

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-536097

(P2017-536097A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 15/113 (2010.01)
C 12 N 1/15 (2006.01)
C 12 N 1/19 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 N 15/00
C 12 N 1/15
C 12 N 1/19
C 12 N 1/21

Z N A A
G

テーマコード(参考)

2 B 0 3 0
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-519275 (P2017-519275)
(86) (22) 出願日 平成27年10月7日 (2015.10.7)
(85) 翻訳文提出日 平成29年6月9日 (2017.6.9)
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/054472
(87) 國際公開番号 WO2016/060912
(87) 國際公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)
(31) 優先権主張番号 62/063,199
(32) 優先日 平成26年10月13日 (2014.10.13)
(33) 優先権主張国 米国(US)

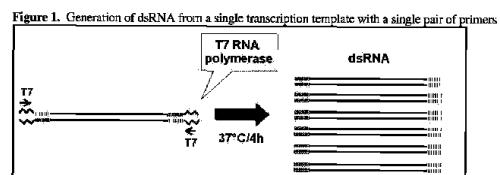
(71) 出願人 501035309
ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
ー
アメリカ合衆国 インディアナ州 462
68, インディアナポリス, ジオナス
ヴィレ ロード, 9330
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100095360
弁理士 片山 英二
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100126354
弁理士 藤田 尚

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鞘翅目および半翅目害虫に対する抵抗性を付与するCOP1コートマーアルファサブユニット核酸分子

(57) 【要約】

本開示は、鞘翅目および/または半翅目害虫を含む、害虫における標的コードおよび転写非コード配列のRNA干渉媒介阻害による害虫の防除のための核酸分子およびその使用の方法に関する。本開示はまた、害虫の防除に有用な核酸分子を発現するトランスジェニック植物を作製する方法ならびにそれにより得られる植物細胞および植物に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異種プロモーターに作動可能に連結した少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む単離核酸であって、前記ポリヌクレオチドは、

配列番号 1 ; 配列番号 1 の相補体 ; 配列番号 1 の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片 ; 配列番号 1 の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片の相補体 ; 配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然コード配列 ; 配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然コード配列の相補体 ; 配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片 ; 配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片の相補体 ; ならびに

配列番号 84 ; 配列番号 84 の相補体 ; 配列番号 84 の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片 ; 配列番号 84 の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片の相補体 ; 配列番号 84 を含むエウスキスツス属 (*Euschistus*) 生物の天然コード配列 ; 配列番号 84 を含むエウスキスツス属 (*Euschistus*) 生物の天然コード配列の相補体 ; 配列番号 84 を含むエウスキスツス属 (*Euschistus*) 生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片 ; 配列番号 84 を含むエウスキスツス属 (*Euschistus*) 生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連續したヌクレオチドの断片の相補体
からなる群から選択される、核酸。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 11 、配列番号 12 、配列番号 72 、配列番号 73 、配列番号 74 、配列番号 75 、配列番号 84 、配列番号 86 、配列番号 87 および前述のもののいずれかの相補体からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む植物形質転換ベクター。

【請求項 4】

前記生物が *D. v. ヴィルギフェラ* (*D. v. virgifera*) ルコント ; *D. バルベリ* (*D. barberi*) スミスおよびローレンス ; *D. u. ホワルディ* (*D. u. howardi*) ; *D. v. ゼアエ* (*D. v. zeae*) ; *D. バルテアタ* (*D. balteata*) ルコント ; *D. u. テネラ* (*D. u. tenella*) ; *D. スペシオーサ* (*D. speciosa*) ジャーマー ; *D. u. ウンデシムブンクタータ* (*D. u. undecimpunctata*) マンネルヘイム ; エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*) (F a b r .) (ネオトロピカルブラウンスティングバグ) 、ネザラ・ビリデュラ (*Nezara viridula*) (L .) (ミナミアオカメムシ) 、ピエゾドルス・ゲイルディニイ (*Piezodorus guildinii*) (ウェストウッド) (レッドバンディッドスティングバグ) 、ハリオモルファ・ハリス (*Halyomorpha halys*) (S t a l) (クサギカメムシ) ; チナビア・ヒラレ (*Chinavia hilare*) (セイ) (グリーンスティングバグ) ; エウスキスツス・セルブス (*Euschistus servus*) (セイ) (ブラウンスティングバグ) 、ディケロブス・メラカンツス (*Dichelops melacanthus*) (ダラス) 、ディケロブス・フルカツス (*Dichelops furcatus*) (F .) 、エデッサ・メジタブンダ (*Edessa meditabunda*) (F .) 、チアンタ・ペルジトル (*Thyanta perditor*) (F .) (ネオトロピカルレッドショルダードスティングバグ) 、チナビア・マルギナツム (*Chinavia marginatum*) (パリソ・ド・ボーヴォワ) 、ホルシアス・ノビレルス (*Horcius nobilellus*) (ベルク) (コットンバグ) 、テディア・スチグモサ (*Taedea stigmosa*) (ベルク) 、ホシカメムシ (*Psdercus peruvianus*) (ゲラン - メヌヴィル) 、ネオメガロトムス・パルブス (*Neomega lotomus parvus*) (ウェストウッド) 、レプトグロスス・ゾナツス (*Leptoglossus zonatus*) (ダラス) 、ニエストレア・シダエ (*Niesthrea sidae*) (F .) 、カスミカメムシ (*Lygus hesperus*) (ナイト) (ウェスタンターニッシュドプラントバグ) およびサビヨメクラガメ (*Lygus lineolaris*) (パリソ・ド・ボーヴォワ) からなる群から選択され

10

20

30

40

50

る、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドから転写されるリボ核酸（RNA）分子。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現から產生される二本鎖リボ核酸分子。

【請求項 7】

ポリヌクレオチド配列を鞘翅目または半翅目害虫と接触させることが、前記ポリヌクレオチドと特異的に相補的な内因性ヌクレオチド配列の発現を阻害する、請求項 6 に記載の二本鎖リボ核酸分子。

【請求項 8】

リボヌクレオチド分子を鞘翅目または半翅目害虫と接触させることが、前記害虫を殺すまたはその成長および／もしくは摂食を阻害する、請求項 7 に記載の二本鎖リボ核酸分子。

【請求項 9】

第 1、第 2 および第 3 の RNA セグメントを含み、

前記第 1 の RNA セグメントが前記ポリヌクレオチドを含み、

前記第 3 の RNA セグメントが、第 2 のポリヌクレオチド配列により前記第 1 の RNA セグメントに連結されており、

前記第 1 および前記第 3 の RNA セグメントがリボ核酸に転写されたときにハイブリダイズして二本鎖 RNA を形成するように、前記第 3 の RNA セグメントが実質的に前記第 1 の RNA セグメントの逆相補体である、請求項 6 に記載の二本鎖 RNA。

【請求項 10】

長さが約 15 ~ 約 30 ヌクレオチドの二本鎖リボ核酸分子および一本鎖リボ核酸分子からなる群から選択される、請求項 5 に記載の RNA。

【請求項 11】

異種プロモーターが、植物細胞中で機能的である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む植物形質転換ベクター。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項 13】

原核細胞である、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

真核細胞である、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 15】

植物細胞である、請求項 14 に記載の細胞。

【請求項 16】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドで形質転換された植物。

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドを含む、請求項 16 に記載の植物の種子。

【請求項 18】

検出可能な量の前記ポリヌクレオチドを含む、請求項 16 に記載の植物から生産される商品生産物。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが前記植物において二本鎖リボ核酸分子として発現する、請求項 16 に記載の植物。

【請求項 20】

トウモロコシ、ダイズまたは綿細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 21】

トウモロコシ、ダイズまたは綿である、請求項 16 に記載の植物。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが前記植物においてリボ核酸分子として発現し、鞘翅目または半翅目害虫が前記植物の一部を摂取したとき、前記リボ核酸分子が、前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドと特異的に相補的である内因性ポリヌクレオチドの発現を阻害する、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 2 3】

内因性害虫遺伝子の発現を阻害する RNA 分子をコードする少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

前記追加のポリヌクレオチド（複数可）がそれぞれ植物細胞中で機能し得る異種プロモーターに作動可能に連結した、請求項 2 3 に記載のポリヌクレオチドを含む植物形質転換ベクター。

10

【請求項 2 5】

害虫集団を防除する方法であって、前記害虫内部の生物学的機能を阻害するために前記害虫との接触により機能するリボ核酸（RNA）分子を含む作用物質を用意することを含み、前記 RNA が配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチド；配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの相補体；配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの転写物；ならびに配列番号 1 および配列番号 8 4 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの転写物の相補体と特異的にハイブリダイズ可能である、方法。

20

【請求項 2 6】

前記作用物質が二本鎖 RNA 分子である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記害虫が鞘翅目または半翅目害虫である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

鞘翅目または半翅目害虫集団を防除する方法であって、

鞘翅目または半翅目害虫の宿主植物に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換植物細胞を供給することを含み、前記集団に属する鞘翅目または半翅目害虫との接触により前記鞘翅目または半翅目害虫内部の標的配列の発現を阻害するように機能し、前記ポリヌクレオチドを含まない同じ宿主植物種の植物における同じ害虫種と比較して、前記鞘翅目もしくは半翅目害虫または害虫集団の成長および / または生存の低減をもたらすリボ核酸分子を生成するように前記ポリヌクレオチドを発現させる、方法。

30

【請求項 2 9】

前記リボ核酸分子が二本鎖リボ核酸分子である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記鞘翅目または半翅目害虫集団が、前記形質転換植物細胞を欠いている同じ宿主植物種の宿主植物に寄生する同じ害虫種の集団と比較して減少する、請求項 2 8 に記載の方法。

40

【請求項 3 1】

前記リボ核酸分子が二本鎖リボ核酸分子である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記鞘翅目または半翅目害虫集団が、前記形質転換植物細胞を欠いている同じ種の宿主植物に寄生する鞘翅目または半翅目害虫集団と比較して減少する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

植物における害虫寄生を防除する方法であって、

配列番号 1 または配列番号 8 4 、

配列番号 1 または配列番号 8 4 の相補体、

50

配列番号 1 または配列番号 8 4 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片、
配列番号 1 または配列番号 8 4 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相
補体、

配列番号 1 または配列番号 8 4 の転写物、

配列番号 1 または配列番号 8 4 の転写物の相補体、

配列番号 1 または配列番号 8 4 の転写物の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの
断片、および

配列番号 1 または配列番号 8 4 の転写物の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの
断片の相補体

からなる群から選択されるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズ可能であるリボ核
酸 (RNA) を前記害虫の食餌に供給することを含む、方法。 10

【請求項 3 4】

前記食餌が前記ポリヌクレオチドを発現するように形質転換された植物細胞を含む、請
求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記特異的にハイブリダイズ可能な RNA が二本鎖 RNA 分子に含まれる、請求項 3 3
に記載の方法。

【請求項 3 6】

コーン作物の収量を向上する方法であって、
請求項 1 に記載の核酸をコーン植物に導入して、トランスジェニックコーン植物を產生す
ることと、

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドの発現を可能にするために前記コーン植物を栽培
することとを含み、前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドの発現が、鞘翅目および /
または半翅目害虫の発育または成長ならびに前記鞘翅目および / または半翅目害虫による
感染に起因する収量の損失を阻害する、方法。 20

【請求項 3 7】

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドの発現が、前記コーン植物の一部と接触した鞘
翅目および / または半翅目害虫における少なくとも第 1 の標的遺伝子を抑制する RNA 分
子を生成する、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

トランスジェニック植物細胞を產生する方法であって、
請求項 1 に記載の核酸を含むベクターで植物細胞を形質転換することと、
複数の形質転換植物細胞を含む植物細胞培養物の発育を可能にするのに十分な条件下で
前記形質転換植物細胞を培養することと、

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドをそのゲノムに組み込んだ形質転換植物細胞を
選択することと、

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドによりコードされるリボ核酸 (RNA) 分子の
発現について前記形質転換植物細胞をスクリーニングすることと、

前記 RNA を発現する植物細胞を選択することと
を含む、方法。 40

【請求項 3 9】

前記 RNA 分子が二本鎖 RNA 分子である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

鞘翅目および / または半翅目害虫抵抗性トランスジェニック植物を產生する方法であっ
て、

請求項 3 8 に記載の方法により產生された前記トランスジェニック植物細胞を用意する
ことと、

前記トランスジェニック植物細胞からトランスジェニック植物を再生させることとを含
み、前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドによりコードされる前記リボ核酸分子の発現
が、形質転換植物に接触する鞘翅目および / または半翅目害虫における標的遺伝子の発現 50

を調節するのに十分である、方法。

【請求項 4 1】

トランスジェニック植物細胞を產生する方法であって、
鞘翅目害虫から植物を保護する手段を含むベクターで植物細胞を形質転換することと、
複数の形質転換植物細胞を含む植物細胞培養物の発育を可能にするのに十分な条件下で前記形質転換植物細胞を培養することと、

植物に鞘翅目害虫抵抗性を与える手段をそのゲノムに組み込んだ形質転換植物細胞を選択することと、

鞘翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害するための手段の発現について前記形質転換植物細胞をスクリーニングすることと、

鞘翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害するための前記手段を発現する植物細胞を選択することと

を含む、方法。

【請求項 4 2】

鞘翅目害虫抵抗性トランスジェニック植物を產生する方法であって、

請求項 4 1 に記載の方法により產生された前記トランスジェニック植物細胞を用意することと、

前記トランスジェニック植物細胞からトランスジェニック植物を再生させることとを含み、鞘翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する前記手段の発現が、形質転換植物に接触する鞘翅目害虫における標的遺伝子の発現を調節するのに十分である、方法。

【請求項 4 3】

トランスジェニック植物細胞を產生する方法であって、

植物に半翅目害虫抵抗性を与える手段を含むベクターで植物細胞を形質転換することと、

複数の形質転換植物細胞を含む植物細胞培養物の発育を可能にするのに十分な条件下で前記形質転換植物細胞を培養することと、

植物に半翅目害虫抵抗性を与える前記手段をそのゲノムに組み込んだ形質転換植物細胞を選択することと、

半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害するための手段の発現について前記形質転換植物細胞をスクリーニングすることと、

半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害するための前記手段を発現する植物細胞を選択することと

を含む、方法。

【請求項 4 4】

半翅目害虫抵抗性トランスジェニック植物を產生する方法であって、

請求項 4 3 に記載の方法により產生された前記トランスジェニック植物細胞を用意することと、

前記トランスジェニック植物細胞からトランスジェニック植物を再生させることとを含み、半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する前記手段の発現が、形質転換植物に接触する半翅目害虫における標的遺伝子の発現を調節するのに十分である、方法。

【請求項 4 5】

バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属種またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属種に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 4 6】

B . チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*) に由来する前記ポリペプチドが Cry 1 B、Cry 1 I、Cry 2 A、Cry 3、Cry 7 A、Cry 8、Cry 9 D、Cry 14、Cry 18、Cry 22、Cry 23、Cry 34、Cry 35、Cry 36、Cry 37、Cry 43、Cry 55、Cyt 1 A および Cyt 2 C を含む群から選択される、請求項 4 5 に記載の核酸。

【請求項 4 7】

バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属種またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属種に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 4 8】

B. チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) に由来する前記ポリペプチドが Cry 1 B、Cry 1 I、Cry 2 A、Cry 3、Cry 7 A、Cry 8、Cry 9 D、Cry 1 4、Cry 1 8、Cry 2 2、Cry 2 3、Cry 3 4、Cry 3 5、Cry 3 6、Cry 3 7、Cry 4 3、Cry 5 5、Cyt 1 A および Cyt 2 C を含む群から選択される、請求項 4 7 に記載の細胞。

10

【請求項 4 9】

バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属種またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属種に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 6 に記載の植物。

【請求項 5 0】

B. チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) に由来する前記ポリペプチドが Cry 1 B、Cry 1 I、Cry 2 A、Cry 3、Cry 7 A、Cry 8、Cry 9 D、Cry 1 4、Cry 1 8、Cry 2 2、Cry 2 3、Cry 3 4、Cry 3 5、Cry 3 6、Cry 3 7、Cry 4 3、Cry 5 5、Cyt 1 A および Cyt 2 C を含む群から選択される、請求項 4 9 に記載の植物。

20

【請求項 5 1】

前記形質転換植物細胞がバチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属種またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属種に由来するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

B. チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) に由来する前記ポリペプチドが Cry 1 B、Cry 1 I、Cry 2 A、Cry 3、Cry 7 A、Cry 8、Cry 9 D、Cry 1 4、Cry 1 8、Cry 2 2、Cry 2 3、Cry 3 4、Cry 3 5、Cry 3 6、Cry 3 7、Cry 4 3、Cry 5 5、Cyt 1 A および Cyt 2 C を含む群から選択される、請求項 5 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****優先権主張**

本出願は、「鞘翅目および半翅目害虫に対する抵抗性を付与する COP1 コートマーアルファサブユニット核酸分子」について 2014 年 10 月 13 日に出願した米国仮特許出願番号第 62 / 063199 号の出願日の利益を主張するものである。

【0 0 0 2】**開示の分野**

本発明は、一般的に、害虫（例えば、鞘翅目害虫および半翅目害虫）により引き起こされる植物被害の遺伝子防除に関する。特定の実施形態において、本発明は、植物保護効果を得るための害虫の細胞における標的コードおよび非コードポリヌクレオチドの同定ならびに標的コードおよび非コードポリヌクレオチドの発現を転写後に抑制または阻害するための組換え DNA 技術の使用に関する。

40

【背景技術】**【0 0 0 3】****背景**

ウェスタンコーンルートワーム (WCR)、ディアプロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera virgifera*) ルコント (LeConte) は、北アメリカにおける最も破壊的なトウモロコシ根切り虫の種の 1 つであり、米国中西部のコーン栽培地

50

域において特に問題となっている。ノーザンコーンルートワーム (N C R) 、ディアプロティカ・バルベリ (*Diabrotica barberi*) スミスおよびローレンス (Smith and Lawrence) は、W C Rと同じ範囲の多くにおいてともに生息する密接に関連する種である。アメリカにおける重要な害虫であるディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 種の次のいくつかの他の関連亜種：メキシカンコーンルートワーム (M C R) 、D. ヴィルギフェラ・ゼアエ (*D. virgifera zaea*) クリサンおよびスミス (Krysan and Smith) ; サザンコーンルートワーム (S C R) 、D. ウンデシム punctata · ホワルディ (*D. undecimpunctata howardi*) バーバー (Barbar) ; D. バルテアタ (*D. balteata*) ルコント ; D. ウンデシム punctata · テネラ (*D. undecimpunctata tenella*) ; D. スペシオーサ (*D. speciosa*) ジャーマー；ならびに D. u. ウンデシム punctata (*D. u. undecimpunctata*) マンネルヘイム (Mannerheim) が存在する。米国農務省は、トウモロコシ根切り虫が 8 億ドルの収量低下および 2 億ドルの処理費用を含む 10 億ドルの収入減をもたらしていると推定している。
10

【0004】

W C R および N C R の両方は、夏に卵として土壤中に産み付けられる。該昆虫は、冬期に卵期に留まる。卵は、楕円形で、白く、長さが 0.004 インチ未満である。幼虫は、5 月後期または 6 月後期に孵化し、卵孵化の正確な時期は、温度差および場所により年ごとに異なる。新たに孵化した幼虫は、長さが 0.125 インチ未満の白色の虫である。孵化した時点に、幼虫は、コーンの根を常食とし始める。トウモロコシ根切り虫は、3 つの幼虫齢を経る。数週間の摂食の後、幼虫は、脱皮して蛹期に入る。それらは、土壤中で蛹化し、その後、7 月および 8 月に成虫として土壤から出てくる。根切り虫の成虫は、長さが約 0.25 インチである。
20

【0005】

トウモロコシ根切り虫の幼虫は、コーンおよび他のいくつかの草種を食して発育を完了する。スズメノテッポウを食して生育した幼虫は、後に出現し、コーンを食して生育した幼虫よりも成虫として小さい頭蓋サイズを有する (Ellsbury et al. (2005) Environ. Entomol. 34:627-634)。W C R 成虫は、コーンのひげ、花粉および露出した穂先の穀粒を常食とする。W C R 成虫がコーンの生殖組織が存在する前に出現する場合、それらは、葉組織を常食とし、それにより植物の成長を遅くし、さらに宿主植物を殺すこともあり得る。しかし、成虫は、得られるようになるとき、好ましいひげおよび花粉に速やかに移る。N C R 成虫もコーン植物体の生殖組織を常食とするが、対照的にめったにコーンの葉を常食としない。
30

【0006】

コーンにおける根切り虫被害の大部分は、幼虫による摂食によって引き起こされる。新たに孵化した根切り虫は、最初に微細なコーン根毛を常食とし、根端に潜り込む。幼虫がさらに成長すると、一次根を常食とし、それに潜り込む。トウモロコシ根切り虫が多数である場合、幼虫による摂食により、コーンの茎の基部に至るまでの根の切り取りがしばしばもたらされる。重度の根の傷害は、水および栄養素を植物体に輸送する根の能力を妨げ、植物体の成長を低下させ、穀物の生産の減少をもたらし、それにより、全収量をしばしば大幅に減少させる。重度の根の傷害は、収穫をより困難にし、収量をさらに減少させる、コーン植物体の倒伏もしばしばもたらす。さらに、成虫によるコーンの生殖組織の常食により、穂先のひげの切り取りがもたらされ得る。この「ひげのクリッピング」が花粉飛散時に十分に高度である場合、授粉が妨げられる可能性がある。
40

【0007】

トウモロコシ根切り虫の防除は、輪作、化学殺虫剤、生物農薬（例えば、胞子形成グラム陽性細菌、バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) (B t))、B t 毒素を発現するトランスジェニック植物、またはそれらの組合せにより試みることができる。輪作は、農地の使用に望まれない制限を設けるという著しい不利な状況に見舞われる。さらに、一部の根切り虫の種の産卵は、コーン以外の作物畑で起こり、あるいは長期の休眠期は、複数年にわたる卵の孵化をもたらし、それにより、コーンおよびダイズを用
50

いて実施される輪作の有効性が減ずることがあり得る。

【0008】

化学殺虫剤は、トウモロコシ根切り虫の防除を達成するための戦略に最も高度に依拠する。化学殺虫剤の使用は、不完全なトウモロコシ根切り虫防除戦略であるが、化学殺虫剤の費用が殺虫剤の使用にもかかわらず起こり得る根切り虫被害の費用に加えられる場合にトウモロコシ根切り虫により毎年米国で10億ドル以上が失われ得る。幼虫の高個体数、多雨および殺虫剤（複数可）の不適切な散布はすべて、不十分なトウモロコシ根切り虫防除をもたらし得る。さらに、殺虫剤の連用は、非標的種に対するそれらの多くの毒性による重大な環境への懸念を生じさせるだけでなく、殺虫剤抵抗性の根切り虫の系統を選び出すこととなり得る。

10

【0009】

カメムシおよび他の半翅目昆虫（異翅亜目）は、他の重要な農業害虫種群を構成する。世界的にカメムシの50以上の密接に関連した種が作物被害を引き起こすことが公知である。McPherson & McPherson (2000) *Stink bugs of economic importance in America north of Mexico* CRC Press. これらの昆虫は、トウモロコシ、ダイズ、果実、野菜および穀物を含む多数の重要な作物に存在する。

【0010】

カメムシは、成虫期に達する前に複数の若虫期を経る。卵から成虫に発育するまでの期間は、約30～40日である。若虫および成虫の両方が、それらが口外組織の消化および壊死をもたらす消化酵素も注入する軟組織からの液汁を常食とする。消化された植物性物質および栄養物がその後摂取される。植物維管束系からの水および栄養物の枯渇により、植物組織の損傷が生ずる。発育中の穀類および種子の損傷は、収量および発芽が著しく低減するため、最も重大である。温暖な気候で複数の世代が発生して、著しい昆虫の押寄せをもたらす。カメムシの現在の管理は、個々の畑ごとの殺虫剤処理に依拠している。したがって、進行中の作物の損失を最小限にするために、代替管理戦略が緊急に必要である。

20

【0011】

RNA干渉（RNAi）は、標的遺伝子配列のすべて、またはその十分なサイズの任意の一部に対して特異的である干渉RNA（iRNA）分子（例えば、二本鎖RNA（dsRNA）分子）がそれによりコードされるmRNAの分解をもたらす、内因性細胞経路を利用する方法である。近年、RNAiは、多くの種および実験系、例えば、エレガンス線虫、植物、昆虫胚および組織培養中細胞における遺伝子「ノックダウン」を実施するために用いられている。例えば、Fire et al. (1998) *Nature* 391:806-811; Martinez et al. (2002) *Cell* 110:563-574; McManus and Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737-747参照。

30

【0012】

RNAiは、DICE Rタンパク質複合体を含む内因性経路を経るmRNAの分解を伴う。DICE Rは、長いdsRNA分子を低分子干渉RNA（siRNA）と呼ばれる、約20ヌクレオチドの短い断片に切断する。siRNAは、パッセンジャー鎖およびガイド鎖の2つの一本鎖RNAに巻き戻される。パッセンジャー鎖は、分解され、ガイド鎖は、RNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）に取り込まれる。

40

【0013】

米国特許第7,612,194号明細書ならびに米国特許出願公開第2007/0050860号明細書、第2010/0192265号明細書および第2011/0154545号明細書は、*D. v. virgifera* ルコントの蛹から単離された9112発現配列タグ（EST）配列のライブラリーを開示している。米国特許第7,612,194号明細書および米国特許出願公開第2007/0050860号明細書において植物細胞におけるアンチセンスRNAの発現のためにそこに開示された*D. v. virgifera* 液胞型プロトンH⁺-ATPアーゼ（V-ATPアーゼ）のいくつかの特定の部分配列の1つと相補的である核酸分子をプロモーターに作動可能に連結することが示唆されている。米国特許出願公開第2010/0192265号

50

明細書は、植物細胞におけるアンチセンス RNA の発現のために未知および非開示機能の *D. v. ヴィルギフェラ* (*D. v. virgifera*) 遺伝子の特定の部分配列（部分配列は、エレガンス線虫 (*C. elegans*) における C 5 6 C 1 0 . 3 遺伝子産物と 58% 同一であると述べられている）と相補的である核酸分子にプロモーターを作動可能に連結することを示唆している。米国特許出願公開第 2011/0154545 号明細書は、植物細胞におけるアンチセンス RNA の発現のために *D. v. ヴィルギフェラ* (*D. v. virgifera*) コートマーベータサブユニット遺伝子の 2 つの特定の部分配列と相補的である核酸分子にプロモーターを作動可能に連結することを示唆している。さらに、米国特許第 7,943,819 号明細書は、*D. v. ヴィルギフェラ* (*D. v. virgifera*) ルコントの幼虫、蛹および切開中腸から単離された 906 の発現配列タグ (EST) のライブラリーを開示し、植物細胞における二本鎖 RNA の発現のために *D. v. ヴィルギフェラ* (*D. v. virgifera*) 負荷 (charged) 多胞体タンパク質 4 b 遺伝子の特定の部分配列と相補的である核酸分子にプロモーターを作動可能に連結することを示唆している。
10

【0014】

V-ATP アーゼのいくつかの特定の部分配列および未知の機能の遺伝子の特定の部分配列以外には、RNA 干渉のためにそれらに示されている 9 千を超える配列のいずれかの特定の配列を使用するさらなる示唆は、米国特許第 7,612,194 号明細書ならびに米国特許出願公開第 2007/0050860 号明細書、第 2010/0192265 号明細書および第 2011/0154545 号明細書に示されていない。さらに、米国特許第 7,612,194 号明細書ならびに米国特許出願公開第 2007/0050860 号明細書、第 2010/0192265 号明細書および第 2011/0154545 号明細書のいずれも、示された 9 千を超える配列のどのその他のものが dsRNA または siRNA として用いた場合に、トウモロコシ根切り虫の種において致死性、または別の面では有用でさえあるかについての指針を記載していない。米国特許第 7,943,819 号明細書は、負荷多胞体タンパク質 4 b 遺伝子の特定の部分配列以外には、RNA 干渉のためにそれに示されている 9 千を超える配列のいずれかの特定の配列を使用する示唆を記載していない。さらに、米国特許第 7,943,819 号明細書は、示された 9 千を超える配列のどのその他のものが dsRNA または siRNA として用いた場合に、トウモロコシ根切り虫の種において致死性、または別の面では有用でさえあるかについての指針を記載していない。米国特許出願公開第 2013/040173 号明細書および PCT 出願公開国際公開第 2013/169923 号パンフレットは、トウモロコシにおける RNA 干渉のためのディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) Snf7 遺伝子由来の配列の使用を記載している。(Bolognesi et al. (2012) PLOS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534 にも開示されている。)
20

【0015】

トウモロコシ根切り虫 DNA と相補的な配列（前述のような）の圧倒的大多数は、dsRNA または siRNA として用いた場合にトウモロコシ根切り虫の種からの植物保護効果をもたらさない。例えば、Baum et al. (2007), Natute Biotechnology 25:1322-1326 は、RNAi によりいくつかの WCR 遺伝子標的を阻害する効果を記載している。これらの著者らは、彼らが試験した 26 標的遺伝子のうちの 8 標的遺伝子が 520 ng/cm² を超える非常に高い iRNA (例えば、dsRNA) 濃度で実験的に有意な鞘翅目害虫の死亡率をもたらすことができなかったことを報告した。
30

【0016】

米国特許第 7,612,194 号明細書および米国特許出願公開第 2007/0050860 号明細書の著者らは、ウェスタンコーンルートワームを標的とするコーン植物における in planta RNAi の最初の報告を行った。Baum et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6. これらの著者らは、トランスジェニック RNAi トウモロコシを開発するための可能な標的遺伝子をスクリーニングする高処理式 in vivo 食餌 RNAi システムを記載している。290 の標的の最初の遺伝子プールのうち、14 のみが幼虫防除能を示した。最も有効な二本鎖 RNA (dsRNA) のうちの 1 つは、液胞 AT
40

50

50

50

50

50

PアーゼサブユニットA（V-ATPアーゼ）をコードする遺伝子を標的とし、対応する内因性mRNAの速やかな抑制をもたらし、低濃度のdsRNAによる特異的RNAi反応を誘発した。このように、これらの著者らは、可能な害虫管理ツールとしてのin planta RNAiの可能性を最初に記録し、さらに候補遺伝子の比較的に小さい組からでさえも有効な標的を先駆的に正確に特定することができないことを同時に示した。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

開示

本明細書に開示するのは、核酸分子（例えば、標的遺伝子、DNA、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA）、ならびに例えば、D.v.ヴィルギフェラ（*D. v. virgifera*）ルコント（ウェスタンコーンルートワーム、「WCR」）；D.バルベリ（*D. barberi*）スミスおよびローレンス（ノーザンコーンルートワーム、「NCR」）；D.u.ホワルディ（*D. u. howardi*）バーバー（サザンコーンルートワーム、「SCR」）；D.v.ゼアエ（*D. v. zeae*）クリサンおよびスミス（メキシカンコーンルートワーム、「MCR」）；D.バルテアタ（*D. balteata*）ルコント；D.u.テネラ（*D. u. tenella*）；D.スペシオーサ（*D. speciosa*）ジャーマー；D.u.ウンデシム punctata（*D. u. undecimpunctata*）マンネルヘイム等の鞘翅目害虫、ならびにエウスキスツス・ヘロス（*Euschistus heros*）（Fabr.）（ネオトロピカルブラウンスティンクバグ、「BSB」）、E.セルブス（*E. servus*）（セイ）（ブラウンスティンクバグ）；ネザラ・ビリデュラ（*Nezara viridula*）（L.）（ミナミアオカメムシ）、ピエゾドルス・グイルディニイ（*Piezodorus guildinii*）（ウェストウッド）（レッドバンディッドスティンクバグ）、ハリオモルファ・ハリス（*Halyomorpha halys*）（Stal）（クサギカメムシ）；チナビア・ヒラレ（*Chinavia hilare*）（セイ）（グリーンスティンクバグ）；C.マルギナツム（*C. marginatum*）（パリソ・ド・ボーヴォワ）；ディケロブス・メラカンツス（*Dichelops melacanthus*）（ダラス）；D.フルカツス（*D. furcatus*）（F.）；エデッサ・メジタブンダ（*Edessa meditabunda*）（F.）；チアンタ・ペルジトル（*Thyanta perditor*）（F.）（ネオトロピカルレッドショルダードスティンクバグ）；ホルシアス・ノビレルス（*Horcius nobilellus*）（ベルク）（コットンバグ）；テディア・スチグモサ（*Taedia stigmosa*）（ベルク）；ホシカメムシ（*Dysdercus peruvianus*）（ゲラン-メヌヴィル）；ネオメガロトムス・パルブス（*Neomega lotomus parvus*）（ウェストウッド）；レプトグロスス・ゾナツス（*Leptoglossus zonatus*）（ダラス）；ニエストレア・シダエ（*Niesthrea sidiae*）（F.）；カスミカメムシ（*Lygus hesperus*）（ナイト）（ウェスタンターニッシュドプラントバグ）およびサビイロメクラガメ（*L. lineolaris*）（パリソ・ド・ボーヴォワ）等の半翅目害虫を含む、害虫の防除のためのそれらの使用の方法である。特定の例において、害虫における1つまたは複数の天然核酸の少なくとも一部と相同意で得る例示的な核酸分子を開示する。

【0018】

これらおよびさらなる例において、天然核酸は、標的遺伝子である可能性があり、その産物は、例えればかつ制限なしに、代謝プロセスまたは幼虫／若虫の発育に関与することがあり得る。いくつかの例において、それと相同意的なポリヌクレオチドを含む核酸分子による標的遺伝子の発現の翻訳後阻害は、鞘翅目および／または半翅目害虫において致死性である、あるいはその成長および／または発育の低減をもたらすことがあり得る。特定の例において、外被タンパク質複合体アルファサブユニットからなる遺伝子（本明細書でCOP1alphaサブユニットおよびCOP1alphaと呼ぶ）は、転写後サイレンシングのための標的遺伝子として選択することができる。特定の例において、転写後阻害に有用な標的遺伝子は、本明細書でCOP1alphaと呼ぶ新たな遺伝子である。したがって、COP1alphaのヌクレオチド配列（配列番号1および配列番号84）を含む単離核酸分子、COP1alpha（配列番号1および配列番号84）の相補体および前述のもののいずれかの断片を本明細書で開示する。

10

20

30

40

50

【0019】

標的遺伝子産物（例えば、COP1 ALPHΑと呼ばれる遺伝子の産物）内のアミノ酸配列と少なくとも約85%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子も開示する。例えば、核酸分子は、配列番号2または配列番号85(COP1 ALPHΑタンパク質)と少なくとも85%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。特定の例において、核酸分子は、COP1 ALPHΑの産物内のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。標的遺伝子産物内のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの逆相補体であるポリヌクレオチドを含む核酸分子をさらに開示する。

10

【0020】

鞘翅目および/または半翅目害虫標的遺伝子、例えば、COP1 alphaのすべてまたは一部と相補的であるiRNA（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA）分子の产生に用いることができるcDNAポリヌクレオチドも開示する。特定の実施形態では、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよび/またはhpRNAは、植物または細菌等の遺伝子操作生物によりin vitroまたはin vivoで产生され得る。特定の例において、COP1 alpha（配列番号1および配列番号84）のすべてまたは一部と相補的であるiRNA分子を产生させるために用いることができるcDNA分子を開示する。

20

【0021】

鞘翅目および/または半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する手段、ならびに植物に鞘翅目および/または半翅目害虫抵抗性を与える手段をさらに開示する。鞘翅目および/または半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する手段は、配列番号3(COP1 alpha region 1、本明細書で時にはCOP1 alpha reg 1と呼ぶ)または配列番号4(COP1 alpha region 2、本明細書で時にはCOP1 alpha reg 2と呼ぶ)または配列番号72(COP1 alpha version 1、本明細書で時にはCOP1 alpha ver 1と呼ぶ)または配列番号73(COP1 alpha version 2、本明細書で時にはCOP1 alpha ver 2と呼ぶ)または配列番号74(COP1 alpha version 3、本明細書で時にはCOP1 alpha ver 3と呼ぶ)または配列番号75(COP1 alpha version 4、本明細書で時にはCOP1 alpha ver 4と呼ぶ)または配列番号86(エウスキスツス・ヘロス(Euschistus heros)COP1 alpha region 1、本明細書で時にはBSS_COP1 alpha -1と呼ぶ)または配列番号87(エウスキスツス・ヘロス(Euschistus heros)COP1 alpha region 2、本明細書で時にはBSS_COP1 alpha -2と呼ぶ)またはその相補体の少なくとも1つからなる一本または二本鎖RNA分子である。鞘翅目および/または半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する手段の機能的等価物は、配列番号1または配列番号84を含むWCRまたはBSS遺伝子のすべてまたは一部と実質的に相同である一本または二本鎖RNA分子を含む。植物に鞘翅目および/または半翅目害虫抵抗性を与える手段は、プロモーターに作動可能に連結した鞘翅目および/または半翅目害虫における必須遺伝子の発現を阻害する手段をコードする核酸配列を含むDNA分子であり、該DNA分子は、トウモロコシ植物体のゲノムに組み込まれることができる。

30

【0022】

開示するのは、害虫内部の生物学的機能を阻害するために害虫により取り込まれるときに機能するiRNA（例えば、dsRNA、siRNA、shRNA、miRNAおよびhpRNA）分子を害虫（例えば、鞘翅目または半翅目害虫）に与えることを含む、害虫（例えば、鞘翅目または半翅目害虫）の集団を防除する方法であり、ここで、iRNA分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87；配列番号1、配列

40

50

番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87の相補体；配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87のいずれかのすべてまたは一部を含むディアプロティカ属(*Diabrotica*)生物(例えば、WCR)または半翅目生物(例えば、BSB)の天然コード配列；配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87のいずれかのすべてまたは一部を含むディアプロティカ属(*Diabrotica*)または半翅目生物の天然コード配列の相補体；配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87のいずれかのすべてまたは一部を含む天然RNA分子に転写されるディアプロティカ属(*Diabrotica*)または半翅目生物の天然非コード配列；ならびに配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号84、配列番号86および配列番号87のいずれかのすべてまたは一部を含む天然RNA分子に転写されるディアプロティカ属(*Diabrotica*)または半翅目生物の天然非コード配列の相補体からなる群から選択されるヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含む。

【0023】

d s RNA、s i RNA、m i RNA、s h RNAおよび/またはh p RNAを、d s RNA、s i RNA、m i RNA、s h RNAおよび/またはh p RNAを発現する飼料ベースのアッセイまたは複数の遺伝子組換え植物細胞における鞘翅目および/または半翅目害虫に与えることができる方法も本明細書に開示する。これらおよびさらなる例において、d s RNA、s i RNA、m i RNA、s h RNAおよび/またはh p RNAは、鞘翅目の幼虫および/または半翅目害虫の若虫により摂取させることができる。本発明のd s RNA、s i RNA、m i RNA、s h RNAおよび/またはh p RNAの摂取は、幼虫/若虫におけるRNAiをもたらす可能性があり、これがひいては鞘翅目および/または半翅目害虫の生存能力に必須な遺伝子のサイレンシングをもたらし、最終的に幼虫/若虫の死につながる可能性がある。したがって、鞘翅目および/または半翅目害虫の防除に有用な例示的な核酸配列(複数可)を含む核酸分子を鞘翅目および/または半翅目害虫に与える方法を開示する。特定の例において、本発明の核酸分子の使用により防除される鞘翅目および/または半翅目害虫は、WCR、NCR、SCR、MCR、D.バルテアタ(*D. balteata*)、D.u.テネラ(*D. u. tenella*)、D.スペシオーサ(*D. speciosa*)、D.u.ウンデシム punctata(*D. u. undecimpunctata*)、エウスキスツス・ヘロス(*Euschistus heros*)、E.セルブス(*E. servus*)、ピエゾドルス・グイルディニイ(*Piezodorus guildinii*)、ハリオモルファ・ハリス(*Halyomorpha halys*)、ネザラ・ビリデュラ(*Nezara viridula*)、チナビア・ヒラレ(*Chinavia hilare*)、C.マルギナツム(*C. marginatum*)、ディケロプス・メラカンツス(*Dichelops melacanthus*)、D.フルカツス(*D. furcatus*)、エデッサ・メジタブンダ(*Edessa meditabunda*)、チアンタ・ペルジトル(*Thyanta perditor*)、ホルシアス・ノビレルス(*Horcius nobilellus*)、テディア・スチグモサ(*Taedea stigmosa*)、ホシカメムシ(*Dysdercus peruvianus*)、ネオメガロトムス・パルブス(*Neomegalotomus parvus*)、レプトグロスス・ゾナツス(*Leptoglossus zonatus*)、ニエストレア・シダエ(*Niesthrea sidae*)および/またはカスミカメムシ(*Lygus hesperus*)であり得る。

【0024】

前述および他の特徴は、添付図面に準拠して進められる、いくつかの実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】プライマーの単一の対を用いて単一の転写録型からd s RNAを生成するために用いた戦略の描写を含む図である。

【図2】2つの転写録型からd s RNAを生成するために用いた戦略の描写を含む図であ

10

20

30

40

50

る。

【発明を実施するための形態】

【0026】

配列一覧表

添付の配列一覧表に列挙した核酸配列を 37 C . F . R . § 1 . 822 に規定の通りにヌクレオチド塩基の標準的文字略記を用いて示す。列挙した核酸およびアミノ酸配列は、記述されたように配列したヌクレオチドおよびアミノ酸モノマーを有する分子（すなわち、それぞれポリヌクレオチドおよびポリペプチド）を定義する。列挙した核酸およびアミノ酸配列は、記述されたように配列したヌクレオチドおよびアミノ酸モノマーを含むポリヌクレオチドまたはポリペプチドの属もそれぞれ定義する。遺伝コードの重複性を考慮すると、コード配列を含むヌクレオチド配列も、参照配列からなるポリヌクレオチドと同じポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの属を記述することが理解される。アミノ酸配列は、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ORF の属を記述することがさらに理解される。

【0027】

各核酸配列の 1 つの鎖のみを示すが、相補鎖は、表示鎖の記載により含められるものと理解される。一次核酸配列の相補体および逆相補体は、一次配列によって必然的に開示されるので、核酸配列の相補的配列および逆相補的配列は、他の状態であることが明確に述べられない限り（または配列が出現する文脈から他の状態であることが明らかでない限り）、該核酸配列の任意の参照により含められる。さらに、RNA 鎖のヌクレオチド配列は、それが転写された DNA の配列によって決定される（チミン（T）に対するウラシル（U）核酸塩基の置換を別にすれば）ことは、当技術分野で理解されているので、RNA 配列は、それをコードする DNA 配列への参照により含められる。添付の配列一覧表において、

配列番号 1 は、ディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する COP I alpha サブユニットを含む DNA 配列を示す。

配列番号 2 は、ディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する COP I alpha タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 は、in vitro での ds RNA 合成（5' および 3' 末端における T7 プロモーター配列は示さず）に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する COP I alpha reg 1 (region 1) の DNA 配列を示す。

配列番号 4 は、in vitro での ds RNA 合成（5' および 3' 末端における T7 プロモーター配列は示さず）に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する COP I alpha reg 2 (region 2) の DNA 配列を示す。

配列番号 5 は、T7 ファージプロモーターの DNA 配列を示す。

配列番号 6 は、in vitro での ds RNA 合成（5' および 3' 末端における T7 プロモーター配列は示さず）に用いた YFP コード領域セグメントの DNA 配列を示す。

配列番号 7 ~ 10 は、COP I alpha reg 1 および COP I alpha reg 2 を含む COP I alpha サブユニット配列の一部を増幅するために用いたプライマーを示す。

配列番号 11 は、pDAB117217 に見いだされるディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する COP I alpha ヘアピン v3 - RNA 形成配列を示す。大文字で表示した塩基は、COP I alpha センス鎖であり、下線を引いた小文字で表示した塩基は、ST - LS1 イントロンを含み、下線を引いていない小文字で表示した塩基は、COP I alpha アンチセンス鎖である。

【0028】

10

20

30

40

【化 1】

AGGTGTAAACTGGGCATCTTCCATCCAACCTGCCTCTATTGCCTGGTGCTGATG
ACAGACAAAGTAAAATTATGGAGAATGAATGATTCTAAAGCATGGGAAGgactagtaccggtt
ggaaaggatgttctgttccatgtatataattactaattactaatttagtaatagtagttcaagttttcaaaaataaaagaatgtat
tatatactattgtttctgttgttatataacttgttatatttaattataactttctaataatatgacccaaacatgtgtatgtcagggttgcacccgcgtta
cttcccatgtttagaatcattcattccataatttacttgtctgtcatcagcaccagaggcataagaggcagagttggatggaaagatgcccagtttacaccc

配列番号 12 は、*p D A B 1 1 7 2 1 8* に見いだされるディアプロティカ・ヴィルギフェラ (*Diabrotica virgifera*) に由来する C O P I a l p h a ヘアピン v 4 - R N A 形成配列を示す。大文字で表示した塩基は、C O P I a l p h a センス鎖であり、下線を引いた小文字で表示した塩基は、S T - L S 1 イントロンを含み、下線を引いていない小文字で表示した塩基は、C O P I a l p h a アンチセンス鎖である。

[0 0 2 9]

【化 2】

TTTATTCCATCCTAGACAGGAACTGATTCTCTAAACAGTGAAGATAAAACTATTAGA
GTTTGGGATACAACAAAGAACCTGCCTACATACATTAAAAGGGAAAATGgactgtac
cgggttggaaaggtatgtttctgtttccatgttatataattatcaactaatttagtaatatagtattcaagtatttttcaaataaaaaga
atgtatataactattgtttctgttagttataagtgtgtatatttaattataactttctaataatatgaccaaaacatgtgtatgtgcaggttgatccg
cgggttacatttcccttaatgtatgttaggcaagtcttttagtgtatcccactctaatagtttatcttactgttgagagaatcagttccgtcttag
gatgaaataaa

配列番号 13 は、 p D A B 1 1 0 8 5 3 に見いだされる Y F P ヘアピン RNA 形成配列 v 2 を示す。大文字で表示した塩基は、 Y F P センス鎖であり、下線を引いた塩基は、 S T - L S 1 イントロンを含み、小文字で表示した下線を引いていない塩基は、 Y F P アンチセンス鎖である。

[0 0 3 0]

【化 3】

配列番号 14 は、ST-LS1 イントロンを含む配列を示す。

配列番号 15 は、 p D A B 1 0 1 5 5 6 に見いだされる Y F P タンパク質コード配列を示す。

配列番号16は、Annexin region 1のDNA配列を示す。

配列番号17は、Annexin region 2のDNA配列を示す。

配列番号18は、Beta spectrin 2 region 1のDNA配列を示す。

配列番号 19 は、 Beta spectrin 2 region 2 の DNA 配列を示す。

配列番号20は mtRP-14 region 1のDNA配列を示す。

配列番号20は、mt R P - 14 region の DNA 配列を示す。

配列番号 2 2 ~ 4 9 は dsRNA 合成のための YF-444A Annexin Beta

s p e c t r i n 2 および m t R P - L 4 の遺伝子領域を増幅するために用いたプライマーを示す。

配列番号 5 0 は、 T I P 4 1 様タンパク質をコードするトウモロコシ D N A 配列を示す。

配列番号 5 1 は、オリゴヌクレオチド T 2 0 N V の D N A 配列を示す。

配列番号 5 2 ~ 5 6 は、トウモロコシ転写物レベルを測定するために用いたプライマーおよびプローブの配列を示す。

配列番号 5 7 は、バイナリーベクター主鎖検出に用いた S p e c R コード領域の一部の D N A 配列を示す。

配列番号 5 8 は、ゲノムコピー数解析に用いた A A D I コード領域の一部の D N A 配列を示す。 10

配列番号 5 9 は、トウモロコシンベルターゼ遺伝子の D N A 配列を示す。

配列番号 6 0 ~ 6 8 は、遺伝子コピー数解析に用いたプライマーおよびプローブの配列を示す。

配列番号 6 9 ~ 7 1 は、トウモロコシ発現解析に用いたプライマーおよびプローブの配列を示す。

配列番号 7 2 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera) に由来する C O P I a l p h a v e r 1 (v e r s i o n 1) の D N A 配列を示す。 20

配列番号 7 3 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera) に由来する C O P I a l p h a v e r 2 (v e r s i o n 2) の D N A 配列を示す。

配列番号 7 4 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera) に由来する C O P I a l p h a v e r 3 (v e r s i o n 3) の D N A 配列を示す。

配列番号 7 5 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたディアプロティカ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera) に由来する C O P I a l p h a v e r 4 (v e r s i o n 4) の D N A 配列を示す。 30

配列番号 7 6 ~ 8 3 は、 C O P I a l p h a v e r 1 、 C O P I a l p h a v e r 2 、 C O P I a l p h a v e r 3 および C O P I a l p h a v e r 4 を含むディアプロティカ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera) C O P I a l p h a 配列の一部を増幅するために用いたプライマーを示す。

配列番号 8 4 は、ネオトロピカルブラウンスティングバグ (エウスキスツス・ヘロス (Euschistus heros)) に由来する B S B C O P I a l p h a 転写物の例示的な D N A 配列を示す。

配列番号 8 5 は、エウスキスツス・ヘロス (Euschistus heros) C O P I A L P H A タンパク質のアミノ酸配列を示す。 40

配列番号 8 6 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたエウスキスツス・ヘロス (Euschistus heros) に由来する B S B _ C O P I a l p h a - 1 の D N A 配列を示す。

配列番号 8 7 は、 i n v i t r o での d s R N A 合成 (5 ' および 3 ' 末端における T 7 プロモーター配列は示さず) に用いたエウスキスツス・ヘロス (Euschistus heros) に由来する B S B _ C O P I a l p h a - 2 の D N A 配列を示す。

配列番号 8 8 ~ 9 1 は、 B S B _ C O P I a l p h a - 1 および B S B _ C O P I a l p h a - 2 を含むエウスキスツス・ヘロス (Euschistus heros) C O P I a l p h a 配列の一部を増幅するために用いたプライマーを示す。 50

配列番号 9 2 は、 Y F P 標的 d s R N A : Y F P v 2 のセンス鎖である。

配列番号 9 3 ~ 9 4 は、 Y F P 標的 d s R N A : Y F P v 2 の一部を増幅するために用いたプライマーを示す。

配列番号 9 5 は、 Y F P ヘアピン配列 (Y F P v 2 - 1) を示す。大文字で表示した塩基は、 Y F P センス鎖であり、下線を引いた小文字で表示した塩基は、 R T M 1 イントロンを含み、下線を引いていない小文字で表示した塩基は、 Y F P アンチセンス鎖である。

【 0 0 3 1 】

【 化 4 】

ATGTCATCTGGAGCACTTCTCTTCATGGGAAGATTCTACGTGTGGAGATGGAAG
GGAATGTTGATGCCACACCTTAGCATACGTGGAAAGGCTACGGAGATGCCTCAG
TGGGAAAGtccggcaacatgttgacgttgtaagtctgattttgactcttttctccgtcacaatttctacttccaactaaa
atgctaagaacatgttataactttttataacttaatatgtgatttgaccaggcagatagacttcattacttcccactgaggcatctccgttagcct
ttcccacgtatctaagggtgtggccatcaacattccctccatctccacaacgtaaggaatctccatgaaagagaagtgtccagatgacat

10

【 0 0 3 2 】

詳細な説明

I . いくつかの実施形態の概要

害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）の寄生の遺伝子防除のための方法および組成物を本明細書に開示する。害虫集団の R N A i 媒介防除のための標的遺伝子として用いる害虫の生活環に必須の 1 つまたは複数の遺伝子（複数可）を同定する方法も提供する。R N A 分子をコード D N A プラスミドベクターは、成長、生存および／または発育に必須の 1 つまたは複数の標的遺伝子（複数可）を抑制するように設計することができる。いくつかの実施形態では、R N A 分子は、d s R N A 分子を形成することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、害虫における標的遺伝子のコードまたは非コード配列と相補的である核酸分子による標的遺伝子の発現の転写後抑制または阻害の方法を提供する。これらおよびさらなる実施形態では、害虫は、標的遺伝子のコードまたは非コード配列と相補的である核酸分子のすべてまたは一部から転写される 1 つまたは複数の d s R N A 、 s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A および／または h p R N A 分子を摂取し、それにより植物保護効果をもたらし得る。

20

30

【 0 0 3 3 】

したがって、いくつかの実施形態は、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）の少なくとも部分的な防除を達成するために標的遺伝子（複数可）のコードおよび／または非コード配列と相補的である i R N A （すなわち、 d s R N A 、 s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A および／または h p R N A ）を用いる、標的遺伝子産物の発現の配列特異的阻害を含む。例えば、配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 2 、配列番号 7 3 、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 8 4 、配列番号 8 6 、配列番号 8 7 およびこれらの断片のいずれかに示す、ポリヌクレオチドを含む一組の単離および精製核酸分子を開示する。いくつかの実施形態では、安定化 d s R N A 分子は、標的遺伝子の転写後サイレンシングまたは阻害のために、この配列、その断片、またはこれらの配列の 1 つを含む遺伝子から発現させることができる。特定の実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 1 のすべてまたは一部を含む。他の実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 3 のすべてまたは一部を含む。他の実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 4 のすべてまたは一部を含む。またさらなる実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 7 2 のすべてまたは一部を含む。他の実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 7 3 のすべてまたは一部を含む。さらに他の実施形態では、単離および精製核酸分子は、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 8 4 、配列番号 8 6 または配列番号 8 7 のすべてまたは一部を含む。

40

【 0 0 3 4 】

50

いくつかの実施形態は、少なくとも 1 つの i RNA (例えば、dsRNA) 分子 (複数可) をコードする少なくとも 1 つの組換え DNA をそのゲノムに有する組換え宿主細胞 (例えば、植物細胞) を含む。特定の実施形態では、dsRNA 分子 (複数可) は、害虫における標的遺伝子の発現を転写後に検出されなくするまたは阻害するために鞘翅目および / または半翅目害虫により摂取されたときに生成され得る。組換え DNA は、例えば、配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 2 、配列番号 7 3 、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 8 4 、配列番号 8 6 もしくは配列番号 8 7 のいずれか ; 配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 2 、配列番号 7 3 、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 8 4 、配列番号 8 6 もしくは配列番号 8 7 のいずれかの断片 ; または配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 2 、配列番号 7 3 、配列番号 7 4 、配列番号 7 5 、配列番号 8 4 、配列番号 8 6 もしくは配列番号 8 7 の 1 つもしくは複数のものを含む遺伝子の部分配列 ; またはそれらの相補体を含み得る。

10

【 0035 】

いくつかの実施形態は、配列番号 1 および / または配列番号 8 4 および / またはその相補体によってコードされる RNA のすべてまたは一部を含む少なくとも 1 つの i RNA (例えば、dsRNA) 分子 (複数可) をコードする組換え DNA をそのゲノムに有する組換え宿主細胞を含む。害虫 (例えば、鞘翅目および / または半翅目) によって摂取された場合、i RNA 分子 (複数可) は、鞘翅目および / または半翅目害虫における配列番号 1 および / または配列番号 8 4 を含む標的遺伝子の発現をサイレンシングまたは阻害し、それにより、鞘翅目および / または半翅目害虫における成長、発育および / または摂食の停止をもたらし得る。

20

【 0036 】

いくつかの実施形態では、dsRNA 分子を形成することができる少なくとも 1 つの RNA 分子をコードする少なくとも 1 つの組換え DNA をそのゲノムに有する組換え宿主細胞は、形質転換植物細胞であり得る。いくつかの実施形態は、そのような形質転換植物細胞を含むトランスジェニック植物を含む。そのようなトランスジェニック植物に加えて、トランスジェニック植物世代の子孫植物、トランスジェニック種子およびトランスジェニック植物産物をすべて提供し、それらのそれぞれが組換え DNA (複数可) を含む。特定の実施形態では、dsRNA 分子を形成することができる RNA 分子は、トランスジェニック植物細胞において発現させることができる。したがって、これらおよび他の実施形態では、dsRNA 分子は、トランスジェニック植物細胞から単離することができる。特定の実施形態では、トランスジェニック植物は、コーン (ゼア・マイス (Zea mays)) 、ダイズ (グリシン・マクス (Glycine max)) およびイネ科 (Poaceae) の植物からなる群から選択される植物である。

30

【 0037 】

いくつかの実施形態は、害虫 (例えば、鞘翅目および / または半翅目) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する方法を含む。これらおよび他の実施形態では、dsRNA 分子を形成することができる RNA 分子をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子を提供することができる。特定の実施形態では、dsRNA 分子を形成することができる RNA 分子をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結することができ、転写終結配列にも作動可能に連結することができる。特定の実施形態では、害虫細胞における標的遺伝子の発現を調節する方法は、(a) dsRNA 分子を形成することができる RNA 分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターにより植物細胞に形質転換を起こさせることと、(b) 複数の形質転換植物細胞を含む植物細胞培養物の発育を可能にするのに十分な条件下で形質転換植物細胞を培養することと、(c) ベクターをそのゲノムに組み込んだ形質転換植物細胞を選択することと、(d) 選択された形質転換植物細胞がベクターのポリヌクレオチドによりコードされた dsRNA 分子を形成することができる RNA 分子を含むことを判定することとを含み得る。植物は、そのゲノムに組み込まれたベクターを有し、ベクターのポリヌクレオチドによりコードされた dsRNA 分子を含む植物細胞から再生させることができる。

40

50

【0038】

したがって、そのゲノムに組み込まれた d s RNA 分子を形成することができる RNA 分子をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含むトランスジェニック植物であって、ベクターのポリヌクレオチドによりコードされた d s RNA 分子を含むトランスジェニック植物も開示する。特定の実施形態では、植物における d s RNA 分子を形成することができる RNA 分子の発現は、害虫の成長および／または生存が阻害されるように、形質転換植物または植物細胞と接触する（例えば、形質転換植物、植物の一部（例えば、根）または植物細胞を常食にすることにより）害虫（例えば、鞘翅目または半翅目）の細胞中の標的遺伝子の発現を調節するのに十分である。本明細書に開示するトランスジェニック植物は、害虫の寄生に対する抵抗性および／または耐性の増大を示し得る。特定のトランスジェニック植物は、WCR；NCR；SCR；MCR；D. バルテアタ (*D. balteata*) ルコント；D. u. テネラ (*D. u. tenella*)；D. スペシオーサ (*D. speciosa*) ジャーマー；D. u. ウンデシム punctata (*D. u. undecimpunctata*) マンネルヘイム；エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*)；ピエゾドルス・グイルディニイ (*Piezodorus guildinii*)；ハリオモルファ・ハリス (*Halyomorpha halys*)；ネザラ・ビリデュラ (*Nezara viridula*)；チナビア・ヒラレ (*Chinavia hilare*)；エウスキスツス・セルブス (*Euschistus servus*)；ディケロブス・メラカンツス (*Dichelops melacanthus*)；ディケロブス・フルカツス (*Dichelops furcatus*)；エデッサ・メジタブンダ (*Edessa meditabunda*)；チアンタ・ペルジトル (*Thyanta perditor*)；チナビア・マルギナツム (*Chinavia marginatum*)；ホルシアス・ノビレルス (*Horcius nobilellus*)；テディア・スチグモサ (*Taedea stigmosa*)；ホシカメムシ (*Dysdercus peruvianus*)；ネオメガロトムス・パルブス (*Neomegalotomus parvus*)；レプトグロスス・ゾナツス (*Leptoglossus zonatus*)；ニエストレア・シダエ (*Niesthrea sidae*)；カスミカメムシ (*Lygus hesperus*)；およびサビイロメクラガメ (*Lygus lineolaris*) からなる群から選択される 1 つまたは複数の鞘翅目および／または半翅目害虫（複数可）に対する抵抗性および／または保護の増大を示し得る。

10

20

30

【0039】

害虫（鞘翅目および／または半翅目）への i RNA 分子等の防除剤の送達の方法も本明細書に開示する。そのような防除剤は、宿主において摂食する、成長する、または別の方 30 法で被害を引き起こす害虫集団の能力の低下を直接的または間接的にもたらし得る。いくつかの実施形態では、害虫における少なくとも 1 つの標的遺伝子を抑制するための害虫への安定化 d s RNA 分子の送達と、それにより、RNA i を引き起こし、害虫宿主における植物被害を低減または排除することとを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、害虫における標的遺伝子の発現を阻害する方法は、害虫における成長、生存および／または発育の停止をもたらし得る。

30

【0040】

いくつかの実施形態では、害虫（鞘翅目および／または半翅目）の寄生の排除または低減を達成するために植物、動物および／または植物もしくは動物の環境に用いる i RNA (例えば、d s RNA) 分子を含む組成物（例えば、局所組成物）を提供する。特定の実施形態では、組成物は、害虫に食させる栄養組成物または食物源であり得る。いくつかの実施形態は、害虫が利用できる栄養組成物または食物源を作ることを含む。i RNA 分子を含む組成物の摂取は、害虫の 1 つまたは複数の細胞による該分子の取り込みをもたらし得、これがひいては害虫の細胞（複数可）における少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現の阻害をもたらし得る。害虫の寄生による植物または植物細胞の摂取または被害は、害虫の宿主に i RNA 分子を含む 1 つまたは複数の組成物を供給することにより、害虫が存在する宿主組織または環境中またはその上において制限または排除することができる。

40

【0041】

本明細書に開示する組成物および方法は、異なる標的（例えば、RAS Opposite または ROP）（米国特許出願公開第 20150176025 号明細書）および RNA APII (米国特許出願公開第 20150176009 号明細書) に向けられる他の i R

50

N A 分子と組み合わせて一緒に用いることができる。害虫、例えば、幼虫における複数の標的配列に作用する可能性は、有効性を増大させ、また i R N A 技術を含む害虫管理への持続可能なアプローチを改善し得る。本明細書に開示する組成物および方法は、害虫（鞘翅目および／または半翅目）による被害を防除するための他の方法および組成物とも組み合わせて一緒に用いることができる。例えば、害虫から植物を保護するための本明細書で述べる i R N A 分子は、害虫に対して有効な 1 つもしくは複数の化学物質、そのような害虫に対して有効な生物農薬、輪作、R N A i 媒介法およびR N A i 組成物（例えば、害虫に有害である植物におけるタンパク質（例えば、B t 毒素）の組換え産生）の特徴と異なる特徴を示す遺伝子組換え技術のさらなる使用を含む方法に用いることができる。

【0042】

10

I I . 略語

B S B ネオトロピカルブラウンスティングバグ（エウスキヌツス・ヘロス（*Euschemus heros*））

d s R N A 二本鎖リボ核酸

E S T 発現配列タグ

G I 成長阻害

N C B I 米国国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）

g D N A ゲノムD N A

i R N A 阻害リボ核酸

20

O R F オープンリーディングフレーム

R N A i リボ核酸干渉

m i R N A マイクロリボ核酸

s i R N A 低分子阻害リボ核酸

s h R N A 短ヘアピン型リボ核酸

h p R N A ヘアピンリボ核酸

U T R 非翻訳領域

W C R ウェスタンコーンルートワーム（ディアブロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ（*Diabrotica virgifera virgifera*）ルコント）

N C R ノーザンコーンルートワーム（ディアブロティカ・バルベリ（*Diabrotica barberi*）スミスおよびローレンス）

30

M C R メキシカンコーンルートワーム（ディアブロティカ・ヴィルギフェラ・ゼアエ（*Diabrotica virgifera zeae*）クリサンおよびスミス）

P C R ポリメラーゼ連鎖反応

q P C R 定量的ポリメラーゼ連鎖反応

R I S C R N A 誘導型サイレンシング複合体

S C R サザンコーンルートワーム（ディアブロティカ・ウンデシムブンクタータ・ホワルディ（*Diabrotica undecimpunctata howardi*）バーバー）

S E M 平均値の標準誤差

Y E P 黄色蛍光タンパク質

40

【0043】

I I I . 用語

続く説明および表において、多くの用語が用いられている。そのような用語に与えるべき範囲を含む、明細書および特許請求の範囲の明確で、一貫した理解を可能にするために、以下の定義を記載する。

【0044】

鞘翅目害虫： 本明細書で用いているように、「鞘翅目害虫」という用語は、コーンおよび他のイネ科植物を含む、農作物および農産物を常食とする、ディアブロティカ属（*Diabrotica*）の害虫を含む、鞘翅目（*Coleoptera*）の昆虫を意味する。特定の例において、鞘翅目害虫は、D . v . ヴィルギフェラ（*D. v. virgifera*）ルコント（W C R ）；D .

50

バルベリ (*D. barberi*) スミスおよびローレンス (N C R) ; D . u . ホワルディ (*D. u . howardi*) (S C R) ; D . v . ゼアエ (*D. v. zeae*) (M C R) ; D . バルテアタ (*D. balteata*) ルコント ; D . u . テネラ (*D. u. tenella*) ; D . スペシオーサ (*D. speciosa*) ジャーマー ; ならびに D . u . ウンデシムünkタータ (*D. u. undecimpunctata*) マンセルヘイムを含むリストから選択される。

【0045】

(生物との)接触： 本明細書で用いているように、核酸分子に関する、生物(例えば、鞘翅目または半翅目害虫)「との接触」または「による取込み」という用語は、生物体内への核酸分子のインターナリゼーション、例えば、かつ制限なく、生物による分子の摂取(摂食による)；生物を核酸分子を含む組成物と接触させること；核酸分子を含む溶液による生物を漬けることを含む。

10

【0046】

コンティグ： 本明細書で用いているように、「コンティグ」という用語は、单一遺伝源に由来する一組の重複DNAセグメントから再構築されているDNA配列を意味する。

【0047】

コーン植物体： 本明細書で用いているように、「コーン植物体」という用語は、ゼア・マイス種 (*Zea mays*) (トウモロコシ) の植物を意味する。

【0048】

発現： 本明細書で用いているように、コードポリヌクレオチド(例えば、遺伝子または導入遺伝子)の「発現」は、しばしばタンパク質の合成を含む、核酸転写単位のコード化情報(例えば、g DNAまたはc DNA)が細胞の作動、非作動または構造部分に変換されるプロセスを意味する。遺伝子発現は、外部シグナル、例えば、遺伝子発現を増加または減少させる作用因子への細胞、組織または生物体の曝露による影響を受け得る。遺伝子の発現は、DNAからRNAを経てタンパク質までの経路のどこかで調節することもできる。遺伝子発現の調節は、例えば、転写、翻訳、RNA輸送およびプロセッシング、mRNA等の中間分子の分解に作用するコントロールにより、またはそれらが行われた後に特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、画分化、もしくは分解により、またはそれらの組合せにより起こる。遺伝子発現は、制限なく、ノーザンプロット、RT - PCR、ウェスタンプロット、またはin vitro、in situもしくはin vivoタンパク質活性アッセイ(複数可)を含む、当技術分野で公知のいずれかの方法によりRNAレベルまたはタンパク質レベルで測定することができる。

20

【0049】

遺伝物質： 本明細書で用いているように、「遺伝物質」という用語は、DNAおよびRNA等の、すべての遺伝子および核酸分子を含む。

【0050】

半翅目害虫： 本明細書で用いているように、「半翅目害虫」という用語は、広範囲の宿主植物を常食とし、刺して、吸う口器を有する、カメムシ科 (Pentatomidae)、メクラカメムシ科 (Miridae)、ホシカメムシ科 (Pyrrhocoridae)、ヘリカメムシ科 (Coreidae)、クモヘリカメムシ科 (Alydidae) およびロバルス科 (Rhopalidae) の昆虫を含むがこれに限定されない、半翅目 (Hemiptera) の昆虫を意味する。特定の例において、半翅目害虫は、エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*) (Fabr.) (ネオトロピカルブラウンスティングバグ)、ネザラ・ビリデュラ (*Nezara viridula*) (L.) (ミナミアオカメムシ)、ピエゾドルス・ゲイルディニイ (*Piezodorus guildinii*) (ウェストウッド) (レッドバンディングスティングバグ)、ハリオモルファ・ハリス (*Halyomorpha halys*) (Stål) (クサギカメムシ)、チナビア・ヒラレ (*Chinavia hilare*) (セイ) (グリーンスティングバグ)；エウスキツツス・セルブス (*Euschistus servus*) (セイ) (ブラウンスティングバグ)、ディケロブス・メラカンツス (*Dichelops melacanthus*) (ダラス)、ディケロブス・フルカツス (*Dichelops furcatus*) (F.)；エデッサ・メジタブンダ (*Edessa meditabunda*) (F.)、チアンタ・ペルジトル (*Thyanta perditor*) (F.) (ネオトロピカルレッドショルダードスティングバグ)、チナビア・マル

40

50

ギナツム (*Chinavia marginatum*) (パリソ・ド・ボーヴォワ)、ホルシアス・ノビレルス (*Horcius nobilellus*) (ベルク) (コットンバグ)、テディア・スチグモサ (*Taedea stigmosa*) (ベルク) ; ホシカメムシ (*Dysdercus peruvianus*) (ゲラン・メヌヴィル) ; ネオメガロトムス・パルブス (*Neomegalotomus parvus*) (ウェストウッド) ; レプトグロスス・ゾナツス (*Leptoglossus zonatus*) (ダラス)、ニエストレア・シダエ (*Niesthrea sidiae*) (F.)、カスミカメムシ (*Lygus hesperus*) (ナイト) (ウェスタンターニッシュドプラントバグ) およびサビイロメクラガメ (*Lygus lineolaris*) (パリソ・ド・ボーヴォワ) を含むリストから選択される。

【0051】

阻害： 本明細書で用いているように、「阻害」という用語は、コードポリヌクレオチド（例えば、遺伝子）に対する効果を記述するために用いる場合、コードポリヌクレオチドから転写されたmRNA および / またはコードポリヌクレオチドのペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質産物の細胞レベルの測定可能な低下を意味する。いくつかの例において、コードポリヌクレオチドの発現は、発現がほぼ無くなるように阻害することができる。「特異的阻害」は、特異的阻害が達成される細胞中の他のコードポリヌクレオチド（例えば、遺伝子）の発現に後に影響を及ぼすことのない標的コードポリヌクレオチドの阻害を意味する。

10

【0052】

昆虫： 害虫について本明細書で用いているように、「害虫」という用語は、具体的に鞘翅目害虫および半翅目害虫を含む。いくつかの実施形態では、該用語は、いくつかの他の害虫も含む。

20

【0053】

単離された： 「単離（された）」生物学的構成成分（核酸またはタンパク質等）は、構成成分の化学的または機能的变化がもたらされるのと同時に、構成成分が天然に存在する生物体の細胞中の他の生物学的構成成分（すなわち、他の染色体および染色体外DNA およびRNA、ならびにタンパク質）から実質的に分離された、とは別に產生された、またはから精製された（例えば、核酸は、核酸を染色体における残りのDNAに連結している化学結合を切断することによって染色体から単離することができる）。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準精製方法によって精製された核酸分子およびタンパク質を含む。該用語は、宿主細胞中で組換え発現により調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子、タンパク質およびペプチドも含む。

30

【0054】

核酸分子： 本明細書で用いているように、「核酸分子」という用語は、RNA、cDNA、gDNA のセンスおよびアンチセンス鎖の両方を含み得る、ヌクレオチドの重合体、ならびに合成体および上記のものの混合重合体を意味し得る。ヌクレオチドまたは核酸塩基は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、いずれかの型のヌクレオチドの修飾体を意味し得る。「核酸分子」は、本明細書で用いているように、「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義語である。核酸分子は、特に示さない限り、通常、長さが少なくとも 10 塩基である。慣例により、核酸分子のヌクレオチド配列は、分子の 5' 末端から 3' 末端の方向に読み取られる。核酸分子の「相補体」は、核酸分子の核酸塩基と塩基対（すなわち、A - T / U および G - C）を形成し得る核酸塩基を有するポリヌクレオチドを意味する。

40

【0055】

いくつかの実施形態は、mRNA 分子の相補体である RNA 分子に転写される錆型DNA を含む核酸を含む。これらの実施形態では、mRNA 分子に転写される核酸の相補体は、RNA ポリメラーゼ (DNA を 5' → 3' 方向に転写する) が mRNA 分子とハイブリダイズし得る相補体からの核酸を転写するように、5' → 3' の配向で存在する。別途明確に述べない限り、または文脈から他の状態であることが明白でない限り、「相補体」という用語は、したがって、5' から 3' まで、参照核酸の核酸塩基と塩基対を形成し得る核酸塩基を有するポリヌクレオチドを意味する。同様に、明示的に別の定めをした場合を

50

除いて（または文脈から他の状態であることが明らかである場合を除いて）、核酸の「逆相補体」は、逆の配向の相補体を意味する。前述のことを以下の実例で示す。

5' ATGATGATG 3' ポリヌクレオチド

5' TACTACTAC 3' ポリヌクレオチドの「相補体」

5' CATCATCAT 3' ポリヌクレオチドの「逆相補体」

【0056】

本発明のいくつかの実施形態は、ヘアピンRNA形成iRNA分子を含む。これらのiRNAでは、以下の説明図に示すように、一本鎖RNA分子が相補的および逆相補的ポリヌクレオチドを含む領域にわたって「折り重なり」、それ自体とハイブリダイズし得るよう、RNA干渉により標的とされる核酸の相補体および逆相補体の両方を同じ分子に見いだすことができる。

5' AUGAUGAUG - リンカーポリヌクレオチド - CAUCACAU 3'、これがハイブリダイズして、以下を形成する。

【0057】

【化5】



10

20

30

40

【0058】

「核酸分子」は、すべてのポリヌクレオチド、例えば、一本および二本鎖型のDNA；一本鎖型のRNA；ならびに二本鎖型のRNA(dsRNA)を含む。「ヌクレオチド配列」または「核酸配列」という用語は、個々の一本鎖としての、または二重らせんにおける核酸のセンスおよびアンチセンス鎖の両方を意味する。「リボ核酸」(RNA)という用語は、iRNA(阻害RNA)、dsRNA(二本鎖RNA)、siRNA(低分子干渉RNA)、mRNA(メッセンジャーRNA)、miRNA(マイクロRNA)、sRNA(低分子ヘアピンRNA)、hpRNA(ヘアピンRNA)、tRNA(転移RNA)、対応するアシル化アミノ鎖を負荷されているか、または負荷されていないかを問わず)およびcRNA(相補的RNA)を含む。「デオキシリボ核酸」(DNA)という用語は、cDNA、gDNAおよびDNA-RNAハイブリッドを含む。「ポリヌクレオチド」、「核酸」、その「セグメント」およびその「断片」という用語は、例えば、gDNA；リボソームRNA；転移RNA；RNA；メッセンジャーRNA；オペロン；ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質をコードするまたはコードするように適合させることができる工学的に操作したより小さいポリヌクレオチド；ならびにそれらの対応するヌクレオチド配列により示される核酸分子内の構造および/または機能要素を含むと当業者により理解される。

【0059】

オリゴヌクレオチド：オリゴヌクレオチドは、短い核酸ポリマーである。オリゴヌクレオチドは、より長い核酸セグメントの切断により、または個々のヌクレオチド前駆体を重合させることにより、形成させることができる。自動合成器により、長さが数百塩基までのオリゴヌクレオチドの合成が可能である。オリゴヌクレオチドは、相補的核酸に結合し得るので、それらは、DNAまたはRNAを検出するためのプローブとして用いることができる。DNAから構成されるオリゴヌクレオチド(オリゴデオキシリボヌクレオチド)は、DNAおよびRNA(cDNAへの逆転写)配列の増幅のための技術である、PCRに用いることができる。PCRにおいて、オリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼがオリゴヌクレオチドを伸長させ、相補鎖を複製することを可能にする、「プライマー」

50

と一般的に呼ばれる。

【0060】

核酸分子は、天然および／または非天然ヌクレオチド結合により結合した天然および修飾ヌクレオチドのいずれかまたは両方を含み得る。核酸分子は、当業者により容易に理解されるように、化学的もしくは生化学的に修飾することができ、または非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含み得る。そのような修飾は、例えば、標識、メチル化、類似体による1つまたは複数の天然ヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間修飾（例えば、非荷電結合：例えば、メチルホスホン酸、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメート等；荷電結合：例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート等；ペンドント部分：例えば、ペプチド；インターフェーラー：例えば、アクリジン、ソレラン等；キレート剤；アルキル化剤；修飾結合：例えば、アルファアノマー核酸等）を含む。「核酸分子」という用語は、一本鎖、二本鎖、部分二重らせん、三重らせん、ヘアピン、環状およびパドロック型立体配座を含む、任意の位相幾何学的立体配座も含む。10

【0061】

本明細書で用いているように、DNAに関しては、「コード配列」、「構造ヌクレオチド配列」または「構造核酸分子」という用語は、適切な調節配列の制御下におかれた場合、転写およびmRNAにより、ポリペプチドに最終的に翻訳されるヌクレオチド配列を意味する。RNAに関しては、「コード配列」という用語は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるヌクレオチド配列を意味する。コード配列の境界は、5'末端における翻訳開始コドンおよび3'末端における翻訳停止コドンにより決定される。コード配列は、ゲノムDNA；cDNA；EST；および組換えヌクレオチド配列を含むが、これらに限定されない。20

【0062】

ゲノム： 本明細書で用いているように、「ゲノム」という用語は、細胞の核内に見いだされる染色体DNAを意味し、細胞の細胞分画物内に見いだされるオルガネラDNAも意味する。本発明のいくつかの実施形態では、DNA分子が植物細胞のゲノムに組み込まれるように、DNA分子を植物細胞に導入することができる。これらおよびさらなる実施形態では、DNA分子は、植物細胞の核DNAに組み込むか、または植物細胞の葉緑体もしくはミトコンドリアのDNAに組み込むことができる。「ゲノム」という用語は、細菌に適用するとき、細菌細胞内の染色体およびプラスミドの両方を意味する。本発明のいくつかの実施形態では、DNA分子が細菌のゲノムに組み込まれるように、DNA分子を細菌に導入することができる。これらおよびさらなる実施形態では、DNA分子は、染色体に組み込むか、または安定プラスミドとしてもしくはそれに位置することができる。30

【0063】

配列同一性： 「配列同一性」または「同一性」という用語は、本明細書で用いているように、2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈において、規定の比較ウインドウにわたり最大の一一致を得るようにアライメントした場合に同じである2つの配列における残基を意味する。

【0064】

本明細書で用いているように、「配列同一性の百分率」という用語は、2つの最適にアライメントされた配列（例えば、核酸配列またはポリペプチド配列）を比較ウインドウにわたり比較することにより決定される値を意味し、比較ウインドウにおける配列の一部は、2つの配列の最適のアライメントのために参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。百分率は、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両配列に存在する位置の数を測定して、一致した位置の数を求め、一致した位置の数を比較ウインドウにおける位置の総数で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を得ることによって計算する。参照配列と比較してすべての位置で同一である配列は、参照配列と100%同一であると言われ、またその逆も同じである。40

【0065】

比較のために配列をアライメントする方法は、当技術分野で周知である。様々なプログ

10

20

30

40

50

ラムおよびアライメントアルゴリズムが例えれば、Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-244; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-10890; Huang et al. (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-165; Pearson et al. (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331; Tatiana et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250に記載されている。配列のアライメントの方法および相同意性の計算の詳細な考察は、例えばAltschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410において見いだすことができる。

【0066】

10

米国国立生物技術情報センター (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST (商標); Altschul et al. (1990)) が、いくつかの配列解析プログラムに関連して使用するために、米国国立生物技術情報センター (Bethesda、MD) を含むいくつかの情報源およびインターネット上で利用できる。このプログラムを用いて配列同一性をどのようにして決定するかの説明は、BLAST (商標) の「ヘルプ」セクションのもとにインターネット上で入手できる。核酸配列の比較のために、デフォルトパラメーターに設定されたデフォルト BLOSUM62マトリックスを用いてBLAST (商標) (blastn) プログラムの「blast 2 配列」関数 (function) を用いることができる。参照配列とのより大きい類似性を有する核酸配列は、この方法により評価する場合、同一性の百分率の増加を示す。

20

【0067】

特異的にハイブリダイズ可能な / 特異的に相補的な： 本明細書で用いているように、「特異的にハイブリダイズ可能な」および「特異的に相補的な」という用語は、安定かつ特異的な結合が核酸分子と標的核酸分子との間で起こるように十分な程度の相補性を示す用語である。2つの核酸分子間のハイブリダイゼーションは、2つの核酸分子の核酸配列間の逆平行アライメントの形成を伴う。2つの分子は、そのとき逆鎖上の対応する塩基との水素結合を形成して、それが十分に安定である場合、当技術分野で周知の方法を用いて検出できる二重らせん分子を形成することができる。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能であるにはその標的配列と100%相補的である必要はない。しかし、ハイブリダイゼーションが特異的であるために存在しなければならない配列相補性の量は、用いるハイブリダイゼーション条件の関数である。

30

【0068】

特定の厳密度をもたらすハイブリダイゼーション条件は、最適なハイブリダイゼーション方法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さによって異なる。一般的に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションのイオン強度 (とりわけNa⁺および / またはMg⁺⁺濃度) は、ハイブリダイゼーションの厳密性を決定する。洗浄緩衝液のイオン強度および洗浄温度も厳密性に影響を及ぼす。特定の厳密度を達成するために必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は、当業者に公知であり、例えば、Sambrook et al. (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapter 9 and 11, and updatesおよびHames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985に述べられている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらなる詳細な指示および指針は、例えば、Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; およびAusubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995, and updatesに見いだすことができる。

40

【0069】

本明細書で用いているように、「厳密条件」は、ハイブリダイゼーション分子間に80

50

%を超える配列マッチおよび標的核酸分子内に相同配列が存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を含む。「厳密条件」は、厳密性のさらなる特定のレベルを含む。したがって、本明細書で用いているように、「中厳密性」条件は、80%を超える配列マッチを有する（すなわち、20%未満のミスマッチを有する）分子がハイブリダイズする条件であり、「高厳密性」の条件は、90%を超えるマッチを有する（すなわち、10%未満のミスマッチを有する）配列がハイブリダイズする条件であり、「超高厳密性」の条件は、95%を超えるマッチを有する（すなわち、5%未満のミスマッチを有する）配列がハイブリダイズする条件である。

【0070】

以下は、代表的で、非限定的なハイブリダイゼーション条件である。 10

高厳密条件（少なくとも90%の配列同一性を共有する配列を検出する）： 5×S
SC緩衝液中の65度で16時間のハイブリダイゼーション；2×SSC緩衝液で室温でそれぞれ15分間2回洗浄する；および0.5×SSC緩衝液で65度でそれぞれ20分間2回洗浄する。

中厳密条件（少なくとも80%の配列同一性を共有する配列を検出する）： 5×~6
×SSC緩衝液中の65~70度で16~20時間のハイブリダイゼーション；2×
SSC緩衝液で室温でそれぞれ5~20分間2回洗浄する；および1×SSC緩衝液で
55~70度でそれぞれ30分間2回洗浄する。

非厳密対照条件（少なくとも50%の配列同一性を共有する配列がハイブリダイズする）： 6×SSC緩衝液中の室温~55度で16~20時間のハイブリダイゼーション；2×~3×SSC緩衝液で室温~55度でそれぞれ20~30分間少なくとも2回洗浄する。 20

【0071】

本明細書で用いているように、核酸に関する「実質的に相同」または「実質的相同性」という用語は、参照核酸と厳密条件下でハイブリダイズする連続した核酸塩基を有するポリヌクレオチドを意味する。例えば、配列番号1および/または配列番号84のいずれかの参照核酸と実質的に相同である核酸は、配列番号1および/または配列番号84のいずれかの参照核酸と厳密条件（例えば、上に示した中厳密条件）のもとでハイブリダイズする核酸である。実質的に相同であるポリヌクレオチドは、少なくとも80%の配列同一性を有し得る。例えば、実質的に相同であるポリヌクレオチドは、79%、80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%および約100%等の、約80%~100%の配列同一性を有し得る。実質的相同性の特性は、特異的ハイブリダイゼーションに密接に関連している。例えば、特異的結合が望まれる条件下、例えば、厳密ハイブリダイゼーション条件下で非標的ポリヌクレオチドに対する核酸の特異的結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在する場合に、核酸分子は、特異的にハイブリダイズする。 30

【0072】

本明細書で用いているように、「オルソログ」という用語は、共通の祖先の核酸から発生し、2つ以上の種において共通の機能を保持し得る2つ以上の種における遺伝子を意味する。 40

【0073】

本明細書で用いているように、5'~3'方向に読み取られたポリヌクレオチドのすべてのヌクレオチドが3'~5'方向に読み取られた場合の他のポリヌクレオチドのすべてのヌクレオチドと相補的である場合、2つの核酸分子は、「完全な相補性」を示すと言われる。参照ポリヌクレオチドと相補的であるポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドの逆相補体と配列同一性を示す。これらの用語および記述は、当技術分野で十分に定義されており、当業者に容易に理解される。

【0074】

作動可能に連結した：第1のポリヌクレオチドが第2のポリヌクレオチドと機能的関係

にある場合、第1のポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結している。組換えによって產生させる場合、作動可能に連結したポリヌクレオチドは、一般的に連續しており、2つのコード領域を連結するために必要な場合、同じ読み枠に（例えば、翻訳段階で融合されるORFである）ある。しかし、核酸は、作動可能に連結されるのに連續している必要はない。

【0075】

「作動可能に連結した」という用語は、調節遺伝エレメントおよびコードポリヌクレオチドに関連して用いる場合、調節エレメントが連結されたコードポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼすことを意味する。「調節エレメント」または「制御エレメント」は、転写のタイミングおよびレベル／量、RNAプロセッシングもしくは安定性、または関連コードポリヌクレオチドの翻訳に影響を及ぼすポリヌクレオチドを意味する。調節エレメントは、プロモーター；翻訳リーダー；インtron；エンハンサー；システム-ループ構造；レプレッサー結合ポリヌクレオチド；終結配列を有するポリヌクレオチド；ポリアデニル化認識配列を有するポリヌクレオチド等を含み得る。特定の調節エレメントは、それと作動可能に連結したコードポリヌクレオチドの上流および／または下流に位置し得る。また、コードポリヌクレオチドと作動可能に連結した特定の調節配列は、二本鎖核酸分子の関連補鎖上に位置し得る。

10

【0076】

プロモーター：本明細書で用いているように、「プロモーター」という用語は、転写の開始の上流にあり、転写を開始するためにRNAポリメラーゼおよび他のタンパク質の認識および結合に関与し得るDNAの領域を意味する。プロモーターは、細胞中の発現のためにコードポリヌクレオチドに作動可能に連結することができる、あるいはプロモーターは、細胞中の発現のためにコードポリヌクレオチドに作動可能に連結することができるシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結することができる。「植物プロモーター」は、植物細胞中の転写を開始することができるプロモーターであり得る。発育制御下のプロモーターの例としては、葉、根、種子、纖維、木質導管、仮導管または厚膜組織等の特定の組織における転写を優先的に開始するプロモーター等がある。そのようなプロモーターは、「組織優先的」と呼ばれる。特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターは、「組織特異的」と呼ばれる。「細胞型特異的」プロモーターは、1つまたは複数の器官における特定の細胞型、例えば、根または葉における維管束細胞における発現を主として推進する。「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあり得るプロモーターであり得る。誘導性プロモーターにより転写を開始させ得る環境条件の例としては、嫌気性条件および光の存在等がある。組織特異的、組織優先的、細胞型特異的および誘導性プロモーターは、「非構成性」プロモーターのクラスを構成する。「構成性」プロモーターは、ほとんどの環境条件下またはほとんどの組織もしくは細胞型で活性であり得るプロモーターである。

20

30

【0077】

任意の誘導性プロモーターを本発明のいくつかの実施形態で用いることができる。Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366を参照のこと。誘導性プロモーターにより、転写の速度は、誘導剤に応答して増大する。例示的な誘導性プロモーターは、銅に応答するACEIシステムに由来するプロモーター；ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤に応答するトウモロコシに由来するIn2遺伝子；Tn10のTetレプレッサー；およびその転写活性がグルココルチコステロイドホルモンにより誘導され得る(Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421)、ステロイドホルモン遺伝子に由来する誘導性プロモーターを含むが、これらに限定されない。

40

【0078】

例示的な構成性プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター等の、植物ウイルスに由来するプロモーター；イネアクチン遺伝子に由来するプロモーター；ユビキチンプロモーター；pEMU；MAS；トウモロコシH3ヒストンプロモーター；およびALSプロモーター、セイヨウアブラナ(Brassica napus)AL

50

S 3 構造遺伝子の 5' 側の Xba I / Nco I 断片（または前記 Xba I / Nco I 断片と類似のポリヌクレオチド）（国際 PCT 公開国際公開第 96 / 30530 号パンフレット）を含むが、これらに限定されない。

【0079】

さらに、あらゆる組織特異的または組織優先的プロモーターは、本発明のいくつかの実施形態で用いることができる。組織特異的プロモーターに作動可能に連結したコードポリヌクレオチドを含む核酸分子を用いて形質転換した植物は、特定の組織において、もっぱら、または優先的にコードポリヌクレオチドの産物を產生し得る。例示的な組織特異的または組織優先的プロモーターは、インゲンマメ属に由来するもの等の、種子優先的プロモーター；キャブまたはルビスコに由来するもの等の葉特異的および光誘導性プロモーター；LAT52 に由来するもの等の薬特異的プロモーター；Zm13 に由来するもの等の花粉特異的プロモーター；および apg に由来するもの等の小胞子優先的プロモーターを含むが、これらに限定されない。

10

【0080】

ダイズ植物： 本明細書で用いているように、「ダイズ植物」という用語は、ダイズ（例えば、G. max）グリシン属種 (Glycine sp.) の植物を意味する。

【0081】

形質転換： 本明細書で用いているように、「形質転換」または「形質導入」という用語は、細胞への 1 つまたは複数の核酸分子（複数可）の移入を意味する。核酸分子の細胞ゲノムへの取込みにより、またはエピソーム複製により、核酸分子が細胞により安定に複製されるようになる場合、細胞は、細胞に形質導入された核酸分子によって「形質転換」される。本明細書で用いているように、「形質転換」という用語は、核酸分子をそのような細胞に導入することができるすべての技術を含む。例は、ウイルスベクターによるトランسفェクション；プラスミドベクターによる形質転換；エレクトロポレーション (Fromm et al. (1986) Nature 319:791-3)；リポフェクション (Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7)；マイクロインジェクション (Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85)；アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介移入 (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)；直接 DNA 取込み；および微粒子銃 (Klein et al. (1987) Nature 327:70) を含むが、これらに限定されない。

20

【0082】

導入遺伝子： 外因性核酸。いくつかの例において、導入遺伝子は、鞘翅目および/または半翅目害虫に見いだされる核酸分子と相補的であるポリヌクレオチドを含む ds RNA 分子を形成することができる RNA の 1 つまたは両方の鎖（複数可）をコードする DNA であり得る。さらなる例において、導入遺伝子は、遺伝子（例えば、除草剤耐性遺伝子、産業的または薬学的に有用な化合物をコードする遺伝子、または望ましい農業的形質をコードする遺伝子）であり得る。これらおよび他の例において、導入遺伝子は、導入遺伝子のコードポリヌクレオチド（例えば、プロモーター）と作動可能に連結した調節エレメントを含み得る。

30

【0083】

ベクター： 例えは、形質転換細胞を生産するために細胞に導入する核酸分子。ベクターは、複製起点等の、宿主細胞中で複製することを可能にする遺伝エレメントを含み得る。ベクターの例は、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、または外因性 DNA を細胞内に運ぶウイルスを含むが、これらに限定されない。ベクターは、アンチセンス分子、ならびに/または選択可能マーカー遺伝子および当技術分野で公知の他の遺伝エレメントを生産するものを含む、1 つまたは複数の遺伝子も含み得る。ベクターは、細胞を形質導入、形質転換または感染させ、それにより、ベクターによりコードされる核酸分子および/またはタンパク質を細胞に発現させる。ベクターは、細胞への核酸分子の侵入を達成することを促進する物質を場合によって含む（例えは、リポソーム、タンパク質コーティング等）。

40

【0084】

50

収量： 同時に同じ条件下で成長する同じ成長場所における基準品種の収量と比べて約100%またはそれ以上の安定化収量。特定の実施形態では、「収量向上」または「収量の向上」は、栽培品種が、同時に同じ条件下で成長する当作物に害であり、本明細書における組成物および方法により標的にされる、著しい密度の鞘翅目および／または半翅目害虫を含む同じ成長場所における基準品種の収量と比べて105%またはそれ以上の安定化収量を有することを意味する。

【0085】

特に示さないまたは默示しない限り、「a」、「an」および「the」という用語は、本明細書で用いているように、「少なくとも1つ」を意味する。

【0086】

特に説明しない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、この開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を有する。分子生物学における一般用語の定義は、例えば、Lewin's Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびMeyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見いだすことができる。特に示さない限り、すべての百分率は、重量によるものであり、すべての溶媒の混合割合は、容積によるものである。すべての温度は、摂氏温度である。

10

【0087】

I V . 害虫ポリヌクレオチドを含む核酸分子

A . 概要

本明細書で述べるのは、害虫の防除に有用な核酸分子である。いくつかの例において、害虫は、鞘翅目または半翅目害虫である。述べる核酸分子は、標的ポリヌクレオチド（例えば、天然遺伝子および非コードポリヌクレオチド）、dsRNA、siRNA、shRNA、hpRNA および miRNA を含む。例えば、鞘翅目および／または半翅目害虫における1つまたは複数の天然核酸のすべてまたは一部に対して特異的に相補的であり得る dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA および／または hpRNA 分子をいくつかの実施形態で述べる。これらおよびさらなる実施形態では、天然核酸（複数可）は、1つまたは複数の標的遺伝子（複数可）であり得、その産物は、例えばかつ制限なく、幼虫／若虫の発育に関与し得る。本明細書で述べる核酸分子は、核酸分子が特異的に相補的である少なくとも1つの天然核酸（複数可）を含む細胞に導入した場合、細胞中で RNAi を開始し、結果として天然核酸（複数可）の発現を低減または排除し得る。いくつかの例において、それに対して特異的に相補的である核酸分子による標的遺伝子の発現の低減または排除は、害虫の成長、発育および／または摂食の低減または停止をもたらし得る。

30

【0088】

いくつかの実施形態では、害虫における少なくとも1つの標的遺伝子を選択することができ、該標的遺伝子は、COP1 alpha（配列番号1または配列番号84）を含む。特定の例において、鞘翅目または半翅目害虫における標的遺伝子が選択され、該標的遺伝子は、COP1 alpha（配列番号1または配列番号84）を含む新たなヌクレオチド配列を含む。

40

【0089】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、COP1 alpha（配列番号1または配列番号84）のタンパク質産物のアミノ酸配列と少なくとも約85%同一（例えば、少なくとも84%、85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%または100%同一）である連続したアミノ酸配列を含むポリペプチドにin silicoで翻訳することができるポリヌクレオチドを含む核酸分子であり得る。標的遺伝子は、任意の害虫における核酸であり得、その転写後阻害は、例えば、害虫に対する保護効果を植物にもたらすための、害虫の成長および／または生存に対する有害効果を有する。特定の例において、標的遺伝子は、配列番号1または配列番号84のアミノ酸

50

配列と少なくとも約 8 5 % 同一、約 9 0 % 同一、約 9 5 % 同一、約 9 6 % 同一、約 9 7 % 同一、約 9 8 % 同一、約 9 9 % 同一、約 1 0 0 % 同一または 1 0 0 % 同一である連続したアミノ酸配列を含むポリペプチドに in silico で逆翻訳することができるポリヌクレオチドを含む核酸分子である。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態で提供するのは、その発現が、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）におけるコードポリヌクレオチドによりコードされる天然 RNA 分子のすべてまたは一部と特異的に相補的であるポリヌクレオチドを含む RNA 分子をもたらす、DNA である。いくつかの実施形態では、害虫による発現 RNA 分子の摂取後に、害虫の細胞中のコードポリヌクレオチドの下方制御を得ることができる。特定の実施形態では、害虫の細胞中のコード配列の下方制御は、害虫の成長、発育および／または生存に対する有害効果をもたらし得る。

10

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的害虫遺伝子の 5' UTR ; 3' UTR ; スプライスリーダー；インtron；アウトロン（例えば、トランススプライシングでその後修飾される 5' UTR RNA ）；ドナトロン（トランススプライシングのためのドナー配列を提供するのに必要な非コード RNA ）等の転写非コード RNA および他の非コード転写 RNA を含む。そのようなポリヌクレオチドは、モノシストロン性およびポリシストロン性遺伝子の両方に由来し得る。

20

【 0 0 9 2 】

したがって、いくつかの実施形態に関連して害虫（鞘翅目および／または半翅目）における標的配列のすべてまたは一部に対して特異的に相補的である少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む i RNA 分子（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA および h p RNA ）についても本明細書で述べる。いくつかの実施形態では、i RNA 分子は、複数の標的核酸、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種またはそれ以上の標的核酸のすべてまたは一部と相補的であるポリヌクレオチド（複数可）を含み得る。特定の実施形態では、i RNA 分子は、植物または細菌等の遺伝子組換え生物により in vitro または in vivo で產生され得る。害虫における標的核酸のすべてまたは一部に対して特異的に相補的である dsRNA 分子、siRNA 分子、miRNA 分子、shRNA 分子および／または h p RNA 分子の产生に用いることができる cDNA も開示する。特定の宿主標的の安定な形質転換を達成するのに用いる組換え DNA 構築物をさらに述べる。形質転換宿主標的は、組換え DNA 構築物から有効レベルの dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA および／または h p RNA 分子を発現し得る。したがって、植物細胞中で機能し得る異種プロモーターに作動可能に連結した、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む植物形質転換ベクターについても述べるものであり、該ポリヌクレオチド（複数可）の発現により、害虫における標的核酸のすべてまたは一部に特異的に相補的である連続した核酸塩基の連なりを含む RNA 分子が結果として生じる。

30

【 0 0 9 3 】

特定の例において、害虫（鞘翅目および／または半翅目）の防除に有用な核酸分子は、COP1 alpha（配列番号 1 または配列番号 84 ）DNA を含むディアブロティカ属（Diabrotica）または半翅目生物から単離された天然核酸のすべてもしくは一部；発現したとき、COP1 alpha（配列番号 1 または配列番号 84 ）によりコードされる天然 RNA 分子のすべてもしくは一部と特異的に相補的であるポリヌクレオチドを含む RNA 分子をもたらすヌクレオチド配列；COP1 alpha（配列番号 1 または配列番号 84 ）のすべてまたは一部と特異的に相補的である少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む i RNA 分子（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA および h p RNA ）；COP1 alpha（配列番号 1 または配列番号 84 ）のすべてもしくは一部と特異的に相補的である dsRNA 分子、siRNA 分子、miRNA 分子、shRNA 分子および／または h p RNA 分子の产生に用いることができる cDNA 配列；な

40

50

らびに形質転換宿主標的が1つまたは複数の前述の核酸分子を含む、特定の宿主標的の安定な形質転換を達成するのに用いる組換えDNA構築物を含み得る。

[0 0 9 4]

B. 核酸分子

本発明は、とりわけ、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）の細胞、組織もしくは器官における標的遺伝子発現を阻害するiRNA（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA）分子；ならびに害虫の細胞、組織もしくは器官における標的遺伝子発現を阻害するために細胞もしくは微生物においてiRNA分子として発現することができるDNA分子を提供する。

(0 0 9 5)

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号1または84のいずれか；配列番号1または84のいずれかの相補体；配列番号1または配列番号84のいずれかの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号1または配列番号84のいずれかの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号1を含むディアブロティカ属(Diabrotica)生物(例えば、WCR)の天然コードポリヌクレオチド；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列；配列番号1を含むディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然コード配列の相補体；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列の相補体；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列の相補体；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の相補体；配列番号1を含むディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号84を含む半翅目生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号1を含むディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号84を含む半翅目生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアブロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；および配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体からなる群から選択される少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つまたはそれ以上)のポリヌクレオチド(複数可)を含む单離核酸分子を提供する。特定の実施形態では、单離ポリヌクレオチドの鞘翅目および/または半翅目害虫との接触またはそれらによる取込みは、害虫の成長、発育および/または摂食を阻害する。

[0 0 9 6]

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は、鞘翅目および／または半翅目害虫の細胞、組織または器官における標的遺伝子発現を阻害するように細胞または微生物において i R N A 分子として発現することができる少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つまたはそれ以上）の D N A （複数可）を含み得る。そのような D N A （複数可）は、d s R N A 分子（複数可）を形成することができるコード化 R N A の転写を開始または増大させるように D N A 分子を含む細胞中で機能するプロモーターに作動可能に連結させることができる。一実施形態では、少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つまたはそれ以上）の D N A （複数可）は、配列番号 1 または配列番号 8 4 を含む群から選択されるポリヌクレオチドに由来し得る。配列番号 1 または配列番号 8 4 の誘導体は、配列番号 1 および／または配列番号 8 4 の断片を含む。いくつかの実施形態では、そのような断片は、例えば

、配列番号 1 もしくは配列番号 8 4 の少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含む。したがって、そのような断片は、例えば、配列番号 1 および / もしくは配列番号 8 4 の 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 1 0 0 、 1 1 0 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 4 0 、 1 5 0 、 1 6 0 、 1 7 0 、 1 8 0 、 1 9 0 、 2 0 0 個もしくはそれ以上の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含み得る。いくつかの例において、そのような断片は、例えば、配列番号 1 もしくは配列番号 8 4 の少なくとも 1 9 個の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含み得る。したがって、配列番号 1 または配列番号 8 4 の断片は、配列番号 1 および / もしくは配列番号 8 4 の例えば、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 もしくは 3 0 個、約 4 0 個（例えば、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 および 4 5 個）、約 5 0 個、約 6 0 個、約 7 0 個、約 8 0 個、約 9 0 個、約 1 0 0 個、約 1 1 0 個、約 1 2 0 個、約 1 3 0 個、約 1 4 0 個、約 1 5 0 個、約 1 6 0 個、約 1 7 0 個、約 1 8 0 個、約 1 9 0 個、約 2 0 0 個もしくはそれ以上の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含み得る。
10

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態は、鞘翅目および / または半翅目害虫の細胞、組織または器官における標的遺伝子の発現を阻害するために部分的または完全に安定化された d s R N A 分子を鞘翅目および / または半翅目害虫に導入することを含む。 i R N A 分子（例えば、 d s R N A 、 si R N A 、 mi R N A 、 s h R N A および h p R N A ）として発現させ、鞘翅目および / または半翅目害虫により取り込まれた場合、配列番号 1 または配列番号 8 4 およびその相補体のいずれかの 1 つまたは複数の断片を含むポリヌクレオチドは、死、発育停止、成長阻害、性比の変化、一腹子数の減少、鞘翅目および / または半翅目害虫による感染の停止および / または摂食の停止の 1 つまたは複数をもたらし得る。例えば、いくつかの実施形態では、鞘翅目および / または半翅目害虫の標的遺伝子配列と実質的に相同であり、配列番号 1 または配列番号 8 4 を含むヌクレオチド配列の 1 つまたは複数の断片を含む約 1 5 ~ 約 3 0 0 個または約 1 9 ~ 約 3 0 0 個のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む d s R N A 分子を提供する。そのような d s R N A 分子の発現は、例えば d s R N A 分子を取り込む鞘翅目および / または半翅目害虫における死および / または成長阻害をもたらす。
20

【 0 0 9 8 】

特定の実施形態では、本発明により提供される d s R N A 分子は、配列番号 1 もしくは配列番号 8 4 および / または配列番号 1 もしくは配列番号 8 4 の断片と相補的なヌクレオチド配列を含む標的遺伝子からの転写物と相補的なポリヌクレオチドを含み、害虫におけるその標的遺伝子の阻害は、害虫の成長、発育または他の生物学的機能に必須であるポリペプチドまたはポリヌクレオチド作用物質（ agent ）の低減または除去をもたらす。選択されるポリヌクレオチドは、配列番号 1 または配列番号 8 4 、配列番号 1 または配列番号 8 4 に示すヌクレオチド配列の連続した断片、あるいは前述のもののいずれかの相補体のいずれかと約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の配列同一性を示し得る。例えば、選択されるポリヌクレオチドは、配列番号 1 または配列番号 8 4 、配列番号 1 または配列番号 8 4 に示すヌクレオチド配列の連続した断片、あるいは前述のもののいずれかの相補体と 7 9 % 、 8 0 % 、約 8 1 % 、約 8 2 % 、約 8 3 % 、約 8 4 % 、約 8 5 % 、約 8 6 % 、約 8 7 % 、約 8 8 % 、約 8 9 % 、約 9 0 % 、約 9 1 % 、約 9 2 % 、約 9 3 % 、約 9 4 % 、約 9 5 % 、約 9 6 % 、約 9 7 % 、約 9 8 % 、約 9 8 . 5 % 、約 9 9 % 、約 9 9 . 5 % 、または約 1 0 0 % の配列同一性を示し得る。
40

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子発現を阻害するように細胞または微生物において i R N A 分子として発現することができる D N A 分子は、 1 つまたは複数の標的害虫種（例えば、鞘翅目または半翅目害虫種）に見いだされる天然ポリヌクレオチドのすべてまたは一部に特異的に相補的である単一ポリヌクレオチドを含み得る。あるいは該 D N A 分子
50

は、複数のそのような特異的に相補的ポリヌクレオチドからキメラとして構築することができる。

【0100】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、「スペーサー」により分離された第1および第2のポリヌクレオチドを含み得る。スペーサーは、これが望ましい場合、第1および第2のポリヌクレオチドの間の二次構造の形成を促進するヌクレオチドの任意の配列を含む領域であり得る。一実施形態では、スペーサーは、mRNAのセンスまたはアンチセンスコードポリヌクレオチドの一部である。スペーサーは、代わりになるべきものとして、核酸分子と共有結合することができるヌクレオチドまたはそのホモログの任意の組合せを含み得る。いくつかの例において、スペーサーは、イントロン（例えば、ST-LSIイントロンまたはRTM1イントロン）であり得る。10

【0101】

例えば、いくつかの実施形態では、DNA分子は、異なるiRNA分子のそれぞれが第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドを含み、第1および第2のポリヌクレオチドが互いに相補的である、1つまたは複数の異なるiRNA分子をコードするポリヌクレオチドを含み得る。第1および第2のポリヌクレオチド配列は、スペーサー配列によりRNA分子内でつなぐことができる。スペーサーは、第1のポリヌクレオチドまたは第2のポリヌクレオチドの一部を構成し得る。第1および第2のポリヌクレオチドを含むRNA分子の発現は、第1および第2のポリヌクレオチドの特異的分子内塩基対合による、dsRNA分子の形成につながり得る。第1のポリヌクレオチドまたは第2のポリヌクレオチドは、害虫（鞘翅目および/または半翅目害虫）の生得のポリヌクレオチド（例えば、標的遺伝子または転写非コードポリヌクレオチド）、その誘導体、またはそれと相補的なポリヌクレオチドと実質的に同一であり得る。20

【0102】

dsRNA核酸分子は、重合リボヌクレオチドの二本鎖を含み、リン酸-糖主鎖またはヌクレオシドの修飾を含み得る。RNA構造の修飾は、特異的阻害を可能にするように調整することができる。一実施形態では、siRNA分子を生成することができるよう、dsRNA分子をユビキタス酵素法により修飾することができる。この酵素法は、in vitroまたはin vivoで、真核生物におけるDicer等のRNase III酵素を利用し得る。Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-8; およびHamilton and Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2を参照のこと。Dicerまたは機能的に同等のRNase III酵素は、より大きいdsRNA鎖および/またはhpRNA分子を、それぞれが長さが約19~25ヌクレオチドである、より小さいオリゴヌクレオチド（例えば、siRNA）に切断する。これらの酵素により生成されたsiRNA分子は、2~3ヌクレオチドの3'突出ならびに5'リン酸および3'ヒドロキシル末端を有する。RNase III酵素から生成されたsiRNA分子は、細胞中の一本鎖RNAに巻き戻され、分離される。siRNA分子は、次に標的遺伝子から転写されたRNAと特異的にハイブリダイズし、両RNA分子は、その後、固有の細胞RNA分解メカニズムにより分解される。このプロセスは、標的生物における標的遺伝子によりコードされるRNAの効果的な分解または除去をもたらし得る。その結果は、標的遺伝子の転写後サイレンシングである。いくつかの実施形態では、異種核酸分子から内因性RNase III酵素により生成されたsiRNA分子は、鞘翅目および/または半翅目害虫における標的遺伝子の下方制御を効果的に媒介し得る。30

【0103】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、分子間ハイブリダイゼーションによりin vivoでdsRNA分子を形成することができる一本鎖RNA分子に転写され得る少なくとも1種の非天然ポリヌクレオチドを含み得る。そのようなdsRNAは、一般的に自己集合性であり、標的遺伝子の転写後阻害を達成するために害虫（例えば、鞘翅目または半翅目）の栄養源に供給することができる。これらおよびさらなる実施形態では、核酸分子は、それぞれが害虫における異なる標的遺伝子と特異的に相補的である、2種の非天然ポ40

10

20

30

40

50

リヌクレオチドを含み得る。そのような核酸分子を d s R N A 分子として、例えば、鞘翅目および / または半翅目害虫に供給する場合、d s R N A 分子は、害虫における少なくとも 2 種の異なる標的遺伝子の発現を阻害する。

【 0 1 0 4 】

C . 核酸分子を得ること

害虫（鞘翅目および半翅目）における様々なポリヌクレオチドは、i R N A および i R N A をコードする D N A 分子等の、核酸分子の設計のための標的として用いることができる。しかし、天然ポリヌクレオチドの選択は、簡単なプロセスではない。例えば、鞘翅目または半翅目害虫における少数の天然ポリヌクレオチドのみが有効な標的となる。特定の天然ポリヌクレオチドを本発明の核酸分子により効果的に下方制御することができるかどうか、あるいは特定の天然ポリヌクレオチドの下方制御が害虫の成長、発育および / または生存に対して有害効果を有するかどうかを確実に予測することはできない。それから単離された E S T 等の、天然鞘翅目および半翅目害虫ポリヌクレオチドの圧倒的大多数（例えば、米国特許第 7,612,194 号明細書に示されている鞘翅目害虫ポリヌクレオチド）は、害虫の成長、発育および / または生存に対する有害効果を有さない。害虫に対する有害作用を有し得る天然ポリヌクレオチドのどれを、宿主植物におけるそのような天然ポリヌクレオチドに対して相補的な核酸分子を発現させ、宿主植物に害をもたらすことなく、摂食により害虫に有害効果をもたらすための組換え技術に用いることができるかも予測できない。

10

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、核酸分子（例えば、害虫（鞘翅目または半翅目）の宿主植物に供給すべき d s R N A 分子）は、代謝または異化生化学的経路、細胞分裂、エネルギー代謝、消化、宿主植物認識等に関与するポリペプチド等の、害虫の発育に必須のタンパク質またはタンパク質の一部をコードする c D N A を標的とするように選択される。本明細書で述べたように、その少なくとも 1 つのセグメントが標的害虫生物の細胞中で産生される R N A の少なくとも実質的に同一のセグメントに特異的に相補的である 1 つまたは複数の d s R N A を含む、標的害虫生物による組成物の摂取は、標的の死または他の阻害をもたらし得る。害虫に由来する、ポリヌクレオチド、D N A または R N A は、害虫による寄生に抵抗性の植物細胞を構築するために用いることができる。鞘翅目および / または半翅目害虫の宿主植物（例えば、Z . マイス (Z. mays) または G . マクス (G. max) ）は、例えば、本明細書に提供する鞘翅目および / または半翅目害虫に由来する 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含むように形質転換を起こさせることができる。宿主に形質転換を起こさせたポリヌクレオチドは、形質転換宿主内の細胞または生体液中で d s R N A 配列を形成する 1 つまたは複数の R N A をコードし、ひいては害虫がトランスジェニック植物との栄養関係を結ぶ場合 / 時に d s R N A を利用できるようにし得る。これは、害虫の細胞中の 1 つまたは複数の遺伝子の発現の抑制、ならびに最終的に死またはその成長もしくは発育の阻害をもたらし得る。

20

30

【 0 1 0 6 】

したがって、いくつかの実施形態では、害虫（例えば、鞘翅目または半翅目）の成長および発育に本質的に関与する遺伝子を標的とする。本発明に用いる他の標的遺伝子は、例えば、害虫の運動、移動、成長、発育、感染能および餌場の確定に重要な役割を果たすものを含み得る。したがって、標的遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子または転写因子であり得る。さらに、本発明に用いる天然害虫ポリヌクレオチドは、その機能が当業者に公知であり、そのポリヌクレオチドが標的害虫のゲノムにおける標的遺伝子と特異的にハイブリダイズ可能である、植物、ウイルス、細菌または昆虫遺伝子のホモログ（例えば、オルソログ）から得ることもできる。ハイブリダイゼーションにより既知のヌクレオチド配列を有する遺伝子のホモログを同定する方法は、当業者に公知である。

40

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i R N A （例えば、d s R N A 、s i R N A 、m i R N A 、s h R N A および h p R N A ）分子を生成するためのポリヌクレオチドを含む

50

核酸分子を得る方法を提供する。1つのそのような実施形態は、(a)害虫(例えば、鞘翅目または半翅目)におけるd s RNA媒介遺伝子抑制時に1つまたは複数の標的遺伝子(複数可)をそれらの発現、機能および表現型について解析するステップと、(b)d s RNA媒介抑制解析で成長または発育表現型の変化(例えば、低下)を示す標的害虫のポリヌクレオチドまたはそのホモログのすべてもしくは一部を含むプローブによりc DNAまたはg DNAライブラリーを探査するステップと、(c)プローブと特異的にハイブリダイズするDNAクローンを同定するステップと、(d)ステップ(b)で同定されたDNAクローンを単離するステップと、(e)ステップ(d)で単離されたクローンを含むc DNAまたはg DNA断片の配列を決定するステップであって、配列決定された核酸分子がRNAまたはそのホモログのすべてもしくは実質的な部分を含んでいるステップと、(f)遺伝子、またはsi RNA、mi RNA、hp RNA、m RNA、sh RNAまたはd s RNAのすべてもしくは実質的な部分を化学的に合成するステップとを含む。

10

【0108】

さらなる実施形態では、i RNA(例えば、d s RNA、si RNA、mi RNA、sh RNAおよびhp RNA)分子の実質的な部分を生成するためのポリヌクレオチドを含む核酸断片を得る方法は、(a)標的害虫(例えば、鞘翅目または半翅目)の天然ポリヌクレオチドの一部と特異的に相補的である第1および第2のオリゴヌクレオチドプライマーを合成するステップと、(b)ステップ(a)の第1および第2のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてクローニングベクターに存在するc DNAまたはg DNA挿入断片を增幅するステップとを含み、増幅核酸分子は、si RNA、mi RNA、hp RNA、m RNA、sh RNAまたはd s RNA分子の実質的な部分を含む。

20

【0109】

核酸は、多くのアプローチにより単離し、増幅し、または生成することができる。例えば、i RNA(例えば、d s RNA、si RNA、mi RNA、sh RNAおよびhp RNA)分子は、g DNAもしくはc DNAライブラリー、またはその一部から得られた標的ポリヌクレオチド(例えば、標的遺伝子または標的転写非コードポリヌクレオチド)のPCR増幅により得ることができる。DNAまたはRNAは、標的生物から抽出することができ、核酸ライブラリーは、当業者に公知の方法を用いてそれから作製することができる。標的生物から得られたg DNAまたはc DNAライブラリーは、標的遺伝子のPCR増幅および配列決定に用いることができる。確認済みのPCR産物は、最小プロモーターによりセンスおよびアンチセンスRNAを生成するためのin vitro転写用の錆型として用いることができる。あるいは、核酸分子は、ホスホルアミダイト化学等の標準的な化学を用いる自動DNA合成装置(例えば、P. E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.) モデル392または394 DNA / RNA合成装置)の使用を含む、多くの技術(例えば、Ozaki et al. (1992) Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214; およびAgrawal et al. (1990) Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423)のいずれかにより合成することができる。例えば、Beaucage et al. (1992) Tetrahedron, 48: 2223-2311; 米国特許第4,980,460号明細書、第4,725,677号明細書、第4,415,732号明細書、第4,458,066号明細書および第4,973,679号明細書を参照のこと。ホスホロチオエート、ホスホルアミデート等の非天然主鎖基をもたらす代替の化学も用いることができる。

30

【0110】

本発明のRNA、d s RNA、si RNA、mi RNA、sh RNAまたはhp RNA分子は、手動または自動化反応により当業者により化学的もしくは酵素的に、あるいはRNA、d s RNA、si RNA、mi RNA、sh RNAまたはhp RNA分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を含む細胞中でin vivoで生成することができる。RNAは、部分または完全有機合成によつても生成することができ、任意の修飾リボヌクレオチドをin vitroでの酵素または有機合成により導入することができる。RNA分子は、細胞RNAポリメラーゼまたはバクテリオファージRNAポリメラーゼ(例えば、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼおよびSP6 RNA

40

50

ポリメラーゼ)により合成することができる。ポリヌクレオチドのクローニングおよび発現に有用な発現構築物は、当技術分野で公知である。例えば、国際PCT公開国際公開第097/32016号パンフレットならびに米国特許第5,593,874号明細書、第5,698,425号明細書、第5,712,135号明細書、第5,789,214号明細書および第5,804,693号明細書を参照のこと。化学的にまたはin vitroでの酵素合成により合成されるRNA分子は、細胞に導入する前に精製することができる。例えば、RNA分子は、溶媒もしくは樹脂による抽出、沈殿、電気泳動、クロマトグラフィーまたはそれらの組合せにより混合物から精製することができる。あるいは、化学的にまたはin vitroでの酵素合成により合成されるRNA分子は、例えば、試料の処理による損失を避けるために、精製せずにまたは最小限の精製で用いることができる。RNA分子は、保存のために乾燥するか、または水溶液に溶解することができる。溶液は、dsRNA分子の二重らせん鎖のアニーリングおよび/または安定化を促進するための緩衝剤または塩を含んでいてもよい。

【0111】

実施形態では、dsRNA分子は、单一自己相補的RNA鎖により、または2つの相補的RNA鎖から形成させることができる。dsRNA分子は、in vivoまたはin vitroで合成することができる。細胞の内因性RNAポリメラーゼは、in vivoで1つまたは2つのRNA鎖の転写を媒介し得る。あるいはin vivoまたはin vitroでの転写を媒介するのにクローン化RNAポリメラーゼを用いることができる。害虫における標的遺伝子の転写後阻害は、宿主の器官、組織もしくは細胞型における特異的転写(例えば、組織特異的プロモーターを用いることによる)；宿主における環境条件の刺激(例えば、感染、ストレス、温度および/または化学誘導物質に応答性である誘導性プロモーターを用いることによる)；および/または宿主の発育段階もしくは年齢における工学的転写(例えば、発育段階特異的プロモーターを用いることによる)により宿主標的化することができる。dsRNA分子を形成するRNA鎖は、in vitroまたはin vivoで転写されるかどうかを問わず、ポリアデニル化され得るか、またはされ得ず、細胞の翻訳装置によりポリペプチドに翻訳され得るか、またはでき得ない。

【0112】

D. 組換えベクターおよび宿主細胞形質転換

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞(例えば、細菌細胞、酵母細胞または植物細胞)への導入のためのDNA分子であって、RNAへの発現ならびに害虫(鞘翅目および/または半翅目)による摂取により、害虫の細胞、組織もしくは器官における標的遺伝子の抑制を達成するポリヌクレオチドを含むDNA分子も提供する。したがって、いくつかの実施形態は、害虫における標的遺伝子発現を阻害するための植物細胞中でiRNA(例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA)分子として発現することができるポリヌクレオチドを含む組換え核酸分子を提供する。発現を開始または増大させるために、そのような組換え核酸分子は、1つまたは複数の調節エレメントを含んでいてもよく、調節エレメントは、iRNAとして発現することができるポリヌクレオチドに作動可能に連結することができる。植物において遺伝子抑制分子を発現させる方法は、公知であり、本発明のポリヌクレオチドを発現させるために用いることができる。例えば、国際PCT公開国際公開第06/073727号パンフレットおよび米国特許出願公開第2006/0200878号明細書を参照のこと。

【0113】

特定の実施形態では、本発明の組換えDNA分子は、dsRNA分子を形成し得るRNAをコードするポリヌクレオチドを含み得る。そのような組換えDNA分子は、摂取により害虫(例えば、鞘翅目および/または半翅目)細胞における内因性標的遺伝子(複数可)の発現を阻害することができるdsRNA分子を形成し得るRNAをコードし得る。多くの実施形態では、転写RNAは、安定化構造で、例えば、ヘアピンならびにステムおよびループ構造として提供することができるdsRNA分子を形成し得る。

【0114】

いくつかの実施形態では、d s RNA分子の1つの鎖は、配列番号1；配列番号1の相補体；配列番号1の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号1の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号1を含むディアプロティカ属(Diabrotica)生物(例えば、WCR)の天然コード配列；配列番号1を含むディアプロティカ属(Diabrotica)生物の天然コード配列の相補体；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアプロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列；配列番号1を含む天然RNA分子に転写されるディアプロティカ属(Diabrotica)生物の天然非コード配列の相補体；配列番号1を含むディアプロティカ属(Diabrotica)生物の天然コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号1を含むディアプロティカ属(Diabrotica)生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号1を含むエウスキスツス・ヘロス(E. heros)生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；および配列番号1を含むエウスキスツス・ヘロス(E. heros)生物の天然コードポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体のいずれかからなる群から選択されるポリヌクレオチドと実質的に相同であるポリヌクレオチドからの転写により形成させることができる。

10

【0115】

いくつかの実施形態では、d s RNA分子の1つの鎖は、配列番号84；配列番号84の相補体；配列番号84の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号84の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列の相補体；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の相補体；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号84を含む半翅目生物の天然コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片；および配列番号84を含む天然RNA分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの断片の相補体からなる群から選択されるポリヌクレオチドと実質的に相同であるポリヌクレオチドからの転写により形成させることができる。

20

【0116】

特定の実施形態では、d s RNA分子を形成し得るRNAをコードする組換えDNA分子は、少なくとも1つのプロモーターに対して、1つのポリヌクレオチドがセンス配向をなし、他のポリヌクレオチドがアンチセンス配向をなすように、少なくとも2つのポリヌクレオチドが配列し、センスポリヌクレオチドおよびアンチセンスポリヌクレオチドが、例えば、約5から約1000ヌクレオチドのスペーサーにより連結またはつながれている、コード領域を含み得る。スペーサーは、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチド間のループを形成する可能性がある。センスポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドは、標的遺伝子(例えば、配列番号1または配列番号84を含む遺伝子)またはその断片と実質的に相同であり得る。しかし、いくつかの実施形態では、組換えDNA分子は、スペーサーなしにd s RNA分子を形成し得る、RNAをコードし得る。複数の実施形態では、センスコードポリヌクレオチドおよびアンチセンスコードポリヌクレオチドは、異なる長さであり得る。

30

【0117】

害虫に対する有害効果または害虫に対する植物保護効果を有すると同定されたポリヌクレオチドは、本発明の組換え核酸分子における適切な発現力セットの創製により発現d s RNA分子に容易に取り込むことができる。例えば、そのようなポリヌクレオチドは、標的遺伝子ポリヌクレオチド(例えば、配列番号1または配列番号84およびその断片)に対応する第1のセグメントを選択し、このポリヌクレオチドを第1のセグメントに相同ま

40

50

たは相補的でない第2のセグメントスペーサー領域に連結し、これを、少なくとも一部が第1のセグメントと実質的に相補的である第3のセグメントに連結することにより、システムおよびループ構造を有するヘアピンとして発現させることができる。そのような構築物は、第1のセグメントと第3のセグメントとの分子内塩基対合によりシステムおよびループ構造を形成し、ループ構造が生じ、第2のセグメントを含む。例えば、米国特許出願公開第2002/0048814号明細書および第2003/0018993号明細書ならびに国際PCT公開国際公開第94/01550号パンフレットおよび国際公開第98/05770号パンフレットを参照のこと。dsRNA分子は、例えば、システム・ループ構造（例えば、ヘアピン）等の二本鎖構造の形態で生成することができ、それにより、天然害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）ポリヌクレオチドを標的とするsiRNAの生成は、siRNAの生成の増大をもたらす、またはdsRNAへアピンプロモーターの転写遺伝子サイレンシングを防ぐためにメチル化を低下させる、例えば、追加の植物発現性カセット上の標的遺伝子の断片の共発現により増大する。

10

【0118】

本発明の実施形態は、1つまたは複数のiRNA分子の発現の害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）阻害レベルを達成するための植物への本発明の組換え核酸分子の導入（すなわち、形質転換）を含む。組換えDNA分子は、例えば、線状または閉環プラスミド等のベクターであり得る。ベクターシステムは、単一ベクターもしくはプラスミド、または宿主のゲノムに導入される全DNAを一緒に含む2つ以上のベクターもしくはプラスミドであり得る。さらに、ベクターは、発現ベクターであり得る。本発明の核酸は、例えば、連結コードポリヌクレオチドまたは他のDNAエレメントの発現を駆動するために1つまたは複数の宿主において機能する適切なプロモーターの制御下でベクターに適切に挿入することができる。多くのベクターがこの目的のために利用でき、適切なベクターの選択は、ベクターに挿入される核酸のサイズおよびベクターにより形質転換される特定の宿主細胞に主として依存する。各ベクターは、その機能（例えば、DNAの増幅またはDNAの発現）およびそれが適合する個々の宿主細胞に依存する様々な構成成分を含む。

20

【0119】

トランスジェニック植物に害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）からの保護を与えるために、例えば、組換えDNAを組換え植物の組織または液内でiRNA分子（例えば、dsRNA分子を形成するRNA分子）に転写させることができる。iRNA分子は、宿主植物種に被害をもたらし得る害虫内部の対応する転写ポリヌクレオチドと実質的に相同であり、特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含み得る。害虫は、例えば、iRNA分子を含むトランスジェニック宿主植物の細胞または液を摂取することにより、トランスジェニック宿主植物の細胞中で転写されるiRNA分子と接触し得る。したがって、特定の例において、標的遺伝子の発現は、トランスジェニック宿主植物に寄生する鞘翅目および/または半翅目害虫体内のiRNA分子により抑制される。いくつかの実施形態では、標的鞘翅目および/または半翅目害虫における標的遺伝子の発現の抑制により、植物が害虫による攻撃から保護するこがもたらされ得る。

30

【0120】

本発明の組換え核酸分子により形質転換された植物細胞との栄養関係にある害虫へのiRNA分子の送達を可能にするために、植物細胞中のiRNA分子の発現（すなわち、転写）が必要である。したがって、組換え核酸分子は、核酸分子を増幅させる細菌細胞および核酸分子を発現させる植物細胞等の、宿主細胞中で機能する異種プロモーター配列等の1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結した本発明のポリヌクレオチドを含み得る。

40

【0121】

本発明の核酸分子に用いるのに適するプロモーター配列は、すべてが当技術分野で周知である、誘導性、ウイルス、合成または構成性であるものを含む。そのようなプロモーターを記載している非限定的な例としては、米国特許第6,437,217号明細書（トウモロコシRS81プロモーター）；第5,641,876号明細書（イネアクチンプロモーター）；第6,426,446号明細書（トウモロコシRS324プロモーター）；第

50

6, 429, 362号明細書(トウモロコシPR-1プロモーター)；第6, 232, 526号明細書(トウモロコシA3プロモーター)；第6, 177, 611号明細書(構成性トウモロコシプロモーター)；第5, 322, 938号明細書、第5, 352, 605号明細書、第5, 359, 142号明細書および第5, 530, 196号明細書(CaMV35Sプロモーター)；第6, 433, 252号明細書(トウモロコシL3オレオシンプロモーター)；第6, 429, 357号明細書(イネアクチン2プロモーターおよびイネアクチン2イントロン)；第6, 294, 714号明細書(光誘導性プロモーター)；第6, 140, 078号明細書(塩誘導性プロモーター)；第6, 252, 138号明細書(病原体誘導性プロモーター)；第6, 175, 060号明細書(リン欠乏誘導性プロモーター)；第6, 388, 170号明細書(二方向プロモーター)；第6, 635, 806号明細書(ガンマコイキンプロモーター)；ならびに米国特許出願公開第2009/757, 089号明細書(トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーター)等がある。追加のプロモーターとしては、ノパリンシンターゼ(NOS)プロモーター(Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9)およびオクトピンシンターゼ(OCS)プロモーター(アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)の腫瘍誘導プラスミド上で運ばれる)；カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)19Sプロモーター等のカリモウイルスプロモーター(Lawton et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24)；CaMV 35Sプロモーター(Odell et al. (1985) Nature 313:810-2)；ゴマノハグサモザイクウイルス35Sプロモーター(Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8)；スクロースシンターゼプロモーター(Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8)；R遺伝子複合体プロモーター(Chandler et al. (1989) Plant Cell 1:1175-83)；クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子プロモーター；CaMV 35S(米国特許第5, 322, 938号明細書、第5, 352, 605号明細書、第5, 359, 142号明細書および第5, 530, 196号明細書)；FMV 35S(米国特許第6, 051, 753号明細書および第5, 378, 619号明細書)；PC1SVプロモーター(米国特許第5, 850, 019号明細書)；SCP1プロモーター(米国特許第6, 677, 503号明細書)；およびAGRtu.nosプロモーター(GENBANK(商標)受託番号V00087; Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7)等がある。

【0122】

特定の実施形態では、本発明の核酸分子は、根特異的プロモーター等の組織特異的プロモーターを含む。根特異的プロモーターは、作動可能に連結したコードポリヌクレオチドの発現を根組織においてもっぱらまたは優先的に駆動する。根特異的プロモーターの例は、当技術分野で公知である。例えば、米国特許第5, 110, 732号明細書、第5, 459, 252号明細書および第5, 837, 848号明細書ならびにOpperman et al. (1994) Science 263:221-3; およびHirel et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:207-18を参照のこと。いくつかの実施形態では、本発明による鞘翅目および/または半翅目害虫の防除のためのポリヌクレオチドまたは断片は、該ポリヌクレオチドまたは断片に対して反対の転写方向に配向した2つの根特異的プロモーター間でクローニングされ得る。そして、それらは、トランスジェニック植物細胞中で作動可能であり、その内で発現して、上述のように、その後にdsRNA分子を形成し得るトランスジェニック植物細胞中のRNA分子を生成する。植物組織において発現したiRNA分子は、標的遺伝子発現の抑制が達成されるよう害虫により摂取せることができる。

【0123】

核酸分子に任意選択的に作動可能に連結することができるさらなる調節エレメントとしては、プロモーターエレメントとコードポリヌクレオチドとの間に位置する翻訳リーダーエレメントとして機能する5'UTR等がある。翻訳リーダー-エレメントは、完全にプロセシングされたmRNAに存在し、それは、一次転写物のプロセシングおよび/またはRNAの安定性に影響を及ぼし得る。翻訳リーダー配列の例としては、トウモロコシおよび

10

20

30

40

50

ペチュニア熱ショックタンパク質リーダー（米国特許第5,362,865号明細書）、植物ウイルス外被タンパク質、植物ルビスコリーダーおよびその他等がある。例えば、Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36を参照のこと。5'UTRの非限定的な例としては、GmHsp（米国特許第5,659,122号明細書）；PhDnAK（米国特許第5,362,865号明細書）；AtAnt1；TEV (Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7)；およびAGRtunos (GENBANK (商標)受託番号V00087；およびBevan et al. (1983) Nature 304:184-7)等がある。

【0124】

核酸に任意選択的に作動可能に連結することができる追加の調節エレメントとしては、
3'非翻訳配列、3'転写終結領域またはポリアデニル化領域等もある。これらは、ポリ
ヌクレオチドの下流に位置する遺伝エレメントであり、ポリアデニル化シグナル、および
/または転写またはmRNAプロセシングに影響を及ぼすことができる他の調節シグナル
をもたらすポリヌクレオチドを含む。ポリアデニル化シグナルは、植物においてmRNA
前駆体の3'末端へのポリアデニル酸ヌクレオチドの付加を引き起こすように機能する。
ポリアデニル化エレメントは、様々な植物遺伝子、またはT-DNA遺伝子に由来し得る。
3'転写終結領域の非限定的な例は、ノバリンシンターゼ3'領域 (nos 3'；Fral
ey et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7) である。異なる3'非翻訳
領域の使用の例は、Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1:671-80に示されている。
ポリアデニル化シグナルの非限定的な例としては、エンドウ (*Pisum sativum*) RbcS
2遺伝子 (Ps.RBcS2-E9；Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-9) および
AGRtunos (GENBANK (商標)受託番号E01312) からのもの等がある。

【0125】

いくつかの実施形態は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドに作動可能に連結した上述の調節配列の少なくとも1つを含む単離かつ精製DNA分子を含む植物形質転換ベクターを含み得る。発現した場合、該1つまたは複数のポリヌクレオチドは、害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）における天然RNA分子のすべてまたは一部と特異的に相補的であるポリヌクレオチドを含む1つまたは複数のiRNA分子（複数可）を生じさせる。したがって、該ポリヌクレオチド（複数可）は、標的鞘翅目および/または半翅目害虫RNA転写物内に存在するポリヌクレオチドのすべてまたは一部をコードするセグメントを含み得、標的害虫転写物のすべてまたは一部の逆向き反復配列を含み得る。植物形質転換ベクターは、複数の標的ポリヌクレオチドに特異的に相補的なポリヌクレオチドを含み、それにより、標的害虫の1つまたは複数の集団または種の細胞中の2つ以上の遺伝子の発現を阻害するための複数のdsRNAの生成を可能にし得る。異なる遺伝子に存在するポリヌクレオチドに特異的に相補的なポリヌクレオチドのセグメントは、トランスジェニック植物における発現のための单一複合核酸分子中に組み合わせることができる。そのようなセグメントは、連続していても、またはスペーサーにより分離されてもよい。

【0126】

いくつかの実施形態では、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチド（複数可）を既に含む本発明のプラスミドは、同じプラスミドにおける追加のポリヌクレオチド（複数可）の逐次的挿入により修飾することができ、追加のポリヌクレオチド（複数可）は、最初の少なくとも1つのポリヌクレオチド（複数可）と同じ調節エレメントに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、複数の標的遺伝子の阻害のために設計することができる。いくつかの実施形態では、阻害される複数の遺伝子は、同じ害虫（例えば、鞘翅目または半翅目）種から得ることができ、これにより、核酸分子の有効性が増大し得る。他の実施形態では、遺伝子は、異なる害虫から得ることができ、これにより、作用物質（複数可）が有効である害虫の範囲が拡大し得る。複数の遺伝子を抑制または発現と抑制の組合せの標的とする場合、ポリシストロン性DNAエレメントを作製することができる。

10

20

30

40

50

きる。

【0127】

本発明の組換え核酸分子またはベクターは、植物細胞等の形質転換細胞に選択可能な表現型を付与する選択可能マークーを含み得る。選択可能マークーは、本発明の組換え核酸分子を含む植物または植物細胞を選択するためにも用いることができる。マークーは、殺生物剤抵抗性、抗生物質抵抗性（例えば、カナマイシン、ジェネチシン（G 418）、ブレオマイシン、ハイグロマイシン等）または除草剤耐性（例えば、グリホセート等）をコードし得る。選択可能マークーの例は、カナマイシン抵抗性をコードし、カナマイシン、G 418 等を用いて選択することができるneo遺伝子；ピアラホス抵抗性をコードするbar遺伝子；グリホセート耐性をコードする突然変異E P S P シンターゼ遺伝子；プロモキシニルに対する抵抗性を付与するニトリラーゼ遺伝子；イミダゾリノンまたはスルホニル尿素耐性を付与する突然変異アセト乳酸シンターゼ（ALS）遺伝子；およびメトレキセート抵抗性DHFR 遺伝子であり得るが、これらに限定されない。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リコマイシン、メトレキセート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリン等に対する抵抗性を付与する複数の選択可能マークーが利用できる。そのような選択可能マークーの例は、例えば、米国特許第5,550,318号明細書、第5,633,435号明細書、第5,780,708号明細書および第6,118,047号明細書に示されている。

【0128】

本発明の組換え核酸分子またはベクターは、スクリーニング可能マークーも含み得る。スクリーニング可能マークーは、発現をモニターするために用いることができる。例示的なスクリーニング可能マークーとしては、様々な色原性基質が公知である酵素をコードする-グルクロニダーゼまたはuidA 遺伝子（GUS）（Jefferson et al. (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405）；植物組織におけるアントシアニン色素（赤色）の産生を調節する産物をコードするR遺伝子座遺伝子（DellaPorta et al. (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac." In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82）；-ラクタマーゼ遺伝子（Sutcliffe et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41）；様々な色原性基質が公知である酵素をコードする遺伝子（例えば、P A D A C、色原性セファロスボリン）；ルシフェラーゼ遺伝子（Ow et al. (1986) Science 234:856-9）；色原性カテコールを変換することができるカテコールジオキシゲナーゼをコードするxy1E 遺伝子（Zukowski et al. (1983) Gene 46(2-3):247-55）；アミラーゼ遺伝子（Ikeda et al. (1990) Bio/Technol. 8:241-2）；チロシンをDOPA およびドーパキノンに酸化し、これが次にメラニンに縮合することを可能にする酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子（Katz et al. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14）；および-ガラクトシダーゼ等がある。

【0129】

いくつかの実施形態では、上述の組換え核酸分子は、トランスジェニック植物の創製ならびに害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）に対する感受性の低下を示すトランスジェニック植物を調製するための植物における異種核酸の発現の方法に用いることができる。植物形質転換ベクターは、例えば、iRNA 分子をコードする核酸分子を植物形質転換ベクターに挿入し、これらを植物に導入することによって調製することができる。

【0130】

宿主細胞の形質転換の適切な方法としては、例えば、プロトプラストの形質転換による（例えば、米国特許第5,508,184号明細書参照）、乾燥/抑制媒介DNA 取込みによる（例えば、Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8参照）、エレクトロポレーションによる（例えば、米国特許第5,384,253号明細書参照）、炭化ケイ素纖維を用いた攪拌による（例えば、米国特許第5,302,523号明細書および第5,464,765号明細書参照）、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介形質

10

20

30

40

50

転換による（例えば、米国特許第5,563,055号明細書、第5,591,616号明細書、第5,693,512号明細書、第5,824,877号明細書、第5,981,840号明細書および第6,384,301号明細書参照）およびDNAコーティング粒子の促進による（例えば、米国特許第5,015,580号明細書、第5,550,318号明細書、第5,538,880号明細書、第6,160,208号明細書、第6,399,861号明細書および第6,403,865号明細書参照）等の、DNAを細胞に導入することができる方法等がある。コーンを形質転換するのにとりわけ有用な技術は、例えば、米国特許第7,060,876号明細書および第5,591,616号明細書ならびに国際PCT公開国際公開第95/06722号パンフレットに記載されている。これらのような技術の適用により、事実上あらゆる種の細胞を安定に形質転換させることができる。いくつかの実施形態では、形質転換DNAを宿主細胞のゲノムに組み込む。多細胞種の場合、トランスジェニック細胞をトランスジェニック生物に再生することができる。これらの技術のいずれも、例えば、トランスジェニック植物のゲノムに1つまたは複数のmRNA分子をコードする1つまたは複数の核酸を含むトランスジェニック植物を产生するのに用いることができる。

10

【0131】

発現ベクターを植物に導入するために最も広く用いられている方法は、アグロバクテリウム属(*Agrobacterium*)の天然の形質転換システムに基づいている。*A. tumefaciens*および*A. rhizogenes*は、植物細胞に遺伝的に形質転換を起こさせる植物病原性土壤細菌である。それぞれ*A. tumefaciens*(*A. tumefaciens*)および*A. rhizogenes*(*A. rhizogenes*)のTiおよびRiプラスミドは、植物の遺伝的形質転換に関与する遺伝子を運ぶ。Ti(腫瘍誘導)プラスミドは、形質転換植物に転移する、T-DNAとして公知である大きいセグメントを含む。Tiプラスミドの他のセグメントである、Vir領域は、T-DNA転移に関与する。T-DNA領域は、末端反復配列に隣接する。修飾バイナリーベクターにおいて、腫瘍誘導遺伝子が欠失しており、Vir領域の機能は、T-DNA境界エレメントが隣接する外来DNAを導入するために用いられる。T領域は、トランスジェニック細胞および植物の効率的な回収のための選択可能マークー、ならびに核酸をコードするdsRNA等の導入のためのポリヌクレオチドを挿入するための多重クローニング部位も含み得る。

20

【0132】

したがって、いくつかの実施形態では、植物形質転換ベクターは、*A. tumefaciens*(*A. tumefaciens*)のTiプラスミド(例えば、米国特許第4,536,475号明細書、第4,693,977号明細書、第4,886,937号明細書および第5,501,967号明細書ならびに欧州特許第0122791号明細書参照)または*A. rhizogenes*(*A. rhizogenes*)のRiプラスミドに由来する。追加の植物形質転換ベクターとしては、例えば、および制限なく、Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303:209-13; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7; Klee et al. (1985) Bio/Technol. 3:637-42により;および欧州特許第0120516号明細書に記載されているもの、ならびに前述のもののいずれかに由来するもの等がある。天然で植物と相互作用するシノリゾビウム属(*Sinorhizobium*)、リゾビウム属(*Rhizobium*)およびメソリゾビウム属(*Mesorhizobium*)等の他の細菌を、多くの多様な植物への遺伝子導入を媒介するように修飾することができる。これらの植物関連共生細菌は、非病害性Tiプラスミドおよび適切なバイナリーベクターの両方の獲得により遺伝子導入に適格にすることができる。

30

【0133】

外因性DNAをエント細胞に供給した後、形質転換細胞は、一般的にさらなる培養および植物再生のために同定される。形質転換細胞を同定する能力を改善するために、前述の選択可能またはスクリーニング可能マークー遺伝子を形質転換体を生成するために用いる形質転換ベクターとともに用いることを望むことができる。選択可能マークーを用いる場合、細胞を選択剤または複数の選択剤に曝露することにより、形質転換細胞は、形質転換された可能性のある細胞集団内で同定される。スクリーニング可能マークーを用いる場合

40

50

、所望のマーカー遺伝子形質について細胞をスクリーニングすることができる。

【0134】

選択剤への曝露で生残している細胞、またはスクリーニングアッセイで陽性と評価された細胞は、植物の再生を補助する培地中で培養することができる。いくつかの実施形態では、任意の適切な植物組織培養培地（例えば、M S および N 6 培地）は、成長調節剤等のさらなる物質を含めることにより改良することができる。植物再生努力を開始するのに十分な組織が利用できるまで、または手作業による選択を反復した後、組織の形態が再生に適するまで（例えば、少なくとも 2 週間）、組織を成長調節剤を含む基礎培地上に維持し、その後、芽条形成を促す培地に移す。十分な芽条形成が起こるまで、培養物を定期的に移す。芽条が形成されたならば、それらを根形成を促す培地に移す。十分な根が形成されたならば、さらなる成長および成熟のために植物を土壤に移すことができる。10

【0135】

再生植物における対象の核酸分子（例えば、鞘翅目および / または半翅目害虫における標的遺伝子発現を抑制する 1 つまたは複数の i R N A 分子をコードする D N A ）の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。そのようなアッセイとしては、例えば、サザンおよびノーザンプロットティング、P C R ならびに核酸配列決定等の分子生物学的アッセイ；例えば、免疫学的手段（E L I S A および / またはウェスタンプロット）によるまたは酵素機能によるタンパク質産物の存在の検出等の生化学的アッセイ；葉部または根部アッセイ等の植物部位アッセイ；ならびに全再生植物の表現型の解析等がある。20

【0136】

組込みイベントは、例えば、対象の核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いる P C R 増幅により解析することができる。P C R 遺伝子型決定は、ゲノムに組み込まれた対象の核酸分子を含むと予測された単離宿主植物カルス組織から得られた g D N A のポリメラーゼ連鎖反応（P C R ）増幅と、それに続く P C R 増幅産物の標準クローニングおよび配列解析を含むが、これらに限定されないと理解される。P C R 遺伝子型決定の方法は、十分に記載され（例えば、Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-53）、任意の植物種（例えば、Z . マイス（Z . mays ）または G . マクス（G . max ））または細胞培養物を含む組織型に由来する g D N A に適用することができる。30

【0137】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）依存性形質転換法を用いて形成されたトランスジェニック植物は、一般的に 1 つの染色体に挿入された単一組換え D N A を含む。該単一組換え D N A のポリヌクレオチドは、「トランスジェニックイベント」または「組込みイベント」と呼ばれる。そのようなトランスジェニック植物は、挿入外来ポリヌクレオチドに対して異型接合である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子に対して同型接合であるトランスジェニック植物は、単一外来遺伝子を含む独立分離トランスジェニック植物をそれ自体、例えば、T₀ 植物と性的に交配（自殖）して、T₁ 種子を產生することにより得ることができる。產生された T₁ 種子の 4 分の 1 は、導入遺伝子に対して同型接合となる。T₁ 種子を発芽させることにより、一般的に異型接合体と同型接合体との区別を可能にする S N P アッセイまたは熱増幅アッセイ（すなわち、接合性アッセイ）を用いて異型接合性について試験することができる植物が得られる。40

【0138】

特定の実施形態では、害虫（例えば、鞘翅目および / または半翅目）阻害効果を有する少なくとも 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 もしくは 10 種またはそれ以上の異なる i R N A 分子が植物細胞中で產生される。i R N A 分子（例えば、d s R N A 分子）は、異なる形質転換イベントで導入された複数の核酸から、または単一形質転換イベントで導入された単一核酸から発現させることができる。いくつかの実施形態では、複数の i R N A 分子が单一プロモーターの制御下で発現する。他の実施形態では、複数の i R N A 分子が複数のプロモーターの制御下で発現する。害虫の同じ種の異なる集団、あるいは害虫の異なる種の両方において、1 つもしくは複数の害虫内部の異なる遺伝子座（例えば、配列番号50

1または配列番号84で定義される遺伝子座)に対してそれぞれ相同である複数のポリヌクレオチドを含む单一iRNA分子を発現させることができる。

【0139】

組換え核酸分子による植物の直接形質転換に加えて、少なくとも1つのトランスジェニックイベントを有する第1の植物をそのようなイベントを欠いている第2の植物と交配することにより、トランスジェニック植物を作製することができる。例えば、iRNA分子をコードするポリヌクレオチドを含む組換え核酸分子を形質転換に適用できる第1の植物系統に導入して、トランスジェニック植物を産生することができ、そのトランスジェニック植物を第2の植物系統と交配して、iRNA分子をコードするポリヌクレオチドを第2の植物系統に移入することができる。

10

【0140】

いくつかの態様では、形質転換植物細胞から得られたトランスジェニック植物により生産された種子および商品生産物が含まれ、種子または商品生産物は、検出可能な量の本発明の核酸を含む。いくつかの実施形態では、そのような商品生産物は、例えば、トランスジェニック植物を得て、それらから食品または飼料を調製することによって生産することができる。本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む商品生産物としては、例えば、および制限なく、本発明の1つまたは複数の核酸を含む、植物の粗びき粉、油、粉碎もしくは全粒または種子、ならびに組換え植物または種子の粗びき粉、油、または粉碎もしくは全粒を含むあらゆる食品等がある。1つまたは複数の一次産品または商品生産物中の本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドの検出は、一次産品または商品生産物が、害虫(例えば、鞘翅目および/または半翅目)を防除する目的のために本発明の1つまたは複数のiRNA分子を発現するように設計されたトランスジェニック植物から生産されるという事実上の証拠である。

20

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子を含むトランスジェニック植物または種子は、制限なく、以下を含む、そのゲノムに少なくとも1つの他のトランスジェニックイベントも含み得る: 例えば、Caf1-180(米国特許出願公開第2012/0174258号明細書)、VatpaseC(米国特許出願公開第2012/0174259号明細書)、Rho1(米国特許出願公開第2012/0174260号明細書)、VatpaseH(米国特許出願公開第2012/0198586号明細書)、PPI-87B(米国特許出願公開第2013/0091600号明細書)、RPA70(米国特許出願公開第2013/0091601号明細書)およびRPS6(米国特許出願公開第2013/0097730号明細書)からなる群から選択される1つまたは複数の遺伝子座等の、配列番号1または配列番号84により定義されるもの以外の害虫における遺伝子座を標的とするiRNA分子が転写されるトランスジェニックイベント; 鞘翅目および/または半翅目害虫以外の生物(例えば、植物寄生線虫)における遺伝子を標的とするiRNA分子が転写されるトランスジェニックイベント; 殺虫タンパク質(例えば、バチルス・チューリンゲンシス(Bacillus thuringiensis)、アルカリゲネス(Alcaligenes)属種(例えば、米国特許出願公開第2014/0033361号明細書)またはシュードモナス(Psuedomonas)属種(例えば、PCT出願公開国際公開第2015/038734号パンフレット)殺虫タンパク質)をコードする遺伝子; 除草剤耐性遺伝子(例えば、グリホセートに対する耐性を与える遺伝子; ならびに収量の増加、脂肪酸代謝の変化または細胞質雄性不稔性の回復等のトランスジェニック植物における望ましい表現型に寄与する遺伝子。特定の実施形態では、植物病害および昆虫被害の防除の増大のための所望の形質を達成するために本発明のiRNA分子をコードするポリヌクレオチドを植物における他の昆虫防除および病害抵抗性形質と組み合わせることができる。異なる作用機序を用いる昆虫防除形質を組み合わせることは、単一の防除形質を有する植物と比べて優れた耐久性を有する保護トランスジェニック植物をもたらし得る。その理由は、例えば、形質(複数可)に対する抵抗性が圃場で起こる可能性が低いためである。

30

【0142】

40

50

V. 鞘翅目および/または半翅目害虫における標的遺伝子の抑制

A. 概要

本発明のいくつかの実施形態では、鞘翅目および/または半翅目害虫の防除に有用な少なくとも1つの核酸分子を鞘翅目および/または半翅目害虫に与えることができ、核酸分子は、害虫（複数可）におけるRNAi媒介遺伝子サイレンシングをもたらす。特定の実施形態では、iRNA分子（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA）を鞘翅目および/または半翅目宿主に与えることができる。いくつかの実施形態では、鞘翅目および/または半翅目害虫の防除に有用な核酸分子は、核酸分子を害虫と接触させることによって害虫に与えることができる。これらおよびさらなる実施形態では、鞘翅目および/または半翅目害虫の防除に有用な核酸分子は、害虫の給餌基体、例えば、栄養組成物に加えることができる。これらおよびさらなる実施形態では、鞘翅目および/または半翅目害虫の防除に有用な核酸分子は、害虫により摂取される核酸分子を含む植物物質の摂取により与えることができる。特定の実施形態では、核酸分子は、植物物質に導入された組換え核酸の発現により、例えば、組換え核酸を含むベクターによる植物細胞の形質転換および形質転換植物細胞からの植物物質または全植物の再生により、植物物質中に存在する。

10

【0143】

B. RNAi媒介遺伝子抑制

複数の実施形態では、本発明は、例えば、標的ポリヌクレオチドと特異的に相補的であるポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの鎖を含むiRNA分子を設計することにより、害虫（例えば、鞘翅目（例えば、WCRもしくはNCR）または半翅目（例えば、BSB）害虫）のトランスクリプトームにおける必須天然ポリヌクレオチド（例えば、必須遺伝子）を標的とするように設計することができるiRNA分子（例えば、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNAおよびhpRNA）を提供する。そのように設計されたiRNA分子の配列は、標的ポリヌクレオチドと同一であり得るか、あるいはiRNA分子とその標的ポリヌクレオチドとの間の特異的ハイブリダイゼーションを妨げないミスマッチを取り込み得る。

20

【0144】

本発明のiRNA分子を害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）における遺伝子抑制の方法に用い、それにより、植物（例えば、iRNA分子を含む保護形質転換植物）における害虫によってもたらされる被害のレベルまたは発生率を低下させることができる。本明細書で用いているように、「遺伝子抑制」という用語は、発現の転写後抑制および転写抑制を含む遺伝子またはコードポリヌクレオチドからのタンパク質発現の低下を含む、mRNAへの遺伝子転写およびmRNAのその後の翻訳の結果として産生されるタンパク質のレベルを低下させる周知の方法のいずれかを意味する。転写後抑制は、抑制の標的とする遺伝子から転写されたmRNAのすべてまたは一部と抑制のために用いる対応するiRNA分子との間の特異的相同性によって媒介される。さらに、転写後抑制は、リポソームによる結合のために細胞内で利用できるmRNAの量の実質的かつ測定可能な低下を意味する。

30

【0145】

iRNA分子がdsRNA分子である実施形態では、dsRNA分子は、酵素であるDicerによって短いsiRNA分子（長さが約20ヌクレオチド）に切断され得る。dsRNA分子に対するDicer活性により生じた二本鎖siRNA分子は、2つの一本鎖siRNA、すなわち「パッセンジャー鎖」と「ガイド鎖」に分離され得る。パッセンジャー鎖は、分解することができ、ガイド鎖は、RISCに取り込むことができる。転写後抑制は、ガイド鎖とmRNA分子の特異的に相補的なポリヌクレオチドとの特異的ハイブリダイゼーションおよびその後のアルゴノート（RISC複合体の触媒構成成分）酵素による切断によって起こる。

40

【0146】

本発明の実施形態では、あらゆる形態のiRNA分子を用いることができる。当業者は

50

、 ds RNA 分子が、調製中および細胞に siRNA 分子を供給するステップ中に一般的に一本鎖 RNA 分子よりも安定であり、細胞中でも一般的により安定であることを理解するであろう。したがって、例えば、 siRNA および miRNA 分子は、いくつかの実施形態では同等に有効であり得るが、 dsRNA 分子をその安定性のため選択することができる。

[0 1 4 7]

特定の実施形態では、*in vitro*で発現させて、害虫（例えば、鞘翅目および/または半翅目）のゲノム内のポリヌクレオチドによりコードされる核酸分子と実質的に相同であるiRNA分子を生成することができる、ポリヌクレオチドを含む核酸分子を提供する。特定の実施形態では、*in vitro*転写iRNA分子は、ステム-ループ構造を含む安定化dsRNA分子であり得る。害虫が*in vitro*転写iRNA分子と接触した後、害虫における標的遺伝子（例えば、必須遺伝子）の転写後阻害が起こり得る。

[0 1 4 8]

本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 19 個の連続したヌクレオチド）を含む核酸分子の発現を害虫（例えば、鞘翅目および / または半翅目）における標的遺伝子の転写後阻害の方法に用い、ポリヌクレオチドは、配列番号 1；配列番号 1 の相補体；配列番号 1 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 1 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コードポリヌクレオチド；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コードポリヌクレオチドから発現した RNA の相補体；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コードポリヌクレオチドから発現した RNA；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コードポリヌクレオチドから発現した RNA の相補体；配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コードポリヌクレオチドから発現した RNA の相補体；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物（例えば、WCR）の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 1 を含むディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；および配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアプロティカ属 (Diabrotica) 生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体からなる群から選択される。特定の実施形態では、前述のもののいずれかと少なくとも約 80% 同一（例えば、79%、約 80%、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 100% および 100%）である核酸分子の発現を用いることができる。これらおよびさらなる実施形態では、害虫（例えば、鞘翅目および / または半翅目）の少なくとも 1 つの細胞中に存在する RNA 分子に特異的にハイブリダイズする核酸分子を発現させることができる。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの核酸分子の発現を鞘翅目害虫における標的遺伝子の転写後阻害の方法に用いることができ、ヌクレオチド配列は、配列番号 1；配列番号 1 の相補体；配列番号 1 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 1 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 1 を含むディアブロティカ属 (*Diabrotica*) 生物（例えば、WCR）の天然コード配列；配列番号 1 を含むディアブロティカ属 (*Diabrotica*) 生物（例えば、WCR）の天然コード配列の相補体；配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアブロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然非コード配列；配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアブロティカ属 (*Diabrotica*) 生物の天然非コード配列の相補体；配列番号 1 を含むディアブロティカ属 (*Diabrotica*) 生

物（例えば、W C R）の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 1 を含むディアプロティカ属（Diabrotica）生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアプロティカ属（Diabrotica）生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；および配列番号 1 を含む天然 RNA 分子に転写されるディアプロティカ属（Diabrotica）生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体からなる群から選択される。特定の実施形態では、前述のもののいずれかと少なくとも 80 % 同一（例えば、80 %、約 81 %、約 82 %、約 83 %、約 84 %、約 85 %、約 86 %、約 87 %、約 88 %、約 89 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 100 % および 100 %）である核酸分子の発現を用いることができる。これらおよびさらなる実施形態では、鞘翅目害虫の少なくとも 1 つの細胞中に存在する RNA 分子に特異的にハイブリダイズする核酸分子を発現させることができる。特定の例において、そのような核酸分子は、配列番号 1 を含むヌクレオチド配列を含み得る。10

【0150】

本発明の特定の実施形態では、ヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含む核酸分子の発現を半翅目害虫における標的遺伝子の転写後阻害の方法に用いることができ、ヌクレオチド配列は、配列番号 84；配列番号 84 の相補体；配列番号 84 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 84 の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 84 を含む半翅目生物の天然コード配列；配列番号 84 を含む半翅目生物の天然コード配列の相補体；配列番号 84 を含む天然 RNA 分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列；配列番号 84 を含む天然 RNA 分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の相補体；配列番号 84 を含む天然 RNA 分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の相補体；配列番号 84 を含む半翅目生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；配列番号 84 を含む半翅目生物の天然コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体；配列番号 84 を含む天然 RNA 分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片；および配列番号 84 を含む天然 RNA 分子に転写される半翅目生物の天然非コード配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドの断片の相補体からなる群から選択される。特定の実施形態では、前述のもののいずれかと少なくとも 80 % 同一（例えば、80 %、約 81 %、約 82 %、約 83 %、約 84 %、約 85 %、約 86 %、約 87 %、約 88 %、約 89 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 100 % および 100 %）である核酸分子の発現を用いることができる。これらおよびさらなる実施形態では、半翅目害虫の少なくとも 1 つの細胞中に存在する RNA 分子に特異的にハイブリダイズする核酸分子を発現させることができる。特定の例において、そのような核酸分子は、配列番号 84 を含むヌクレオチド配列を含み得る。20

【0151】

RNA i 転写後抑制システムが、遺伝子突然変異、系統多型または進化的分岐のため予想され得る標的遺伝子における配列変動に耐えることができるることは、本明細書におけるいくつかの実施形態の重要な特徴である。導入される核酸分子が標的遺伝子の一次転写産物または完全にプロセシングされた mRNA と特異的にハイブリダイズされる限り、導入される核酸分子は、標的遺伝子の一次転写産物または完全にプロセシングされた mRNA と絶対的に相同である必要はあり得ない。さらに、導入される核酸分子は、標的遺伝子の一次転写産物または完全にプロセシングされた mRNA に対して、全長である必要はあり得ない。30

【0152】

本発明の i RNA 技術を用いる標的遺伝子の阻害は、配列特異的である。すなわち、i RNA 分子（複数可）と実質的に相同的のポリヌクレオチドは、遺伝的阻害の標的となる。いくつかの実施形態では、標的遺伝子の一部と同一のヌクレオチド配列を有するポリヌク40

レオチドを含むRNA分子を阻害のために用いることができる。これらおよびさらなる実施形態では、標的ポリヌクレオチドと比べて1つまたは複数の挿入、欠失および／または点突然変異を有するポリヌクレオチドを含むRNA分子を用いることができる。特定の実施形態では、iRNA分子と標的遺伝子の一部は、例えば、少なくとも約80%以上、少なくとも約81%以上、少なくとも約82%以上、少なくとも約83%以上、少なくとも約84%以上、少なくとも約85%以上、少なくとも約86%以上、少なくとも約87%以上、少なくとも約88%以上、少なくとも約89%以上、少なくとも約90%以上、少なくとも約91%以上、少なくとも約92%以上、少なくとも約93%以上、少なくとも約94%以上、少なくとも約95%以上、少なくとも約96%以上、少なくとも約97%以上、少なくとも約98%以上、少なくとも約99%以上、少なくとも約100%以上、および100%の配列同一性を共有し得る。あるいは、dsRNA分子の二重らせん領域は、標的遺伝子転写物の一部と特異的にハイブリダイズ可能であり得る。特異的にハイブリダイズ可能な分子において、より大きい相同性を示す全長に満たないポリヌクレオチドは、より長く、より低い相同性のポリヌクレオチドを補う。標的遺伝子転写物の一部と同一であるdsRNA分子の二重らせん領域のポリヌクレオチドの長さは、少なくとも約25、50、100、200、300、400、500または少なくとも約1000塩基であり得る。いくつかの実施形態では、20～100ヌクレオチドを超えるポリヌクレオチドを用いることができる。特定の実施形態では、約200～300ヌクレオチドを超えるポリヌクレオチドを用いることができる。特定の実施形態では、標的遺伝子のサイズによって、約500～1000ヌクレオチドを超えるポリヌクレオチドを用いることができる。
。

10

20

30

40

50

【0153】

特定の実施形態では、害虫（例えば、鞘翅目または半翅目）における標的遺伝子の発現は、著しい抑制が起こるように、害虫の細胞内で少なくとも10%、少なくとも33%、少なくとも50%、または少なくとも80%抑制され得る。著しい抑制は、検出可能な表現型をもたらす閾値を超える抑制（例えば、成長の停止、摂食の停止、発育の停止、死の誘発等）、あるいはRNAの検出可能な減少および／または標的遺伝子に対応する遺伝子産物が抑制されることを意味する。本発明の特定の実施形態では、抑制は、害虫の実質的にすべての細胞で起こるが、他の実施形態では、抑制は、標的遺伝子を発現する細胞のサブセットでのみ起こる。

【0154】

いくつかの実施形態では、転写抑制は、「プロモータートランス抑制」と呼ばれることを達成するように、プロモーターDNAまたはその相補体との実質的な配列同一性を示すdsRNA分子の細胞中の存在によって媒介される。遺伝子抑制は、例えば、dsRNA分子を含む植物物質を摂取またはそれと接触することにより、そのようなdsRNA分子を摂取またはそれと接触し得る害虫における標的遺伝子に対して有効であり得る。プロモータートランス抑制に用いるdsRNA分子は、害虫の細胞中の1つまたは複数の相同または相補的ポリヌクレオチドの発現を阻害または抑制するように特別に設計することができる。植物細胞における遺伝子発現を調節するためのアンチセンスまたはセンス配向RNAによる転写後遺伝子抑制は、米国特許第5,107,065号明細書、第5,759,829号明細書、第5,283,184号明細書および第5,231,020号明細書に開示されている。

【0155】

C. 害虫に与えるiRNA分子の発現

害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）におけるRNAi媒介遺伝子抑制のためのiRNA分子の発現は、多くのin vitroまたはin vivo方式のいずれか1つにより行うことができる。iRNA分子は、次に、例えば、iRNA分子を害虫と接触させることにより、または害虫にiRNA分子を摂取もしくは別の方法でインターナリゼーションさせることにより、害虫に与えることができる。いくつかの実施形態は、鞘翅目および／または半翅目害虫の形質転換宿主植物、形質転換植物細胞ならびに形質転換植

物の子孫を含む。形質転換植物細胞および形質転換植物は、害虫保護効果をもたらすために、例えば、異種プロモーターの制御下で1つまたは複数のiRNA分子を発現するように工学的に操作することができる。したがって、形質転換植物および植物細胞が摂食時に害虫により消費される場合、害虫は、トランスジェニック植物または細胞において発現したiRNA分子を摂取し得る。本発明のポリヌクレオチドは、様々な原核および真核微生物宿主に導入して、iRNA分子を生成することもできる。「微生物」という用語は、細菌および菌類等の原核および真核種を含む。

【0156】

遺伝子発現の調節は、そのような発現の部分的または完全な抑制を含み得る。他の実施形態では、害虫（鞘翅目および／または半翅目）における遺伝子発現の抑制の方法は、その少なくとも1つのセグメントが害虫の細胞内のmRNA配列と相補的である、本明細書で述べたポリヌクレオチドの転写後に形成された遺伝子抑制量の少なくとも1つのdsRNA分子を害虫の宿主の組織に供給することを含む。害虫により摂取された、siRNA、miRNA、shRNAまたはhpRNA分子等のその変形態様を含む、dsRNA分子は、例えば、配列番号1または配列番号84からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含むCOP1 alpha DNA分子から転写されたRNA分子と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または約100%同一であり得る。したがって、それらに導入された場合、害虫における内因性コードポリヌクレオチドまたは標的コードポリヌクレオチドの発現を抑制または阻害する、dsRNA分子を得るために非天然ポリヌクレオチドおよび組換えDNA構築物を含むが、これらに限定されない単離され、実質的に精製された核酸分子を提供する。

10

20

30

40

【0157】

特定の実施形態は、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）植物における1つまたは複数の標的遺伝子（複数可）の転写後阻害ならびに植物害虫の集団の防除のためのiRNA分子の送達のための送達システムを提供する。いくつかの実施形態では、送達システムは、宿主細胞中で転写されたRNA分子を含む宿主トランスジェニック植物細胞または宿主細胞の内容物の摂取を含む。これらおよびさらなる実施形態では、本発明の安定化dsRNA分子を供給する(providing)組換えDNA構築物を含むトランスジェニック植物細胞またはトランスジェニック植物を創製する。特定のiRNA分子をコードする核酸を含むトランスジェニック植物細胞またはトランスジェニック植物は、組換えDNA技術（当技術分野で周知である基本技術）を用いて、本発明のiRNA分子（例えば、安定化dsRNA分子）をコードするポリヌクレオチドを含む植物形質転換ベーターを構築し、植物細胞または植物を形質転換し、転写iRNA分子を含むトランスジェニック植物細胞またはトランスジェニック植物を生成することにより、產生することができる。

【0158】

トランスジェニック植物に害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）からの保護を与えるために、例えば、組換えDNA分子をdsRNA分子、siRNA分子、miRNA分子、shRNA分子またはhpRNA分子等のiRNA分子に転写することができる。いくつかの実施形態では、組換えDNA分子から転写されたRNA分子は、組換え植物の組織または液内でdsRNA分子を形成し得る。そのようなdsRNA分子は、宿主植物に寄生し得る種類の害虫体内のDNAから転写される対応するポリヌクレオチドと同一であるポリヌクレオチドから一部構成され得る。害虫体内の標的遺伝子の発現は、dsRNA分子により抑制され、害虫における標的遺伝子の発現の抑制は、トランスジェニック植物が害虫への抵抗をもたらす。dsRNA分子の調節作用は、例えば、ハウスキーピング遺伝子を含む、細胞代謝または細胞形質転換に関与する内因性遺伝子；転写因子；脱皮関連遺伝子；ならびに細胞の代謝または正常な成長および発育に関与するポリペプチドをコードする他の遺伝子を含む、害虫において発現する様々な遺伝子に適用できることが示された。

【0159】

50

導入遺伝子からの i n v i v o での、または発現構築物からの転写のために、調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーおよびポリアデニル化シグナル）をいくつかの実施形態で用いて、RNA鎖（または（複数の）鎖）を転写することができる。したがって、いくつかの実施形態では、上述のように、i RNA分子を生成するのに用いるポリヌクレオチドは、植物宿主細胞中の機能し得る 1 つまたは複数のプロモーターエレメントに作動可能に連結することができる。プロモーターは、通常、宿主ゲノムに常在する内因性プロモーターであり得る。本発明のポリヌクレオチドは、作動可能に連結したプロモーターエレメントの制御下で、その転写および／または得られる転写物の安定性に有利に作用するさらなるエレメントにより両側に隣接され得る。そのようなエレメントは、作動可能に連結したプロモーターの上流、発現構築物の 3' 末端の下流に位置し、プロモーターの上流と発現構築物の 3' 末端の下流の両方に存在し得る。

10

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態は、植物を常食とする害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）により引き起こされる宿主植物（例えば、コーン植物体）の被害を低減する方法であって、本発明の少なくとも 1 つの核酸分子を発現する形質転換植物細胞を宿主植物に供給することを含み、核酸分子（複数可）が、害虫（複数可）により取り込まれることにより機能して、害虫（複数可）体内の標的ポリヌクレオチドの発現を抑制し、発現の抑制が、害虫（複数可）の死亡、および／または成長の低下をもたらし、それにより、害虫より引き起こされる宿主植物の被害を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、核酸分子（複数可）は、d s RNA 分子を含む。これらおよびさらなる実施形態では、核酸分子（複数可）は、それぞれが鞘翅目および／または半翅目害虫細胞中で発現する核酸分子と特異的にハイブリダイズ可能な複数のポリヌクレオチドを含む d s RNA 分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子（複数可）は、害虫細胞中で発現する核酸分子と特異的にハイブリダイズ可能な 1 つのポリヌクレオチドからなる。

20

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、コーン作物の収量を増加させる方法であって、本発明の少なくとも 1 つの核酸分子をコーン植物に導入することと、核酸を含む i RNA 分子の発現を可能にするためにコーン植物を培養することとを含み、核酸を含む i RNA 分子の発現が、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）の被害ならびに／あるいは成長を抑制し、それにより、害虫の寄生による収量低下を低減または解消する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、i RNA 分子は、d s RNA 分子である。これらおよびさらなる実施形態では、核酸分子（複数可）は、それぞれ害虫細胞中で発現する核酸分子と特異的にハイブリダイズすることができる複数のポリヌクレオチドを含む d s RNA 分子を含む。いくつかの例において、核酸分子（複数可）は、鞘翅目および／または半翅目害虫細胞中で発現する核酸分子と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。

30

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、害虫（例えば、鞘翅目および／または半翅目）における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、本発明の少なくとも 1 つの i RNA 分子をコードする、ポリヌクレオチドがプロモーターおよび転写終結エレメントに作動可能に連結されている、ポリヌクレオチドを含むベクターにより植物細胞を形質転換することと、複数の形質転換植物細胞を含む植物細胞培養物の発育を可能にするのに十分な条件下で形質転換植物細胞を培養することと、ポリヌクレオチドをそのゲノムに組み込んだ形質転換植物細胞を選択することと、組み込まれたポリヌクレオチドによりコードされる i RNA 分子の発現について形質転換植物細胞をスクリーニングすることと、i RNA 分子を発現するトランスジェニック植物細胞を選択することと、害虫に選択されたトランスジェニック植物細胞を食餌として与えることとを含む、方法を提供する。植物も、組み込まれた核酸分子によりコードされる i RNA 分子を発現する形質転換植物細胞から再生させることができる。いくつかの実施形態では、i RNA 分子は、d s RNA 分子である。これらおよびさらなる実施形態では、核酸分子（複数可）は、それぞれ害虫細胞中で発現する核酸分子と

40

50

特異的にハイブリダイズすることができる複数のポリヌクレオチドを含む d s R N A 分子を含む。いくつかの例において、核酸分子（複数可）は、鞘翅目および / または半翅目害虫細胞中で発現する核酸分子と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。

【 0 1 6 3 】

本発明の i R N A 分子は、植物細胞のゲノムに取り込まれた、または植え付けの前の種子に適用されるコーティングもしくは種子処理に取り込まれるような組換え遺伝子からの発現の産物として、植物種（例えば、コーン）の種子に取り込むことができる。組換え遺伝子を含む植物細胞は、トランスジェニックイベントであると考えられる。本発明の実施形態に害虫（例えば、鞘翅目および / または半翅目）への i R N A 分子の送達のための送達システムも含まれる。例えば、本発明の i R N A 分子は、害虫（複数可）の細胞に直接導入することができる。導入の方法は、i R N A と害虫（複数可）の宿主の植物組織との直接混合、ならびに宿主植物組織への本発明の i R N A 分子を含む組成物の施用を含み得る。例えば、i R N A 分子は、植物表面上に噴霧することができる。あるいは、i R N A 分子は、微生物により発現させることができ、微生物は、植物表面上に塗布することができ、または注入等の物理的手段により根もしくは幹に導入することができる。上で述べたように、トランスジェニック植物は、植物に寄生することができる公知の害虫を殺すのに十分な量で少なくとも 1 つの i R N A 分子を発現するように工学的に操作することもできる。化学または酵素合成により生成した i R N A 分子は、一般的農業慣行と調和した方法で製剤化することもでき、害虫による植物被害を防除するためのスプレー式製品として用いることができる。製剤は、効果的な葉の被覆に必要な適切なアジュバント（例えば、展着剤および湿潤剤）、ならびに U V 損傷から i R N A 分子（例えば、d s R N A 分子）を保護するための U V 保護剤を含み得る。そのような添加物は、生物殺虫剤産業で一般的に用いられており、当業者に周知である。そのような施用は、害虫からの植物の保護を向上させるために他のスプレー式殺虫剤施用（生物学的に基づくまたは別の方法）と組み合わせることができる。

【 0 1 6 4 】

本明細書で引用した刊行物、特許および特許出願を含む、すべての参考文献は、本開示の明示的詳細と不一致でない程度まで、参照によって本明細書に組み込まれ、したがって、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個別かつ具体的に示され、本明細書にその全体が記載されていたかのようなことと同じ程度に組み込まれる。本明細書で述べた参考文献は、本出願の出願日の前のそれらの開示についてのみ記載する。本明細書における何物も、発明者らが先行発明によるそのような開示に先行する権利を与えられないことの容認と解釈すべきでない。

【 0 1 6 5 】

以下の実施例は、特定の個別の特徴および / または態様を例示するために示す。これらの実施例は、述べる特定の特徴または態様に本開示を限定するものと解釈すべきではない。

【 実施例 1 】

【 0 1 6 6 】

昆虫食餌バイオアッセイ

試料の調製およびバイオアッセイ いくつかの d s R N A 分子（C O P I a l p h a r e g 1（配列番号 3）、C O P I a l p h a r e g 2（配列番号 4）、C O P I a l p h a v e r 1（配列番号 7 2）、C O P I a l p h a v e r 2（配列番号 7 3）、C O P I a l p h a v e r 3（配列番号 7 4）および C O P I a l p h a v e r 4（配列番号 7 5）に対応するものを含む）を M E G A S C R I P T（登録商標）R N A i キットを用いて合成し、精製した。精製 d s R N A 分子は、T E 緩衝液に入れて用意し、すべてのバイオアッセイは、W C R（ディアプロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ（Diabrotica virgifera virgifera）ルコント）の死および成長阻害についてのバックグラウンド基準としての役割を果たした、この緩衝液からなる対照処理を含ん

10

20

30

40

50

でいた。バイオアッセイ緩衝液中の dsRNA 分子の濃度は、NANO DROP (商標) 8000 分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington, DE) を用いて測定した。

【0167】

人工昆虫飼料を給餌した新生幼虫を用いて実施したバイオアッセイにおける昆虫活性について試料を試験した。WCR卵は、CROP CHARACTERISTICS, INC. (Farmington, MN) から入手した。

【0168】

バイオアッセイは、昆虫バイオアッセイ用に特別に設計された (C - D INTERNATIONAL, Pitman, NJ) 128 ウエルプラスチックトレーで実施した。各ウエルは、鞘翅目昆虫の成長用に設計された約 1.0 mL の人工飼料を含んでいた。dsRNA 試料の 60 μL アリコートを各ウエルの飼料の表面上にピペットにより送達した (40 μL / cm²)。dsRNA 試料の濃度は、ウエルにおける表面積 (1.5 cm²) の 1 平方センチメートル当たりの dsRNA の量 (ng / cm²) として計算した。処理トレーは、飼料表面上の液体が蒸発するかまたは飼料中に吸収されるまで、フュームフード内に保持した。

【0169】

羽化の数時間以内に、個々の幼虫を湿らせたラクダ毛ブラシで捕捉し、処理飼料上にのせた (1 ウエル当たり 1 または 2 匹の幼虫)。次いで、128 ウエルプラスチックトレーの寄生ウエルを透明プラスチックの粘着性シートで密封し、ガス交換を可能にするために通気孔をつけた。バイオアッセイトレーを制御された環境条件下 (28 °C, 相対湿度約 40 %, 16 : 8 (明 / 暗)) で 9 日間保持し、その後、各試料に曝露した昆虫の総数、死亡昆虫の数および生存昆虫の体重を記録した。平均死亡百分率および平均成長阻害を各処理について計算した。成長阻害 (GI) は、以下のように計算した。

$$GI = [1 - (TWITT / TNIT) / (TWIBC / TNIBC)]$$

ここで、TWITT は、処理における生存昆虫の総体重であり、TNIT は、処理における昆虫の総数であり、TWIBC は、バックグラウンド基準 (緩衝液対照) における生存昆虫の総体重であり、TNIBC は、バックグラウンド基準 (緩衝液対照) における昆虫の総数である。

【0170】

統計解析は、JMP (商標) ソフトウェア (SAS, Cary, NC) を用いて行った。

【0171】

LC₅₀ (致死濃度) は、試験昆虫の 50 % が殺される用量と定義される。GI₅₀ (成長阻害) は、試験昆虫の平均成長 (例えば、生存体重) がバックグラウンド基準試料で認められる平均値の 50 % である用量と定義される。

【0172】

反復したバイオアッセイで、個々の試料の摂取が、トウモロコシ根切り虫幼虫の驚くべきおよび予期しない死亡および成長阻害をもたらしたことが示された。

【実施例 2】

【0173】

候補標的遺伝子の同定

RNAi トランスジェニック植物昆虫抵抗性技術による防除のための候補標的遺伝子配列を得るためのプールされたトランスクリプトームの解析のために WCR (ディアプロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ (Diabrotica virgifera virgifera) ルコント) の発育の複数の段階を選択した。

【0174】

一適例において、以下のフェノール / TRI REAGENT (登録商標) に基づく方法 (MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH) を用いて、全 RNA を約 0.9 g m の全初齢 WCR 幼虫 (孵化後 4 ~ 5 日; 16 °C) に

10

20

30

40

50

保持)から単離し、精製した。

【0175】

幼虫を、均一な懸濁液が得られるまで、10 mLのTRI REAGENT(登録商標)を含む15 mLホモジナイザーで室温でホモジナイズした。室温での5分のインキュベーションの後に、ホモジネートを1.5 mL小遠心管に分配し(1本の管につき1 mL)、200 μ Lのクロロホルムを加え、混合物を15秒間激しく振とうした。抽出物を室温で10分間静置した後、4度で12000 $\times g$ で遠心分離することにより相を分離した。上相(約0.6 mLを構成する)を他の滅菌済み1.5 mL管に注意深く移し、等容積の室温のイソプロパノールを加えた。室温で5~10分間インキュベートした後、混合物を12000 $\times g$ (4または25)で8分間遠心分離した。

10

【0176】

上清を注意深く除去し、捨て、毎回の洗浄後に7500 $\times g$ (4または25)で5分間の遠心分離により回収して、RNAペレットを75%エタノールを用いてボルテックスすることにより2回洗浄した。エタノールを注意深く除去し、ペレットを3~5分間風乾し、次いで、ヌクレアーゼ不含有滅菌水に溶解した。RNA濃度は、260 nmおよび280 nmでの吸光度(A)を測定することにより決定した。約0.9 g mの幼虫からの一般的な抽出により、1.9のA₂₆₀/A₂₈₀比を有する1 mgを超える全RNAが得られた。そのように抽出されたRNAは、さらなる処理まで-80度で保存した。

【0177】

RNAの質は、アリコートを1%アガロースゲルに通すことにより判断した。アガロースゲル溶液は、高圧滅菌済み容器中でDEPC(ジエチルピロカーボネート)処理水で希釈した高圧滅菌済み10×TAE緩衝液(トリス・酢酸・EDTA; 1×濃度は0.04 Mトリス・酢酸、1 mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩)、pH 8.0)を用いて調製した。1×TAEをランニング緩衝液として用いた。使用前に、電気泳動槽およびウエル形成コームをRNase AWAY(商標)(INVITROGEN INC.、Carlsbad、CA)で清浄にした。2 μ LのRNA試料を8 μ LのTE緩衝液(10 mMトリスHCl pH 7.0; 1 mM EDTA)および10 μ LのRNA試料緩衝液(NOVAGEN(登録商標)カタログ番号70606; EMD4 Bioscience、Gibbstown、NJ)と混合した。試料を70度で3分間加熱し、室温に冷却し、1ウエル当たり5 μ L(1 μ L~2 μ LのRNAを含む)をロードした。分子の大きさの比較のために市販のRNA分子量マーカーを同時に別個のウエルで実験にかけた。ゲルは、60ボルトで2時間実験にかけた。

20

【0178】

標準化cDNAライブラリーは、商業サービス提供会社(EUROFINS MWG Operon、Huntsville、AL)によってランダムプライミングを用いて幼虫の全RNAから作製された。標準化幼虫cDNAライブラリーは、EUROFINS MWG OperonにおいてGS FLX 454 Titanium(商標)シリーズ化学により1/2プレートスケールで配列決定がなされ、これにより、348 bpの平均リード長を有する600,000を超えるリードが得られた。350,000リードが50,000を超えるコンティグにアセンブルされた。非アセンブルリードおよびコンティグの両方が公開プログラムであるFORMATDB(NCBIから入手できる)を用いてBLASTableデータベースに変換された。

30

【0179】

他のWCR発育段階で集められた物質から全RNAおよび標準化cDNAライブラリーが同様に作製された。様々な発育段階を代表するcDNAライブラリーメンバーを合わせることによって標的遺伝子スクリーニング用のプールされたトランスクリプトームライブラリーが構築された。

40

【0180】

ショウジョウバエ属(*Drosophila*)およびコクヌストモドキ(*Tribolium*)等の他の昆虫における特定の遺伝子の致死性RNAi効果に関する情報を用いてRNAiターゲティ

50

ングのための候補遺伝子を選択した。これらの遺伝子は、鞘翅目昆虫における生存および成長に必須であるという仮説が立てられた。選択された標的遺伝子ホモログが下記のようにトランスクリプトーム配列データベースにおいて同定された。二本鎖RNA(dsRNA)の生成のための鋳型を作製するために標的遺伝子の全長または部分配列をPCRにより増幅した。

【0181】

候補タンパク質コード配列を用いたBLASTN検索を非アセンブルディアプロティカ属(Diabrotica)配列リードまたはアセンブルコンティグを含むBLASTableデータベースに対して行った。BLASTXを用いてディアプロティカ属(Diabrotica)配列への有意なヒット(コンティグ相同意について e^{-20} より良好、非アセンブル配列リード相同意について e^{-10} より良好と定義)がNCBI非冗長データベースに対して確認された。このBLASTX検索の結果は、BLASTN検索で同定されたディアプロティカ属(Diabrotica)ホモログ候補遺伝子配列が実際にディアプロティカ属(Diabrotica)遺伝子を含んでいたか、またはディアプロティカ属(Diabrotica)配列に存在する非ディアプロティカ属(Diabrotica)候補遺伝子配列へのベストヒットであったことを確認するものであった。ほとんどの場合に、タンパク質をコードすると注釈をつけられたコクヌストモドキ(Tribolium)候補遺伝子は、ディアプロティカ属(Diabrotica)トランスクリプトーム配列における配列または複数の配列との明確な配列相同意を示した。少数の場合に、ディアプロティカ属(Diabrotica)コンティグの一部または非ディアプロティカ属(Diabrotica)候補遺伝子との相同意により選択された非アセンブル配列が重複していたこと、およびコンティグのアセンブリがこれらの重複に加わらなかつたことが明らかであった。これらの場合、Sequencher(商標)v4.9(GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI)を用いて、配列をより長いコンティグにアセンブルした。

10

20

30

30

40

50

【0182】

ディアプロティカ属(Diabrotica)COPI alphaをコードする候補標的遺伝子(配列番号1)は、鞘翅目害虫の死、成長の抑制、発育の抑制またはWCRにおける生殖の抑制をもたらし得る遺伝子として同定された。

【0183】

WCR COPI alphaとの相同意を有する遺伝子

COPIは、シスゴルジ膜上の発芽過程を阻害する特異的な外被タンパク質複合体を意味する(Nickel, et al. 2002. Journal of Cell Science 115, 3235-3240)。COPIコートマー複合体は、7つのサブユニットからなる。COPIコートマー-ALPHAは、サブユニットの1つである。該複合体の機能は、ゴルジ複合体のシス末端から小胞を、それらが最初に合成された、粗面小胞体に運び戻すことである。このドメインも含む他のディアプロティカ・ヴィルギフェラ(Diabrotica virgifera)タンパク質は、構造および/または機能特性を共有する可能性があり、したがって、これらのタンパク質の1つをコードする遺伝子は、鞘翅目害虫の死、成長の抑制、発育の抑制またはWCRにおける生殖の抑制をもたらし得る候補標的遺伝子を含む可能性がある。

【0184】

配列番号1の配列は、新規である。該配列は、公開データベースに収載されておらず、国際公開第2011/025860号パンフレット、米国特許出願公開第20070124836号明細書、米国特許出願公開第20090306189号明細書、米国特許出願公開第20070050860号明細書、米国特許出願公開第20100192265号明細書、または米国特許第7,612,194号明細書に開示されていない。ディアプロティカ属(Diabrotica)COPI alpha配列(配列番号1)は、コクヌストモドキ(Tribolium castaneum)(GENBANK受託番号XM_962379.2)に由来する配列の断片に多少関連する。ディアプロティカ属(Diabrotica)COPI alphaアミノ酸配列(配列番号2)の最も近いホモログは、GENBANK受託番号XP_967472.1を有するコクヌストモドキ(Tribolium castaneum)タンパク質(90%類似度)

似；相同性領域にわたり 81% 同一）である。

【0185】

C O P I a l p h a d s R N A 導入遺伝子は、冗長 R N A i ターゲティングおよび相乗的 R N A i 効果をもたらすために他の d s R N A 分子と組み合わせることができる。C O P I a l p h a を標的とする d s R N A を発現するトランスジェニックコーンイベントは、トウモロコシ根切り虫による根の食害を防止するのに有用である。C O P I a l p h a d s R N A 導入遺伝子は、これらの根切り虫防除技術のいずれかに対して抵抗性の根切り虫集団の発生を軽減するための昆虫抵抗性管理遺伝子ピラミッドにおけるバチルス・チューリングンシス (*Bacillus thuringiensis*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属種またはシードモナス (*Pseudomonas*) 属種殺虫タンパク質技術との併用のための新たな作用機序を提示している。10

【0186】

本明細書で C O P I a l p h a と呼ぶ、ディアプロティカ属 (*Diabrotica*) 候補遺伝子の配列の全長または部分クローニングを用いて、d s R N A の合成のための P C R アンブリコンを得た。

【0187】

配列番号 1 は、ディアプロティカ属 (*Diabrotica*) C O P I a l p h a の 4037 b p D N A 配列を示す。

配列番号 3 は、C O P I a l p h a r e g 1 の 400 b p D N A 配列を示す。

配列番号 72 は、C O P I a l p h a v e r 1 の 123 b p D N A 配列を示す。20

配列番号 73 は、C O P I a l p h a v e r 2 の 120 b p D N A 配列を示す。

配列番号 74 は、C O P I a l p h a v e r 3 の 107 b p D N A 配列を示す。

配列番号 75 は、C O P I a l p h a v e r 4 の 110 b p D N A 配列を示す。

【実施例 3】

【0188】

d s R N A を產生するための標的遺伝子の増幅

各標的遺伝子のコード領域の一部を P C R により増幅するためにプライマーを設計した。表 1 を参照のこと。適切な場合、T7 ファージプロモーター配列 (T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A ; 配列番号 5) を増幅センスまたはアンチセンス鎖の 5' 末端に取り込んだ。表 1 を参照のこと。全 R N A を W C R から抽出し、第一鎖 c D N A を、天然標的遺伝子配列のすべてまたは一部を増幅するために配置された対向プライマーを用いた P C R 反応用の鑄型として用いた。d s R N A は、黄色蛍光タンパク質 (Y F P) のコード領域 (配列番号 6; Shagin et al. (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50) を含む D N A クローニングからも増幅した。30

【0189】

【表1】

表1. 例示的なCOPI alpha 標的遺伝子およびYFP 隱性対照遺伝子のコード領域の一部を増幅するために用いたプライマーおよびプライマー対

	遺伝子 ID	プライマ ーID	配列番 号	配列
対1	<i>COPI alpha</i> reg1	<i>COPI alpha</i> -F1T7	7	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA CTAACACGTCCCTGGATCTTAACTAG
		<i>COPI alpha</i> -R1T7	8	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA GACACCAGCAAATCTTCAGAAGG
対2	<i>COPI alpha</i> reg2	<i>COPI alpha</i> -F2T7	9	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA AGCTTCATTGGATTCCACTGTC
		<i>COPI alpha</i> -R2T7	10	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA ACAGGAGGTTGCCATGTACTGT
対3	<i>COPI alpha</i> ver1	<i>COPI alpha</i> v1_F	76	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA AAAGATTCTGGATAATGGCATCAC
		<i>COPI alpha</i> v1_R	77	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA GGAGGTTGCCATGTACTGTG
対4	<i>COPI alpha</i> ver2	<i>COPI alpha</i> v2_F	78	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA GGAAGGATGCCAATGTTAAG
		<i>COPI alpha</i> v2_R	79	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA CTATGGCTTCCGTGAATTG
対5	<i>COPI alpha</i> ver3	<i>COPI alpha</i> v3_F	80	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA AGGTGTAAACTGGGCATCTTC
		<i>COPI alpha</i> v3_R	81	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA CTTCCCATGCTTAGAATCATTG
対6	<i>COPI alpha</i> ver4	<i>COPI alpha</i> v4_F	82	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA TTTATTCCATCCTAGACAGGAAC
		<i>COPI alpha</i> v4_R	83	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA CATTTCCTTAAATGTATGTAGG
対7	YFP	YFP-F_T7	22	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA CACCATGGCTCCAGCGGCC
		YFP-R_T7	25	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGA AGATCTTGAAGGCGCTTTCAGG

【実施例4】

【0190】

RNA i構築物

PCRによる鑄型の調製およびdsRNA合成。

COPI alphaおよびYFP dsRNAの產生のための特定の鑄型を得るため

10

20

30

40

50

に用いた戦略を図1に示す。C O P I a l p h a d s R N A 合成に用いることを目的とした鑄型D N Aは、表1におけるプライマー対およびW C R 初齢幼虫から単離した全R N Aから作製した（P C R 鑄型としての）第一鎖c D N Aを用いたP C Rにより作製した。各選択されたC O P I a l p h a およびY F P 標的遺伝領域について、P C R 増幅により、増幅センスおよびアンチセンス鎖の5'末端にT 7 プロモーター配列が導入された（Y F P セグメントは、Y F P コード領域のD N A クローンから増幅された）。所定の遺伝子の各領域のセンスおよびアンチセンス鎖の両方のそれらの5'末端にT 7 プロモーター配列を有するP C R 産物をd s R N Aの生成に用いた。図1を参照のこと。特定のプライマー対により増幅したd s R N A 鑄型の配列は、配列番号3（C O P I a l p h a r e g 1）、配列番号4（C O P I a l p h a r e g 2）、C O P I a l p h a v e r 1（配列番号7 2）、C O P I a l p h a v e r 2（配列番号7 3）、C O P I a l p h a v e r 3（配列番号7 4）、C O P I a l p h a v e r 4（配列番号7 5）およびY F P（配列番号6）であった。昆虫バイオアッセイ用の二本鎖R N Aは、AMBITION（登録商標）MEGASCRIP T（登録商標）R N A iキットを用いて製造業者の指示（INVITROGEN）に従って合成し、精製した。d s R N Aの濃度は、NANO DROP（商標）8 0 0 0 分光光度計（THERMO SCIENTIFIC、Wilmington、DE）を用いて測定した。

【0191】

植物形質転換ベクターの構築

C O P I a l p h a（配列番号1）のセグメントを含むヘアピン形成のための標的遺伝子構築物を含むエントリーベクター（p D A B 1 1 7 2 1 7 およびp D A B 1 1 7 2 1 8）は、化学合成断片の組合せ（D N A 2 . 0、Menlo Park、CA）および標準分子クローニング法を用いてアセンブルした。R N A一次転写物による分子内ヘアピン形成は、互いに反対の方向のC O P I a l p h a 標的遺伝子配列のセグメントの2つのコピーを配列すること（单一転写単位内に）によって促進したが、2つのセグメントは、S T - L S 1 イントロン配列（配列番号1 4；Vancanneyt et al. (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50）により分離されている。したがって、一次m R N A 転写物は、イントロン配列によって分離された、互いの大きな逆方向反復配列としての2つのC O P I a l p h a 遺伝子セグメント配列を含む。トウモロコシユビキチン1プロモーターのコピー（米国特許第5,510,474号明細書）を一次m R N Aヘアピン転写物の生成を駆動するために用い、トウモロコシペルオキシダーゼ5遺伝子の3'非翻訳領域を含む断片（Z m P e r 5 3' UTR v 2；米国特許第6,699,984号明細書）をヘアピンR N A発現遺伝子の転写を終結させるために用いた。

【0192】

エントリーベクターp D A B 1 1 7 2 1 1は、C O P I a l p h a（配列番号1）のセグメントを含むC O P I a l p h aヘアピンv 3 - R N A構築物（配列番号1 1）を含む。

【0193】

エントリーベクターp D A B 1 1 7 2 1 2は、p D A B 1 1 7 2 1 1に見いだされるものと異なるC O P I a l p h a（配列番号1）のセグメントを含むC O P I a l p h aヘアピンv 4 - R N A構築物（配列番号1 2）を含む。

【0194】

上述のエントリーベクターp D A B 1 1 7 2 1 1およびp D A B 1 1 7 2 1 2は、一般的なバイナリーデスティネーションベクター（p D A B 1 0 9 8 0 5）との標準G A T E W A Y（登録商標）組換え反応に用いて、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介トウモロコシ胚形質転換用のC O P I a l p h aヘアピンR N A発現形質転換ベクター（それぞれp D A B 1 1 4 5 1 5およびp D A B 1 1 5 7 7 0）を生成した。

【0195】

Y F Pヘアピンd s R N Aを発現する遺伝子を含む、陰性対照バイナリーベクターp D A B 1 1 0 8 5 3は、一般的なバイナリーデスティネーションベクターp D A B 1 0 9 8

10

20

30

40

50

05およびエントリーベクター pDAB101670を用いた標準GATEWAY(登録商標)組換え反応により構築した。エントリーベクター pDAB101670は、(上記のような)トウモロコシユビキチン1プロモーターの発現制御下のYFPヘアピン配列(配列番号13)およびトウモロコシペルオキシダーゼ5遺伝子の3'非翻訳領域を含む(上記のような)断片を含む。

【0196】

バイナリーデスティネーションベクター pDAB109805は、サトウキビ桿状バドナウイルス(ScBV)プロモーター(Schenk et al. (1999) Plant Molec. Biol. 39:1221-30)の調節下の除草剤抵抗性遺伝子(アリールオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ;AAD-1 v3)(米国特許第7838733号(B2)およびWright et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5)を含む。トウモロコシ縞葉ウイルス(MSV)外被タンパク質遺伝子5'UTRおよびトウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼ1(ADH1)遺伝子のイントロン6の配列から構成されている、合成5'UTR配列は、ScBVプロモーターセグメントの3'末端とAAD-1コード領域の開始コドンとの間に配置する。トウモロコシリパーゼ遺伝子の3'非翻訳領域(ZmLip 3'UTR;米国特許第7,179,902号明細書)を含む断片をAAD-1 mRNAの転写を終結させるために用いた。

【0197】

YFPタンパク質を発現する遺伝子を含む、さらなる陰性対照バイナリーベクター pDAB101556を、一般的なバイナリーデスティネーションベクター pDAB9989およびエントリーベクター pDAB100287を用いた標準GATEWAY(登録商標)組換え反応により構築した。バイナリーデスティネーションベクター pDAB9989は、(上記のような)トウモロコシユビキチン1プロモーターの調節発現下の(上記のような)除草剤抵抗性遺伝子(アリールオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ;AAD-1 v3)およびトウモロコシリパーゼ遺伝子の3'非翻訳領域(ZmLip 3'UTR;上記のような)を含む断片を含む。エントリーベクター pDAB100287は、(上記のような)トウモロコシユビキチン1プロモーターの発現制御下のYFPコード領域(配列番号15)およびトウモロコシペルオキシダーゼ5遺伝子の3'非翻訳領域を含む(上記のような)断片を含む。

【0198】

配列番号11は、pDAB117217に見いだされるCOP1 alphaヘアピンv3-RNA形成配列を示す。

【0199】

配列番号12は、pDAB117218に見いだされるCOP1 alphaヘアピンv4-RNA形成配列を示す。

【実施例5】

【0200】

候補標的遺伝子のスクリーニング

実施例2で同定された標的遺伝子配列を阻害するように設計された合成dsRNAは、飼料ベースのアッセイにおいてWCRに投与した場合、死亡および成長阻害を引き起こした。COP1 alpha reg1、COP1 alpha reg2、COP1 alpha ver1、COP1 alpha ver2、COP1 alpha ver3およびCOP1 alpha ver4は、スクリーニングした他のdsRNAと比べて、このアッセイにおける有効性の著しい増加を示すことが認められた。

【0201】

反復したバイオアッセイで、COP1 alpha reg1、COP1 alpha reg2、COP1 alpha ver1、COP1 alpha ver2、COP1 alpha ver3およびCOP1 alpha ver4に由来するdsRNA調製物の摂取が、それぞれウェスタンコーンルートワーム幼虫の死亡および/または成長阻害をもたらしたことが示された。表2および表3にこれらのdsRNAへの9日間の

10

20

30

40

50

曝露後のWCR幼虫の飼料ベースの摂食バイオアッセイの結果、ならびに黄色蛍光タンパク質(YFP)コード領域(配列番号6)から調製したdsRNAの陰性対照試料を用いて得られた結果を示す。

【0202】

【表2】

表2.9日間の摂食後のウェスタンコーンルートワーム幼虫を用いて得られたCOPI alpha dsRNA食餌摂食アッセイの結果。ANOVA分析で、平均死亡%および平均成長阻害(GI)%の有意な差が認められた。Turkey-Kramer検定を用いて平均値を分離した。

遺伝子名	用量 (ng/cm ²)	列の 数	平均値(死亡%) ± SEM*	平均値(GI) ± SEM
<i>COPI alpha reg1</i>	500	6	58.01 ± 6.55 (AB)	0.82 ± 0.03 (A)
<i>COPI alpha reg2</i>	500	6	70.59 ± 4.80 (A)	0.87 ± 0.03 (A)
<i>COPI alpha ver1</i>	500	6	36.08 ± 10.87 (BC)	0.81 ± 0.07 (A)
<i>COPI alpha ver2</i>	500	10	40.88 ± 5.41 (B)	0.86 ± 0.03 (A)
<i>COPI alpha ver3</i>	500	12	41.63 ± 7.14 (B)	0.83 ± 0.03 (A)
<i>COPI alpha ver4</i>	500	12	53.17 ± 6.40 (AB)	0.84 ± 0.05 (A)
TE**	0	20	13.21 ± 2.21 (CD)	0.00 ± 0.02 (B)
水	0	20	9.97 ± 1.98 (D)	-0.04 ± 0.06 (B)
YFP***	500	20	9.17 ± 2.02 (D)	-0.18 ± 0.16 (B)

*SEM=平均値の標準誤差。括弧内の英字は、統計的水準を表す。同じ英字によって連結されている水準は、有意に異なっている(P<0.05)。

**TE=トリス HCl(1mM)プラス EDTA(1mM)緩衝液、pH7.2。

***YFP=黄色蛍光タンパク質

10

20

30

【0203】

【表3】

表3.WCR幼虫に対するCOPI alpha dsRNAの経口効力(ng/cm²)の概要

遺伝子名	LC ₅₀ (ng/cm ²)	範囲	GI ₅₀ (ng/cm ²)	範囲
<i>COPI alpha reg1</i>	0.53	0.05-1.68	0.12	0.03-0.46
<i>COPI alpha reg2</i>	0.75	0.13-2.05	0.17	0.06-0.52
<i>COPI alpha ver3</i>	3389.02	401.09-5273159	0.053	0.001-1.51
<i>COPI alpha ver4</i>	288.54	93.69 - 2284.78	0.40	0.06 – 2.61

40

50

【0204】

ディアブロティカ属(Diabrotica)種の特定の遺伝子をRNAi媒介昆虫防除に活用することができることは、以前に示唆された。906配列を開示している、米国特許出願公開第2007/0124836号明細書および9112配列開示している、米国特許第7,614,924号明細書を参照のこと。しかし、RNAi媒介昆虫防除に有用性を有すると示唆された多くの遺伝子がディアブロティカ属(Diabrotica)の防除に有効でないことが判定された。配列COPI alpha reg1、COPI alpha reg2、COPI alpha ver1、COPI alpha ver2、COPI alpha ver3およびCOPI alpha ver4が、それぞれRNAi媒介昆虫防除に有用性を有すると示唆された他の遺伝子と比較して、ディアブロティカ属(Diabrotica)の驚くべきかつ予期しない優れた防除をもたらすことも判定された。

【0205】

例えば、Annexin、Beta spectrin 2 およびmtRP-L4は、米国特許第7,612,194号明細書においてそれぞれRNAi媒介昆虫防除に有効であることが示唆された。配列番号16は、Annexin region 1 (Reg1)のDNA配列であり、配列番号17は、Annexin region 2 (Reg2)のDNA配列である。配列番号18は、Beta spectrin 2 region 1 (Reg1)のDNA配列であり、配列番号19は、Beta spectrin 2 region 2 (Reg2)のDNA配列である。配列番号20は、mtRP-L4領域1 (Reg1)のDNA配列であり、配列番号21は、mtRP-L4領域2 (Reg2)のDNA配列である。YFP配列(配列番号6)も陰性対照としてdsRNAを生成するためにも用いた。

【0206】

前述の配列のそれぞれを実施例3の方法によりdsRNAを生成するために用いた。dsRNAの生成のための特定の錆型を得るために用いた戦略を図2に示す。dsRNA合成に用いることを目的としたDNA錆型は、表4におけるプライマー対およびWCR初齢幼虫から単離された全RNAから調製した第一鎖cDNA (PCR錆型としての)を用いてPCRにより作製した。(YFPは、DNAクローンから増幅した。)それぞれの選択した標的遺伝子領域について、2回の別個のPCR増幅を実施した。第1のPCR増幅で、増幅センス鎖の5'末端にT7プロモーター配列が導入された。第2の反応で、アンチセンス鎖の5'末端にT7プロモーター配列が取り込まれた。標的遺伝子の各領域の2つのPCR増幅断片をほぼ等量で混合し、混合物をdsRNAの生成のための転写錆型として用いた。図2を参照のこと。AMBION(登録商標)MEGAscript(登録商標)RNAiキットを用いて製造業者の指示(INVITROGEN)に従って二本鎖RNAを合成し、精製した。dsRNAの濃度をNANODROP(商標)8000分光光度計(THERMO SCIENTIFIC、Wilmington、DE)を用いて測定し、dsRNAをそれぞれ上述の同じ飼料ベースのバイオアッセイにより試験した。表4にYFP、Annexin Reg1、Annexin Reg2、Beta spectrin 2 Reg1、Beta spectrin 2 Reg2、mtRP-L4 Reg1およびmtRP-L4 Reg2 dsRNA分子を生成するために用いたプライマーの配列を示す。図2に示した方法に用いるYFPプライマー配列も表4に挙げる。表5にこれらのdsRNA分子への9日間の曝露後のWCR幼虫の飼料ベースのバイオアッセイの結果を示す。反復したバイオアッセイで、これらのdsRNAの摂取がTE緩衝液、水またはYFPタンパク質の対照試料について認められたものを上回るウェスタンコンフルートワーム幼虫の死亡または成長阻害をもたらさなかつたことが示された。

【0207】

10

20

30

【表4-1】

表4. 遺伝子のコード領域の一部を増幅するために用いたプライマーおよびプライマー対

	遺伝子 (Region)	プライマーID	配列番号	配列
対8	YFP	YFP-F_T7	22	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC ACCATGGGCTCCAGCGGCC
		YFP-R	23	AGATCTTGAAGGCCTCTCAGG
対9	YFP	YFP-F	24	CACCATGGGCTCCAGCGGCC
		YFP-R_T7	25	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAA GATCTTGAAGGCCTCTCAGG
対10	Annexin (Reg 1)	Ann-F1_T7	26	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAG CTCCAACAGTGGTTCCCTTATC
	Annexin (Reg 1)	Ann-R1	27	CTAATAATTCTTTTAATGTTCTG AGG
対11	Annexin (Reg 1)	Ann-F1	28	GCTCCAACAGTGGTCCTTATC
	Annexin (Reg 1)	Ann-R1_T7	29	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC TAATAATTCTTTTAATGTTCTG AGG
対12	Annexin (Reg 2)	Ann-F2_T7	30	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAT TGTTACAAGCTGGAGAACCTCTC
	Annexin (Reg 2)	Ann-R2	31	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG
対13	Annexin (Reg 2)	Ann-F2	32	TTGTTACAAGCTGGAGAACCTCTC
	Annexin (Reg 2)	Ann-R2T7	33	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC TTAACCAACAACGGCTAATAAGG
対14	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1_T7	34	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAA GATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1	35	GTCCATTCTGCCATCCACTGCA
対15	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-F1	36	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	Beta-spect2 (Reg 1)	Betasp2-R1_T7	37	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAG TCCATTCTGCCATCCACTGCA
対16	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2_T7	38	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAG CAGATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2	38	CTGGGCAGCTTCTGTTCCCTC

10

20

30

40

【0208】

【表4-2】

対 17	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-F2	40	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA
	Beta-spect2 (Reg 2)	Betasp2-R2_T7	41	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC TGGGCAGCTTCTGTTCCCTC
対 18	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_T7	42	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAA GTGAAATGTTAGCAAATATAACATC C
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1	43	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
対 19	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	44	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACAT CC
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_T7	45	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAA CCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
対 20	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2_T7	46	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC AAAGTCAGATTGAAGTGAGAGGT
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2	47	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCC C
対 21	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-F2	48	CAAAGTCAGATTGAAGTGAGAGG T
	mtRP-L4 (Reg 2)	L4-R2_T7	49	TTAATACGACTCACTATAAGGGAGAC TACAAATAAAACAAGAAGGACCCC

【0209】

【表5】

10

20

30

表5.9 日後のウェスタンコーンルートワーム幼虫を用いて得られた食餌摂食アッセイの結果

遺伝子名	用量 (ng/cm ²)	平均生存幼虫体重 (mg)	平均%死亡	平均成長阻害
Annexin-Reg 1	1000	0.545	0	-0.262
Annexin-Reg 2	1000	0.565	0	-0.301
Beta spectrin2 Reg 1	1000	0.340	12	-0.014
Beta spectrin2 Reg 2	1000	0.465	18	-0.367
mtRP-L4 Reg 1	1000	0.305	4	-0.168
mtRP-L4 Reg 2	1000	0.305	7	-0.180
TE 緩衝液*	0	0.430	13	0.000
水	0	0.535	12	0.000
YFP**	1000	0.480	9	-0.386

*TE=トリス HCl(10mM)プラス EDTA(1mM)緩衝液、pH8

**YFP=黄色蛍光タンパク質

40

【実施例6】

【0210】

50

殺虫ヘアピン d s R N A を含むトランスジェニックトウモロコシ組織の生成
アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換

植物ゲノムに安定に組み込まれたキメラ遺伝子の発現により 1 つまたは複数の殺虫 d s R N A 分子（例えば、C O P I a l p h a ; 配列番号 1 を含む遺伝子を標的とする d s R N A 分子を含む少なくとも 1 つの d s R N A 分子）を産生するトランスジェニックトウモロコシ細胞、組織および植物は、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換の後に生成した。スーパーバイナリーまたはバイナリー形質転換ベクターを用いるトウモロコシ形質転換法は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 8,304,604 号明細書に記載されているように、当技術分野で公知である。形質転換組織は、ハロキシホップ含有培地上で成長するそれらの能力により選択し、適宜、d s R N A の產生についてスクリーニングした。そのような形質転換組織培養物の一部は、実施例 1 で述べたように本質的に、バイオアッセイのために新生トウモロコシ根切り虫幼虫に与えることができる。10

【 0 2 1 1 】

アグロバクテリウム (Agrobacterium) 培養開始 上（実施例 4 ）で述べたバイナリー形質転換ベクター p D A B 1 1 4 5 1 5 、 p D A B 1 1 5 7 7 0 、 p D A B 1 1 0 8 5 3 または p D A B 1 0 1 5 5 6 を含むアグロバクテリウム (Agrobacterium) 菌株 D A t 1 3 1 9 2 細胞（国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 6 2 2 2 号パンフレット）のグリセロールストックを適切な抗生物質を含む A B 最少培地プレート (Watson, et al., (1975) J. Bacteriol. 123:255-264) に画線接種し、 2 0 ℃ で 3 日間成長させた。次いで、培養物を同じ抗生物質を含む Y E P プレート (g m / L ; 酵母エキス、 1 0 ；ペプトン、 1 0 ； N a C l 、 5) に画線接種し、 2 0 ℃ で 1 日間インキュベートした。20

【 0 2 1 2 】

アグロバクテリウム (Agrobacterium) 培養

実験当日に、接種培地およびアセトシリンゴンを含む保存溶液を実験における構築物の数に対して適切な容積で調製し、滅菌済みの使い捨て 2 5 0 m L フラスコにピペットで移した。接種培地 (Frame et al. (2011) Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. IN Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe and E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. pp 327-341) は、 2 . 2 g m / L M S 塩 ; 1 X I S U 修飾 M S ビタミン (Frame et al., ibid.) ; 6 8 . 4 g m / L スクロース ; 3 6 g m / L グルコース ; 1 1 5 m g / L L - プロリン ; および 1 0 0 m g / L ミオイノシトールを含んでいた (p H 5 . 4) 。アセトシリンゴンを接種培地を含むフラスコに 1 0 0 % ジメチルスルホキド中 1 M 保存溶液から 2 0 0 μ M の最終濃度になるまで加え、溶液を十分に混合した。30

【 0 2 1 3 】

各構築物について、 Y E P プレートからのアグロバクテリウム (Agrobacterium) を満たした 1 または 2 接種ループを滅菌済みの使い捨て 5 0 m L 遠心管中の 1 5 m L の接種培地 / アセトシリンゴン保存溶液に懸濁し、 5 5 0 n m での溶液の光学濃度 (O D 5 5 0) を測定した。次いで、追加の接種培地 / アセトシリンゴン混合物を用いて懸濁液を 0 . 3 ~ 0 . 4 の O D 5 5 0 に希釈した。次いで、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 懸濁液の管を、室温で約 7 5 r p m に設定したプラットフォーム振とう機上に水平にのせ、胚切開を実施しながら 1 ~ 4 時間振とうした。40

【 0 2 1 4 】

穂の滅菌および胚の単離 トウモロコシ未熟胚を温室内で成長させたゼア・マイス (Zea mays) 近交系 B 1 0 4 の植物 (Hallauer et al. (1997) Crop Science 37:1405-1406) から入手し、自家または近縁授粉して、穂を産生させた。穂は、授粉後約 1 0 ~ 1 2 日目に収穫した。実験日に、脱殻した穂を層流フード内で市販の漂白剤 (U L T R A C L O R O X (登録商標) 殺菌漂白剤、 6 . 1 5 % 次亜塩素酸ナトリウム ; 2 滴の T W E E N 2 0 を含む) の 2 0 % 溶液中に浸漬し、 2 0 ~ 3 0 分間振とうした後、滅菌脱イオン水で 3 回すすぐことによって表面滅菌した。未熟接合胚 (1 . 8 ~ 2 . 2 m m 長) を各穂から無50

菌的に切り離し、200 μMアセトシリンゴンを含む液体接種培地中適切なアグロバクテリウム(Agrobacterium)細胞の2.0 mL懸濁液を含む小遠心管に無作為に分配し、2 μLの10%BREAK-THRU(登録商標)S233界面活性剤(EVONIK INDUSTRIES; Essen, Germany)を加えた。所与のセットの実験について、プールした穂由来の胚を各形質転換に使用した。

【0215】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)共培養

単離後、胚をロッカーブラットフォーム上に5分間置いた。次いで、管の内容物を、4.33 g m / L MS塩；1X ISU修飾MSビタミン；30 g m / Lスクロース；700 mg / L L-プロリン；KOH中3.3 mg / Lジカンバ(3,6-ジクロロ-o-アニス酸または3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸)；100 mg / Lミオイノシトール；100 mg / Lカゼイン酵素加水分解物；15 mg / L AgNO₃；DMSO中200 μMアセトシリンゴン；および3 g m / L GELZAN(商標)を含むpH 5.8の共培養培地のプレート上に注いだ。液体アグロバクテリウム(Agrobacterium)懸濁液を滅菌済みの使い捨てホールピペットにより除去した。次いで、胚を、顕微鏡を活用して滅菌済み鉗子を用いて胚盤を上向きにして配向させた。プレートを閉じ、3 M(商標)MICROPORE(商標)医療用テープで密封し、約60 μmol m⁻² s⁻¹の光合成有効放射(PAR)の連続光を用いた25のインキュベーターに入れた。

【0216】

カルスの選択およびトランスジェニックイベントの再生 共培養期間の後、胚を、4.33 g m / L MS塩；1X ISU修飾MSビタミン；30 g m / Lスクロース；700 mg / L L-プロリン；KOH中3.3 mg / Lジカンバ；100 mg / Lミオイノシトール；100 mg / Lカゼイン酵素加水分解物；15 mg / L AgNO₃；0.5 g m / L MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸一水和物；PHYTOTEC HNOLOGIES LABR；Le nexa、KS)；250 mg / Lカルベニシリン；および2.3 g m / L GELZAN(商標)から構成されていたpH 5.8の静止培地に移した。36以下の胚を各プレートに除去した。プレートを透明プラスチックボックスに入れ、約50 μmol m⁻² s⁻¹ PARの連続光を用いて27で7~10日間インキュベートした。次いで、カルス化胚を、100 nM R-ハロキシホップ酸(0.0362 mg / L；AAD-1遺伝子を含むカルスの選択用)を含む(上記)静止培地から構成されていた、選択培地I上に移した(<18/プレート)。プレートを透明ボックスに戻し、約50 μmol m⁻² s⁻¹ PARの連続光を用いて27で7日間インキュベートした。次いで、カルス化胚を、500 nM R-ハロキシホップ酸(0.181 mg / L)を含む(上記)静止培地から構成されていた、選択培地II上に移した(<12/プレート)。プレートを透明ボックスに戻し、約50 μmol m⁻² s⁻¹ PARの連続光を用いて27で14日間インキュベートした。この選択ステップは、トランスジェニックカルスがさらに増殖し、分化することを可能とした。

【0217】

増殖性の胚発生カルスを再生前培地に移した(<9/プレート)。再生前培地は、pH 5.8で4.33 g m / L MS塩；1X ISU修飾MSビタミン；45 g m / Lスクロース；350 mg / L L-プロリン；100 mg / Lミオイノシトール；50 mg / Lカゼイン酵素加水分解物；1.0 mg / L AgNO₃；0.25 g m / L MES；NaOH中0.5 mg / Lナフタレン酢酸；エタノール中2.5 mg / Lアブシジン酸；1 mg / L 6-ベンジルアミノプリン；250 mg / Lカルベニシリン；2.5 g m / L GELZAN(商標)；および0.181 mg / L R-ハロキシホップ酸を含んでいた。プレートを透明ボックス中に保存し、約50 μmol m⁻² s⁻¹ PARの連続光を用いて27で7日間インキュベートした。次いで、再生カルスをPHYTATRAY S(商標)(SIGMA-ALDRICH)中の再生培地に移し(<6/プレート)、1日当たり16時間点灯/8時間消灯(約160 μmol m⁻² s⁻¹ PARで)で28で14日間または芽条および根が発生するまでインキュベートした。再生培地は、p

10

20

30

40

50

H 5 . 8 で 4 . 3 3 g m / L M S 塩 ; 1 X I S U 修飾 M S ビタミン ; 6 0 g m / L スクロース ; 1 0 0 m g / L ミオイノシトール ; 1 2 5 m g / L カルベニシリソウ ; 3 g m / L G E L L A N (商標) ゴム ; および 0 . 1 8 1 m g / L R - ハロキシホップ酸を含んでいた。次いで、一次根付きの小芽条を単離し、選択せずに伸長培地に移した。伸長培地は、p H 5 . 8 で 4 . 3 3 g m / L M S 塩 ; 1 X I S U 修飾 M S ビタミン ; 3 0 g m / L スクロース ; および 3 . 5 g m / L G E L R I T E (商標) を含んでいた。

【0218】

ハロキシホップを含む培地上で成長するそれらの能力により選択した形質転換植物の芽条を P H Y T A T R A Y S (商標) から成長培地 (P R O M I X B X ; P R E M I E R T E C H H O R T I C U L T U R E) を満たした小ポットに移植し、カップまたは H U M I - D O M E S (A R C O P L A S T I C S) で覆い、次いで、C O N V I R O N 成長チャンバー (27 昼間 / 24 夜間、16 時間明期、50 ~ 70 % R H 、200 μ mol m⁻² s⁻¹ P A R) 内で環境に順化させた。場合によっては、推定トランスジェニック小植物を、トウモロコシゲノムに組み込まれた A A D 1 除草剤耐性遺伝子を検出するように設計されたプライマーを用いた定量的リアルタイム P C R アッセイにより導入遺伝子相対コピー数について解析した。さらに、R N A q P C R アッセイを用いて、推定形質転換体の発現 d s R N A における S T - L S 1 イントロン配列の存在を検出した。次いで、選択された形質転換小植物をさらなる成長および試験のために温室に移した。

【0219】

バイオアッセイおよび種子生産のための温室における T₀ 植物の移動および樹立植物が V 3 - V 4 段階に達した場合、それらを I E C U S T O M B L E N D (P R O F I L E / M E T R O M I X 1 6 0) 土壌ミックスに移植し、温室内 (光曝露の種類 : 光または同化 ; 高照度限界 : 1 2 0 0 P A R ; 日照時間 16 時間 ; 27 昼間 / 24 夜間) で開花まで成長させた。

【0220】

昆虫バイオアッセイに用いるための植物を小ポットから T I N U S (商標) 3 5 0 - 4 R O O T R A I N E R S (登録商標) (S P E N C E R - L E M A I R E I N D U S T R I E S 、A c h e s o n 、A l b e r t a 、C a n a d a) に移植した (R O O T R A I N E R S (登録商標) のイベントにつき 1 つの植物体)。R O O T R A I N E R S (登録商標) に移植してから約 4 日後に、バイオアッセイのために植物に寄生させた。

【0221】

非トランスジェニックエリート近交系 B 1 0 4 の植物または他の適切な花粉ドナーから採取した花粉を T₀ トランスジェニック植物のひげに授粉することにより、T₁ 世代の植物を得た。可能な場合、逆交配も実施した。

【実施例 7】

【0222】

トランスジェニックトウモロコシ組織の分子解析

トウモロコシ組織の分子解析 (例えば、R N A q P C R) は、根の食害を評価したのと同じ日に温室成長植物から採取した葉および根の試料について実施した。

【0223】

P e r 5 3 ' U T R の R N A q P C R アッセイの結果は、ヘアピン導入遺伝子の発現をバリデートするために用いた。(内因性 P e r 5 遺伝子の発現がトウモロコシ組織に通常存在するので、非形質転換トウモロコシ植物で低レベルの P e r 5 3 ' U T R の検出が予想される。) 発現 R N A における S T - L S 1 イントロン配列 (d s R N A ヘアピン分子の形成に不可欠である) の R N A q P C R アッセイの結果は、ヘアピン転写物の存在をバリデートするために用いた。導入遺伝子 R N A レベルは、内因性トウモロコシ遺伝子の R N A 発現レベルと比較して測定した。

【0224】

ゲノム D N A における A A D 1 コード領域の一部を検出するための D N A q P C R 解析は、導入遺伝子挿入配列のコピー数を推定するために用いた。これらの解析用の試料は

10

20

30

40

50

、環境チャンバー内で成長した植物から採取した。結果を單一コピー天然遺伝子の一部を検出するように設計されたアッセイのDNA qPCR結果と比較し、単純イベント(COPIalpha導入遺伝子の1つまたは2つのコピーを有する)を温室内のさらなる試験に進めた。

【0225】

さらに、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子(SpecR; T-DNAの外側のバイナリーベクタープラスミド上に存在)の一部を検出するように設計されたqPCRアッセイを用いて、トランスジェニック植物が外来組込みプラスミド主鎖配列を含んでいたかどうかを判断した。

ヘアピンRNA転写物発現レベル: Per5'3'UTRのqPCR

カルス細胞イベントまたはトランスジェニック植物をPer5'3'UTR配列のリアルタイム定量的PCR(qPCR)により解析して、TIP41様タンパク質(すなわち、GENBANK受託番号AT4G34270のマイスホモログ; 74%同一性のtBLASTXスコアを有する)をコードする、内部トウモロコシ遺伝子(配列番号50; GENBANK受託番号BT069734)の転写物レベルと比較した、全長ヘアピン転写物の相対発現レベルを決定した。RNAは、RNAEASY(商標)96キット(QIAGEN、Valencia、CA)を用いて単離した。溶出後、全RNAをキットの提案プロトコールによるDNase1処理にかけた。次いで、RNAをNANODROP8000分光光度計(THERMOSCIENTIFIC)で定量し、濃度を25ng/μLに対して標準化した。第一鎖cDNAは、製造業者の推奨プロトコールに実質的に従って、5μL変性RNAを含む10μL反応容積でHIGH CAPACITY cDNA SYNTHESIS KIT(INVITROGEN)を用いて作製した。複合ランダムプライマーおよびオリゴdTの作業ストックを調製するために、ランダムプライマーストックミックスの1mL管への10μLの100μM T20VNオリゴヌクレオチド(IDT)(配列番号51; TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN、ここで、Vは、A、CまたはGであり、Nは、A、C、GまたはT/Uである)の添加を含めるように、プロトコールをわずかに修正した。

【0226】

cDNA合成の後に、試料をヌクレアーゼ不含有水で1:3に希釈し、アッセイに供するまで-20で保存した。

【0227】

Per5'3'UTRおよびTIP41様転写物の別個のリアルタイムPCRアッセイは、10μL反応容積でLIGHTCYCLER(商標)480(ROCHE DIAGNOSTICS、Indianapolis、IN)を用いて実施した。Per5'3'UTRアッセイについては、反応は、P5U76S(F)(配列番号52)およびP5U76A(R)(配列番号53)プライマーならびにROCHE UNIVERSAL PROBE(商標)(UPL76; カタログ番号4889960001; FAMで標識した)を用いて行った。TIP41様参照遺伝子アッセイについては、TIPmxF(配列番号54)およびTIPmxR(配列番号55)プライマーおよびHEX(ヘキサクロロフルオロセイン)で標識したHXTIPプローブ(配列番号56)を用いた。

【0228】

すべてのアッセイに無錫型(ミックスのみ)の陰性対照を含めた。標準曲線のために、試料の交差汚染の有無を確認するためにブランク(ソースウェル中水)もソースプレートに含めた。プライマーおよびプローブ配列を表6に示す。様々な転写物の検出のための反応成分处方を表7に開示し、PCR反応条件を表8に要約する。FAM(6-カルボキシフルオレセインアミダイト)蛍光部分を465nmで励起し、510nmで蛍光を測定した。HEX(ヘキサクロロフルオロセイン)蛍光部分の対応する値は、533nmおよび580nmであった。

【0229】

10

20

30

40

【表6】

表6. トランスジェニックトウモロコシにおける転写レベルの分子解析に用いたオリゴヌクレオチド配列

標的	オリゴヌクレオチド	配列番号	配列
Per5 3'UTR	P5U76S (F)	52	TTGTGATGTTGGTGGCGTAT
Per5 3'UTR	P5U76A (R)	53	TGTTAAATAAAACCCCAAAGATCG
Per5 3'UTR	Roche UPL76 (FAM-プローブ)	NAv**	Roche Diagnosticsカタログ番号488996001
TIP41	TIPmxF	54	TGAGGGTAATGCCAACTGGTT
TIP41	TIPmxR	55	GCAATGTAACCGAGTGTCTCTCAA
TIP41	HXTIP (HEX-プローブ)	56	TTTTGGCTTAGAGTTGATGGTGTACTGATGA

*TIP41様タンパク質

**供給業者から入手できなかったNAv配列

10

【0 2 3 0】

20

【表7】

表7. 転写物の検出のためのPCR反応レシピ^o

構成成分	Per5 3'UTR	TIP様遺伝子
	最終濃度	
Roche緩衝液	1 X	1X
P5U76S (F)	0.4 μM	0
P5U76A (R)	0.4 μM	0
Roche UPL76 (FAM)	0.2 μM	0
HEXtipZM F	0	0.4 μM
HEXtipZM R	0	0.4 μM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 μM
cDNA (2.0 μL)	該当せず	該当せず
水	10μLにする	10μLにする

30

【0 2 3 1】

【表8】

表8. RNAqPCR用のサーモサイクル条件

Per5 3'UTRおよびTIP41様遺伝子検出				
プロセス	温度	時間	サイクル数	
標的活性化	95°C	10分	40	10
変性	95°C	10秒		
伸長	60°C	40秒		
獲得FAMまたはHEX	72°C	1秒		
冷却	40°C	10秒	1	

【0232】

データは、供給業者の推奨に従って C_q 値の計算のための二次微分最大値アルゴリズムを用いた相対的定量により LIGHT CYCLER (商標) ソフトウェア v1.5 を用いて解析した。発現解析については、発現値は、最適化 PCR 反応について産物がサイクルごとに倍加するという仮定のもとに 2 の基準値が選択される、2つの標的間の C_q 値の差の比較に依拠する、 C_t 法 (すなわち、 $2 - (C_q_{TARGET} - C_q_{REF})$) を用いて計算した。

【0233】

ヘアピン転写物のサイズおよび完全性：ノーザンプロットアッセイ

場合によって、COPI alpha ヘアピン dsRNA を発現するトランスジェニック植物における COPI alpha ヘアピン RNA の分子サイズを測定するためのノーザンプロット (RNA プロット) 解析を用いることにより、トランスジェニック植物のさらなる分子的特徴付けが得られる。

【0234】

すべての材料および装置は、使用前に RNAZAP (AMBION / INVITROGEN) により処理する。組織試料 (100 mg ~ 500 mg) は、2 mL SAFELOCK EPPENDORF 管に採取し、1 mL の TRIZOL (INVITROGEN) 中 3 個のタングステンビーズを含む KLECKO (商標) 組織粉碎機 (GARCIA MANUFACTURING、Visalia、CA) を用いて 5 分間破壊し、次いで、室温 (RT) で 10 分間インキュベートした。場合によって、試料を 4 ~ 11,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を新しい 2 mL SAFELOCK EPPENDORF 管に移す。200 μL のクロロホルムをホモジネートに加えた後、管を反転により 2 ~ 5 分間混合し、室温で 10 分間インキュベートし、4 ~ 12,000 × g で 15 分間遠心分離する。上相を滅菌済みの 1.5 mL EPPENDORF 管に移し、600 μL の 100% イソプロパノールを加えた後、室温で 10 分 ~ 2 時間インキュベートし、次いで、4 ~ 25 ~ 12,000 × g で 10 分間遠心分離する。上清を捨て、RNA ベレットを 1 mL の 70% エタノールで 2 回洗浄し、洗浄の間に 4 ~ 25 ~ 7,500 × g で 10 分間遠心分離する。エタノールを捨て、ベレットを、50 μL のヌクレアーゼ不含有水に再懸濁する前に 3 ~ 5 分間短く風乾する。

【0235】

全 RNA を NANODROP 8000 (登録商標) (THERMO - FISHER) を用いて定量し、試料を 5 μg / 10 μL に標準化した。次いで、10 μL のグリオキサー (AMBION / INVITROGEN) を各試料に加える。5 ~ 14 ng の DIG RNA 標準マーカーミックス (ROCHE APPLIED SCIENCE、Indianapolis、IN) を分配し、等容積のグリオキサーに加える。試料およびマーク RNA を 50 ~ 45 分間変性し、NORTHERN MAX 10 X グリオキサーラ

ンニング緩衝液(AMBION / INVITROGEN)中1.25% S E A K E M GOLDアガロース(LONZA、Allendale、NJ)ゲル上にロードするまで、氷上で保存する。RNAは、65ボルト/30mAで2時間15分間の電気泳動により分離する。

【0236】

電気泳動の後、ゲルを2X SSCで5分間すすぎ、GEL DOCステーション(BIORAD、Hercules、CA)で撮像し、次いで、10X SSCを転移緩衝液(3M塩化ナトリウムおよび300mMクエン酸三ナトリウムからなる20X SSC、pH7.0)として用いてRNAをナイロン膜(MILLIPORE)に室温で一夜受動的に転移させる。転移後、膜を2X SSCで5分間すすぎ、RNAを膜(AGILENT/STRATAGENE)にUV架橋し、膜を室温で最長2日間乾燥する。
10

【0237】

膜をULTRAHYB緩衝液(AMBION / INVITROGEN)中で1~2時間プレハイブリダイズする。プローブは、ROCHE APPLIED SCIENCE DIG法によりジゴキシゲニンで標識された対象の配列(適宜、例えば、配列番号11または配列番号12のアンチセンス配列部分)を含むPCR增幅産物からなっている。推奨緩衝液中のハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション管中60°の温度で一夜である。ハイブリダイゼーションの後、プロットをDIG洗浄にかけ、包み、フィルムに1~30分間曝露し、次いで、フィルムを現像するが、すべてがDIGキットの供給業者により推奨された方法による。
20

【0238】

導入遺伝子コピー数の決定。

2回の葉のパンチにほぼ相当するトウモロコシ葉片を96ウェルコレクションプレート(QIAGEN)に収集した。組織の破壊は、1個のステンレススチールビーズを含むBiosprint 96AP1溶解緩衝液(Biosprint 96 PLANT KIT; Qiaagenから供給)中でKlecko(商標)組織粉碎機(Garcia Manufacturing、Visalia、CA)を用いて実施した。組織の温浸の後、Biosprint 96 PLANT KITおよびBiosprint 96抽出口ボットを用いてゲノムDNA(gDNA)を高処理式で単離した。ゲノムDNAは、qPCR反応を始める前に2:3 DNA:水に希釈した。
30

【0239】

qPCR解析

加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子検出は、Light Cycler(登録商標)480システムを用いてリアルタイムPCRにより実施した。ST-LS1イントロン配列(配列番号14)を検出するために、またはSPEC R遺伝子の一部(すなわち、バイナリーベクタープラスマド上で運ばれるスペクチオマイシン抵抗性遺伝子;配列番号68;表9におけるSPC1オリゴヌクレオチド)を検出するために加水分解プローブアッセイに用いるオリゴヌクレオチドは、Light Cycler(登録商標)Probe Design Software 2.0を用いて設計した。さらに、AAD-1除草剤耐性遺伝子のセグメント(配列番号62;表9におけるGAAD1オリゴヌクレオチド)を検出するために加水分解プローブアッセイに用いるオリゴヌクレオチドは、Primer Expressソフトウェア(Applied Biosystems)を用いて設計した。表9にプライマーおよびプローブの配列を示す。アッセイは、各アッセイにおいてgDNAが存在していたことを保証するための内部参照配列としての役割を果たした、内因性トウモロコシ染色体遺伝子(インベルターゼ(配列番号59;GENBANK受託番号U16123;ここでIVR1と呼ぶ)用試薬を用いて多重化した。増幅のために、0.4μMの各プライマーおよび0.2μMの各プローブを含む10μL容積の多重反応においてLight Cycler(登録商標)480 Probes Masterミックス(Roche Applied Science)を1x最終濃度で調製した(表10)。表11に概要を示すように2段階増幅反応を実施した。FAMおよびHEX標
40

10

20

30

40

50

識プローブの発蛍光団の活性化および発光は、上述の通りであり、CY5コンジュゲートは、650 nmで最大限に励起され、670 nmで最大限に蛍光を発する。

【0240】

Cpスコア(蛍光シグナルがバックグラウンド閾値に交差する点)は、フィットポイントアルゴリズム(LightCycler softwareリリース1.5)およびRelative Quantモジュール(Ct法に基づく)を用いてリアルタイムPCRデータから決定した。データは、上述のように処理した(上; RNA qPCR)。

【0241】

【表9】

10

表9. 遺伝子コピー数の決定およびバイナリーベクタープラスミド主鎖検出に用いたプライマーおよびプローブ(蛍光コンジュゲートを含む)の配列

名称	配列番号	配列
ST-LS1-F	69	GTATGTTCTGCTTACCTTGAT
ST-LS1-R	70	CCATGTTTGGTCATATATTAGAAAAGTT
ST-LS1-P (FAM)	71	AGTAATATAGTATTCAAGTATTTCAGAAAT
GAAD1-F	60	TGTCGGTCCCTCTACCAA
GAAD1-R	61	CAACATCCATCACCTTGACTGA
GAAD1-P (FAM)	62	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
IVR1-F	63	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR1-R	64	AAAGTTGGAGGCTGCCGT
IVR1-P (HEX)	65	CGAGCAGACCGCCGTGACTTCTACC
SPC1A	66	CTTAGCTGGATAACGCCAC
SPC1S	67	GACCGTAAGGCTTGATGAA
TQSPEC (CY5*)	68	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA

CY5=シアニン-5

20

30

【0242】

【表10】

表10. 遺伝子コピー数解析およびプラスミド主鎖検出のための反応構成成分

構成成分	量(μL)	ストック	最終濃度
2x 緩衝液	5.0	2x	1x
適切なフォワードプライマー	0.4	10 μM	0.4
適切なリバースプライマー	0.4	10 μM	0.4
適切なプローブ	0.4	5 μM	0.2
IVR1-フォワードプライマー	0.4	10 μM	0.4
IVR1-リバースプライマー	0.4	10 μM	0.4
IVR1-プローブ	0.4	5 μM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
gDNA	2.0	ND**	ND
合計	10.0		

*NA=該当なし

**ND=決定されず

10

20

【0243】

【表11】

表11. DNA qPCR 用のサーモサイクル条件

ゲノムコピー数解析			
プロセス	温度	時間	サイクル数
標的活性化	95°C	10分	1
変性	95°C	10秒	40
伸長・獲得 FAM、HEX または CY5	60°C	40秒	
冷却	40°C	10秒	1

30

【実施例8】

【0244】

トランスジェニックトウモロコシのバイオアッセイ

in vitro 昆虫バイオアッセイ

40

植物細胞中で生成する対象発明の dsRNA の生物活性は、バイオアッセイ法によって示される。例えば、Baum et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-1326 を参照のこと。例えば、殺虫 dsRNA を生成する植物に由来する様々な植物組織または組織片を制御された摂食環境における標的昆虫に与えることによって、有効性を示すことができる。あるいは、殺虫 dsRNA を生成する植物に由来する様々な植物組織から抽出物を調製し、抽出された核酸を本明細書で前述したようにバイオアッセイのための人工飼料の上に分配して加える。そのような摂食アッセイの結果は、殺虫 dsRNA を生成しない宿主植物の適切な対照組織を用いる同様に実施されたバイオアッセイと、または他の対照試料と比較する。

【0245】

50

トランスジェニックトウモロコシイベントを用いた昆虫バイオアッセイ

洗浄卵から孵化した2匹のウェスタンコーンルートワーム幼虫（1～3日齢）を選択し、バイオアッセイトレーの各ウエルに入れる。次いで、ウエルを「pull n' peel」タブカバー（BIO-CV-16、BIO-SERV）で覆い、18時間／6時間

明／暗サイクルとした28インキュベーターに入れた。最初の寄生の9日後に、各処理における昆虫の総数のうちの死亡昆虫の百分率と計算される、死亡率について幼虫を評価した。昆虫試料を-20で2日間凍結し、次いで、各処理の昆虫の幼虫をプールし、体重を測定する。成長阻害の百分率は、2つの対照ウエル処理の平均体重の平均値によって割った実験処理の平均体重として計算する。データは、成長阻害百分率（陰性対照の）として表す。対照平均体重を超える平均体重は、ゼロに標準化する。

10

【0246】

温室内の昆虫バイオアッセイ

ウェスタンコーンルートワーム（WCR、ディアプロティカ・ヴィルギフェラ・ヴィルギフェラ（*Diabrotica virgifera virgifera*）卵は、CROP CHARACTISTICS（Farmington, MN）から土壤入りで受領した。WCR卵を28で10～11日間インキュベートした。土壤からの卵を洗浄し、0.15%寒天溶液中に入れ、濃度を0.25mLアリコート当たり約75～100個の卵に調整した。孵化速度をモニターするために卵懸濁液のアリコートを用いて孵化プレートをペトリ皿中にセットした。

20

【0247】

ROOTTRAINERS（登録商標）中で成育中のトウモロコシ植物体の周囲の土壤に150～200個のWCR卵を寄生させた。昆虫に2週間摂食させ、その後、「根評点付け」を各植物に対して行った。Oleson et al. (2005, J. Econ. Entomol. 98:1-8)に本質的に準拠して等級付けに節損傷評価基準（Node-Injury Scale）を用いた。このバイオアッセイに合格した植物を種子生産のために5ガロンのポットに移植した。移植した植物を殺虫剤で処理して、さらなる根切り虫被害および温室内の昆虫の放出を防止した。種子生産のために植物に人工授粉した。これらの植物により產生された種子は、T₁および植物のその後の世代における評価のために残した。

30

【0248】

温室バイオアッセイに2種の陰性対照植物を含めた。トランスジェニック陰性対照植物は、黄色蛍光タンパク質（YFP）またはYFPヘアピンdsRNAを产生するように設計された遺伝子を含むベクターによる形質転換により生成した（実施例4参照）。非形質転換陰性対照植物は、7sh382またはB104系の種子から成長させた。バイオアッセイを2つの別個の日に実施し、陰性対照を各組の植物物質に含めた。

【0249】

表12にCOPI alphaヘアピン植物の分子解析およびバイオアッセイの組み合わせた結果を示す。表12に要約したバイオアッセイの結果の検討により、例えば、配列番号11および配列番号12に例示されるような、配列番号1のセグメントを含むCOPI alphaヘアピンdsRNAを発現する構築物を含むトランスジェニックトウモロコシ植物の大多数がウェスタンコーンルートワームの幼虫の摂食によって招かれる根の損傷から保護されるという驚くべきかつ予期しない所見が明らかになる。37の等級付けしたイベントのうちの22が0.5以下の根評点を有していた。表13に陰性対照植物の分子解析およびバイオアッセイの組み合わせた結果を示す。34の等級付けした植物のうちの5つが0.75以下の根評点を有していたが、ほとんどの植物がWCR幼虫摂食からの保護を有さなかった。陰性対照植物の組における低い根評点付けスコアを有するいくつかの植物の存在が時として認められ、温室環境でのこの種のバイオアッセイの変動および実施することの困難を反映している。

40

【0250】

【表 12 - 1】

表 12 COPI alpha ヘアピン v3 および COPI alpha ヘアピン v3 発現トウモロコシ植物の温室バイオアッセイおよび分子解析結果

試料 ID	バッヂ#	葉組織		根組織		根評点付け
		ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	
COPI alpha v3 イベント						
117217[1]-001.001	2	8.0	82.1	4.6	58.5	0.05
117217[1]-002.001	2	6.0	44.0	7.1	35.5	**NG
117217[1]-003.001	2	0.0	0.1	0.4	0.2	1
117217[1]-004.001	2	11.5	91.8	15.4	176.1	0.25
117217[1]-007.001	3	14.9	139.1	10.0	103.3	0.01
117217[1]-008.001	3	10.3	105.4	5.9	63.6	0.05
117217[1]-011.001	3	11.6	101.1	17.4	121.9	0.01
117217[1]-012.001	3	13.6	95.7	5.1	165.4	0.01
117217[1]-013.001	3	3.4	34.8	3.5	134.4	0.01
117217[1]-015.001	3	0.0	0.0	0.1	14.1	0.75
117217[1]-018.001	3	16.7	209.4	15.7	124.5	0.01
117217[1]-019.001	3	8.2	73.5	3.1	90.5	0.01
117217[1]-020.001	4	7.6	50.9	***ND	***ND	0.05
117217[1]-021.001	3	11.3	122.8	6.2	166.6	0.01
117217[1]-022.001	4	7.4	56.5	***ND	***ND	0.05
117217[1]-027.001	4	6.7	47.2	***ND	***ND	0.05
117217[1]-029.001	4	8.1	70.0	***ND	***ND	0.05
117217[1]-030.001	4	13.4	73.0	***ND	***ND	0.05
117217[1]-031.001	4	0.0	0.0	***ND	***ND	**NG
117217[1]-033.001	4	12.7	59.7	***ND	***ND	0.05
117217[1]-035.001	4	7.4	65.8	***ND	***ND	0.01
117217[1]-038.001	4	11.2	93.1	***ND	***ND	0.05
COPI alpha v4 イベント						
117218[1]-004.001	1	2.445	104.7	0.940	101.1	0.05
117218[1]-008.001	1	1.000	200.9	3.010	144.0	0.01
117218[1]-012.001	1	1.338	97.7	0.712	141.0	0.25
117218[1]-014.001	1	1.376	58.1	0.473	52.0	0.1
117218[1]-015.001	1	2.928	101.8	0.559	127.1	0.1
117218[1]-017.001	1	1.057	88.6	1.110	131.6	0.01
117218[1]-019.001	1	1.474	94.4	0.853	326.3	0.05
117218[1]-020.001	1	1.165	69.1	2.219	321.8	0.1
117218[1]-025.001	1	0.599	118.6	1.959	121.1	**NG
117218[1]-027.001	1	0.451	75.1	0.590	134.4	1

10

20

30

40

【0 2 5 1】

【表 1 2 - 2】

117218[1]-028.001	1	0.486	92.4	1.035	140.1	0.01
117218[1]-029.001	1	0.853	206.5	1.141	209.4	0.05
117218[1]-037.001	2	9.0	70.5	2.2	47.2	1
117218[1]-039.001	2	3.5	22.8	4.3	63.6	0.01
117218[1]-041.001	2	6.9	39.1	15.0	38.3	0.1
117218[1]-042.001	2	7.8	52.7	5.4	81.6	0.01
117218[1]-043.001	2	7.2	39.1	2.4	57.7	0.1
117218[1]-045.001	2	0.0	37.0	1.7	36.5	0.01
117218[1]-046.001	2	4.7	39.4	3.9	85.0	0.1

*RTL=TIP4 様遺伝子転写物レベルに対して測定した相対的転写物レベル

**NG=植物のサイズが小さいため等級付けせず

***ND=実施せず

【0 2 5 2】

【表 13 - 1】

表 13 トランスジェニックおよび非形質転換トウモロコシ植物を含む陰性対照植物の温室バイオアッセイおよび分子解析結果

試料 ID	バッヂ#	葉組織		根組織		根評点付け
		ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	ST-LS1 RTL*	PER5 UTR RTL	
101556[691]-10720.001	1	0.000	75.1	0.000	56.1	1
101556[691]-10721.001	1	0.000	71.5	0.166	114.6	1
101556[691]-10722.001	1	0.000	259.6	0.000	0.0	**NG
101556[691]-10723.001	1	0.000	136.2	0.000	148.1	1
101556[691]-10724.001	1	0.000	82.1	0.000	16.9	1
101556[691]-10725.001	2	0.8	15.2	0.0	24.9	1
101556[691]-10726.001	2	0.7	16.2	0.0	55.7	0.5
101556[691]-10727.001	2	1.2	32.0	0.0	24.8	0.5
101556[691]-10728.001	2	0.0	7.9	0.0	54.9	1
101556[691]-10729.001	2	0.0	16.9	0.0	23.6	1
101556[691]-10948.001	3	0.0	21.6	***ND	***ND	0.75
101556[691]-10949.001	3	0.0	40.5	***ND	***ND	0.75
101556[691]-10950.001	3	0.0	42.2	***ND	***ND	1
101556[691]-10951.001	3	0.4	0.0	***ND	***ND	1
101556[691]-10952.001	3	0.0	58.1	***ND	***ND	1
YFPヘアピンイベント						
110853[9]-336.001	1	0.000	0.5	0.000	0.6	0.75
110853[9]-337.001	1	1.064	526.4	0.000	1.5	1
110853[9]-338.001	1	0.536	219.8	0.707	108.4	1
110853[9]-339.001	1	0.000	0.0	0.000	0.6	1
110853[9]-340.001	2	2.7	25.1	7.5	61.8	1
110853[9]-341.001	2	3.5	45.6	2.2	24.1	1

10

20

30

40

【0253】

【表13-2】

110853[9]-343.001	2	3.6	62.2	6.6	68.6	1
110853[9]-344.001	2	3.5	58.9	4.7	31.8	0.5
110853[9]-345.001	2	3.1	42.5	5.6	40.5	1
110853[9]-346.001	3	0.0	0.0	***ND	***ND	1
110853[9]-347.001	3	0.0	0.1	***ND	***ND	1
110853[9]-348.001	3	9.5	183.5	***ND	***ND	0.5
非形質転換植物						
7sh382	1	0.000	0.4	0.000	8.7	1
7sh382	1	0.000	0.3	0.000	2.3	1
7sh382	1	0.000	0.2	0.000	0.0	1
7sh382	1	0.000	0.2	0.000	4.4	0.75
7sh382	1	0.000	0.4	0.000	6.8	0.5
7sh382	2	0.0	0.1	0.0	34.8	1
7sh382	2	0.0	0.1	1.5	0.2	1
7sh382	2	0.4	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	2	***ND	***ND	0.0	41.9	0.5
7sh382	2	1.1	0.2	0.0	2.1	1
7sh382	3	0.0	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	3	0.0	0.1	***ND	***ND	0.5
7sh382	3	0.6	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	3	0.0	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	4	1.7	1.3	***ND	***ND	0.75
7sh382	4	0.6	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	4	0.0	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	4	0.7	0.1	***ND	***ND	1
7sh382	4	0.0	0.0	***ND	***ND	1
B104	1	0.000	0.0	0.000	1.9	1
B104	1	0.000	0.1	0.000	99.0	1
B104	1	0.000	1.1	0.000	7.1	1
B104	1	0.000	0.1	0.000	31.6	1
B104	1	0.000	0.0	0.000	2.3	1
B104	2	0.0	0.1	0.9	0.1	1
B104	2	0.3	3.6	0.0	4.3	1
B104	2	2.4	16.8	0.3	0.5	1
B104	2	0.0	0.1	0.8	0.0	1
B104	3	0.0	0.0	***ND	***ND	1
B104	3	0.0	0.0	***ND	***ND	1
B104	3	0.0	0.0	***ND	***ND	1
B104	4	0.3	0.0	***ND	***ND	1
B104	4	0.4	0.0	***ND	***ND	1

【0254】

【表13-3】

B104	4	0.0	0.0	***ND	***ND	1
B104	4	0.5	0.0	***ND	***ND	1
B104	4	0.0	0.2	***ND	***ND	1

*RTL=TIP4様遺伝子転写物レベルに対して測定した相対的転写物レベル

**NG=植物のサイズが小さいため等級付けせず

***ND=実施せず

10

【実施例9】

【0255】

鞘翅目害虫配列を含むトランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*)

10 ~ 20のトランスジェニックT₀ゼア・マイス (*Zea mays*) 植物を実施例6で述べたように生成する。RNAi構築物のヘアピンdsRNAを発現するさらなる10 ~ 20のT₁ゼア・マイス (*Zea mays*) 独立系をトウモロコシ根切り虫チャレンジのために得る。配列番号11、配列番号12に示す、または他の場合さらに配列番号1を含む、ヘアピンdsRNAが得られ得る。さらなるヘアピンdsRNAは、例えば、Caf1 - 180 (米国特許出願公開第2012/0174258号明細書)、VatpaseC (米国特許出願公開第2012/0174259号明細書)、Rhō1 (米国特許出願公開第2012/0174260号明細書)、VatpaseH (米国特許出願公開第2012/0198586号明細書)、PPI - 87B (米国特許出願公開第2013/0091600号明細書)、RPA70 (米国特許出願公開第2013/0091601号明細書)またはRPS6 (米国特許出願公開第2013/0097730号明細書)等の鞘翅目害虫配列から得られ得る。これらは、RT - PCRまたは他の分子解析法により確認される。選択される独立T₁系からの全RNA調製物は、任意選択的に、RNAi構築物のそれぞれにおけるヘアピン発現カセットのST - LSIイントロンに結合するように設計されたプライマーを用いるRT - PCRに用いられる。さらに、RNAi構築物における各標的遺伝子に対する特異的プライマーは、任意選択的に、植物体におけるsiRNA生成に必要なプロセシング前 (pre-processed) mRNAを增幅し、その生成を確認するために用いられる。各標的遺伝子の所望のバンドの増幅により、各トランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*) 植物におけるヘアピンRNAの発現が確認される。標的遺伝子のdsRNAヘアピンのsiRNAへのプロセシングは、任意選択的に、RNAプロットハイブリダイゼーションを用いて独立トランスジェニック系においてその後確認される。

20

30

30

【0256】

さらに、標的遺伝子との80%を超える配列同一性を有するミスマッチ配列を有するRNAi分子は、標的遺伝子との100%の配列同一性を有するRNAi分子について認められるものと同様の仕方でトウモロコシ根切り虫に作用する。同じRNAi構築物におけるヘアピンdsRNAを形成するミスマッチ配列と天然配列との対応により、摂食鞘翅目害虫の成長、発育および生存能力に影響を及ぼすことができる植物処理siRNAがもたらされる。

40

【0257】

標的遺伝子に対応するdsRNA、siRNAまたはmiRNAの植物体への送達および摂食による鞘翅目害虫によるその後の取り込みにより、RNA媒介遺伝子サイレンシングによる鞘翅目害虫における標的遺伝子の下方制御がもたらされる。標的遺伝子の機能が発育の1つまたは複数の段階で重要である場合、鞘翅目害虫の成長、発育および生殖が影響を受け、WCR、NCR、SCR、MCR、D.バルテアタ (*D. balteata*) ルコント、D. u. テネラ (*D. u. tenella*) およびD. u. ウンデシム punctata (*D. u. undecimlineata*)

50

impunctata) マンネルヘイムの少なくとも 1 つの場合、寄生し、摂食し、発育し、かつ／または生殖することの不成功につながるか、あるいは鞘翅目害虫の死につながる。次いで、鞘翅目害虫を防除するために、標的遺伝子の選択および RNAi の成功裏での適用を用いる。

【0258】

トランスジェニック RNAi 系および非形質転換ゼア・マイス (*Zea mays*) の表現型比較 ヘアピン dsRNA を創製するために選択した標的鞘翅目害虫遺伝子または配列は、あらゆる公知の植物遺伝子配列との類似性がない。したがって、これらの鞘翅目害虫遺伝子または配列を標的とする構築物による（全身性）RNAi の生成または活性化は、トランスジェニック植物に対してあらゆる有害な影響を及ぼすことは、予想されない。しかし、トランスジェニック系の発育および形態特性を非形質転換植物、ならびにヘアピン発現遺伝子を有さない「空」のベクターにより形質転換したトランスジェニック系の植物と比較する。植物の根、芽条、茎葉および生殖特性を比較する。トランスジェニック植物および非形質転換植物の根の長さおよび成長パターンに観察可能な差はない。高さ等の植物の芽条の特性、葉の数およびサイズ、開花時期、花のサイズおよび外観は、同様である。温室内で *in vitro* および土壤中で栽培した場合、一般的に、トランスジェニック系と標的 iRNA 分子の発現のないものとの間に観察可能な形態の差はない。
10

【実施例 10】

【0259】

鞘翅目害虫配列およびさらなる RNAi 構築物を含むトランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*)
20

鞘翅目害虫以外の生物を標的とする iRNA 分子に転写されるそのゲノムにおける異種コード配列を含むトランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*) 植物を、1 つまたは複数の殺虫 dsRNA 分子（例えば、配列番号 1 を含む遺伝子を標的とする dsRNA 分子を含む少なくとも 1 つの dsRNA 分子）を生成するようにアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) または WHISKERS (商標) 方法論 (Petolino and Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67 参照) により二次的に形質転換する。実施例 4 に述べたように本質的に調製される植物形質転換プラスミドベクターを、鞘翅目害虫以外の生物を標的とする iRNA 分子に転写されるそのゲノムにおける異種コード配列を含むトランスジェニック Hi II または B104 ゼア・マイス (*Zea mays*) 植物から得られたトウモロコシ懸濁細胞または未熟トウモロコシ胚にアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) または WHISKERS (商標) 媒介形質転換法により送達する。
30

【実施例 11】

【0260】

RNAi 構築物およびさらなる鞘翅目害虫防除配列を含むトランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*)

鞘翅目害虫生物を標的とする iRNA 分子（例えば、配列番号 1 を含む遺伝子を標的とする dsRNA 分子を含む少なくとも 1 つの dsRNA 分子）に転写されるそのゲノムにおける異種コード配列を含むトランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*) 植物を、1 つまたは複数の殺虫タンパク質分子、例えば、Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A、および Cyt2C 殺虫タンパク質を生成するようにアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) または WHISKERS (商標) 方法論 (Petolino and Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67 参照) により二次的に形質転換する。実施例 4 に述べたように本質的に調製される植物形質転換プラスミドベクターを、鞘翅目害虫生物を標的とする iRNA 分子に転写されるそのゲノムにおける異種コード配列を含むトランスジェニック B104 ゼア・マイス (*Zea mays*) 植物から得られたトウモロコシ懸濁細胞または未熟トウモロコシ胚にアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) または WHISKERS (商標) 媒介形質転換法により送達する。鞘翅目害虫の防除のための iRNA 分子および殺虫タン
40

10

20

30

40

50

パク質を生成する二重形質転換植物が得られる。

【実施例 12】

【0261】

C O P I a l p h a R N A i 注入後のネオトロピカルブラウンスティンクバグ（エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*)）の死亡

ネオトロピカルブラウンスティンクバグ (B S B ; エウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*)) コロニー

B S B は、65%の相対湿度、16:8時間明：暗サイクルの27インキュベーター中で飼育した。2~3日間にわたって採取した1グラムの卵を底に濾紙ディスクを備えた5L容器に播種し、換気のために容器を#18網で覆った。各飼育容器で約300~400匹の成体B S B が得られた。すべての段階で、昆虫に週3回新鮮なサヤマメを与え、ヒマワリ種子、ダイズおよびラッカセイ(3:1:1重量比)を含む種子混合物の小袋を週1回交換した。ウィックとしての綿プラグを入れたバイアルに水を補給した。最初の2週間の後に、昆虫を週1回新しい容器に移した。

10

【0262】

B S B 人工飼料

以下のように調製したB S B 人工飼料（調製してから2週間以内に用いた）。凍結乾燥サヤマメをM A G I C B U L L E T（登録商標）配合機で微粉末まで配合し、一方、生（有機）落花生を別個のM A G I C B U L L E T（登録商標）配合機で配合した。配合乾燥成分は、蓋をし、十分に振とうして成分を混合した、大規模M A G I C B U L L E T（登録商標）配合機で混ぜ合わせた（重量百分率：サヤマメ35%、落花生35%、スクロース5%、複合ビタミン（昆虫用Vanderzant Vitamin Mixture、SIGMA-ALDRICH、カタログ番号V1007）0.9%）。次いで、混合した乾燥成分を混合ボウルに加えた。別個の容器中で、水およびベノミル抗真菌剤(50 ppm; 25 μLの20000 ppm溶液 / 50 mL飼料溶液)を十分に混合し、次いで乾燥成分混合物に加えた。溶液が十分に配合されるまで、すべての成分を手により混合した。飼料を所望の大きさに成形し、アルミニウム箔で緩やかに包み、60で4時間加熱し、次いで冷却し、4で保存した。

20

【0263】

B S B トランスクリプトームアセンブリ

30

B S B の発育の6段階をm R N A ライブライバーの作製のために選択した。全R N A は、-70で凍結し、Fast Prep（登録商標）-24 Instrument (MP BIOMEDICALS)上Ly sing MATRIX A 2mL管 (MP BIOMEDICALS、Santa Ana、CA) 中10容積のLy sis / Binding緩衝液中でホモジナイズした昆虫から抽出した。全m R N A は、製造業者のプロトコールに従ってmir Vana (商標) miRNA Isolation Kit (AMBION; INVITROGEN)を用いて抽出した。illumina (登録商標) Hi Seq (商標) システム (San Diego、CA) を用いたR N A 配列決定により、R N A i 昆虫防除技術に用いる候補標的遺伝子配列が得られた。Hi Seq (商標)により、6つの試料で合計で約3億7千8百万リードが得られた。TRINIT Yアセンブリーソフトウェア (Grabherr et al. (2011) Nature Biotech. 29:644-652) を用いて各試料についてリードを個別にアセンブルした。アセンブルした転写物を組み合わせて、ブルされたトランスクリプトームを生成した。このB S B プールトランスクリプトームは、378, 457配列を含む。

40

【0264】

B S B C O P I a l p h a オルソログの同定

ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) C O P タンパク質配列 C O P - P A および C O P - P B : それぞれG E N B A N K 受託番号N P _ 477395 およびN P _ 728648をクエリー配列として用いてB S B プールトランスクリプトームのt B L A S T n 検索を実施した。B S B C O P I a l p h a (配列番号84) が、予測ペプチド配列配

50

列番号 85とともにエウスキスツス・ヘロス (*Euschistus heros*) 候補標的遺伝子として同定された。

【0265】

鑄型の作製およびdsRNA合成。

cDNAは、TRIzol（登録商標）試薬（LIFE TECHNOLOGIES）を用いて単一の若い成体昆虫（約90mg）から抽出した全BSB RNAから作製した。昆虫を200μLのTRIzol（登録商標）を含む1.5mL小遠心管中でペレット乳棒（FISHER BRANDカタログ番号12-141-363）およびPestle Motor Mixer（COLE-PARMER、Vernon Hills、IL）を用いて室温でホモジナイズした。ホモジナイズした後、追加の800μLのTRIzol（登録商標）を加え、ホモジネートをボルテックスミキサーで混合し、次いで室温で5分間インキュベートした。遠心分離により細胞デブリを除去し、上清を新しい管に移した。1mLのTRIzol（登録商標）に関する製造業者推奨TRIzol（登録商標）抽出プロトコールに従って、RNAペレットを室温で乾燥し、Elution Buffer Type 4（すなわち、10mMトリス-HCl、pH8.0）を用いたGFX PCR DNA AND Gel Extraction Kit（illustra（商標）；GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES）からの200μLのトリス緩衝液に再懸濁した。RNA濃度は、NanoDrop（商標）8000分光光度計（Thermo Scientific、Wilmington、DE）を用いて測定した。10

【0266】

cDNAの増幅

cDNAは、供給業者の推奨プロトコールに従って、RT-PCR用のSUPERSCRIPT FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM（商標）（INVITROGEN）を用いて5μgのBSB全RNA鑄型およびオリゴdTプライマーから逆転写した。転写反応の最終容積は、ヌクレアーゼ不含有水で100μLとした。20

【0267】

dsRNA転写用のDNA鑄型の増幅

プライマー-BSB_COP-1-For（配列番号88）およびBSB_COP-1-Rev（配列番号89）を用いて、BSB_COP1_alpha-1鑄型（配列番号86）とも呼ぶ、BSB_COP1_alpha_region_1を増幅した。プライマー-BSB_COP-2-For（配列番号90）およびBSB_COP-2-Rev（配列番号91）を用いて、BSB_COP1_alpha-2鑄型（配列番号87）とも呼ぶ、BSB_COP1_alpha_region_2を増幅した。DNA鑄型は、1μLのcDNA（上記）を鑄型として用いてタッチダウンPCR（1/サイクル低下でアニール温度を60から50に低下させた）により増幅した。それぞれBSB_COP1_alpha-1およびBSB_COP1_alpha-2の494bpおよび495bpを構成する断片が35サイクルのPCR中に生成した。上記の手順は、YFPv2-F（配列番号93）およびYFPv2-R（配列番号94）プライマーを用いて301bp陰性対照鑄型YFPv2（配列番号92）を増幅するためにも用いた。BSB_COP1_alpha-1、BSB_COP1_alpha-2およびYFPv2プライマーは、それらの5'末端におけるT7ファービジプロモーター配列（配列番号5）を含んでおり、したがって、dsRNA転写のためのYFPv2およびBSB_COP1_alpha DNA断片の使用を可能にした。30

【0268】

dsRNAの合成

dsRNAは、製造業者の指示に従って用いたMEGA script（商標）RNAiキット（AMBITION）により2μLのPCR産物（上記）を鑄型として用いて合成した。図1を参照のこと。dsRNAをNANO DROP（商標）8000分光光度計で定量40

10

20

40

50

し、ヌクレアーゼ不含有 0 . 1 X T E 緩衝液 (1 m M トリス H C l 、 0 . 1 m M E D T A 、 pH 7 . 4) で 5 0 0 n g / μ L に希釈した。

【 0 2 6 9 】

B S B 血体腔への d s R N A の注射

B S B は、 6 5 % 相対湿度および 1 6 : 8 時間明 : 暗の光周期の 2 7 インキュベーター中で、コロニーとして、サヤマメおよび種子飼料を与えて飼育した。二齢若虫（それぞれ体重 1 ~ 1 . 5 m g ）を傷害を防ぐために小ブラシを用いて緩やかに取り扱い、氷上のペトリ皿に入れて、昆虫を冷却し、静置した。各昆虫に 5 5 . 2 n L の 5 0 0 n g / μ L d s R N A 溶液（すなわち、 2 7 . 6 n g d s R N A ; 1 8 . 4 ~ 2 7 . 6 μ g / g 体重の用量）を注射した。注射は、 D r u m m o n d 3 . 5 インチ # 3 - 0 0 0 - 2 0 3 - G / X ガラス毛細管から引き抜いた注射針を取り付けた N A N O J E C T (商標) I I 注射器 (D R U M M O N D S C I E N T I F I C 、 B r o o m h a l l 、 P A) を用いて実施した。針の先端を折り、毛細管に軽油を入れ直し (backfilled) 、次いで 2 ~ 3 μ L の d s R N A を満たした。d s R N A を若虫の腹部に注射し（試験当たり d s R N A 当たり 1 0 匹の昆虫に注射）、別の 3 日に試験を繰り返した。注射した昆虫（ 1 ウエル当たり 5 匹）を、人工 B S B 飼料のペレットを含み、 P u l l - N - P e e l (商標) タブ (B I O - C V - 4 ; B I O - S E R V) で覆った 3 2 ウエルトレー (B i o - R T - 3 2 飼育トレー ; B I O - S E R V 、 F r e n c h t o w n 、 N J) に移した。水分は、綿芯を含む 1 . 5 m L 小遠心管中の 1 . 2 5 m L の水により供給した。トレーを 2 6 . 5 、 6 0 % 湿度および 1 6 : 8 時間明 : 暗の光周期でインキュベートした。生存数および体重を注射後 7 日後に測定した。
10
20

【 0 2 7 0 】

注射により B S B C O P I a l p h a が致死性 d s R N A 標的と同定された Y F P コード領域のセグメント、 Y F P v 2 を標的とする d s R N A を B S B 注射実験における陰性対照として用いた。表 1 に要約したように、二齢 B S B 若虫の血体腔に注射した 2 7 . 6 n g の B S B _ C O P I a l p h a - 1 および B S B _ C O P I a l p h a - 2 d s R N A は、 7 日以内に数値的により高い死亡率をもたらした。各 d s R N A の試験当たり 1 0 匹の昆虫に注射した。
30

【 0 2 7 1 】

【 表 1 】

表 1 注射 7 日後の二齢ブラウンスティングバグ若虫の血体腔内への BSB COPI alpha dsRNA 注射の結果

	平均死亡%	SEM	試験数	t 檢定(p)
BSB_COPI alpha-1	43.3	24.0	3	1.75E-01
YFPv2 dsRNA	3.3	3.3	3	

	平均死亡%	SEM	試験数	t 檢定(p)
BSB_COPI alpha-2	56.7	28.5	3	1.36E-01
YFPv2 dsRNA	3.3	3.3	3	

【 実施例 1 3 】

【 0 2 7 2 】

半翅目害虫配列を含むトランスジェニックゼア・マイス (Z e a m a y s)

配列番号 8 4 、配列番号 8 6 および / または配列番号 8 7 を含む核酸の発現ベクターを

含む 10 ~ 20 のトランスジェニック T₀ ゼア・マイス (*Zea mays*) 植物を実施例 7 で述べたように生成する。RNAi 構築物のヘアピン dsRNA を発現するさらなる 10 ~ 20 の T₁ ゼア・マイス (*Zea mays*) 独立系を BSB チャレンジのために得る。配列番号 86 または配列番号 87 に示す、または他の場合、配列番号 84 をさらに含むヘアピン dsRNA が得られ得る。これらは、RT - PCR または他の分子解析法により確認される。選択される独立 T₁ 系からの全 RNA 調製物は、任意選択的に、RNAi 構築物のそれぞれにおけるヘアピン発現カセットの ST - L S 1 イントロンに結合するように設計されたプライマーを用いる RT - PCR に用いられる。さらに、RNAi 構築物における各標的遺伝子に対する特異的プライマーは、任意選択的に、植物体における siRNA 生成に必要なプロセシング前 mRNA を增幅し、その生成を確認するために用いられる。各標的遺伝子の所望のバンドの増幅により、各トランスジェニックゼア・マイス (*Zea mays*) 植物におけるヘアピン RNA の発現が確認される。標的遺伝子の dsRNA ヘアピンの siRNA へのプロセシングは、任意選択的に、RNA プロットハイブリダイゼーションを用いて独立トランスジェニック系においてその後確認される。

10

【0273】

さらに、標的遺伝子との 80 % を超える配列同一性を有するミスマッチ配列を有する RNAi 分子は、標的遺伝子との 100 % の配列同一性を有する RNAi 分子について認められるものと同様の仕方でトウモロコシ根切り虫に作用する。同じ RNAi 構築物におけるヘアピン dsRNA を形成するミスマッチ配列と天然配列との対応により、摂食半翅目害虫の成長、発育および生存能力に影響を及ぼすことができる植物処理 siRNA がもたらされる。

20

【0274】

標的遺伝子に対応する dsRNA、siRNA、shRNA または miRNA の植物体への送達および摂食による半翅目害虫によるその後の取込みにより、RNA 媒介遺伝子サイレンシングによる半翅目害虫における標的遺伝子の下方制御がもたらされる。標的遺伝子の機能が発育の 1 つまたは複数の段階で重要である場合、半翅目害虫の成長、発育および生殖が影響を受け、エウスキスツス・ヘロス (*Euchistus heros*)、ピエゾドルス・グイルディニイ (*Piezodorus guildinii*)、ハリオモルファ・ハリス (*Halyomorpha halys*)、ネザラ・ビリデュラ (*Nezara viridula*)、アクロステルヌム・ヒラレ (*Acrosternum hilare*) およびエウスキスツス・セルブス (*Euschistus servus*) の少なくとも 1 つの場合、寄生し、摂食し、発育し、かつ / または生殖することの不成功につながるか、あるいは半翅目害虫の死につながる。次いで、半翅目害虫を防除するために、標的遺伝子の選択および RNAi の成功裏での適用を用いる。

30

【0275】

トランスジェニック RNAi 系および非形質転換ゼア・マイス (*Zea mays*) の表現型比較

30

ヘアピン dsRNA を創製するために選択した標的半翅目害虫遺伝子または配列は、あらゆる公知の植物遺伝子配列との類似性がない。したがって、これらの半翅目害虫遺伝子または配列を標的とする構築物による（全身性）RNAi の生成または活性化は、トランスジェニック植物に対してあらゆる有害な影響を及ぼすことは、予想されない。しかし、トランスジェニック系の発育および形態特性を非形質転換植物、ならびにヘアピン発現遺伝子を有さない「空」のベクターにより形質転換したトランスジェニック系の植物と比較する。植物の根、芽条、茎葉および生殖特性を比較する。トランスジェニック植物および非形質転換植物の根の長さおよび成長パターンに観察可能な差はない。高さ等の植物の芽条の特性、葉の数およびサイズ、開花時期、花のサイズおよび外観は、同様である。温室内で in vitro および土壤中で栽培した場合、一般的に、トランスジェニック系と標的 iRNA 分子の発現のないものとの間に観察可能な形態の差はない。

40

【実施例 14】

【0276】

半翅目害虫配列を含むトランスジェニックグリシン・マクス (*Glycine max*)

50

配列番号 8 4、配列番号 8 6 および / または配列番号 8 7 を含む核酸の発現ベクターを含む 10 ~ 20 のトランスジェニック T 0 グリシン・マクス (Glycine max) 植物を、以下のように、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換による等を含む、当技術分野で公知のように生成する。成熟ダイズ (グリシン・マクス (Glycine max)) 種子を塩素ガスで一夜 16 時間滅菌する。塩素ガスによる滅菌後、種子を塩素ガスを消散させるための Laminar (商標) 流フード内の開放容器に入れる。次に、滅菌済み種子をブラックボックスを用いた暗所で滅菌 H 2 O を 16 時間、24 で吸収させる。

【 0 2 7 7 】

分割種子ダイズの調製。

種子外被を分離し、除去し、種子を 2 つの子葉部分に分割するために種子のへそに沿って、スカルペルに取り付けられた # 10 ブレードを用いて縦方向に切断されているダイズ種子物質のプロトコールにより要求されている調製物である胚軸の一部を含む分割ダイズ種子。胚軸を部分的に除去することに十分な注意を払い、胚軸の約 1 / 2 ~ 1 / 3 が子葉の節末端に付着したままとする。

【 0 2 7 8 】

接種。

次いで、胚軸の一部を含む分割ダイズ種子を配列番号 8 4、配列番号 8 6 および / または配列番号 8 7 を含むバイナリープラスミドを含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) (例えば、EHA 101 または EHA 105 株) の溶液中に約 30 分間浸漬する。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 溶液は、胚軸を含む子葉を浸漬する前に = 0 . 6 O D 650 の最終濃度に希釈する。

【 0 2 7 9 】

共培養。

接種後、分割ダイズ種子をろ紙片で覆ったペトリ皿中の共培養培地上でアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 菌株とともに 5 日間共培養する (Wang, Kan. Agrobacterium Protocols. 2.1. New Jersey: Humana Press, 2006. Print.)。

【 0 2 8 0 】

芽条誘導。

共培養の 5 日後に、分割ダイズ種子を B 5 塩、B 5 ビタミン、28 mg / L 第一鉄、38 mg / L Na2EDTA、30 g / L スクロース、0 . 6 g / L MES、1 . 11 mg / L BAP、100 mg / L Timenitin (商標)、200 mg / L セホタキシムおよび 50 mg / L バンコマイシン (pH 5 . 7) を含む液体芽条誘導 (SI) 培地で洗浄する。次いで分割ダイズ種子を B 5 塩、B 5 ビタミン、7 g / L Noble 寒天、28 mg / L 第一鉄、38 mg / L Na2EDTA、30 g / L スクロース、0 . 6 g / L MES、1 . 11 mg / L BAP、50 mg / L Timenitin (商標)、200 mg / L セホタキシム、50 mg / L バンコマイシン (pH 5 . 7) からなる芽条誘導 I (SI I) 培地上で、子葉の平らな側を上向きにし、子葉の節末端を培地に埋め込んで培養する。2 週間の培養の後に、形質転換分割ダイズ種子の外植体を 6 mg / L グルホシネット (Liberty (登録商標)) を添加した SI I 培地を含む芽条誘導 II (SI II) 培地上に移す。

【 0 2 8 1 】

芽条伸長。

SI II 培地上の 2 週間の培養の後に、子葉を外植体から除去し、子葉の基部で切断を行うことによって胚軸を含むフラッシュシュートパッド (flush shoot pad) を摘出す。子葉から単離したシュートパッドを芽条伸長 (SE) 培地に移す。SE 培地は、MS 塩、28 mg / L 第一鉄、38 mg / L Na2EDTA、30 g / L スクロース、0 . 6 g / L MES、50 mg / L アスパラギン、100 mg / L L - ピログルタミン酸、0 . 1 mg / L IAA、0 . 5 mg / L GA3、1 mg / L ゼアチニリボシド、5

10

20

30

40

50

0 mg / L Timentin(商標)、200 mg / L セホタキシム、50 mg / L バンコマイシン、6 mg / L グルホシネット、7 g / L Noble寒天(pH 5.7)からなっている。培養物を新鮮なSE培地に2週間ごとに移す。培養物をConviron(商標)成長チャンバー内で80~90 μmol / m²秒の光度の18時間明期で24で成長させる。

【0282】

発根。

子葉シートパッドの基部で伸長芽条を切断することによって、子葉シートパッドから発生した伸長芽条を単離し、伸長芽条を1 mg / L IBA(インドール3-酢酸)に1~3分間浸漬して、発根を促進した。次に、伸長芽条をphytaトレー中発根培地(MS塩、B5ビタミン、28 mg / L 第一鉄、38 mg / L Na₂EDTA、20 g / Lスクロースおよび0.59 g / L MES、50 mg / L アスパラギン、100 mg / L L-ピログルタミン酸ならびに7 g / L Noble寒天、pH 5.6)に移す。

10

【0283】

栽培。

24、18時間明期のConviron(商標)成長チャンバー内の1~2週間の培養の後、根を発生した芽条を被覆sundaeカップ中土壤ミックスに移し、小植物の順化のために一定温度(22)および湿度(40~50%)下での120~150 μmol / m²秒の光度の長日条件下(16時間明/8時間暗)のConviron(商標)成長チャンバー(モデルCMP4030およびCMP3244、Controlled Environments Limited、Winnipeg、Manitoba、Canada)に入れた。発根小植物は、さらなる順化および頑健なトランスジェニックダイズ植物の樹立のために温室に移す前に、sundaeカップ中で数週間順化させる。

20

【0284】

RNAi構築物のヘアピンdsRNAを発現するさらなる10~20のT₁グリシン・マクス(Glycine max)独立系をBSBチャレンジのために得る。配列番号86および/または配列番号87に示す、または他の場合、配列番号84を含むヘアピンdsRNAが得られ得る。これらは、RT-PCRまたは他の分子解析法により確認される。選択される独立T₁系からの全RNA調製物は、任意選択的に、RNAi構築物のそれぞれにおけるヘアピン発現カセットのST-LS1イントロンに結合するように設計されたプライマーを用いるRT-PCRに用いられる。さらに、RNAi構築物における各標的遺伝子に対する特異的プライマーは、任意選択的に、植物体におけるsiRNA生成に必要なプロセシング前mRNAを増幅し、その生成を確認するために用いられる。各標的遺伝子の所望のバンドの増幅により、各トランスジェニックグリシン・マクス(Glycine max)植物におけるヘアピンRNAの発現が確認される。標的遺伝子のdsRNAへアピンのsiRNAへのプロセシングは、任意選択的に、RNAプロットハイブリダイゼーションを用いて独立トランスジェニック系においてその後確認される。

30

【0285】

さらに、標的遺伝子との80%を超える配列同一性を有するミスマッチ配列を有するRNAi分子は、標的遺伝子との100%の配列同一性を有するRNAi分子について認められるものと同様の仕方でトウモロコシ根切り虫に作用する。同じRNAi構築物におけるヘアピンdsRNAを形成するミスマッチ配列と天然配列との対合により、摂食半翅目害虫の成長、発育および生存能力に影響を及ぼすことができる植物処理siRNAがもたらされる。

40

【0286】

標的遺伝子に対応するdsRNA、siRNA、shRNAまたはmiRNAの植物体への送達および摂食による半翅目害虫によるその後の取込みにより、RNA媒介遺伝子サイレンシングによる半翅目害虫における標的遺伝子の下方制御がもたらされる。標的遺伝子の機能が発育の1つまたは複数の段階で重要である場合、半翅目害虫の成長、発育および生殖が影響を受け、エウスキヌツス・ヘロス(Euschistus heros)、ピエゾドルス・グ

50

イルディニイ (*Piezodorus guildinii*)、ハリオモルファ・ハリス (*Halyomorpha halys*)、ネザラ・ビリデュラ (*Nezara viridula*)、アクロステルヌム・ヒラレ (*Acrosternum hilare*) およびエウスキスツス・セルブス (*Euschistus servus*) の少なくとも 1 つの場合、寄生し、摂食し、発育し、かつ / または生殖することの不成功につながるか、あるいは半翅目害虫の死につながる。次いで、半翅目害虫を防除するために、標的遺伝子の選択および RNAi の成功裏での適用を用いる。

【0287】

トランスジェニック RNAi 系および非形質転換グリシン・マクス (*Glycine max*) の表現型比較

ヘアピン dsRNA を創製するために選択した標的半翅目害虫遺伝子または配列は、あらゆる公知の植物遺伝子配列との類似性がない。したがって、これらの半翅目害虫遺伝子または配列を標的とする構築物による（全身性）RNAi の生成または活性化は、トランスジェニック植物に対してあらゆる有害な影響を及ぼすことは、予想されない。しかし、トランスジェニック系の発育および形態特性を非形質転換植物、ならびにヘアピン発現遺伝子を有さない「空」のベクターにより形質転換したトランスジェニック系の植物と比較する。植物の根、芽条、茎葉および生殖特性を比較する。トランスジェニック植物および非形質転換植物の根の長さおよび成長パターンに観察可能な差はない。高さ等の植物の芽条の特性、葉の数およびサイズ、開花時期、花のサイズおよび外観は、同様である。温室内で in vitro および土壤中で栽培した場合、一般的に、トランスジェニック系と標的 RNA 分子の発現のないものとの間に観察可能な形態の差はない。

10

20

30

40

50

【実施例 15】

【0288】

人工飼料でのエウスキスツス・ヘロス (*E. heros*) バイオアッセイ

人工飼料での dsRNA 摂食アッセイにおいて、注射実験（実施例 12）の場合と同様に、約 18 mg の人工飼料のペレットおよび水を含む 32 ウエルトレーラーを準備する。200 ng / μl の濃度の dsRNA を食物ペレットおよび水試料の 2 つのウエルのそれぞれに 100 μl で加える。5 匹の二齢エウスキスツス・ヘロス (*E. heros*) 若虫を各ウエルに導入する。水試料および YFP 転写物を標的とする dsRNA を陰性対照として用いる。実験は、異なる 3 日に反復する。8 日間の処置の後に生存昆虫の体重を測定し、死亡率を決定する。

【実施例 16】

【0289】

鞘翅目害虫配列を含むトランスジェニックシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

COP1 alpha (配列番号 84) のセグメントを含むヘアピン形成のための標的遺伝子構築物を含むシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 形質転換ベクターは、実施例 4 と同様な標準的分子法を用いて作製する。シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 形質転換は、標準的アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) ベースの手順を用いて実施する。T1 種子は、グルホシネット耐性選択可能マークターを用いて選択する。トランスジェニック T1 シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物を作製し、同型接合単純コピー T2 トランスジェニック植物を昆虫試験用に作製する。バイオアッセイは、花房を有する成長シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物について実施する。5 ~ 10 匹の昆虫を各植物に配置し、14 日以内に生存についてモニターする。

【0290】

シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 形質転換ベクターの構築。

COP1 alpha (配列番号 84) のセグメントを含むヘアピン形成のための標的遺伝子構築物を含むエントリーべクター pDAB3916 に基づくエントリークローニングは、化学的に合成された断片 (DNA 2.0, Menlo Park, CA) および標準分子クローニング法の組合せを用いてアセンブルする。RNA 一次転写物による分子内ヘアピン形成は、反対方向の標的遺伝子セグメントの 2 つのコピーを配列する（单一転写単位内で）ことによって促進され、2 つのセグメントは、ST - LS1 イントロン配列 (配列

番号 14) によって分離されている (Vancanneyt et al. (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50)。したがって、一次 mRNA 転写物は、2つの COP I alpha 遺伝子セグメント配列をインtron 配列によって分離された、互いの大きな逆方向反復配列として含む。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ユビキチン 10 プロモーターのコピー (Callis et al. (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493) は、一次 mRNA へアピン転写物の产生を促進するために用い、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のオープンリーディングフレーム 23 の 3' 非翻訳領域を含む断片 (AtuORF23 3' UTR v1; 米国特許第 5,428,147 号明細書) は、ヘアピン - RNA 発現遺伝子の転写を終結させるために用いる。

【0291】

上述のエントリーべクター pDAB3916 内のヘアピンクローンは、一般的なバイナリーデステイニエーションベクター pDAB101836 との標準 GATEWAY (登録商標) 組換え反応に用いて、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 形質転換用のヘアピン RNA 発現形質転換ベクターを产生する。

【0292】

バイナリーデステイニエーションベクター pDAB101836 は、キャッサバ葉脈ウイルスプロモーター (CsVMV プロモーター v2、米国特許第 7601885 号明細書; Verdaguer et al. (1996) Plant Molecular Biology, 31:1129-1139) の調節下の除草剤耐性遺伝子 DSM-2 v2 (米国特許出願公開第 2011/0107455 号明細書) を含む。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のオープンリーディングフレーム 1 の 3' 非翻訳領域を含む断片 (AtuORF1 3' UTR v6; Huang et al. (1990) J. Bacteriol., 172:1814-1822) は、DSM2 v2 mRNA の転写を終結させるために用いる。

【0293】

YFP ヘアピン RNA を発現する遺伝子を含む、陰性対照バイナリーコンストラクタ pDAB114507 は、一般的なバイナリーデステイニエーションベクター (pDAB101836) およびエントリーべクター pDAB3916 を用いた標準 GATEWAY (登録商標) 組換え反応により構築する。エントリー構築物 pDAB112644 は、シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) ユビキチン 10 プロモーター (上記のような) の発現制御下の YFP ヘアピン配列 (hpYFP v2-1、配列番号 95) およびアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の ORF23 3' 非翻訳領域 (上記のような) を含む断片を含む。

【0294】

殺虫性ヘアピン RNA を含むトランスジェニックシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) の产生: アグロバクテリウム媒介形質転換。

ヘアピン配列を含むバイナリープラスミドをアグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 菌株 GV3101 (pMP90RK) にエレクトロポレーションする。組換えアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) クローンは、組換えアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) コロニーのプラスミド調製物の制限解析により確認される。製造業者の推奨プロトコールに従って QIAGEN Plasmid Max Kit (QIAGEN、カタログ番号 2162) を用いて、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 培養からプラスミドを抽出する。

【0295】

シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 形質転換および T₁ 選択。

12 ~ 15 個のシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物 (c.v. Columbia) を 250 μmol/m² の光度、25、18 : 6 時間の明 : 暗条件を有する温室内の 4" ポットで生育させる。形質転換の 1 週間前に一次花茎を切り取る。10 μl の組換えアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) グリセロールストックを 100 ml の LB プロス (Sigma L3022) + 100 mg/L スペクチノマイシン + 50 mg/L カナマイシン中で 28 度インキュベートし、225 rpm で 72 時間振とうすることによって、

10

20

30

40

50

アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 接種物を調製する。アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 細胞を収穫し、花浸漬の前に 5 % スクロース + 0 . 0 4 % S i l w e t - L 7 7 (L e h l e S e e d s カタログ番号 V I S - 0 2) + 1 0 μ g / L ベンゾアミノプリン (B A) 溶液中に O D 6 0 0 0 . 8 ~ 1 . 0 まで懸濁する。植物の地上部をアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 溶液中に緩やかに搅拌しながら 5 ~ 1 0 分間浸漬する。次いで、植物を、結実まで定期的な散水および施肥による正常な成長のために温室に移す。

【実施例 1 7】

【0 2 9 6】

トランスジェニックシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) の成長およびバイオアッセイ。
ヘアピン RNA i 構築物で形質転換した T 1 シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) の選択。
各形質転換からの最大 2 0 0 m g の T 1 種子を 0 . 1 % アガロース溶液中に層状にする。
種子を # 5 s u n s h i n e 培地を含む発芽トレー (1 0 . 5 " x 2 1 " x 1 " ; T . O . P l a s t i c s I n c . , C l e a r w a t e r , M N) に植え込む。形質転換体は、植え込みの 6 および 9 日後に 2 8 0 g / h a の I g n i t e (登録商標) (グリホシネート) に対する耐性に関して選択する。選択されたイベントを直径 4 " のポットに移植する。挿入コピー解析は、 R o c h e L i g h t C y c l e r 4 8 0 を用いた加水分解定量的実時間 P C R (q P C R) によって移植の 1 週間以内に実施する。 P C R プライマーおよび加水分解プローブは、 L i g h t C y c l e r P r o b e D e s i g n S o f t w a r e 2 . 0 (R o c h e) を用いて D S M 2 v 2 選択可能マークーに対して設計する。植物は、 2 4 で、 1 0 0 ~ 1 5 0 m E / m 2 s の強度の蛍光および白熱電灯下で 1 6 : 8 明 : 暗光周期で維持する。
10

【0 2 9 7】

エウスキスツス・ヘロス (*E. heros*) 植物摂食バイオアッセイ。
少なくとも 4 つの低コピー (1 ~ 2 挿入) 、 4 つの中コピー (2 ~ 3 挿入) および 4 つの高コピー (4 挿入) イベントを各構築物ごとに選択する。植物を開花期 (植物が花および長角果を含む) まで成長させる。昆虫の同定を容易にするために土壤の表面を約 5 0 m l の白砂で覆う。 5 ~ 1 0 匹の二齢エウスキスツス・ヘロス (*E. heros*) 若虫を各植物上に導入する。植物を直径が 3 " 、高さが 1 6 " で、 0 . 0 3 " の壁厚を有するプラスチック管 (品目番号 4 8 4 4 8 5 、 V i s i p a c k F e n t o n , M O) で覆い、昆虫を隔離するために管をナイロン網で覆う。植物をコンバイロン (c o n v i r o n) 内で通常の温度、光および散水条件下で保つ。 1 4 日に、昆虫を収集し、体重を測定し、死亡百分率ならびに成長阻害 (1 - 処理体重 / 対照体重) を計算する。 Y F P ヘアピン発現植物を対照として用いる。
20

【0 2 9 8】

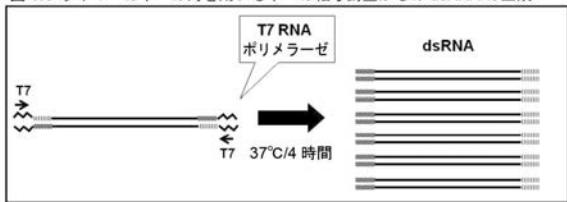
T 2 シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 種子の発生および T 2 バイオアッセイ。
T 2 種子は、各構築物についての選択される低コピー (1 ~ 2 挿入) イベントから產生させる。植物 (同型接合および / または異型接合) を上述のように、エウスキスツス・ヘロス (*E. heros*) バイオアッセイに供する。 T 3 種子を同型接合体から収穫し、将来の解析のために保存する。
30

【0 2 9 9】

本開示は、様々な修正および代替形態を受け入れる余地があり得るが、特定の実施形態を例として詳細に述べた。しかし、本開示は、開示した特定の形態に限定されるものでないことを理解すべきである。それどころか、本開示は、以下の添付の特許請求の範囲およびそれらの適法の等価物により規定される本開示の範囲内に入るすべての修正、等価物および代替手段を含むものとする。
40

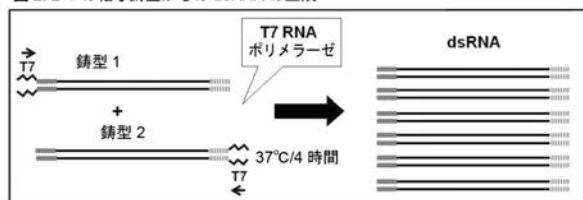
【図1】

図1.プライマーの単一の対を用いる單一の転写録型からのdsRNAの生成



【図2】

図2.2つの転写録型からのdsRNAの生成



【配列表】

2017536097000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/54472															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/435, C12N 15/82, A01H 5/10 (2016.01) CPC - C07K 14/43536, C07K 14/43536, C07H 21/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC(8): C07K 14/435, 1/14; A01H 5/10, 5/00; A01N 65/00, 57/16; C12N 15/82, 1/21, 15/113, 15/63, 5/10; A01P 7/04; A23L 1/00, 1/10; A23K 1/00; C07H 21/04 (2016.01) CPC: C12N 15/8285, 15/8282, 15/113, 15/8218, 15/8286; C07H 21/04; C07K 14/43536																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); PubMed; Lens.org PatSeq; Google/Google Scholar; EBSCO: SEQ ID NOs: 1, 84; 'Diabrotica', 'Euschemus', plant, transformation, vector, promoter, polynucleotid*, recombinant*, repress*, inhibit*, protect*, resist*, plant*, pest*, 'coleopteran', 'hemipteran', 'isolat', nucle*, acid*, link*, heterologous*, control*, insect*, popular*																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category*</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2012/0137387 A1 (BAUM, J et al.) 31 May 2012; abstract; paragraphs [0013], [0016]-[0017], [0019]-[0027], [0029]-[0031], [0033], [0045], [0046], [0048], [0049], [0052], [0061], [0068], [0076], [0077], [0085], [0087], [0108], [0109], [0115], [0117], [0129], [0157], [0160], [0182], [0194], [0245], [0246], [0248]; claims 1, 3-13, 15, 16, 18, 19, 21-24, 28-30; nucleotides 1358-2708 of SEQ ID NO: 847.</td> <td>1, 3-40, 45, 47, 49</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2014/0298536 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 02 October 2014; abstract; paragraphs [0056], [0174], [0197]; claims 10, 40, 41.</td> <td>46, 48, 50-52</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014/0275208 A1 (HU, X et al.) 18 September 2014; abstract; paragraph [0005].</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 8,630,440 B2 (SIEGFRIED, B et al.) 10 September 2013; column 5, lines 20-38</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2012/0137387 A1 (BAUM, J et al.) 31 May 2012; abstract; paragraphs [0013], [0016]-[0017], [0019]-[0027], [0029]-[0031], [0033], [0045], [0046], [0048], [0049], [0052], [0061], [0068], [0076], [0077], [0085], [0087], [0108], [0109], [0115], [0117], [0129], [0157], [0160], [0182], [0194], [0245], [0246], [0248]; claims 1, 3-13, 15, 16, 18, 19, 21-24, 28-30; nucleotides 1358-2708 of SEQ ID NO: 847.	1, 3-40, 45, 47, 49	Y	US 2014/0298536 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 02 October 2014; abstract; paragraphs [0056], [0174], [0197]; claims 10, 40, 41.	46, 48, 50-52	A	US 2014/0275208 A1 (HU, X et al.) 18 September 2014; abstract; paragraph [0005].	2	A	US 8,630,440 B2 (SIEGFRIED, B et al.) 10 September 2013; column 5, lines 20-38	2
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 2012/0137387 A1 (BAUM, J et al.) 31 May 2012; abstract; paragraphs [0013], [0016]-[0017], [0019]-[0027], [0029]-[0031], [0033], [0045], [0046], [0048], [0049], [0052], [0061], [0068], [0076], [0077], [0085], [0087], [0108], [0109], [0115], [0117], [0129], [0157], [0160], [0182], [0194], [0245], [0246], [0248]; claims 1, 3-13, 15, 16, 18, 19, 21-24, 28-30; nucleotides 1358-2708 of SEQ ID NO: 847.	1, 3-40, 45, 47, 49															
Y	US 2014/0298536 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 02 October 2014; abstract; paragraphs [0056], [0174], [0197]; claims 10, 40, 41.	46, 48, 50-52															
A	US 2014/0275208 A1 (HU, X et al.) 18 September 2014; abstract; paragraph [0005].	2															
A	US 8,630,440 B2 (SIEGFRIED, B et al.) 10 September 2013; column 5, lines 20-38	2															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "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																	
Date of the actual completion of the international search 24 February 2016 (24.02.2016)		Date of mailing of the international search report 03 MAR 2016															
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-6300		Authorized officer Shane Thomas <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/54472
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: 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)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>***Please See Supplemental Page***</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input checked="" type="checkbox"/> 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.: Group I: Claims 1-40, 45-52 		
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/54472

-***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.

Group I: Claims 1-40 and 45-52 are directed toward an isolated nucleic acid; and methods, additional nucleic acids and constructs related thereto.

Group II: Claims 41-44 are directed toward methods for producing transgenic plant cells.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include SEQ ID NO: 1, which is not present in Group II, the special technical features of Group II including an essential gene in a hemipteran pest, which is not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a method for producing a transgenic plant cell, the method comprising: transforming a plant cell with a vector comprising a means for protecting a plant from insect pests; culturing the transformed plant cell under conditions sufficient to allow for development of a plant cell culture comprising a plurality of transformed plant cells; selecting for transformed plant cells that have integrated the means for providing insect pest resistance to a plant into their genomes; screening the transformed plant cells for expression of a means for inhibiting expression of a gene in an insect pest; and selecting a plant cell that expresses the means for inhibiting expression of a gene in an insect pest.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2014/159829 A1 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) (hereinafter 'Du Pont').

Du Pont discloses a method for producing a transgenic plant cell (a method for producing a transgenically transformed plant cell; paragraphs [000108], [000109]), the method comprising: transforming a plant cell (paragraph [000108]) with a vector (with a vector comprising a transfer cassette; paragraphs [00063], [000108]) comprising a means for protecting a plant from insect pests (comprising a silencing element that reduces the expression of a target polynucleotide in a desired pest, for protecting a plant from the pest; paragraphs [00061], [00082]); culturing the transformed plant cell under conditions sufficient to allow for development of a plant cell culture (transforming the cells and culturing the cells in selective media to produce a plant cell culture comprising transformed cells; paragraphs [000136], [000137]) comprising a plurality of transformed plant cells (paragraphs [000136], [000137]); selecting for transformed plant cells (culturing the cells in selective media to select transformed plant cells; paragraphs [00136], [000137]) that have integrated (paragraphs [000130], [000137]) the means for providing insect pest resistance to a plant into their genomes (the silencing element that confers insect resistance into their genomes; paragraphs [00061], [00082], [000130], [000137]); screening the transformed plant cells for a means for inhibiting expression of a gene in an insect pest (screening transformed plants grown from the plant cells for zygosity for the silencing element that inhibits expression of a gene in an insect pest (screening the transformed plant cells for a means for inhibiting expression of a gene in an insect pest); paragraphs [00061], [00082], [000139]); and selecting a plant cell that comprises the means for inhibiting expression of a gene in an insect pest (and selecting homozygous plant seeds for growth and examination of insect protection (selecting a plant cell that comprise the means for inhibiting expression of a gene in an insect pest); paragraphs [00061], [00082], [000169]).

Since none of the special technical features of the Groups I-II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Du Pont reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00	A
A 0 1 H 5/10 (2006.01)	A 0 1 H 5/10	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,R0,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72) 発明者 ナルバ, ケネス

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 リー, ファロン

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 ゲング, シャオシン

アメリカ合衆国 インディアナ州 46077, ジオンズビル イーグル レイク ドライブ 6
206

(72) 発明者 エランゴ, ナヴィン

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 ヘンリー, マシュー ジェイ.

アメリカ合衆国 インディアナ州 46256, インディアナポリス, ピーチ クノール 822
6

(72) 発明者 ランガサミ, ムルゲサン

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 ウスレイ, アロン ティー.

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 アロア, カニカ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07093, ウエスト ニュー ヨーク ユニット 43
4, アベニュー アット ポート インペリアル 20

(72) 発明者 ガンドラ, プレームチャンド

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 ウォーデン, サラ イー.

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

(72) 発明者 フィッシュレピッチ, エリーヌ

アメリカ合衆国 インディアナ州 48268, インディアナポリス, ジオンズビル ロード 9
330

F ターΔ(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 AD07 CA17 CB02
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA48