

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500055

(P2004-500055A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 N 63/00	A O 1 N 63/00	4 B O 6 5
C O 7 K 14/705	A O 1 N 63/00	4 H O 1 1
C O 7 K 16/28	C O 7 K 14/705	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15	C O 7 K 16/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-537503 (P2001-537503)	(71) 出願人	502373341
(86) (22) 出願日	平成12年10月25日 (2000.10.25)		バイオロジカル・ターゲッツ・インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成14年4月26日 (2002.4.26)		レーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/041521		アメリカ合衆国テキサス州76271, テ
(87) 国際公開番号	W02001/034807		ィオガ, ピー・オー・ボックス 579
(87) 国際公開日	平成13年5月17日 (2001.5.17)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	60/161, 564		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成11年10月26日 (1999.10.26)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 *Pectinophora gossypiella* (ピンクワタノミムシ) *Bacillus thuringiensis* (バシラススリンギエンシス) 毒素受容体BT-R2

(57) 【要約】

Bacillus thuringiensis 毒素に特異的に結合する、ピンクワタノミムシ、*Pectinophora gossypiella*からの200kD受容体, BT-R₂をコードするcDNAを、クローン化、配列決定、および特性解明した。その最小毒素結合断片を同定した。当該BT-R₂cDNAは、作物の成長および発生に影響するピンクワタノミムシおよび他の昆虫類中の受容体の分析、ならびに、可能性のある殺虫剤の細胞毒性および結合親和性のデザインアッセイを可能にする。本明細書に記載のクローンおよび他の方法は、天然および/または導入相同性受容体の操作、従って、標的宿主の生物、組織および/または細胞を特異的に破壊することを可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ピンクワタノミムシ、*Pectinophora gossypiella*からの約200 kDのBT毒素受容体をコードする配列を含んでなる、単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号2のBT毒素受容体配列をコードする、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号1の配列を含んでなる、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 4】

前記単離された核酸分子が、配列番号1の400連続ヌクレオチドのプロープに該プロープの全長に亘り高度のストレインジーでハイブダイズできる、請求項1の単離された核酸分子。 10

【請求項 5】

前記BT毒素受容体が、配列番号2の配列に少なくとも85%相同である、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 6】

前記BT毒素受容体が、配列番号2の配列に少なくとも90%相同である、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 7】

前記BT毒素受容体が、配列番号2の配列に少なくとも95%相同である、請求項1の単離された核酸分子。 20

【請求項 8】

前記BT毒素受容体が、配列番号2の配列に少なくとも98%相同である、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 9】

前記配列が、原核生物系内での発現に最適化されたコドンである、請求項1の単離された核酸分子。

【請求項 10】

前記配列が、真核生物系内での発現に最適化されたコドンである、請求項1の単離されたポリヌクレオチド配列。 30

【請求項 11】

請求項1から10の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 12】

請求項11のベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 13】

毒素類の細胞毒性のレベルおよび毒素類の作用の様式を査定するのに使用される、請求項12の宿主細胞。

【請求項 14】

毒素類の細胞毒性のレベルおよび毒素類の作用の様式を査定するのに使用される、天然のBT毒素受容体を含んでなる細胞。 40

【請求項 15】

請求項11のベクターを含んでなるトランスジェニック生物。

【請求項 16】

配列番号2のアミノ酸(aa)534-544, aa291-304, aa697-705, aa622-632, aa886-895, aa791-803, aa1055-1066, aa1621-1642, aa1321-1331, aa1451-1461, aa1516-1525, aa1572-1582, aa1677-1729, および aa1269-1367から成る群より選択されるペプチドをコードする配列を含んでなる、単離された核酸分子。

【請求項 17】

配列番号 2 に少なくとも 85 % 相同な配列を含んでなる、精製されたタンパク質。

【請求項 18】

前記配列が配列番号 2 に少なくとも 90 % 相同である、請求項 17 の精製されたタンパク質。

【請求項 19】

前記配列が配列番号 2 に少なくとも 95 % 相同である、請求項 17 の精製されたタンパク質。

【請求項 20】

前記配列が配列番号 2 に少なくとも 98 % 相同である、請求項 17 の精製されたタンパク質。

10

【請求項 21】

前記配列が配列番号 2 である、請求項 17 の精製されたタンパク質。

【請求項 22】

配列番号 2 のアミノ酸 (aa) 534 - 544 ; aa291 - 304 ; aa697 - 705 ; aa622 - 632 ; aa886 - 895 ; aa791 - 803 ; aa1055 - 1066 ; aa1621 - 1642 ; aa1321 - 1331 ; aa1451 - 1461 ; aa1516 - 1525 ; aa1572 - 1582 ; aa1677 - 1729 ; および aa1269 - 1367 から成る群より選択される配列を含んでなる、精製されたペプチド。

【請求項 23】

配列番号 2 の aa1269 - 1367 を含む、請求項 22 の精製されたペプチド。

20

【請求項 24】

配列番号 2 の aa1677 - 1727 からの少なくとも 17 連続アミノ酸 (aa) を含む、精製されたペプチド。

【請求項 25】

配列番号 1 のヌクレオチド 3807 - 4101 である第 2 配列のプロープに、前記プロープの全長に沿って高度のストリージェンシーでハイブリダイズできる第 1 配列を含んでなる、単離された核酸分子。

【請求項 26】

請求項 19 ~ 21 のペプチドをコードする配列を含んでなる、単離された核酸分子。

30

【請求項 27】

配列番号 2 で同定される BT - R2 タンパク質のカルボキシル尾部内に存在する抗原に結合し、カイコまたはタバコスズメガ *Bacillus thuringiensis* Cry 毒素受容体に結合しない、*Bacillus thuringiensis* Cry 毒素受容体抗体。

【請求項 28】

配列番号 2 で同定される BT - R2 タンパク質内に存在する抗原に結合し、カイコおよびタバコスズメガ *Bacillus thuringiensis* Cry 毒素受容体にも結合する、*Bacillus thuringiensis* Cry 毒素受容体抗体。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

関連出願へのクロス・リファレンス

本特許出願は、1999 年 10 月 26 日出願の先願同時係属米国暫定特許出願シリアル番号第 60 / 161564 号からの優先権の恩典を請求し、その全開示を引用により本明細書に援用する。

発明の技術分野

本発明は、*Bacillus thuringiensis* (BT) 毒素に対する受容体に、従って該受容体に結合できる殺虫剤に、そして殺虫剤抵抗性の軽減に、関する。特に、当該発明は、*Pectinophora gossypiella*, ピンクワタノミムシ、からの新規受容体および受容体エレメントについての組換え DNA および発現系に関

50

する。

【0002】

発明の背景

当該発明の範囲を限定せずに、例として、綿害虫殺虫剤としての *Bacillus thuringiensis* 毒素の使用に関連して、その背景を説明する。綿花の害虫類は、1998年全米ではほぼ10%も収穫を減らした。昆虫損害は、170万ベイル（綿の梱）以上も綿の全生産高を減少させ、約12億2400万ドルの経済損失をもたらした。特にワタノミムシノメムシの組合せの一群は最も被害が大きく、2.7%の損失を与えた。ピンクワタノミムシ *Pectinophora gossypiella* *Saunders*（“PBW”）は、綿花に甚大な被害を及ぼす鱗翅類の昆虫で、世界中で最も破壊的な綿花の害虫である。 10

Bacillus thuringiensis は、殺虫性毒素類を含むパラ孢子結晶を形成するグラム陽性孢子形成細菌である（*Bull*ら、*Crit. Rev. Microbiol.*（1980）8：147-204；*Hofte*および*Whitely*、*Microbiol. Rev.*（1989）53：242）。毒素の作用は、感受性がある昆虫の中腸微柔毛の先端刷子縁（BBMV）上の特定の受容体への結合を介して媒介される。

B. thuringiensis 処方物およびトランスジェニック植物を用いる綿害虫の生物的制御は、長年利用されており、急速に普及している。最近、BTの毒素遺伝子をもつトランスジェニック綿植物が開発され、市販されている。そうしたトランスジェニック植物は、ピンクワタノミムシに対して高度の抵抗性を備えている（*Schnepf*ら、*Microbiol. Mol. Biol. Rev.*（1998）62：775）。しかし、害虫管理プログラムに何か新しい殺虫剤が導入されると、当該殺虫剤に抵抗性のある個体に向けての淘汰プロセスが間もなく開始する。BT毒素を発現するトランスジェニック作物の使用が増えるにつれて、昆虫抵抗性はさらに広がると予想される。数種の昆虫におけるBT毒素に対する耐性の増加が複数の研究者により報告されており、一方、研究室の淘汰実験で、BT毒素処方物やトランスジェニック植物の使用が、ピンクワタノミムシに抵抗性の発生をもたらす可能性が明らかにされている（*Bartlett*ら、*Beltwide Cotton Conference*（1995）2：766）。 20

BT毒素処方物または当該毒素遺伝子を発現するトランスジェニック植物は、抵抗性のまたは耐性の昆虫株の出現を促す恐れがあるという関心が、BT毒素タンパク質とそれらのそれぞれの昆虫受容体との間の相互作用についての理解を深めるための探究を、経済的に相当重要な問題にすることになった。 30

【0003】

米国特許第5693491号で、本発明者らは、タバコスズメガ、*Manduca sexta*（*M. sexta*）の幼虫から *B. thuringiensis* 毒素受容体 BT-R₁ の精製およびcDNAクローニングを開示した。最近、二つのBT毒素受容体が、カイコ、*Bombyx mori* から同定、精製およびクローン化されている（*Nagamatsu*ら、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*（1998）62：727）。 40

これまでのところ、この分野では、主要な綿害虫、*P. gossypiella* のBT毒素受容体の構造と機能に関する構造情報は得られていない。さらに、当該発明者らが知る限り、BT受容体上のBT毒素についてのコンセンサス結合ドメインをコードする最小結合断片は、まだ同定されていない。該最小結合断片の単離は、*P. gossypiella* のように世界中で経済的に重要な他の昆虫類から、重要でありながらまた特性解明されていないBT毒素受容体のクローニングおよび構造特性把握を可能にするであろう。

【0004】

発明の要旨

本発明は、本明細書でCry毒素受容体と記す、新規BT結晶毒素受容体の単離および発現についての情報および材料を提供する。大体において、当該発明は、本明細書ではBT 50

- R₂ と記す、新規鱗翅類 B T 毒素受容体の構造および機能の特性把握を提供する。

B . t h u r i n g i e n s i s 毒素に特異的に結合するピンクワタノミムシからの代替糖タンパク質受容体をコードする c D N A をクローン化し、配列決定し、特性を解明した。当該 B T - R₂ c D N A は、ピンクワタノミムシおよび作物の成長や発生に影響する他の昆虫や生物における受容体の分析を、ならびに、細胞毒性および可能性のある殺虫剤の結合親和性についての検定のデザインを、可能にする。本明細書に記載のクローンおよび他の方法は、天然の、および / または、導入相同の受容体の操作、従って、B . t h u r i n g i e n s i s の毒素に抵抗性のある昆虫を含む、標的宿主の生物、組織および / または細胞を特異的に破壊することを可能にする。

当該発明は、ピンクワタノミムシ、P . g o s s y p i e l l a の C r y 1 A 毒素に対する 200 k D 受容体をコードする、精製およびクローン化 c D N A を、さらに提供する。本発明の長所は、B T 毒素受容体上の毒素結合ドメインをコードする最小結合断片の同定である。本発明のもう一つの長所は、現在未詳の B T 受容体のクローニングおよび構造特性解明についての方法論の提供である。さらに、本発明は、毒素抵抗性の出現と戦う際に使用するための、有効な毒素結合受容体の同定およびデザインのための方法および材料を提供する。また、本発明は、毒素受容体を発現するトランスジェニック生物を作製するのに使用してもよい。

【0005】

現在好ましい典型的実施態様の詳細な説明

本発明は、当該発明の好ましい実施態様が表示されている、添付図面を以下に参照しながら、ここでさらに十分に説明される。しかし、本発明は、多くの異なる形で具体化が可能で、本明細書に示された実施態様に限定されると解釈するべきでなく；むしろ、本開示が完全無欠になるように、そして当該発明の範囲を当業者に十分伝えるように、これらの実施態様は提供されるものである。

略語および定義

本明細書を通じ下記の略語を使用する：b p - 塩基対；B T - B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s または B . t h u r i n g i e n s i s ；B T - R_x - X 型の B T 毒素受容体；B B M V - 膜小胞の刷子縁；c D N A - 相補的 D N A ；C r y 毒素 - B T のパラ孢子結晶毒素；I E F - 免疫電気泳動；k b - キロベースまたはキロ塩基対；k D - キロダルトン；K_d - 解離定数；L C₅₀ - 50 % 死亡率をもたらす致死濃度；P B W - ピンクワタノミムシ、P e c t i n o p h o r a g o s s y p i e l l a または P . g o s s y p i e l l a ；P C R - ポリメラーゼ連鎖反応；R A C E - c D N A 端の急速増幅；R T - 逆転写酵素；S W - カイコ (B o m b y x m o r i または B . m o r i) ；T H W - タバコスズメガ (M a n d u c a s e x t a または M . s e x t a) ；および U T R - 非翻訳領域。

【0006】

用語 “ X % 相同 ” は、T . A . T a t u s o v a および T . L . M a d d e n (1999) , “ B l a s t 2 s e q u e n c e s - a n e w t o o l f o r c o m p a r i n g p r o t e i n a n d n u c l e o t i d e s e q u e n c e s ” , F E M S M I C R O B I O L L E T T . 174 : 247 - 250 に記載されているブラスト (B L A S T) 相同性整列により、および下記のパラメーターを用いて、決定される、二つの核酸またはタンパク質の配列がどの程度同一かを、指す：プログラム (b l a s t n) または (b l a s t p) が適正；マトリックス (O B L O S U M 62) ；マッチに対するリワード (1) ；ミスマッチに対するペナルティー (- 2) ；オープンギャップ (5) およびエクステンションギャップ (2) ペナルティー；ギャップ X - ドロップオフ (50) ；エクスペクト (10) ；ワードサイズ (11) ；フィルター (オフ) 。これらのパラメーターを用いる二配列整列プログラムに基づくウェブの例は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html> で見られる。

それ故、当該発明は、本発明の配列に高度に似ている核酸およびタンパク質配列を含み、

また本明細書に記載の配列に 80、85、90、95 および 98 % 類似性の配列を含む。

【0007】

当該発明はまた、ゲノムまたは cDNA ライブラリーから単離または合成的に調製できる核酸配列、および本明細書の下記に記載されている核酸配列に由来する 400 ヌクレオチドプローブの全長に高度のストリンジェンシーの下にハイブリダイズする核酸配列を含む。高度のストリンジェンシーとは、60 の温度で 0.2 X SSC の最終洗浄を含むと定義される。計算では：

$$E f f \quad T m = 81.5 + 16.6 (\log M [N a +]) + 0.41 (\% G + C) - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

これらの条件で、50 % GC をもつ遺伝子の許容ミスマッチ比率は、約 12 % と推定される。 10

本明細書に記載の核酸およびタンパク質配列を、便宜を計って以下に表示する。

【0008】

【表 1】

配列番号：	DNA およびタンパク質配列
配列番号：1	<i>P. gossypiella</i> からの BT-R ₂ cDNA 配列 (図 1)
配列番号：2	<i>P. gossypiella</i> についての BT-R ₂ タンパク質配列 (図 2)

20

【0009】

【表 2】

配列番号:	プライマー配列	プライマー名
配列番号: 3	5' CAN ATH CGN GCN CAN GAY GGN GG 3'	BTR 1209U
配列番号: 4	5' TTG TAC ACS GCW GGS ATW TCC AC 3'	BTR 1355U
配列番号: 5	5' NAC YTG RTC RAT RTT RCA NGT CAT 3'	BTR 1486D
配列番号: 6	5' NCC DAT NAG RTC NGA RTC RTT NGA 3'	BTR 1657D
配列番号: 7	5' TAG GTT GTA TCC TCA GTA TGA GGA 3'	PBW-BTR GSP-1
配列番号: 8	5' CCA GAG TGG AGT CCA CCG CCA TA 3'	PBW-BTR GSP-2
配列番号: 9	5' CTG AGT AAG TGT TAT CTT GAA AG 3'	PBW-BTR GSP-3
配列番号: 10	5' CAN ATH CGN GCN CAN GAY GGN GG 3'	BTR 1209U
配列番号: 11	5' GAT AGC GGC CCC AGG AAC CAA CAA ACA GG 3'	PBW-BTR GSP-4
配列番号: 12	5' AGT GCG AGT GCT TTG AAT CTG TGA 3'	PBW-B'IR P2U
配列番号: 13	5' GTC TCT TCT CAC CGT CAC TGT CAC T 3'	PBW-BTR P5U
配列番号: 14	5' GCA TGC TGG CAG TAG GTT GTA TC 3'	PBW-BTR P6D
配列番号: 15	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'	(AUAP)
配列番号: 16	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'	(AP)

N = A, C, T, 又は G; H = A, T, 又は C; B = T, C, 又は G; D = A, T, 又は G; V = A, C, 又は G; R = A 又は G; Y = C 又は T; M = A 又は C; K = T 又は G; S = C 又は G; W = A 又は T

【0010】

さらに特に、本明細書に記載の研究は、新規 Cry 毒素受容体の同定、クローニング、および特性把握を標的とした。一つの実施態様は、以下“PBW”と記す、ピンクワタノミムシ、*P. gossypiella* の従来未同定の Cry 毒素受容体の特性把握および単離を指向した。

PBW の Cry 毒素受容体を同定および単離するために、五つの異なる Cry タンパク質 (Cry 1Aa, Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 3A および Cry 11A) について、新生児 PBW 幼虫に対する毒性を測定した。鱗翅類特異的毒素 (Cry 1Aa, Cry 1Ab および Cry 1Ac) は、PBW 幼虫に高い毒性を示し、 LC_{50} は $25 - 45 \text{ ng/cm}^3$ 昆虫餌料の範囲であったが、一方、甲虫類特異的 (Cry 3A) または双翅類特異的 (Cry 11A) 毒素は、 2000 ng/cm^3 まで何らの検出可能な毒性を示さないことが、明らかにされた (図 3)。

【0011】

10

20

30

40

50

三つの鱗翅類特異的Cry1A毒素(Cry1Aa, Cry1AbおよびCry1Ac)の、P. gossypiellaのBBMVへの結合を詳細に解明した。リガンドプロット実験は、120kDのタンパク質類がCry1Ac毒素にのみ結合するのに対し、200kDタンパク質がCry1Aa, Cry1AbおよびCry1Ac毒素に結合することを、示した。120kDタンパク質は熱ショックタンパク質であることが今ではわかっているが、Cry毒素作用へのその関係は不明である。

Bombyx moriからの175kDカドヘリン様Cry1Aa結合タンパク質の場合、¹²⁵I標識Cry1Aa結合は、非標識Cry1Aaの存在により排除されたが、¹²⁵I-Cry1Aaリガンドプロットにより確認された約110kDの別のバンドは、検出できる程度の競合を証明することはできなかった。したがって、P. gossypiellaは、M. sextaおよびB. moriのように、少なくとも一つのCry1A毒素に対して高親和性および低親和性の両結合タンパク質を含み、PBWからの前記200kDaタンパク質は、鱗翅類特異的Cry1A毒素に対する共通の結合タンパク質であることが、明らかになった。

10

【0012】

ピンクワタノミムシの中腸BBMVとのCry1A毒素相互作用の詳細な機構を明らかにした。それぞれCry1Aa, Cry1AbおよびCry1Acに対して、相同競合検定から計算した平衡解離定数(K_d) (図3Aおよび3B)は、16.5, 12.4および12.8nMおよび結合部位の濃度は3.7, 3.6および8.6pmol/mgである。三つのCry1A毒素に対するヒル係数は、BBMV結合タンパク質について0.6と0.8の間であり(図3A)、BBMV中の結合部位に対するそれらの毒素の結合には負の協同性があることを示している。Cry1A毒素類のBBMVタンパク質への結合は、特異的で可飽和性である。460μgのBBMVタンパク質の飽和に必要な毒素量は次の順序であった：Cry1Ac > Cry1Aa > Cry1Ab。

20

抗Cry1Ab抗血清とのBBMVタンパク質類の免疫沈澱および¹²⁵I-Cry1Ab毒素とのその後のリガンドプロットティングも、該毒素の約200kDタンパク質への結合を示した。その200kDタンパク質は、二次元(2D)ゲル分析により示されたように単一タンパク質である(データは示していない)。等電点(pI)4.3をもつM. sextaからの210kD結合タンパク質とP. gossypiella(pI 4.1)からの200kD結合タンパク質との比較から、両タンパク質はほぼ同じ等電点をもつことが明らかになった。200kD PBWタンパク質は、M. sexta BT-R₁ 210kDタンパク質に対するポリクローナル抗血清と多少の交差反応性をもつことがわかった。PBW BT-R₂遺伝子をクローン化するため、二つの受容体、タバコスズメガ(“THW”)BT-R₁およびカイコ(“SW”)BT-R175、のものの間の保存性アミノ酸配列に基づき、十分に縮重のプライマーをデザインした。該プライマー位置は、毒素結合に不可欠な細胞外ドメイン中の領域をコードすると、本発明者らにより考えられた配列を、含むか除くかするようにデザインされたが、本明細書では以下、該配列は“リード(READ)”サイン(signature)配列と記す。また以下、該DNA配列のこの結合断片は、“サイン”領域と記すこととする。

30

【0013】

三つのクローン、PBW-421(aa1367-1496), PBW-866(aa1210-1496)およびPBW-1373(aa1210-1675)が得られたが、それらは、THW BT-R₁およびSW BT-R175の両者に、約50%ヌクレオチドおよび約60%アミノ酸配列類似性をもつ。前記421塩基対および866塩基対クローンは、それぞれ約21および32kDのタンパク質をコードする。発現された両タンパク質は、THW BT-R₁ポリクローナル抗血清と交差反応したが、21kDタンパク質ではなく、32kDタンパク質の方は、Cry1Ab毒素と特異的に、高い親和性で結合することが示された。その推定 K_d 値は約17nMで、BBMVについて得られた K_d 値と同様である。同様に、PBW-866クローンからの内部断片は、毒素に結合しなかったが、BT-R₁抗体と交差反応をした。このデータは、抗BT-R₁抗体による認

40

50

識は、機能性毒素受容体を規定するには不十分なことを、証明している。完全長受容体をコードする cDNA 配列を得るために、5' および 3' RACE 反応を用いて PBW BT-R₂ 受容体の 5' および 3' 端をまず得て、次いで 5' および 3' UTR からの遺伝子特異的プライマーを用いて完全長受容体 cDNA のクローニングを行った。その完全長 cDNA クローン (配列番号 1) には、1729 個アミノ酸のオープンリーディングフレーム (配列番号 2) があり、194 kD の推定分子量および 2-D ゲル分析により測定された値と同様な 4.1 の計算 pI 値をもつ。

【0014】

当該タンパク質は三つのドメインから成る：すなわち、細胞外、膜貫通および細胞質ドメインである。該タンパク質配列は二つの疎水性領域を含み、一つはアミノ末端にあり、シグナルペプチドの特徴をもち、もう一つは COOH 末端付近 (アミノ酸 1575 - 1600) で、膜貫通ドメインを形成するらしい。細胞外ドメインは、12 のカドヘリン様モチーフに加えて、二つのロイシンジッパーモチーフを含む膜近位領域を、含む。N 結合糖鎖形成のための 11 のコンセンサス部位が細胞外領域に存在し、それが、天然タンパク質と計算された質量との見掛けの分子量の差を説明すると思われる。

上述の結果に基づき、受容体配列における、あるいは毒素結合親和性における、あるいは受容体発現における、変動が、異なるレベルの毒素感受性または抵抗性をもたらすことは、当業者には明らかであろう。さらに、本発明の受容体は、技術分野で周知の方法によりトランスジェニック生物の作出に使うことが可能である。

【0015】

BT 毒素の作用様式を調べるために、いくつかの理由から、哺乳動物異種細胞培養系を選んだ。第一に、BT Cry1A 毒素類は、これまでに調べられた何れの哺乳類細胞系にも毒作用を示さない。この特徴は、ほとんどの入手可能な昆虫細胞系が、毒素に対してさまざまな程度の感受性を示すのと、対照的である (Kwara, 1998)。第二に、哺乳類細胞の使用により、当該受容体が、昆虫細胞系中の何らの会合タンパク質と無関係に、毒性を媒介するかどうかを決定できることになる。

哺乳類 COS-7 細胞へ導入されると、当該クローン化 cDNA は、BT-R₁ 抗血清を用いるウェスタンブロット分析により検出される BT-R₂ を発現した。発現された受容体は、細胞表面にディスプレイされ、M. sexta BT-R₁ に対して高めたポリクローナル抗体で検出された。これらの結果は、PBW BT-R₂ cDNA により発現されたタンパク質が、該昆虫中腸に見られる天然タンパク質と同様であることを、示唆している。

BT 毒素類に対する受容体でトランスフェクトした COS-7 哺乳類細胞を、Cry1A 毒素の細胞毒性を査定するモデル系として使用する可能性について、裁定した。該表面受容体は、Cry1Ab 抗体を用いる免疫蛍光標識法により検出された Cry1Ab 毒素に、明らかに結合できた (データは示していない)。これらの結果は、当該受容体の結合部位がその未変性のコンホメーションをとっていることを示す。有意義にも、当該細胞を BT-R₁ 抗血清とインキュベートしたところ、メタノール固定されたトランスフェクト COS-7 細胞中に、強く標識された小胞が観察された (データは示していない)。この観察は、該細胞のエンドサイトーシス/エキソサイトーシス経路で通常形成する小胞が BT-R₂ タンパク質を含むことを、示している。加えて、この結果は、該受容体が、当該昆虫中腸でのその本来の対応物のように、細胞表面で発現されるだけでなく、細胞によって正常にリサイクルされることも、示している。

【0016】

Cry1Ab 毒素で処理されたトランスフェクト COS-7 細胞を、時間を変えて顕微鏡観察したところ、顕著な細胞病理学的パターンが証明された。蛍光顕微鏡下で観察された細胞病理学的変化は、形質膜の破壊、細胞膨張、細胞の分解および斃死を含んでいた。それらの徴候は、0.6 μg/ml Cry1Ab、2 時間の存在下で得られた。それに対して、ベクターだけをトランスフェクトし、その後毒素で処理した細胞については、細胞病理学的な影響は全く現れなかった。明らかに、表面受容体への毒素の結合と細胞への毒

10

20

30

40

50

性との間には、明瞭な相関関係がある。

B Tの調製物に中毒した後の、M . s e x t aおよび他の鱗翅類幼虫の中腸細胞の細胞学的外観および超微細構造は、複数の研究者によって詳しく報告されている (B r a v o ら , 1 9 9 2) 。 M . s e x t a 中腸に関する組織病理学的研究は、中腸上皮細胞 (円柱細胞) への C r y 1 A の病理学的挙動を証明した (M i d h o e ら , 1 9 9 9) 。これらの研究者は、中腸の上皮細胞が、B T毒素の摂取後間もなく、膨張するのを明らかにした。ついに、それらの上皮細胞は破裂し、その細胞質内容物を小腸内腔へ放出した。中毒したトランスフェクト C O S - 7 細胞についての本観察は、これらの報告と完全に一致し、両系において毒が同様に作用することを証明している。さらに、該 B T毒素受容体のトランスフェクト分子を発現する細胞ならびに該受容体の天然型を発現する細胞は、細胞毒性のレベルおよび毒素の作用様式の査定に使用可能なことが、当業者には自明のほうである。

10

【 0 0 1 7 】

鱗翅類の昆虫は、サイズが 1 6 0 から 2 2 0 k D の範囲の、C r y 1 A 毒素類に対する高分子量結合タンパク質を、一般に発現する (M a r t i n e z - R a m i r e z 1 9 9 4 ; V a d l a m u d i ら , 1 9 9 3 ; O d d o u ら , 1 9 9 3 ; N a g a m a t s u ら , 1 9 9 8 a ; I h a r a ら , 1 9 9 8) 。これらのタンパク質の二つは、2 0 0 k D ピンクワタノミムシ受容体の他に、クローン化され、配列決定された：すなわち、M . s e x t a からの B T - R₁ 2 1 0 k D カドヘリン関連受容体 (V a d l a m u d i ら , 1 9 9 5) および B . m o r i からの 1 7 5 k D カドヘリン関連受容体 (N a g a m a t s u ら , 1 9 9 8 a) である。興味深いことに、これら二つのタンパク質は、両者間で 6 0 - 7 0 % 同一性および 8 0 % 類似性をもつ。

20

P . g o s s y p i e l l a は、少なくとも一つの C r y 1 A 毒素、C r y 1 A c に対する高親和性および低親和性結合タンパク質を発現する。その高親和性受容体は、大きな分子量のカドヘリン関連タンパク質である。最も重要な保存領域の一つはサイン (s i g n a t u r e) 配列と思われる。該サイン配列は配列 (R E A D) を含むが、それは、毒素結合部位の二つのアルギニンに結合する二つの負に荷電したアミノ酸の存在により、毒結合に関与すると考えられている。裏付ける証拠は、前記サイン配列を含むクローン P B W - 8 6 6 , およびサイン配列を含まない P B W - 4 2 1 についての免疫ブロット分析から、得られる。該最小結合断片をさらに規定するため、短小化ペプチド類について、毒素を結合するそれらの能力をテストした (図 4) 。当該最小結合断片は、“ R E A D ” サイン配列を含み、アミノ酸 1 2 6 9 番から 1 3 6 7 番で構成する。

30

本明細書に提供される情報は、ピンクワタノミムシの毒素受容体の分子生物学を理解する上で、また野外におけるより長期の持続性、より高い毒性、および抵抗性発生の妨害についての有効な毒素を操作するためにも、必要である。この情報は、他の経済的に重要な作物害虫における C r y 毒素受容体相互作用の理解を助けるはずである。

【 0 0 1 8 】

【 実施例 】

実施例 1 精製された毒素類の特異性

組換えプロトキシン類 C r y 1 A a , C r y 1 A b , および C r y 1 A c (B a c i l l u s G e n e t i c S t o c k C e n t e r , オハイオ州大) を、E . c o l i J M - 1 0 3 から調製し、L e e ら J . B i o l . C h e m . (1 9 9 2) 2 6 7 : 3 1 1 5 による記載にほぼ従いトリプシン処理した。さらに、その可溶性トリプシン処理 6 0 k D 毒素類を、H R - 5 / 5 M o n o - Q 陰イオン交換カラム (P H A R M A C I A^T M) 上で、F P L C 塩化ナトリウム塩濃度勾配精製に付した後、定量、^{1 2 5} I 標識し、そしてバイオアッセイに使用した。B . t h u r i n g i e n s i s s u b s p . t e n e b r i o n i s からの C r y 3 A 結晶タンパク質を、3 . 3 M 臭化ナトリウム中で可溶化し、パパインで処理し、そして得られた 6 7 k D 毒素を、L i ら N a t u r e (1 9 9 1) 3 5 3 : 8 1 5 の方法により精製した。6 5 k D C r y 1 1 A 毒素は、B . t h u r i n g i e n s i s s u b s p . i s r a e l e n s i s から C h i l c o

40

50

ttら J. Gen. Micro (1988) 134:1551 により記載されているように可溶化により単離し、さらに陰イオン交換 FPLC により精製した。すべての毒素タンパク質定量は、牛血清アルブミン (BSA, 画分 V) を標準品として、バイシンコニン酸法 (PIERCE CHEMICALTM) を用いて実施した。

【0019】

ピンクワタノミムシは、USDA PINK BOLLWORM REARING FACILITYTM (PBWRF, Phoenix, AZ) から入手した。人工飼料は、SOUTHLAND PRODUCTS INC.TM, Lake Village, AR から入手した。該飼料は、沸騰水中で再構成し、55 に冷却した。各 Cry 毒素は、温液体飼料中で完全に混合し、バイオアッセイ用カップは 20 ml の飼料で充たした。冷却および乾燥後、10 匹の新生幼虫を各カップにいれ、カップは直ちに蓋をした。Watsonら, Beltwide Cotton Conference, Memphis, Tenn. (1995) の方法を用い、P. gossypiella の 1 齢幼虫に対するトリプシン活性化毒素類の毒性を測定した。通常、各用量につき、6 カップの 4 複製を調製した。カップは 30 で 21 日間インキュベートしたが、これは、正常な P. gossypiella の 95% 以上が蛹化に達するのに必要な期間である。21 日が終わったところで、飼料カップを調べ、各カップ中の幼虫の数、および蛹と成虫の数とを記録した。

新生 P. gossypiella 幼虫を用いてテストした精製 Cry 1Aa, Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 3A および Cry 2A の比毒性を、図 3B に示す。3 種の Cry 1A 毒素はすべて毒性が高く、LC₅₀ 値は 25 - 45 ng/cm³ 人工飼料当り、の範囲であった。Cry 3A (鞘翅類すなわち甲虫類に有毒とされる) および Cry IIA (双翅類、特に蚊に有毒とされる) は、テストした最高濃度 (2000 ng/cm³) でも P. gossypiella 幼虫に毒性を示さなかった。

【0020】

実施例 2 BT-R₂ 受容体の特性解明

4 齢初期幼虫を 1 時間氷上に置き、それらの幼虫から中腸を外科的に取出した。Wolfsbergerら, Comp. Biochem. Physiol. (1987) 86A:30, の示差マグネシウム沈澱法により、プロテアーゼインヒビター類 (5 mg/ml のペプスタチン、アンチパイン、アプロトニン、ロイペプチン、1 mM PMSF、および 5 mM ベンザミジン) の存在下で、中腸組織から BBMV を調製した。最終ペレットは、プロテアーゼインヒビター類を含む A 緩衝液 (300 mM マニトール, 5 mM EGTA, および 17 mM Tris-HCl, pH 7.5) 中に再懸濁し、液体窒素中で瞬間凍結し、-85 で貯蔵した。

【0021】

Cry 毒素類は、クロラミン T 法 (Hunter および Greenwood, Nature (1962) 194:495, ¹²⁵I-Na (NEN DUPONTTM) による) を用いて、¹²⁵I 標識した。10 μg の毒素を、25 μl のクロラミン T (4 mg/ml) を含む 100 μl の NaHPO₄ 緩衝液 (0.5 M, pH 7.4) 中で、5 μl の ¹²⁵I-Na (0.5 mCi) と混合した。反応混合物は 23 で 20 - 25 秒間攪拌し、そして 50 μl の Na₂S₂O₅ (4.4 mg/ml) を添加して反応を停止させた。遊離のヨウ素は、10 mg/ml BSA を含む PBS で平衡化した EXCELULOSETM 脱塩カラム (PIERCETM) 上のゲル濾過により、除去した。

【0022】

毒素結合アッセイ

同種および異種両競合阻害結合アッセイを、Keeton および Bulla (1997) による記載のように実施した。全量 25 μg の BBMV を、次第に濃度を上げた (0 - 1000 nM) 適当な非標識同種毒素 (Cry 1Ac) または異種毒素 (Cry 1Aa, Cry 1Ab, Cry 3A および Cry 11A) の存在下で、1.2 nM ¹²⁵I-Cry 1Ac 毒素とインキュベートした。インキュベーションは、100 μl の結合緩衝液 (PBS / 0.2% BSA) 中、25 で 30 分間行った。放射線標識および非標識毒素類を

、BBMVに加える前に、混合した。非結合の毒素は、BBMV結合毒素から、 $14,000 \times g$ で10分間の遠心分離により分離した。結合毒素を含むペレットは、氷冷結合緩衝液中で緩い渦撹拌により3回洗い、最終ペレット中の放射能をBECKMAN GAMMA 5500^{T M} カウンターを用いて測定した。結合データは、PRISM^{T M} プログラム (GRAPHPAD SOFTWARE INC.^{T M}, San Diego) により分析した。

【0023】

¹²⁵I-Cry1Ac毒素のP. gossypiellaへの競合阻害結合は、次第に濃度を増加させた非標識Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa, Cry3AおよびCry11A毒素類の存在下で実行した。同種競合結合アッセイは、ヨウ素化Cry1A毒素および各種濃度の対応非標識毒素で実施した。標識毒素の結合部位濃度 (B_{max}) および解離定数 (K_d) は、3回の別個の実験から計算した。平衡結合パラメーター類は、データをPRISM^{T M} コンピュータープログラムで分析することにより推定した。

【0024】

ラジオリガンド プロッティング

200 μg のBBMVタンパク質を、FrancisおよびBulla (1997) による記載のように、可溶化し、7.5% SDS-PAGEにより分離し、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転移した。プロットは、5%脱脂ドライミルクパウダー、5%グリセロール、0.5% Tween-20, および0.025% アジ化ナトリウムを含むTBS (10 mM Tris-HCl および0.9% 塩化ナトリウム) により、25

で2時間遮断した。遮断緩衝液を除き、膜は、非標識毒素の存在または不在のいずれかで、 2×10^5 cpm/ml ($1-1.25$ nM) ¹²⁵I-Cry1A毒素類を含む等容量の新しい遮断緩衝液中、25 で2時間インキュベートした。最後に、膜は、新しい遮断緩衝液で各10分間3回洗い、TBSで1回すすぎ、乾燥し、-80 でKodak X線フィルムに露出した。

200および120 kDタンパク質への結合の特異性を明らかにするため、PBW BBMVタンパク質類のプロットを、次第に濃度を増加させた非標識Cry1Ac毒素の存在下で、¹²⁵I-Cry1Ac毒素とインキュベートした。

【0025】

Cry1Ab結合タンパク質の免疫沈澱

免疫沈澱は、Vadlamudiら (1993) に従って実行した。25 μl のCry1Ab抗血清を、洗浄緩衝液 (1% Nonidet P-40, 6 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl および250 mM 塩化ナトリウム) 中で平衡化した1 mlのprotein A-Sepharose CL-4Bへ加え、4 で1時間混合した。該プロットを洗浄緩衝液で3回洗った後、700 μg のCry1Ab毒素を加え、該混合物を4 でさらに1時間インキュベートし、洗浄緩衝液で3回再び洗浄した。ピンクワタノミシBBMVタンパク質類 (6 mg) を、1% NP-40 およびプロテアーゼインヒビター類 (10 μg /ml ペプスタチン、アンチパイン、アプロトニンおよびロイペプチン; 5 mM ヨードアセタミド; および1 mM PMSF) を含む洗浄緩衝液中で可溶化した。非可溶化タンパク質は遠心分離により除去した。可溶化されたタンパク質は、0.45 μm フィルターを通して濾過し、1 mlのCry1Ab毒素へ結合したSepharose-protein Aビーズへ添加し、そしてその試料を4 で1時間ゆっくり攪拌した。Sepharoseビーズは、遠心分離し、0.25% NP-40 および0.02% SDSを含む洗浄緩衝液で4回洗浄した。その毒素結合タンパク質複合体は、Laemmli (1970) 試料緩衝液中で加熱して解離させ、そして該結合タンパク質類は、クーマシー染色し、¹²⁵I-Cry1AbによるリガンドプロットとCry1Ab抗血清を用いるウェスタンブロットにより検出した。

【0026】

ピンクワタノミシCry1A受容体の免疫検出

免疫沈澱したタンパク質をPVDF膜に移し、PBS緩衝液中5%脱脂ドライミルクで遮

10

20

30

40

50

断し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCry 1 Abを含む同じ遮断緩衝液中、4 で一晩インキュベートした。非結合毒素はPBSで洗浄した。 60 kD Cry 1 Ab毒素に対して家兎で高めた抗体を、 $1:1000$ に希釈し、前記膜に25 で2時間ハイブリダイズさせ、次いでそのプロットをPBSで洗浄した。ペルオキシダーゼ接合ヤギ抗家兎IgGをTBS遮断緩衝液中 $1:3000$ に希釈し、膜に2時間ハイブリダイズさせた。次に、膜をPBSで徹底的に洗浄した。結合毒素の可視化は、the Enhanced Chemiluminescence (ECL) ウェスタンブロット検出法 (AMERSHAMTM) を用いて達成した。

【0027】

サザンブロット分析

P. gossypii ellaまたはM. sextaからの $40 \mu\text{g}$ のPvuH消化ゲノムDNAを、 0.8% $1 \times$ TBEアガロースゲル上で分離し、ナイロン膜 (BIO-RADTM, ZETA-PROBE GTTM) 上へプロットした。分析は、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) に従って行った。該フィルターは、BT-R₁cDNAの³²P標識ランダムプライムドC末端 (HincH断片, 0.5 kb) とハイブリダイズした。フィルターハイブリッド形成は、 50% ホルムアミド、 $5 \times$ Denhardt試薬, 1 M 塩化ナトリウム, 2% SDS, 50 mM Tris-HClおよび $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子DNA中、 42°C で21時間行った。該フィルターは、 $2 \times$ SSC, 0.5% SDSで、次に $1 \times$ SSC, 0.5% SDSで、次に $0.5 \times$ SSC, 0.5% SDS, 次いで4番目に $0.25 \times$ SSC, 0.5% SDSで洗浄した。各洗浄は 42°C 30分間である。最後に、該フィルターを $2 \times$ SSCですすぎ、Kodak X線フィルムに -85°C で露出した。

【0028】

タンパク質の電気泳動溶出

電気泳動は、 7.5% アクリルアミド ($\text{pH } 8.0$) を用いる、厚さ 1.5 mm のポリアクリルアミド スラブ ゲル中で実施した。SDS-PAGE後、タンパク質は、 4 M 酢酸ナトリウム溶液で透明なバンドとして明らかにした。それらのタンパク質は、かみそりの刃を用いて切り取った。ゲル片中のタンパク質は、 50% (v/v) メタノール溶液中15分間固定し、 0.125 M Tris-HCl緩衝液 ($\text{pH } 6.8$) および 2% 2-メルカプトエタノール中、さらに15分間2回平衡化した。 1% (w/v) SDSを加えた上記緩衝液中での当該ゲル片の平衡化は、上記のように実施した。平衡化したゲル片は、SDS (25 mM Tris, 190 mM グリシンおよび 0.1% SDS) を含む最少量の該緩衝液とともに、透析チューブへ挿入した。電気溶出は、実質的にFindlay (1990) による記載のように行った。水平 flat-bed-mini-gel 電気泳動装置 (BIO-RADTM) を、 50 V 、12時間、4 の電気溶出に使用した。緩衝液は 25 mM Tris, 190 mM グリシンおよび 0.1% SDS ($\text{pH } 8.3$) である。電気泳動の終りに、電極の極性を30秒間変え、透析チューブへのタンパク質の吸着を防いだ。透析チューブ内の緩衝液を集め、チューブは最少容量の緩衝液で3回洗浄した。SDSを透析で除き、タンパク質はCENTRICON-30ミクロ濃縮器 (AMICON) を用いて濃縮した。

【0029】

二次元ゲル電気泳動

二次元ゲル電気泳動は、O'Farrell (1975) の方法に従って実施した。等電点電気泳動は、 2.0 mm (内径) ガラス管中で 2.0% アンホライン (ampholine) ($\text{pH } 3.5 - 10$; LKB/PHARMACIATM) を用い、 9600 volt-hr で行った。緩衝液`O中で10分間平衡化後、チューブゲルを、 8% アクリルアミド ($\text{pH } 8.0$) スラブゲル ($14 \times 14 \text{ cm}$) の先端のスタッピングゲルに当てた。SDSスラブゲル電気泳動は、 12.5 mA で4時間行った。電気泳動後、一つ

10

20

30

40

50

のゲルはクーマシーブルーで染色し、その他のゲルはP V D F ペーパー上へ200mAで一晩トランスブロットした(Vadlamudiら, 1993)。P V D F ペーパーは、パウダードミルク溶液で遮断し、¹²⁵I - C r y 1 A cまたは¹²⁵I - C r y 1 A bとインキュベートし、-85℃でX線フィルムに露出した。

【0030】

B T - R₂ をコードするcDNAの同定および回収

全RNAを、PBWの4齢幼虫の中腸組織から、グアニジニウムチオシアネート法(Chomczynskiら Analyt. Biochem. (1987) 162:156)により、調製した。ポリ(A⁺)RNAを、POLYACTRACT MRNA ISOLATION SYSTEMTM (PROMEGATM)で単離した。第1鎖cDNAは、オリゴ(dT)およびランダムヘキサマープライマー類および逆転写酵素を用い、標準的な方式に従って合成し、所望のmRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅の鋳型として用いた。縮重オリゴヌクレオチドプライマー類は、M. sexta B T - R₁ およびB. mori B T - R 175間の保存性アミノ酸に基づきデザインした。そうしたプライマー類は、PBW B T - R₂ の部分断片のクローン化に使用した。

10

【0031】

PBW B T - R₂ のクローニングのために、M. sexta B T - R₁ およびB. mori B T - R 175の間の膜近位ドメイン保存配列中の配列由来の完全縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用い、RT-PCRを採用した。B T - R - 1486Dに対するプライマーB T - R - 1355UおよびB T - R - 1209Uを、PBW cDNAに適用し、421kbおよび866kb断片を増幅した。PCR産物は、1.5%アガロース上で分離し、ゲル精製して、T Aクローニングベクター(INVITROGENTM)中へクローン化し、そしてE. coli INV F中へ形質転換した。正しい挿入断片の存在と同一性は、EcoR1消化およびDNA塩基配列決定で確認した。PBW - 866クローンは、クローンPBW - 421中に見られるヌクレオチド配列を含むことがわかった。さらに、1657Dに対するプライマー1209Uを用いて、膜近位ドメインおよび細胞質ドメインの大部分を表す1373kb断片(PBW - 1373)をクローン化した。クローンPBW - 287(a a 1346 - 1438)は、866kbクローンからの287kb内部断片で、遺伝子特異的プライマーP5およびP6を用いてクローン化した。

20

【0032】

該部分クローン類から得た配列に基づき、センスおよびアンチセンスプライマーを用いて、5'および3' RACEシステムにより、当該製造会社の説明書(GIBCO BRLTM)に従って、PBW B T - R₂ クローンの3'および5'端をクローン化した。該5'端は、キット中にあるABRIDGED UNIVERSAL AMPLIFICATION PRIMERTM (AUAPTM)に対する遺伝子特異的アンチセンスプライマーGSP1, GSP2およびGSP3を用いて、増幅した。3'端は、AUAPTMに対する遺伝子プライマーGSP4を用いて増幅した。予測サイズのPCR産物を単離し、T AクローニングベクターpCR2.1(INVITROGENTM)中へサブクローン化し、そしてE. coli INV F中へ形質転換した。E. coliまたはCOS7細胞中での組換えタンパク質発現のため、RT-PCRクローンまたは完全長PBW - B T - R₂ クローンのコード配列を、pET30またはpcDNA3.1発現ベクター中へ再クローン化し、そしてBL21(DE3) LysS(NOVAGENTM)またはCOS7哺乳類細胞中へ形質転換した。E. coli培養は、1mM終濃度のIPTGを用い3時間誘導した。

30

40

【0033】

完全長PBW B T - R₂ (~5.5kb; 配列は図1配列番号1を参照されたい)を、哺乳類発現ベクターpcDNA3.1(INVITROGENTM)中へ結合し、DNA塩基配列決定により確認した。その推定ポリペプチドの分子量は194kDで、pIは4.1である。該受容体は1729個アミノ酸のオープンリーディングフレームをもつ(図2)(配列番号2)。該アミノ酸配列は、23アミノ酸残基の推定シグナルペプチド、2

50

7 残基の膜貫通ドメイン (a a 1 5 7 8 - 1 6 0 5) および 1 2 4 残基細胞質ドメインを含む。さらに、該アミノ酸配列は、1 2 の推定カドヘリンモチーフ、1 1 の推定 N - 糖鎖形成部位およびアミノ酸 1 5 4 1 - 1 5 6 2 と 1 5 7 8 - 1 6 0 0 に二つのロイシンジッパーモチーフを含む。最小毒素結合断片はアミノ酸 1 2 6 9 から 1 3 6 7 である (図 4)。

【 0 0 3 4 】

該タンパク質相同性を、既出の定義のところで記載のように、B L A S T P により分析すると、G e n B a n k 非冗長 (n o n r e d u n d a n n t (n r)) データベース中の最も近いパラログは、A c c . N o . J E 0 1 2 8 にある B o m b y x m o r i 受容体で、I d e n t i t i e s = 1 0 3 4 / 1 7 0 8 (6 0 %) , P o s i t i v e s = 1 2 6 6 / 1 7 0 8 (7 3 %) , G a p s = 3 5 / 1 7 0 8 (2 %) である。次に近い種は、A c c . N o . A A B 3 3 7 5 8 . 1 の M a n d u c a s e x t a で、I d e n t i t i e s = 8 7 1 / 1 5 4 0 (5 6 %) , P o s i t i v e s = 1 1 0 1 / 1 5 4 0 (7 0 %) , G a p s = 2 2 / 1 5 4 0 (1 %) である。該ヌクレオチド配列は有意な相同性を示さなかった。

10

【 0 0 3 5 】

これら 3 種間のペプチド相同性は図 5 A - C に示し、完全に保存されている残基は箱囲いしてある。S B W 配列のペプチド断片を使って、特異的または非特異的抗体の作製が可能である。通常、抗体を作出するには少なくとも 1 7 アミノ酸ペプチド断片が使われるが、もっと小さなペプチドでも、抗原性があり、独特であるために十分複雑なこともある。特に、P B W 配列のカルボキシル尾部 (a a 1 6 7 7 - 末端) は、この種に独特で、P B W 独特の抗体を作製するのに使用可能である。抗原として有用と思われる典型的なペプチド (図 5、配列番号 2 についての番号で) を、以下に示す：

20

【 0 0 3 6 】

【 表 3 】

PBW独特ペプチド	通常ペプチド
a a 534-544	a a 291-304
a a 697-705	a a 622-632
a a 886-895	a a 791-803
a a 1055-1066	a a 1621-1642
a a 1321-1331	
a a 1451-1461	
a a 1516-1525	
a a 1572-1582	
a a 1677-1729	

30

【 0 0 3 7 】

発現 B T - R₂ タンパク質の免疫検出

誘導性 B L 2 1 (D E 3) L y s S 細菌培養からの細胞溶解物を電気泳動に付し、P V D F 膜に移した。フィルターは、1 0 μ g / m l の C r y 1 A b 毒素を含む 5 0 m l の遮断緩衝液中 4 で遮断した。非結合毒素は P B S により除去した。T H W に対する家兔一次抗体は P B S により除去した。細胞外ドメイン T H W B T - R に対するまたは F P L C 精製 C r y 1 A b に対する家兔一次抗体は、5 0 m l T B S 遮断緩衝液で 1 : 1 0 0 0 に希釈した。フィルターは、抗血清と 2 時間インキュベートし、遮断緩衝液で 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ接合ヤギ抗家兔 I g G を 1 : 2 0 0 0 に希釈し、2 7 で 2 時間フィルターとともにインキュベートして、そして高度化学発光 (t h e e n h a n c

40

50

ed chemoluminescence (ECL)) 検出システム (AMERSHAMTM) で現像させた。

【0038】

BT-R₂ の哺乳類発現

哺乳類発現ベクター pcDNA3.1 (INVITROGENTM) 中へクローン化した PBW BT-R₂ cDNA を、Keeton および Bulla, Appl. Environ. Microbiol. (1997) 63:3419 により記載の方法に従って、哺乳類細胞 (COS-7 SV40 形質転換アフリカミドリザル細胞; ATCC CRL-1651) 中で発現させた。COS-7 細胞 (4 × 10⁴ / ウエル) を、24 ウエル・プレート中に置いた 12 mm カバースリップ上で、10% 加熱不活性化胎児牛血清 (FBS) を補充した Dulbecco の修飾 Eagle 培地 (DMEM) 中で、増殖させた。

10

【0039】

COS-7 細胞は、LIPOFECTAMIN PLUS REAGENTTM (GIBCO BRLTM) を用いて、該構築物でトランスフェクトした。細胞は、10% CO₂ の湿気の多い雰囲気中で、10% FBS を含む DMEM 培地中、37 °C で 2 日間インキュベートした。BT-R₂ は、SDS-PAGE および抗 BT-R₁ または抗 Cry1Ab 抗血清によるイムノブロッティングによりモニターした。表面発現は、抗 BT-R₁ 抗体による免疫蛍光顕微鏡法により、検出した。トランスフェクトされた細胞への BT 毒素の影響は、Cry1Ab 毒素の存在または不在下で、当該細胞を 2 または 4 時間インキュベートし、そして抗 BT-R₁ または抗 Cry1Ab 抗体の何れかを用い、免疫蛍光顕微鏡により形態的变化をモニターすることにより、証明した。細胞死が明らかに証明される (示していない)。

20

【0040】

免疫蛍光顕微鏡法

COS-7 細胞を、24 ウエル・プレート中 12 mm ガラスカバースリップ上で、増殖させた。細胞を固定し、冷メタノール (-20 °C) または 4% パラホルムアルデヒド中、27 °C で 15 分間浸透化した。カバースリップを、PBS で 3 回すすぎ、次いで PBS 中の 1% BSA で 15 分間遮断した。細胞は、一次抗体と 27 °C で 30 分間インキュベートし、次いで上記のようにすすぎと遮断を行った。同じインキュベーションおよび洗浄処置を二次抗体に適用した。抗体は TRITC ヤギ抗家兎 IgG で検出した。カバースリップを FLUOROMOUNT GTM に装着し、エピ蛍光照明および 40X アポクロマートレンズを備えた OLYMPUSTM 顕微鏡で観察した。写真撮影は OLYMPUS SPO TTM カメラで行った。

30

【0041】

ウェスタンブロット分析

トランスフェクトされた COS-7 細胞を、冷 PBS で洗浄し、溶解緩衝液 (50 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, 10 μM ロイペプチン) 中で細胞溶解し、氷冷下 10 分間再懸濁した。次いで、4X 試料緩衝液を当該細胞に添加し、95 °C で 5 分間加熱した。溶解物は 7.5% SDS-PAGE による電気泳動に付し、タンパク質を電気泳動的に PVDF フィルターに移し、遮断し、そして抗 BT-R₁ または抗 Cry1Ab 抗体とインキュベートした。

40

【0042】

結果: ¹²⁵I - Cry1A 結合タンパク質の同定

P. gossypiella の BBMV タンパク質類は、SDS-PAGE により測定すると、分子サイズが 205 kD 以上から 25 kD 以下までの範囲にあった (データは示していない)。¹²⁵I 標識 Cry1Aa, Cry1Ab および Cry1Ac をリガンドブロットに使用して、どの P. gossypiella BBMV タンパク質がそれぞれの毒素に結合するかを同定した。SDS-PAGE により分離されたタンパク質は、PVDF 膜に移され、放射能標識された各毒素と個別にインキュベートされた。¹²⁵I - Cry

50

1 A a , ^{1 2 5} I - C r y 1 A b および ^{1 2 5} I - C r y 1 A c は、約 2 0 0 k D のタンパク質に結合した（データは示してない）。^{1 2 5} I - C r y 1 A c は約 1 2 0 k D にあるタンパク質バンドにも結合した。C r y 1 A a および C r y 1 A b はいずれも、1 2 0 k D タンパク質には結合しなかった。3 種の毒素すべての結合パターンは、還元および非還元いずれの条件でも、同じであった（データは示してない）。

【 0 0 4 3 】

結果：競合阻害結合アッセイ

^{1 2 5} I - 標識 C r y 1 A a , C r y 1 A b および C r y 1 A c を、P . g o s s y p i e l l a B B M V との結合アッセイに使用した。^{1 2 5} I - C r y 1 A c 毒素の P . g o s s y p i e l l a への競合結合は、次第に濃度を増加させた非標識 C r y 1 A a , C r y 1 A b , C r y 1 A c , C r y 3 A および C r y 1 1 A 毒素類の存在下で行った。C r y 1 A c 結合の 5 0 % 阻害は、1 0 n M の非標識 C r y 1 A c , 1 0 0 n M の非標識 C r y 1 A a および 1 0 0 n M の非標識 C r y 1 A b で観察された。1 0 0 0 n M の濃度で、非標識 C r y 1 A c , C r y 1 A b および C r y 1 A a は、ヨウ素化 C r y 1 A c の結合をそれぞれ 9 5 、 8 2 および 8 0 % 減少させた（データは示してない）。C r y 3 A および C r y 1 1 A 毒素はいずれも、C r y 1 A c 毒素結合部位に競合しなかった。

【 0 0 4 4 】

同種競合結合アッセイはヨウ素化 C r y 1 A 毒素で実施し、さまざまな濃度の対応非標識毒素 C r y 1 A a , C r y 1 A b および C r y 1 A c は B B W タンパク質に対し高い結合親和性を示した（データは示してない）。C r y 1 A 毒素類の結合の 5 0 % 阻害は、対応する非標識毒素の約 1 0 n M の濃度で観察された。これらのデータは、それらの 3 種の毒素のそれぞれが、高い親和性で特異的に結合することを、示している。各毒素の結合部位濃度 B_{max} および解離定数 K_d は、G R A P H A D コンピュータープログラムでデータを分析することにより、3 回の別々の同種競合阻害実験から計算した（表 1）。 K_d 値はすべて同様に低 n M 範囲にあったが、C r y 1 A c に対する B_{max} は C r y 1 A a または C r y 1 A b より高かった。C r y 1 A a , C r y 1 A b および C r y 1 A c に対するヒル係数は、それぞれ 0 . 6 5 , 0 . 6 5 および 0 . 7 7 で、B B M V タンパク質に対する毒素類について負の結合協力性を示していた。C r y 1 A a および C r y 1 A b の両者についての非線形回帰分析に基づき、単一結合部位モデルが示された。重要なことだが、C r y 1 A c についてのデータは、高および低親和性結合部位をもつ、二結合部位モデルが最も合致していた。

【 0 0 4 5 】

結果：リガンドプロットにおける ^{1 2 5} I - C r y 1 A c 毒素結合の特異性

C r y 1 A c 毒素について予測された推定 “二結合部位” モデルを顧慮して、P . g o s s y p i e l l a B B M V タンパク質のラジオリガンドプロットを、次第に濃度を上げた非標識 C r y 1 A c 毒素の存在下で、^{1 2 5} I - C r y 1 A c 毒素を用いて行った。これらのプロットのオートラジオグラフィーは、2 0 0 k D バンドの強度に顕著な減少を明らかにした（データは示してない）。実際、1 0 n M の C r y 1 A c 毒素濃度でそれは検出できなかった。しかし、1 2 0 k D バンドの場合、1 0 0 0 n M の C r y 1 A c 濃度でも、バンド強度に実質的な減少はなかった（データは示してない）。飽和結合アッセイでは、一定量の各 3 種の ^{1 2 5} I - C r y 1 A 毒素を次第に濃度を上げた B B M V とインキュベーションしたところ、いずれの場合も結合は飽和レベルに達したが、C r y 1 A c 結合のレベルは C r y 1 A a および C r y 1 A b のものより相当高いことがわかった。4 0 0 μ g / m l の B B M V での最大飽和結合は、C r y 1 A a , C r y 1 A b および C r y 1 A c についてそれぞれ 0 . 3 5 , 0 . 0 5 および 1 . 5 n g で、C r y 1 A b に比べて C r y 1 A c 結合には約 3 0 倍の、また C r y 1 A a に比べて C r y 1 A c の方が 4 倍高いことを表している（データは示してない）。

【 0 0 4 6 】

結果：C r y 1 A b 結合タンパク質の免疫沈澱

免疫沈澱実験を、前記 3 種の毒素のうち最も高い結合親和性をもつ C r y 1 A b を用いて

行ったが、それは、該毒素の200 kDタンパク質への結合の特異性をさらに調べるためである。BBMVタンパク質を1%NONIDET P-40TM中で可溶化し、抗毒素protein A-Sepharoseビーズと免疫沈澱させた。結合した物質の混合物を、2-メルカプトエタノールを含むSDS試料緩衝液中で可溶化した。電気泳動とゲルのクーマシーブルーでの染色から、約200 kDaのタンパク質が明かとなり、200 kD毒素結合タンパク質の選択的沈澱が証明された。^{1 2 5} I-Cry 1 Abでのラジオリガンドプロテイングは、約200 kDaのバンドを示し(データは示してない)、前のリガンドプロット実験で確認されたのと同じ結合タンパク質の沈澱を表していた。加えて、Cry 1 Abおよび抗Cry 1 Abポリクローナル抗血清を用いた、免疫沈澱タンパク質のウェスタンブロット(データは示してない)は、ラジオリガンドプロットの結果を裏付けた(データは示してない)。60および52 kDaの低分子量バンドは、それぞれCry 1 Ab毒素およびIgGの重鎖に相当する。

10

【0047】

結果：結合タンパク質の精製

200 kDバンドが一つ以上のタンパク質を含むかどうかを明らかにするため、7.5% SDSポリアクリルアミドゲルから当該バンドを切り出し、電気溶出、透析、そして濃縮を行った。濃縮タンパク質を、pH範囲3.5-10にわたって二次元ゲル電気泳動により分析した。該タンパク質は、4.5±0.2の推定pIおよび200 kDaの見掛け分子量をもつ一つのスポットとして移動した。精製された200 kDタンパク質は、シッフ試薬で染色したところ(データは示してない)、結合タンパク質は糖鎖形成していることが明らかになった。^{1 2 5} I-Cry 1 Abを結合した200 kD IEFスポット(データは示してない)は、他の免疫沈澱研究の結果を確認している。

20

【0048】

サザンブロット分析

P.gossypie11a中にCry 1 A受容体の存在を検出するために、両昆虫からのゲノムDNAを、クローン化THW BT-R₁cDNAおよびその507-bp最小結合断片に対して、ハイブリッド形成させた。それら二つのプローブは、M.sex1aゲノムDNAのPvuH断片に強く結合した(データは示してない)。しかし、該最小結合プローブを用いた場合には、P.gossypie11a DNAに弱いハイブリッド形成があり、完全長BT-R₁プローブでは全く認められなかった(データは示してない)。これらの結果は、M.sex1aからの最小結合断片が、該完全長BT-R₁受容体に対するより、ずっとP.gossypie11a中のCry 1 A結合受容体に、有意レベルのヌクレオチド類似性を共有することを、示唆している。

30

【0049】

結果：BT-R₁抗体を用いる未変性およびクローン化PSW BT-R₂の免疫検出

クローン化PBW断片のTHW BT-R₁に対する近縁性および毒素を結合するその能力を確かめるため、それを、pET30発現ベクター中へサブクローン化した。未変性PBW BBMVタンパク質およびクローンPBW-287, -421および-866から発現されたタンパク質を、SDS-PAGEにより分離し、PVDF膜へ移し、抗BT-R₁血清またはCry 1 Ab毒素と、次いで該毒素に対する抗血清と、インキュベートした。その結果、BBMVは、THW BT-R₁抗血清と相互作用する200 kDタンパク質を含むことが明らかになった(データは示してない)。さらに、それぞれ約15、21および32 kDのタンパク質を発現するクローンPBW-287, -421および-866も、BT-R₁抗血清と交差反応した。しかし、32 kDクローンだけが毒素に結合するタンパク質で、21 kDタンパク質については検出できる結合は全く観察されなかった(データは示してない)。これらの結果は、PBW BT-R₂のTHW BT-R₁への配列近縁性を確認し、32 kDタンパク質が該受容体の毒素結合部位を含むことを証明している。

40

【0050】

結果：クローン化受容体への毒素結合の特異性

50

該受容体断片 (P B W - 8 6 6) への毒素結合の特異性および親和性を、競合リガンドプロット分析を用いて決定した。発現された 3 2 k D タンパク質を、P V D F 膜に移し、次第に濃度を上げた非標識 C r y 1 A b 毒素の不在または存在下で、^{1 2 5} I - C r y 1 A b とインキュベートした。オートラジオグラフィは、3 2 k D バンドの強度が、5 0 0 n M 非標識 C r y 1 A b 毒素の存在下で、検出不能のレベルまで、顕著に減少することを、明らかにした (データは示してない)。結合した ^{1 2 5} I - 毒素はガンマカウンターで定量し、B I O - R A D I M A G E R ^{T M} 分析システムを用いて、発現断片への毒素の結合親和性を計算した。該毒素の結合親和性 (~ 1 7 n M) は、B B M V についての計算値 (表 1) と同様であった。これらの結果は、C r y 1 A b が、P B W B T - R ₂ 8 6 6 に高い親和性で特異的に結合することを、証明している。他の短小化断片もテストし、

10

【 0 0 5 1 】

結果：C O S - 7 細胞中での P B W B T - R ₂ の発現

P B W B T - R ₂ c D N A を哺乳類発現ベクター p c D N A 3 . 1 (I N V I T R O G E N ^{T M}) 中へサブクローン化し、C O S - 7 細胞中へトランスフェクトした。P B W B T - R ₂ c D N A によりコードされるタンパク質は、C r y 1 A b 毒素を結合できる膜タンパク質として、発現された。過渡的にトランスフェクトされた C O S - 7 細胞から分離された膜を、可溶化し、電気泳動に付し、そして C r y 1 A b 毒素およびその抗血清で、または B T - R ₁ 抗血清で直接、免疫プロットした。発現された 2 2 0 k D 受容体は、C r y 1 A b 毒素を結合し、B T - R ₁ 抗血清と交差反応した。ベクターをトランスフェ

20

【 0 0 5 2 】

細胞表面上への B T - R ₂ 受容体の発現は、当該細胞をメタノールまたはパラホルムアルデヒド中で固定し、そしてまず抗 B T - R ₁ 血清と、次いで T R I T C I g G 二次抗体とインキュベートすることにより、示された。トランスフェクトされた細胞は、細胞表面への B T - R ₁ 抗体の結合により、表面が輝いており、P B E B T - R ₂ 受容体が細胞表面で発現されることを、明らかに示した。

【 0 0 5 3 】

その表面発現 P B W 受容体は、毒素を結合し、当該細胞を殺す。トランスフェクトされた細胞は、C r y 1 A b 毒素と 2 または 4 時間インキュベートし、洗浄し、固定して、そしてまず抗 C r y 1 A b 抗血清と、次いで T R I T C I g G 二次抗体とインキュベートした。免疫蛍光顕微鏡により示されるように、B T - R ₂ 発現 C O S - 7 細胞は該毒素を結合したが、ベクターのみでトランスフェクトされた細胞は毒素の表面結合を全く示さなかった。P B W B T - R ₂ を発現する細胞を、毒素と 2 または 4 時間インキュベートすると、細胞の本来の姿の消失、細胞質の消失、形質膜の完全な分解、および細胞死を含む顕著な形態的变化を示した。

30

【 0 0 5 4 】

既に引用したものおよび以下の参考文献は、本明細書で援用され、当該発明公開を支援するために使用される。

J . S . A l e x a n d e r ら、内皮障壁調節におけるカドヘリン エンドサイトーシスの役割：プロテインキナーゼ C およびアクチン・カドヘリン相互作用の関与、I n f l a m m a t i o n , 2 2 巻、4 1 9 - 4 3 3 ページ、1 9 9 8。

40

A . C . B a e r t l e t t , B . T . トランスジェニック綿へのピンクワタノミムシの抵抗性、B e l t w i d e C o t t o n C o n f . , 2 巻、7 6 6 - 7 6 8 ページ、1 9 9 5。

P . C . B o l l i n ら、無脊椎動物病理学会第 2 7 回年会、コーネル大学、I t h a c a , ニューヨーク、1 9 9 5、において発表。

A . B r a v o , B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s のデルタ・エンドトキシンファミリーのタンパク質の系統関係とそれらの機能性ドメイン、J . B a c t e r i o l . 1 7 9 巻、2 7 9 3 - 2 8 0 1 ページ、1 9 9 7。

50

- A . B r a v o ら、中毒した昆虫における *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* の殺虫性結晶タンパク質の免疫細胞学的局在。 *J . I n v e r t e b r . P a t h o l .* 60 巻、237 - 246 ページ、1992。
- L . A . B u l l a ら、*B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* の超微細構造、生理学、および生化学、*C r i t . R e v . M i c r o b i o l .* , 8 巻、147 - 204 ページ、1980。
- J . C a r r o l l ら、*M a n d u c a s e x t a* 中腸刷子縁膜小胞における *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* タンパク質殺虫剤により作られる大きな水孔の分析、*E u r . J . B i o c h e m .* , 245 巻、797 - 804 ページ、1997。
- N . C . C h i l c o t t ら、*i n v i v o* および *i n v i t r o* での *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s v a r . i s r a e l e n s i s* 結晶タンパク質の比較毒性、*J . G e n . M i c r o .* 134 巻、2551 - 2558 ページ、1988。
- P . C h o m c z y n k i ら、酸性グアニジニウムチオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出による RNA 分離の単一工程法、*A n a l t . B i o c h e m* , 162 巻、156 - 159 ページ、1987。
- A . H . D a n t z i g ら、カドヘリンスーパーファミリーに関するタンパク質との腸ペプチド輸送の関連、*S c i e n c e* , 264 巻、430 - 433 ページ、1994。
- M . L . D a y ら、E カドヘリンは、網膜芽細胞腫細胞周期制御経路により前立腺および乳房上皮細胞の凝集依存生存を、媒介する、*J . B i o l . C h e m .* , 274 巻、9656 - 9664 ページ、1999。
- R . A . D e M a a g d , *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* エンドトキソンの異なるドメインは、リガンドプロットで昆虫中腸膜タンパク質に結合できる、*A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l .* , 62 巻、2753 - 2757 ページ、1996。
- J . A . D o r s c h ら、*B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s s u b s p . b e r l i n e r* の殺虫毒素に対する *M a n d u c a s e x t a* からの BT - R₁ 中の結合部位の分離、準備中、1999。
- U . E s t a d a ら、*B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* の殺虫結晶性タンパク質のキャベツシャクトリムシ *T r i c h o p l u s i a n i* (H u b n e r) (鱗翅類: *N o c t u i d a e* 科) の中腸刷子縁への結合、および結晶性タンパク質の一つに対する抵抗性の淘汰、*A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l .* , 60 巻、3840 - 3846 ページ、1994。
- J . F e r r e ら、*B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* の殺虫結晶性タンパク質に対する昆虫抵抗性の生化学と遺伝学、*F E M S M i c r o b i o l . L e t t .* , 132 巻、1 - 7 ページ、1995。
- J . B . F i n d l a y ら、*G e l E l e c t r o p h o r e s i s o f p r o t e i n s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h* (タンパク質のゲル電気泳動: 実際的方法), *A c a d e m i c P r e s s* , ニューヨーク, 第2版、B . D . H a m e s および D . R i c k w o o d (編集者), 83 - 89 ページ、1990。
- B . B . F i n l a y ら、細菌性病原体による哺乳類宿主細胞機能の利用、*S c i e n c e* , 276 巻、718 - 725 ページ、1997。
- B . R . F r a n c i s ら、タバコスズメガ (*M a n d u c a s e x t a*) 中腸の Cry1Ab 毒素に対するカドヘリン様受容体、BT - R₁ , の特性解明の追加、*I n s e c t B i o c h e m . M o l . B i o l .* 27 巻、541 - 550 ページ、1997。
- S . F . G a r c z y n s k i ら、タンパク質プロット分析による *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* エンドトキシンに特異的な推定昆虫刷子縁膜結合分子の同定、*A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l .* 57 巻、2816 - 2820 ページ、1991。
- S . S . G i l l ら、鱗翅類昆虫 *H e l i o t h i s v i r e s c e n s* の中腸からの *B a c i l l u s t h u r i n g i e n s i s* Cry1Ac 毒素結合タンパク質の同

- 定、単離、およびクローニング、*J. Biol. Chem.*, 270巻、27277-27282ページ、1995。
- S. S. Gillら、*Bacillus thuringiensis* エンドトキシン類の作用の様式、*Annu. Rev. Entomol.* 37巻、615-636ページ、1992。
- R. Gurezkaら、膜タンパク質に見られるロイシン残基のヘプタドモチーフは、人工膜貫通セグメントの自己会合を駆動できる、*J. Biol. Chem.*, 274巻、9265-9270ページ、1999。
- J. L. Hermistonら、マウス腸上皮におけるカドヘリン機能の *in vivo* 分析：接着、分化の維持、およびプログラム細胞死の調節における必須の役割、*J. Cell Biol.* 129巻、489-506ページ、1995。 10
- C. Hofmannら、*Bacillus thuringiensis* からのデルタエンドトキシンのシロチョウ (*Pieris brassicae*) の印刷子縁膜小胞への結合、*Eur. J. Biochem.*, 173巻、85-91ページ、1988a。
- C. Hofmannら、*Bacillus thuringiensis* デルタエンドトキシン類の特異性は、標的昆虫中腸の刷子縁膜中の高親和性結合部位の存在と関連する、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85巻、7844-7848ページ、1988b。
- H. Hofteら、*Bacillus thuringiensis* の殺虫結晶性タンパク質、*Micro. Rev.*, 53巻、242-255ページ、1989。 20
- W. Hunterら、高特異的活性のヨウ素131標識ヒト成長ホルモンの調製、*Nature*, 194巻、495-496ページ、1962。
- H. Iharaら、*Bacillus thuringiensis* のCry1Aaデルターエンドトキシンに対する *Bombyx mori* からの結合タンパク質の精製および部分アミノ酸配列、*Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 120巻、197-204ページ、1998。
- S. S. Kantakら、Eカドヘリンは、口腔偏平細胞癌腫細胞における足場非依存性増殖と生残を調節する、*J. Biol. Chem.* 273巻、16953-16961ページ、1998。
- T. P. Keetonら、哺乳類および昆虫細胞培養中で発現された、*Manduca sexta* からの *Bacillus thuringiensis* Cry1A毒素受容体、BT-R₁ のリガンド特異性と親和性、*Appl. Environ. Microbiol.*, 63巻、3419-3425、1997。 30
- T. P. Keetonら、Cry1A *Bacillus thuringiensis* 毒素に対する *Manduca sexta* 中の通常高親和性受容体BT-R₁ の毒素結合特性への、中腸タンパク質調製およびリガンド結合処置の影響、*Appl. Environ. Microbiol.* 64巻、2158-2165ページ、1998。
- C. Kinter、カドヘリン細胞質ドメインによる胚細胞接着の調節、*Cell*, 69巻、225-236ページ、1992。
- P. J. Knightら、鱗翅類 *Manduca sexta* の刷子縁膜中の *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) デルタ・エンドトキシンに対する受容体は、アミノペプチダーゼNである、*Mol. Microbiol.*, 11巻、429-436ページ、1994。 40
- B. H. Knowles, *Bacillus thuringiensis* の殺虫 エンドトキシン類の作用の機構、*Adv. Insect Physiol.* 24巻、275-308ページ、1994。
- K. A. Knudsenら、細胞のシグナル伝達と分化におけるカドヘリン類の役割、*J. Cell Biochem. Suppl.* 30-31巻、168-176ページ、1998。
- J. S. Kwaら、*Bacillus thuringiensis* デルタ・エンドトキ 50

- シンCry1Cの培養昆虫細胞への毒性および結合性状、J. Invertebr. Pathol., 71巻、121-127ページ、1998。
- U. K. Laemmli, バクテリオファージT4の頭部の会合中の構造タンパク質の切断、Nature, 227巻、680-685ページ、1970。
- M. K. Leeら、リガンドプロットングでの競合アッセイの比較による、Bacillus thuringiensis 毒素結合部位の決定における不一致、Biochem. Biophys. Res. Commun., 220巻、575-580ページ、1996。
- M. K. Leeら、Bacillus thuringiensis エンドトキシンのBombyx mori受容体結合領域の場所、J. Biol. Chem., 267巻、3115-3121ページ、1992。 10
- M. K. Leeら、実験室淘汰Heliothis virescens株におけるBacillus thuringiensis Cry1A デルタ・エンドトキシン類に対する抵抗性は、受容体変化に係る、Appl. Environ. Microbiol., 61巻、3836-3842ページ、1995。
- J. Liら、Bacillus thuringiensisからの殺虫性 エンドトキシンの2.5 解像度での結晶構造、Nature, 353巻、815-821ページ、1991。
- K. Luoら、アミノペプチダーゼの106kDa型は、Manduca sextaの刷子縁膜中のBacillus thuringiensis Cry1C dエンドトキシンに対する受容体である、Insect Biochem. Mole. Biol., 26巻、783-791ページ、1996。 20
- K. Luoら、感受性および抵抗性ヒシモンガ(Plutella xylostella)におけるアミノペプチダーゼへのBacillus thuringiensis Cry1Ac毒素の結合、Appl. Environ. Microbiol., 63巻、1024-1027ページ、1997。
- J. Mengaudら、Eカドヘリンは、L. monocytogenesが上皮細胞へ侵入するのに必要な表面タンパク質インターナリンに必要な受容体である、Cell, 84巻、923-932ページ、1996。
- E. G. Midboe, BT-R₁ 遺伝子の特徴把握とManduca sextaにおけるその発現、Ph. D. ワイオミング大学、Laramie。 30
- W. J. Moarら、Spodoptera exigus (Hubner) (鱗翅類: Noctuidae科)によるBacillus thuringiensis Cry1C抵抗性の発生、Appl. Environ. Microbiol., 61巻、2082-2092ページ。
- S. M. Mohamed, 未発表データ、1999。
- J. Muller-Cohnら、Cry1Cに対するSpodoptera littoralis (鱗翅類: Noctuidae科)抵抗性および他のBacillus thuringiensis結晶毒素類に対する交差抵抗性、J. Econ. Entomol., 89巻、791-797ページ、1996。 40
- Y. Nagamatsuら、Bacillus thuringiensis殺虫性Cry1A(a)毒素に対するBombyx mori受容体のクローニング、配列決定、および発現、Biosci. Biotechnol. Biochem., 62巻、727-734ページ。
- Y. Nagamatsuら、Bacillus thuringiensis殺虫性Cry1A(a)毒素に対するBombyx mori中腸受容体の同定、Biosci. Biotechnol. Biochem., 62巻、718-726ページ、1998。
- P. H. O'Farrell, タンパク質の高分離二次元電気泳動、J. Biol. Chem., 250巻、4007-4021ページ、1975。
- B. Oppertら、Plodia interpunctellaからの内腔プロテイ 50

- ナーゼ類および *Bacillus thuringiensis* の Cry 1 A (c) プロトキシンの加水分解、*Insect Biochem. Mol. Biol.* , 26 巻、571 - 583 ページ、1996。
- J. J. Peluso ら、N - カドヘリン媒介細胞接触は、プロゲステロンとは無関係に、顆粒膜細胞死を阻害する、*Endocrinology* , 137 巻、1196 - 1203 ページ、1996。
- F. J. Perlak ら、昆虫抵抗性綿植物、*Biotechnology (NY)* , 8 巻、939 - 943 ページ、1990。
- C. T. Powell ら、LNCaP ヒト前立腺癌細胞の 12 - O - テトラデカノイルホルボール - 13 - 酢酸誘導アポトーシスの際のプロテインキナーゼ C アルファの持続的膜トランスロケーション、*Cell Growth Differ.* , 7 巻、419 - 428 ページ、1996。 10
- D. L. Rimm ら、ヒト E - カドヘリンの分子クローニングは、カドヘリンスーパーファミリーの新しい小部門を示唆している、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 200 巻、1754 - 1761 ページ、1994。
- J. Sambrook ら、分子クローニング：ラボラトリーマニュアル、第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク、1989。
- E. Schnepf ら、*Bacillus thuringiensis* およびその殺虫性結晶タンパク質、*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* , 62 巻、3 号、775 - 806 ページ、1998。 20
- J. L. Schwartz ら、保存性選択的アルギニン領域中の単一部位突然変異は、*Bacillus thuringiensis* 毒素 Cry 1 Aa により形成されるイオンチャンネルに影響する、*Appl. Environ. Microbiol.* , 63 巻、3978 - 3984 ページ、1997。
- T. Shimizu ら、プロテインキナーゼ カルファによるラミン B のリン酸化とヒト白血病 HL 60 細胞のアポトーシスの際のタンパク質分解、*J. Biol. Chem.* 273 巻、15 号、8669 - 8674 ページ、1998。
- S. Strehl ら、ヒト染色体 13 番およびマウス染色体 14 番上に局在する二つの新しいプロトカドヘリン (PCDH8 および PCDH9) の特性解明、*Genomics* , 30 53 巻、1 号、81 - 89 ページ、1998。
- S. T. Suzuki, プロトカドヘリン類およびカドヘリンスーパーファミリーの多様性、*J. Cell. Sci.* , 109 巻、(Pt. 11), 2609 - 2611 ページ、1996。
- B. E. Tabashnik ら、*Plutella xylostella* 中での *Bacillus thuringiensis* の抵抗性への回復、*PNAS USA* , 91 巻、10 号、4120 - 4124 ページ、1994。
- M. Takeichi ら、カドヘリン媒介の細胞・細胞接着および神経発生、*Neurosci. Res. Suppl.* , 13 巻、S92 - S96 ページ、1990。
- R. K. Vadlamudi ら、*Bacillus thuringiensis* subsp. berliner の殺虫性毒素に対する *Manduca sexta* からの特異的結合タンパク質、*J. Biol. Chem.* , 268 巻、17 号、12334 - 123340 ページ、1993。 40
- R. K. Vadlamudi ら、*Bacillus thuringiensis* の殺虫性毒素に対する受容体のクローニングと発現、*J. Biol. Chem.* , 270 巻、10 号、5490 - 5494 ページ、1995。
- A. P. Valaitis ら、マイマイガ中腸刷子縁膜からの二つのアミノペプチダーゼと *Bacillus thuringiensis* Cry 1 A 毒素類との相互作用分析、*Insect Biochem. Mol. Biol.* , 27 巻、529 - 539 ページ、1997。 50

A . P . V a l a i t i s ら、マイマイガの中腸の刷子縁膜アミノペプチダーゼNは、*Bacillus thuringiensis*のCry1A(c)デルタ・エンドトキシンに対する受容体として役立つ、*Insect Biochem. Mol. Biol.* , 25巻、10号、1143 - 1151ページ、1995。

T . F . W a t s o n ら、*Beltwide Cotton Conf.* , *Memphis* で発表。

M . E . W h a l o n ら、*Bacillus thuringiensis* に抵抗性のトスジハムシ (*Colorado potato beetle*) (甲虫類: *Chrysomelidae* 科) 株の淘汰、*J. Econ. Entomol.* , 86巻、226 - 233ページ、1993。

M . R . W i l l i a m s , *Beltwide Cotton Conf.* , 1999 で発表。

G . K . W i n k e l ら、プロテインキナーゼCの活性化は、4細胞期マウス胚における未熟抱合腔閉鎖を誘発する、*Dev. Biol.* , 138巻、1 - 15ページ、1990。

M . G . W o l f e r s b e r g e r , マイマイガ幼虫への二つの *Bacillus thuringiensis* エンドトキシンの毒性は、該毒素類に対する中腸刷子縁膜上の結合部位の親和性と逆関係にある、*Experientia* , 60巻、475 - 477ページ、1990。

M . W o l f e r s b e r g e r ら、シロチョウ (*Pieris brassicae*) の幼虫中腸からのアミノ酸輸送刷子縁膜小胞の調製と部分特性解明、*Comp. Biochem. Physiol.* , 86A巻、301 - 308ページ、1987。

K . Y a o i ら、*Bacillus thuringiensis* Cry1Aa毒素の受容体に対する候補としての *Bombyx mori* からのアミノペプチダーゼN、*Eur. J. Biochem.* , 246巻、652 - 657ページ、1997。

【0055】

本発明は、例証的な実施態様を参考にしながら記載したが、この記載は、限定的な意味に解釈されることを意図するものではない。例証的な実施態様のさまざまな修飾および組合せ、ならびに当該発明の他の実施態様は、当該記載を参照すれば、当業者には自明であろう。従って、添付の特許請求の範囲は、そうした修飾および強化を包括することを、意図している。

【図面の簡単な説明】

本発明の方法および装置のさらに完全な理解は、添付図面とともに、以下の詳細な説明を参照することにより、得られると思われるが、そこで：

【図1】図1A - Bは、*P. gossypiella* からのBT-R₂タンパク質をコードするcDNAのヌクレオチド配列を示す(配列番号1)を示す。

【図2】図2Aおよび2Bは、*P. gossypiella* からのBT-R₂タンパク質のアミノ酸配列を示す(配列番号2)を示す。矢印は、推定カドヘリンドメインCR1 - CR12の開始部位を示す、SIG = シグナル配列(二重下線)。PD = 膜近位ドメイン；CYT = 細胞質領域。膜貫通領域は下線と太字で示す。ロイシンジッパーモチーフLZは下線を付す。N残基は推定N-糖鎖形成部位を表す。最小結合断片MBF(アミノ酸aa1269 - 1367)も二重下線を付す。

【図3】図3Aは、中腸上皮細胞から調製した*P. gossypiella* 幼虫の刷子縁膜小胞上へのCry1A毒素の結合結果を示すグラフである。

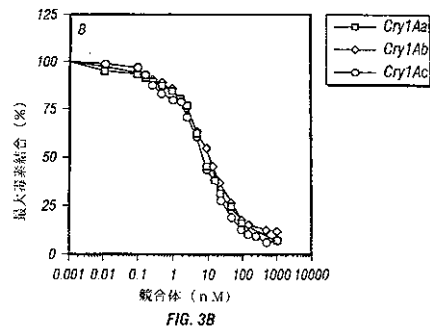
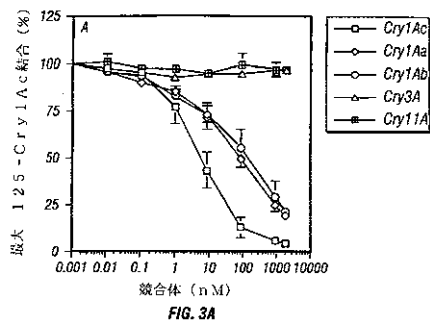
図3Bは、*P. gossypiella* 幼虫およびBBMVへのCry1A毒素の毒性結果を示すグラフである。

【図4】図4は、短小化体(truncations)PBW-1210-1439, PBW-1269-1439, PBW-1367-1496, およびPBW-1210-1367(最小結合断片)を含む、ピンクワタノミムシ(PBW)BT-R₂cDNAsの構造の地図である。各クローンから発現されたタンパク質のCry1A毒素への結合は、

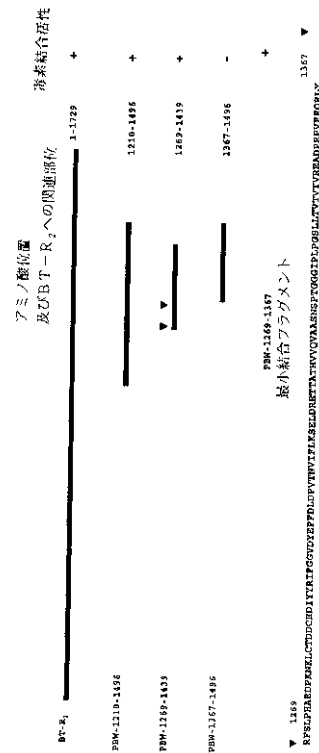
結合の場合(+)、非結合の場合(-)により同定された。

【図5】図5A-Cは、カイコ(上)、タバコスズメガ(中)、ピンクワタノミムシ(下) Cry毒素受容体の整列の図解である。完全に保存されている残基は、箱で囲ってある。

【図3】



【図4】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 May 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/34807 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/705, 14/435, C12Q 1/68, C12N 5/10, C07K
16/28

(21) International Application Number: PCT/US00/41531

(22) International Filing Date: 25 October 2000 (25.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
69/161,564 26 October 1999 (26.10.1999) US
Not furnished 24 October 2000 (24.10.2000) US(71) Applicants and
(72) Inventors: BULLA, Lee, A., Jr. [US/US]; 6455 U.S.
Hwy. 377, Tioga, TX 76271 (US); CANDAS, Mehmet
[US/US]; 13859 Peyton Drive, Dallas, TX 75240 (US).(74) Agent: VAN DYKE, Raymond; Jenkins & Gilchrist, P.C.,
Suite 3200, 1445 Ross Avenue, Dallas, TX 75202-2799
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— Without international search report and to be republished
upon receipt of that report.For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/34807 A2

(54) Title: PECTINOPHORA GOSSYPIELLA (PINK BOLLWORM) BACULUS THURINGIENSIS TOXIN RECEPTOR BT-R₂(57) Abstract: A cDNA encoding a 200 kD receptor, BT-R₂, from the pink boll worm, *Pectinophora gossypiella*, that binds specifically to a *Bacillus thuringiensis* toxin has been cloned, sequenced and characterized. The minimum toxin binding fragment has been identified. The BT-R₂ cDNA permits the analysis of receptors in pink boll worm and other insects that affect crop growth and development, as well as, design assays for the cytotoxicity and binding affinity of potential pesticides. The clone and other methods described herein, permit the manipulation of natural and/or introduced homologous receptors and, thus, to specifically destroy organisms, tissues and/or cells of the target host.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

PECTINOPHORA GOSSEPIELLA (PINK BOLLWORM)
BACILLUS THURINGIENSIS TOXIN RECEPTOR BT-R₂

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

5 This Application for Patent claims the benefit of priority from, and hereby incorporates by reference the entire disclosure of, co-pending U.S. Provisional Application for Patent Serial No. 60/161,564 filed October 26, 1999.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

10 This invention generally relates to receptors for *Bacillus thuringiensis* (BT) toxin and thus to pesticides able to bind the receptor, and to ameliorating pesticide resistance. In particular, the invention relates to recombinant DNA and expression systems for a novel receptor and receptor elements from *Pectinophora gossypiella*, the pink bollworm.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 Without limiting the scope of the invention, its background is described in connection with uses of *Bacillus thuringiensis* toxins as cotton insect biocidal agents, as an example. Cotton insect pests reduced yields by almost 10% across the US in 1998. Insect damage reduced the overall cotton yield by more than 1.7 million bales and produced a financial loss of about \$1.224 billion. One group in particular, the bollworm/budworm complex was the most damaging causing a 2.7% loss. The pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* Saunders ("PBW"), is a lepidopteran insect that causes severe damage to cotton and is the most destructive pest of cotton worldwide.

30

WO 01/34807

PCT/US00/41521

Bacillus thuringiensis is a gram positive, sporeforming bacterium that forms a parasporal crystal which contains insecticidal toxins (Bulla et al., Crit. Rev. Microbiol. (1986) 8: 147-204; Höfte and Whiteley, Microbiol. Rev. (1989) 53: 242. The effect of the toxin is mediated through binding to specific receptors on the apical brush border of the midgut microvillae (BBMV) of susceptible insects.

Biological control of cotton pests using *B. thuringiensis* formulations and transgenic plants has been in use for a number of years and is growing rapidly. Recently, transgenic cotton plants carrying the toxin genes of BT have been developed and sold commercially. Such transgenic plants have a high degree of resistance to the pink bollworm (Schnepf et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. (1998) 62: 775). However, the introduction of any new insecticide into a pest management program immediately initiates a selection process for individuals that are resistant to the pesticide. As the use of transgenic crops expressing BT toxin increases, insect resistance is expected to become more widespread. Increased tolerance for BT toxins in several species of insects has been reported by several investigators while laboratory selection experiments have shown that the use of BT toxin formulations and transgenic plants can provoke the development of resistance in the pink bollworm (Bartlett, et al., Beltwide Cotton Conference (1995) 2: 766).

Concerns that BT toxin formulations or transgenic plants expressing the toxin genes may evoke emergence of either resistant or tolerant strains of insects has made the search for a better understanding of the interaction between the BT toxin proteins and their respective insect receptors a matter of considerable economic importance.

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

In U.S. Patent No. 5,693,491, the present inventors disclosed the purification and cDNA cloning of a *B. thuringiensis* toxin receptor BT-R₁ from larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta* (*M. Sexta*).
5 Recently, two BT toxin receptors have been identified, purified and cloned from the silkworm, *Bombyx mori* (Nagamatsu et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1998) 62: 727).

Heretofore in this field, there has been no structural information concerning the structure and function of BT toxin receptor of the major cotton insect pest, *P. gossypiella*. Furthermore, to the inventors' knowledge, the minimum binding fragment encoding a consensus binding domain for BT toxin on the
10 BT receptor has not yet been identified. Isolation of the minimum binding fragment could permit cloning and structural characterization of important yet uncharacterized BT toxin receptors from other insects of worldwide economic importance such as *P. gossypiella*.
15
20

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides information and materials for isolation and expression of novel BT crystal toxin receptors, herein referred to as Cry toxin receptors. Generally, the invention provides
25 structural and functional characterization of a novel lepidopteran BT toxin receptor, herein referred to as BT-R₂.

A cDNA that encodes an alternative glycoprotein receptor from the pink bollworm that binds specifically to a *B. thuringiensis* toxin has been cloned, sequenced and characterized. The BT-R₂ cDNA permits the analysis of receptors in pink bollworm and other insects and organisms that affect crop growth and development, as
30 well as the design of assays for the cytotoxicity and
35

WO 01/34807

PCT/US00/41521

binding affinity of potential pesticides. The clone and other methods described herein, permit the manipulation of natural and/or introduced homologous receptors and, thus, to specifically destroy organisms, tissues and/or cells of the target host, including insects resistant to toxins of *B. thuringiensis*.

The invention further provides purified and cloned cDNA encoding a 200 kD receptor for the Cry1A toxins of the pink bollworm, *P. gossypiella*. An advantage of this invention is the identification of the minimum binding fragment encoding the toxin binding domain on the BT toxin receptor. Another advantage of this invention is the provision of methodologies for cloning and structural characterization of presently unknown BT receptors. Furthermore, this invention provides methods and materials for identification and design of effective toxin binding receptors for use in combating emergence of toxin resistance. Also, this invention may be used to generate transgenic organisms expressing toxin receptors.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

A more complete understanding of the method and apparatus of the present invention may be obtained by reference to the following Detailed Description when taken in conjunction with the accompanying Drawings wherein:

FIGURES 1A-B show the nucleotide sequence cDNA encoding the BT-R₂ protein from *P. gossypiella* (SEQ ID NO:1);

FIGURES 2A and 2B show the amino acid sequence of BT-R₂ protein from *P. gossypiella* (SEQ ID NO: 2). Arrows indicate the start site of the putative cadherin domains CR1 - CR12, SIG = signal sequence (double underline); MPD = membrane proximal domain; CYT = cytoplasmic region. The transmembrane region is

WO 01/34807

PCT/US99/41521

underlined and bold. The leucine zipper motif LZ is underlined. N residues denote putative N-glycosylation sites. The minimum binding fragment MEF (aa 1269-1367) is also double underlined;

5 Figure 3A is a graph showing the binding results of CryIA toxins on *P.gossypiella* larvae brush border membrane vesicles prepared from midgut epithelial cells;

10 Figure 3B is a graph showing the toxicity results of CryIA toxins on *P. gossypiella* larvae and BMV;

 Figure 4 is a map of the structure of the pink bollworm (PBW) BT-R₁ cDNAs, including truncations PBW-1210-1439, PBW-1269-1439, PBW-1367-1496, and PBW-1210-1367 (the minimum binding fragment). The binding of proteins expressed from each clone to CryIA toxin was identified by (+) for binding and (-) for non-binding; and

15 and
 FIGURES 5A-C illustrate an alignment of the silk worm (top), the tobacco hornworm (middle), and the pink bollworm (bottom) Cry toxin receptors. Perfectly conserved residues are boxed.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENTLY PREFERRED EXEMPLARY EMBODIMENTS

25 The present invention will now be described more fully hereinafter with reference to the accompanying drawings, in which preferred embodiments of the invention are shown. This invention may, however, be embodied in many different forms and should not be construed as limited to the embodiments set forth herein; rather, these embodiments are provided so that this disclosure will be thorough and complete, and will fully convey the scope of the invention to those skilled in the art.

WO 01/34807

PCT/US00/41523

ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

The following abbreviations are used throughout this application: bp - base pairs; BT - *Bacillus thuringiensis* or *B. thuringiensis*; BT-R_x - BT toxin receptor of type x; BBMV - brush border of the membrane vesicles; cDNA - complementary DNA; Cry toxin - parasporal crystalline toxin of BT; IEF - immunoelectrophoresis; kb - kilobase or kilo base pairs; kD - kilodaltons; K_d - dissociation constant; LC₅₀ - lethal concentration resulting in a 50% mortality; PBW - pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* or *P. gossypiella*; PCR - polymerase chain reaction; RACE - Rapid Amplification of cDNA Ends; RT - reverse transcriptase; SW - silkworm (*Bombyx mori* or *B. mori*); THW - tobacco hornworm (*Manduca sexta* or *M. sexta*); and UTR - untranslated region.

The term "x% homology" refers to the extent to which two nucleic acid or protein sequences are identical as determined by BLAST homology alignment as described by T.A. Tatusova & T.L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250 and using the following parameters: Program (blastn) or (blastp) as appropriate; matrix (OEBLOSUM62), reward for match (1); penalty for mismatch (-2); open gap (5) and extension gap (2) penalties; gap x- drop off (50); Expect (10); word size (11); filter (off). An example of a web based two sequence alignment program using these parameters is found at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncf/b12.html>.

The invention thus includes nucleic acid or protein sequences that are highly similar to the sequences of the present invention, and include sequences of 80, 85, 90, 95 and 98% similarity to the sequences described herein.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

The invention also includes nucleic acid sequences that can be isolated from genomic or cDNA libraries or prepared synthetically, and that hybridize under high stringency to the entire length of a 400 nucleotide probe derived from the nucleic acid sequences described herein under. High stringency is defined as including a final wash of 0.2X SSC at a temperature of 60°C. Under the calculation:

$$\text{Eff } T_m = 81.5 + 16.6(\log M [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.72(\% \text{ formamide})$$

the percentage allowable mismatch of a gene with 50% GC under these conditions is estimated to be about 12%.

The nucleic acid and protein sequences described herein are listed for convenience as follows:

SEQ ID Nos.:	DNA and Protein Sequences
SEQ ID NO: 1	BT-R ₁ cDNA sequence from <i>P. gossypiella</i> (Figure 1)
SEQ ID NO: 2	BT-R ₂ protein sequence for <i>P. gossypiella</i> (Figure 2)

SEQ ID Nos.:	Primer Sequences	Primer Name
SEQ ID NO: 3	5' CAN ATH CGN GCN CAN GAY GGN GG 3'	ETR 1209U
SEQ ID NO: 4	5' TTG TAC ACS GCW GGS ATW TCC AC 3'	ETR 1355U
SEQ ID NO: 5	5' NAC YTG RTC RAT RTT RCA NGT CAT 3'	ETR 1486D
SEQ ID NO: 6	5' NCC DAT NAG RTC NGA RTC RTT NGA 3'	ETR 1657D
SEQ ID NO: 7	5' TAG GTT GTA TCC TCA GTA TGA GGA 3'	PBW-BTR GSP-1
SEQ ID NO: 8	5' CCA GAG TGG AGT CCA CCG CCA TA 3'	PBW-BTR GSP-2

WO 01/34807

PCT/US00/41521

	SEQ ID	5' CTG AGT AAG TGT TAT CTT	PBW-BTR
	NO: 9	GAA AG 3'	GSP-3
	SEQ ID	5' CAN ATH CGN GCN CAN GAY	BTR 12090
	NO: 10	GGN GG 3'	
5	SEQ ID	5' GAT AGC GGC CCC AGG AAC	PBW-BTR
	NO: 11	CAA CAA ACA GG 3'	GSP-4
	SEQ ID	5' AGT GCG AGT GCT TTG AAT	PBW-B'IR
	NO: 12	CTG TGA 3'	P2U
10	SEQ ID	5' GTC TCT TCT CAC CGT CAC	PBW-BTR
	NO: 13	TGT CAC T 3'	P5U
	SEQ ID	5' GCA TGC TGG CAG TAG GTT	PBW-BTR
	NO: 14	GTA TC 3'	P6D
	SEQ ID	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	(AUAP)
	NO: 15	3'	
15	SEQ ID	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT	(AP)
	NO: 16	ACT TTT TTT TTT TTT T 3'	

N = A, C, T, or G; H = A, T, or C; B = T, C, or G; D = A, T, or G; V = A, C, or G; R = A or G; Y = C or T; M = A or C; K = T or G; S = C or G; W = A or T

20 More particularly, the studies described herein were targeted toward the identification, cloning and characterization of novel Cry toxin receptors. One embodiment was directed to characterization and isolation of the heretofore unidentified Cry toxin receptor of the pink bollworm, *P. gossypiella*, hereinafter referred to as "PBW".

In order to identify and isolate the Cry toxin receptor of the PBW, toxicity was determined for five different Cry proteins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3A and Cry11A) against neonate PBW larvae. It was determined that the lepidopteran-specific toxins (Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac) showed high toxicity toward PBW larvae with a LC_{50} ranging from 25-45 ng/cm² of insect diet, while the coleopteran specific (Cry3A) or the dipteran specific (Cry11A) toxins did not exhibit any detectable toxicity up to 2000 ng/cm² (Figure 3).

WO 01/34807

PCT/US00/41521

The binding of the three lepidopteran-specific CryIA toxins (CryIAa, CryIAb and CryIAc) to the BBMVs of *P. gossypiella* was characterized in detail. Ligand blot experiments showed that proteins of 120 kD bind only the CryIAc toxin whereas a 200 kD protein binds to CryIAa, CryIAb and CryIAc toxins. It is now known that the 120 kD protein is a heat shock protein, although its relation to the Cry toxin effect is not understood.

In the case of the 175 kD cadherin-like CryIAa binding protein from *Bombyx mori*, ¹²⁵I-labeled CryIAa binding was eliminated by the presence of unlabeled CryIAa, but additional band(s) of approximately 110 kD, identified by ¹²⁵I-CryIAa ligand blots, failed to demonstrate a detectable degree of competition. Thus, it was determined that *P. gossypiella*, like *M. sexta* and *B. mori*, contains both high-affinity and low-affinity binding proteins for at least one CryIA toxin and that the 200 kDa protein from PBW is a common binding protein for the lepidopteran-specific CryIA toxins.

The detailed mechanism of the CryIA toxin interaction with the midgut BBMVs of the pink bollworm was determined. The equilibrium dissociation constants (K_d) calculated from the homologous competition assays (Figs. 3A and 3B) are 16.5, 12.4 and 12.8 nM and the concentrations of binding sites are 3.7, 3.6 and 8.6 pmol/mg, for CryIAa, CryIAb and CryIAc, respectively. The Hill Coefficients for the three CryIA toxins are between 0.6 and 0.8 for BBMVs binding proteins (Figure 3A), indicating that there is negative cooperativity in the binding of these toxins to the binding site(s) in the BBMVs. Binding of the CryIA toxins to BBMVs proteins was specific and saturable. The toxin amount required for saturation of 460 µg of BBMVs proteins was in the following order: CryIAc>CryIAa>CryIAb.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

Immunoprecipitation of BBMV proteins with anti-Cry1Ab antiserum and subsequent ligand blotting with ¹²⁵I-Cry1Ab toxin also showed binding of the toxin to an approximately 200 kD protein. The 200 kD protein is a single protein as shown by 2D-gel analysis (data not shown). A comparison between the 210 kD binding protein from *M. sexta* with a pI = 4.3 and the 200 kD binding protein from *P. gossypiella* (pI = 4.1) revealed that both proteins have almost the same pI. It was determined that the 200 kD PBW protein had some cross-reactivity with polyclonal antisera against the *M. sexta* BT-R₁ 210 kD protein.

In order to clone the PBW BT-R₁ gene, fully degenerate primers were designed based on the conserved amino acid sequences between that of the two receptors, tobacco hornworm ("THW") BT-R₁ and silkworm ("SW") BT-R175. The primer locations were designed to include or exclude a sequence thought by the present inventors to encode a region in the extracellular domain critical to toxin binding, herein after "READ" signature sequence. Hereinafter this binding fragment of the DNA sequence will be referred to as the "signature" region.

Three clones were obtained, PBW-421 (aa 1367-1496), PBW-866 (aa 1210-1496) and PBW-1373 (aa 1210-1675), which have about 50 % nucleotide and about 60% amino acid sequence similarity to both THW BT-R₁ and SW BT-R175. The 421 bp and 866 bp clones encode proteins of about 21 and 32 kD, respectively. Although both expressed proteins cross-reacted with THW BT-R₁ polyclonal antisera, the 32 kD protein, but not the 21 kD protein, was shown to bind Cry1Ab toxin specifically with high affinity. The estimated K_d value is about 17 nM, which is similar to the K_d value obtained for BBMV. Similarly, an internal fragment from the PBW-866 clone did not bind toxin, but did cross-react with BT-R₁ antibodies. This data demonstrates that

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

recognition by anti-BT-R₁ antibodies is insufficient to define a functional toxin receptor.

5 In order to obtain a cDNA sequence encoding the full-length receptor, the 5' and 3' ends of the FEW BT-R₂ receptor were first obtained using 5' and 3' RACE reactions followed by cloning of the full-length receptor cDNA using gene specific primers from the 5' and 3' UTR. The full-length cDNA clone (SEQ ID NO: 1) has an open reading frame of 1729 amino acids (SEQ ID NO:2), with a deduced molecular weight of 194 kD and a
10 calculated pI value of 4.1, which is similar to the value determined by 2-D gel analysis.

The protein consists of three domains: extracellular, transmembrane and cytoplasmic. The
15 protein sequence contains two hydrophobic regions, one at the amino terminus, characteristic of a signal peptide and one near the COOH-terminus (amino acids 1575-1600) that probably forms a transmembrane domain. The extracellular domain contains 12 cadherin-like motifs, in addition to, a membrane proximal region that
20 contains two leucine zipper motifs. Eleven consensus sites for N-linked glycosylation are present in the extracellular region, which may account for the difference in apparent molecular mass between the
25 native protein and the calculated mass.

Based on the results discussed above, it would be apparent to one of ordinary skill in the art that variances in receptor sequences or in toxin binding
30 affinities or in receptor expression may render different levels of toxin susceptibility or resistance. Furthermore, the receptor of the present invention may be used to generate transgenic organisms by methods well known in the art.

To investigate the mode of action of BT toxin, a
35 mammalian heterologous cell culture system was chosen for several reasons. First, BT CryIA toxins have shown

WO 01/34807

PCT/US00/41521

no toxic effect on any mammalian cell lines studied to date. This characteristic is in contrast to most available insect cell lines, which exhibit variable degrees of sensitivity to toxin (Kwa et al., 1998).
5 Second, the use of a mammalian cell would allow the determination of whether the receptor, independent of any associated protein in an insect cell line, would mediate toxicity.

When introduced into mammalian COS-7 cells, the
10 cloned cDNA expressed BT-R₂ that was detected by western blot analysis using BT-R₁ antisera. The expressed receptor was displayed on the cell surface and detected with polyclonal antibodies raised against *M. sexta* BT-R₁. These results suggest that the protein
15 expressed by the PBW BT-R₂ cDNA is similar to the natural protein found in the insect midgut.

The possibility of using COS-7 mammalian cells transfected with a receptor for BT toxins as a model system for assessing the cytotoxicity of the CryIA toxin was determined. The surface receptor clearly was
20 able to bind to the CryIAb toxin, which was detected by immunofluorescent labeling using CryIAb antibodies (data not shown). These results indicate that the binding site of the receptor must assume its native conformation. Significantly, intensively labeled
25 vesicles in the methanol fixed transfected COS-7 cells were observed when the cells were incubated with BT-R₂ antiserum (data not shown). This observation indicates that vesicles, which form normally in the cell endocytosis/exocytosis pathway, contain the BT-R₂
30 proteins. In addition, this result shows that the receptor is not only expressed on the cell surface, like its native counter part in the insect midgut, but also is recycled normally by the cell.

35 Microscopy of the transfected COS-7 cells treated with CryIAb toxins for various times demonstrated

WO 01/34807

PCT/US00/41521

significant cytopathological patterns. The cytopathological changes observed under the fluorescent microscope included disruption of the plasma membrane, cell swelling, disintegration and death of the cells.

5 The symptoms were obtained in the presence of 0.6 µg/ml Cry1Ab for 2 hr. In contrast, no cytopathological effects were revealed for cells transfected with vector alone and subsequently treated with toxin. Clearly, there is a distinct correlation between toxin binding

10 to the surface receptor and toxicity to the cells.

The cytological appearance and ultrastructure of the midgut cells of *M. sexta* and other lepidopteran larvae, after intoxication with preparations of BT, have been reported extensively by several authors

15 (Bravo et al., 1992). Histopathological studies on *M. sexta* midgut demonstrated pathological behavior for Cry1A on midgut epithelial cells (columnar cells) (Midhøe et al., 1999). These investigators demonstrated that the epithelial cells of the midgut swell shortly after ingestion of the BT toxin. Eventually, the epithelial cells burst and released their cytoplasmic contents into the midgut lumen.

20

The present observations on the intoxicated transfected COS-7 cells are in complete agreement with these reports, which demonstrates that the toxin acts similarly in both systems. Furthermore, it should be apparent to one of ordinary skill in the art that cells expressing transfected molecules of the BT toxin receptor as well as cells expressing a natural form of

25

30 the receptor may be used to assess the level of cytotoxicity and mode of action of toxins.

Lepidopteran insects generally express high molecular weight binding proteins for the Cry1A toxins that range in size from 160 to 220 kD (Martinez-Ramirez

35 1994; Vadlamudi et al., 1993; Oddouet al., 1993; Nagamatsu et al., 1998a; Ihara et al., 1998). Two of

WO 01/34807

PCT/US00/41521

these proteins, in addition to the 200 kD pink bollworm receptor, have been cloned and sequenced: the BT-R₁ 210 kD cadherin-related receptor from *M. sexta* (Vadlamudi et al., 1995) and the 175 kD cadherin-related from *B. mori* (Nagamatsu et al., 1998a). Interestingly, these two proteins have 60-70% identity and 80% similarity between themselves.

P. gossypiella expresses a high-affinity and a low-affinity binding protein for at least one CryIA toxin, CryIAc. The high-affinity receptor is a cadherin-related protein with a large molecular mass. One of the most important conserved regions may be the signature sequence. The signature sequence contains the sequence (READ), which is believed to be responsible for toxin binding due to the presence of two negatively charged amino acids that bind to two arginines in the toxin binding site. Supporting evidence comes from the immunoblot analysis for clones PBW-866, which contains the proposed signature sequence, and PBW-421, which does not include the signature sequence. To further define the minimum binding fragment, truncation peptides were tested for their ability to bind toxin (Figure 4). The minimum binding fragment contains the "READ" signature sequence and consists of amino acids 1269 to 1367.

The information provided herein is necessary for understanding the molecular biology of the toxin receptor in the pink bollworm and to engineer more effective toxins in terms of longer persistence in the field, higher toxicity, and preclusion of resistance development. This information will facilitate understanding of Cry toxin receptor interactions in other economically important insect crop pests.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

EXAMPLE 1 SPECIFICITY OF PURIFIED TOXINS

Recombinant protoxins CryIAa, CryIAb, and CryIAC (Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University) were prepared from *E. coli* JM-103 and trypsinized essentially as described by Lee et al. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 3115. In addition, the soluble trypsinized 60 kD toxins were subjected to FPLC NaCl salt gradient purification over an HR-5/5 Mono-Q anion exchange column (PHARMACIA™) prior to quantitation, radioiodination, and use in bioassays. Cry3A crystal protein from *E. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* was solubilized in 3.3 M NaBr and treated with papain, and the resulting 67 kD toxin was purified by the method of Li et al. *Nature* (1991) 353: 815. The 65 kD CryIIA toxin was isolated from *E. thuringiensis* subsp. *israelensis* via solubilization as described by Chilcott et al. *J. Gen. Micro* (1988) 134: 1551 and further purified by anion-exchange FPLC. All toxin protein quantitations were performed using the bicinchoninic acid method (PIERCE CHEMICAL™) with Bovine Serum Albumin (BSA, Fraction V) as a standard.

Pink bollworms were obtained from the USDA PINK BOLLWORM REARING FACILITY™ (PBWRF, Phoenix, AZ). An artificial diet was obtained from SOUTHLAND PRODUCTS INC.™, Lake Village, AR. The diet was reconstituted in boiling water and cooled to 55°C. Each Cry toxin was thoroughly mixed in the warm liquid diet and bioassay cups were filled with 20 ml of diet. After cooling and drying, 10 neonate larvae were placed in each cup and the cups were immediately capped. The method of Watson, et al., *Beltwide Cotton Conference*, Memphis, Tenn. (1995) was used to determine the toxicity of trypsin-activated toxins against first-instar larvae of *P. gossypiella*. Generally, four replicates of six cups were prepared for each dose. Cups were incubated at 30° C for 21 days, the length of

WO 01/34807

PCT/US00/41521

time necessary for more than 95% of normal *P. gossypiella* to reach pupation. At the end of 21 days, the diet cups were examined and the numbers of larvae and numbers of pupae or adults in each cup were recorded.

The specific toxicities of purified Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3A and Cry 2A tested using neonate *P. gossypiella* larvae are shown in Figure 3B. It was determined that all three Cry1A toxins are highly toxic, with LC₅₀ values ranging from 25-45 ng/cm³ of artificial diet. Cry3A (considered toxic to coleopteran or beetle insects) and Cry IIA (considered toxic to dipteran insects, especially mosquitoes) were not toxic to *P. gossypiella* larvae at the highest concentrations tested (2000 ng/cm³).

EXAMPLE 2 CHARACTERIZATION OF THE BT-R₂ RECEPTOR

Early fourth-instar larvae were kept on ice for 1 hr and midguts were surgically removed from the larvae. BBMW were prepared from midgut tissues by the differential magnesium precipitation method of Wolfersberger, et al., *Comp. Biochem. Physiol.* (1987) 86A: 30, in the presence of protease inhibitors (5 mg/ml pepstatin, antipain, aprotonin, leupeptin, 1 mM PMSF, and 5 mM benzamidine). The final pellet was resuspended in buffer A (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, and 17 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing the protease inhibitors, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -85°C.

Cry toxins were radioiodinated using the chloramine T method (Hunter and Greenwood, *Nature* (1962) 194: 495, with ¹²⁵I-Na (NEN DUPONT™). Ten µg of toxin were mixed with 5 µl of ¹²⁵I-Na (0.5 mCi) in 100 µl of NaHPO₄ buffer (0.5 M, pH 7.4) with 25 µl of Chloramine T (4 mg/ml). The reaction mixture was agitated for 20-25 seconds at 23°C and the reaction was

WO 01/34807

PCT/US00/41521

stopped by adding 50 μ l of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (4.4 mg/ml). Free iodine was removed by gel filtration on an EXCELLULOSETM desalting column (PIERCETM) equilibrated with PBS containing 10 mg/ml BSA.

5 **TOXIN BINDING ASSAYS.**

Both homologous and heterologous competition inhibition binding assays were performed as described by Keeton and Bulla (1997). A total of 25 μ g of BBMV were incubated with 1.2 nM ^{125}I -CryIAC toxin in the presence of increasing concentrations (0-1000 nM) of the appropriate unlabeled homologous toxin (CryIAC) or heterologous toxins (CryIAa, CryIAb, Cry3A, and CryIIA). Incubations were in 100 μ l of binding buffer (PBS/0.2% BSA) at 25°C for 30 min. Radiolabeled and unlabeled toxins were mixed together before adding them to the BBMV. Unbound toxins were separated from BBMV-bound toxin by centrifugation at 14,000 x g for 10 min. The pellet containing bound toxin was washed three times in ice cold binding buffer by gentle vortexing and radioactivity in the final pellet was measured using a BECKMAN GAMMA 5500TM counter. Binding data were analyzed by the PRISMTM program (GRAPHPAD SOFTWARE INC.TM, San Diego).

Competition inhibition binding of ^{125}I -CryIAC toxin to *P. gossypiella* was carried out in the presence of increasing concentrations of unlabeled CryIAC, CryIAb, CryIAa, Cry3A and CryIIA toxins. Homologous competition binding assays were performed with iodinated CryIA toxins and various concentrations of the corresponding unlabeled toxin. The binding site concentration (B_{max}), and dissociation constant (K_d) of labeled toxins were calculated from three separate experiments. The equilibrium binding parameters were estimated by analyzing the data with the PRISMTM computer program.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

RADIOLOGAND BLOTTING.

The two hundred μ g of BBMV proteins were solubilized, separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as described by Francis and Bulla (1997). Blots were blocked with TBS (10 mM Tris-HCl and 0.9 % NaCl) containing 5% non-fat dry milk powder, 5% glycerol 0.5% Tween-20, and 0.025% sodium azide for 2 hr at 25°C. Blocking buffer was removed and membranes were incubated for 2 hr at 25°C in an equal volume of fresh blocking buffer containing 2×10^5 cpm/ml (1-1.25 nM) of 125 I-CryIA toxins either in the presence or absence of unlabeled toxins. Finally, membranes were washed three times with fresh blocking buffer for 10 min each, rinsed once with TBS, dried, and exposed to Kodak X-ray film at -80° C.

To determine the specificity of binding to the 200 and 120 kD proteins, blots of PBW BBMV proteins was incubated with 125 I-CryIAC toxin in the presence of increasing concentrations of unlabeled CryIAC toxin.

IMMUNOPRECIPITATION OF CryIAB BINDING PROTEIN.

Immunoprecipitation was carried out according to Vadlamudi, et al. (1993). Twenty five μ l of Cry IAb antiserum were added to 1 ml of protein A-Sepharose CL-4B equilibrated in washing buffer (1% Nonidet P-40, 6 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl and 250 mM NaCl) and mixed for 1 hr at 4°C. After washing the blot three times with washing buffer, 700 μ g of Cry IAb toxin were added and the mixture were incubated for an additional 1 hr at 4°C and washed again three times with washing buffer. Pink bollworm BBMV proteins (6 mg) were solubilized in washing buffer containing 1% NP-40 and protease inhibitors (10 μ g/ml pepstatin, antipain, aprotonin and leupeptin; 5 mM iodoacetamide; and 1 mM PMSF).

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

Unsolubilized proteins were removed by centrifugation. Solubilized proteins were filtered through a 0.45 μ m filter, added to 1 ml of Sepharose-protein A beads linked to Cry1Ab toxins, and the sample was stirred gently for 1 hr at 4°C. Sepharose beads were centrifuged and washed four times with washing buffer containing 0.25% NP-40 and 0.02% SDS. The toxin-binding protein complex was dissociated by heating in Laemmli (1970) sample buffer and the binding proteins were Coomassie stained and detected by ligand blotting with ¹²⁵I-Cry1Ab and Western blot using Cry1Ab antiserum.

IMMUNODETECTION OF PINK BOLLWORM CRY1A RECEPTOR.

Immunoprecipitated proteins were transferred to a PVDF membrane, blocked with 5% nonfat dry milk in PBS buffer and incubated at 4°C overnight in the same blocking buffer containing 10 μ g/ml of Cry1Ab. Unbound toxin was washed with PBS. Antibodies raised in rabbits against the 60 kD Cry1Ab toxin were diluted 1:1000 and hybridized to the membrane for 2 hr at 25°C and the blot then was washed with PBS. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was diluted 1:3000 in TBS blocking buffer and hybridized to the membrane for 2 hr. The membrane then was washed extensively with PBS. Visualization of the bound toxin was accomplished using the Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western blotting detection method (AMERSHAM™).

SOUTHERN BLOT ANALYSIS.

Forty μ g of PvuII digested genomic DNA from *P. gossypiella* or *M. sexta* were separated on a 0.8 % 1X TBE-agarose gel and blotted onto a nylon membrane (BIO-RAD™, ZETA-PROBE GT™). The analysis was carried out according to Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor

WO 01/34807

PCT/US99/41521

Laboratory, N.Y. (1989). The filter was hybridized with ³²P-labeled, random primed, C-terminal of BT-R₁ cDNA (HincII fragment, 0.5 kb). Filter hybridization was carried out at 42°C for 21 hr in 50 % formamide, 5X Denhardt's reagent, 1M NaCl, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl and 100 µg/ml of salmon sperm DNA. The filter was washed with 2X SSC, 0.5% SDS, then with 1X SSC, 0.5% SDS, then with 0.5X SSC, 0.5% SDS, followed by a fourth wash with 0.25X SSC, 0.5% SDS. Each wash was for 30 min at 42°C. Finally, the filter was rinsed in 2X SSC and exposed to Kodak X-ray film at -85°C.

ELECTROPHORETIC ELUTION OF PROTEINS.

Electrophoresis was performed in 1.5-mm-thick polyacrylamide slab gels using 7.5% acrylamide (pH 8.0). After SDS-PAGE, proteins were revealed as transparent bands with 4 M sodium acetate solution. The proteins were excised using a razor blade. Proteins in the gel strips were fixed in 50 % (v/v) methanol solution for 15 min and equilibrated twice in 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) and 2% 2-mercaptoethanol for an additional 15 min. Equilibration of the gel strips in the above buffer with 1% (w/v) SDS was performed as described above. The equilibrated gel strips were inserted into a dialysis tube with a minimum amount of the buffer containing SDS (25 mM Tris, 190 mM glycine and 0.1% SDS). Electroelution was carried out essentially as described by Pindlay (1990). A horizontal flat-bed mini-gel electrophoresis apparatus (BIO-RAD™) was used for electroelution at 50 V for 12 hr at 4°C. The buffer consisted of 25 mM Tris, 190 mM glycine and 0.1% SDS (pH 8.3). At the end of electrophoresis, the polarity of electrodes was changed for 30 sec to avoid adsorption of proteins onto the dialysis tubes. The buffer inside the dialysis tubes was collected and the

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

tubes were washed three times with a minimum volume of buffer. SDS was dialyzed out and protein was concentrated by using a CENTRICON-30 micro-concentrator (AMICON).

5 **TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS.**

Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to the method of O'Farrell (1975). Isoelectric focusing was carried out in 2.0 mm (I.D.) glass tubes using 2.0% ampholines (pH 3.5-10; LKB/PHARMACIA™) for 9600 volt-hr. After equilibration for 10 min in buffer 'O', tube gels were applied to the stacking gels on top of 8% acrylamide (pH 8.0) slab gels (14 x 14 cm). SDS slab gel electrophoresis was carried out for 4 hr at 12.5 mA. After electrophoresis, one gel was stained with Coomassie blue and the others were transblotted onto PVDF paper overnight at 200 mA (Vadlamudi et al., 1993). The PVDF paper was blocked with powdered milk solution, incubated with ¹²⁵I-Cry1Ac or ¹²⁵I-Cry1Ab and exposed to X-ray film at -85°C.

10
15
20

IDENTIFICATION AND RECOVERY OF cDNA ENCODING BT-R₂.

Total RNA was prepared from the midgut tissue of fourth instar larvae of the PBW by the guanidinium thiocyanate method (Chomczynski et al. *Analyt. Biochem.* (1987) 162: 156). Poly (A+) RNA was isolated with the POLYATRACK MRNA ISOLATION SYSTEM™ (PROMEGA™). First strand cDNA was synthesized using oligo-(dT) and random hexamer primers and reverse transcriptase according to standard methodologies and used as the template for amplification by polymerase chain reaction (PCR) of desired mRNAs. Degenerate oligonucleotide primers were designed based on the conserved amino acids between *M. sexta* BT-R₁ and *B. mori* BT-R175. Such primers were used to clone partial fragments of PBW BT-R₂.

25
30

WO 01/34897

PCT/US00/41521

For cloning of the PBW BT-R₂, RT-PCR was employed using fully degenerate oligonucleotide primers derived from a sequence in the membrane proximal domain conserved sequence between *M sexta* BT-R₁ and *B. mori* BT-R175. Primers BT-R-1355U and BT-R-1209U against BT-R-1486D were applied to PBW cDNA to amplify 421-bp and 866-bp fragments. The PCR products were resolved on 1.5% agarose, gel purified, cloned into a TA cloning vector (INVITROGEN™) and transformed into *E. coli* INV-F. The presence and identity of the correct insert was confirmed with EcoRI digestion and DNA sequencing. The PBW-886 clone was found to contain the nucleotide sequence found in clone PBW-421. In addition, primer 1209U against 1657D was used to clone a 1373-bp fragment (PBW-1373), which represents most of the membrane proximal domain and the cytoplasmic domain. Clone PBW-287 (aa 1346-1438) is a 287 bp internal fragment from 866-bp clone and was cloned using gene specific primers P5 and P6.

Based on the sequence obtained from the partial clones, sense and antisense primers were used to clone the 3' and 5' ends of the PBW BT-R₂ clone by the 5' and 3' RACE system according to the manufacturer's instructions (GIBCO BRL™). The 5' end was amplified using gene-specific antisense primers GSP1, GSP2 and GSP3 against ABRIDGED UNIVERSAL AMPLIFICATION PRIMER™ (AUAP™) provided in the kit. The 3' end was amplified using gene primer GSP4 against AUAP™. The PCR product of the predicted size was isolated and subcloned into TA cloning vector pCR2.1 (INVITROGEN™) and transferred into *E. coli* INV-F. For recombinant protein expression in *E. coli*, or COS7 cells, the coding sequences for the RT-PCR clones or the full length PBW-BT-R₂ clone were recombined into the pET30 or pCDNA3.1 expression vectors and transformed into BL21 (DE3) LysS (NOVAGEN™) or COS7 mammalian cells. The *E. coli* cultures were

WO 01/34807

PCT/US00/41521

induced using a 1 mM final concentration of IPTG for 3 hr.

5 The full length PBW BT-R₂ (~5.5 kb; see sequence in Figure 1 SEQ ID NO:1) was ligated into the mammalian expression vector pcDNA3.1 (INVITROGEN™) and confirmed by DNA sequencing. The molecular mass of the deduced polypeptide is 194 kD with a pI of 4.1. The receptor has an open reading frame of 1729 amino acids (Figure 2) (SEQ ID NO: 2). The amino acid sequence contains a putative signal peptide of 23 amino acid residues, a transmembrane domain of 27 residues (aa 1578-1605) and a 124-residue cytoplasmic domain. In addition, the amino acid sequence contains 12 putative cadherin motifs, 11 putative N-glycosylation sites and two leucine zipper motifs at amino acid 1541-1562 and 1578-1600. The minimum toxin binding fragment is amino acids 1269 to 1367 (Figure 4).

10 When the protein homology is analyzed by BLASTP, as described under definitions above, the closest paralog in the GenBank nonredundant (nr) database is the *Bombyx mori* receptor at Acc. No. JE0128 with Identities = 1034/1708 (60%), Positives = 1266/1708 (73%), Gaps = 35/1708 (2%). The next closest species was *Manduca sexta* at Acc. No. AAB33758.1 with Identities = 871/1540 (56%), Positives = 1101/1540 (70%), Gaps = 22/1540 (1%). The nucleotide sequence showed no significant homologies.

20 The peptide homologies amongst these three species are shown in FIGURES 5A-C where perfectly conserved residues are boxed. Peptide fragments of the SBW sequence may be used to generate specific or nonspecific antibodies. Usually, it is recommended that at least 17 amino acid peptide fragments are used to generate antibodies, however, smaller peptides may also be antigenic and sufficiently complex to be unique. In particular, the carboxyl tail (aa 1677-end)

WO 01/34807

PCT/US00/41521

of the PBW sequence is unique to this species and can be used to generate PSW unique antibodies. Exemplary peptides that may be useful as antigens (numbered with respect to FIGURE 5, SEQ ID NO: 2) are shown as follows:

5

10

15

PBW Unique Peptides	Common Peptides
aa 534-544	aa 291-304
aa 697-705	aa 622-632
aa 886-895	aa 791-803
aa 1055-1066	aa 1621-1642
aa 1321-1331	
aa 1451-1461	
aa 1516-1525	
aa 1572-1582	
aa 1677-1729	

IMMUNODETECTION OF THE EXPRESSED BT-R₂ PROTEINS.

Cell lysates from the induced BL21 (DE3) LysS bacterial cultures were electrophoresed and transferred to PVDF membranes. Filters were blocked at 4°C in 50 ml of blocking buffer containing 10 ug/ml of Cry1Ab toxin. Unbound toxin was removed by PBS. Rabbit primary antibodies for the THW was removed by PBS. Rabbit primary antibodies for the THW BT-R, extracellular domain or for the FPLC-purified Cry1Ab were diluted 1:1000 in 50 ml TBS blocking buffer. The filters were incubated for 2 hr with the antiserum and washed three times with the blocking buffer. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was diluted to 1:2000 and incubated with filters for 2 hr at 27°C and was developed with the enhanced chemoluminescence (ECL) detection system (AMERSHAM™).

30

WO 01/34807

PCT/US00/41521

MAMMALIAN EXPRESSION OF BT-R₂.

The PEW BT-R₂ cDNA cloned into pcDNA3.1, a mammalian expression vector (INVITROGEN™), was expressed in mammalian cells (COS-7 SV40 transformed African green monkey cells; ATCC CRL-1651) according to methods described by Keeton and Bulla, *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 63: 3419. COS-7 cells (4 x 10⁴/well) were grown in Dalbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) on 12 mm cover slips placed in a 24-well plate.

COS-7 cells were transfected with the construct using the LIPOFECTAMIN PLUS REAGENT™ (GIBCO BRL™). The cells were incubated for two days at 37°C in DMEM medium containing 10% FBS in a humidified atmosphere of 10%CO₂. BT-R₂ was monitored by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-BT-R₁ or antiCry1Ab antiserum. Surface expression was detected by immunofluorescence microscopy with the anti-BT-R₁ antibodies. The effects of BT toxin on the transfected cells were demonstrated by incubating the cells in the presence or absence of Cry1Ab toxin for 2 or 4 hr and monitoring the morphological changes by immunofluorescence microscopy using either anti-BT-R₁ or anti-Cry1Ab antibodies. Cell death is clearly demonstrated (not shown).

IMMUNOFLOURESCENCE MICROSCOPY.

COS-7 cells were grown on 12-mm glass coverslips in a 24-well plate. The cells were fixed and permeabilized either in cold methanol (-20°C) or 4% paraformaldehyde for 15 minutes at 27°C. Coverslips were rinsed three times with PBS and then blocked for 15 minutes with 1% BSA in PBS. Cells were incubated with primary antibody for 30 minutes at 27°C followed by rinsing and blocking as just described. The same

WO 01/34807

PCT/US99/41521

incubation and washing procedures were applied to secondary antibody. Antibodies were detected with TRITC goat anti-rabbit IgG. Coverslips were mounted in FLUOROMOUNT G™ and viewed with an OLYMPUS™ microscope equipped with epi-fluorescence illumination and a 40X Apochromat lens. Photography was done with an OLYMPUS SPOT™ camera.

WESTERN BLOT ANALYSIS.

Transfected COS-7 cells were washed with cold PBS, lysed in lysis buffer (50 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, 10 μM leupeptin) and resuspended on ice for 10 minutes. Then, 4X sample buffer was added to the cells and heated at 95°C for 5 minutes. Lysates were subjected to electrophoresis through 7.5% SDS-PAGE, and proteins were electrophoretically transferred to a PVDF filter, blocked and incubated with either anti-BT-R₁, or anti-Cry1Ab antibodies.

RESULTS: IDENTIFICATION OF ¹²⁵I-CRY1A BINDING PROTEINS.

BBMV proteins of *P. gossypiella* ranged in molecular size from greater than 205 kD to less than 25 kD (data not shown) as determined by SDS-PAGE. ¹²⁵I-labeled Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac were used in ligand blots to identify which *P. gossypiella* BBMV proteins bind the respective toxins. Proteins that had been separated by SDS-PAGE were transferred to PVDF membranes and incubated with each radiolabeled-toxin separately. ¹²⁵I-Cry1Aa, ¹²⁵I-Cry1Ab and ¹²⁵I-Cry1Ac bound to a protein of about 200 kD (data not shown). ¹²⁵I-Cry1Ac bound also to a protein band at about 120 kD. Neither Cry1Aa nor Cry1Ab bound to the 120 kD protein. The binding patterns for all three toxins were the same under both reducing and nonreducing conditions (data not shown).

WO 01/34807

PCT/US00/41521

RESULTS: COMPETITION INHIBITION BINDING ASSAYS.

¹²⁵I-labeled CryIAa, CryIAb and CryIAC were used in binding assays with *P. gossypiella* BBMV. Competition binding of ¹²⁵I-CryIAC toxin to *P. gossypiella* was carried out in the presence of increasing concentrations of unlabeled CryIAa, CryIAb, CryIAC, Cry3A and CryIIA toxins. Fifty-percent inhibition of CryIAC binding was observed at 10 nM of unlabeled CryIAC, 100 nM unlabeled CryIAa and 100 nM of unlabeled CryIAb. At a concentration of 1000 nM, unlabeled CryIAC, CryIAb and CryIAa reduced binding of iodinated CryIAC by 95, 82 and 80%, respectively (data not shown). Neither Cry3A nor CryIIA toxin competed for the CryIAC toxin binding site.

Homologous competition binding assays were performed with iodinated CryIA toxins and various concentrations of the corresponding unlabeled toxin. CryIAa, CryIAb and CryIAC showed high binding affinity to BBW proteins (data not shown). Fifty-percent inhibition of binding of CryIA toxins was observed at concentrations of approximately 10 nM of the corresponding unlabeled toxin. These data indicate that each of the three toxins binds specifically with high affinity. The binding site concentration, E_{max} , and the dissociation constant, K_d , of each toxin was calculated from the three separate homologous competition inhibition experiments by analyzing the data with the GRAFHAD computer program (Table 1). The K_d values all were similar and in the low nM range whereas the E_{max} for CryIAC was higher than CryIAa or CryIAb. The Hill coefficients for CryIAa, CryIAb and CryIAC were 0.65, 0.65, and 0.77, respectively, indicating a negative binding cooperativity for the toxins against the BBMV proteins. A single binding site model was indicated based on the nonlinear

WO 01/34807

PCT/US00/41521

regression analysis for both CryIAa and CryIAb. Significantly, CryIAc, the data was best accommodated by a two binding site model with high- and low-affinity binding sites.

5 **RESULTS: SPECIFICITY OF ¹²⁵I-CRYIAC TOXIN BINDING IN LIGAND BLOTS.**

 In view of the putative "two-binding site" model predicted for the CryIAc toxin, radioligand blots of *P. gossypiella* BBMV proteins were carried out with ¹²⁵I-CryIAc toxin in the presence of increasing concentrations of unlabeled CryIAc toxin. Autoradiography of these blots revealed significant reduction in the intensity of the 200 kD band (data not shown). Indeed, it was undetectable at a CryIAc toxin concentration of 10 nM. In the case of the 120 kD band, however, there was virtually no reduction in the band intensity (data not shown) even at a CryIAc concentration of 1000 nM. In saturation binding assays, incubation of a fixed amount of each of the three ¹²⁵I-labeled CryIA toxins with increasing concentrations of BBMV showed that binding reached a saturation level in each case but that the level of CryIAc binding was substantially higher than those of CryIAa and CryIAb. Maximum saturable binding at 400 µg/ml of BBMV was approximately 0.35, 0.05 and 1.5 ng for CryIAa, CryIAb and CryIAc, respectively, which represents an approximately 30-fold difference in CryIAc binding compared to CryIAb, and, it is 4 fold higher for CryIAc compared to CryIAa (data not shown).

10

15

20

25

30 **RESULTS: IMMUNOPRECIPITATION OF THE CRYIAB BINDING PROTEIN.**

 Immunoprecipitation experiments were performed using CryIAb, which has the highest binding affinity of the three toxins, to further examine the specificity of binding of the toxin to the 200 kD protein. BBMV proteins were solubilized in 1% NONIDET P-40™ and

WO 01/34807

PCT/US99/41521

immunoprecipitated with anti-toxin-protein A-Sepharose beads. The mixture of bound material was solubilized in SDS sample buffer containing 2-mercaptoethanol. Electrophoresis and staining of the gel with Coomassie blue revealed a protein of about 200 kDa, demonstrating selective precipitation of the 200 kD toxin-binding protein. Radioligand blotting with ¹²⁵I-Cry1Ab showed a band of about 200 kDa (data not shown), indicating precipitation of the same binding protein as that identified in previous ligand blot experiments. Additionally, a Western blot (data not shown) of the immunoprecipitated protein using Cry1Ab and anti-Cry1Ab polyclonal antiserum confirmed the results of the radio-ligand blot (data not shown). The low-molecular weight bands at 60 and 52 kDa correspond to the Cry1Ab toxin and the heavy chain of IgG, respectively.

RESULTS: PURIFICATION OF THE BINDING PROTEINS.

To determine whether the 200 kD band contains more than one protein, the band was excised from a 7.5% SDS polyacrylamide gel, electroeluted, dialyzed and concentrated. The concentrated protein was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis over a pH range of 3.5-10. The protein migrated as one spot with an estimated pI of 4.5 ± 0.2 and apparent molecular mass of 200 kDa. The purified 200 kD protein stained with Schiff's reagent (data not shown) indicating that the binding protein is glycosylated. The 200 kD IEF spot bound ¹²⁵I -Cry1Ab (data not shown) corroborates the results from other immunoprecipitation studies.

RESULTS: SOUTHERN BLOT ANALYSIS.

To detect the presence of the Cry1A receptor in *P. gossypiella*, genomic DNA from both insects were hybridized against the cloned THW BT-R₂ cDNA and its 507-bp minimum binding fragment. The two probes bound

WO 01/34807

PCT/US00/41521

intensively to the PvuH fragment of *M. sexta* genomic DNA (data not shown). There was weak hybridization to the *P. gossypiella* DNA, however, using the minimum binding probe and none with the full-length BT-R₁ probe (data not shown). These results suggest that the minimum binding fragment from *M. sexta* shares a significant level of nucleotide similarity to the Cry1A binding receptor in *P. gossypiella*, more so than to the full-length BT-R₁ receptor.

10 **RESULTS: IMMUNODETECTION OF NATIVE AND CLONED PBW BT-R₂ USING BT-R₁ ANTIBODIES.**

To confirm the relatedness of the cloned PBW fragment to the THW BT-R₁ and its ability to bind toxin, it was subcloned into a pET30 expression vector. The native PBW BBMV proteins and the expressed proteins from clones PBW-287, -421 and -866 were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and incubated with either anti-BT-R₁ serum or Cry1Ab toxin followed by antiserum to the toxin. The results reveal that BBMV contain a 200 kD protein that interacts with THW BT-R₁ antiserum (data not shown). In addition, clones PBW-287, -421 and -866 which express proteins of about 15, 21 and 32 kD, respectively, also cross-reacted with BT-R₁ antiserum. The 32 kD clone, however, was the only protein to bind toxin, whereas no detectable binding was observed with the 21 kD protein (data not shown). These results confirm the sequence relatedness of PBW BT-R₂ to THW BT-R₁ and demonstrate that the 32 kD protein contains the toxin-binding site of the receptor.

30 **RESULTS: SPECIFICITY OF TOXIN BINDING TO THE CLONED RECEPTOR.**

The specificity and affinity of toxin binding to the receptor fragment (PBW-866) was determined using competition ligand blot analysis. The expressed 32 kD

WO 01/34807

PCT/US00/41521

protein was transferred to PVDF membranes and incubated with 125 I-Cry1Ab in the absence or presence of increasing concentrations of unlabeled Cry1Ab toxin. Autoradiography revealed significant reduction in the intensity of the 32 kD band to an undetectable level in the presence of 500 nM unlabeled Cry1Ab toxin (data not shown). Bound 125 I toxin was quantitated with a gamma counter and the BIO-RAD IMAGERTM analysis system was used to calculate the binding affinity of toxin to the expressed fragment. The binding affinity (~17nM) of the toxin was similar to the calculated value (Table 1) for SBMV. These results demonstrate that Cry1Ab binds specifically with high affinity to PBW BT-R₂ 866. Other truncation fragments were also tested, and it was determined that the minimum binding fragment consists of amino acids 1269 to 1367.

Results: Expression of PBW BT-R₂ in COS-7 Cells.

PBW BT-R₂ cDNA was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 (INVITROGENTM) and transfected into COS-7 cells. Protein encoded by the PBW BT-R₂ cDNA was expressed as a membrane protein capable of binding Cry1Ab toxin. Membranes isolated from transiently transfected COS-7 cells were solubilized, electrophoresed, and immunoblotted either with Cry1Ab toxin and its antiserum or with BT-R₁ antiserum directly. The expressed 220 kD receptor bound Cry1Ab toxin and cross-reacted with BT-R₁ antiserum. No interaction to vector transfected cells was observed.

Expression of BT-R₂ receptor on the cell surface was shown by fixing the cells in methanol or paraformaldehyde and incubating first with anti-BT-R₂ serum, and then with TRITC IgG secondary antibodies. Transfected cells portrayed bright surfaces due to the binding of BT-R₂ antibodies to the cell surface clearly

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

showing that the PBW BT-R₁ receptor is expressed on the cell surface.

5 The surface-expressed PBW receptor binds toxin and kills the cells. Transfected cells were incubated with Cry1Ab toxin for 2 or 4 hr, washed, fixed and incubated first with anti-Cry1Ab antiserum, and then with TRITC IgG secondary antibodies. As shown by immunofluorescence microscopy, BT-R₁ expressing COS-7 cells bound the toxin, whereas cells transfected with vector alone did not show any surface binding of toxin. Incubation of cells expressing PBW BT-R₁ with toxin for 2 or 4 hr showed significant morphological changes which include loss of cell integrity, loss of cell cytoplasm and complete disintegration of the plasma membrane and cell death.

10 The prior cited and following references are incorporated by reference herein and are used to support the invention disclosure:

20 J.S. Alexander et al., The role of cadherin endocytosis in endothelial barrier regulation: involvement of protein kinase C and actin-cadherin interactions, *Inflammation*, Vol. 22, pp. 419-433, 1998.

25 A.C. Bartlett, Resistance of the pink bollworm to B.T. transgenic cotton, *Beltwide Cotton Conf.*, Vol. 2, pp. 766-768, 1995.

 P.C. Bolin et al., presented at the XXVIIth Annual Meeting of the society for Invertebrate Pathology, Cornell University, Ithaca, N.Y., 1995.

30 A. Bravo, Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains, *J. Bacteriol.*, Vol. 179, pp. 2793-2801, 1997.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- A. Bravo et al., Immunocytochemical Localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects, *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 60, pp. 237-246, 1992.
- 5 L.A. Bulla et al., Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*, *Crit. Rev. Microbiol.*, Vol. 8, pp. 147-204, 1980.
- J. Carroll et al., Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles, *Eur. J. Biochem.*, Vol. 245, pp. 797-804, 1997.
- 10 N.C. Chilcott et al., Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* crystal proteins in vivo and in vitro; *J. Gen. Micro.*, Vol. 134, pp. 2551-2558, 1988.
- 15 P. Chomczynski et al., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analyt. Biochem.*, Vol. 162, pp. 156-159, 1987.
- 20 A.H. Dantzig et al., Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily, *Science*, Vol. 264, pp. 430-433, 1994.
- M.L. Day et al., E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway, *J. Biol. Chem.*, Vol. 274, pp. 9656-9664, 1999.
- 25 R.A. De Maagd, Different Domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut

WO 01/34807

PCT/US90/41521

- membrane proteins on ligand blots, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp. 2753-2757, 1996.
- 5 J.A. Dorsch et al., Isolation of the binding site in BT-R₁ from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berlineri*. In Preparation, 1999.
- 10 U. Estada et al., Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidopteran: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 60, pp. 3840-3846, 1994.
- 15 J. Ferre et al., Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 132, pp. 1-7, 1995.
- J.B. Findlay et al., Gel Electrophoresis of proteins-A Practical Approach, *Academic Press, New York*, 2nd ed., B.D. Hames and D. Rickwood (editors), pp. 83-89, 1990.
- 20 B.B. Finlay et al., Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens, *Science*, vol. 276, pp. 718-725, 1997.
- 25 B.R. Francis et al., Further characterization of BT-R₁, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 27, pp. 541-550, 1997.
- S.F. Garczynski et al., Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, pp. 2816-2820, 1991.
- 5 S.S. Gill et al., Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, pp. 27277-27282, 1995.
- 10 S.S. Gill et al., The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins, *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 37, pp. 615-636, 1992.
- R. Gurezka et al., A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments, *J. Biol. Chem.*, Vol. 274, pp. 9265-9270, 1999.
- 15 J.L. Hermiston et al., In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death, *J. Cell Biol.*, Vol. 129, pp. 489-506, 1995.
- 20 C. Hofmann et al., Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Eur. J. Biochem.*, Vol. 173, pp. 85-91, 1998a.
- 25 C. Hofmann et al., Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp. 7844-7848, 1988b.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- H. Hofte et al., Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol. Rev.*, Vol. 53, pp. 242-255, 1989.
- 5 W. Hunter et al., Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity, *Nature*, Vol. 194, pp. 495-496, 1962.
- 10 H. Ihara et al., Purification and partial amino acid sequences of the binding protein from *Bombyx mori* for CryIAa delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 120, pp. 197-204, 1998.
- 15 S.S. Kantak et al., E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, pp. 16953-16961, 1998.
- 20 T.P. Keeton et al., Ligand specificity and affinity of BT-R₁, the *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 3419-3425, 1997.
- 25 T.P. Keeton et al., Effects of midgut-protein-preparative and ligand binding procedures on the toxin binding characteristics of BT-R₁, a common high-affinity receptor in *Manduca sexta* for CryIA *Bacillus thuringiensis* toxins, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, pp. 2158-2165, 1998.
- C. Kintner, Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain, *Cell*, Vol. 69, pp. 225-236, 1992.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- 5 F.J. Knight et al., The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, Vol. 11, pp. 429-436, 1994.
- B.H. Knowles, Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins, *Adv. Insect Physiol.*, Vol. 24, pp. 275-308, 1994.
- 10 K.A. Knudsen et al., A role for cadherins in cellular signaling and differentiation, *J. Cell Biochem. Suppl.*, Vol. 30-31, pp. 168-176, 1998.
- J.S. Kwa et al., Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIC to cultured insect cells, *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 71, pp. 121-127, 1998.
- 15 U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- M.K. Lee et al., Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 220, pp. 575-580, 1996.
- 20 M.K. Lee et al., Location of *Bombyx mori* receptor binding region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, pp. 3115-3121, 1992.
- 25 M.K. Lee et al., Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- alteration, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 3836-3842, 1995.
- 5 J. Li et al., Crystal structure of the insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution, *Nature*, Vol. 353, pp. 815-821, 1991.
- K. Luo et al., A 106 kDa from of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*, *Insect Biochem. Mole., Biol.*, Vol. 26, pp. 783-791, 1996.
- 10 K. Luo et al., Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant Diamondback moths (*Plutella xylostella*), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 1024-1027, 1997.
- 15 A.C. Martinez-Ramirez et al., Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs, *Biochem. Biophys Res. Commun.*, Vol. 201, No. 2, pp. 782-787, 1994.
- 20 J. Mengaud et al., E-cadherin is the receptor required for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells, *Cell*, Vol. 84, pp. 923-932, 1996.
- 25 E.G. Midboe, Characterization of the BT-R₁ gene and its expression in *Manduca sexta*, Ph.D. University of Wyoming, Laramie.
- W.J. Moar et al., Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 2086-2092.

WO 01/34807

PCT/US80/41521

S.M. Mohamed, Unpublished data, 1999.

5 J. Muller-Cohn et al., *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins, *J. Econ. Entomol.*, Vol. 89, pp. 791-797, 1996.

Y. Nagamatsu et al., Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(a) toxin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 62, pp. 727-734.

10 Y. Nagamatsu et al., Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(a) toxin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 62, pp. 718-726, 1998.

15 P.H. O'Farrell, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, Vol. 250, pp. 4007-4021, 1975.

20 B. Oppert et al., Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) protoxin, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 26, pp. 571-583, 1996.

J.J. Peluso et al., N-cadherin-mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in a progesterone-independent manner, *Endocrinology*, Vol. 137, pp. 1196-1203, 1996.

25 F.J. Perlak et al., Insect resistant cotton plants, *Biotechnology (NY)*, Vol. 8, pp. 939-943, 1990.

C.T. Powell et al., Persistent membrane translocation of protein kinase C alpha during 12-0-

WO 01/34897

PCT/US99/41521

- tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of
LNCaP human prostate cancer cells, *Cell Growth Differ.*,
Vol. 7, pp. 419-428, 1996.
- 5 D.L. Rimm et al., Molecular cloning of human E-cadherin
suggests a novel subdivision of the cadherin
superfamily, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 200,
pp. 1754-1761, 1994.
- 10 J. Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory
manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
Spring Harbor, N.Y., 1989.
- E. Schnepf et al., *Bacillus thuringiensis* and its
pesticidal crystal proteins, *Microbiol. Mol. Biol.*
Rev., Vol. 62, No. 3, pp. 775-806, 1998.
- 15 J.L. Schwartz et al., Single-site mutations in the
conserved alternating-arginine region affect ionic
channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis*
toxin, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 3978-
3984, 1997.
- 20 T. Shimizu et al., Lamin B phosphorylation by protein
kinase calpha and proteolysis during apoptosis in human
leukemia HL60 cells, *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, No. 15,
pp. 8669-8674, 1998.
- 25 S. Strehl et al., Characterization of two novel
protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human
chromosome 13 and mouse chromosome 14, *Genomics*, Vol.
53, No. 1, pp. 81-89, 1998.
- S.T. Suzuki, Protocadherins and diversity of the
cadherin superfamily, *J. Cell. Sci.*, Vol. 109 (Pt. 11),
pp. 2609-2611, 1996.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- B.E. Tabashnik et al., Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*, *PNAS USA*, Vol. 91, No. 10, pp. 4120-4124, 1994.
- 5 M. Takeichi et al., Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis, *Neurosci. Res. Suppl.*, Vol. 13, pp. S92-S96, 1990.
- 10 R.K. Vadlamudi et al., A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berlineri*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, No. 17, pp. 12334-12340, 1993.
- R.K. Vadlamudi et al., Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, No. 10, pp. 5490-5494, 1995.
- 15 A.P. Valaitis et al., Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 27, pp. 529-539, 1997.
- 20 A.P. Valaitis et al., Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 25, No. 10, pp. 1143-1151, 1995.
- 25 T.F. Watson et al., Presented at the Beltwide Cotton Conf., Memphis.
- M.E. Whalon et al., Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*, *J. Econ. Entomol.*, Vol. 86, pp. 226-233, 1993.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

M.R. Williams, Presented at the Beltwide Cotton Conf., 1999.

5 G.K. Winkel et al., Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo, *Dev. Biol.*, Vol. 138, pp. 1-15, 1990.

10 M.G. Wolfersberger, The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membrane for the toxins, *Experientia*, Vol. 46, pp. 475-477, 1990.

15 M. Wolfersberger et al., Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 86A, pp. 301-308, 1987.

K. Yaci et al., Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin, *Eur. J. Biochem.*, Vol. 246, pp. 652-657, 1997.

20 While this invention has been described with reference to illustrative embodiments, this description is not intended to be construed in a limiting sense. Various modifications and combinations of illustrative
25 embodiments, as well as other embodiments of the invention, will be apparent to persons skilled in the art upon reference to the description. It is therefore intended that the appended claims encompass such modifications and enhancements.

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An isolated nucleic acid molecule, comprising
2 a sequence encoding a BT toxin receptor of about 200 kD
3 from the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*.
- 1 2. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, encoding the BT toxin receptor sequence of SEQ ID
3 NO: 2.
- 1 3. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, comprising the sequence of SEQ ID NO: 1.
- 1 4. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein said isolated nucleic acid molecule is
3 capable of hybridizing at high stringency to a probe of
4 400 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 over the
5 entire length of said probe.
- 1 5. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein said BT toxin receptor is at least 85%
3 homologous to the sequence of SEQ ID NO: 2.
- 1 6. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein said BT toxin receptor is at least 90%
3 homologous to the sequence of SEQ ID NO: 2.
- 1 7. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein said BT toxin receptor is at least 95%
3 homologous to the sequence of SEQ ID NO: 2.
- 1 8. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein said BT toxin receptor is at least 98%
3 homologous to the sequence of SEQ ID NO: 2.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

- 1 9. The isolated nucleic acid molecule of claim
2 1, wherein the sequence is codon optimized for
3 expression in a prokaryotic system.
- 1 10. The isolated polynucleotide sequence of claim
2 1 wherein the sequence is codon optimized for
3 expression in a eukaryotic system.
- 1 11. An expression vector, comprising the isolated
2 nucleic acid molecule of claims 1-10.
- 1 12. A host cell, comprising the vector of claim
2 11.
- 1 13. The host cell of claim 12, which is used to
2 assess the level of cytotoxicity and mode of action of
3 toxins.
- 1 14. A cell, comprising a naturally occurring BT
2 toxin receptor, which is used to assess the level of
3 cytotoxicity and mode of action of toxins.
- 1 15. A transgenic organism, comprising the vector
2 of claim 11.
- 1 16. An isolated nucleic acid molecule, comprising
2 a sequence encoding a peptide selected from the group
3 consisting of: amino acid (aa) 534-544, aa 291-304, aa
4 697-705, aa 622-632, aa 886-895, aa 791-803, aa 1055-
5 1066, aa 1621-1642, aa 1321-1331, aa 1451-1461, aa
6 1516-1525, aa 1572-1582, aa 1677-1729, and aa 1269-1367
7 of SEQ ID NO: 2.
- 1 17. A purified protein, comprising a sequence
2 that is at least 85% homologous to SEQ ID NO: 2.

WQ 01/34807

PCT/US00/41521

- 1 18. The purified protein of claim 17, wherein the
2 sequence is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 2.
- 1 19. The purified protein of claim 17, wherein the
2 sequence is at least 95% homologous to SEQ ID NO: 2.
- 1 20. The purified protein of claim 17, wherein the
2 sequence is at least 98% homologous to SEQ ID NO: 2.
- 1 21. The purified protein of claim 17, wherein the
2 sequence is SEQ ID NO: 2.
- 1 22. A purified peptide, comprising a sequence
2 selected from the group consisting of; amino acid (aa)
3 534-544; aa 291-304; aa 697-705; aa 622-632; aa 886-
4 895; aa 791-803; aa 1055-1066; aa 1621-1642; aa 1321-
5 1331; aa 1451-1461; aa 1516-1525; aa 1572-1582; aa
6 1677-1729; and aa 1269-1367 of SEQ ID NO: 2.
- 1 23. The purified peptide of claim 22, that
2 comprises aa 1269-1367 of SEQ ID NO: 2.
- 1 24. A purified peptide that comprises at least 17
2 contiguous amino acids (aa) from aa 1677-1729 of SEQ ID
3 NO: 2.
- 1 25. An isolated nucleic acid molecule, comprising
2 a first sequence that is capable of hybridizing at high
3 stringency to a probe of a second sequence along said
4 probes entire length, wherein said second sequence is
5 nucleotides 3807-4101 of SEQ ID NO: 1.
- 1 26. An isolated nucleic acid molecule, comprising
2 a sequence that encodes the peptide of claims 19-21.

WO 01/34807

PCT/U500/41521

1 27. *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptor
2 antibody, that binds to an antigen present in the
3 carboxyl tail of a BT-R2 protein as identified in SEQ
4 ID NO: 2, and does not bind to silkworm or tobacco
5 hornworm *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors.

1 28. A *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptor
2 antibody, that binds to an antigen present in a BT-R2
3 protein as identified in SEQ ID NO: 2, and also binds
4 to silkworm and tobacco hornworm *Bacillus thuringiensis*
5 Cry toxin receptors.

WO 01/34807

PCT/US00/41521

1/9

AACATTTACATACAGCCAGTGTAGATGACACATTGATTTAAAAAATAGTCCGAGTGCTTTGA
ATCTGTGATTTCAAATATCGAATCAAAAGGACTGCATTAGTGTGTGGGAGTTAAAGTGTGT
GAGAATAGACCAACGACCATGCAAGATGGCGGGTGACGCTGCATACTGGTGACGGTGCTTCTC
ACCTTCGCAACATCAGTTTTCGGGCAAGAAACAACATGGTCGAGATGTTACTACATGACTGACG
CTATTCCGAGGGGAACCGAAACCGGATGATTTCGCTGACTAGAAATGGACTGGTGGATGGACCGA
CTGGCCTTTGATCCCGGCTGAGGCAAGAGACGAGTGTGCATAAACGGCTGGTACCCACAACCTC
ACGAGCCTTCTCTCGGCACCATCATCATCCACATGGAAAGAGAGATCGAGGGAGATGTTGCTA
TCGCTAACTTAACATGATGTTCTCGAACCCAGAAATTTGTCAGCCGATGGTTATAGSATC
TTCTAACCTGCTAAGTCCAGAGATCCGGAATGAAACGGGGCGTGGTACCTTTATATAACCAAT
AGGCAAGATTATGAAACACCAACAATGCGTCGGTATACATTGCAGTCCGAGTCCAGACGAGA
CTCGTGGGACGAGTGAGTCTGTCCATCGAAACATTGACGATAACGACCTATCGTCAGGGT
GCTAGACGCTTTCGCAAGTCCCGGAATTCGGGGAGCTCGACTAACAGACTGCGTTTACCAAGTG
TCAGACGAAGATGGGAGGCTTAGTATCGAGCCATGACATTCGCGCTCACATCAGACCGTGAAG
ACGTACAGATAATTCTATGTGGAGCCAGCTCACATTACTGGTGATTGGTTCAACATGCAAAATTAC
TATCGGTATCCTTACGCGCTTAACCTCGAAAGCAACCCGCTGCACATCTTTCAAATCACTGCT
TTGACTCCTGGGCCAACCAACATACGGTGACGGTGATGGTGCAGTCCAGAAATGTGGAACACC
GACCGCGGATGGATGGAAATCTTCGAGTCCAGCAGTTTGACGAGATGACGGAGCAGCAATT
CCAGGTGCGGCGCATCGACGGAGACCTGGCATCGGGAAGCTATACACTATACCTTCGAGACA
GATGAGGAAGAGATTGTTCTTCATCGAAACACTTCGGGCGGCGCATGACGGAGCCATCTTCA
GCACTCGATGATTGATGTGGATAGGCTCCGCGAGATGCTCTCAGACTGTCCTGTTGGCATA
CAAGTACGACAATGTGTCCTTCGCCACCCGACACCCGTCGTGATCATAGTCAATGACATCAAC
AACAGAAACCCCAACCGCTGCAAGATGAGTACACAATCTCCATAATGGAAGAACTCCACTGT
CGCTGAATTTGCTGAATTTTGGTTTCTATGATGAAGATTTGATCTACGCAATCTCTGGT
GGAAATACAAGGCGAGAACCTTCAGGCGTAGAGCAAGCGTTTATATTGCGCCACCGCAGGC
TTCCAGAACGAGACATTCGCCATAGGACTCAAGATCACCGAATGCTGGATTATGAGGATGTTT
CTTTCCAAACATCAAGCTCAAGGTAATAGCAACGGACCGTGACAATACCAATTTTACTGGAGT
CGCGGAGTCAACGTGAACCTGATTAAATGGAAACGACGAGGAGCGATCTTTGAGGAAGACCG
CTCGTTGTCAAGTTCAAGGAGACTGTACCCAAAGACTATCACGTCCGCGAGACTGAGGGCTCAG
ACCGGACATAGGAGACAGCGTTGTGCATTCCATCTTGGGAAATGCGAATACATTTTGAGAAAT
CGACGAAGAACTGGCGACATATACGTAGCTATTGATGACGCGTTTCGATTATCAGACAGAAAT
GAATTTAACATACAAGTTCCGCGCTCAGGACACCATGTCCGAGCCAGAGTCCAGGCATACAGCGG
CTGCTCAGCTGGTCATAGAATCGAGGACGTCAACACACACCTCCTACTCTGAGGCTGCTCG
CGTAAGTCCGCTCTGTAGAAGAGAAATGTCCAGAGGGCTTTGAAATCAACCGGAGATAACCGCC
ACGGACCTGACACACAGCATACCTGCAGTTTGAATAGATTGGGACACATCCTTTGCCACTA
AACAGGGGCGTGATACCAATCAATAGATTCCAGCGATGCGTGGATATAGAAACCATCTTCCC
AAACCCAGCCGACACCAAGAGGCTGTGGGCGAGTGGTAGCGAAGGGGATCCGCCATAACGTG
ACCATCCATTTTGAAGAGTTGAATTTCTCTACCTCACAGTGAGAGTTGCGGACTTGACACAG
ATGACGGACGAGATTATGATGAATCTACCTTCACGGTAATAATAATAGATATGAACGACAACTG
GCCTATCTGGGCTCTGGTTTCTGAAACAGACCTTCAGTATTCGGGAGCGATCATCTACCGGC
GTCTGATCGGGTCCGTACTCGTACAGACATTGATGGCCACTTTACAAACAGTCCGGTACA
CCATTATCCCCCAGGAAGATACTCCTGAAGGTCTAGTCCAGATACATTTCTGTACGGGTCAAT
TACAGTTGATGAGAAATGTTGCAATCGACGCTGATTTCCACCTCGTTGGCACCTCAACTACAG
GITATAGCCAGGACAAATGTTCTGAAGAAATGAAGAGAACTGTCCCGGATCCAGTGTCT
GGGATACTCTGCGGACAAATGTAATTAACATCGTGGACATAACAAACAGGTCCCGGACGAGA
CCTCAGTCGATCAACGAAACGGTGTACATTTATGAAATGCACCGATTTCACGAACTGGTC

Figure 1A

WO 01/34807

PCT/US00/41521

2/9

AAGATATACTCCATCGACGAAGACAGAGACGAAATATATCACACGGTGGGGTACCAGATCAATT
ATGCTGTGAACCAACGGCTGCGAGACTTCTTCGCCATAGACCTGGATTACAGCCAGGTGTACGT
GGAGAACACCAACATGAGCTCCTGGATCGGGACAGAGGCGAAGACCAACACAGGATATTCATT
AACCTCATTGACAACCTTTATAGCGAAGGAGATGGAAATAGAAATGTAAACACTACAGAGGTGC
TGGTATATCTATTAGATGAGAATGACAACGGCTCCTGAATTGCCGACTCCAGAAGCTGAGTTG
GAGCATTTCGAGGATTACAAGAGGGTATAACACTCGATGCCGAAAGCGATGTGATATACGCA
CCGGATATAGACAAAGAGGACACGCCAAACTCTCACGTTGGCTACGCAATCCTGGCCATGACAG
TCACCAATAGAGACCTGGACACTGTTCCGAGACTTCTCAACATGCTGTCCGCTAACCAACGTAAAC
CGGATTCTCCAGACAGCAATGCCTTTGAGAGGATATTGGGGGACTTACGATATAAGTGTACTG
GCGTTCGACCCGGTATTCCTCAGCAGATATCTCATGAGGTGTATGAATTGGAAATTCGACCTT
ACAATTACAATCCTCCTCAGTTCCGTTTTCTGAATCCGGGACGATTCACGACTGGCTTTGGA
ACGGCAGTGGTAAATAATGTTTTGTCACTGTAAACGGTGACCCGTTAGACAGGATACAAGCA
ATTGACGACGATGGTCTTGATGCTGGCGTGTGACTTTCGATATTGTTGGAGATGCTGATGCGT
CAAACTACTTCAGAGTAAATAATGATGGCGACAGCTTTGGAACCTTGTGCTGACACAGGCGCT
TCCTGAGGAAGGCAAGGAATTTGAGGTTACCATCCGGGTACAGACGGCGGAACGAACTTCGA
TCATATTCAACAGACTCCACTATAACAGTCCCTCTTCGTTCCGACTTTGGGTGATCCGATCTTTC
AAGATAACACTTACTCAGTAGCATTTCTTGAATAAGAGGTTGGCTTGACTGAGAGGTTCTCGCT
CCCACATGACAGAGGCCCTAAGAACAACCTTCGACTGACGACTGTCACGATATTACTACAGG
ATCTTTGGTGGTGTGAGTACGAGCCATTGACCTGGACCCGGTGACGAACGTGATCTTCCTGA
AATCAGAACTAGACCGGAGACCACTGCTACGCATGTGGTGCAAGTGCCAGCCAGTAATTTCGCC
CACAGGAGGGCGGAATACCACTCCCTGGGTCTTCTCACCGTCACTGTCACTGTACGAGAAGCG
GATCCACGGCTGTGTTGAGCAGCGTCTGTACACGGCTGGCATTTCCTACTCCGATAACATCA
ACAGGGAACACTACTACCGTTCTGTCAACTCATTCGAAAACGCAAAATGACATATACCATCGA
AGACGGTTCTATGGCGGTGGACTCCACTCTGGAAGCCGTCAAGGACTCGGCGTTCCATCTGAAC
GCGCAGACCGGCGTCTCATACTGAGGATACAACCTACTGCCAGCATGCAGGGCATGTTTGAAT
TCAACGTCATCGCTACTGACCCAGATGAGAAGACAGATACGGCAGAGGTGAAGTCTACCTCAT
TTCATCCCAAAATAGGGTGTCTTCTATATCTGTGACATGTGGAGCGGTGAGAGTAAACGA
GACTTTATCGCAGAAACGTTGAGCGTTGGCTTCACATGACCTGCAATATAGATCAGGTGCTGC
CGGGCACCACGACGCGGGGTGATTGAGGAGGCCATGGCGGAAGTCCATGCTCACTTCATACA
GGATAACATCCTGTGAGCGCCGACAGTATTGAAGAGCTTCGCACTGACACTCAGCTGCTGGCC
TCCGTCCAAGGTGTGTTGAACCAACGGCTGTTGGTCTGAAACGACCTGGTGACGGGGTCAAGCC
CTGATCTCGGCACTGCCGGGTGCAGATCACCATCTATGTGTAGCCGGGTGTGAGCCATCCT
TGCTTCTCTGCTGCTTATTCTGCTCATCACATTCATCGTGAGGACCGAGCTCTGAACCGCGT
TTGGAAGCACTGTGATGACGAAATACGGCTCGGTGGATTCCGGGCTGAACCGAGTGGGGATAG
CGGGCCCGAGAACCAACAAACCGCATCGAAGGCTCCAAACCCATCTGGAACGAGCAGATCAA
GGCCCCGGACTTCGATGCCATCAGTGACACATCTGACGACTCTGATCTAATCGGCATCGAGGAT
AGCCTGCAGGGAGCTTAGAGAGAAAAGGGCAGACAAAGCAGTAGATGCTTGGTGAAGAAAGC
TGAAGAAGAACGATGGAGCCATGGGGGAATACGAAATCAAGGCCCTCGAGCCCTAGAACTAT
CGTGAGTCGTATTACGTATATCCAGACATGATGAGATACATTGATGAGTTTGGACAPACCGCAA
CTAGAAATGCAAGTGAAGAAATGCTTTATTGTTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTGGAA
CCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAATCATCAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTCA
GGGGGAGGTGTGGGAGGCTATCC

Figure 1B

WO 01/34807

PCT/US00/41521

SIG 3/9
 1 MAGDACILVT VLLTFATSVE GQETTSRCY YMTDAIPREP KPDDLPLEW
 CR1 →
 51 TGGWTDWPLI PAEPREDVCI NGWYPQLTST SLGTIIHME EEIBGDVAIA
 101 KLNVDGSGTP EIVQPMVIGS SNLLSPEIRN ENGAWLYIT NRQDYETPTM
 CR2 →
 151 RRYTFDVRVP DETRAARVSL SIENIDNDP IVRVLDACQV PELGEPRLTD
 201 CVYQVSDDEG RLSIEPMTFR LTSREDVQI FYVEPAHITG DWFNMQITIG
 CR3 →
 251 ILSALNFESN PLHIFQITAL DSWPNNHVT VMVQVQNVH RPPRWMEIFA
 301 VQQFDEMTQ QFQVRAIDGD TGICKAIHYT LETDEEEDLF FIETLPGGHD
 351 GAIFSTAMID VDLRLRDVFR LSLVAYKYDN VSFATPTPVV IIVNDINNKK
 CR4 →
 401 PQPLQDEYTI SIMEETPLSL NFAELPGFYD EDLIYAQSLV EIQGENPPGV
 451 EQAFYIAPTA GPQNTFAIG TQDHRMLDYE DVPPQNIKLK VIATDRDNTN
 CR5 →
 501 FTGVAEENVN LINWNEDEPI FEEDQLVVKF KETVPKDYHV GRLRAHDRDI
 551 GDSVVHSILG NANTFLRIDE ETGDIYVAID DAFDYHRQNE FNIQVRAQDT
 CR6 →
 601 MSEPESRHTA AAQLVIELED VNNTPTLRL PRVSFSVEEN VPEGFENRE
 651 ITATDPDTTA YLQFEIDWDT SPATKQGRDT NPIBFHGCVD IETIPFPAD
 701 TREAVGRVVA KGIRHNVTIH FEEFEPLYLT VRVRDLHTDD GRDYDESTFT
 CR7 →
 751 VIIIDMNDNW FIWASGFLNQ TFSIRERSST GVVIGSVLAT DIDGPLYNQV
 801 RYTIIPQEDT PEGLVQIHFW TGQITVDENG AIDADIPPRW HLNYTVIASD
 CR8 →
 851 KCSEENEENC PPDVFWDTL RDNVINIVDI NNKVEAADLS RFNETVYIYE
 901 NAPDFTNVVK IYSIDEDRDE IYHTVRYQIN YAVNQRLRDF FAIDLDSGQV
 951 YVENINNELL DRDRGEDQHR IFINLIDNFY SEGDCNRNVN TTEVLVILLD
 CR9 →
 1001 ENDNAPELPT PEELSWSISE DLQEGITLDG ESDVIYAPDI DKEDTPNSHV
 1051 GYAILAMTVT NRDLDTVPRL LNMLSPNNVT GFLQTAMPLR GYWGTYDISV
 1101 LAFDHGIPQQ ISHEVYELEI RPYNYNPPQF VFPESGTILR LALERAVVNN

Figure 2A

WO 01/34987

PCT/US00/41521

4/9

CR10 →
 1151 VLSLVNGDPL DRIQAIDDDG LDAGVVTFDI VGDADASNYF RVNNDGDSFG
 1201 TLLLTQALPE EGKBEFVTIR ATDGGTEPRS YSTDSTITVL FVPTLGDPF
 CR11 → MBF
 1251 QDNTYSVAFF EKEVGUTERF SUPHSDPKN KLCDDCHDI YYRIFGSDY
 1301 RPFDLDPVTN VIPLKSELDL ETTATHVVQV AASNSPTGGG IPLPGLLTV
 CR12 →
 1351 TVTIVREADPR PVPEQRLLTA GISTSDNINR ELLTVRATHS ENAQLTYTIE
 1401 DGSMAVDSTL EAVKDSAPHL NAQTGVILIR IQPTASMQGM FEFNVIATDP
 → MPD
 1451 DEKIDTAEVK VYLISQNEV SFIFLNDVET VESNRDFIAE TFSVGFNMTC
 LZ
 1501 NIDQVLPFTN DAGVIQEMMA EVHAHFIQDN IPVSADSIEE LRSDTQLLES
 1551 VQGVINQRLI VLNDLVTGVS PDLGTAGVQI TIYVLAGLSA ILAFLCHELL
 → CYT
 1601 ITFIVRTRAL NRRLEALSMT KYGSVDSGLN RVGIAAPFTN KHALEGSNPI
 1651 WNEQIKAPDF DAISDTSDDS DLIGIEDSLQ GDLEEKRADK AVDALVKKLK
 1701 KNDGAMGEYE FKASRASRTI VSRITYIQT.

Figure 2B

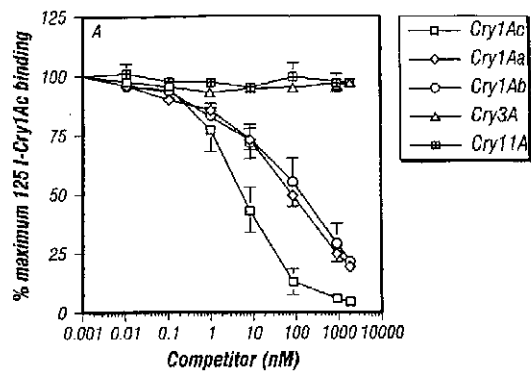


FIG. 3A

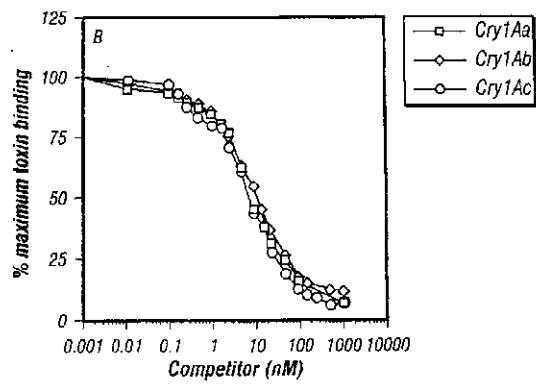


FIG. 3B

WO 01/34807

PCT/US00/41521

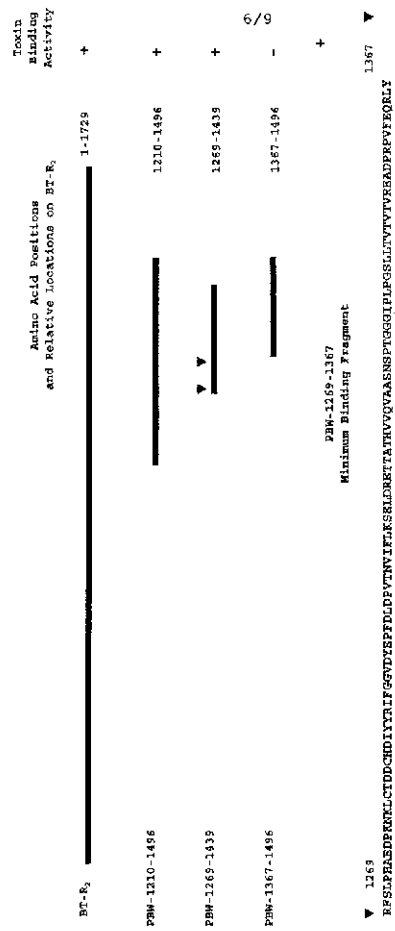


Figure 4

WO 01/34807

PCT/US00/41521

7/9

Figure 5A

1 AGVVRLATLLIYETLAQERCGFNYIPRP B.mori STR175
 1 MAVRIAAFLVFIAPAVLAQERCGYMTAPRLTHSTR1
 1 MAGACAILVTVLTFATSVFQQTSSRCYYMTDAIPRE PBN STR2
 35 PRPDLPELDFEQTMSORPLIPADREVCMDGYMAMT B.mori STR175
 35 PRPDNLPLNFEQTMSORPLIPAPERDDLCMDAYHVIT THW STR1
 40 PKPDDLPDEWTGGTDMFLPAEPDDDVCINGMYQLLT PBN STR2
 73 FTYGTOYXEEIEGEVPIAALLVVRQPRVYEPFLS B.mori STR175
 74 ANLGTQVIYMDEIEDEITIAILKNYQPSTPTELPLLS THW STR1
 79 STSLGTIIHNSEIEGDVAIARLNYQSGTDEIVQPHVI PBN STR2
 112 GSNLVYIRRPDSNGEHHLITTORQDETETCMQQYVF B.mori STR175
 113 GSYNLLMVYIRRVDNGEHHLIITQRHNYSLRGMQYMF THW STR1
 119 GSNLSEELRNEGHAMYLYITNRQDYSTTHRRYTF PBN STR2
 152 KIRIDGELVAGVSLLIVNIDDNAPIIQALEPQVDELGE B.mori STR175
 151 NVRIVDGGSLVAGSLATVNIDDNAPIIQNFEPCRVPELGE THW STR1
 156 DVIVPDETRAARVSLSISNIDNDDPIVRVLDACQVPELGE PBN STR2
 192 ARLTECVVVTTDADGRISTFNOPRIDSDRGQDKIFYIQ B.mori STR175
 191 FGLTECTYQVSDADRISTEFNQPRIDSVRGDEETFETRTHSTR1
 196 PRLTDCVQVSDSDERISEPNTENLTDNSVOIFVEFE PBN STR2
 232 ANFGEHIRMTTHVIINEPLNFETHDLHIFSVTALDSLPN B.mori STR175
 231 TNIPNQMMLRHTIGUNTSLNVTSLHIFSVTALDSLPN THW STR1
 236 ANITGDMFNQIHTIGLSALNEFSNELHIEQITALDSLPN PBN STR2
 272 THTTTLLVQVENVEHRPPFWVEIFAVQQDEKTAQSFVR B.mori STR175
 271 THTTTMNVQVANVNRPPFWVEIFAVQQDEKSYQNFTV THW STR1
 276 HETVTVMVQVQNVEHRPPFWVEIFAVQQDENTEQQYR PBN STR2
 322 AIDDGTGGNKPINYRLETEDTFHIRTIEGGRSGATLY B.mori STR175
 321 AIDDGTEINMPINYRLETEDTFSIEALPGGESGAVFL THW STR1
 326 AIDDGTGGRAINYTLEEDECLFETLPGGNDGAIFS PBN STR2
 362 VDPIDRDTLOREVPQLSIIAYKYDNESSATAANVVIIVND B.mori STR175
 351 VSPIDRDTLOREVPPLTVAYKYDSEATSTTVVIIVTD THW STR1
 356 TANIVDDRDRDRYFRLSLVAYXYDNVSFATPTVVIIVND PBN STR2
 392 INDQRHEPLKEYRLNHEETALTLNFODEFGEHDRDDGG B.mori STR175
 391 INDQRHEPLKEYRLAHEETPLTLNFODEFGEHDRDDGG THW STR1
 396 INNKPQPLQDEETISHEETPLSLNEALFGEHDRDDGG PBN STR2
 432 NAQKTVRLESDYPADAAAAFYIAPEVGYQSTPTMGTANTH B.mori STR175
 431 NAQYTVRLESVDPPGAEAFYIAPEVGYQSTPTMGTLNTH THW STR1
 435 YAQLVEIQGENPGVEQAFYIAETAGQNTFAIGTQQDN PBN STR2
 472 KMLDYEIVPEFORIRLSVIATDMDNEEHVGVAVYYINLIN B.mori STR175
 471 SMLDYEIVPEFOSITIRVVATDNNDTRHVGVALVHIDLIN THW STR1
 475 RMLDYEDVEFONIKLKVIATDDRDTNFTGVAVYYINLIN PBN STR2
 511 WNDDEEFIFEHSVQNVSFKSTEGKCFFVANVRAKDRDIDD B.mori STR175
 510 WNDDEQPIFEHAVOTVTFDETEGCFFVAKAVAKDRDIDD THW STR1
 514 WNDDEEFIFEHEDOLVVKFKETVPKDYHVQRLRAHDRDIGDS PBN STR2
 551 VEHTLKGNANYSLTDXDTGDIHVTQDDFDYHQSELFV B.mori STR175
 550 VEHTLLGNAVNFLTDKLTGDIRVSANDPFNYHRESLFV THW STR1
 554 VVHLSLGNANTFLRIDDEETGDIYVAIDEAIVHRQNEPNI PBN STR2

WO 01/34807

PCT/US00/41521

B/9

Figure 5B

591 G V R A D D T L G S P - - F H T A T S Q Q - T M L S D I N N T P P T L R L F R G B.mori BTR175
 590 G V R A T D T L G L P - - F H T A T S Q Q V I R L N D I N N T P P T L R L F R G THW BTR1
 594 Q V R A Q D T M S E F E S R H T A A A Q L V I E L K D V N N T P P T L R L F R V PFW BTR2
 629 S P N V E E N V P E Q V I T S E I K A T D P O T T A E L R F E I D M T T S V A B.mori BTR175
 628 S P Q V E E N V P O G H V I T Q E L K A T D P O T T A D L R F E I N M D T S F A THW BTR1
 634 S P S V E E N V P E G F E I N R E T A T D P D T T A Y L C F E I D M D T S F A PFW BTR2
 669 T K Q G R E A N F I S F H N C V E I E T T V P A I N N R G S A I G R L V V K K I B.mori BTR175
 668 T K Q G R Q A N F D S F F N C V E I E T T F P E I N N R G L A I G R V V A R E I THW BTR1
 674 T K Q G R D T N P I E F H G C V O I E T T F P N P A O T R E A V G R V V A K G I PFW BTR2
 709 R E N V T I C Y E E F E N L Y L T V R V R D L N T V I G D D Y D E S T F T I T B.mori BTR175
 708 R H N V T T D Y E E F S V L S L T V R V R D L N T V Y G O D D Y D E S N L T I T I THW BTR1
 714 R H N V T I H F S E F S Y L V L T V R V R D L H T D D G R D Y D E S T F T V I I PFW BTR2
 749 I D M N D N P F I W V P C T L E Q S L R V R E N S D A G V V I G T L T A T D I D B.mori BTR175
 748 I D M N D N A V W V E C T L E Q N F R V R E M S A G G L V V G S V R R A D I D THW BTR1
 754 I D M N D N I D I W A S G P C N G T F S I K E R S S T Q V V I G S V L A T D I D PFW BTR2
 789 G P L Y N Q V R Y T M K A N E G T P E N L L M I O F Y T G Q I T V K T S G A I D B.mori BTR175
 788 G P L Y N Q V R Y T I F P R E D T D K D L I M I D F L T G Q I S V N T S G A I D THW BTR1
 794 G P L Y N Q V R Y T I I P Q E D E F E G L V O I N F V T G Q I T V D B N G A I D PFW BTR2
 829 A D V E R R Y N I Y Y T V V A I D A C Y A E D P D D C N D D P T Y W E F Q G V B.mori BTR175
 826 A D T P R F R L Y Y T V V A S D R C I S T E D P A D C R F D P T Y W E T E G N I THW BTR1
 834 A D I T P R F R W R L N Y T V I A S D K C S E E N C E P D P F M D I L R V N PFW BTR2
 869 V I Q I T I D I N N K I F Q P E T O Q F K A V Y Y I Y R A T H L D E V V T I T A THW BTR1
 868 T I R I T D T N N K V P Q A E T T K P D I V V Y I Y S N A T H L D E V V T I T A THW BTR1
 874 V I N I V D I N N K V B A A D L S R F W E T Y Y I Y S N A E D F T N V V K I Y S PFW BTR2
 909 S D L D R D D I Y N T I S F Q I N Y A V N P R L R D F F A V D F D T G R V Y V Y B.mori BTR175
 908 S D L D R D D I Y N T V S V V I N Y A V M P R L M N F F S V N R R T G L V Y V D THW BTR1
 914 I G S D E D E I Y R T V R Y Q I N Y A V N O R L R D F F A I D L D S G Q V Y V - PFW BTR2
 949 Y T I D - - S V L D R D C D E F O H R I F F N L I D N F F Q Q G D G N R N O N B.mori BTR175
 948 Y E T Q G S C E V L D R D C D E F T K R I F F N L I D N F M G E G E G N R N O N THW BTR1
 953 - - E N T K N R L L D R D R G E D O G E R I F T N L I D N F Y S E G O G N R N V N PFW BTR2
 986 D A E V L V V L L D V N D N A P E L P E F D E L S W S V S E S L T K G T R L Q P B.mori BTR175
 988 D T S V L V I L L D V N D N A P E L P F P S E L S W T I S E N L K Q G V R L E F THW BTR1
 991 T T E V L V I L L D V N D N A P E L P T P S E L S W S I S E D L Q E G I T L D G PFW BTR2
 1026 K - - - T Y A F D R D E P D T D N S R V G Y A I I S L T I A N M E I E - V P F E B.mori BTR175
 1028 K - - - I F A F D R D E P D T D N S R V G Y S I L N L S - T E R D I E - V P F E THW BTR1
 1031 E S D V I Y A P D I D K S D T P N S H V G Y A A L A H T V T N E D L D T V D R L PFW BTR2
 1062 F T H I Q I Q N V T G E L E T A M D L K G Y W G T Y A I H I K A Y D H G I P Q Q B.mori BTR175
 1063 F V M I O I A N V T G E I S T A M D L K G Y W G T Y A I H I R A F D H G I P Q Q - THW BTR1
 1071 L N H L S P N H V T G F L Q T A M P L R G Y W G T Y D I S V L A F D H G I P Q Q PFW BTR2
 1103 M S - N E T V E L V I R H Y Q F H A P V F V F P K H G A T L R L A R E R A V V N B.mori BTR175
 1102 M S M K T V E L I I H F P N Y Y A P E F V F P T N D A V I R L A R E R A V I N THW BTR1
 1111 I S - H E V E L F R I P Y N Y N P P Q P V F P S G T I L R L A L E R A V V N PFW BTR2
 1141 G L A T V D C E F L N R X V A T D E D G L H A G Q V A F E V V G D T E A V D Y B.mori BTR175
 1142 G V L A T V N G E F L E R I S A T D F D G L H A G V V T F Q V V G D S E S Q R Y THW BTR1
 1150 N V L S T M N C D F L D R I C A I D D G L D A G V V T F D I V G D A D A S N Y PFW BTR2

WO 01/34807

PCT/US00/41521

9/9

Figure 5C

```

1191 F K I V N D G E K S G T C M L K Q L F P E C I R E F E V T I R A T D G G T E P R B.mori BTR175
1192 F Q V V N D G E K L G S L R L Q A V P E I R R F R I T I R A T D G G T D F G T H N BTR1
1193 F R V N N D G S F G T L L T Q A L P E G K E F E V T I R A T D G G T E F F P B W BTR2

1221 P L S T D C T F S V V F V P I Q Q E F I F P Y S T H T V A F I E R E A Q L L D R B.mori BTR175
1222 P L S T D M T T R V V F V P I Q Q E F R F A S S E H A V A F I E M S A G N E S T H BTR1
1230 S Y S T D S T T V L F V P I T L C D P I F Q D N T Y S V A F F E K E V G L T E R P B W BTR2

1261 H E L F K A E R K N H C S D D C H N I Y Y R I I D G N N D G H F S L D E T T B.mori BTR175
1262 H Q L F L A Q D I K N H L C E D D C H S I Y Y R I I D G N S E C H F G L D P V R T H N BTR1
1270 F S L F H A E D P F K N F L C T O D C H D I Y Y R T F G G V D Y E F F G L D P V T P B W BTR2

1301 N V L F L V K E L D R S V S E T Y I L T I A A S N S F T I G C - I A L T S T I - T B.mori BTR175
1302 N R L F L K K E L I R E Q S A S H T L Q V A A S N S F D I G G - I P L P A S I L T T H N BTR1
1310 H V I F L K S E L D R N S T T A T H V V Q V A A S N S F T I G G O I P L P G S L L T P B W BTR2

1339 I T V N V R E A D F Q P V F V R D L Y T A G I S T S D S I N R E L L I L Q A T H B.mori BTR175
1341 V T V T V R E A D F R P V F V R E L Y T A G I S T A D S I G R E L L R L M A T Q T H N BTR1
1350 V T V T V R E A D F R P V F E Q R L Y T A G I S T S D N I N R E L L I T V R A T H P B W BTR2

1379 S E N A P I I T I D N S T M V T F T L A S V R E T A F I L N F H T G V L I L B.mori BTR175
1381 S E G S A I T T A I D Y D T M V V D F S L E A V R Q S A F V L N A Q T G V L I L T H N BTR1
1390 S E N A O L T Y T I E D G S M A V D S T L E A V K D S A F H L N A Q T G V L I L P B W BTR2

1419 N I G E T A S N H G H F E F Q V V A T D F A G Y S D R A N V K I V L I S T R N R B.mori BTR175
1421 N I Q P T A T N H G L F R F E V T A T D T A G A Q D R T D V T V V S Q N R T H N BTR1
1430 R I Q P T A S M O G V F E P N V I A T D F D E K T D T A E V K V V L I S S Q N R P B W BTR2

1459 V F F L F V N T L E G V E Q N T D F I A Q T F S A G F E H T C N I D Q V V P A T B.mori BTR175
1461 V Y V F V N T L Q Q V E D N R D F I A D T F S A G F N H T C N I D Q V V P A H T H N BTR1
1470 V S E T F L N D V E T V E S N R D F I A E T F S V G F N H T C N I D Q V V P G T P B W BTR2

1499 D A - S G V I N K G I T E V R G H F I R D N V P V P A D E T R T L R Q D N V L L B.mori BTR175
1501 D P V T Q V A L E N S T Q N R G H F I R D N V P V L A M E I R Q J R S D L V L L T H N BTR1
1510 N D - A G V I Q E A M A E V H A H F I Q D M F V S A D S I E K L R S D T Q L L P B W BTR2

1538 T A I Q S T A T R L L V L R D L F T D T S A - P D A G S A A V L Y A L A V L B.mori BTR175
1541 S S I Q T T L A A R S L V L Q D L C T N S S F D - S A P D S S L T V V V L A S L T H N BTR1
1549 R E V Q G V N Q R L L V L M D L V T G V S F D L G T A G V Q I T I Y V L A G L P B W BTR2

1577 S A L L A A L C L L L L V I F I I R T K K L N R R L E A L T V K K Y G S V D S G B.mori BTR175
1580 S A V L G F N C L V L L L T F I I R T R A L N R R L E A L S M T E Y G S L D S G T H N BTR1
1589 S A I L A F L C L L L L I T F I V E T R A L N R R L E A L S N T E Y G S V D S G P B W BTR2

1617 L N R V G I A A P G T N K H A V E G S N F I M R S T I K A F D F D S M S D A S N B.mori BTR175
1620 L N R A G I A A P G T N K H T V E G S N F I F N S A I K T F D L D A I S E G S N T H N BTR1
1629 L N R V G I A A P G T N K H A T E G S N F I W N E Q I N A T F D A I S D T S D P B W BTR2

1657 D S D L I G I E D L F H F G E N N Y F P R D V D E F K T D K - P E D I V A T H N B.mori BTR175
1660 D S D L I G I E D L F H F G - N V F M D P R V N E - K A N G Y P S - - V A N H N T H N BTR1
1669 D S D L I G I E D S - - - - - L Q G D L E E K R A D K A V D A L V K K L K P B W BTR2

1696 N N - - - - - F G T K S T P P S F E F A N - - Q F Q K B.mori BTR175
1698 N N - - - - - F A F N P T P F S F E F V N G - Q F R K I T H N BTR1
1701 K N D G A N G E Y E F K A S R A S R T I V S R I T Y I Q T P B W BTR2

```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 May 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/34807 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/705, 14/435, C12Q 1/68, C12N 5/10, C07K
16/28

(21) International Application Number: PCT/US00/41521

(22) International Filing Date: 25 October 2000 (25.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/161,564 26 October 1999 (26.10.1999) US

(71) Applicants and
(72) Inventors: BILLI, Lee, A., Jr. [US/US]; 6455 U.S.
Hwy. 377, Tiooga, TX 76271 (US); CANDAS, Mehmet
[US/US]; 13859 Peyton Drive, Dallas, TX 75240 (US).(74) Agent: VANDYKE, Raymond, Jenkins & Gilchrist, P.C.,
Suite 3300, 1445 Ross Avenue, Dallas, TX 75202-2799
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
ND, NG, NI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
1 November 2001For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
to the Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/34807 A3

(54) Title: PECTINOPHORA GOSSTYIELLA (PINK BOLLWORM) BACILLUS THURINGIENSIS TOXIN RECEPTOR BT-R₂(57) Abstract: A cDNA encoding a 200 kD receptor, BT-R₂, from the pink boll worm, *Pectinophora gossypiella*, that binds specifically to a *Bacillus thuringiensis* toxin has been cloned, sequenced and characterized. The minimum toxin binding fragment has been identified. The BT-R₂ cDNA permits the analysis of receptors in pink boll worm and other insects that affect crop growth and development, as well as, design assays for the cytotoxicity and binding affinity of potential pesticides. The clone and other methods described herein, permit the manipulation of natural and/or introduced homologous receptors and, thus, to specifically destroy organisms, tissues and/or cells of the target host.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/41521
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K14/435 C12Q1/68 C12N5/10 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) in both national classification and IPC:		
B. REIDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data have been consulted using the international search (range of data base size) where practical, search terms used: BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 98 59048 A (UNIV WYOMING) 30 December 1998 (1998-12-30) the whole document, but especially Example 6 and figure 7	1,14,16, 22 1-28
X	NAGAMATSU YASUNORI ET AL: "Cloning, sequencing, and expression of the Bombyx mori receptor for Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(a) toxin" BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, vol. 62, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 727-734, XP002164759 ISSN: 0916-8451 cited in the application the whole document	16,22
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of this C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *1* earlier document not published on or after the international filing date *1* document which may throw doubts on priority claimed or which is cited to establish the partition date of another claim or other special reasons (as appearing) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *1* document published prior to the international filing date but later than the priority date		
1 later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *C* document of particular relevance: the claimed invention cannot be understood without or cannot be considered to involve an inventive step without the document as taken alone *1* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step which the document is combined with one or more other prior documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of issuing of the international search report
21 May 2001		01/06/2001
Name and receiving address of the ISA European Patent Office P.O. Box 5516 Palisade NY 12158-0516 Tel: +1-518-592-9500 Fax: +1-518-592-9501 Telex: (431-18) 340-3406		Authorized officer Andres, S

Form PCT/ISA/210 (November 2000)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No. PCT/US 00/41521	
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevant to claim No.
T	KARIM SHAHID ET AL: "Determination of receptor binding properties of <i>Bacillus thuringiensis</i> delta-endotoxins to cotton bollworm (<i>Helicoverpa zea</i>) and pink bollworm (<i>Pectinophora gossypiella</i>) midgut brush border membrane vesicles." PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, vol. 67, no. 3, July 2000 (2000-07), pages 198-216, XP002167866 ISSN: 0048-3575

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatl. Application No.
PCT/US 00/41521

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members)	Publication date
WO 9859048 A	30-12-1998	AU 7828398 A	04-01-1999
		BR 9810217 A	08-08-2000
		EP 1005547 A	07-06-2000
		ZA 9805372 A	04-02-1999

PCT/US 00/41521

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100075236

弁理士 栗田 忠彦

(72) 発明者 リー・エイ・ブーラ, ジュニア

アメリカ合衆国テキサス州 7 6 2 7 1, ティオガ, ユー・エス・ハイウェイ 3 7 7, 6 4 5 5

(72) 発明者 メーメット・カンダス

アメリカ合衆国テキサス州 7 5 2 4 0, ダラス, ペイトン・ドライブ 1 3 8 5 9

F ターム (参考) 4B024 AA07 AA08 BA38 BA58 BA63 CA04 DA02 DA06 EA04 HA08

HA20

4B065 AA20Y AA90X AA90Y AB01 AB04 BA02 BA25 CA23 CA24 CA48

CA53

4H011 AC01 BB19 BB23 DH11

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA54 CA51 DA50 DA75 DA83

EA06 FA73 FA74