μl
試験群3	20μl		30μl
対照群3		20μl	30μl
試験群4	30μl		20μl
対照群4		30μl	20μl
試験群5	40μl		10μl
対照群5		40μl	10μl
試験群6	50μl		
対照群6		50μl	

表1において、B 1 2は実施例2で得られたB 1 2初代培養物を含む上澄液である。

【0020】

それぞれ表1により調製した溶液に、10μg/mlの抗C r y 1 A bポリクローナル抗体を50μl加え、37℃で2時間培養した後、それぞれ2μg/ml C r y 1 A b毒素で被覆した96ウェルプレートの中(前記2μg/ml C r y 1 A b毒素で被覆した96ウェルプレートは、前日に2μg/mlのC r y 1 A b毒素を取り96ウェルプレートの中に加え、100μl/ウェルとし、4℃で一晩置いた)で2時間反応させた。各ウェルをP B S T 250μlで3回洗浄した後、各ウェルにそれぞれ1：5000で希釈したH R P - ヤギ抗ウサギI g Gを100μl加え、室温で1時間培養した。各ウェルをP B S T 250μlで3回洗浄した後、各ウェルにそれぞれ基質呈色溶液を100μl加え、青色が現れるまで室温で10～20分間反応させ、最後に各ウェルにそれぞれ濃度2mol/LのH₂SO₄を50μl加え、反応を素早く終了させた。マイクロプレートリーダーでOD₄₅₀値を測定した。

【0021】

実験結果は図1に示した通りである。抑制率はB12含量の増加に伴い増大することがわかった。対照群には競合抑制現象がなく、B12は、β型抗イディオタイプ一本鎖抗体であり、Cry1Ab毒素を模して競合し、抗Cry1Ab毒素ポリクローナル抗体と結合したことを説明している。

【0022】

(2) 生物学的測定試験

試験は、試験群1、試験群2、試験群3、陽性対照群、陰性対照群1、陰性対照群2、陰性対照群3に分け、試験の手順は次の通りとした。

(a) 密封：100 μl / ウェルの5 μg / mlのBBMVを、96ウェルプレートの中に、4℃で一晩置き、翌日、各ウェルをPBST 250 μlで3回洗浄した後、それぞれ質量比3%のBSAを200 μl入れ、室温で2時間培養し、密封した。

(b) 試料添加：ステップ1で密封した96ウェルプレートを、250 μl / ウェルのPBSTで3回洗浄した後、それぞれ96ウェルプレートに表2により試料を添加した。

【0023】

【表2】

表2 B12生物学的測定試験溶液の調製

群	2 μg/ml Cry1Ab 毒素	B12	「β」タイプ以外の Anti-Id ScFv	2×TY-AG液体 培地	CPBS
試験群1	50 μl	10 μl		40 μl	
試験群2	50 μl	30 μl		20 μl	
試験群3	50 μl	50 μl			
陽性対照群	50 μl				50 μl
陰性対照群1	50 μl		10 μl	40 μl	
陰性対照群2	50 μl		30 μl	20 μl	
陰性対照群3	50 μl		50 μl		

表2において、B12は実施例2で得られたB12初代培養物を含む上澄液である。

【0024】

(c) ステップbで試料を添加した96ウェルプレートを、室温で2時間培養し、各ウェルをPBST 250 μlで3回洗浄した後、各ウェルに10 μg / ml抗Cry1Abポリクローナル抗体を100 μl加え、再び各ウェルをPBST 250 μlで3回洗浄し、各ウェルに1：5000で希釈したHRP-ヤギ抗ウサギIgGを100 μl加え、室温で1時間培養した。各ウェルをPBST 250 μlで3回洗浄し、各ウェルに基質呈色溶液を100 μl加え、青色が現れるまで室温で10～20分間反応させ、最後に各ウェルに濃度2 mol / LのH₂SO₄を50 μl加え、反応を素早く終了させた後、マイクロプレートリーダーでOD₄₅₀値を測定した。

【0025】

実験結果は図2に示した通りであり、陽性対照に比べ、抗Cry1Ab毒素イディオタイプ一本鎖抗体B12（試験群1、2、3）は、Cry1Ab毒素とその受容体BBMVとの結合を抑制することができたが、「β」タイプ以外の陰性対照には抑制現象がなく、B12が「β」タイプであることがさらに実証された。

【0026】

実施例4 抗Cry1Ab毒素イディオタイプ一本鎖抗体の殺虫活性の検証

試験は、試験群と対照群に分けて行われた。

試験群は、実施例2で得られたB12初代培養物を含有する上澄液（B12）を用いた。

。

陽性対照群は、濃度0.2 g / LのCry1Ab毒素（CK+）を用いた。

陰性対照群は、「β」タイプ以外のAnti-Id ScFvs（CK-）を用いた。

【0027】

試験手順：

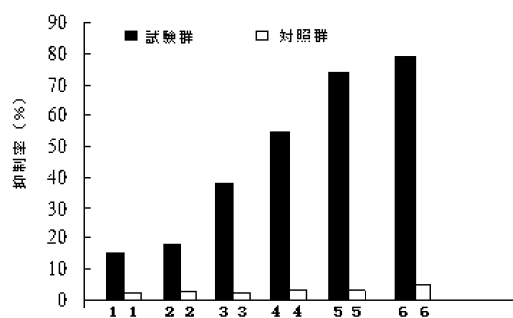
試験群、陽性対照群、陰性対照群を各10ml取り、滅菌したペトリ皿の中に入れ、それぞれイネの葉6枚およびキャベツの葉6枚を入れ、30分間浸し、取り出して陰干しした。コブノメイガ三齢幼虫およびコナガ三齢幼虫に、陰干しした葉を与えた。

【0028】

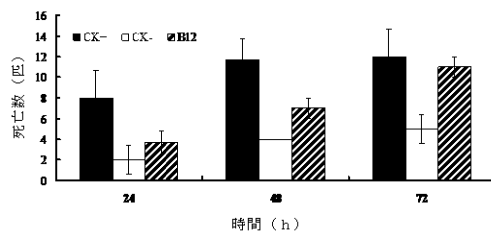
試験結果は図3、4に示した通りであり、図3は、それぞれB12、Cry1Ab毒素（CK+）、「β」タイプ以外のAnti-Id ScFvs（CK-）で浸したイネの葉を与えた後のコブノメイガ三齢幼虫の死亡状況であり、図4は、それぞれB12、Cry1Ab毒素（CK+）、「β」タイプ以外のAnti-Id ScFvs（CK-）で浸したキャベツを与えた後のコナガ三齢幼虫の死亡状況であり、B12が比較的優れた殺虫効果を有することがわかる。

10

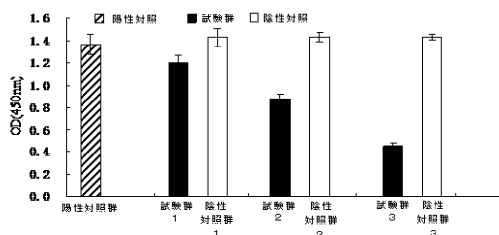
【図1】



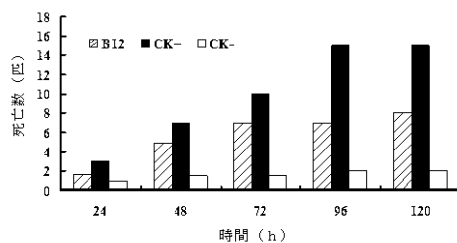
【図3】



【図2】



【図4】



【配列表】

0006236531000001.xml

フロントページの続き

- (74)代理人 100169904
弁理士 村井 康司
- (74)代理人 100117422
弁理士 堀川 かおり
- (72)発明者 ▲劉▼▲賢▼金
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 徐重新
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 ▲張▼霄
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 ▲劉▼媛
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 ▲謝▼雅晶
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 ▲張▼存政
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 余向▲陽▼
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所
- (72)発明者 王冬▲蘭▼
中国江▲蘇▼省南京市玄武区▲鐘▼▲靈▼街50号江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院食品▲質▼量安全与▲檢▼▲測▼研究所

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 中国特許出願公開第102936598 (CN, A)
Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, Vol.81, p.84-90
Toxicol, 2012, Vol.60, p.1290-1297

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
C07K 16/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq