

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

相乗的に有効な量で、

a)

(i) 植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドおよび植物を病原体から保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのタンパク質もしくはペプチド；および

(ii) 標的配列、外膜タンパク質もしくは外膜タンパク質断片を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞
および

b) ビテルタノール、ピキサフェン、ブロムコナゾール、カルベンダジム、カルプロパミド、ジクロフルアニド、フェナミドン、フェンヘキサミド、酢酸フェンチン、水酸化フェンチン、フルオピコリド、フルオキサストロビン、フルキンコナゾール、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソチアニル、メトミノストロビン、オフラセ (ofurace)、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロクロラズ、プロパモカルブ、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピリメタニル、スピロキサミン、トリルフルアニド、トリアジメホン、トリアジメノール、トリアゾキシド、トリフロキシストロビン、N-[5-クロロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-N-シクロプロピル-3-(ジフルオロメチル)-5-フルオロ-1-メチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、2,6-ジメチル-1H,5H-[1,4]ジチイノ[2,3-c:5,6-c']ジピロール-1,3,5,7(2H,6H)-テトロン、およびN-(5-クロロ-2-イソプロピルベンジル)-N-シクロプロピル-3-(ジフルオロメチル)-5-フルオロ-1-メチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミドからなる群から選択される少なくとも一つの殺菌剤

を含む組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも一つのタンパク質もしくはペプチドが、植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素および細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素からなる群から選択される植物成長刺激性タンパク質もしくはペプチドである請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記外膜産生性バチルス細胞がバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の細胞である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員が、バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*)、バチルス・シュードミコイデス (*Bacillus pseudomycoides*)、バチルス・サマニイ (*Bacillus samanii*)、バチルス・ガエモケンシス (*Bacillus gaemokensis*)、バチルス・ウェイヘンステフェンシス (*Bacillus weihenstephensis*)、バチルス・トヨイエンシス (*Bacillus toyoiensis*) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記標的配列または外膜タンパク質が、

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 35 と少なくとも約 43% 同一性を有するアミノ酸配列 (アミノ酸 25 から 35 との同一性は少なくとも約 54% である。)；

配列番号 1 のアミノ酸 1 から 35 を含む標的配列；

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 35 を含む標的配列；

10

20

30

40

50

配列番号 1 のアミノ酸 22 から 31 を含む標的配列；

配列番号 1 のアミノ酸 22 から 33 を含む標的配列；

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 31 を含む標的配列；

配列番号 1 を含む標的配列；または

配列番号 2 と少なくとも 85 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む外膜タンパク質を含む請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記植物成長刺激化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素が、アセトインレダクターゼ、インドール-3-アセトアミドヒドロラーゼ、トリプトファンモノオキシゲナーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ジアセチルレダクターゼ、ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、アミノトランスフェラーゼ、トリプトファンデカルボキシラーゼ、アミノオキシダーゼ、インドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼ、インドール-3-アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、トリプトファン側鎖オキシダーゼ、ニトリルヒドロラーゼ、ニトリラーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、アデノシンリン酸イソペンテニルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、アデノシンキナーゼ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、CYP735A、5'リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、ゼアチンシーストランスイソメラーゼ、ゼアチンO-グルコシルトランスフェラーゼ、 β -グルコシダーゼ、シス-ヒドロキシラーゼ、CKシス-ヒドロキシラーゼ、CK-N-グルコシルトランスフェラーゼ、2,5-リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ゼアチンレダクターゼ、ヒドロキシルアミンレダクターゼ、2-オキシグルタル酸ジオキシゲナーゼ、ジベレリン酸2B/3Bヒドロラーゼ、ジベレリン3-オキシダーゼ、ジベレリン20-オキシダーゼ、キトサナーゼ、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ、 β -1,4-グルカナーゼ、 β -1,6-グルカナーゼ、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼ、およびノッド因子産生に関与する酵素からなる群から選択される請求項 2 から 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記植物成長刺激化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素がキトサナーゼである請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記融合タンパク質が配列番号 109 を含む請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素が、セルラーゼ、リパーゼ、リグニンオキシダーゼ、プロテアーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、ホスファターゼ、ニトロゲナーゼ、ヌクレアーゼ、アミダーゼ、硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、アミラーゼ、アンモニアオキシダーゼ、リグニナーゼ、グルコシダーゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ペクチナーゼ、グルカナーゼ、スルファターゼ、ウレアーゼ、キシラナーゼ、およびシデロホアからなる群から選択される請求項 2 から 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記酵素がエンドセルラーゼ、エキソセルラーゼ、および β -グルコシダーゼからなる群から選択されるセルラーゼである請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記融合タンパク質がバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) エンドグルカナーゼを含む請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記融合タンパク質が配列番号 107 を含む請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組換えバチルス細胞がバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thur*

10

20

30

40

50

ingiensis) BT013A由来である請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記酵素がホスホリパーゼである請求項9に記載の組成物。

【請求項15】

前記融合タンパク質が配列番号108を含む請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記融合タンパク質が、前記融合タンパク質の標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片に固有の孢子形成プロモーターの制御下に発現される請求項1から15のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項17】

前記融合タンパク質が、高発現孢子形成プロモーターの制御下に発現される請求項1から16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項18】

前記高発現孢子形成プロモーターが σ -K孢子形成特異的ポリメラーゼプロモーター配列を含む請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記孢子形成プロモーターが、配列番号：85から103のいずれか一つの核酸配列と少なくとも80%同一性を有する核酸配列を含む請求項16から18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項20】

前記少なくとも一つの殺菌剤が、カルベンダジム、フルキンコナゾール、イソチアニル、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロチオコナゾールおよびトリフロキシストロビンからなる群から選択される請求項1から19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項21】

前記殺菌剤がトリフロキシストロビンである請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

前記少なくとも一つの殺菌剤がイソチアニルである請求項1から19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

請求項1から22のいずれか1項に記載の組成物で処理された種子。

【請求項24】

植物成長促進および／または植物の健康増進のための、請求項1から23のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項25】

通常の植物もしくはトランスジェニック植物またはその種子を処理するための請求項24に記載の使用。

【請求項26】

植物、植物部分または植物周囲の場所を処理して植物成長を促進および／または植物の健康を増進する方法であって、

a)

(i) 少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および

(ii) 標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片

を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；および

b) ビテルタノール、ビキサフェン、ブロムコナゾール、カルベンダジム、カルプロパミド、ジクロフルアニド、フェナミドン、フェンヘキサミド、酢酸フェンチン、水酸化フェンチン、フルオピコリド、フルオキサストロビン、フルキンコナゾール、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソチアニル、メトミノストロビン、オフラセ (ofurace)、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロクロラズ、プロパモカルブ、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピリメタニル、スピロキサミン、トリルフルアニド、トリアジメホン、トリアジメノール、トリアゾキシド、トリフロキシストロビン、N-[5-クロ

10

20

30

40

50

ロー 2 - (トリフルオロメチル) ベンジル] - N - シクロプロピル - 3 - (ジフルオロメチル) - 5 - フルオロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボキサミド、2, 6 - ジメチル - 1 H, 5 H - [1, 4] ジチイノ [2, 3 - c : 5, 6 - c'] ジピロール - 1, 3, 5, 7 (2 H, 6 H) - テトロン、および N - (5 - クロロ - 2 - イソプロピル ベンジル) - N - シクロプロピル - 3 - (ジフルオロメチル) - 5 - フルオロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボキサミドからなる群から選択される少なくとも一つの殺菌剤

を同時または順次に施用する段階を含む方法。

【請求項 27】

前記標的配列または外膜タンパク質が、

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 35 と少なくとも約 43 % 同一性を有するアミノ酸配列 (アミノ酸 25 から 35 との同一性は少なくとも約 54 % である。) ;

配列番号 1 のアミノ酸 1 から 35 を含む標的配列 ;

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 35 を含む標的配列 ;

配列番号 1 のアミノ酸 22 から 31 を含む標的配列 ;

配列番号 1 のアミノ酸 22 から 33 を含む標的配列 ;

配列番号 1 のアミノ酸 20 から 31 を含む標的配列 ;

配列番号 1 を含む標的配列 ; または

配列番号 2 と少なくとも 85 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む外膜タンパク質を含む請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2014 年 9 月 17 日出願の米国暫定特許出願 62 / 051, 915 (その内容は、参照によって全体が本明細書に組み込まれる。) に対する優先権を主張するものである。

【0002】

電子的に提出された配列表への言及

配列表の公式コピーを、2015 年 9 月 14 日作成のファイル名「BCS149058 WO__ST25. txt」であってサイズが 152 キロバイトである ASCII 様式配列表として EFS - Web によって電子的に提出しており、本明細書と同時に提出している。この ASCII 様式文書に含まれる配列表は、本明細書の一部であり、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるものである。

【0003】

背景

発明の分野

本発明は、相乗的に効果的な量で、(i) (x) 少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質またはペプチド ; および (y) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞 ; および (ii) 昆虫、ダニ、線虫および / または植物病原体に対する活性を向上させる能力を示す本明細書に開示の特定の殺菌剤から選択される少なくとも一つの殺菌剤を含む組成物に関する。さらに本発明は、この組成物の使用ならびに植物成長を促進し、植物の健康を増進し、および / または植物および植物部分の全体的損傷を低減する方法に関するものである。

【背景技術】

【0004】

作物保護では、植物の健康および / または成長を向上させる方法が常に必要とされている。一般に、健康度の高い植物の方がより高い収量をもたらし、および / または植物もしくはその産物の品質が高くなる。

【0005】

10

20

30

40

50

植物の健康を増進するためには、無機物および有機物の両方に基づく肥料が世界的に用いられている。肥料は単一物質であるか組成物であることができ、栄養素を植物に提供するのに使用される。肥料使用の大きな躍進は、1840年ごろのJ u s t u s v o n L i e b i gによる窒素肥料の開発であった。しかしながら肥料は、土壌の酸性化および土壌における栄養素バランスの不安定化、例えばミネラル不足や塩分および重金属の濃縮を生じる可能性がある。さらに、過剰な肥料使用は、土壌動物相の変化をもたらす可能性があり、さらには地上水および地下水を汚染し得る。さらに、硝酸塩などの健康に有害な物質が植物や果実で濃縮させることもあり得る。

【0006】

さらに、殺虫剤および殺菌剤が、有害生物を防除するのに世界的に使用されている。合成殺虫剤または殺菌剤は多くの場合で非特異的であることから、他の天然の有益な生物を含む標的生物以外の生物に作用し得る。化学的性質のため、それらは毒性かつ非生物分解性でもあり得る。特に食品における化学物質の残留物に関連する環境問題および健康問題の可能性について、世界中の消費者の意識が高まっている。そのため、化学的（すなわち合成）農薬の使用または少なくとも量を減らすことへの消費者の圧力が大きくなっている。従って、有効な病害生物防除をなおも可能としながら、食物連鎖要件を管理する必要がある。

【発明の概要】

【0007】

合成殺虫剤または殺菌剤の使用から生じるさらなる問題は、殺虫剤または殺菌剤の繰り返しおよび排他的施用によって抵抗性の有害動物もしくは微生物の選択を生じる場合が多いという点である。通常、そのような株は同じ作用機序を有する他の有効成分に対して交差抵抗性でもある。そうすると前記活性化化合物による病原体の効果的防除はもはやできない。しかしながら、新たな作用機序を有する有効成分は、開発が困難かつ費用がかかる。

【0008】

植物健康増進剤および／または植物保護剤として作用する生物農薬（BCA）の使用が、肥料や合成農薬に代わる選択肢である。場合により、BCAの有効性は、特に高い感染圧の場合には、従来の殺虫剤および殺菌剤の場合と同じレベルではない。結果的に、状況により、生物農薬、それらの突然変異体およびそれらによって産生される代謝物は、特に低施用量において、完全に満足なものとは限らない。従って、合成殺菌剤および殺虫剤と組み合わせて使用される新たな植物健康増進性組成物および／または植物保護組成物、例えば生物農薬を開発して上記の要件を満足しようとするのが常に必要とされている。

【0009】

これを考慮すると、特に、植物成長を向上させる能力および／または植物の健康を増進する能力が高められた、または昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対する高い活性を示す組成物を提供することが本発明の目的であった。

【0010】

従って、これらの目的が、下記で定義の本発明による組成物によって達成されることが見出された。a) (i) 植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素；細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素；および病原体もしくは有害生物から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および(ii) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；およびb) 本明細書で開示の少なくとも一つの特定の殺菌剤を施用することで、好ましくは優加法的に(i) 植物成長、植物収量および／または植物の健康および／または(ii) 昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対する活性を高めることができる。

【0011】

標的配列、外膜タンパク質、外膜タンパク質断片、融合タンパク質、およびそのような融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞について本明細書で言及するこ

10

20

30

40

50

とは、独立の実施形態であるとは見なすべきではない。そうではなく、本願を通じて、標的配列、外膜タンパク質、外膜タンパク質断片、融合タンパク質、およびそのような融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞についての言及は、1以上の本明細書に記載の特定の殺菌剤との組み合わせで（好ましくは、相乗的組み合わせで）のみ開示および特許請求されるものと見なすべきである。さらに、「本明細書に開示の特定の殺菌剤」についての言及は、下記の段落〔000185〕から〔000187〕に記載の殺菌剤を包含するものである。

【0012】

本発明は、相乗的に有効な量で、a) (i) 植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に参与する酵素および細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素または病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および(ii) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；およびb) 少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤を含む組成物に関する。

【0013】

一部の実施形態において、前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）；配列番号1のアミノ酸1から35を含む標的配列；配列番号1のアミノ酸20から35を含む標的配列；配列番号1のアミノ酸22から31を含む標的配列；配列番号1のアミノ酸22から33を含む標的配列；配列番号1のアミノ酸20から31を含む標的配列；配列番号1を含む標的配列；または配列番号2と少なくとも85%同一性を有するアミノ酸配列を含む外膜タンパク質を含む。

【0014】

一部の実施形態において、外膜産生性バチルス細胞は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の細胞である。組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員は、バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycooides*)、バチルス・シュードミコイデス (*Bacillus pseudomycooides*)、バチルス・サマニイ (*Bacillus samani*)、バチルス・ガエモケンシス (*Bacillus gaemokensis*)、バチルス・ウェイヘンステフェンシス (*Bacillus weihenstephensis*)、バチルス・トヨイエンシス (*Bacillus toyoiensis*) およびそれらの組み合わせの細胞のいずれかであることができる。さらなる実施形態において、組換えバチルス細胞は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013Aの細胞である。

【0015】

ある種の態様において、前記融合タンパク質は、アセトインレダクターゼ、インドール-3-アセトアミドヒドロラーゼ、トリプトファンモノオキシゲナーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ジアセチルレダクターゼ、ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、アミノトランスフェラーゼ、トリプトファンデカルボキシラーゼ、アミノオキシダーゼ、インドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼ、インドール-3-アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、トリプトファン側鎖オキシダーゼ、ニトリルヒドロラーゼ、ニトリラーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、アデノシンリン酸イソペンテニルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、アデノシンキナーゼ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、CYP735A、5'リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、ゼアチンシーストランスイソメラーゼ、ゼアチンO-グルコシルトランスフェラーゼ、 β -グルコシダーゼ、シス-ヒドロキシラーゼ、CKシス-ヒドロキシラーゼ、CK N-グルコシルトランスフェラーゼ

、2, 5-リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ゼアチンレダクターゼ、ヒドロキシルアミンレダクターゼ、2-オキシグルタル酸ジオキシゲナーゼ、ジベレリン酸2 B / 3 Bヒドロラーゼ、ジベレリン3-オキシダーゼ、ジベレリン20-オキシダーゼ、キトサナーゼ、キチナーゼ、 β -1, 3-グルカナーゼ、 β -1, 4-グルカナーゼ、 β -1, 6-グルカナーゼ、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼ、およびノッド因子産生に關与する酵素からなる群から選択される植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に關与する酵素を含む。

【0016】

他の態様において、前記融合タンパク質は、セルラーゼ、リパーゼ、リグニンオキシダーゼ、プロテアーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、ホスファターゼ、ニトロゲナーゼ、ヌクレアーゼ、アミダーゼ、硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、アミラーゼ、アンモニアオキシダーゼ、リグニナーゼ、グルコシダーゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ペクチナーゼ、グルカナーゼ、スルファターゼ、ウレアーゼ、キシラナーゼ、およびシデロホアからなる群から選択される細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素を含む。

【0017】

さらに他の態様において、前記融合タンパク質は、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドを含み、そのタンパク質またはペプチドは抗菌活性、抗真菌活性、または抗菌活性および抗真菌活性の両方を有する。そのようなタンパク質は、バクテリオシン、リゾチーム、リゾチームペプチド、シデロホア、非リボソーム活性ペプチド、コンアルブミン、アルブミン、ラクトフェリン、ラクトフェリンペプチド、TasA、またはストレプトアビジンを含むことができる。

【0018】

一部の実施形態において、前記少なくとも一つの殺菌剤は、ビテルタノール、ビキサフェン、ブロムコナゾール、カルベンダジム、カルプロバミド、ジクロフルアニド、フェナミドン、フェンヘキサミド、酢酸フェンチン、水酸化フェンチン、フルオピコリド、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキンコナゾール、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソチアニル、メトミノストロビン、オフラセ (ofurace)、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロクロラズ、プロパモカルブ、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピリメタニル、スピロキサミン、テブコナゾール、トリルフルアニド、トリアジメホン、トリアジメノール、トリアゾキシド、トリフロキシストロビン、N-[5-クロロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-N-シクロプロピル-3-(ジフルオロメチル)-5-フルオロ-1-メチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、および2, 6-ジメチル-1H, 5H-[1, 4]ジチイノ[2, 3-c:5, 6-c']ジピロール-1, 3, 5, 7(2H, 6H)-テトロンからなる群から選択される。

【0019】

他の実施形態において、前記少なくとも一つの殺菌剤は、カルベンダジム、フルキンコナゾール、イソチアニル、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロチオコナゾール、テブコナゾール、およびトリフロキシストロビンからなる群から選択される。

【0020】

一部の実施形態において、本発明の組成物は、相乗的に有効な量で、a)(i)植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に關与する酵素および細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素または植物を病原体から保護する少なくとも一つのタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および(ii)融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；およびb)カルベンダジム、フルキンコナゾール、イソチアニル、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロチオコナゾール、フルオピラム、テブコナゾール、およびトリフロキシストロビンからなる群から選択される少なくとも一つの殺菌剤を含む。

10

20

30

40

50

【0021】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はカルベンダジムであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ（chitinase）を含み；(iv) 前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）またはバチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013Aの細胞である。

10

【0022】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はフルキンコナゾールであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ（chitinase）を含み；(iv) 前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）またはバチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013Aの細胞である。

20

【0023】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はイソチアニルであり；(ii) 前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ（chitinase）を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞はバチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）またはバチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013Aの細胞である。

30

【0024】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はペンシクロンであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ（chitinase）を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員細胞はバチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）またはバチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス（Ba

40

50

cilllus cereus) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013Aの細胞である。

【0025】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はペンフルフェンであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (*chitosinase*) を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycooides*) の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013Aの細胞である。

10

【0026】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はプロチオコナゾールであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (*chitosinase*) を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycooides*) の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013Aの細胞である。

20

【0027】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はフルオピラムであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (*chitosinase*) を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycooides*) の細胞を含む。

30

【0028】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はトリフロキシストロビンであり；(ii) 前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (*chitosinase*) を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞はバチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycooides*) の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セ

40

50

レウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013A の細胞である。

【0029】

上記実施形態の特定の態様において、(i) 前記少なくとも一つの殺菌剤はテブコナゾールであり；(ii) 前記標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約43%同一性を有するアミノ酸配列（アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約54%である。）を含み；(iii) 前記植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、好ましくはそれぞれ配列番号107、108および109と少なくとも95%配列同一性を有するエンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (*chitinase*) を含み；および(iv) 前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) の細胞を含む。さらに別の特定の実施形態において、前記組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細胞は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013A の細胞である。

【0030】

一部の態様において、前記組成物はさらに、増量剤、溶媒、自発性促進剤、担体、乳化剤、分散剤、凍結保護剤、増粘剤およびアジュバントからなる群から選択される少なくとも一つの補助剤を含む。

【0031】

他の態様において、本発明は、本明細書に開示の組成物のいずれかで処理された種子に関するものである。

【0032】

さらに本発明は、殺菌剤および／または殺虫剤としての開示の組成物の使用に関する。ある種の態様において、開示の組成物を、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体によって引き起こされる植物および植物部分の全体的損傷ならびに収穫された果実もしくは野菜の損失を減らすのに用いる。他の態様において、開示の組成物を、植物成長を促進し、および／または植物の健康を増進するのに用いる。

【0033】

さらに、本発明は、植物、植物部分および／または植物生育場所に同時もしくは順次に、相乗的に有効な量で a) (i) 植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素；細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素；および病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および(ii) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；および b) 昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対して活性を示す、本明細書に開示の特定の殺菌剤から選択される少なくとも一つの殺菌剤を施用する段階を含む、植物、植物部分、例えば種子、根、根茎、球茎、鱗茎、または塊茎、および／または土壌などの植物もしくは植物部分が成長する場所もしくはその近くの場所を処理して、植物成長を促進および／または植物の健康を増進する方法に関する。

【0034】

別の実施形態において、本発明は、植物、植物部分、例えば種子、根、根茎、球茎、鱗茎、または塊茎、および／または土壌などの植物もしくは植物部分が成長する場所もしくはその近くの場所に同時もしくは順次に、相乗的に有効な量で a) (i) 植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素；細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素；および病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および(ii) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；および b) 昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対して活性を示す、本明細書に開示の特定の殺菌剤から選択される少な

くとも一つの殺菌剤を施用する段階を含む、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体によって引き起こされる植物および植物部分の全体的損傷ならびに収穫された果実もしくは野菜の損失を低減する方法である。

【0035】

上記の段落において、「含む (comprise)」またはそのいずれかの派生語 (例えば、comprising、comprises) という用語は、「からなる (consist of)」またはその適用可能な相当する派生語によって置き換えることができる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*) スターン (Sterne) 株 Bcl A のアミノ末端部分のアミノ酸配列の配置を、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員からの各種外膜タンパク質からの相当する領域とともに示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

概して、「農薬性」とは物質が植物病害生物の死亡率を高める能力または成長速度を阻害する能力を意味する。その用語は本明細書において、ある物質が昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対する活性を示す特性を説明するのに用いられる。本発明の意味において、「病害生物」という用語は、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体を含む。

【0038】

指定の NRRL もしくは ATCC 寄託番号の変異体も、指定の NRRL もしくは ATCC 寄託番号のゲノムと 85% 強、より好ましくは 90% 強、またはより好ましくは 95% 強の配列同一性であるゲノム配列を有する菌株と定義することができる。ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域 (またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域) は、別の配列に対してある一定のパーセント (例えば、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99%) の「配列同一性」を有しており、それは、アラインメントさせた場合に、塩基 (またはアミノ酸) のそのパーセントが二つの配列を比較して同一であることを意味するものである。このアラインメントおよび相同性もしくは配列同一性パーセントは、当業界で公知のソフトウェアプログラム、例えば Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30, Section 7. 7. 18、表 7. 7. 1 に記載のものを用いて求めることができる。

【0039】

NRRL は、住所が National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U. S. A である Agricultural Research Service Culture Collection の略称である。

【0040】

ATCC は、住所が ATCC Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10110, U. S. A である American Type Culture Collection の略称である。

【0041】

本明細書に記載され、頭に NRRL または ATCC が付く寄託番号を有する株はいずれ

10

20

30

40

50

も、特許手続きのための微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約による上記個々の寄託機関に寄託されたものである。

【0042】

「植物成長刺激化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素」には、植物成長を刺激し、植物構造を変える化合物の生合成経路におけるいずれかの段階を触媒する酵素、または植物成長を刺激し、植物構造を変える化合物の不活性もしくは低活性誘導体の、その化合物の活性型もしくは高活性型への変換を触媒する酵素などがある。そのような化合物には、例えば、小分子植物ホルモン、例えばオーキシン類およびサイトカイニン類、生理活性ペプチド類、および根圏において細菌もしくは真菌によって合成される植物成長刺激性小分子（例えば、2, 3-ブタンジオール）などがあるが、これらに限定されるものではない。

10

【0043】

本明細書で使用される「植物免疫系エンハンサータンパク質もしくはペプチド」には、植物の免疫系に対して有益な効果を有するタンパク質またはペプチドなどがある。

【0044】

本明細書で使用される「植物成長刺激タンパク質またはペプチド」という用語は、そのタンパク質またはペプチドに曝露された植物における植物成長を高めるタンパク質またはペプチドを含む。

【0045】

「植物成長を増進」および「植物成長を刺激」という用語は、本明細書において互換的に使用され、植物の高さ、重量、葉の大きさ、根の大きさ、または茎の大きさのうちの少なくとも一つを高めたり増加させて、植物からのタンパク質収量を増加させたり、植物の穀物収量を増加させる能力を指す。

20

【0046】

本明細書で使用される「病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド」は、そのタンパク質またはペプチドに曝露された植物を、病原体感染に対して低感受性とするタンパク質またはペプチドを含む。

【0047】

本明細書で使用される「植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチド」は、そのタンパク質またはペプチドに曝露された植物を、ストレスに対して高抵抗性とするタンパク質またはペプチドを含む。

30

【0048】

「植物結合性タンパク質もしくはペプチド」という用語は、植物のいずれかの部分（例えば、根または植物の地上部分、例えば葉、枝葉、茎、花または果実）または植物体に特異的または非特異的に結合することができるペプチドまたはタンパク質を指す。

【0049】

本明細書で使用される「標的配列」という用語は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の外膜へのより長いポリペプチドまたはタンパク質の局在化をもたらすポリペプチド配列を指す。

【0050】

融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞
融合タンパク質は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の外膜への融合タンパク質を標的とする標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片ならびに (a) 植物成長刺激タンパク質またはペプチド; (b) 病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド; (c) 植物のストレス抵抗性を促進するタンパク質またはペプチド; (d) 植物結合性タンパク質またはペプチド; または (e) 植物免疫系エンハンサータンパク質またはペプチドを含む。バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員細菌で発現される場合、これらの融合タンパク質は、胞子の外膜層を標的とするものであり、そのタンパク質またはペプチドが胞子の外側に露出するような物理的配置となっている。

40

50

【 0 0 5 1 】

このバチルス外膜露出（B E M D）系を用いて、植物に（例えば、植物の枝葉、果実、花、茎または根に）、または土壌などの植物成長媒体にペプチド類、酵素類および他のタンパク質を送達することができる。このようにして土壌または別の植物成長媒体に送達されるペプチド類、酵素類、およびタンパク質は、長期間にわたってその土壌で生き残り、活性を示す。本明細書に記載の融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞の土壌もしくは植物の根圏に導入することで、多くの異なる土壌条件での植物成長が効果的に促進される。これら酵素を増やす上でのB E M Dの使用によって、それらの酵素は、植物寿命の最初の数ヶ月にわたり、その植物および根圏に対して有益な結果をもたらすことができる。

10

【 0 0 5 2 】

標的配列、外膜タンパク質、および外膜タンパク質断片

参照しやすいように、本明細書で言及されるペプチドおよびタンパク質配列についての配列番号を、下記の表1に挙げてある。

【 0 0 5 3 】

表1. ペプチドおよびタンパク質配列

【表1】

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
BclA (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) のAA1-41	配列番号: 1*
全長 BclA	配列番号: 2*
BetA/BAS3290 (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) のAA1-33	配列番号: 3
全長 BetA/BAS3290	配列番号: 4
BAS4623 (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) のMet+AA2-43	配列番号: 5
全長 BAS4623	配列番号: 6

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
BclB (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) のAA1-34	配列番号: 7
全長BclB	配列番号: 8
BAS1882 (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) のAA1-30	配列番号: 9
全長BAS1882	配列番号: 10
遺伝子2280 (B. ユーヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-39	配列番号: 11
全長KBAB4遺伝子2280	配列番号: 12
遺伝子3572 (B. ユーヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-39	配列番号: 13
全長KBAB4遺伝子3572	配列番号: 14
外膜リーダーヘプテド (B. セルス (B. cereus) VD200) のAA1-49	配列番号: 15
全長外膜リーダーヘプテド	配列番号: 16
外膜リーダーヘプテド (B. セルス (B. cereus) VD166) のAA1-33	配列番号: 17
全長外膜リーダーヘプテド	配列番号: 18
仮想タンパク質 IKG_04663 (B. セルス (B. cereus) VD200) のAA1-39	配列番号: 19
全長仮想タンパク質 IKG_04663、部分	配列番号: 20

10

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
YVTNβ-フールドタンパク質 (B. ウェイヘンステフェンシス(B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-39	配列番号: 21
全長YVTNβ-フールドタンパク質KBAB4	配列番号: 22
仮想タンパク質bcerkbab4_2363 (B. ウェイヘンステフェンシス(B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-30	配列番号: 23
全長仮想タンパク質bcerkbab4_2363 KBAB4	配列番号: 24
仮想タンパク質bcerkbab4_2131 (B. ウェイヘンステフェンシス(B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-30	配列番号: 25
全長仮想タンパク質bcerkbab4_2131	配列番号: 26
三重らせん反復含有コラーゲン (B. ウェイヘンステフェンシス(B. weihenstephensis) KBAB4) のAA1-36	配列番号: 27
全長三重らせん反復含有コラーゲンKBAB4	配列番号: 28
仮想タンパク質bmyco0001_21660 (B. ミコイデス(B. mycooides) 2048) のAA1-39	配列番号: 29
全長仮想タンパク質bmyco0001_21660	配列番号: 30
仮想タンパク質bmyc0001_22540 (B. ミコイデス (B. mycooides) 2048) のAA1-30	配列番号: 31
全長仮想タンパク質bmyc0001_22540	配列番号: 32

10

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
仮想タンパク質bmyc0001_21510 (B. mycoides) 2048) のAA1-21	配列番号: 33
全長仮想タンパク質bmyc0001_21510	配列番号: 34
コラーゲン三重らせん反復タンパク質 (B. thuringiensis) 35646) のAA1-22	配列番号: 35
全長コラーゲン三重らせん反復タンパク質	配列番号: 36
仮想タンパク質WP_69652 (B. cereus) のAA1-35	配列番号: 43
全長仮想タンパク質WP_69652	配列番号: 44
外膜リターゲ-WP016117717 (B. cereus) のAA1-41	配列番号: 45
全長外膜リターゲ-WP016117717	配列番号: 46
外膜ペプチド WP002105192 (B. cereus) のAA1-49	配列番号: 47
全長外膜ペプチド WP002105192	配列番号: 48
仮想タンパク質WP87353 (B. cereus) のAA1-38	配列番号: 49
全長仮想タンパク質WP87353	配列番号: 50
外膜ペプチド 02112369 (B. cereus) のAA1-39	配列番号: 51

10

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
全長外膜ペプチド 02112369	配列番号 : 52
外膜タンパク質WP016099770 (<i>B. cereus</i>) のAA1-39	配列番号 : 53
全長外膜タンパク質WP016099770	配列番号 : 54
仮想タンパク質YP006612525 (<i>B. thuringiensis</i>) のAA1-36	配列番号 : 55
全長仮想タンパク質YP006612525	配列番号 : 56
仮想タンパク質TIGR03720 (<i>B. mycoides</i>) のAA1-136	配列番号 : 57**
全長仮想タンパク質TIGR03720	配列番号 : 58**
BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) のAA1-196	配列番号 : 59*
BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) のMet+AA20-35	配列番号 : 60
BetA/BAS3290 (<i>B. anthracis</i> Sterne) のMet+AA12-27	配列番号 : 61
遺伝子2280 (<i>B. weihenstephensis</i>) KBAB4) のMet+AA18-33	配列番号 : 62
遺伝子3572 (<i>B. weihenstephensis</i>) KBAB4) のMet+AA18-33	配列番号 : 63

10

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
外膜リーダーペプチド (B. cereus) VD166) のMet+AA12-27	配列番号 64
YVTNβ-プロペラタンパク質 (B. weihenstephensis) KBAB4) のMet+AA18-33	配列番号 : 65
仮想タンパク質bcerkbab4_2363 (B. weihenstephensis) KBAB4) のMet+AA9-24	配列番号 66
仮想タンパク質bcerkbab4_2131 (B. weihenstephensis) KBAB4) のMet+AA9-24	配列番号 : 67
仮想タンパク質bmyc0001_22540 (B. mycoides) 2048) のMet+AA9-24	配列番号 : 68
BAS1882 (B. anthracis Sterne) のMet+AA9-24	配列番号 69
外膜リーダー-WP016117717 (B. cereus) のMet+AA20-35	配列番号 : 70
全長InhA (B. mycoides)	配列番号 : 71
全長BAS1141 (ExsY) (B. anthracis Sterne)	配列番号 : 72
全長BAS1144 (BxpB/ExsFA) (B. anthracis Sterne)	配列番号 : 73
全長BAS1145 (CotY) (B. anthracis Sterne)	配列番号 : 74

10

20

30

40

タンパク質、タンパク質断片、または標的配列	配列識別番号
全長BAS1140 (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne))	配列番号 : 75
全長ExsFB (B. アントラシス (B. anthracis) H9401)	配列番号 : 76
全長InhA1 (B. ツリンギ・エンシス (B. thuringiensis) HD74)	配列番号 : 77
全長ExsJ (B. セルス (B. cereus) ATCC10876)	配列番号 : 78
全長ExsH (B. セルス (B. cereus))	配列番号 : 79
全長YjcA (B. アントラシス・エームス (B. anthracis Ames))	配列番号 : 80
全長YjcB (B. アントラシス (B. anthracis))	配列番号 : 81
全長BclC (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne))	配列番号 : 82
全長酸ホスファターゼ (バチルス・ツリンギ・エンシス (Bacillus thuringiensis) 血清型コンクキアン (konkukian) 株97-27)	配列番号 : 83
全長InhA2 (B. ツリンギ・エンシス (B. thuringiensis) HD74)	配列番号 : 84

【 0 0 5 4 】

A A = アミノ酸

* B. アントラシス (B. anthracis) スターン (Sterne) 株 Bcl A は、B. ツリンギエンシス (B. thuringiensis) Bcl A と 100% 配列同一性を有する。従って、配列番号 1、2 および 59 は、それぞれ B. ツリンギエンシス (B. thuringiensis) Bcl A のアミノ酸 1 から 41、全長 B. ツリンギエンシス (B. thuringiensis) Bcl A、および B. ツリンギエンシス (B. thuringiensis) Bcl A のアミノ酸 1 から 196 も表す。同様に、配列番号 60 は、B. ツリンギエンシス (B. thuringiensis) Bcl A のメチオニン残基とアミノ酸 20 から 35 も表す。

【0055】

* * B. ミコイデス (B. mycoides) 仮想タンパク質TIGR03720は、B. ミコイデス (B. mycoides) 仮想タンパク質WP003189234と100%配列同一性を有する。従って、配列番号：57および58は、それぞれB. ミコイデス (B. mycoides) 仮想タンパク質WP003189234のアミノ酸1から136および全長B. ミコイデス (B. mycoides) 仮想タンパク質WP003189234も表す。

【0056】

バチルス (Bacillus) は、桿菌の属である。バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科の細菌には、属種バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis)、バチルス・セレウス (Bacillus cereus)、バチルス・ツリングエンシス (Bacillus thuringiensis)、バチルス・ミコイデス (Bacillus mycoides)、バチルス・シュードミコイデス (Bacillus pseudomycoides)、バチルス・サマニイ (Bacillus samanii)、バチルス・ガエモケンシス (Bacillus gaeomokensis)、バチルス・トヨイエシス (Bacillus toyoiensis) およびバチルス・ウェイヘンステフェンシス (Bacillus weihensstephensis) などがある。ストレスのある環境条件下では、バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科細菌は孢子形成し、長期間にわたり休眠状態のままでいることができる卵形の内生孢子を形成する。その内生孢子の最外層は外膜と称され、毛様突起の外側毛羽立ちによって囲まれた基底層を含む。毛様毛羽立ち上の細繊維は主としてコラーゲン様糖タンパク質BclAによって形成され、それに対して前記基底層は多くの異なるタンパク質からなる。別のコラーゲン関連タンパク質BclBは、外膜にも存在し、バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科構成員の内生孢子上で露出している。

【0057】

表面毛羽立ちの主たる構成要素であるBclAは、アミノ末端 (N末端) が基底層に位置し、カルボキシ末端 (C末端) が孢子から外方向に延びて外膜に結合していることが明らかにされている。

【0058】

BclAおよびBclBのN末端領域からのある種の配列を用いて、ペプチドまたはタンパク質をバチルス・セレウス (Bacillus cereus) 内生孢子の外膜に向かわせることができることが、以前に発見されている (米国特許公開番号2010/0233124および2011/0281316、およびThompson, et al., "Targeting of the BclA and BclB Proteins to the Bacillus anthracis Spore Surface," Molecular Microbiology, 70(2):421-34 (2008) (これらそれぞれの全内容が、参照によって本明細書に組み込まれるものとする。)) を参照する)。バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis) のBetA/BAS3290タンパク質が外膜に局在していることも認められた。

【0059】

特に、バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis) スターン (Sterne) 株からのBclAのアミノ酸20から35は、外膜に向かうのに十分であることが認められている。いくつかの他のバチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科外膜タンパク質および関連する配列を有するバチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科タンパク質の相当するN末端領域を有するBclA (配列番号1) のアミノ酸1から41の配列配置を図1に示してある。図1からわかるように、BclAのアミノ酸20から41に相当する領域におけるタンパク質の全ての間に高度相同性の領域がある。しかしながら、これらの配列において、BclAのアミノ酸36から4

1に相当するアミノ酸は、二次構造を含み、外膜への融合タンパク質局在化には必要ではない。BclAの保存標的配列領域（配列番号1のアミノ酸20から35）を図1で太字で示してあり、それは外膜への局在化に必要な最小標的配列に相当する。標的配列内のBclAのアミノ酸25から35に及ぶより高度に保存された領域に、図1における配列で下線を引いており、それは、ExsFA/BxpB/ExsFBおよび相同体の認識配列であり、それは記載のタンパク質を外膜の表面上に向かわせ、集合させる。図1における配列番号3、5および7のアミノ酸配列は、それぞれ、バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）スターン（Sterne）株BetA/BAS3290のアミノ酸1から33、メチオニンとそれに続くバチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）スターン（Sterne）株BAS4623のアミノ酸2から43、およびバチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）スターン（Sterne）株BclBのアミノ酸1から34である（BAS4623の場合、天然タンパク質中の位置1に存在するバリンをメチオニンに代えることで、発現がより良好になることが認められた。）。図1からわかるように、これらの配列のそれぞれが、BclAのアミノ酸20から35に相当する保存領域（配列番号1；太字で図示）、およびBclAのアミノ酸20から35に相当するより高度に保存された領域（下線）を含む。

10

【0060】

バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員からの別のタンパク質も、保存標的領域を含む。特に、図1において、配列番号9はバチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）スターン（Sterne）株BAS1882のアミノ酸1から30であり；配列番号11は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB42280遺伝子産物のアミノ酸1から39であり；配列番号13は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB43572遺伝子産物のアミノ酸1から39であり；配列番号15は、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）VD200外膜リーダーペプチドのアミノ酸1から49であり；配列番号17は、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）VD166外膜リーダーペプチドアミノ酸1から33であり；配列番号19は、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）VD200仮想タンパク質IKG__04663のアミノ酸1から39であり；配列番号21は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB4YVTNβ-プロペラタンパク質のアミノ酸1から39であり；配列番号23は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4__2363のアミノ酸1から30であり；配列番号25は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4__2131のアミノ酸1から30であり；配列番号27は、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）KBAB4三重らせん反復含有コラーゲンのアミノ酸1から36であり；配列番号29は、バチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）2048仮想タンパク質bmyc0001__21660のアミノ酸1から39であり；配列番号31は、バチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）2048仮想タンパク質bmyc0001__22540のアミノ酸1から30であり；配列番号33は、バチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）2048仮想タンパク質bmyc0001__21510のアミノ酸1から21であり；配列番号35は、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）35646コラーゲン三重らせん反復タンパク質のアミノ酸1から22であり；配列番号43は、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）仮想タンパク質WP__69652のアミノ酸1から35であり；配列番号45は、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）外膜リーダーWP016117717のアミノ酸1から41であり

20

30

40

50

；配列番号47は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 外膜ペプチドWP002105192のアミノ酸1から49であり；配列番号49は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 仮想タンパク質WP87353のアミノ酸1から38であり；配列番号51は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 外膜ペプチド02112369のアミノ酸1から39であり；配列番号53は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 外膜タンパク質WP016099770のアミノ酸1から39であり；配列番号55は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 仮想タンパク質YP006612525のアミノ酸1から36であり；配列番号57は、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) 仮想タンパク質TIGR03720のアミノ酸1から136である。図1に示したように、これらタンパク質のN末端領域のそれぞれが、BclA (配列番号1) のアミノ酸20から35で保存された領域およびBclAのアミノ酸25から35に相当するより高度に保存された領域を含む。

10

【0061】

アミノ酸20から35を含むBclAのいずれの部分も、標的配列として用いることができる。さらに、全長外膜タンパク質または外膜タンパク質断片を、融合タンパク質を外膜に向かわせるのに用いることができる。従って、アミノ酸20から35を含む全長BclAまたはBclAの断片を、外膜に向かわせるのに用いることができる。例えば、全長BclA (配列番号2) または配列番号59 (BclAのアミノ酸1から196) などのカルボキシ末端が欠損しているBclAの中程度の大きさの断片を用いて、融合タンパク質を外膜に向かわせることができる。配列番号59の断片などの中程度の大きさの断片は、全長BclAより小さい二次構造を有し、標的配列としての使用に好適であることが認められている。標的配列は、アミノ酸20から35、例えば配列番号1 (BclAのアミノ酸1から41)、配列番号1のアミノ酸1から35、配列番号1のアミノ酸20から35、または配列番号60 (BclAのアミノ酸20から35に連結されたメチオニン残基) などのBclAの多くの比較的短い部分も含むことができる。アミノ酸20から35の一部のみを含むBclAのさらにより短い断片も、融合タンパク質を外膜に向けさせる能力を示す。例えば、その標的配列は、配列番号1のアミノ酸22から31、配列番号1のアミノ酸22から33、または配列番号1のアミノ酸20から31を含むことができる。

20

【0062】

あるいは、BclAのアミノ酸20から35に相当するアミノ酸を含むBetA/BAS3290、BAS4623、BclB、BAS1882、KBAB42280遺伝子産物、KBAB43572遺伝子産物、B. セレウス (*B. cereus*) VD200外膜リーダーペプチド、B. セレウス (*B. cereus*) VD166外膜リーダーペプチド、B. セレウス (*B. cereus*) VD200仮想タンパク質IKG_04663、B. ウェイヘンステフェンシス (*B. weihenstephensis*) KBAB4YVTNβ-プロペラタンパク質、B. ウェイヘンステフェンシス (*B. weihenstephensis*) KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4_2363、B. ウェイヘンステフェンシス (*B. weihenstephensis*) KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4_2131、B. ウェイヘンステフェンシス (*B. weihenstephensis*) KBAB4三重らせん反復含有コラーゲン、B. ミコイデス (*B. mycoides*) 2048仮想タンパク質bmyc00001_21660、B. ミコイデス (*B. mycoides*) 2048仮想タンパク質bmyc00001_22540、B. ミコイデス (*B. mycoides*) 2048仮想タンパク質bmyc00001_21510、B. ツリングエンシス (*B. thuringiensis*) 35646コラーゲン三重らせん反復タンパク質、B. セレウス (*B. cereus*) 仮想タンパク質WP_69652、B. セレウス (*B. cereus*) 外膜リーダーWP016117717、B. セレウス (*B. cereus*) 外膜ペプチドWP002105192、B. セレウス (*B. cereus*) 仮想タンパク質WP87353、B. セレウス (*B. cereus*) 外膜ペプチド02112369、B. セレウス

30

40

50

(*B. cereus*) 外膜タンパク質WP016099770、*B. thuringiensis* 仮想タンパク質YP006612525、または *B. mycooides* 仮想タンパク質TIGR03720のいずれの部分も、標的配列として役立ち得る。図1からわかるように、BetA/BAS3290のアミノ酸12から27、BAS4623のアミノ酸23から38、BclBのアミノ酸13から28、BAS1882のアミノ酸9から24、KBAB42280遺伝子産物のアミノ酸18から33、KBAB43572遺伝子産物のアミノ酸18から33、*B. cereus* VD200外膜リーダーペプチドのアミノ酸28から43、*B. cereus* VD166外膜リーダーペプチドのアミノ酸12から27、*B. cereus* VD200仮想タンパク質IKG__04663のアミノ酸18から33、*B. weihenstephensis* KBAB4_YVTNβ-プロペラタンパク質のアミノ酸18から33、*B. weihenstephensis* KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4__2363のアミノ酸9から24、*B. weihenstephensis* KBAB4仮想タンパク質bcerkbab4__2131のアミノ酸9から24、*B. weihenstephensis* KBAB4三重らせん反復含有コラーゲンのアミノ酸15から30、*B. mycooides* 2048仮想タンパク質bmyc00001__21660のアミノ酸18から33、*B. mycooides* 2048仮想タンパク質bmyc00001__22540のアミノ酸9から24、*B. mycooides* 2048仮想タンパク質bmyc00001__21510のアミノ酸1から15、*B. thuringiensis* 35646コラーゲン三重らせん反復タンパク質のアミノ酸1から16、*B. cereus* 仮想タンパク質WP__69652のアミノ酸14から29、*B. cereus* 外膜リーダーWP016117717のアミノ酸20から35、*B. cereus* 外膜ペプチドWP002105192のアミノ酸28から43、*B. cereus* 仮想タンパク質WP87353のアミノ酸17から32、*B. cereus* 外膜ペプチド02112369のアミノ酸18から33、*B. cereus* 外膜タンパク質WP016099770のアミノ酸18から33、*B. thuringiensis* 仮想タンパク質YP006612525のアミノ酸15から30、および *B. mycooides* 仮想タンパク質TIGR03720のアミノ酸115から130は、BclAのアミノ酸20から35に相当する。従って、上記で挙げた相当するアミノ酸を含むこれらのタンパク質のいずれの部分も、標的配列として役立ち得る。

【0063】

さらに、BclAのアミノ酸20から35を含むあらゆるアミノ酸配列または上記で挙げた相当するアミノ酸のいずれも、標的配列として役立ち得る。

【0064】

従って、前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸1から35、配列番号1のアミノ酸20から35、配列番号1、配列番号60、配列番号1のアミノ酸22から31、配列番号1のアミノ酸22から33、または配列番号1のアミノ酸20から31を含むことができる。あるいは、前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸1から35、配列番号1のアミノ酸20から35、配列番号1、または配列番号60からなる。あるいは、前記標的配列は、配列番号1のアミノ酸22から31、配列番号1のアミノ酸22から33、または配列番号1のアミノ酸20から31からなることができる。あるいは、外膜タンパク質は全長BclA（配列番号2）を含むことができ、または外膜タンパク質断片は、カルボキシ末端が欠損したBclAの中程度の大きさの断片、例えば配列番号59（BclAのアミノ酸1から196）を含むことができる。あるいは、前記外膜タンパク質断片は、配列番号59からなることができる。

【0065】

標的配列は配列番号3のアミノ酸1から27、配列番号3のアミノ酸12から27または配列番号3も含むことができ、または外膜タンパク質は、全長BetA/BAS3290（配列番号4）を含むことができる。BetA/BAS3290のアミノ酸12から27に連結されたメチオニン残基を標的配列として用いることができることも認められている。従って、標的配列は、配列番号61を含むことができる。標的配列は、配列番号3のアミノ酸14から23、配列番号3のアミノ酸14から25、または配列番号3のアミノ酸12から23も含むことができる。

【0066】

標的配列は配列番号5のアミノ酸1から38、配列番号5のアミノ酸23から38、または配列番号5も含むことができ、または外膜タンパク質は全長BAS4623（配列番号6）を含むことができる。

10

【0067】

あるいは、標的配列は配列番号7のアミノ酸1から28、配列番号7のアミノ酸13から28、または配列番号7を含むことができ、または外膜タンパク質は、全長BclB（配列番号8）を含むことができる。

【0068】

標的配列は配列番号9のアミノ酸1から24、配列番号9のアミノ酸9から24または配列番号9も含むことができ、または外膜タンパク質は全長BAS1882（配列番号10）を含むことができる。BAS1882のアミノ酸9から24に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号69を含むことができる。

20

【0069】

標的配列は配列番号11のアミノ酸1から33、配列番号11のアミノ酸18から33または配列番号11も含むことができ、または外膜タンパク質は、全長B. ウェイヘンステフェンシス（B. weihenstephensis）KBAB42280遺伝子産物（配列番号12）を含むことができる。B. ウェイヘンステフェンシス（B. weihenstephensis）KBAB42280遺伝子産物のアミノ酸18から33に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号62を含むことができる。

30

【0070】

標的配列は配列番号13のアミノ酸1から33、配列番号13のアミノ酸18から33または配列番号13も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. ウェイヘンステフェンシス（B. weihenstephensis）KBAB43572遺伝子産物（配列番号14）を含むことができる。B. ウェイヘンステフェンシス（B. weihenstephensis）KBAB43572遺伝子産物のアミノ酸18から33に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号63を含むことができる。

【0071】

あるいは、標的配列は配列番号15のアミノ酸1から43、配列番号15のアミノ酸28から43または配列番号15も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. セレウス（B. cereus）VD200外膜リーダーペプチド（配列番号16）を含むことができる。

40

【0072】

標的配列は配列番号17のアミノ酸1から27、配列番号17のアミノ酸12から27または配列番号17も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. セレウス（B. cereus）VD166外膜リーダーペプチド（配列番号18）を含むことができる。B. セレウス（B. cereus）VD166外膜リーダーペプチドのアミノ酸12から27に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号64を含むことができる。

50

【0073】

標的配列は配列番号19のアミノ酸1から33、配列番号19のアミノ酸18から33または配列番号19も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. セレウス (B. cereus) VD200 仮想タンパク質 IKG__04663 (配列番号20) を含むことができる。

【0074】

あるいは、標的配列は配列番号21アミノ酸1から33、配列番号21のアミノ酸18から33または配列番号21を含み、または外膜タンパク質は全長B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 YVTNβ-プロペラタンパク質 (配列番号22) を含むことができる。B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 YVTNβ-プロペラタンパク質のアミノ酸18から33に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号65を含むことができる。

10

【0075】

標的配列は配列番号23のアミノ酸1から24、配列番号23のアミノ酸9から24または配列番号23も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 仮想タンパク質 bcerkbab4__2363 (配列番号24) を含むことができる。B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 仮想タンパク質 bcerkbab4__2363 のアミノ酸9から24に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号66を含むことができる。

20

【0076】

標的配列は配列番号25のアミノ酸1から24、配列番号25のアミノ酸9から24または配列番号25を含み、または外膜タンパク質は全長B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 仮想タンパク質 bcerkbab4__2131 (配列番号26) を含むことができる。B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 仮想タンパク質 bcerkbab4__2131 のアミノ酸9から24に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号67を含むことができる。

30

【0077】

あるいは、標的配列は配列番号27のアミノ酸1から30、配列番号27のアミノ酸15から30または配列番号27を含み、または外膜タンパク質は全長B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB4 三重らせん反復含有コラーゲン (配列番号28) を含むことができる。

【0078】

標的配列は配列番号29のアミノ酸1から33、配列番号29のアミノ酸18から33または配列番号29も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. ミコイデス (B. mycoides) 2048 仮想タンパク質 bmyc00001__21660 (配列番号30) を含むことができる。

【0079】

標的配列は配列番号31のアミノ酸1から24、配列番号31のアミノ酸9から24または配列番号31も含むことができ、または外膜タンパク質は全長B. ミコイデス (B. mycoides) 2048 仮想タンパク質 bmyc00001__22540 (配列番号32) を含むことができる。B. ミコイデス (B. mycoides) 2048 仮想タンパク質 bmyc00001__22540 のアミノ酸9から24に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号68を含むことができる。

40

【0080】

あるいは、標的配列は配列番号33のアミノ酸1から15、配列番号33を含み、または外膜タンパク質は全長B. ミコイデス (B. mycoides) 2048 仮想タンパ

50

ク質 b m y c 0 0 0 1 _ 2 1 5 1 0 (配列番号 3 4) を含む。

【0081】

標的配列は配列番号 3 5 のアミノ酸 1 から 1 6、配列番号 3 5 も含むことができ、または外膜タンパク質は、全長 B. ツリンギエンシス (B. t h u r i n g i e n s i s) 3 5 6 4 6 コラーゲン三重らせん反復タンパク質 (配列番号 3 6) を含むことができる。

【0082】

標的配列は配列番号 4 3 のアミノ酸 1 から 2 9、配列番号 4 3 のアミノ酸 1 4 から 2 9 または配列番号 4 3 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 仮想タンパク質 W P _ 6 9 6 5 2 (配列番号 4 4) を含むことができる。

10

【0083】

あるいは、標的配列は配列番号 4 5 のアミノ酸 1 から 3 5、配列番号 4 5 のアミノ酸 2 0 から 3 5 または配列番号 4 5 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 外膜リーダー W P 0 1 6 1 1 7 7 1 7 (配列番号 4 6) を含むことができる。B. セレウス (B. c e r e u s) 外膜リーダー W P 0 1 6 1 1 7 7 1 7 のアミノ酸 2 0 から 3 5 に連結されたメチオニン残基も、標的配列として用いることができる。従って、標的配列は、配列番号 7 0 を含むことができる。

【0084】

標的配列は配列番号 4 7 のアミノ酸 1 から 4 3、配列番号 4 7 のアミノ酸 2 8 から 4 3 または配列番号 4 7 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 外膜ペプチド W P 0 0 2 1 0 5 1 9 2 (配列番号 4 8) を含むことができる。

20

【0085】

標的配列は配列番号 4 9 のアミノ酸 1 から 3 2、配列番号 4 9 のアミノ酸 1 7 から 3 2 または配列番号 4 9 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 仮想タンパク質 W P 8 7 3 5 3 (配列番号 5 0) を含むことができる。

【0086】

あるいは、標的配列は配列番号 5 1 のアミノ酸 1 から 3 3、配列番号 5 1 のアミノ酸 1 8 から 3 3 または配列番号 5 1 を含むことができ、外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 外膜ペプチド 0 2 1 1 2 3 6 9 (配列番号 5 2) を含むことができる。

30

【0087】

標的配列は配列番号 5 3 のアミノ酸 1 から 3 3、配列番号 5 3 のアミノ酸 1 8 から 3 3 または配列番号 5 3 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. セレウス (B. c e r e u s) 外膜タンパク質 W P 0 1 6 0 9 9 7 7 0 (配列番号 5 4) を含むことができる。

【0088】

あるいは、標的配列は配列番号 5 5 の酸 1 から 3 0、配列番号 5 5 のアミノ酸 1 5 から 3 0 または配列番号 5 5 を含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. ツリンギエンシス (B. t h u r i n g i e n s i s) 仮想タンパク質 Y P 0 0 6 6 1 2 5 2 5 (配列番号 5 6) を含むことができる。

40

【0089】

標的配列は配列番号 5 7 のアミノ酸 1 から 1 3 0、配列番号 5 7 のアミノ酸 1 1 5 から 1 3 0 または配列番号 5 7 も含むことができ、または外膜タンパク質は全長 B. ミコイデス (B. m y c o i d e s) 仮想タンパク質 T I G R 0 3 7 2 0 (配列番号 5 8) を含むことができる。

【0090】

さらに、B c l A のアミノ酸 2 0 から 3 5 が保存され、アミノ酸 2 5 から 3 5 がより保存されているが、標的配列がタンパク質を外膜に向かわせる能力に影響することなく、ある程度の変異がこの領域で起こり得ることが図 1 における配列配置から容易にわかる。図

50

1 には、各配列の相当するアミノ酸のそれぞれの B c l A のアミノ酸 2 0 から 3 5 (「2 0 から 3 5 % 同一性」) および B c l A のアミノ酸 2 5 から 3 5 (「2 5 から 3 5 % 同一性」) との同一性パーセントを挙げてある。従って、例えば、B c l A のアミノ酸 2 0 から 3 5 と比較して、B e t A / B A S 3 2 9 0 の相当するアミノ酸は約 8 1 . 3 % 同一であり、B A S 4 6 2 3 の相当するアミノ酸は約 5 0 . 0 % 同一であり、B c l B の相当するアミノ酸は約 4 3 . 8 % 同一であり、B A S 1 8 8 2 の相当するアミノ酸は約 6 2 . 5 % 同一であり、K B A B 4 2 2 8 0 遺伝子産物の相当するアミノ酸は約 8 1 . 3 % 同一であり、K B A B 4 3 5 7 2 遺伝子産物の相当するアミノ酸は約 8 1 . 3 % 同一である。残りの配列についてのこの領域での配列同一性を図 1 に示してある。

【0091】

B c l A のアミノ酸 2 5 から 3 5 に関して、B e t A / B A S 3 2 9 0 の相当するアミノ酸は約 9 0 . 9 % 同一であり、B A S 4 6 2 3 の相当するアミノ酸は約 7 2 . 7 % 同一であり、B c l B の相当するアミノ酸は約 5 4 . 5 % 同一であり、B A S 1 8 8 2 の相当するアミノ酸は約 7 2 . 7 % 同一であり、K B A B 4 2 2 8 0 遺伝子産物の相当するアミノ酸は約 9 0 . 9 % 同一であり、K B A B 4 3 5 7 2 遺伝子産物の相当するアミノ酸は約 8 1 . 8 % 同一である。残りの配列についてのこの領域での配列同一性を図 1 に示してある。

【0092】

従って、標的配列は、配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 4 3 % 同一性を有するアミノ酸配列 (アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 5 4 % である。) を含むことができる。あるいは、その標的配列は 1 6 個のアミノ酸からなり、配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 4 3 % 同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 5 4 % である。

【0093】

標的配列は、配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 5 0 % 同一性を有するアミノ酸配列も含むことができ、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 6 3 % である。あるいは、標的配列は 1 6 個のアミノ酸からなって少なくとも配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と約 5 0 % 同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 6 3 % である。

【0094】

標的配列は、配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 5 0 % 同一性を有するアミノ酸配列も含むことができ、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 7 2 % である。あるいは、標的配列は 1 6 個のアミノ酸からなって配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 5 0 % 同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 7 2 % である。

【0095】

標的配列は、配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 5 6 % 同一性を有するアミノ酸配列も含むことができ、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 6 3 % である。あるいは、標的配列は 1 6 個のアミノ酸からなって配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 5 6 % 同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 6 3 % である。

【0096】

あるいは、標的配列は配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 6 2 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 7 2 % である。標的配列は、1 6 個のアミノ酸からなって配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 6 2 % 同一性を有するアミノ酸配列からなることもでき、配列番号 1 のアミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 7 2 % である。

【0097】

標的配列は配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から 3 5 と少なくとも約 6 8 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、アミノ酸 2 5 から 3 5 との同一性は少なくとも約 8 1 % であ

10

20

30

40

50

る。あるいは、標的配列は16個のアミノ酸からなって配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも68%同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約81%である。

【0098】

標的配列は、配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約75%同一性を有するアミノ配列も含むことができ、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約72%である。あるいは、標的配列は16個のアミノ酸からなって配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約75%同一性を有するアミノ酸配列からなり、配列番号1のアミノ酸25から35との同一性は少なくとも約72%である。

【0099】

標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約75%同一性を有するアミノ配列も含むことができ、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約81%である。あるいは、標的配列は16個のアミノ酸からなって配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約75%同一性を有するアミノ酸配列からなり、配列番号1のアミノ酸25から35との同一性は少なくとも約81%である。

【0100】

標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約81%同一性を有するアミノ酸配列も含むことができ、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約81%である。あるいは、標的配列は16個のアミノ酸からなって配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約81%同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約81%である。

【0101】

標的配列は配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約81%同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約90%である。あるいは、標的配列は16個のアミノ酸からなって配列番号1のアミノ酸20から35と少なくとも約81%同一性を有するアミノ酸配列からなり、アミノ酸25から35との同一性は少なくとも約90%である。

【0102】

標的配列がBclAのアミノ酸20から35、BetA/BAS3290、BAS4263、BclB、BAS1882、KBAB4 2280遺伝子産物もしくはKBAB3572遺伝子産物の相当するアミノ酸を含む限り、またはBclAのアミノ酸20から35および25から35と上記配列同一性のいずれかを含む配列が存在する限りにおいて、上記配列の変異体も標的配列として用いることができることは、当業者は認識するものである。

【0103】

BclAのアミノ酸25から35と相同性を有する領域が欠損しているある種のバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科外膜タンパク質も、ペプチドまたはタンパク質をバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の外膜に向かわせるのに用いることが可能であることも発見されている。特に、前記融合タンパク質は、配列番号71を含む外膜タンパク質 (B. mycoides) InhA)、配列番号72を含む外膜タンパク質 (B. anthracis) スターン (Sterne) BAS1141 (ExsY))、配列番号73を含む外膜タンパク質 (B. anthracis) スターン (Sterne) BAS1144 (BxpB/ExsFA))、配列番号74を含む外膜タンパク質 (B. anthracis) スターン (Sterne) BAS1145 (CotY))、配列番号75を含む外膜タンパク質 (B. anthracis) スターン (Sterne) BAS1140)、配列番号76を含む外膜タンパク質 (B. anthracis) H9401 ExsFB)、配列番号77を含む外膜タンパク質 (B. thuringiensis) HD74 InhA1)、配列番号78を含む外膜タンパク質 (B. セレ

10

20

30

40

50

ウス (*B. cereus*) ATCC 10876 Exs J)、配列番号 79 を含む外膜タンパク質 (*B. cereus*) Exs H)、配列番号 80 を含む外膜タンパク質 (*B. anthracis*) エームス (Ames) Yj c A)、配列番号 81 を含む外膜タンパク質 (*B. anthracis*) Yj c B)、配列番号 82 を含む外膜タンパク質 (*B. anthracis*) スターン (Sterne) Bcl C)、配列番号 83 を含む外膜タンパク質 (バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 血清型コンクキアン (*konkukian*) 株 97-27 酸ホスファターゼ)、または配列番号 84 を含む外膜タンパク質 (*B. thuringiensis*) HD 74 Inh A2) を含むことができる。本明細書に記載の融合タンパク質に配列番号 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 または 84 を含む外膜タンパク質を含ませることで、*B. cereus* 科構成員の外膜に標的化される。

10

【0104】

さらに、全長外膜タンパク質または上記記載の外膜タンパク質断片のいずれかと高度の配列同一性を有する外膜タンパク質も、ペプチドまたはタンパク質をバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員の外膜に向かわせるのに用いることができる。従って、前記融合タンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、44、46、48、50、52、54、56、58、59、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 および 84 のいずれか一つと少なくとも 85 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む外膜タンパク質を含むことができる。あるいは、前記融合タンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、44、46、48、50、52、54、56、58、59、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 および 84 のいずれか一つと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一性を有する外膜タンパク質を含むことができる。

20

【0105】

あるいは、前記融合タンパク質は、配列番号 59 と少なくとも 85 % 同一性を有するアミノ酸配列からなる外膜タンパク質断片を含むことができる。あるいは、前記融合タンパク質は、配列番号 59 と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一性を有するアミノ酸配列からなる外膜タンパク質断片を含むことができる。

30

【0106】

本明細書に記載の標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片のいずれにおいても、標的配列、外膜タンパク質または外膜タンパク質断片は、そのカルボキシ末端にアミノ酸配列 G X T を含むことができ、X はいずれかのアミノ酸である。

【0107】

本明細書に記載の標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片のいずれにおいても、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片は、配列番号 1 のアミノ酸 20 に相当する標的配列の位置にアラニン残基を含むことができる。

40

【0108】

融合タンパク質

融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質または外膜タンパク質断片、および少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドを含むことができる。植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、ペプチドホルモン、非ホルモンペプチド、植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素または細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素を含むことができる。標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片は、上記の標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片のい

50

ずれかであることができる。

【0109】

融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質または外膜タンパク質断片、および植物を病原体から保護する少なくとも一つのタンパク質もしくはペプチドを含むことができる。標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片は、上記の標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片のいずれかであることができる。

【0110】

融合タンパク質は、当業界で公知の標準的なクローニングおよび分子生物学的方法を用いて製造することができる。例えば、タンパク質またはペプチドをコードする遺伝子（例えば、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドをコードする遺伝子）は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができ、上記標的配列のいずれかをコードするDNAに連結して融合タンパク質をコードするDNA分子を形成することができる。その融合タンパク質をコードするDNA分子は、いずれか好適なベクター、例えばプラスミドベクターにクローニングすることができる。そのベクターは好適には、融合タンパク質をコードするDNA分子を容易に挿入することができる多重クローニング部位を含む。前記ベクターも好適には、選択可能なマーカー、例えば抗生物質抵抗性遺伝子を含むことで、ベクターで形質転換、トランスフェクションまたは接合される細菌を容易に同定および単離できるようにする。ベクターがプラスミドである場合、そのプラスミドは好適には、複製起点も含む。前記融合タンパク質をコードするDNAは好適には、B. セレウス（B.

cereus）科構成員内生孢子（例えば、B. セレウス（B. cereus）科構成員からの天然bclAプロモーター）の外膜上での融合タンパク質の発現を引き起こす孢子形成プロモーターの制御下にある。あるいは、前記融合タンパク質をコードするDNAは、B. セレウス（B. cereus）科構成員宿主の染色体DNAに組み込むことができる。

【0111】

融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、外膜タンパク質断片、または植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド、植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチド、または植物結合性タンパク質もしくはペプチドの一部ではない別のポリペプチド配列も含むことができる。例えば、前記融合タンパク質は、タグまたはマーカーを含むことで、融合タンパク質（例えば、ポリヒスチジンタグまたはGFPもしくはYFPなどの蛍光タンパク質）の精製または視覚化または融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞孢子の視覚化を促進することができる。

【0112】

本明細書に記載の標的配列、外膜タンパク質および外膜タンパク質断片を用いる外膜上での融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の自然たたみ込みおよび活性保持を可能とするこれら配列のアミノ末端における二次構造の欠如のために促進される。適切なたたみ込みは、標的配列、外膜タンパク質、外膜タンパク質断片、および融合パートナータンパク質の間に短いアミノ酸リンカーを含ませることでさらに促進することができる。

【0113】

従って、本明細書に記載の融合タンパク質のいずれも、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド、植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチド、または植物結合性タンパク質もしくはペプチドの間のアミノ酸リンカーを含むことができる。

【0114】

リンカーは、ポリアラニンリンカーまたはポリグリシンリンカーを含むことができる。アラニン残基およびグリシン残基の両方の混合物を含むリンカーも用いることができる。例えば、標的配列が配列番号1を含む場合、融合タンパク質は下記の構造のうちの一つを有することができる：

リンカーなし：配列番号 1－融合パートナータンパク質

アラニンリンカー：配列番号 1－A n－融合パートナータンパク質

グリシンリンカー：配列番号 1－G n－融合パートナータンパク質

混合アラニンおよびグリシンリンカー：配列番号 1－(A/G) n－融合パートナータンパク質。

【0115】

上記において、A n、G n、および(A/G) nは、それぞれ、あらゆる数のアラニン、あらゆる数のグリシン、またはアラニンおよびグリシンのあらゆる数の混合物である。例えば、nは1から25であることができ、好ましくは6から10である。リンカーがアラニン残基およびグリシン残基の混合物を含む場合、あらゆる組み合わせのグリシン残基およびアラニン残基を用いることができる。上記の構造において、「融合パートナータンパク質」は、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド、植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチド、または植物結合性タンパク質もしくはペプチドを表す。

10

【0116】

あるいはまたはさらに、リンカーは、プロテアーゼ認識部位を含むことができる。プロテアーゼ認識部位が含まれることで、プロテアーゼ認識部位を認識するプロテアーゼに曝露されると、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド、植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチド、または植物結合性タンパク質もしくはペプチドの標的除去が可能となる。

20

【0117】

植物成長刺激タンパク質およびペプチド

上記で示したように、融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドを含むことができる。例えば、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、ペプチドホルモン、非ホルモンペプチド、植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素、または細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素を含むことができる。

【0118】

例えば、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドがペプチドホルモンを含む場合、ペプチドホルモンは、ファイトスルホカイン（例えば、ファイトスルホカイン- α ）、c l a v a t a 3 (C L V 3)、システミン、Z m l G F、またはS C R / S P 1 1を含むことができる。

30

【0119】

植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドが非ホルモンペプチドを含む場合、非ホルモンペプチドは、R K N 1 6 D 1 0、H g - S y v 4 6、e N O D 4 0 ペプチド、メリチン、マストパラン、M a s 7、R H P P、P O L A R I S、またはクニツ(k u n i t z)トリプシン阻害剤(K T I)を含むことができる。

【0120】

植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドは、植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素を含むことができる。植物成長刺激化合物の産生もしくは活性化に関与する酵素は、植物成長を刺激して植物構造を変える化合物の生合成経路におけるいずれかの段階を触媒する酵素、または植物成長を刺激し植物構造を変える化合物の不活性もしくは低活性誘導体のその化合物の活性型もしくは高活性型への変換を触媒する酵素であることができる。

40

【0121】

植物成長刺激化合物は、根圏における細菌または真菌によって産生される化合物、例えば、2, 3-ブタンジオールを含むことができる。

【0122】

あるいは、植物成長刺激化合物は、植物成長ホルモン、例えば、サイトカイニンもしくはサイトカイニン誘導体、エチレン、オーキシンもしくはオーキシン誘導体、ジベレリン

50

酸もしくはジベレリン酸誘導体、アブシシン酸もしくはアブシシン酸誘導体、またはジャスモン酸もしくはジャスモン酸誘導体を含むことができる。

【0123】

植物成長刺激化合物がサイトカイニンもしくはサイトカイニン誘導体を含む場合、サイトカイニンまたはサイトカイニン誘導体は、キネチン、シスーゼアチン、トランスーゼアチン、6-ベンジルアミノプリン、ジヒドロキシゼアチン、N6-(D2-イソペンテニル)アデニン、リボシルゼアチン、N6-(D2-イソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-シス-リボシルゼアチン、シス-リボシルゼアチン、トランス-リボシルゼアチン、2-メチルチオ-トランス-リボシルゼアチン、リボシルゼアチン-5-モノホスフェート、N6-メチルアミノプリン、N6-ジメチルアミノプリン、2'-デオキシゼアチンリボシド、4-ヒドロキシ-3-メチル-トランス-2-ブテニルアミノプリン、オルト-トポリン、メタ-トポリン、ベンジルアデニン、オルト-メチルトポリン、メタ-メチルトポリン、またはそれらの組み合わせを含むことができる。

10

【0124】

植物成長刺激化合物がオーキシンもしくはオーキシン誘導体を含む場合、オーキシンまたはオーキシン誘導体は、活性オーキシン、不活性オーキシン、複合型オーキシン、天然オーキシン、または合成オーキシン、またはそれらの組み合わせを含むことができる。例えば、オーキシンまたはオーキシン誘導体は、インドール-3-酢酸、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-アセトアルドキシム、インドール-3-アセトアミド、インドール-3-アセトニトリル、インドール-3-エタノール、インドール-3-ピルベ

20

【0125】

植物成長刺激化合物の産生もしくは活性化に關与する酵素は、アセトインレダクターゼ、インドール-3-アセトアミドヒドロラーゼ、トリプトファンモノオキシゲナーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アセト乳酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ジアセチルレダクターゼ、ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、アミノトランスフェラーゼ（例えば、トリプトファミノトランスフェラーゼ）、トリプトファンデカルボキシラーゼ、アミノオキシダーゼ、インドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼ、インドール-3-アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、トリプトファン側鎖オキシダーゼ、ニトリルヒドロラーゼ、ニトリラーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、アデノシンリン酸イソペ

30

ンテニルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、アデノシンキナーゼ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、CYP735A、5'-リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、ゼアチンシス-トランスイソメラーゼ、ゼアチンO-グルコシルトランスフェラーゼ、 β -グルコシダーゼ、シス-ヒドロキシラーゼ、CKシス-ヒドロキシラーゼ、CK-N-グルコシルトランスフェラーゼ、2,5-リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、アデノシンヌクレオシダーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ゼアチンレダクターゼ、ヒドロキシルアミンレダクターゼ、2-オキソグルタル酸ジオキシゲナーゼ、ジベレリン酸2B/3Bヒドロラーゼ、ジベレリン3-オキシダーゼ

40

、ジベレリン20-オキシダーゼ、キトシナーゼ(chitinase)、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ、 β -1,4-グルカナーゼ、 β -1,6-グルカナーゼ、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼ、またはノッド因子産生に關与する酵素（例えば、nodA、nodB、またはnodI）を含むことができる。

【0126】

前記酵素がプロテアーゼまたはペプチダーゼを含む場合、プロテアーゼまたはペプチダーゼは、タンパク質、ペプチド、プロタンパク質、またはプレプロタンパク質を開裂させて生理活性ペプチドを作るプロテアーゼまたはペプチダーゼであることができる。その生理活性ペプチドは、生理活性を発揮するあらゆるペプチドであることができる。

【0127】

50

生理活性ペプチドの例には、RKN 16D10およびRHPPなどがある。

【0128】

タンパク質、ペプチド、プロタンパク質、またはプレプロタンパク質を開裂させて生理活性ペプチドを作るプロテアーゼまたはペプチダーゼは、サブチリシン、酸プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、プロテイナーゼ、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、サーモリシン、パパイン、ペプシン、トリプシン、プロナーゼ、カルボキシラーゼ、セリンプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、またはメタロプロテアーゼを含むことができる。

【0129】

プロテアーゼまたはペプチダーゼは、高タンパク質食（例えば、大豆ミールまたは酵母抽出物）中のタンパク質を開裂させることができる。

【0130】

植物成長刺激タンパク質は、細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素も含むことができる。そのような酵素には、セルラーゼ類、リパーゼ類、リグニンオキシダーゼ類、プロテアーゼ類、グリコシドヒドロラーゼ類、ホスファターゼ類、ニトロゲナーゼ類、ヌクレアーゼ類、アミダーゼ類、硝酸レダクターゼ類、亜硝酸レダクターゼ類、アミラーゼ類、アンモニアオキシダーゼ類、リグニナーゼ類、グルコシダーゼ類、ホスホリパーゼ類、フィターゼ類、ペクチナーゼ類、グルカナーゼ類、スルファターゼ類、ウレアーゼ類、キシラナーゼ類、およびシデロホア類などがある。植物成長培地に導入されたり、植物、種子または植物もしくは植物種子周囲の区画に施用された場合、細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する融合タンパク質含有酵素は、植物近傍の栄養素のプロセッシングに役立つことで、植物による、または植物近傍の有益な細菌もしくは真菌による栄養素取り込みを促進させることができる。

【0131】

好適なセルラーゼ類には、エンドセルラーゼ類（例えば、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）エンドグルカナーゼ、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）エンドグルカナーゼ、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）エンドグルカナーゼ、またはバチルス・クラウシイ（バチルス・クラウシイ（*Bacillus clausii*）エンドグルカナーゼなどのエンドグルコナーゼ（*endoglucanase*））、エキソセルラーゼ類（例えば、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）エキソセルラーゼ）、およびβ-グルコシダーゼ類（例えば、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）β-グルコシダーゼ、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）β-グルコシダーゼ、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）β-グルコシダーゼ、またはバチルス・クラウシイ（*Bacillus clausii*）β-グルコシダーゼ）などがある。

【0132】

前記リパーゼは、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）リパーゼ、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）リパーゼ、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）リパーゼ、またはバチルス・クラウシイ（*Bacillus clausii*）リパーゼを含むことができる。

【0133】

1実施形態において、リパーゼはバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）リパーゼを含む。そのバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）リパーゼは、次のプライマー：ggatccatggcctgaacacaatcc（順方向、配列番号37）およびggatcccttaatttcgtatttctggcc（逆方向、配列番号38）を用いてPCR増幅することができる。

【0134】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、セルラーゼはバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) エンドグルカナーゼである。バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) エンドグルカナーゼは、次のプライマー：ggatccatgaaacgggtcaatc (順方向、配列番号39) およびggatcccttactaatcttggttcctgt (逆方向、配列番号40) を用いてPCR増幅することができる。

【0135】

さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、大腸菌 (*E. coli*) プロテアーゼPtrBを含む。大腸菌 (*E. coli*) プロテアーゼPtrBは、次のプライマー：ggatccatgctaccctaaagcc (順方向、配列番号41) およびggatcccttagtccgcaggcgtagc (逆方向、配列番号42) を用いてPCR増幅することができる。

10

【0136】

ある種の実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号104におけるヌクレオチド配列由来のエンドグルカナーゼを含む。

【0137】

標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および、適宜にリンカー配列、例えばポリ-Aリンカーに融合し得る例示的なエンドグルカナーゼについてのアミノ酸配列は、配列番号107として提供される融合タンパク質である。

【0138】

他の実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号105に示したヌクレオチド配列由来のホスホリパーゼを含む。

20

【0139】

標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および適宜にリンカー配列、例えばポリ-Aリンカーに融合し得る例示的なホスホリパーゼについてのアミノ酸配列は、配列番号108として提供される融合タンパク質である。

【0140】

さらに別の実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号106で示したヌクレオチド配列由来のキトサナーゼを含む。融合タンパク質中の、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および適宜にリンカー配列、例えばポリ-Aリンカーに融合し得る例示的なキトサナーゼについてのアミノ酸配列は、配列番号109として提供される。

30

【0141】

融合構築物を作るため、オーバーラップエクステンションによるスプライシング (SOE) 技術を用いて、BclAの最初の35アミノ酸 (配列番号1のアミノ酸1から35) をコードするバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) DNAの天然bclAプロモーターに遺伝子を融合させることができる。正しい単位複製配列を大腸菌 (*E. coli*) /バチルス (*Bacillus*) シャトルベクターpHP13にクローニングし、正しいクローンをDNA配列決定によってスクリーニングする。正しいクローンをバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) (Cry、プラスミド) にエレクトロポレーションし、クロラムフェニコール抵抗性に関してスクリーニングする。正しい形質転換体をブレインハートインフュージョン培地において30℃で終夜増殖させ、栄養寒天プレートに蒔き、30℃で3日間インキュベートする。融合構築物を発現する孢子 (BEMD孢子) を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄することでプレートから回収し、遠心およびさらなるPBSでの洗浄によって精製することができる。

40

【0142】

そのような融合タンパク質において、エンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (chitinase) は、それぞれ配列番号107、108または109と少なくとも85%同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。

50

【0143】

そのような融合タンパク質において、エンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (chitosinase) は、それぞれ配列番号107、108または109と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0144】

そのような融合タンパク質において、エンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (chitosinase) は、それぞれ配列番号107、108または109と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0145】

そのような融合タンパク質において、エンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (chitosinase) は、それぞれ配列番号107、108または109と少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0146】

そのような融合タンパク質において、エンドグルカナーゼ、ホスホリパーゼまたはキトシナーゼ (chitosinase) は、それぞれ配列番号107、108または109と少なくとも99%同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0147】

好適なリグニンオキシダーゼは、リグニンペルオキシダーゼ類、ラッカーゼ類、グリオキサルオキシダーゼ類、リグニナーゼ類、およびマンガンペルオキシダーゼ類を含む。

【0148】

20

プロテアーゼは、サブチリシン、酸プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、プロテイナーゼ、ペプチダーゼ、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、サーモリシン、パパイシン、ペプシン、トリプシン、プロナーゼ、カルボキシラーゼ、セリンプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、またはメタロプロテアーゼを含むことができる。

【0149】

ホスファターゼは、リン酸モノエステルヒドロラーゼ、ホスホモノエステラーゼ (例えば、PhoA4)、リン酸ジエステルヒドロラーゼ、ホスホジエステラーゼ、三リン酸モノエステルヒドロラーゼ、無水リン酸ヒドロラーゼ、ピロホスファターゼ、フィターゼ (例えば、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) EE148フィターゼまたはバチルス・ツリングエンシス (Bacillus thuringiensis) BT013Aフィターゼ)、トリメタホスファターゼまたはトリホスファターゼを含むことができる。

30

【0150】

ニトロゲナーゼは、Nifファミリーニトロゲナーゼ (例えば、パニエバシラス・メシリエンシス (Paenibacillus massiliensis) NifBDEHKNXV) を含むことができる。

【0151】

病原体から植物を保護するタンパク質およびペプチド

融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片、および植物を病原体から保護する少なくとも一つのタンパク質もしくはペプチドを含むことができる。

40

【0152】

タンパク質またはペプチドは、植物免疫応答を刺激するタンパク質またはペプチドを含むことができる。例えば、植物免疫応答を刺激するタンパク質またはペプチドは、植物免疫系エンハンサータンパク質またはペプチドを含むことができる。植物免疫系エンハンサータンパク質またはペプチドは、植物の免疫系に対して有益な効果を有するタンパク質またはペプチドであることができる。好適な植物免疫系エンハンサータンパク質およびペプチドには、ハーピン類、 α -エラスチン類、 β -エラスチン類、システミン類、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、エリシチン類、デフェンシン類、クリプトゲイン類、フ

50

ラゲリントタンパク質、およびフラゲリンペプチド類（例えば、f l g 2 2）などがある。

【0153】

あるいは、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドは、抗菌活性、抗真菌活性、または抗菌および抗真菌の両方の活性を有するタンパク質またはペプチドであることができる。そのようなタンパク質およびペプチドの例には、バクテリオシン類、リゾチーム類、リゾチームペプチド類（例えば、L y s M）、シデロホア類、非リボソーム活性ペプチド類、コンアルブミン類、アルブミン類、ラクトフェリン類、ラクトフェリンペプチド類（例えば、L f c i n B）、ストレプトアビジンおよびT a s Aなどがある。

【0154】

病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドは、殺虫活性、殺蠕虫活性を有する、昆虫または青虫捕食を抑制する、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質またはペプチドであることもできる。例えば、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドは、殺虫性細菌毒素（例えば、V I P殺虫性タンパク質）、内毒素、C r y毒素（例えば、バチルス・ツリングエンシス（B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s）からのC r y毒素）、プロテアーゼ阻害剤タンパク質またはペプチド（例えば、トリプシン阻害剤またはアローヘッド（a r r o w h e a d）プロテアーゼ阻害剤）、システインプロテアーゼ、またはキチナーゼを含むことができる。C r y毒素がバチルス・ツリングエンシス（B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s）からのC r y毒素である場合、そのC r y毒素はC r y 5 Bタンパク質またはC r y 2 1 Aタンパク質であることができる。C r y 5 BおよびC r y 2 1 Aは、殺虫および殺線虫の両方の活性を有する。

【0155】

病原体から植物を保護するタンパク質は、酵素を含むことができる。好適な酵素には、プロテアーゼ類およびラクトナーゼ類などがある。そのプロテアーゼ類およびラクトナーゼ類は、細菌シグナル伝達分子（例えば、細菌ラクトンホモセリンシグナル伝達分子）に特異的であることができる。

【0156】

その酵素がラクトナーゼである場合、そのラクトナーゼは、1, 4-ラクトナーゼ、2-ピロン-4, 6-ジカルボキシレートラクトナーゼ、3-オキシソアジペートエノール-ラクトナーゼ、アクチノマイシンラクトナーゼ、デオキシリモネートA環-ラクトナーゼ、グルコノラクトナーゼL-ラムノノ-1, 4-ラクトナーゼ、リモニン-D環-ラクトナーゼ、ステロイド-ラクトナーゼ、トリアセテート-ラクトナーゼ、またはキシロノ-1, 4-ラクトナーゼを含むことができる。

【0157】

その酵素は、細菌または真菌の細胞成分に特異的な酵素であることもできる。例えば、その酵素は、 β -1, 3-グルカナーゼ、 β -1, 4-グルカナーゼ、 β -1, 6-グルカナーゼ、キトシナーゼ（c h i t o s i n a s e）、キチナーゼ、キトシナーゼ（c h i t o s i n a s e）様酵素、リチカーゼ、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、プロテアーゼ（例えば、アルカリプロテアーゼ、酸プロテアーゼ、または中性プロテアーゼ）、ムタノリシン、スタホリシン（s t a p h o l y s i n）、またはリゾチームを含むことができる。

【0158】

植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質およびペプチド

前記融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および少なくとも一つの植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチドを含むことができる。

【0159】

例えば、前記植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチドは、ストレス関連化合物を分解する酵素を含む。ストレス関連化合物には、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（A C C）、反応性酸素種、一酸化窒素、オキシリピン類およびフェ

ノール類などがあるが、それらに限定されるものではない。具体的な反応性酸素種には、ヒドロキシル、過酸化水素、酸素、およびスーパーオキシドなどがある。ストレス関連化合物を分解する酵素は、スーパーオキシドジスムターゼ、オキシダーゼ、カタラーゼ、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼ、ペルオキシダーゼ、抗酸化酵素、または抗酸化ペプチドを含むことができる。

【0160】

植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチドは、植物を環境ストレスから保護するタンパク質またはペプチドも含むことができる。環境ストレスは、例えば、干魃、洪水、熱、凍結、塩、重金属、低pH、高pHまたはそれらの組み合わせを含むことができる。例えば、植物を環境ストレスから保護するタンパク質またはペプチドは、氷核形成タンパク質、プロリナーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、イソコリスミ酸シンターゼ、イソコリスミ酸ピルビン酸リアーゼ、またはコリンデヒドロゲナーゼを含むことができる。

10

【0161】

植物結合タンパク質およびペプチド

前記融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片および少なくとも植物結合性タンパク質もしくはペプチドを含むことができる。その植物結合性タンパク質もしくはペプチドは、植物のいずれかの部分（例えば、植物根または植物の地上部分、例えば葉、茎、花、または果実）または植物体に特異的もしくは非特異的に結合する能力を有するタンパク質またはペプチドであることができる。従って、例えば、前記植物結合性タンパク質もしくはペプチドは、根結合性タンパク質もしくはペプチド、または葉結合性タンパク質もしくはペプチドであることができる。

20

【0162】

好適な植物結合性タンパク質およびペプチドには、アドヘシン類（例えば、リガデシン（*rhicadhesin*））、フラゲリン類、オムプチン類、レクチン類、エクспанシン類、バイオフィーム構造タンパク質（例えば、*TasA*または*YuaB*）繊毛タンパク質、カールス（*curlus*）タンパク質、インチミン類、インペーシン類、アグルチニン類、およびアフイムブリアル（*afimbrial*）タンパク質などがある。

【0163】

融合タンパク質を発現する組換えバチルス

本明細書に記載の融合タンパク質は、組換え外膜産生性バチルス細胞によって発現することができる。融合タンパク質は、上記で記載の融合タンパク質のいずれかであることができる。

30

【0164】

組換え外膜産生性バチルス細胞は、2以上の上記の融合タンパク質のいずれかを共発現することができる。例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞は、植物成長刺激タンパク質もしくはペプチドを含む少なくとも一つの融合タンパク質、病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドを含む少なくとも一つの融合タンパク質、または少なくとも一つの植物におけるストレス抵抗性を高めるタンパク質もしくはペプチドとともに、植物結合性タンパク質もしくはペプチドを含む少なくとも一つの融合タンパク質を共発現することができる。

40

【0165】

組換え外膜産生性バチルス細胞は、バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）、バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）、バチルス・ミコイデス（*Bacillus mycooides*）、バチルス・シュードミコイデス（*Bacillus pseudomycooides*）、バチルス・サマニイ（*Bacillus samanii*）、バチルス・ガエモケンシス（*Bacillus gaemokensis*）、バチルス・ウェイヘンステフェンシス（*Bacillus weihenstephensis*）、バチルス・トヨイエシス（*Bacillus toyoie*

50

n s i s) またはそれらの組み合わせを含むことができる。例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞は、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、バチルス・シュードミコイデス (*Bacillus pseudomycoides*)、またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) を含むことができる。特に、組換え外膜産生性バチルス細胞は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) またはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoide s*) を含むことができる。

【0166】

融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞を発生させるため、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員を、当業界で公知の標準的方法 (例えば、エレクトロポレーションによって) を用いて融合タンパク質をコードするベクターで複合化、形質導入または形質転換することができる。次に、当該細菌をスクリーニングして、当業者に公知の方法によって形質転換体を識別することができる。例えば、ベクターが抗生物質抵抗性遺伝子を含む場合、細菌を抗生物質抵抗性についてスクリーニングすることができる。あるいは、その融合タンパク質をコードするDNAを、*B. cereus* (B. *cer e u s*) 科構成員宿主の染色体DNAに組み込むことができる。次に、組換え外膜産生性バチルス細胞を、胞子形成を誘発する条件に曝露することができる。胞子形成を誘発するのに好適な条件は当業界で公知である。例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞を寒天プレートに蒔き、約30℃の温度で数日間 (例えば3日間) インキュベ

10

20

【0167】

上記属種のいずれかの不活性化株、無毒性株または遺伝子組み換えが行われた株も好適に用いることができる。例えば、Cry毒素を欠損しているバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) を用いることができる。あるいはまたはさらに、融合タンパク質を発現する組換え*B. cereus* (B. *cer e u s*) 科胞子が発生すると、それらを不活性化して、以前に使われたさらなる発芽を防止することができる。当業界で公知の細菌胞子を不活性化するいかなる方法も用いることができる。好適な方法には、熱処理、γ線照射、X線照射、UV-A照射、UV-B照射、化学的処理 (例えば、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、過酸化水素、酢酸、漂白剤またはこれら

30

【0168】

植物成長促進効果および／または他の有益な特質を有する組換え外膜産生性バチルス細胞

多くのバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員株が。固有の有益な特質を有する。例えば、一部の株は、植物成長促進効果を有する。本明細書に記載の融合タンパク質のいずれも、そのような株で発現させることができる。

【0169】

例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞は、植物成長促進性細菌株を含むことができる。

40

【0170】

植物成長促進性細菌株は、を含むことができる。殺虫性毒素 (例えば、Cry毒素) を産生する細菌株は、殺真菌性化合物 (例えば、β-1, 3-グルカナーゼ、キトシナーゼ (*chit os i n a s e*)、リチカーゼ、またはそれらの組み合わせ) を産生し、殺線虫化合物 (例えば、Cry毒素) を産生し、殺細菌性化合物を産生し、1以上の抗生物質に対して抵抗性であり、1以上の自由に複製するプラスミドを含み、植物根に結合し、植物根にコロニー形成し、バイオフィルムを形成し、栄養素を可溶化し、有機酸を分泌し、またはこれらのいずれかの組み合わせを行う。

50

【0171】

例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞が植物成長促進性細菌株を含む場合、植物成長促進性細菌株は、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) BT155 (NRRL番号B-50921)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) EE118 (NRRL番号B-50918)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) EE141 (NRRL番号B-50916)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) BT46-3 (NRRL番号B-50922)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員 EE128 (NRRL番号B-50917)、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013A (NRRL番号B-50924)、またはバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員 EE349 (NRRL番号B-50928) を含むことができる。バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013A は、バチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 4Q7 としても知られる。これらの各株は、米国農務省 (USDA) 農業調査局 (ARS) (住所 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, U. S. A.) に 2014 年 3 月 10 日付けで寄託されており、括弧内に提供される NRRL 寄託番号によって識別される。

10

【0172】

これらの植物成長促進性株は、各種の元気の良い植物の根圏から単離されており、それらの 16S rRNA 配列により、そして生化学的アッセイによって同定されている。その株は、従来の生化学的および形態学的指標によって、少なくともそれらの属名に特定されている。バチルスなどの確認されたグラム陽性株についての生化学的アッセイには、PEA 培地および栄養寒天での増殖、顕微鏡検査、5% および 7.5% NaCl 培地での増殖、pH 5 および pH 9 での増殖、42℃ および 50℃ での増殖、セロビオース、乳糖、グリセロール、グルコース、ショ糖、d-マンニトールおよびデンプンとの発酵での酸を産生する能力；蛍光顔料産生；ゼラチン加水分解；硝酸還元；カタラーゼ産生、デンプン加水分解；オキシダーゼ反応、ウレアーゼ産生および運動性が含まれていた。

20

【0173】

例えば、植物成長促進性細菌株を含む組換え外膜産生性バチルス細胞は、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) BT155、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) EE141、またはバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) BT013A を含むことができる。組換え外膜産生性バチルス細胞は、本明細書に記載の融合タンパク質のいずれか、例えば配列番号 60 の標的配列および非ホルモンペプチドを含む融合タンパク質（例えば、クニツ (kunitz) トリプシン阻害剤 (KTI)）、植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に参与する酵素（例えば、キトシナーゼ (chitinase)）、植物結合性タンパク質もしくはペプチド（例えば、TasA）；病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチド（例えば、TasA）、または細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素（例えば、ホスファターゼ、例えば PhoA または フィターゼ、またはエンドグルカナーゼ）を発現することができる。

30

40

【0174】

プロモーター

本明細書に記載の組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員のいずれにおいても、前記融合タンパク質は、標的配列、外膜タンパク質、または融合タンパク質の外膜タンパク質断片由来のプロモーターの制御下に発現することができる。例えば、融合タンパク質が B. アントラシス (*B. anthracis*) スターン (Sterne) BclA (例えば、配列番号 1 のアミノ酸 20 から 35、配列番号 1 のアミノ酸 1 から 35、配列番号 1、または配列番号 60) 由来の標的配列を含み、または融合タンパク質が全長 BclA (配列番号 2) また全長 BclA の断片（例えば、配列番号

50

59)を含む場合、融合タンパク質はB. アントラシス (B. anthracis) スターン (Sterne) (例えば、配列番号85のプロモーター) のゲノム中のBclA遺伝子と通常関連しているプロモーターの制御下に発現することができる。

【0175】

あるいは、前記融合タンパク質は、高発現胞子形成プロモーターの制御下に発現させることができる。一部の場合で、前記標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片由来のプロモーターは、高発現胞子形成プロモーターであろう。他の場合、前記標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片由来のプロモーターは、高発現胞子形成プロモーターではないであろう。後者の場合、天然プロモーターに代えて高発現胞子形成プロモーターを用いることが有利である可能性がある。高発現胞子形成プロモーターの制御下での融合タンパク質の発現によって、バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科構成員の外膜上での融合タンパク質の発現が増加する。

10

【0176】

高発現胞子形成プロモーターは、1以上の σ -K胞子形成特異的ポリメラーゼプロモーター配列を含むことができる。

【0177】

バチルス・セレウス (Bacillus cereus) 科構成員において融合タンパク質を発現させるのに使用される好適な高発現胞子形成プロモーターには、下記の表2に挙げたものなどがある。

【0178】

20

表2. プロモーター配列

【表2】

プロモーター (配列番号)	配列
BclA ⁷ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号85)	TAATCACCCCTCTTCCAAATCAATCATATGTTATACATATACTAAACT TTCCATTTTTTTAAATTTGTTCAAGTAGTTTAAGATTTCTTTTCAATAAT TCAAATGTCCGTGTCATTTCTTTTCGGTTTTGCATCTACTATATAATG AACGCTTTATGGAGGTGAATTTATG
BetA ⁷ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号86)	ATTTATTTTCATTCAATTTTCTTATTTAGTACCTACCGCACTCACAAAA AGCACCTCTCATTAATTTATATTATAGTCATTGAAATCTAATTTAATGA AATCATCATACTATATGTTTTATAAGAAGTAAAGGTACCATACTTAA TTAATACATATCTATACACTTCAATATCACAGCATGCAGTTGAATTAT ATCCAACTTTCATTTCAAATTAATAAGTGCCTCCGCTATTGTGAATG TCATTTACTCTCCCTACTACATTTAATAATTATGACAAGCAATCATAG GAGGTTACTACATG
BAS1882 ⁷ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号87)	AATTACATAACAAGAACTACATTAGGGAGCAAGCAGTCTAGCGAAAG CTAACTGCTTTTTTATTAAATAACTATTTTATTAAATTTTCATATATACA ATCGCTTGTCATTTTCATTTGGCTCTACCCACGCATTTACTATTAGTA ATATGAATTTTTTCAGAGGTGGATTTTATT

30

40

プロモーター (配列番号)	配列
遺伝子3572 ^o プロモーター (B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB 4) (配列番号88)	CTATGATTTAAGATACACAATAGCAAAAGAGAAA <u>CATATTATA</u> TAAC GATAAATGAAACTTATGTATATGTATGGTAACTGTATATATTACTACA ATACAGTATACTCATAGGAGGTAGGTATG
YVTN β-ブ ^o プロモーター タンパク質 ^o プロモーター (B. ウェイヘンステフェンシス (B. weihenstephensis) KBAB 4) (配列番号89)	GGTAGGTAGATTTGAAATATGATGAAGAAAAGGAATAACTAAAAGGA GTCGATATCCGACTCCTTTTAGTTATAAATAATGTGGAATTAGAGTAT AATTTTATATAGGTATATTGTATTAGATGAACGCTTTATCCTTTAATTG TGATTAAATGATGGATTGTAAGAGAAGGGGCTTACAGTCCTTTTTTTAT GGTGTCTATAAGCCTTTTTTAAAAGGGGTACACCCACACCCAAAAA CAGGGGGGGTTATAACTACATATTGGATGTTTTGTAACGTACAAGAAT CGGTATTAATTACCCTGTAAATAAGTTATGTGTATATAAGGTAACCTT <u>ATATATTCT</u> CCTACAATAAAATAAAGGAGGTAATAAAGTG
Cry1A7 ^o プロモーター (B. ツリンギ ^o エンシス (B. thuringiensis) HD-73) (配列番号90)	AACCCCTTAATGCATTGGTTAAACATTGTAAAGTCTAAAGCATGGATAA TGGGCGAGAAGTAAGTAGATTGTTAACACCCTGGGTCAAAAATTGAT ATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTTTTT <u>CATAAGATGAGTC</u> <u>ATATGTTTT</u> TAAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAATGA <u>A</u> TTGGTATCTTAATAAAAGAGATGGAGGTAACCTA
ExsY7 ^o プロモーター (B. ツリンギ ^o エンシス (B. thuringiensis) 血清型コンクキアン (konkukian) 株 97-27) (配列番号91)	TAATTCACCTTCCCTTATCCTCTTTCGCCTATTTAAAAAAGGTCTTG AGATTGTGACCAAATCTCCTCAACTCC <u>ATATCTTA</u> TTAATGTAAATA CAAACAAGAAGATAAGGAGTGACATTAA
CotY7 ^o プロモーター (B. ツリンギ ^o エンシス (B. thuringiensis) アル・ハカム (Al Hakam)) (配列番号92)	AGGATGTCTTTTTTTATATTGTATTATGTACATCCCTACTATATAAATT CCCTGCTTTTATCGTAAGAATTAACGTAATATCAACCATATCCCGTTC <u>ATATTGTA</u> GTAGTGATGTCAGAACTCACGAGAAGGAGTGAACATAA
YjcA7 ^o プロモーター (B. ツリンギ ^o エンシス (B. thuringiensis) 血清型クルスタキ (kurstaki) 株HD73) (配列番号93)	TTAATGTCACCTCCTTATCTTCTTGTGTTGTATTTACATT <u>AATAAGATATT</u> GGAGTTGAGGAGATTGGTCAACAATCTCAAGACCTTTTTTTTAAATAG GCGAAAGAGGATAAGGGAAGGTGGAATTA
YjcB7 ^o プロモーター (B. ツリンギ ^o エンシス (B. thuringiensis) 血清型クルスタキ (kurstaki) 株HD73) (配列番号94)	ATATATTTTCATAATACGAGAAAAAGCGGAGTTTAAAAGAATGAGGG AACGGAAATAAAGAGTTGTT <u>CATATAGTAA</u> AATAGACAGAATTGACAG TAGAGGAGA

10

20

30

40

プロモーター (配列番号)	配列
BxpB ⁺ プロモーター (B. ツリンギ エンシス (B. thuringiensis) アル・ハカム (Al Hakam)) (配列番号95)	AAACTAAATAATGAGCTAAGCATGGATTGGGTGGCAGAATTATCTGC CACCCAAT CATATGCTTAAC GAGTATTATTATGTAAATTTCTTAAATTT GGGAACTTGTCTAGAACATAGAACCTGTCTTTTT CATTAAC TGAAAG TAGAAACAGATAAAGGAGTGAAAAACA
ラムノース ⁺ プロモーター (B. ツリンギ エンシス (B. thuringiensis) アル・ハカム (Al Hakam)) (配列番号96)	ATTCACTACAACGGGGATGAGTTTGATGCGGATA CATATGAGA AGTA CCGGAAAAGTGTTTGTAGAA CATTACAA AGATATATTATCTCCATCATA AAGGAGAGATGCAAAAG
CotY/CotZ ⁺ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号97)	CGCGCACCACCTTCGTCGTACAACAACGCAAGAAGAAGTTGGGGATAC AGCAGTATTCTTATTCAGTGATTTAGCACGCGGCGTAACAGGAGAAA ACATTCACGTTGATTTCAGGGTAT CATATCTTA GGATAAATATAATATT AATTTTAAAGGACAATCTCTACATGTTGAGATTGTCTTTTTTATTTGTT CTTAGAAAGAACGATTTTTTAAACGAAAGTTCTTACCACGTTATGAATAT AAGTATAATAGTACACGATTTATTTCAGCTACGTA
BclI ⁺ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号98)	TGAAGTATCTAGAGCTAATTTACGCAAAGGAATCTCAGGACAACACT TTCGCAACACCTATATTTTAAATTTAATAAAAAAAGAGACTCCGGAGT CAGAAATTATAAAGCTAGCTGGGTTCAAAATCAAAAATTTCACTAAAA CGATATTATCAATACGCAGAAAATGGAAAAAACGCCTTATCATAAGG CGTTTTTCCATTTTCTTCAAAACAAACGATTTTACTATGACCATTTA ACTAATTTTTG CATCTACTA TGATGAGTTTCATTACATTCTCATTAG AAAGGAGAGATTTAATG
シグマK ⁺ プロモーター (B. アントラシス・スターン (B. anthracis Sterne)) (配列番号99)	TATATCATATGTAAAATTAGTTCTTATITCCC CATATCATAT AGAAATC GCC CATATTTATA CATGCAGAAAACTAAGTATGGTATTATTCITAAATTG TTTAGCACCTTCTAATATTACAGATAGAATCCGTCATTTTCAACAGTG AACATGGATTTCTTCTGAACACAACCTCTTTTCTTTCCCTTATTTCCAAA AAGAAAAGCAGCCCATTTTAAATACGGCTGCTTGTAATGTACATTA
InhA ⁺ プロモーター (B. ツリンギ エンシス (B. thuringiensis) アル・ハカム (Al Hakam)) (配列番号100)	TATCACATAACTCTTTATTTTAAATATTTTCGA CATAAAGTG AAACTTT AATCAGTGGGGGCTTTGTTCATCCCCCACTGATTATTAATTGAACCA AGGGATAAAAAAGATAGAGGGTCTGACCAGAAAACTGGAGGGCATGA TTCTATAACAAAAAGCTTAATGTTTATAGAATTATGTCTTTTATATAG GGAGGGTAGTAAACAGAGATTGGACAAAAATGCACCGATTATCTG AATTTTAAGTTTATAAAGGGGAGAAATG
BclIクラスター ⁺ リコ シトランスフェラーゼ ⁺ オペロン1 (B. ツリンギ エンシス (B. thuringiensis) 血清型コンクキアン (konkukian) 株 97-27) (配列番号101)	ATTTTTTACTTAGCAGTAAAACTGATATCAGTTTACTGCTTTTTCATT TTTAAATTCAATCATTAATCTTCCTTTTCTACATAGT CATAATGTTT GT ATGACATTCCGTAGGAGGCACTTATA

10

20

30

40

プロモーター (配列番号)	配列
BclAクラスターグ リコシルトランス フェラーゼオペ ロン2 (B. ツリング エンシス (B. thuringiensis) 血清型クルスタ キ(kurstaki) 株HD73) (配列番号102)	ACATAAATTCCACCTCCATAAAGCGTTCATTATATAGTAGATGCAAAAC CGAAAGAAAATGACACGGACATTTGAATTATTGAAAAGAAATCTTAA ACTACTTGAACAATTTAAAAAAATGGAAAGTTTAGTATATGTATAAC <u>ATATGATT</u> GATTTGGAAGAGGGTGATTA
グ リコシルト ランス フェラーゼ プロモーター (B. ツリング エンシス (B. thuringiensis) アル・ハカム(Al Hakam)) (配列番号103)	TTCTATTTTCCAA <u>CATAACATG</u> CTACGATTAAATGGT'TTTTGCAAAT GCCTTCTTGGGAAGAAGGATTAGAGCGTTTTTTTATAGAAACCAAAAG TCATTAACAATTTTAAGTTAATGACTTTTTTGT'TTGCC'TTTAAGAGGTT TTATGTTACTATAATTATAGTATCAGGTACTAATAACAAGTATAAGTA TTTCTGGGAGGATATATCA

10

【0179】

上記表2に挙げたプロモーター配列において、 σ -K 孢子形成特異的ポリメラーゼプロモーター配列の位置が、太字で下線を施した文字列によって示されている。Cry1Aプロモーター(B. ツリングエンシス(B. thuringiensis)HD-73; 配列番号90)は、合計4個の σ -K配列を有し、そのうちの2個が、表2で二重下線によって示したように、互いに重複している。

20

【0180】

バチルス・セレウス(Bacillus cereus)科構成員において前記融合タンパク質を発現するのに使用される好ましい高発現孢子形成プロモーターには、BetAプロモーター(B. アントラシス(B. anthracis)スターン(Sterne); 配列番号86)、BclAプロモーター(B. アントラシス(B. anthracis)スターン(Sterne); 配列番号85)、BclAクラスターグ
リコシルトランスフェラーゼオペロン1および2プロモーター(B. アントラシス(B. anthracis)スターン(Sterne); 配列番号101および102)、およびYVTN β -プロペラタンパク質プロモーター(B. ウェイヘンステフェンシス(B. weihenstephensis)KBAB4; 配列番号89)などがある。

30

【0181】

本明細書に記載のバチルス・セレウス(Bacillus cereus)科構成員のいずれにおいても、前記融合タンパク質は、配列番号85から103のいずれか一つの核酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一性を有する核酸配列を含む孢子形成プロモーターの制御下に発現させることができる。

【0182】

孢子形成プロモーターが配列番号85から103のいずれか一つの核酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一性を有する核酸配列を含む場合、 σ -K 孢子形成特異的ポリメラーゼプロモーター配列または複数配列は好ましくは、配列番号85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、または103の相当するヌクレオチドと100%同一性を有する。例えば、上記表2に示したように、B. アントラシス(B. anthracis)スターン(Sterne)のBclAプロモーター(配列番号85)は、ヌクレオチド24から32、35から43、および129から137で σ -K 孢子形成特異的ポリメラーゼプロモーター配列を有する。従って、孢子形成プロモーターが配列番号85の核酸配列と少なくとも90%同一性を

40

50

有する配列を含む場合、配列番号 85 のヌクレオチド 24 から 32、35 から 43、および 129 から 137 に相当する孢子形成プロモーターのヌクレオチドが配列番号 85 のヌクレオチド 24 から 32、35 から 43、および 129 から 137 と 100% 同一性を有することが好ましい。

【0183】

本明細書に記載の植物成長刺激方法のいずれにおいても、組換え外膜産生性バチルス細胞および本明細書に開示の特定の殺菌剤から選択される少なくとも一つの殺菌剤を含む植物成長培地で成長する植物は、組換え外膜産生性バチルス細胞を含まない同一の植物成長培地での植物の成長と比較して高い成長を示す。

【0184】

植物成長を刺激する本発明に記載の組成物および方法のいずれにおいても、組換え外膜産生性バチルス細胞は、上記細菌の組換え植物成長促進性株のいずれかを含むことができる。

【0185】

本明細書に開示の植物成長を刺激する組成物または方法のいずれにおいても、前記融合タンパク質は、上記プロモーターのいずれかの制御下に発現させることができる。

【0186】

殺菌剤

概して、「殺菌性」とは、物質が真菌の死亡率を高め、増殖速度を阻害する能力を意味する。

【0187】

「真菌 (fungus)」または「真菌 (fungi)」という用語は、非常に多様なクロフィルを持たない有核孢子を有する生物を含む。真菌の例には、酵母類、カビ類、白かび類、さび菌類およびキノコ類などがある。

【0188】

本発明による組成物は、少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤を含む。

【0189】

一般名によって本明細書で特定される活性化合物が知られており、例えば「Pesticide Manual」に、またはインターネットで（例えば：<http://www.alanwood.net/pesticides>）記載されている。

【0190】

一部の実施形態において、殺菌剤は、ビテルタノール、ビキサフェン、ブロムコナゾール、カルベンダジム、カルプロバミド、ジクロフルアニド、フェナミドン、フェンヘキサミド、酢酸フェンチン、水酸化フェンチン、フルオピコリド、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキンコナゾール、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソチアニル、メトミノストロビン、オフラセ (ofurace)、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロクロラズ、プロパモカルブ、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピリメタニル、スピロキサミン、テブコナゾール、トリルフルアニド、トリアジメホン、トリアジメノール、トリアゾキシド、トリフロキシストロビン、N-[5-クロロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-N-シクロプロピル-3-(ジフルオロメチル)-5-フルオロ-1-メチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、および 2, 6-ジメチル-1H, 5H-[1, 4]ジチイノ[2, 3-c:5, 6-c']ジピロール-1, 3, 5, 7(2H, 6H)-テトロンからなる群から選択される。

【0191】

本発明の別の実施形態において、前記殺菌剤は、カルベンダジム、フルキンコナゾール、イソチアニル、ペンシクロン、ペンフルフェン、プロチオコナゾール、テブコナゾール、およびトリフロキシストロビンからなる群から選択される。

【0192】

さらに別の実施形態において、前記殺菌剤は、N-(5-クロロ-2-イソプロピルベンジル)-N-シクロプロピル-3-(ジフルオロメチル)-5-フルオロ-1-メチル

10

20

30

40

50

ー 1 H - ピラゾール - 4 - カルボキサミドである。

【0193】

本発明による組成物

本発明によれば、前記組成物は、相乗的に有効な量で、a) (i) 植物成長刺激性化合物の産生もしくは活性化に關与する酵素；細菌、真菌もしくは植物の栄養源を分解もしくは改変する酵素；および病原体から植物を保護するタンパク質もしくはペプチドからなる群から選択される少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および (ii) 融合タンパク質をバチルス細胞の外膜に局在化させる標的配列を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞；および b) 本明細書に開示の少なくとも一つの特定の殺菌剤を含む。

10

【0194】

本発明による「相乗的に有効量」は、融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞やそのような殺菌剤単独の場合と比較して、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対して効果が高い、融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞と少なくとも一つの本明細書に記載の特定の殺菌剤の組み合わせの量を表す。本発明による「相乗的に有効量」はまた、融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞や殺菌剤単独の場合と比較して、植物成長促進および／または植物の健康増進に効果が高い、融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞と少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の組み合わせの量を表す。

20

【0195】

本発明は、本明細書で言及された殺菌剤それぞれと組換え外膜産生性バチルス細胞との各および全ての組み合わせを含む。

【0196】

さらなる添加剤

本発明の1態様は、増量剤、溶媒、自発性促進剤、担体、乳化剤、分散剤、凍結保護剤、増粘剤およびアジュバントからなる群から選択される少なくとも一つの補助剤をさらに含む上記の組成物を提供することにある。それらの組成物は、製剤と称される。

【0197】

従って、本発明の1態様において、そのような製剤およびそれから調製される施用形態が、本発明の組成物を含む水薬、滴剤および噴霧液などの作物保護剤および／または農薬として提供される。その施用形態は、さらなる作物保護剤および／または農薬、および／または浸透剤、例としては、例えば菜種油、ヒマワリ油などの植物油、例えば液体パラフィンなどの鉱油、菜種油もしくは大豆油メチルエステルもしくはアルカノールアルコキシレートなどの植物脂肪酸のアルキルエステル類などの活性促進補助剤、および／または例えばアルキルシロキサン類および／または塩などの展着剤、例としては有機もしくは無機アンモニウムもしくはホスホニウム塩、例としては硫酸アンモニウムもしくはリン酸水素ジアンモニウム、および／またはスルホコハク酸ジオクチルもしくはヒドロキシプロピルグアールポリマー類などの保持促進剤および／またはグリセロールなどの保湿剤および／または例えばアンモニウム系、カリウム系もしくはリン系肥料などの肥料を含むことができる。

30

40

【0198】

代表的な製剤の例には、水溶性液 (SL)、乳剤 (EC)、水系乳濁液 (EW)、フロアブル剤 (SC、SE、FS、OD)、水分散性粒剤 (WG)、粒剤 (GR) およびカプセル濃厚剤 (CS) であり、これらおよび他の可能な種類の製剤は、例えば FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications, 2004, ISBN: 9251048576 作製の Crop Life International and in Pesticide Specifications, Manual on Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides, FAO Plant Production and Protection Pa

50

pers-173によって記載されている。製剤は、1以上の本発明の活性化合物以外の農薬活性化合物を含んでいても良い。

【0199】

対象の製剤もしくは施用形態は好ましくは、補助剤、例えば増量剤、溶媒、自発性促進剤、担体、乳化剤、分散剤、凍結防止剤、殺生物剤、増粘剤および／または他の補助剤、例えばアジュバントを含む。この文脈でのアジュバントは、製剤の生理効果を高める成分であり、その成分自体は生理効果を持たない。アジュバントの例は、葉表面への保持、展着、付着または浸透を促進する薬剤である。

【0200】

これらの製剤は、公知の方法で、例えば補助剤、例えば増量剤、溶媒および／または固体担体および／またはさらなる補助剤、例えば界面活性剤と活性化合物を混合することで製造される。製剤は、好適な工場で、または施用前もしくは施用時に調製する。

【0201】

補助剤としての使用に好適なものは、活性化合物の製剤、またはその製剤から調製される施用形態（例えば、噴霧液または種子粉衣剤などの使用可能な作物保護剤）にある種の物理的および／または生物学的特性などの特定の特性を付与する上で好適な物質であることができる。

【0202】

好適な増量剤は、例えば水、極性および非極性有機化学液体、例えば芳香族および非芳香族炭化水素（パラフィン類、アルキルベンゼン類、アルキルナフタレン類、クロロベンゼン類など）、アルコール類および多価アルコール類（適切な場合には、置換、エーテル化および／またはエステル化されていても良い）、ケトン類（アセトン、シクロヘキサノンなど）、エステル類（脂肪およびオイル類など）および（ポリ）エーテル類、置換されていないおよび置換されているアミン類、アミド類、ラクタム類（N-アルキルピロリドン類など）およびラクトン類、スルホン類およびスルホキシド（ジメチルスルホキシドなど）の種類からのものである。

【0203】

使用される増量剤が水である場合、補助溶媒として例えば有機溶媒を用いることも可能である。実質的に、好適な液体溶媒は、トルエン、トルエンまたはアルキルナフタレン類などの芳香族類、クロロベンゼン類、クロロエチレン類または塩化メチレンなどの塩素化芳香族類および塩素化脂肪族炭化水素類、シクロヘキサンまたはパラフィン類などの脂肪族炭化水素類、例えば石油留分、鉱油および植物油、ブタノールまたはグリコールなどのアルコール類およびそれらのエーテル類およびエステル類、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトンまたはシクロヘキサノンなどのケトン類、ジメチルホルムアミドおよびジメチルスルホキシドなどの強極性溶媒、および水である。

【0204】

基本的に、全ての好適な溶媒を用いることが可能である。好適な溶媒は、例えば、芳香族炭化水素、例えばキシレン、トルエンまたはアルキルナフタレン類、例えば塩素化芳香族もしくは脂肪族炭化水素、例えばクロロベンゼン、クロロエチレンまたはメチレンクロライド、例えば脂肪族炭化水素、例えばシクロヘキサン、例えばパラフィン類、石油留分、鉱油および植物油、アルコール類、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノールまたはグリコール、例えばさらには、それらのエーテルおよびエステル、ケトン類、例えばアセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトンまたはシクロヘキサノン、例えば強極性溶媒、例えばジメチルスルホキシド、そしてさらには水である。

【0205】

基本的に、全ての好適な担体を用いることができる。好適な担体には、特には、例えばアンモニウム塩およびカオリン類、クレイ類、タルク、チョーク、石英、アタパルガイト、モンモリロナイトまたは珪藻土などの粉碎天然鉱物、および微粉碎シリカ、アルミナなどの粉碎合成鉱物ならびに天然もしくは合成ケイ酸塩、樹脂、ロウ類および／または固体肥料がある。そのような担体の混合物も同様に用いることができる。粒剤に好適な担体に

10

20

30

40

50

は、次のもの、例えば方解石、大理石、軽石、海泡石、白雲石などの粉碎および分別天然鉱物、そして無機および有機ミールの合成顆粒、そしておが屑、紙、ヤシ殻、トウモロコシ穂軸およびタバコ茎などの有機材料の顆粒などがある。

【0206】

液化ガス増量剤または溶媒も用いることができる。特に好適なものは、標準的な温度でおよび標準的な圧力下で気体である増量剤または担体であり、例としてはエアロゾル噴射剤、例えばハロゲン化炭化水素、さらにはブタン、プロパン、窒素および二酸化炭素がある。

【0207】

イオン特性またはノニオン特性を有する乳化剤および／または発泡剤、分散剤または湿展剤またはこれら界面活性物質の混合物の例には、ポリアクリル酸の塩、リグノスルホン酸の塩、フェノールスルホン酸またはナフタレンスルホン酸の塩、エチレンオキサイドと脂肪アルコールとのまたは脂肪酸とのまたは脂肪アミンとの、置換フェノール（好ましくはアルキルフェノール類またはアリールフェノール類）との重縮合物、スルホコハク酸エステル塩、タウリン誘導体（好ましくは酒石酸アルキル類）、ポリエトキシ化アルコール類もしくはフェノール類のリン酸エステル類、多価アルコールの脂肪酸エステル類、および硫酸エステル類、スルホン酸エステル類およびリン酸エステル類を含む化合物の誘導体、例えばアルキルアリールポリグリコールエーテル類、アルキルスルホン酸エステル類、アルキル硫酸エステル類、アリールスルホン酸エステル類、タンパク質加水分解物、リグノサルファイト廃液およびメチルセルロースがある。界面活性物質の存在は、活性化化合物のうちの一つおよび／または不活性担体のうちの一つが水に不溶であり、施用を水で行う場合に有利である。

【0208】

製剤およびそれから誘導される使用形態中に存在しても良いさらなる補助剤には、無機顔料、例えば酸化鉄、酸化チタン、プルシアンブルー、ならびにアリザリン染料、アゾ染料および金属フタロシアニン染料などの有機染料のような着色剤、ならびに栄養素および鉄、マンガン、ホウ素、銅、コバルト、モリブデンおよび亜鉛の塩などの微量栄養素を用いることができる。

【0209】

低温安定剤、保存剤、酸化防止剤、光安定剤、または化学的および／または物理的安定性を高める他の薬剤などの安定剤も存在することができる。さらに、発泡剤または消泡剤を存在させても良い。

【0210】

さらに、製剤およびそれから誘導される施用形態は、別の補助剤として、カルボキシメチルセルロースなどの粘着剤、粉末、顆粒またはラテックスの形態での天然および合成ポリマー、例えばアラビアガム、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニル、さらにはセファリン類およびレシチン類などの天然リン脂質、ならびに合成リン脂質を含むこともできる。さらなる可能な補助剤には、鉱油および植物油などがある。

【0211】

製剤およびそれから誘導される施用形態には、さらに別の補助剤が存在することが可能である。そのような添加剤の例には、香料、保護コロイド、結合、接着剤、増粘剤、チキソトロピー物質、浸透剤、保持促進剤、安定剤、金属イオン封鎖剤、錯化剤、保湿剤および展着剤などがある。概して、活性化化合物は、製剤に一般に用いられる固体および液体添加剤と組み合わせることができる。

【0212】

好適な保持促進剤には、動的表面張力を低減する全ての物質、例えばスルホコハク酸ジオクチル、または粘弾性を高める全ての物質、例えばヒドロキシプロピルグアールポリマーなどがある。

【0213】

本発明の文脈で好適な浸透剤には、代表的には活性農薬化合物の植物への浸透を高める

10

20

30

40

50

のに用いられる全ての物質などがある。この文脈での浸透剤は、（通常は水系）施用液からおよび／または噴霧コーティングから、植物のクチクルに浸透することができ、それによってクチクルにおける活性化合物の移動性を高めることができるものと定義される。この特性は、文献（Baur et al., 1997, Pesticide Science 51, 131-152）に記載の方法を用いて確認することができる。例としては、ココナッツ脂肪エトキシレート（10）またはイソトリデシルエトキシレート（12）などのアルコールアルコキシレート類、脂肪酸エステル類、例えば菜種油もしくは大豆油メチルエステル、脂肪アミンアルコキシレート類、例えば獣脂アミンエトキシレート（15）、またはアンモニウムおよび／またはホスホニウム塩、例えば硫酸アンモニウムまたはリン酸水素ジアンモニウムなどがある。

10

【0214】

その製剤は好ましくは、製剤の重量に基づいて0.0001重量%から98重量%の活性化合物、または特に好ましくは0.01重量%から95重量%の活性化合物、より好ましくは0.5重量%から90重量%の活性化合物を含む。活性化合物の含有量は、組換え外膜産生性バチルス細胞ならびに少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の合計として定義される。

【0215】

製剤から調製される施用形態（作物保護剤）の活性化合物含有量は、広い範囲内で変動させることができる。その施用形態の活性化合物濃度は代表的には、施用形態の重量に基づいて0.0001重量%から95重量%の活性化合物、好ましくは0.0001重量%から1重量%とすることができる。施用は、その施用形態に適合させた一般的な方法で行う。

20

【0216】

さらに、本発明の1態様において、空間的に分離された配置で、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤を相乗的に有効な量で含むパーツのキットが提供される。

【0217】

本発明のさらに別の実施形態において、上記パーツのキットはさらに、少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤を含む。その殺菌剤および／または殺虫剤は、パーツのキットの組換え外膜産生性バチルス細胞コンポーネントに、もしくは空間的に分離されたパーツのキットの殺菌剤コンポーネントに、またはこれらコンポーネントの両方に存在することができる。好ましくは、殺菌剤および殺虫剤は、組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員に基づく生物農薬コンポーネントに存在する。

30

【0218】

さらに、本発明によるパーツのキットはさらに、下記で言及される増量剤、溶媒、自発性促進剤、担体、乳化剤、分散剤、凍結保護剤、増粘剤およびアジュバントからなる群から選択される少なくとも一つの補助剤を含むことができる。この少なくとも一つの補助剤は、パーツのキットの組換え外膜産生性バチルス細胞コンポーネントに、もしくは空間的に分離されたパーツのキットの殺菌剤コンポーネントに、またはこれらコンポーネントの両方に存在することができる。

40

【0219】

本発明の別の態様において、上記の組成物は、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体によって生じる植物および植物部分の全体的な損傷ならびに収穫された果実もしくは野菜の損失を減らすのに用いられる。

【0220】

さらに、本発明の別の態様において、上記の組成物は全体的な植物の健康を増進させる。

【0221】

「植物の健康」という用語は一般に、病害生物の防除に関係ない植物の各種改善を含む

50

ものである。例えば、挙げることができる有利な性質には、発芽、作物収量、タンパク質含有量、オイル含有量、デンプン含有量、根系の発達増加、根の成長増進、根の大きさ維持の向上、根の有効性の向上、ストレス耐性の向上（例えば、干魃、熱、塩、UV、水、低温）、エチレン低減（産生減少および／または受容の阻害）、分げつの増加、植物高さの増加、葉身の拡大、枯れた根出葉の減少、分げつ枝の強化、葉の緑色強化、色素含有量、光合成活性、必要投入量の低下（肥料または水など）、必要な種子の減少、分げつの生産性向上、開花の早期化、結実の早期化、植物倒伏（*verse*）（倒伏）の減少、苗条成長の増加、植物活力の強化、立った植物の増加ならびに早期およびより良好な発芽などの改善された作物特性がある。

【0222】

本発明による使用に関しては、改善された植物の健康は好ましくは、作物収量、根系の発達増加（根の成長増進）、根の大きさ維持の向上、根の有効性の向上、分げつの増加、植物高さの増加、葉身の拡大、枯れた根出葉の減少、分げつ枝の強化、葉の緑色強化、光合成活性、分げつの生産性向上、植物活力の強化および立った植物の増加などの改善された植物特性を指す。

【0223】

本発明に関して、改善された植物の健康は、好ましくは特には、作物収量、根系の発達増加、根の成長増進、根の大きさ維持の向上、根の有効性の向上、分げつの増加および植物高さの増加から選択される改善された植物の性質を指す。

【0224】

本明細書で定義の植物の健康に対する本発明による組成物の効果は、前記植物のある部分を本発明による組成物によって処理し、当該植物の別の部分を本発明による組成物で処理せずに、同じ環境条件下で成長する植物を比較することで確認することができる。代わりに、前記の他の部分は、全く処理しないか、ブラシーボ（すなわち、全ての有効成分を含まない施用（すなわち、本明細書に記載の組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員に基づく生物農薬を含まず、本明細書に記載の殺菌剤を含まない）、または本明細書に記載の組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員に基づく生物農薬を含まない施用、または本明細書に記載の殺菌剤を含まない施用などの本発明による組成物を用いない施用で処理される。

【0225】

本発明による組成物は、任意の望ましい方法で、例えば、種子粉衣、土壌灌注の形態で、および／または、畝間に直接的に、および／または茎葉散布として施用することができる。そして、発芽前、発芽後またはその両方のいずれかで施用することができる。すなわち、当該組成物は、種子、植物もしくは収穫された果実および野菜に施用することができるか、植物がそこで生育している土壌もしくは生育させるのが望ましい土壌（植物の成長場所）に施用することができる。

【0226】

植物および植物部分の全体的な損傷を低減することで、植物の健康が増進され、および／または植物の活力および収量の増加が生じる。

【0227】

好ましくは、本発明による組成物は、従来の植物もしくはトランスジェニック植物またはそれらの種子を処理するのに使用される。

【0228】

本発明はまた、融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤を含む上記の組成物のいずれかをを用いる植物成長の刺激方法に関する。その植物成長刺激方法は、植物、植物部分、植物周囲の場所または植物が植えられる場所（例えば、土壌または他の成長培地）に、相乗的に有効な量で（i）少なくとも一つの植物成長刺激タンパク質もしくはペプチド；および（ii）標的配列、外膜タンパク質、または外膜タンパク質断片を含む融合タンパク質を発現する組換え外膜産生性バチルス細胞、および少なくとも一つの本明細書に開示のさらなる特定の殺菌

10

20

30

40

50

剤を含む組成物を施用することを含む。

【0229】

本発明の別の態様において、相乗的に有効な量で組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤を同時にまたは順次で施用する段階を含む、植物および植物部分の全体的な損傷ならびに昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体によって生じる収穫された果実もしくは野菜の損失を減らす方法が提供される。

【0230】

本発明の別の実施形態において、前記組成物は、組換え外膜産生性バチルス細胞および本明細書に開示の特定の殺菌剤に加えて、少なくとも一つの殺虫剤および／または少なくとも一つの殺菌剤を含む。1実施形態において、前記少なくとも一つの殺虫剤は合成殺虫剤である。

10

【0231】

本発明の方法は、次の施用方法を含む。すなわち、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの前記で言及した本明細書に開示の特定の殺菌剤の両方を、農業上許容される貯蔵寿命を有する単一の安定な組成物（いわゆる「単一製剤」）に製剤することができるか、使用の前または使用時に組み合わせる（いわゆる「組み合わせ製剤」）。

【0232】

別段の断りがない限り、「組み合わせ」という表現は、単一製剤中の、単一の「レディーミックス」形態中の、単一製剤で構成されている組み合わせ噴霧混合物（例えば、「タンクミックス」）中の、特には順次で（すなわち、適度に短い期間（例えば、数時間または数日間、例えば2時間から7日間）の範囲内で順次に）施用される場合の単一の有効成分の組合せ使用における、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤の各種組み合わせを意味する。本発明による組成物を施用する順序は、本発明の作用に関してはあまり重要ではない。従って、「組み合わせ」という用語は、例えば、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤を同時にまたは連続して植物、その周囲、生息環境または貯蔵空間に施用した後における、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または殺虫剤の処理される植物の表面上もしくは内部または処理される植物の周囲、生息環境または貯蔵空間における存在も包含するものである。

20

30

【0233】

前記組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤を順次で利用または使用する場合、次の方法、すなわち第1に前記少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に前記少なくとも一つの別の殺菌剤および／または前記少なくとも一つの殺虫剤を植物または植物部分に施用し、第2に組換え外膜産生性バチルス細胞を同じ植物または植物部分に施用する方法に従って植物もしくは植物部分（種子および種子から発芽する植物を含む）、収穫された果実および野菜を処理することが好ましい。この施用方式によって、収穫時の植物表面での殺虫剤／殺菌剤の残留量が可能な限り低くなる。（作物）成長サイクル内での第1の施用と第2の施用の間の時間間隔は変動することができ、達成されるべき効果によって決まる。例えば、第1の施用は、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体による植物または植物部分への侵入を防止し（これは特に、種子処理の場合である。）、または昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体による侵入と戦う（これは特に、植物および植物部分の処理の場合である。）ために行い、第2の施用は昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体による侵入を予防または抑制するため、および／または植物の成長を促進するために行う。この文脈での抑制は、前記組換え外膜産生性バチルス細胞が病害生物や植物病原性真菌を完全に死滅させることができるのではなく侵入を許容されるレベルに維持できることを意味する。

40

50

【0234】

本発明は、複数回の施用によって、本発明の組成物の殺生物、阻害、予防および／または忌避活性を高める方法も提供する。一部の他の実施形態において、本発明の組成物は、いずれか所望の発達段階中、またはいずれか所定の防除圧（*pest pressure*）下に、約1時間、約5時間、約10時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約1週間、約10日、約2週間、約3週間、約1ヶ月またはそれ以上の間隔で2回、植物および／または植物部分に施用される。さらに一部の実施形態において、本発明の組成物は、いずれか所望の発達段階中、またはいずれか所定の防除圧（*pest pressure*）下に、約1時間、約5時間、約10時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約1週間、約10日、約2週間、約3週間、約1ヶ月またはそれ以上の間隔で、2回より多く、例えば3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上、植物および／または植物部分に施用される。各施用間の間隔は、所望に応じて変えることができる。当業者であれば、植物種、植物病害生物の種類、および他の要素に応じて、施用時期および間隔の長さを決めることができる。

【0235】

前記の段階に従うことで、処理された植物、植物部分、ならびに収穫された果実および野菜表面での少なくとも一つの殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤の残留は非常に低レベルであることができる。

【0236】

別段の言及がなければ、植物または植物部分（種子および種子から発芽した植物を含む）、収穫された果実および野菜の本発明による組成物による処理は、一般的な処理方法、例えば浸漬、散布、噴霧、灌漑、気化、散粉、煙霧、ばらまき、泡状化、塗布、拡散（*spreading-on*）、灌水（灌注（*drenching*））、点滴灌漑などによって、直接的に行うか、または、それらの周囲、生息環境もしくは貯蔵空間に作用させることにより行う。さらに、組換え外膜産生性バチルス細胞、少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤、および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤を単一製剤もしくは組み合わせ製剤として超微量散布法によって施用することも可能であり、または本発明による組成物を組成物として、または単一製剤として土壤中（畝間）に注入することが可能である。

【0237】

「処理対象の植物」という用語は、植物の全ての部分（これは、その根系を包含する）、および、それぞれ、処理対象植物の茎もしくは幹の周囲の少なくとも10cm、20cm、30cmの半径内にある材料物質（例えば、土壌または栄養媒体）または処理対象のその植物の根系の周囲の少なくとも10cm、20cm、30cmの半径内にある材料物質を包含する。

【0238】

適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤存在下に、少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤と組み合わせ使用もしくは利用される組換え外膜産生性バチルス細胞の量は、最終製剤ならびに処理される植物、植物部分、種子、収穫された果実および野菜の大きさもしくは種類によって決まる。通常、本発明に従って利用もしくは使用される組換え外膜産生性バチルス細胞は、その単一製剤または少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤との組み合わせ製剤の約1%から約80重量%、好ましくは約1%から約60重量%、より好ましくは約10%から約50重量%で存在する。

【0239】

適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤存在下に、組換え外膜産生性バチルス細胞と組み合わせ使用もしくは利用される前記少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の量は、最終製剤ならびに処理される植物、植物部分、種子、収穫された果実および野菜の大きさもしくは種類によって決まる。通常、本発明に従って利用もしくは使用される前記特定の殺菌剤は、その単一製剤または組換え外膜

産生性バチルス細胞および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤との組み合わせ製剤の約 0.1 % から約 80 重量%、好ましくは 1 % から約 60 重量%、より好ましくは約 10 % から約 50 重量% で存在する。

【0240】

組換え外膜産生性バチルス細胞の施用は、茎葉噴霧として、土壌処理として、および／または種子処理／粉衣として行うことができる。茎葉処理として使用される場合、1 実施形態において、エーカー当たり全ブロス約 1 / 16 から約 5 ガロンを施用する。土壌処理として使用される場合、1 実施形態において、エーカー当たり全ブロス約 1 から約 5 ガロンを施用する。種子処理に用いる場合、エーカー当たり全ブロス約 1 / 32 から約 1 / 4 ガロンを施用する。種子処理の場合、最終使用製剤は、少なくともグラム当たり 1×10^4 、少なくとも 1×10^5 、少なくとも 1×10^6 、 1×10^7 、少なくとも 1×10^8 、少なくとも 1×10^9 、少なくとも 1×10^{10} コロニー形成単位を含む。

10

【0241】

組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および存在する場合には好ましくは別の殺菌剤および／または殺虫剤も、相乗的重量比で使用または利用される。当業者であれば、通常の方法によって本発明における相乗的重量比を見出すことができる。当業者には、これらの比が、組み合わせ製剤内の比率ならびに両方の成分を処理対象植物に単一製剤として施用した場合の本明細書に記載の組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の計算上の比率を指すことは明らかである。単一製剤中の組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの特定の殺菌剤のそれぞれの体積および量は当業者には既知であることから、当業者は簡単な数学によってこの比を計算することができる。

20

【0242】

その比は、本発明による組み合わせの成分を植物もしくは植物部分に施用した時点での少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の量および本発明による組み合わせの成分を植物もしくは植物部分に施用する少し前（例えば、48 時間、24 時間、12 時間、6 時間、2 時間、1 時間）またはその時点での組換え外膜産生性バチルス細胞の量に基づいて計算することができる。

【0243】

植物もしくは植物部分への組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の施用は、両方の成分が施用後に植物表面もしくは植物体内に存在する限り、同時にまたは異なった時点で行うことができる。組換え外膜産生性バチルス細胞および本明細書に開示の特定の殺菌剤を異なる時点で施用し、その本明細書に開示の特定の殺菌剤を組換え外膜産生性バチルス細胞より前に施用する場合、当業者は、組換え外膜産生性バチルス細胞施用の時点またはその時点の少し前に当業界で公知の化学分析によって、植物表面／植物体内における殺菌剤の濃度を求めることができる。逆も同様に、組換え外膜産生性バチルス細胞を最初に植物に施用する場合、その組換え外膜産生性バチルス細胞の濃度は、殺菌剤施用の時点またはその時点より少し前に、やはり当業界で公知である試験を用いて求めることができる。

30

【0244】

特に、1 実施形態において、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の相乗的重量比は、1 : 1000 から 1000 : 1 の範囲、好ましくは 1 : 500 から 500 : 1 の範囲、より好ましくは 1 : 300 から 500 : 1 の範囲にある。特別に好ましい比率は、20 : 1 から 1 : 20、例えば 10 : 1、5 : 1 または 2 : 1 である。留意すべき点として、これらの比の範囲は、組換えバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 科構成員に基づく生物農薬（少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤または少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の調製物と組み合わせられるもの）を指す。例えば、比率 100 : 1 は、組換え外膜産生性バチルスに基づく生物農薬の孢子調製物 100 重量部および本明細書に開示の特定の殺菌剤 1 重量部を組み合わせることを意味する（単一製剤として、組み合わせ製剤として、ま

40

50

たは植物に別個に施用して植物上でその組み合わせを形成すること)。この実施形態の1態様において、組換え外膜産生性バチルス細胞の孢子調製物は、少なくとも約 1×10^4 cfu/g、少なくとも約 1×10^5 cfu/g、少なくとも約 1×10^6 cfu/g、少なくとも約 1×10^7 cfu/g、少なくとも約 1×10^8 cfu/g、少なくとも約 1×10^9 cfu/g、少なくとも約 1×10^{10} cfu/gを含む乾燥孢子調製物である。

【0245】

別の実施形態において、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の相乗的重量比は、1：100から20，000：1の範囲、好ましくは1：50から10，000：1の範囲、またはさらには1：50から1000：1の範囲である。

10

【0246】

本発明の1実施形態において、散布後の組換え外膜産生性バチルス細胞の濃度は、少なくとも50 g/ha、例えば50から7500 g/ha、50から2500 g/ha、50から1500 g/ha；少なくとも250 g/ha（ヘクタール）、少なくとも500 g/haまたは少なくとも800 g/haである。

【0247】

本発明に従って利用もしくは使用される組成物の施用量は、変動し得るものである。当業者は、通常の実験によって、適切な施用量を見出すことができる。

【0248】

20

本発明の別の態様において、上記の組成物で処理された種子が提供される。

【0249】

植物の種子を処理することによる昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体の防除は、かなり以前から知られており、常に改良すべきテーマである。そうではあっても、種子の処理は、常に満足な形で解決されとは限らない一連の問題を伴う。従って、植物の貯蔵中、播種後または発芽後における作物保護組成物の追加使用の必要性を取り除く、または少なくとも大幅に減らす、種子および発芽植物の保護方法を開発することが望ましい。さらに、種子および発芽植物に対して昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体による攻撃から可能な最も良好な保護を提供するが、植物自体に対する使用有効成分による損傷を起こさないような形で使用される有効成分の量を至適化することが望ましい。特に、種子処理の方法の場合も、病害生物抵抗性もしくは病害生物耐性のトランスジェニック植物の固有の殺虫特性および／または殺線虫特性を考慮して、作物保護組成物の使用を最小限としながら種子および発芽植物の至適な保護を達成すべきである。

30

【0250】

従って本発明は特に、相乗的に有効量で、上記で定義の組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤によって種子を処理することによって、種子および発芽植物を病害生物による攻撃から保護する方法に関するものでもある。種子および発芽植物を病害生物による攻撃から保護する本発明の方法は、種子を組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤、および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤により1回の操作で同時に処理する方法を包含する。それは、種子を、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤によって異なる時点で処理する方法も包含する。

40

【0251】

本発明は同様に、種子および結果的に得られた植物を昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体に対して保護する目的で種子を処理するための本発明の組成物の使用に関する。

【0252】

本発明はさらに、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開

50

示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤で同時に処理された種子に関する。本発明はさらに、組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤で異なった時点で処理された種子に関する。組換え外膜産生性バチルス細胞および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤および適宜に少なくとも一つの別の殺菌剤および／または少なくとも一つの殺虫剤によって異なった時点で処理された種子の場合、本発明の組成物中の個々の有効成分は、種子の異なった層に存在する可能性がある。

【0253】

さらに、本発明は、本発明の組成物による処理後に、フィルムコーティング処理を受けて、種子の埃による摩耗が防止された種子に関する。

10

【0254】

本発明の利点の一つは、本発明の組成物の特定の全身特性のため、これらの組成物による種子の処理によって、種子自体だけでなく種子が発芽した後の種子から発生した植物にも、昆虫、ダニ、線虫および／または植物病原体からの保護が提供されるという点である。このようにして、播種時やその少し後に作物を直接処理する必要がなくなる可能性がある。

【0255】

別の利点は、本発明の組成物による種子の処理によって、処理された種子の発芽および発生を促進できるということに認められる。

20

【0256】

本発明の組成物を特にトランスジェニック種子にも用いることが可能であることも、有利であると考えられる。

【0257】

本発明の組成物をシグナル伝達技術の薬剤と併用し、その結果として、例えば、根粒菌、菌根菌および／または内部寄生菌などの共生生物によるコロニー形成を改善、例えば促進し、および／または窒素固定を至適化することができることも挙げられる。

【0258】

本発明の組成物は、農業において、温室内で、森林でまたは園芸において使用される全ての植物品種の種子を保護するのに適している。詳細には、対象となる種子は、禾穀類（例えば、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバクおよびアワ）、トウモロコシ、ワタ、ダイズ、イネ、ジャガイモ、ヒマワリ、コーヒー、タバコ、キャノーラ、アブラナ、ビート（例えば、テンサイ、および、飼料用ビート）、落花生、野菜（例えば、トマト、キュウリ、エンドウマメ、タマネギ、アブラナ科およびレタス）、果樹、芝生および観賞植物の種子である。禾穀類（例えば、コムギ、オオムギ、ライムギおよびエンバク）、トウモロコシ、大豆、棉、キャノーラ、アブラナおよびイネの種子を処理することが、特に重要である。

30

【0259】

上記ですでに言及したように、本発明の組成物でトランスジェニック種子を処理することが、特に重要である。ここで対象となる種子は、特には殺虫特性および／または殺線虫特性を有するポリペプチドの発現を制御する少なくとも1種類の異種遺伝子を含む植物の種子である。トランスジェニック種子でのこれら異種遺伝子は、例えば、バシルス（*Bacillus*）種、リゾビウム（*Rhizobium*）種、シュードモナス（*Pseudomonas*）種、セラチア（*Serratia*）種、トリコデルマ（*Trichoderma*）種、クラビバクテル（*Clavibacter*）種、グロムス（*Glomus*）種またはグリオクラジウム（*Gliocladium*）種の微生物由来であることができる。本発明は、バシルス（*Bacillus*）種由来の少なくとも1種類の異種遺伝子を含むトランスジェニック種子の処理に特に好適である。特に好ましくは、対象となる異種遺伝子は、バシルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）に由来するものである。

40

50

【0260】

本発明に関連して、本発明の組成物は、種子に対して、単独で施用するか、好適な製剤で施用する。好ましくは、種子は、処理の途中で損傷が引き起こらないように安定である条件で処理する。一般に、種子は、収穫と播種の間の任意の時点で処理することができる。代表的には、植物から分離されていて、穂軸、殻、茎、皮、被毛または髓が除去されている種子を用いる。そこで、例えば、収穫され、不純物が取り除かれ、含水量が15重量%未満となるまで乾燥された種子を使用することができる。あるいは、乾燥後に例えば水で処理され、その後再度乾燥された種子を使用することもできる。

【0261】

種子を処理する場合には、概して、種子の発芽が悪影響を受けないように、および／または種子から生じた植物が損傷を受けないように、種子に施用する本発明の組成物の量および／または他の添加剤の量が選択されるようにする必要がある。このことは、特に、特定の施用量で薬害作用を示し得る有効成分の場合に当てはまる。

【0262】

本発明の組成物は、直接施用することができる。すなわち、さらに別の成分を含ませることなく、そして希釈することなく施用することが可能である。一般に、その組成物は、好適な製剤の形態で種子に施用するのが好ましい。種子処理のための好適な製剤および方法は、当業者には公知であり、例えば、次の文献：米国特許第4,272,417A号、同4,245,432A号、同4,808,430A号、同5,876,739A号、米国特許公開2003/0176428A1、WO2002/080675A1、WO2002/028186A2に記載されている。

【0263】

本発明に従って使用することが可能な組み合わせは、一般的な種子粉衣製剤、例えば、液剤、乳濁液、懸濁液、粉剤、泡剤、スラリーその他の種子用のコーティング組成物、および、さらに、ULV製剤などに変換することができる。

【0264】

これらの製剤は、既知の方法で、その組成物を、一般的な補助剤、例えば、一般的な増量剤、さらには、溶媒または希釈剤、着色剤、湿展剤、分散剤、乳化剤、消泡剤、防腐剤、二次増粘剤、粘着剤、ジベレリン類などと混合させ、さらには水と混合させることによって調製される。

【0265】

本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤中に存在させることができる着色剤には、そのような目的に関して一般的な全ての着色剤などがある。この文脈では、水中での溶解性が乏しい顔料だけでなく、水溶性染料も使用することができる。例としては、「Rhodamin B」、「C. I. Pigment Red 112」、および、「C. I. Solvent Red 1」の名称で知られている着色剤などがある。

【0266】

本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤中に存在させることができる湿展剤には、湿潤を促進し、農薬成分の製剤において一般的な慣習的な全ての物質が包含される。好ましくは、アルキルナフタレンスルホネート類、例えば、ジイソプロピルナフタレンスルホネートまたはジイソブチルナフタレンスルホネートなどを使用することができる。

【0267】

本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤中に存在させることができる分散剤および／または乳化剤には、農薬活性成分の製剤において一般的な非イオン性、アニオン性およびカチオン性の全ての分散剤などがある。好ましくは、非イオン性もしくはアニオン性の分散剤または非イオン性もしくはアニオン性の分散剤の混合物を使用することができる。好適な非イオン性分散剤は特に、エチレンオキシド／プロピレンオキシドブロックポリマー類、アルキルフェノールポリグリコールエーテル類およびトリスチリルフェノールポリグリコールエーテル類、ならびに、それらのリン酸化誘導体または硫酸化誘導体

である。好適なアニオン性分散剤は特には、リグノスルホネート類、ポリアクリル酸塩類およびアリアルスルホネート／ホルムアルデヒド縮合物である。

【0268】

本発明に従って使用される種子粉衣製剤中に存在させることができる消泡剤には、農薬活性成分の製剤において一般的な全ての泡抑制剤などがある。好ましくは、シリコーン系消泡剤およびステアリン酸マグネシウムを使用する。

【0269】

本発明に従って使用される種子粉衣製剤中に存在させることができる防腐剤には、農芸化学組成物中でそのような目的のために使用することが可能な全ての物質などがある。例として、ジクロロフェンおよびベンジルアルコールヘミホルマールなどがある。

10

【0270】

本発明に従って使用される種子粉衣製剤中に存在させることができる二次増粘剤には、農芸化学組成物中でそのような目的のために使用することが可能な全ての物質などがある。好ましいものと想到されるものには、セルロース誘導体、アクリル酸誘導体、キサンタン、変性クレーおよび高分散シリカなどがある。

【0271】

本発明に従って使用される種子粉衣製剤中に存在させることができる粘着剤には、種子粉衣製品中で使用可能な全ての一般的な結合剤などがある。ポリビニルピロリドン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコールおよびチロースを好ましいものとして挙げることができる。

20

【0272】

本発明に従って使用される種子粉衣製剤中に存在させることができるジベレリン類には、好ましくは、ジベレリンA1、ジベレリンA3（＝ジベレリン酸）、ジベレリンA4およびジベレリンA7などがあり、ジベレリン酸を使用するのが特に好ましい。ジベレリン類は公知である（R. Wegler "Chemie der Pflanzenschutz- und Schadlingsbekämpfungsmittel", Vol. 2, Springer Verlag, 1970, pp. 401-412 参照）。

【0273】

本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤は、非常に多様な種類の種子を処理するために、直接使用することができるか、予め水で希釈した後に使用することができる。従って、濃厚物または水による希釈によってそれから得ることができる製剤を用いて、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバクおよびライコムギなどの穀物の種子、さらにはトウモロコシ、イネ、アブラナ、エンドウマメ、マメ類、ワタ、ヒマワリおよびビートの種子、あるいは非常に多様な野菜の種子を粉衣することができる。本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤またはそれらの希釈された調製物は、トランスジェニック植物の種子を粉衣するのに使用することもできる。その場合、発現により形成された物質との相互作用において、さらなる相乗効果が生じることがあり得る。

30

【0274】

本発明に従って使用することが可能な種子粉衣製剤または水を添加することによってその種子粉衣製剤から調製される調製物を用いて種子を処理する場合に、好適な混合装置には、種子粉衣するために一般的に使用することができる全ての装置が包含される。より詳細には、種子粉衣を実行する際の手順は、種子を混合機の中に入れること、特定の所望量の種子粉衣製剤を、そのまま添加するかまたは予め水で希釈した後に添加すること、および、種子表面でのその製剤の分布が均一となるまで混合を実施することを含む。その後乾燥操作を行っても良い。

40

【0275】

本発明に従って使用可能な種子粉衣製剤の施用量は、比較的広い範囲内で変動し得る。それは、製剤中の組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員に基づく生物農薬および少なくとも一つの本明細書に開示の特定の殺菌剤の特定の量に

50

よって、そして種子によって決まる。当該組成物の場合の施用量は、通常は種子 1 k g 当たり 0. 0 0 1 から 5 0 g であり、好ましくは種子 1 k g 当たり 0. 0 1 から 1 5 g にある。

【0276】

さらに、本発明による組成物は好ましくは強力な殺細菌活性を有し、作物保護および材料保護において真菌および細菌などの望ましくない微生物を防除するのに用いることができる。

【0277】

本発明はさらに、本発明の組成物を植物病原性真菌、植物病原性細菌および／またはそれらの生息場所に施用することを特徴とする望ましくない微生物の防除方法に関するものである。

【0278】

作物保護において、植物病原性真菌の防除のために殺菌剤を用いることができる。それらは広いスペクトラムの植物病原性真菌、例えば特にネコブカビ類、ペロノスポロマイセテス (*Peronosporomycetes*) 類 (同義語: 卵菌類)、ツボカビ類、接合菌類、子囊菌類、担子菌類および不完全菌類 (同義語、フンギ・インペルフェクチ (*Fungi imperfecti*)) の構成員である土壌病原体に対する顕著な効力を特徴とする。一部の殺菌剤は全身活性であり、茎葉処理剤として、種子粉衣剤として、または土壌処理殺菌剤として作物保護に使用することができる。さらに、それらは、特に木材または植物の根に侵入する真菌と戦う上で好適である。

【0279】

殺細菌剤は、作物保護でシュードモナス科 (*Pseudomonadaceae*)、リゾビウム科 (*Rhizobiaceae*)、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、コリネバクテリウム科 (*Corynebacteriaceae*) およびストレプトマイセス科 (*Streptomycetaceae*) の防除に用いることができる。

【0280】

本発明に従って処置可能な真菌疾患の例としては、下記のものなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【0281】

ウドンコ病の病原体、例えばブルメリア・グラミニス (*Blumeria graminis*) などのブルメリア (*Blumeria*) 種; ポドスファエラ・ロイコトリカ (*Podospheera leucotricha*) などのポドスファエラ (*Podospheera*) 種; スファエロセカ・フリギネア (*Sphaerotheca fuliginea*) などのスファエロセカ (*Sphaerotheca*) 種; ウンシヌラ・ネケータ (*Uncinula necator*) などのウンシヌラ (*Uncinula*) 種によって引き起こされる病害;

さび病病原体、例えばギムノスポランギウム・サビナエ (*Gymnosporangium sabinae*) などのギムノスポランギウム (*Gymnosporangium*) 種; ヘミレイア・バスタトリックス (*Hemileia vastatrix*) などのヘミレイア (*Hemileia*) 種; ファコプソラ・パチライジ (*Phakopsora pachyrhizi*) およびファコプソラ・マイボミアエ (*Phakopsora meibomiaae*) などのファコプソラ (*Phakopsora*) 種; プクシニア・レコンディテ (*Puccinia recondite*)、*P. トリチシナ* (*P. trititcina*)、*P. グラミニス* (*P. graminis*) または *P. ストリフォルニス* (*P. striiformis*) または *P. ホルデイ* (*P. hordei*) などのプクシニア (*Puccinia*) 種; ウロミセス・アッペンディキュラタス (*Uromyces appendiculatus*) などのウロミセス (*Uromyces*) 種によって引き起こされる病害;

卵菌類 (*Oomycetes*) 群の病原体、例えばアルブゴ・カンジダ (*Albugo*

10

20

30

40

50

candida) などのアルブゴ (*Albugo*) 種; プレミア・ラクチュカエ (*Bremia lactucae*) などのプレミア (*Bremia*) 種; ペロノスポラ・ピシ (*Peronospora pisi*)、*P. parasitica*) または *P. brassicae*) などのペロノスポラ (*Peronospora*) 種; フィトフソラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) などのフィトフソラ (*Phytophthora*) 種; プラスモパラ・ビチコラ (*Plasmopara viticola*) などのプラスモパラ (*Plasmopara*) 種; シュードペロノスポラ・フムリ (*Pseudoperonospora humuli*) または シュードペロノスポラ・キューベンス (*Pseudoperonospora cubensis*) などのシュードペロノスポラ (*Pseudoperonospora*) 種; ピチウム・ウルティマム (*Pythium ultimum*) などのピチウム (*Pythium*) 種によって引き起こされる病害;

例えばアルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*) などのアルテルナリア (*Altmaria*) 種; セルコスボラ・ベチコラ (*Cercospora beticola*) などのセルコスボラ (*Cercospora*) 種; クラジオスポリウム・キュキュメリナム (*Cladospodium cucumerinum*) などのクラジオスポリウム (*Cladospodium*) 種; コクリオボラス・サティブス (*Cochliobolus sativus*) (分生子型: ドレクスレラ (*Drechslera*))、同義語: ヘルミントスポリウム (*Helminthosporium*))、コクリオボラス・ミヨビーナス (*Cochliobolus miyobeanus*) などのコクリオボラス (*Cochliobolus*) 種; コレトトリカム・リンデムサニウム (*Colletotrichum lindemuthianum*) などのコレトトリカム (*Colletotrichum*) 種; シクロコニウム・オレアギナム (*Cycloconium oleaginum*) などのシクロコニウム (*Cycloconium*) 種; ディアポルテ・シトリ (*Diaporthe citri*) などのディアポルテ (*Diaporthe*) 種; エルシノエ・フォーセッティイ (*Elsinoe fawcettii*) などのエルシノエ (*Elsinoe*) 種; グレオスポリウム・ラエティカラー (*Gloeosporium laeticolor*) などのグレオスポリウム種 (*Gloeosporium*); グロメレラ・シンギュラータ (*Glomerella cingulata*) などのグロメレラ (*Glomerella*) 種; ギニャルディア・ビドウェリ (*Guignardia bidwellii*) などのギニャルディア (*Guignardia*) 種; レプトスファエリア・マキュランス (*Leptosphaeria maculans*)、レプトスファエリア・ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) などのレプトスファエリア (*Leptosphaeria*) 種; マグナポルテ・グリージー (*Magnaporthe grisea*) などのマグナポルテ (*Magnaporthe*) 種; ミクロドキウム・ニバレ (*Microdochium nivale*) などのミクロドキウム (*Microdochium*) 種; マイコスファエレラ・グラミニコラ (*Mycosphaerella graminicola*)、*M. arachidicola*) および *M. fijiensis*) などのマイコスファエレラ (*Mycosphaerella*) 種; フェオスファエリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*) などのフェオスファエリア (*Phaeosphaeria*) 種; ピレノフォラ・テレス (*Pyrenophora teres*)、ピレノフォラ・トリチシ・レペンチス (*Pyrenophora tritici repentis*) などのピレノフォラ (*Pyrenophora*) 種; ラムラリア・コロシグニ (*Ramularia collo-cygni*)、ラムラリア・アレオラ (*Ramularia areola*) などのラムラリア (*Ramularia*) 種; リンコスポリウム・セカリス (*Rhynchosporium secalis*) などのリンコスポリウム (*Rhynchosporium*) 種; セプトリア・アピイ (*Septoria apii*)、セプトリア・リコベルシイ (*Septoria lycopersii*) などのセプトリア (*Septoria*) 種; チフラ・インカルナータ (*T*

10

20

30

40

50

typhula incarnata) などのチフラ (*Typhula*) 種; ベンチュリア・イナエキュアリス (*Venturia inaequalis*) などのベンチュリア (*Venturia*) 種によって引き起こされる葉枯病 (leaf blotch diseases) および葉萎凋病 (leaf wilt diseases);

例えば、コルチシウム・グラミネアラム (*Corticium graminearum*) などのコルチシウム (*Corticium*) 種; フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) などのフサリウム (*Fusarium*) 種; ゲウマノミセス・グラミニス (*Gaeumannomyces graminis*) などのゲウマノミセス (*Gaeumannomyces*) 種; リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*) などのリゾクトニア (*Rhizoctonia*) 種; サロクラジウム・オリザエ (*Sarocladium oryzae*) などによって引き起こされるサロクラジウム (*Sarocladium*) 病; サロクラジウム・オリザエ (*Sarocladium oryzae*) などによって引き起こされるサロクラジウム (*Sarocladium*) 病; タペシア・アキュフォルミス (*Tapesia acuformis*) などのタペシア (*Tapesia*) 種; チエラビオプシス・バシコラ (*Thielaviopsis basicola*) などのチエラビオプシス (*Thielaviopsis*) 種によって引き起こされる根および茎の病害;

例えばアルテルナリア属 (*Alternaria* spp.) などのアルテルナリア (*Alternaria*) 種; アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 種; クラドスポリウム・クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*) などのクラドスポリウム (*Cladosporium*) 種; クラビセプス・パープレア (*Claviceps purpurea*) などのクラビセプス (*Claviceps*) 種; フサリウム・クルモラム (*Fusarium culmorum*) などのフサリウム (*Fusarium*) 種; ギッベレラ・ゼアエ (*Gibberella zeae*) などのギッベレラ (*Gibberella*) 種; モノグラフェラ・ニバリス (*Monographella nivalis*) などのモノグラフェラ (*Monographella*) 種; セプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*) などのセプトリア (*Septoria*) 種によって引き起こされる穂および円錐花序の病害 (トウモロコシ穂軸など);

黒穂菌 (smut fungi)、例えばスファセロセカ・ライリアナ (*Sphacelotheca reiliana*) などのスファセロセカ (*Sphacelotheca*) 種; ティレチア・カリエス (*Tilletia caries*)、*T. controversa*) などのティレチア (*Tilletia*) 種; ウロシスティス・オキュラータ (*Urocystis occulta*) などのウロシスティス (*Urocystis*) 種; ウスティラゴ・ヌーダ (*Ustilago nuda*)、*U. nuda tritici*) などのウスティラゴ (*Ustilago*) 種によって引き起こされる病害;

例えばアスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 種; ボトリティス・シネレア (*Botrytis cinerea*) などのボトリティス (*Botrytis*) 種; ペニシリウム・エクспанサム (*Penicillium expansum*) および *P. purpurogenum*) などのペニシリウム (*Penicillium*) 種; スクレロティニア・スクレロティオラム (*Sclerotinia sclerotiorum*) などのスクレロティニア (*Sclerotinia*) 種; ベルティシリウム・アルボアトラム (*Verticillium albo-atrum*) などのベルティシリウム (*Verticillium*) 種によって引き起こされる果実腐敗;

例えばアルタナリア (*Alternaria*) 種によって引き起こされる、例えばアルタナリア・ブラシシコラ (*Alternaria brassicicola*) によって引き起こされる; アファノミセス (*Aphanomyces*) 種、例えばアファノミセス

10

20

30

40

50

・ユーテイケス (*Aphanomyces euteiches*) によって引き起こされる；アスコチタ (*Ascochyta*) 種、例えばアスコチタ・レンティス (*Ascochyta lentis*) によって引き起こされる；アスペルギルス (*Aspergillus*) 種、例えばアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*) によって引き起こされる；クラドスポリウム (*Cladosporium*) 種、例えばクラドスポリウム・ヘルバルム (*Cladosporium herbarum*) によって引き起こされる；コクリオボラス (*Cochliobolus*) 種、例えばコクリオボラス・サティブス (*Cochliobolus sativus*) (分生子型：ドレクスレラ (*Drechslera*)、ビポラリス (*Bipolaris*) 同義語：ヘルミントスポリウム (*Helminthosporium*)) によって引き起こされる；コレトリカム (*Colletotrichum*) 種、例えばコレトリカム・ココデス (*Colletotrichum coccodes*) によって引き起こされる；フサリウム (*Fusarium*) 種、例えばフサリウム・カルモラム (*Fusarium culmorum*) によって引き起こされる；ギbbeレラ (*Gibberella*) 種、例えばギbbeレラ・ゼアエ (*Gibberella zeae*) によって引き起こされる；マクロホミナ (*Macrophomina*) 種、例えばマクロホミナ・ファセオリナ (*Macrophomina phaseolina*) によって引き起こされる；モノグラフェラ (*Monographella*) 種、例えばモノグラフェラ・ニバリス (*Monographella nivalis*) によって引き起こされる；ペニシリウム (*Penicillium*) 種、例えばペニシリウム・エキспанスム (*Penicillium expansum*) によって引き起こされる；ホマ (*Phoma*) 種、例えばホマ・リンガム (*Phoma lingam*) によって引き起こされる；ホモプシス (*Phomopsis*) 種、例えばホモプシス・ソジャエ (*Phomopsis sojae*) によって引き起こされる；フィトフソラ (*Phytophthora*) 種、例えばフィトフソラ・カクトラム (*Phytophthora cactorum*) によって引き起こされる；ピレノホラ (*Pyrenophora*) 種、例えばピレノホラ・グラミネア (*Pyrenophora graminea*) によって引き起こされる；ピリクラリア (*Pyricularia*) 種、例えばピリクラリア・オリザエ (*Pyricularia oryzae*) によって引き起こされる；ピチウム (*Pythium*) 種、例えばピチウム・ウルティマム (*Pythium ultimum*) によって引き起こされる；リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 種、例えばリゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*) によって引き起こされる；リゾプス (*Rhizopus*) 種、例えばリゾプス・オリザエ (*Rhizopus oryzae*) によって引き起こされる；スクレロティウム (*Sclerotium*) 種、例えばスクレロティウム・ロルフシイ (*Sclerotium rolfii*) によって引き起こされる；セプトリア (*Septoria*) 種、例えばセプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*) によって引き起こされる；チフラ (*Typhula*) 種、例えばチフラ・インカルナタ (*Typhula incarnata*) によって引き起こされる；ベルチシリウム (*Verticillium*) 種、例えばベルチシリウム・ダーリアエ (*Verticillium dahliae*) によって引き起こされる種子および土壌伝染性の腐敗、カビ、しおれ、腐敗病および立ち枯れ病；

例えばネクトリア・ガリゲナ (*Nectria galligena*) などのネクトリア (*Nectria*) 種によって引き起こされる癌、こぶ病およびてんぐ巣病；

例えばモニリニア・ラクサ (*Monilinia laxa*) などのモニリニア (*Monilinia*) 種によって引き起こされる枯れ病；

例えばエキソバシジウム・ベキサンス (*Exobasidium vexans*) などのエキソバシジウム (*Exobasidium*) 種；タフリナ・デフォルマンズ (*Taphrina deformans*) などのタフリナ (*Taphrina*) 種によって引き起こされる葉ぶくれ病または葉巻病；

例えばファエモニエラ・クラミドスポラ (*Phaemoniella clamydo*

spora)、ファエオアクレモニウム・アレオフィラム (Phaeoacremonium aleophilum) およびフォミチポリタ・メジテラネア (Fomitiporia mediterranea) によって引き起こされるエスカ (Esca) 病; 例えばユーチパ・ラタ (Eutypa lata) によって引き起こされるユーチパ (Eutypa) 枝枯れ病; 例えばガノデルマ・ボニネンセ (Ganoderma boninense) によって引き起こされるガノダーマ (Ganoderma) 病; 例えばリジドポルス・リグノスス (Rigidoporus lignosus) によって引き起こされるリジドポルス (Rigidoporus) 病によって引き起こされる木材植物における衰退 (decline) 病;

例えばボトリティス・シネレア (Botrytis cinerea) などのボトリティス (Botrytis) 種によって引き起こされる花および種子の病害;

リゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia solani) などのリゾクトニア (Rhizoctonia) 種; ヘルミントスポリウム・ソラニ (Helminthosporium solani) などのヘルミントスポリウム (Helminthosporium) 種によって引き起こされる植物塊茎の病害;

例えばプラモジオフォラ・ブラッシカエ (Plamodiophora brassicae) などのプラモジオフォラ (Plamodiophora) 種によって引き起こされる根こぶ病;

細菌性病原体、例えばキサントモナス・キャンペストリス pv. オリザエ (Xanthomonas campestris pv. oryzae) などのキサントモナス (Xanthomonas) 種; シュードモナス・シリングアエ pv. ラクリマンス (Pseudomonas syringae pv. lachrymans) などのシュードモナス (Pseudomonas) 種; エルウィニア・アミロボラ (Erwinia amylovora) などのエルウィニア (Erwinia) 種によって引き起こされる病害。

【0282】

下記の大豆病害を好ましく防除することができる。

【0283】

例えばアルテルナリア葉斑点病 (alternaria leaf spot) (アルテルナリア属種アトランス・テニュイッシマ (Alternaria spec. attrans tenuissima))、炭疽病 (コレトトリカム・グロエオスポロイデス・デマティウム亜種トランケイタム (Colletotrichum gloeosporoides dematium var. truncatum))、褐斑病 (brown spot) (セプトリア・グリシネス (Septoria glycines))、セルコスボラ葉斑点病 (cercospora leaf spot) および焼枯れ病 (blight) (セクロスボラ・キクチイ (Cercospora kikuchii))、コアネフォラ葉焼枯れ病 (choanephora leaf blight) (コアネフォラ・インファンディブリフェラ・トリスポラ (Choanephora infundibulifera trispora) (同義))、ダクチュリオフォラ葉斑点病 (dactuliophora leaf spot) (ダクチュリオフォラ・グリシネス (Dactuliophora glycines))、べと病 (downy mildew) (ペロノスポラ・マンシュリカ (Peronospora manshurica))、ドレクスレラ焼枯れ病 (drechslera blight) (ドレクスレラ・グリシニ (Drechslera glycinii))、葉輪紋病 (frog eye leaf spot) (セルコスボラ・ソジナ (Cercospora soja))、レプトスファエルリナ葉斑点病 (leptosphaerulina leaf spot) (レプトスファエルリナ・トリフォリイ (Leptosphaerulina trifolii))、フィロスティカ葉斑点病 (phyllosticta leaf spot) (フィロスティカ・ソジャエコラ (Phyllosticta sojaecola))、鞘および茎の焼枯れ病 (фомобшис・ソジャエ (Phomopsis

10

20

30

40

50

sojae))、うどんこ病(powdery mildew)(ミクロスファエラ・ディフューザ(Microsphaera diffusa))、ピレノチャエタ葉斑点病(pyrenochaeta leaf spot)(ピレノチャエタ・グリシネス(Pyrenochaeta glycines))、リゾクトニア・エリアル(rhizoctonia aerial)、葉および膜の焼枯れ病(リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))、さび病(ファコプソラ・パチライジ(Phakopsora pachyrhizi))、ファコプソラ・メイボミアエ(Phakopsora meibomiaae))、黒星病(スファセロマ・グリシネス(Sphaceloma glycines))、ステムフィリウム葉焼枯れ病(stemphylium leaf blight)(ステムフィリウム・ボトリオサム(Stemphylium botryosum))、輪紋病(コリネスポラ・カッシイコラ(Corynespora cassiicola))によって引き起こされる葉、茎、鞘および種子に対する真菌病害。

10

【0284】

例えば黒根腐病(black root rot)(カロネクトリア・クロタラリアエ(Calonectria crotalariae))、炭腐病(マクロフォミナ・ファセオリナ(Macrophomina phaseolina))、フザリウム焼枯病(fusarium blight)または萎凋病(wilt)、根腐れ病ならびに鞘および頸部腐れ病(rot)(フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum))、フザリウム・オルトセラス(Fusarium orthoceras)、フザリウム・セミテクタム(Fusarium semitectum)、フザリウム・エクイセチ(Fusarium equiseti)、マイコレプトディスカス根腐れ病(mycoleptodiscus root rot)(マイコレプトディスカス・テレストリス(Mycoleptodiscus terrestris))、ネオコスモスポラ(neocosmospora)(ネオコスモスポラ・バスイنفেকタ(Neocosmopora vasinfecta))、鞘および茎の焼枯病(blight)(ディアポルセ・ファセオロラム(Diaporthe phaseolorum))、枝枯れ病(ディアポルセ・ファセオロラム亜種カウリボラ(Diaporthe phaseolorum var. caulivora))、フィトフトラ腐れ病(phytophthora rot)(フィトフトラ・メガスペルマ(Phytophthora megasperma))、褐色茎腐れ病(brown stem rot)(フィアロフォラ・グレガータ(Phialophora gregata))、ピチウム腐れ病(pythium rot)(ピチウム・アフアニデルマタム(Pythium aphanidermatum))、ピチウム・イレギュラーレ(Pythium irregulare)、ピチウム・デバリアナム(Pythium debaryanum)、ピチウム・ミリオチラム(Pythium myriotylum)、ピチウム・ウルティマム(Pythium ultimum))、リゾクトニア根腐れ病(rhizoctonia root rot)、茎腐敗および立枯病(リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani))、スクレロティニア茎腐敗病(sclerotinia stem decay)(スクレロティニア・スクレロティオラム(Sclerotinia sclerotiorum))、スクレロティニア白絹病(sclerotinia Southern blight)(スクレロティニア・ロルフシイ(Sclerotinia rolfsii))、チエラビオプシス根腐れ病(thielaviopsis root rot)(チエラビオプシス・バシコラ(Thielaviopsis basicola))によって引き起こされる根および茎基部の真菌病。

20

30

40

【0285】

本発明の組成物は、植物病原性真菌の治療的もしくは保護／予防的防除に用いることができる。従って本発明は、種子、植物もしくは植物部分、果実または植物が成長する土壌に施用される本発明の組成物の使用による植物病原性真菌の治療的および保護的防除方法に関するものでもある。

50

【0286】

植物病害を防除するのに必要な濃度で、当該組成物が植物によって良好に耐容されることで、植物の地上部分、栄養繁殖器官および種子、ならびに土壌の処理が可能となる。

【0287】

本発明によれば、全ての植物および植物部分を処理することができる。植物とは、望ましいおよび望ましくない野生植物、作物および植物変種のような全ての植物および植物集団を意味する（植物品種および植物育種家の権利によって保護され得るか否かを問わず）。栽培品種及び植物変種は、1種類以上の生物工学的な方法で（例えば、倍加半数体、原形質融合、ランダム突然変異誘発および定方向突然変異誘発、分子マーカーまたは遺伝的マーカーなどを用いることによって）補助または補足することが可能な従来の繁殖方法および育種方法によって得られる植物であることができるか、生物工学的な方法と遺伝子工学的な方法によって得られる植物であることができる。植物部分とは、枝条、葉、花および根などの植物の地上部および地下部の全ての部分及び器官を意味し、例えば、葉、針状葉、茎、枝、花、子実体、果実及び種子、ならびに根、球茎および根茎などが挙げられる。作物、ならびに栄養繁殖器官（vegetative propagating material）および生殖繁殖器官（generative propagating material）、例えば、挿し穂、球茎、根茎、匍匐茎および種子なども、植物部分に属する。

10

【0288】

本発明の組成物は、それが植物によって良好に耐容され、好ましい恒温動物毒性を有し、環境によって良好に耐容される場合、植物および植物器官を保護し、収穫量を高め、収穫物の品質を向上させる上で好適である。それは好ましくは、作物保護組成物として用いることができる。それは、通常のように感受性で抵抗性の植物種ならびに全てもしくは一部の発達段階に対して活性である。

20

【0289】

本発明に従って処理することができる植物には、次の主要作物植物：トウモロコシ、ダイズ、アルファルファ、ワタ、ヒマワリ、アブラナ属油料種子（*Brassica oilseeds*）、例えば、セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）（例えば、カノラ、アブラナ）、カブ（*Brassica rapa*）、カラシナ（*B. juncea*）（例えば、（菜の花）マスタード）およびアビシニアガラシ（*Brassica carinata*）、ヤシ（*Arecaceae*）属種（例えば、油やし、ココナッツ）、イネ、コムギ、テンサイ、サトウキビ、エンバク、ライムギ、オオムギ、アワおよびモロコシ、ライコムギ、アマ、ナツ、ブドウおよびブドウの木、ならびに、種々の植物学的分類群からの各種果実および野菜、例えば、バラ属種（*Rosaceae sp.*）（例えば、ナシ状果、例えば、リンゴおよびナシ、さらに、核果、例えば、アンズ、サクランボ、アーモンド、プラムおよびモモ、ならびに液果（*berry fruits*）、例えば、イチゴ、ラズベリー、アカフサスグリおよびクロフサスグリならびにグーズベリー）、リベシオイダエ属種（*Ribesioideae sp.*）、クルミ属種（*Juglandaceae sp.*）、カバノキ属種（*Betulaceae sp.*）、ウルシ属種（*Anacardiaceae sp.*）、ブナ属種（*Fagaceae sp.*）、クワ属種（*Moraceae sp.*）、モクセイ属種（*Oleaceae sp.*）（例えば、オリーブの木）、マタタビ属種（*Actinidaceae sp.*）、クスノキ属種（*Lauraceae sp.*）（例えば、アボカド、シナモン、樟脳）、バショウ属種（*Musaceae sp.*）（例えば、バナナの木およびバナナ園（*banana trees and plantations*））、アカネ属種（*Rubiaceae sp.*）（例えば、コーヒー）、ツバキ属種（*Theaceae sp.*）（例えば、チャ）、アオギリ属種（*Sterculiaceae sp.*）、ミカン属種（*Rutaceae sp.*）（例えば、レモン、オレンジ、ミカンおよびグレープフルーツ）；ナス属種（*Solanaceae sp.*）（例えば、トマト、ジャガイモ、コショウ、トウガラシ、ナス、タバコ）、ユリ属種（*Liliaceae sp.*）、キク属種（*Co*

30

40

50

mpositae sp.) (例えば、レタス、チョウセンアザミおよびチコリー (これは、ルートチコリー (root chicory)、エンダイブまたはクニガナを包含する))、セリ属種 (Umbelliferae sp.) (例えば、ニンジン、パセリ、セロリおよびセロリアック)、ウリ属種 (Cucurbitaceae sp.) (例えば、キュウリ (これは、ガーキン、カボチャ、スイカ、ヒョウタンおよびメロン)、ネギ属種 (Alliaceae sp.) (例えば、リーキおよびタマネギ)、アブラナ属種 (Cruciferae sp.) (例えば、白キャベツ、赤キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、芽キャベツ、タイサイ、コールラビ、ラディッシュ、セイヨウワサビ、コショウソウおよびハクサイ)、マメ属種 (Leguminosae sp.) (例えば、ラッカセイ、エンドウ、レンズマメおよびマメ (例えば、インゲンマメおよびソラマメ))、アカザ属種 (Chenopodiaceae sp.) (例えば、フダンソウ、飼料用ビート、ハウレンソウ、ビートの根 (beet roots))、アマ (Linaceae) 属種 (例えばアサ)、タイマ (Cannabaceae) 属種 (例えば、大麻)、アオイ (Malvaceae) 属種 (例えば、オクラ、カカオ)、ケシ科 (例えば、ケシ)、クサスギカズラ科 (Asparagaceae) (例えば、アスパラガス) ; 有用植物および庭の観賞植物ならびに芝生、芝地、イネ科草本およびステビア・レバウディアナ (Stevia rebaudiana) ; および各場合でこれらの遺伝子組み換え型などがある。

【0290】

植物種または植物品種、それらの生育場所および生育条件 (土壌、気候、生育期、養分 (diet)) に応じて、本発明による組成物を使用または利用して、本発明による処理により、優加法的 (「相乗的」) 効果も生じ得る。従って、例えば、本発明による処理において本発明の組成物を使用もしくは利用することで、施用量の低減および／または活性スペクトルの拡大および／または活性の増強、植物の生育の向上、高温または低温に対する耐性の向上、渇水または水中もしくは土壌中に含まれる塩分に対する耐性の向上、開花能力の向上、収穫の容易性の向上、促進された成熟、収穫量の増加、果実の大きさの増大、植物の高さの増大、葉の緑色の向上、より早い開花、収穫された生産物の品質の向上および／または栄養価の増加、果実内の糖度の上昇、収穫された生産物の貯蔵安定性の向上および／または加工性の向上などが可能であり、これらは、実際に予期された効果を超えるものである。

【0291】

本発明による処理における本発明の組成物の特定の施用量において、植物において強化効果も示し得る。望ましくない植物病原性真菌および／または微生物類および／またはウィルスによる攻撃に対する防御システムが動員される。本発明に関連して、植物を強化する (抵抗性を誘導する) 物質は、処理された植物が、その後で望ましくない植物病原性真菌および／または微生物類および／またはウィルスを接種されたときに、それらの望ましくない植物病原性真菌および／または微生物類および／またはウィルスに対して実質的な程度の抵抗性を示すように、植物の防御システムを刺激することができる物質または物質の組合せを意味するものと理解される。そうして、本発明による処理において本発明による組成物を使用もしくは利用することで、処理後特定の期間内で、上記病原体による攻撃から植物を保護することができる。保護が達成される期間は、植物が該活性化化合物で処理されてから、一般に、1 から 10 日間、好ましくは、1 から 7 日間である。

【0292】

本発明に従って処理するのが同様に好ましい植物および植物品種は、1 以上の生物学的ストレスに対して抵抗性を示す。即ち、そのような植物は、害虫および有害微生物に対して、例えば、線虫類、昆虫類、ダニ類、植物病原性の菌類、細菌類、ウイルス類および／またはウイロイド類などに対して、良好な防御を示す。

【0293】

本発明に従って同様に処理し得る植物および植物品種は、1 以上の非生物学的ストレスに対して抵抗性である植物、すなわちストレス耐性に関して、すでに増進された植物の健康

を示す植物である。非生物的なストレス状態としては、例えば、渇水、低温に晒されること、熱に晒されること、浸透ストレス、湛水、土壤中の塩分濃度の上昇、より多くの鉱物に晒されること、オゾンに晒されること、強い光に晒されること、利用可能な窒素養分が限られていること、利用可能なリン養分が限られていること、日陰回避などを挙げることができる。好ましくは、これらの植物および栽培品種の本発明の組成物による処理はさらに、全体的な植物の健康（上記参照）を高めるものである。

【0294】

本発明に従って同様に処理し得る植物および植物品種は、増大した収量特性を特徴とする植物、すなわちこの特徴に関して、すでに増進された植物の健康を示す植物である。そのような植物における増大した収量は、例えば、改善された植物の生理機能、生長および発育、例えば、水の利用効率、水の保持効率、改善された窒素の利用性、強化された炭素同化作用、改善された光合成、上昇した発芽効率および促進された成熟などの結果であり得る。収量は、さらに、改善された植物の構成によっても影響され得る（ストレス条件下および非ストレス条件下）。そのような改善された植物の構成としては、限定するものではないが、早咲き、ハイブリッド種子生産のための開花制御、実生の活力、植物の寸法、節間の数および距離、根の成長、種子の寸法、果実の寸法、莢の寸法、莢または穂の数、1つの莢または穂当たりの種子の数、種子の体積、強化された種子充填、低減された種子分散、低減された莢の裂開および耐倒伏性などがある。収量についてのさらなる形質としては、種子の組成、例えば、炭水化物含有量、タンパク質含有量、油含有量および油の組成、栄養価、抗栄養化合物の低減、改善された加工性ならびに向上した貯蔵安定性などがある。好ましくは、これらの植物および栽培品種の本発明の組成物による処理はさらに、全体的な植物の健康（上記参照）を高めるものである。

【0295】

本発明により処理され得る植物は、既にヘテロシスまたはハイブリッド活力の特徴を発現するハイブリッド植物であり、それによって、収量、活力、健康および生物ストレス因子および非生物ストレス因子に対する抵抗性がより高くなる。そのような植物は代表的には、同系交配雄性不稔親株（雌親）と別の同系交配雄性稔性親株（雄親）を交雑させることにより作られる。ハイブリッド種子は代表的には、雄性不稔植物から収穫され、栽培者に販売される。雄性不稔植物は、（例えばトウモロコシでは）、雄穂除去、すなわち雄性生殖器（または雄花）の物理的除去により作ることができる場合があるが、より代表的には、雄性不稔性は、植物ゲノムにおける遺伝的決定基の結果である。この場合、そして特には種子がハイブリッド植物から収穫するのが望まれる産物である場合に、ハイブリッド植物での雄性不稔性が十分に回復されるようにすることが有用であるのが普通である。これは、雄性不稔性を担う遺伝的決定基を含むハイブリッド植物で雄性稔性を回復することができる適切な稔性回復遺伝子を雄親が有するようにすることで達成される。雄性不稔性の遺伝的決定基は細胞質に局在化していることができる。細胞質雄性不稔性（CMS）の例としては、例えばアブラナ種に記載されていた。しかしながら、雄性不稔性の遺伝的決定基は、細胞核ゲノムに局在化していることもできる。雄性不稔性植物は、遺伝子工学などの植物バイオテクノロジー法によっても得ることができる。雄性不稔性植物を得る上で特に好ましい手段は、WO 89/10396に記載されており、そこでは、例えば、バルナーゼなどのリボヌクレアーゼが、雄しべにあるタペータム細胞で選択的に発現される。次に稔性は、バルスターなどのリボヌクレアーゼ阻害剤のタペータム細胞での発現によって回復することができる。

【0296】

本発明によって処理することができる植物または植物品種（遺伝子工学などの植物バイオテクノロジー法によって得られる）は、除草剤耐性植物、すなわち、1以上の所定の除草剤に対して耐性とされた植物である。そのような植物は、形質転換により、またはそのような除草剤耐性を付与する突然変異を含む植物の選択によって得ることができる。

【0297】

実施例

10

20

30

40

50

実施例 1：複数の有効成分の組み合わせの効力についての式

有効成分組み合わせの活性が、個別に施用した場合の有効成分の活性の合計を超える場合には、有効成分の相乗効果が存在する。2 種類の有効成分の所定の組み合わせについての予想される活性は、下記のように計算することができる (Colby, S. R., "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations", Weeds 1967, 15, 20-22 参照)。

【0298】

X が、有効成分 A を施用量 $\underline{m}$ ppm (または g/h a) で施用した場合の効力であり、
Y が、有効成分 B を施用量 $\underline{n}$ ppm (または g/h a) で施用した場合の効力であり、
E が、有効成分 A および B をそれぞれ $\underline{m}$ および $\underline{n}$ ppm (または g/h a) で施用した場合の効力である場合、

10

【数 1】

$$E = X + Y - \frac{X \cdot Y}{100}$$

【0299】

である。

【0300】

20

実際の活性が計算値を超える場合、組み合わせの活性は優加法的であり、すなわち相乗効果が存在する。この場合、実際に観察された効力は、上記式から計算される予想効力についての値 (E) より大きいものでなければならない。

【0301】

例えば、上記式および分析を、植物成長促進の評価に適用することができる。そのようなアッセイは、植物に施用してから数日後に評価する。100% は、未処理対照植物の重量に相当する植物重量を意味する。効力は、この場合、未処理対照の重量と比較して植物重量の追加%を意味する。例えば、未処理対照植物と比較して120%の植物重量となる処理は、20%の効力を有することになるものと考えられる。組み合わせについての植物成長促進効果 (すなわち、組み合わせ剤で処理した植物の%植物重量について観察された効力) が計算値を超える場合、その組み合わせ剤の活性は超加法的であり、すなわち相乗効果が存在する。

30

【0302】

上記式および分析を用いて、疾病防除アッセイにおける相乗効果を評価することもできる。%で表される効力の程度が示されている。0%は対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は疾病が全く観察されないことを意味する。

【0303】

実際の殺虫または殺菌活性が計算値を超える場合、組み合わせの活性は優加法的であり、すなわち相乗効果が存在する。この場合、実際に観察される効力は、上記式から計算される予想効力についての値 (E) より大きいものでなければならない。

40

【0304】

相乗効果を示す別の手法は、Tammesの方法である ("Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides," in Neth. J. Plant Path., 1964, 70, 73-80 参照)。

【0305】

実施例 2：トリフロキシストロビンおよび組換えバチルス・ツリングエンシス (Bacillus thuringiensis) 細胞による植物成長促進

トリフロキシストロビンおよびエンドグルカナーゼを発現する組換えバチルス・ツリングエンシス (Bacillus thuringiensis) 細胞 (「BEE」) の発

50

酵産物の組み合わせの効力を分析するため、実験を行った。25から28℃および湿度50%の植物成長室のライトラック上、小さい3インチ正方形ポット中の合成培地および砂の無菌混合物で、トウモロコシ種子を約14日間にわたり成長させた。各ポットでは、2個の種子を植えた。植え付け時には、各ポットの成長培地を、下記に記載の処理液に浸した。14日後、植物を、植物バイオマスについて測定した。下記の表において、UTCは未処理対照を指す。「計算値」は、上記コルビー式を用いて計算される予想効果値を指し、「効力」は観察された実際の効果を指す。

【0306】

有効成分としてトリフロキシストロビンを含むTRILEX（登録商標）製品（22%トリフロキシストロビン）を水50mLで希釈し、その希釈溶液を用いて成長培地を浸した。下記に示した施用量は、成長培地に施用される有効成分（すなわち、トリフロキシストロビン）の量を指す。

10

【0307】

外膜上でエンドグルカナーゼを発現する組換えバチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員（バチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013A）（BEE）を次のように作った。バチルス・セレウス（*Bacillus cereus*）科構成員での融合タンパク質の発現のためのプラスミドを作るため、BclAプロモーター（配列番号85）、メチオニン開始コドン、およびBclAのアミノ酸20から35（配列番号1）と次にフレームでバチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013Aエンドグルカナーゼ（配列番号107）に融合した6アラニンリンカー配列をコードするPCR断片を作った。これらのPCR断片をXhoIで消化させ、pSUPERプラスミドのSalI部位に結合させて、プラスミドpSUPER-BclA20-35-エンドグルカナーゼを作った。pUC57プラスミド（アンピシリン抵抗性カセットを含む）のバチルスからのpBC16-1プラスミド（テトラサイクリン抵抗性を含む）との融合によって、pSUPERプラスミドを作った。この5.5kbpプラスミドは、大腸菌（*E. coli*）およびバチルス属種の両方で複製することができる。pSUPER-BclA20-35-ホスホリパーゼプラスミドをdamメチラーゼ陰性大腸菌（*E. coli*）株にトランスフォームし、そこで繁殖し、最後にバチルス・ツリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）BT013Aにトランスフォームした。

20

30

【0308】

BEEの全ブロス培地を得るため、ブレインハートインフュージョン培地（BHI）を含む15mLフラスコに、BEEを接種し、300rpmの振盪器設定で約30℃で7から8時間増殖させた。翌日、各フラスコからの小分けサンプル250μLずつを、酵母抽出物系培地50mLの入った250mLフラスコに接種し、約30℃で増殖させた。約2日間のインキュベーション後、胞子形成が少なくとも95%完了した時点で、培養ブロスを回収し、コロニー形成単位を計算した。発酵ブロスを水50mLで5%に希釈し、次のコロニー形成単位を各ポットに施用した。

【0309】

実験の結果を下記の表3に示してある。

40

【0310】

表3

【表 3】

処理	施用量	全植物 バイオマス (g)	実測値 %	効力 %	計算値 %
UTC		2.67	100		
トリフロキシストロビン	0.024 mg/ポット	2.69	101	1	
BEE 5%	7.85×10^8 CFU/ポット	2.89	108	8	
トリフロキシストロビン + BEE 5%	0.024 mg/ポット + 7.85×10^8 CFU/ポット	3.06	115	15	8.92

10

【0311】

結果は、トリフロキシストロビンおよびBEEを組み合わせた場合の優加法的植物収量効果を示している。

【0312】

実施例3：イソチアニルおよび組換えバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 細胞による植物成長促進

20

20℃および湿度70%の温室中、ローム性砂でトウモロコシ種子を約11日間成長させる。処理時点から約11日後、若芽を土から上で切り取り、新鮮重量を求める。

【0313】

配列番号107によってコードされるエンドグルカナーゼを発現する組換えバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 細胞または配列番号108によってコードされて上記の方法に従って得られるホスホリパーゼCを、約50 μg/穀粒で施用する。イソチアニルも、約250 μg/穀粒で施用する。

【0314】

イソチアニルと組み合わせた組換えバチルス・ツリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) で処理されるトウモロコシ植物は、二つの有効成分単独で処理したトウモロコシ植物からの%芽重量に基づいて計算された値を超える%芽重量を有すると予想され、すなわち相乗効果が観察されるであろう。

30

【図 1】

FIG. 1

配列番号	20-35 %同一性	25-35 %同一性
MSNNKYSNGLNPDESLSASAFDPLNVLGPTLPPIPTLPTG	1	100%
MSEKYIUIHCTALFENLIGPTLPPIPTLPTG	3	81.3%
MVKVVEGNGGSKSKPLNSNTKILSLXGPTFPVPTGMITG	5	50.0%
MKQNDKLDWDRGIGPENIGPTFPVLPPIPTG	7	43.8%
MDEFLSAALNPGSYGPTLPPMQPQRTG	9	62.5%
MFDKNEIQINGILQANALNPNLIGPTLPPIPTLPTG	11	81.3%
MEDKNEMKTKNEVLQANALDNPNIIGPTLPPIPTLPTG	13	81.3%
MSRKDKFNRSRMSRKDRFNPKSKSEISISDPLVGPTFPPIPTLPTG	15	62.5%
MNEEYSLHGPALFENLIGPTLSPPIPTG	17	75.0%
MKNRDNRRKQNSLSNRIPTLPPIPTFPVPTG	19	50.0%
MSDKHQMKRSEVLQAHLDNPNIIGPTLPPIPTLPTG	21	75.0%
MDEFLSAALNPGSIGPTLPVVPPIQPTG	23	62.5%
MDEFLSSTALNPGSIGPTLPVVPPIQPTG	25	56.2%
MKERDRQNSLSNFRISPNLIGPTFPVPTG	27	56.2%
VFDKNEIQINGILQANALNPNLIGPTLPPIPTLPTG	29	81.3%
MDEFLYAALNPGSIGPTLPVQPIQPTG	31	56.2%
MDSKNIGTPTLPPIPTLPTG	33	43.8%
MICPENIGTPTLPPIPTLPTG	35	43.8%
MSNNNIPSPFFNFNPNLIGTPTFPPIPTLPTG	43	68.8%
MFSEKKRDLDPNFLSAPALDPNIGTPTFPPIPTLPTG	45	75.0%
MTRKDKFNRSRDRFNPKSKSEILISDPLVGPTFPPIPTLPTG	47	62.5%
MSRKDRFNPKSKSEISISDPLVGPTFPPIPTLPTG	49	62.5%
MKERDNKGQHSLSNFRISPNLIGTFPVPTG	51	50.0%
MRERDNKRQHSLSNFRISPNLIGTFPVPTG	53	50.0%
MKNKDNKGQHSLSNFRISPNLIGTFPVPTG	55	50.0%
MKFSKKSIVDSSIVGRVYSKVNILRFYDARSCQDKDYDGEVDYGEFTFRKLNMEGVSQEKAHNSI GKTYTITINEVYVFTVLLQYSTLIGGSYVFDKNEIQINGILQANALNPNLIGTLPPIPTLPTG	57	81.3%

【配列表】

2017534579000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/050597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01N63/00 A01N43/30 A01N43/54 A01N55/04 A01N43/80
A01N47/32 A01N43/50 A01N37/50 A01N37/24 A01N43/08
A01N43/653 A01N47/38 A01N43/707 A01N43/90 A01N47/12

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A01N

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)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	US 2014/274707 A1 (THOMPSON BRIAN [US] ET AL) 18 September 2014 (2014-09-18) abstract; examples	1-27
A	----- WO 2006/012366 A2 (PHYLLON LLC [US]; GOLDMAN STANLEY [US]; LIBS JOHN [US]) 2 February 2006 (2006-02-02) abstract; examples	1-27
A	----- US 2011/281316 A1 (STEWART GEORGE C [US] ET AL) 17 November 2011 (2011-11-17) abstract; examples	1-27
A	----- WO 2014/079814 A1 (BASF SE [DE]) 30 May 2014 (2014-05-30) abstract; examples	1-27
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2015

Date of mailing of the international search report

02/12/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina de Alba, José

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/050597

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/178649 A1 (BAYER CROPS SCIENCE AG [DE]) 5 December 2013 (2013-12-05) abstract; examples -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/050597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014274707 A1	18-09-2014	CA 2907369 A1 US 2014274707 A1 WO 2014145964 A1	18-09-2014 18-09-2014 18-09-2014
WO 2006012366 A2	02-02-2006	EP 1778714 A2 WO 2006012366 A2	02-05-2007 02-02-2006
US 2011281316 A1	17-11-2011	NONE	
WO 2014079814 A1	30-05-2014	AU 2013349839 A1 CA 2890635 A1 CN 104902756 A EP 2922399 A1 US 2015327556 A1 WO 2014079814 A1	11-06-2015 30-05-2014 09-09-2015 30-09-2015 19-11-2015 30-05-2014
WO 2013178649 A1	05-12-2013	AR 091196 A1 CN 104507315 A EP 2854551 A1 KR 20150021537 A PH 12014502672 A1 US 2015141245 A1 WO 2013178649 A1	21-01-2015 08-04-2015 08-04-2015 02-03-2015 02-02-2015 21-05-2015 05-12-2013

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	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	9/14	(2006.01)	C 1 2 N	9/14	
C 1 2 N	9/90	(2006.01)	C 1 2 N	9/90	
A 0 1 H	3/04	(2006.01)	A 0 1 H	3/04	
C 1 2 N	9/42	(2006.01)	C 1 2 N	9/42	
C 1 2 N	9/50	(2006.01)	C 1 2 N	9/50	
C 1 2 N	9/26	(2006.01)	C 1 2 N	9/26	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	D
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,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,NL,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 100129713
弁理士 重森 一輝
- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味渕 琢也
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 カーティス, ダミアン

アメリカ合衆国、 9 5 6 1 8 ・カリフォルニア、デイヴィス、ヴァルドラ・ストリート・ 1 7 3 6

(72)発明者 トンプソン, ブライアン

アメリカ合衆国、 6 3 1 4 6 ・ミズーリ、クリーヴ・コウー、モマー・レーン・ 1 1 3 6 6

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB02 AB03 AD06 AD07 AD14

4B050 CC07 CC08 DD11 DD13 EE10 HH01 HH02 KK18 LL10

4B065 AA15X AA15Y AA16X AA16Y AA20X AA20Y AB01 BA02 CA24 CA27

CA31 CA47 CA53

4H011 AB03 BA06 BB06 BB21 DA14 DD03

4H045 AA20 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18

BA41 CA11 DA50 DA89 EA05 EA06 FA74