

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7532345号
(P7532345)

(45)発行日 令和6年8月13日(2024.8.13)

(24)登録日 令和6年8月2日(2024.8.2)

| | |
|------------------------|--------------|
| (51)国際特許分類 | F I |
| C 12 N 15/31 (2006.01) | C 12 N 15/31 |
| A 01 H 5/00 (2018.01) | A 01 H 5/00 |
| A 01 H 6/02 (2018.01) | A 01 H 6/02 |
| A 01 H 6/04 (2018.01) | A 01 H 6/04 |
| A 01 H 6/20 (2018.01) | A 01 H 6/20 |

請求項の数 30 (全86頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------------|-----------------------------|----------|-------------------------|
| (21)出願番号 | 特願2021-515455(P2021-515455) | (73)特許権者 | 501231613 |
| (86)(22)出願日 | 令和1年9月24日(2019.9.24) | | モンサント テクノロジー エルエルシー |
| (65)公表番号 | 特表2022-501035(P2022-501035) | | アメリカ合衆国6 3 1 6 7 ミズーリ州セ |
| | A) | | ントルイス、ノース・リンドバーグ・ブ |
| (43)公表日 | 令和4年1月6日(2022.1.6) | | ールバード8 0 0 番、メール・ゾーン・ |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2019/052782 | | イー 1 エヌエイ |
| (87)国際公開番号 | WO2020/068865 | (74)代理人 | 100114188 |
| (87)国際公開日 | 令和2年4月2日(2020.4.2) | | 弁理士 小野 誠 |
| 審査請求日 | 令和4年9月16日(2022.9.16) | (74)代理人 | 100119253 |
| (31)優先権主張番号 | 62/736,236 | | 弁理士 金山 賢教 |
| (32)優先日 | 平成30年9月25日(2018.9.25) | (74)代理人 | 100124855 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | | | 弁理士 坪倉 道明 |
| 米国(US) | | (74)代理人 | 100129713 |
| | | | 弁理士 重森 一輝 |
| | | (74)代理人 | 100137213 |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の昆虫阻害タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

殺虫性タンパク質をコードするポリヌクレオチドセグメントに操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換え核酸分子であって、

- a. 前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、4もしくは6のアミノ酸配列を含む；または
- b. 前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号50もしくは配列番号121に対して少なくとも98%の同一性を有し、

前記殺虫性タンパク質が鞘翅目の昆虫に対して活性を示す、前記組換え核酸分子。

【請求項2】

- a. 前記組換え核酸分子が、植物にて前記殺虫性タンパク質を発現するように機能する配列を含む、または

b. 前記組換え核酸分子が、植物細胞で発現され、殺虫で有効量の殺虫性タンパク質を產生する、または

c. 前記組換え核酸分子がベクターに操作可能に連結され、前記ベクターが、プラスミド、ファージミド、バクミド、コスミド、及び細菌もしくは酵母の人工染色体から成る群から選択される、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項3】

宿主細胞内に存在すると定義され、前記宿主細胞が細菌細胞及び植物細胞から成る群から選択される、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項4】

前記細菌宿主細胞が、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea*、及び*Erwinia*から成る群から選択される細菌の属に由来する、請求項3に記載の組換え核酸分子。

【請求項5】

前記*Bacillus*種が*Bacillus cereus*または*Bacillus thuringiensis*であり、前記*Brevibacillus*が*Brevibacillus laterosporus*であり、または前記*Escherichia*が*Escherichia coli*である、請求項4に記載の組換え核酸分子。

【請求項6】

前記植物細胞が双子葉植物または单子葉植物である、請求項3に記載の組換え核酸分子。

【請求項7】

前記植物宿主細胞が、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ブラッシカ、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、ワタ、ウリ、キュウリ、ダグラスモミ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、ネギ、レタス、ロブロリーパイン、キビ、メロン、ナツツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞用植物、ヤシ、牧草、エンドウマメ、ピーナッツ、コショウ、ハトエンドウ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ(*p u m p k i n*)、ラジアータマツ、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、サフラワー、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ホウレンソウ、カボチャ(*s q u a s h*)、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、スイートガム、スイートポテト、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ、コムギの植物細胞から成る群から選択される、請求項6に記載の組換え核酸分子。

【請求項8】

前記昆虫が、西洋トウモロコシ根切り虫、南部トウモロコシ根切り虫、北部トウモロコシ根切り虫、メキシコ型トウモロコシ根切り虫、ブラジル型トウモロコシ根切り虫、コロラダハムシ、*D i a b r o t i c a v i r i d u l a*及び*D i a b r o t i c a s p e c i o s a*から成るブラジル型トウモロコシ根切り虫複合体、アブラナ科ノミハムシ、縞模様ノミハムシ、または西洋クロノミハムシである、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項9】

前記殺虫性タンパク質が、鱗翅目の昆虫種に対して活性を示す、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項10】

前記昆虫が、タマナヤガ、アメリカタバコガ、コナガ、欧洲アワノメイガ、ツマジロクサヨトウ、南部ヨトウムシ、ダイズルーパー、南西部アワノメイガ、オオタバコガ(*T o b a c c o B u d w o r m*)、ベルベットビーンキャタピラー、サトウキビボーラー、レッサーニュートンストークボーラー、クロヨトウムシ、シロイチモジヨトウ、オオタバコガ(*O l d W o r l d B o o l w o r m*)、ハスモンヨトウ、またはピンクボールワームである、請求項9に記載の組換え核酸分子。

【請求項11】

前記殺虫性タンパク質が、半翅目の昆虫種に対して活性を示す、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項12】

前記昆虫がミナミアオカメムシ、亜熱帯性クサギカメムシ、アカシマカメムシ、クロトゲアオハラカメムシ種、チャバネカメムシ、クサギカメムシ、ミドリカメムシ、クサギカメムシ、西洋サビイロメクラガメ、またはサビイロメクラガメである、請求項11に記載の組換え核酸分子。

【請求項13】

請求項1に記載の組換え核酸分子を含む植物またはその一部。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記植物が単子葉植物または双子葉植物である、請求項13に記載の植物またはその一部。

【請求項 15】

前記植物が、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ブ
ラッカ、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハク
サイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、ワタ、ウリ、キュウ
リ、ダグラスモミ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、ニラ、レタス、
ロブロリーパイン、キビ、メロン、ナツツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞用植
物、ヤシ、牧草、エンドウマメ、ピーナッツ、コショウ、ハトエンドウマメ、マツ、ジャ
ガイモ、ポプラ、カボチャ (p u m p k i n)、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、
イネ、根茎、ライムギ、サフラワー、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ホウレン
ソウ、カボチャ (s q u a s h)、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイート
コーン、スイートガム、スイートポテト、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコ
ムギ、芝草、スイカ、コムギから成る群から選択される、請求項13に記載の植物または
その一部。

10

【請求項 16】

請求項13に記載の植物またはその一部であって、植物の一部が種子であり、前記種子
が前記組換え核酸分子を含む、請求項13に記載の植物またはその一部。

【請求項 17】

20

請求項1に記載の組換え核酸分子を含む昆虫阻害組成物。

【請求項 18】

さらに、前記殺虫性タンパク質とは異なる少なくとも1つの他の殺虫剤をコードする又
クレオチド配列を含む、請求項17に記載の昆虫阻害組成物。

【請求項 19】

前記少なくとも1つの他の殺虫剤が、昆虫阻害タンパク質、昆虫阻害d s R N A分子、
及び補助タンパク質から成る群から選択される、請求項18に記載の昆虫阻害組成物。

【請求項 20】

前記少なくとも1つの他の殺虫剤が、鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の1以上の害虫種
に対して活性を示す、請求項18に記載の昆虫阻害組成物。

30

【請求項 21】

前記少なくとも1つの他の殺虫剤が、C r y 1 A、C r y 1 A b、C r y 1 A c、C r
y 1 A . 1 0 5、C r y 1 A e、C r y 1 B、C r y 1 C、C r y 1 C 变異型、C r y 1
D、C r y 1 E、C r y 1 F、C r y 1 A / F キメラ、C r y 1 G、C r y 1 H、C r y
1 I、C r y 1 J、C r y 1 K、C r y 1 L、C r y 2 A、C r y 2 A b、C r y 2 A e
、C r y 3、C r y 3 A 变異型、C r y 3 B、C r y 4 B、C r y 6、C r y 7、C r y
8、C r y 9、C r y 1 5、C r y 3 4、C r y 3 5、C r y 4 3 A、C r y 4 3 B、C
r y 5 1 A a 1、E T 2 9、E T 3 3、E T 3 4、E T 3 5、E T 6 6、E T 7 0、T I
C 4 0 0、T I C 4 0 7、T I C 4 1 7、T I C 4 3 1、T I C 8 0 0、T I C 8 0 7、
T I C 8 3 4、T I C 8 5 3、T I C 9 0 0、T I C 9 0 1、T I C 1 2 0 1、T I C 1
4 1 5、T I C 2 1 6 0、T I C 3 1 3 1、T I C 8 3 6、T I C 8 6 0、T I C 8 6 7
、T I C 8 6 9、T I C 1 1 0 0、V I P 3 A、V I P 3 B、V I P 3 A b、A X M I -
A X M I -、A X M I - 8 8、A X M I - 9 7、A X M I - 1 0 2、A X M I - 1 1 2、
A X M I - 1 1 7、A X M I - 1 0 0、A X M I - 1 1 5、A X M I - 1 1 3、及びA X
M I - 0 0 5、A X M I 1 3 4、A X M I - 1 5 0、A X M I - 1 7 1、A X M I - 1 8
4、A X M I - 1 9 6、A X M I - 2 0 4、A X M I - 2 0 7、A X M I - 2 0 9、A X
M I - 2 0 5、A X M I - 2 1 8、A X M I - 2 2 0、A X M I - 2 2 1 z、A X M I -
2 2 2 z、A X M I - 2 2 3 z、A X M I - 2 2 4 z 及びA X M I - 2 2 5 z、A X M
I - 2 3 8、A X M I - 2 7 0、A X M I - 2 7 9、A X M I - 3 4 5、A X M I - 3 3
5，A X M I - R 1 及びその变異型、I P 3 及びその变異型、D I G - 3、D I G - 5、

40

50

D I G - 1 0 、 D I G - 6 5 7 、 D I G - 1 1 、 C r y 7 1 A a 1 、 C r y 7 2 A a 1 、 P H I - 4 变異型、 P I P - 7 2 变異型、 P I P - 4 5 变異型、 P I P - 6 4 变異型、 P I P - 7 4 变異型、 P I P - 7 5 变異型、 P I P - 7 7 变異型、 A x m i 4 2 2 、 D i g - 3 0 5 、 A x m i 4 4 0 、 P I P - 4 7 变異型、 A x m i 2 8 1 、 B T - 0 0 9 、 B T - 0 0 1 2 、 B T - 0 0 1 3 、 B T - 0 0 2 3 、 B T 0 0 6 7 、 B T - 0 0 4 4 、 B T - 0 0 5 1 、 B T - 0 0 6 8 、 B T - 0 1 2 8 、 D I G - 1 7 、 D I G - 9 0 、 D I G - 7 9 、 C r y 1 J P 5 7 8 V 、 C r y 1 J P S 1 、 及び C r y 1 J P S 1 P 5 7 8 V から成る群から選択されるタンパク質である、請求項 2 0 に記載の昆虫阻害組成物。

【請求項 2 2】

さらに、前記組換え核酸分子を発現する植物細胞を含むと定義される、請求項 1 7 に記載の昆虫阻害組成物。 10

【請求項 2 3】

商品生産物が、検出可能な量の前記組換え核酸分子またはそれによってコードされる殺虫性タンパク質を含む、請求項 1 3 に記載の植物またはその一部から生産される商品生産物。

【請求項 2 4】

穀物取扱業者によって袋詰めされた商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、トウモロコシ粉、コーンミール、コーンシリップ、コーン油、コーンサイレージ、コーンスターク、コーンシリアル、全粒綿実または加工された綿実、綿油、リント、飼料または食品用に加工された種子及び植物の一部、纖維、紙、バイオマス、及び燃料製品、全粒ダイズ種子または加工されたダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズふすま、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズを含む動物飼料、ダイズを含む紙、ダイズを含むクリーム、ダイズバイオマス、及びダイズ植物とダイズ植物の一部を用いて製造される燃料製品から成る群から選択される請求項 2 3 に記載の商品生産物。 20

【請求項 2 5】

種子を生産する方法であって、
a . 請求項 1 6 に記載の種子を植えることと；
b . 前記種子から植物を生育させることと；
c . 前記植物から種子を収穫することとを含み、前記収穫された種子が、前記組換え核酸分子を含む、前記方法。 30

【請求項 2 6】

昆虫の侵入に耐性がある植物であって、前記植物の細胞が請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含む、前記植物。

【請求項 2 7】

鞘翅目種、鱗翅目種、または半翅目種の害虫または害虫の侵入を防除する方法であって、
a . 配列番号 2 、 4 もしくは 6 のアミノ酸配列を含む殺虫で有効量の殺虫性タンパク質に前記害虫を接触させること；または

b . 配列番号 2 、 配列番号 4 、 配列番号 6 、 配列番号 5 0 もしくは配列番号 1 2 1 に対して少なくとも 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、殺虫で有効量の 1 以上の殺虫性タンパク質と前記害虫を接触させることを含み、但し、前記殺虫性タンパク質が鞘翅目の昆虫に対して活性を示す、前記方法。 40

【請求項 2 8】

植物ゲノム D N A を含む試料にて請求項 1 に記載の組換え核酸分子の存在を検出する方法であって、

a . ストリンジエントなハイブリッド形成条件下で請求項 1 に記載の D N A 分子を含む植物由来のゲノム D N A とハイブリッド形成し、そのようなハイブリッド形成条件下では請求項 1 に記載の組換え核酸分子を含まない他の同質遺伝子植物由来のゲノム D N A とハイブリッド形成しない核酸プローブに前記試料を接触させること、その際、前記プローブが
i. 配列番号 2 、 4 もしくは 6 のアミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質、または、 50

ii.配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号50もしくは配列番号121に対して少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質をコードする配列に対して相同性もしくは相補性であること、但し、前記殺虫性タンパク質が鞘翅目の昆虫に対して活性を示す；

b.前記試料及びプローブをストリンジメントなハイブリッド形成条件に供することと；
c.前記プローブの前記試料のDNAとのハイブリッド形成を検出することとを含む、前記方法。

【請求項29】

タンパク質を含む試料にて殺虫性タンパク質の存在を検出する方法であって、前記殺虫性タンパク質が、配列番号2、4もしくは6のアミノ酸配列を含む；または、前記殺虫性タンパク質が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号50もしくは配列番号121に対して少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、但し、前記殺虫性タンパク質が鞘翅目の昆虫に対して活性を示し；

前記方法が、

a.前記試料を免疫反応性抗体と接触させことと；
b.前記抗体の前記殺虫性タンパク質との結合を検出することとを含み、
その際、結合は前記タンパク質の存在を示す、前記方法。

【請求項30】

検出する前記工程がELISAまたはウエスタンプロットを含む、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本出願は、2018年9月25日出願の米国仮出願第62/736,236号の利益を主張するものであり、この仮出願はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の組込み

2019年9月24日に、コンピューターで読み取り可能な形式の配列表を含有する「MONS465wo-sequence_listing.txt」と名付けられたファイルが作成された。このファイルは456キロバイト(MS-Windows(登録商標)で測定)であり、電子提出(米国特許庁EFS-Webファイリングシステムを用いて)によって同時に出願され、参照によってその全体がこの出願に組み込まれる。

【0003】

発明の分野

本発明は一般に、昆虫阻害タンパク質の分野に関する。作物植物及び種子の農業関連の害虫に対して昆虫阻害活性を示す新規のクラスのタンパク質が開示されている。特に、開示されているタンパク質は、作物植物及び種子の農業関連の害虫、特に鞘翅目及び鱗翅目の害虫種に対して殺虫活性がある。開示されている毒素タンパク質の1以上をコードする組換えポリヌクレオチド構築物を含有する植物、植物の一部、及び種子が提供される。

【背景技術】

【0004】

とりわけ、トウモロコシ、ダイズ、サトウキビ、イネ、コムギ、野菜、ワタを含む農業上重要な植物からの収穫量を改善することができます重要になっている。増加する人口に食料を供給し、衣服を着せ、エネルギーを提供する農産物の必要性の高まりに加えて、気候関連の影響及び農業慣行以外の土地を使用するという増加する人口からの圧力は、農業用に利用可能な耕作可能地の量を減らすと予測される。これらの要因は、特に植物のバイオテクノロジー及び農学慣行に大きな改善がない場合に、食料安全保障の厳しい予測につながってきた。これらの圧力に照らして、技術、農業技術、及び害虫管理における環境的に持続可能な改善は、農業に利用できる限られた量の耕作可能地で作物生産を拡大するた

10

20

30

40

50

めの欠かせないツールである。

【0005】

昆虫、特に鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目内の昆虫は、畑作物への被害の主な原因と考えられており、それによって、蔓延している地域での収穫量が減少する。歴史的に、合成化学殺虫剤の集中的な適用は農業における害虫駆除剤として當てにされていた。新たな耐性の問題に加えて、環境及びヒトの健康への懸念が生物殺虫剤の研究開発を刺激した。この研究努力は、細菌を含む種々の昆虫病原性微生物種の進歩的な発見と使用につながった。

【0006】

昆虫病原性細菌、特に *Bacillus* 属に属する細菌の可能性が発見され、生物学的害虫駆除剤として開発されると、生物的防除のパラダイムが変化した。細菌、*Bacillus thuringiensis* (Bt) の菌株は、Bt 菌株が特定の昆虫に対して高い毒性を示すことが発見されて以来、殺虫性タンパク質の供給源として使用されてきた。Bt 株は、胞子形成の開始時及び定常増殖期に傍胞子結晶封入体内に局在するデルタ内毒素を産生することが知られており（例えば、Cry タンパク質）、分泌された殺虫性タンパク質を産生することも知られている。感受性の高い昆虫が摂取すると、デルタ内毒素と同様に分泌毒素が中腸上皮の表面で効果を発揮し、細胞膜を破壊し、細胞の破壊と死をもたらす。殺虫性タンパク質をコードする遺伝子はまた、他の *Bacillus* 及び、例えば、*Brevibacillus laterosporus*、*Lysinibacillus sphaericus* (以前 *Bacillus sphaericus* として知られていた「Ls」)、*Paenibacillus popilliae*、*Photorhabdus* 及び *Xenorhabdus* のような追加の細菌種の多様性を含む、Bt 以外の細菌種においても同定されている。

10

20

30

【0007】

結晶性及び分泌型の可溶性殺虫性毒素は、宿主に高い特異性があり、化学殺虫剤の代替品として世界中で受け入れられている。例えば、殺虫性毒素タンパク質は、農業上重要な植物を昆虫の侵入から保護し、化学殺虫剤の適用の必要性を減らし、収量を増やすために種々の農業用途で採用してきた。殺虫性毒素タンパク質は、種々の細菌株を含有する微生物製剤を植物表面に分散させるための噴霧のような機械的方法によって、及び遺伝子形質転換技術を用いて殺虫性毒素タンパク質を発現するトランスジェニックの植物及び種子を生産することによって、作物植物の農業関連の害虫を防除するために使用される。

【0008】

殺虫性毒素タンパク質を発現するトランスジェニック植物の使用は世界的に適応してきた。例えば、2012年には、2,610万ヘクタールに、Bt 毒素を発現するトランスジェニック作物が植えられた (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44)。トランスジェニック昆虫保護作物の世界的な使用及びこれらの作物で使用される限られた数の殺虫性毒素タンパク質は、現在利用されている殺虫性タンパク質に耐性を付与する既存の昆虫対立遺伝子についての選択圧を作り出している。

【0009】

殺虫性毒素タンパク質に対する標的害虫での耐性の発達は、殺虫性毒素タンパク質を発現するトランスジェニック作物に対する昆虫耐性の上昇を管理するのに有用である新しい形態の殺虫性毒素タンパク質の発見及び開発の継続的なニーズを生み出す。有効性が改善され、感受性の高い昆虫種のさらに広いスペクトルに対する防除を示す新しいタンパク質毒素は、耐性対立遺伝子を発生させることができる生き残った昆虫の数を減らすであろう。加えて、同じ害虫に対して毒性があり、異なる作用機序を示す2以上のトランスジェニック殺虫性毒素タンパク質の1つの植物での使用は、単一の標的昆虫種における耐性の可能性を低下させる。

40

【0010】

したがって、本発明者らは本明細書において、標的の鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目の害虫種に対して殺虫活性を示す類似の毒素タンパク質、変異型タンパク質、及び例示的な組

50

換えタンパク質と共に *Xenorhabdus* 及び *Photorhabdus* に由来するタンパク質毒素ファミリーを開示する。

【発明の概要】

【0011】

本明細書で開示されているのは、作物植物の1以上の害虫に対して阻害活性を呈することが示される、本明細書で *PirAB* (*Photorhabdus* 昆虫関連) タンパク質毒素と呼ばれる昆虫阻害活性を持つ殺虫性タンパク質（毒素タンパク質）の群である。 *PirAB* タンパク質毒素クラスのタンパク質は単独で、または *PirA* タンパク質及び *PirB* 細胞タンパク質の融合体として、または他の殺虫性タンパク質及び毒剤と組み合わせて製剤及び 植物体にて使用することができるので、農業システムで現在使用されている殺虫性タンパク質及び殺虫剤化学物質への代替を提供する。

【0012】

一実施形態では、本出願で開示されているのは、殺虫性タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換え核酸分子であり、その際、(a) 前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、または157のアミノ酸配列を含み；または(b) 前記殺虫性タンパク質は、(i) 配列番号44、46、48、123、127、129、131、133、及び145に対して少なくとも65%の同一性；もしくは(iii) 配列番号109、121、及び125に対して少なくとも70%の同一性；もしくは(iii) 配列番号12、18、24、36、42、62、68、74、80、86、98、113、117、119、147、149、153、155及び157に対して少なくとも80%の同一性；もしくは(iv) 配列番号30、92、111、115、及び151に対して少なくとも82%の同一性；もしくは(v) 配列番号6及び50に対して少なくとも86%の同一性；もしくは(iv) 配列番号137及び141に対して少なくとも94%の同一性；もしくは(vii) 配列番号4、26、及び32に対して少なくとも97%の同一性；もしくは(viii) 配列番号2、28、34、102、及び102に対して少なくとも98%の同一性；もしくは(ix) 配列番号135と少なくとも99%の同一性；または(x) 配列番号8、10、14、16、20、22、38、40、58、60、64、66、70、72、76、78、82、84、88、90、94、96、100、105、107、139、及び143との100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、または(c) 前記ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、52、53、54、55、56、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、または158ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとハイブリッド形成する；または(d) 前記組換え核酸分子はベクターと操作可能に連結され、前記ベクターはプラスミド、ファージミド、バクミド、コスミド、及び細菌もしくは酵母の人工染色体から成る群から選択される。組換え核酸分子は、植物において殺虫性タンパク質を発現するように機能する配列を含むことができ、または、植物細胞で発現して殺虫で有効量の殺虫性タンパク質を生産する。

【0013】

10

20

30

40

50

本出願の別の実施形態では、本出願の組換え核酸分子を含む宿主細胞であり、その際、宿主細胞は細菌細胞及び植物細胞から成る群から選択される。企図される宿主細胞には、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea*、及び*Erwinia*が挙げられる。特定の実施形態では、前記*Bacillus*種は*Bacillus cereus*もしくは*Bacillus thuringiensis*であり、前記*Brevibacillus*は*Brevibacillus laterosporus*であり、または前記*Escherichia*は*Escherichia coli*である。企図される植物宿主細胞には、双子葉植物細胞及び単子葉植物細胞が挙げられる。さらに企図される植物宿主細胞には、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ブラッシカ、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、白菜、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、ワタ(*Gossypium* sp.)、ウリ、キュウリ、ダグラスモミ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、ネギ、レタス、ロブロリーバイン、キビ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞用植物、ヤシ、牧草、エンドウマメ、ピーナッツ、コショウ、ハトエンドウ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ(*pumpkin*)、ラジアータバイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、サフラワー、低木、ソルガム、サザンバイン、ダイズ、ホウレンソウ、カボチャ(*squash*)、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、スイートガム、スイートポテト、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ、コムギの植物細胞が挙げられる。

【0014】

さらに別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、西洋トウモロコシ根切り虫、西部トウモロコシ根切り虫、北部トウモロコシ根切り虫、メキシコ型トウモロコシ根切り虫、ブラジル型トウモロコシ根切り虫、コロラドハムシ、*Diabrotica viridula*及び*Diabrotica speciosa*から成るブラジル型トウモロコシ根切り虫複合体、アブラナ科ノミハムシ、縞模様ノミハムシ、西洋クロノミハムシを含む鞘翅目昆虫に対して活性を示す。

【0015】

別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、クロヨトウムシ、アメリカタバコガ、コナガ、欧洲アワノメイガ、ツマジロクサヨトウ、南部ヨトウムシ、ダイズルーパー、南西部アワノメイガ、オオタバコガ(*Tobacco Budworm*)、ベルベットビーンキャタピラー、サトウキビボーラー、モロコシマダラメイガ、クロアワヨトウ、シロイチモジヨトウ、オオタバコガ(*Old World Bollworm*)、ハスモンヨトウ、またはピンクボールワームを含む鱗翅目昆虫に対して活性を示す。

【0016】

さらに別の実施形態では、殺虫性タンパク質は、ミナミアオカメムシ、亜熱帯性クサギカメムシ、ミナミアオカメムシ、亜熱帯性クサギカメムシ、アカシマカメムシ、クロトゲアオハラカメムシ種、チャバネカメムシ、クサギカメムシ、ミドリカメムシ、クサギカメムシ、西洋サビイロメクラガメまたはサビイロメクラガメ含む半翅目の昆虫種に対して活性を示す。

【0017】

本出願において企図されるのはまた、殺虫性タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントに操作可能に連結された異種プロモーターを含む組換え核酸分子を含む植物であり、その際、(a)前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311、313、315、317、319、321、323、325、327、329、331、333、335、337、339、341、343、345、347、349、351、353、355、357、359、361、363、365、367、369、371、373、375、377、379、381、383、385、387、389、391、393、395、397、399、401、403、405、407、409、411、413、415、417、419、421、423、425、427、429、431、433、435、437、439、441、443、445、447、449、451、453、455、457、459、461、463、465、467、469、471、473、475、477、479、481、483、485、487、489、491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539、541、543、545、547、549、551、553、555、557、559、561、563、565、567、569、571、573、575、577、579、581、583、585、587、589、591、593、595、597、599、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、691、693、695、697、699、701、703、705、707、709、711、713、715、717、719、721、723、725、727、729、731、733、735、737、739、741、743、745、747、749、751、753、755、757、759、761、763、765、767、769、771、773、775、777、779、781、783、785、787、789、791、793、795、797、799、801、803、805、807、809、811、813、815、817、819、821、823、825、827、829、831、833、835、837、839、841、843、845、847、849、851、853、855、857、859、861、863、865、867、869、871、873、875、877、879、881、883、885、887、889、891、893、895、897、899、901、903、905、907、909、911、913、915、917、919、921、923、925、927、929、931、933、935、937、939、941、943、945、947、949、951、953、955、957、959、961、963、965、967、969、971、973、975、977、979、981、983、985、987、989、991、993、995、997、999、1001、1003、1005、1007、1009、1011、1013、1015、1017、1019、1021、1023、1025、1027、1029、1031、1033、1035、1037、1039、1041、1043、1045、1047、1049、1051、1053、1055、1057、1059、1061、1063、1065、1067、1069、1071、1073、1075、1077、1079、1081、1083、1085、1087、1089、1091、1093、1095、1097、1099、1101、1103、1105、1107、1109、1111、1113、1115、1117、1119、1121、1123、1125、1127、1129、1131、1133、1135、1137、1139、1141、1143、1145、1147、1149、1151、1153、1155、1157、1159、1161、1163、1165、1167、1169、1171、1173、1175、1177、1179、1181、1183、1185、1187、1189、1191、1193、1195、1197、1199、1201、1203、1205、1207、1209、1211、1213、1215、1217、1219、1221、1223、1225、1227、1229、1231、1233、1235、1237、1239、1241、1243、1245、1247、1249、1251、1253、1255、1257、1259、1261、1263、1265、1267、1269、1271、1273、1275、1277、1279、1281、1283、1285、1287、1289、1291、1293、1295、1297、1299、1301、1303、1305、1307、1309、1311、1313、1315、1317、1319、1321、1323、1325、1327、1329、1331、1333、1335、1337、1339、1341、1343、1345、1347、1349、1351、1353、1355、1357、1359、1361、1363、1365、1367、1369、1371、1373、1375、1377、1379、1381、1383、1385、1387、1389、1391、1393、1395、1397、1399、1401、1403、1405、1407、1409、1411、1413、1415、1417、1419、1421、1423、1425、1427、1429、1431、1433、1435、1437、1439、1441、1443、1445、1447、1449、1451、1453、1455、1457、1459、1461、1463、1465、1467、1469、1471、1473、1475、1477、1479、1481、1483、1485、1487、1489、1491、1493、1495、1497、1499、1501、1503、1505、1507、1509、1511、1513、1515、1517、1519、1521、1523、1525、1527、1529、1531、1533、1535、1537、1539、1541、1543、1545、1547、1549、1551、1553、1555、1557、1559、1561、1563、1565、1567、1569、1571、1573、1575、1577、1579、1581、1583、1585、1587、1589、1591、1593、1595、1597、1599、1601、1603、1605、1607、1609、1611、1613、1615、1617、1619、1621、1623、1625、1627、1629、1631、1633、1635、1637、1639、1641、1643、1645、1647、1649、1651、1653、1655、1657、1659、1661、1663、1665、1667、1669、1671、1673、1675、1677、1679、1681、1683、1685、1687、1689、1691、1693、1695、1697、1699、1701、1703、1705、1707、1709、1711、1713、1715、1717、1719、1721、1723、1725、1727、1729、1731、1733、1735、1737、1739、1741、1743、1745、1747、1749、1751、1753、1755、1757、1759、1761、1763、1765、1767、1769、1771、1773、1775、1777、1779、1781、1783、1785、1787、1789、1791、1793、1795、1797、1799、1801、1803、1805、1807、1809、1811、1813、1815、1817、1819、1821、1823、1825、1827、1829、1831、1833、1835、1837、1839、1841、1843、1845、1847、1849、1851、1853、1855、1857、1859、1861、1863、1865、1867、1869、1871、1873、1875、1877、1879、1881、1883、1885、1887、1889、1891、1893、1895、1897、1899、1901、1903、1905、1907、1909、1911、1913、1915、1917、1919、1921、1923、1925、1927、1929、1931、1933、1935、1937、1939、1941、1943、1945、1947、1949、1951、1953、1955、1957、1959、1961、1963、1965、1967、1969、1971、1973、1975、1977、1979、1981、1983、1985、1987、1989、1991、1993、1995、1997、1999、2001、2003、2005、2007、2009、2011、2013、2015、2017、2019、2021、2023、2025、2027、2029、2031、2033、2035、2037、2039、2041、2043、2045、2047、2049、2051、2053、2055、2057、2059、2061、2063、2065、2067、2069、2071、2073、2075、2077、2079、2081、2083、2085、2087、2089、2091、2093、2095、2097、2099、2101、2103、2105、2107、2109、2111、2113、2115、2117、2119、2121、2123、2125、2127、2129、2131、2133、2135、2137、2139、2141、2143、2145、2147、2149、2151、2153、2155、2157、2159、2161、2163、2165、2167、2169、2171、2173、2175、2177、2179、2181、2183、2185、2187、2189、2191、2193、2195、2197、2199、2201、2203、2205、2207、2209、2211、2213、2215、2217、2219、2221、2223、2225、2227、2229、2231、2233、2235、2237、2239、2241、2243、2245、2247、2249、2251、2253、2255、2257、2259、2261、2263、2265、2267、2269、2271、2273、2275、2277、2279、2281、2283、2285、2287、2289、2291、2293、2295、2297、2299、2301、2303、2305、2307、2309、2311、2313、2315、2317、2319、2321、2323、2325、2327、2329、2331、2333、2335、2337、2339、2341、2343、2345、2347、2349、2351、2353、2355、2357、2359、2361、2363、2365、2367、2369、2371、2373、2375、2377、2379、2381、2383、2385、2387、2389、2391、2393、2395、2397、2399、2401、2403、2405、2407、2409、2411、2413、2415、2417、2419、2421、2423、2425、2427、2429、2431、2433、2435、2437、2439、2441、2443、2445、2447、2449、2451、2453、2455、2457、2459、2461、2463、2465、2467、2469、2471、2473、2475、2477、2479、2481、2483、2485、2487、2489、2491、2493、2495、2497、2499、2501、2503、2505、2507、2509、2511、2513、2515、2517、2519、2521、2523、2525、2527、2529、2531、2533、2535、2537、2539、2541、2543、2545、2547、2549、2551、2553、2555、2557、2559、2561、2563、2565、2567、2569、2571、2573、2575、2577、2579、2581、2583、2585、2587、2589、2591、2593、2595、2597、2599、2601、2603、2605、2607、2609、2611、2613、2615、2617、2619、2621、2623、2625、2627、2629、2631、2633、2635、2637、2639、2641、2643、2645、2647、2649、2651、2653、2655、2657、2659、2661、2663、2665、2667、2669、2671、2673、2675、2677、2679、2681、2683、2685、2687、2689、2691、2693、2695、2697、2699、2701、2703、2705、2707、2709、2711、2713、2715、2717、2719、2721、2723、2725、2727、2729、2731、2733、2735、2737、2739、2741、2743、2745、2747、2749、2751、2753、2755、2757、2759、2761、2763、2765、2767、2769、2771、2773、2775、2777、2779、2781、2783、2785、2787、2789、2791、2793、2795、2797、2799、2801、2803、2805、2807、2809、2811、2813、2815、2817、2819、2821、2823、2825、2827、2829、2831、2833、2835、2837、2839、2841、2843、2845、2847、2849、2851、2853、2855、2857、2859、2861、2863、2865、2867、2869、2871、2873、2875、2877、2879、2881、2883、2885、2887、2889、2891、2893、2895、2897、2899、2901、2903、2905、2907、2909、2911、2913、2915、2917、2919、2921、2923、2925、2927、2929、2931、2933、2935、2937、2939、2941、2943、2945、2947、2949、2951、2953、2955、2957、2959、2961、2963、2965、2967、2969、2971、2973、2975、2977、2979、2981、2983、2985、2987、2989、2991、2993、2995、2997、2999、3001、3003、3005、3007、3009、3011、3013、3015、3017、3019、3021、3023、3025、3027、3029、3031、3033、3035、3037、3039、3041、3043、3045、3047、3049、3051、3053、3055、3057、3059、3061、3063、3065、3067、3069、3071、3073、3075、3077、3079、3081、3083、3085、3087、3089、3091、3093、3095、3097、3099、3101、3103、3105、3107、3109、3111、3113、3115、3117、3119、3121、3123、3125、3127、3129、3131、3133、3135、3137、3139、3141、3143、3145、3147、3149、3151、3153、3155、3157、3159、3161、3163、3165、3167、3169、3171、3173、3175、3177、3179、3181、3183、3185、3187、3189、3191、3193、3195、3197、3199、3201、3203、3205、3207、3209、3211、3213、3215、3217、3219、3221、3223、3225、3227、3229、3231、3233、3235、3237、3239、3241、3243、3245、3247、3249、3251、3253、3255、3257、3259、3261、3263、3265、3267、3269、3271、3273、3275、3277、3279、3281、3283、3285、3287、3289、3291、3293、3295、3297、3299、3301、3303、3305、3307、3309、3311、3313、3315、3317、3319、3321、3323、3325、3327、3329、3331、3333、3335、3337、3339、3341、3343、3345、3347、3349、3351、3353、3355、3357、3359、3361、3363、3365、3367、3369、3371、3373、3375、3377、3379、3381、3383、3385、3387、3389、3391、3393、3395、3397、3399、3401、3403、3405、3407、3409、3411、3413、3415、3417、3419、3421、3423、3425、3427、3429、3431、3433、3435、3437、3439、3441、3443、3445、3447、3449、3451、3453、3455、3457、3459、3461、3463、3465、3467、3469、3471、3473、3475、3477、3479、3481、3483、3485、3487、3489、3491、3493、3495、3497、3499、3501、3503、3505、3507、3509、3511、3513、3515、3517、3519、3521、3523、3525、3527、3529、3531、3533、3535、3537、3539、3541、3543、3545、3547、3549、3551、3553、3555、3557、3559、3561、3563、3565、3567、3569、3571、3573、3575、3577、3579、3581、3583、3585、3587、3589、3591、3593、3595、3597、3599、3601、3603、3605、3607、3609、3611、3613、3615、3617、3619、3621、3623、3625、3627、3629、3631、3633、3635、3637、3639、3641、3643、3645、3647、3649、3651、3653、3655、3657、3659、3661、3663、3665、3667、3669、3671、3673、3675、3677、3679、3681、3683、3685、3687、3689、3691、3693、3695、3697、3699、3701、3703、3705、3707、3709、3711、3713、3715、3717、3719、3721、3723、3725、3727、3729、3731、3733、3735、3737、3739、3741、3743、3745、3747、3749、3751、3753、3755、3757、3759、3761、3763、3765、3767、3769、3771、3773、3775、3777、3779、3781、3783、3785、3787、3789、3791、3793、3795、3797、3799、3801、3803、3805、3807、3809、3811、3813、3815、3817、3819、3821、3823、3825、3827、3829、3831、3833、3835、3837、3839、3841、3843、3845、3847、3849、3851、3853、3855、3857、3859、3861、3863、3865、3867、3869、3871、3873、3875、3877、3879、3881、3883、3885、3887、3889、3891、3893、3895、3897、3899、3901、3903、3905、3907、3909、3911、3913、3915、3917、3919、3921、3923、3925、3927、3929、3931、3933、3935、3937、3939、3941、3943、3945、3947、3949、3951、3953、3955、3957、3959、3961、3963、3965、3967、3969、3971、3973、3975、3977、3979、3981、3983、3985、3987、3989、3991、3993、3995、3997、3999、4001、4003、4005、4007、4009、4011、4013、4015、4017、4019、4021、4023、4025、4027、4029、4031、4033

37、139、141、143、145、147、149、151、153、155、または157のアミノ酸配列を含む；または(b)前記殺虫性タンパク質は、(i)配列番号44、46、48、123、127、129、131、133、及び145に対して少なくとも65%の同一性；もしくは(iii)配列番号109、121、及び125に対して少なくとも70%の同一性；もしくは(iii)配列番号12、18、24、36、42、62、68、74、80、86、98、113、117、119、147、149、153、155、及び157に対して少なくとも80%の同一性；もしくは(iv)配列番号30、92、111、115、及び151に対して少なくとも82%の同一性；もしくは(v)配列番号6及び50に対して少なくとも86%の同一性；もしくは(vi)配列番号137及び141に対して少なくとも94%の同一性；もしくは(vii)配列番号4、26、及び32に対して少なくとも97%の同一性；もしくは(viii)配列番号2、28、34、102、及び102に対して少なくとも98%の同一性；もしくは(ix)配列番号135と少なくとも99%の同一性；もしくは(x)配列番号8、10、14、16、20、22、38、40、58、60、64、66、70、72、76、78、82、84、88、90、94、96、100、105、107、139、及び143との100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；または(c)前記ポリヌクレオチドセグメントは、ストリンジエントなハイブリッド形成条件下で配列番号49、51、52、53、54、55、56、146、148、150、152、154、156もしくは158のヌクレオチド配列の相補体とハイブリッド形成する；または(d)前記植物が検出可能な量の前記殺虫性タンパク質を提示する。特定の実施形態では、殺虫性タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、または157を含む。一実施形態では、植物は单子葉植物または双子葉植物のいずれかである。別の実施形態では、植物は、アルファアルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ブラッシカ、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、白菜、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、ワタ、ウリ、キュウリ、ダグラスモミ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、ネギ、レタス、ロブロリーパイン、キビ、メロン、ナッツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞用植物、ヤシ、牧草、エンドウマメ、ピーナッツ、コショウ、ハトエンドウマメ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ(pumpkin)、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、サフラワー、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ホウレンソウ、カボチャ(squash)、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、スイートガム、スイートポテト、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ、コムギから成る群から選択される。

【0018】

さらなる実施形態では、組換え核酸分子を含む種子が開示される。

【0019】

別の実施形態では、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む昆虫阻害組成物が企図される。昆虫阻害組成物はさらに、前記殺虫性タンパク質とは異なる少なくとも1つの他の殺虫剤をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。少なくとも1つの他の殺虫剤は、昆虫阻害タンパク質、昆虫阻害d s R N A分子、及び補助タンパク質から成る群から選択される。昆虫阻害組成物における少なくとも1つの他の殺虫剤は、鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の1以上の害虫種に対して活性を示す。昆虫阻害組成物における少なくとも1つの他の殺虫剤は、一実施形態では、Cry1A、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B、Cry1C、Cry1C変異型、Cry

10

20

30

40

50

y 1 D、Cry 1 E、Cry 1 F、Cry 1 A / F キメラ、Cry 1 G、Cry 1 H、Cry 1 I、Cry 1 J、Cry 1 K、Cry 1 L、Cry 2 A、Cry 2 A b、Cry 2 A e、Cry 3、Cry 3 A 变異型、Cry 3 B、Cry 4 B、Cry 6、Cry 7、Cry 8、Cry 9、Cry 15、Cry 34、Cry 35、Cry 43 A、Cry 43 B、Cry 51 Aa 1、ET 29、ET 33、ET 34、ET 35、ET 66、ET 70、TIC 400、TIC 407、TIC 417、TIC 431、TIC 800、TIC 807、TIC 834、TIC 853、TIC 900、TIC 901、TIC 1201、TIC 1415、TIC 2160、TIC 3131、TIC 836、TIC 860、TIC 867、TIC 869、TIC 1100、VIP 3 A、VIP 3 B、VIP 3 A b、AXM I - AXMI - 88、AXMI - 97、AXMI - 102、AXMI - 112、AXMI - 117、AXMI - 100、AXMI - 115、AXMI - 113、及び AXMI - 005、AXMI 134、AXMI - 150、AXMI - 171、AXMI - 184、AXMI - 196、AXMI - 204、AXMI - 207、AXMI - 209、AXMI - 205、AXMI - 218、AXMI - 220、AXMI - 221 z、AXM I - 222 z、AXMI - 223 z、AXMI - 224 z 及び AXMI - 225 z、AXMI - 238、AXMI - 270、AXMI - 279、AXMI - 345、AXMI - 335、AXMI - R1 及びその变異型、IP 3 及びその变異型、DIG - 3、DIG - 5、DIG - 10、DIG - 657 DIG - 11、Cry 71 Aa 1、Cry 72 Aa 1、PHI - 4 变異型、PIP - 72 变異型、PIP - 45 变異型、PIP - 64 变異型、PIP - 74 变異型、PIP - 75 变異型、PIP - 77 变異型、Axmi 422、Dig - 305、Axmi 440、PIP - 47 变異型、Axmi 281、BT - 009、BT - 0012、BT - 0013、BT - 0023、BT 0067、BT - 0044、BT - 0051、BT - 0068、BT - 0128、DIG - 17、DIG - 90、DIG - 79、Cry 1 JP578V、Cry 1 JPS1、及び Cry 1 JPS1 P578V から成る群から選択される。

【0020】

本出願で開示されている検出可能な量の組換え核酸分子を含む商品生産物が企図される。そのような商品生産物には、穀物取扱業者によって袋詰めされた商品トウモロコシ、コーンフレーク、コーンケーキ、コーンフラワー、コーンミール、コーンシロップ、コーン油、コーンサイレージ、コーンスターーチ、コーンシリアル等、及び対応するワタ商品生産物、例えば、飼料または食品、纖維、紙、バイオマスのために加工される全粒綿実または加工された綿実、綿油、リント、種子や植物の一部、及び綿油由来の燃料または綿繰り機廃棄物由来のペレットのような燃料製品、及び対応するダイズ商品生産物、例えば、全粒ダイズ種子または加工されたダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズふすま、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズを含む動物飼料、ダイズを含む紙、ダイズを含むクリーム、ダイズバイオマス、及びダイズ植物及びダイズ植物の一部を用いて生産された燃料製品、及び対応するイネ、コムギ、ソルガム、ハトエンドウ、ピーナッツ、果実、メロン、及び該当する場合、本出願の検出可能な量のそのようなポリヌクレオチド及びまたはポリペプチドを含有するそのような商品生産物のジュース、濃縮物、ジャム、ゼリー、マーマレード、及び他の食用形態を含む植物性商品生産物が挙げられる。

【0021】

本出願において企図されるのはまた、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む種子を生産する方法である。該方法は、本出願で開示されている組換え核酸分子を含む種子の少なくとも1つを植えることと、種子から植物を育てることと、植物から種子を収穫することとを含み、その際、収穫された種子は本出願における組換え核酸分子を含む。

【0022】

別の実例となる実施形態では、昆虫の侵入に耐性のある植物が提供され、その際、前記植物の細胞は、(a)配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、4

10

20

30

40

50

8、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80
 、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、
 107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、
 127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、
 147、149、151、153、155、もしくは157に記述されたような殺虫で有
 効量の殺虫性タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む；または(b)前記殺虫性タ
 ンパク質は、(i)配列番号44、46、48、123、127、129、131、13
 3、及び145に対して少なくとも65%の同一性；もしくは(iii)配列番号109、
 121、及び125に対して少なくとも70%の同一性；もしくは(iii)配列番号1
 2、18、24、36、42、62、68、74、80、86、98、113、117、
 119、147、149、153、155及び157に対して少なくとも80%の同一性
 ；もしくは(iv)配列番号30、92、111、115、及び151に対して少なくとも
 82%の同一性；もしくは(v)配列番号6及び50に対して少なくとも86%の同一性
 ；もしくは(vi)配列番号137及び141に対して少なくとも94%の同一性；も
 しくは(vii)配列番号4、26、及び32に対して少なくとも97%の同一性；も
 しくは(viii)配列番号2、28、34、102、及び102に対して少なくとも98%
 の同一性；もしくは(ix)配列番号135に対して少なくとも99%の同一性；も
 しくは(x)配列番号8、10、14、16、20、22、38、40、58、60、64、
 66、70、72、76、78、82、84、88、90、94、96、100、10
 5、107、139、及び143と100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
 10
 20
 20

【0023】

本出願において開示されているのはまた、鞘翅目または鱗翅目の種の害虫を防除する方法、及び植物、特に作物植物の鞘翅目または鱗翅目の種の害虫の侵入を防除する方法である。方法は、一実施形態では、(a)配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、または157に記述されたよ
 うな殺虫で有効量の1以上の殺虫性タンパク質と害虫を接触させることを含む；または(b)前記殺虫性タンパク質は、(i)配列番号44、46、48、123、127、129、131、133、及び145に対して少なくとも65%の同一性；もしくは(iii)配列番号109、121、及び125に対して少なくとも70%の同一性；もしくは(iii)配列番号12、18、24、36、42、62、68、74、80、86、98、113、117、119、147、149、153、155に対して少なくとも80%の同一性及び157；もしくは(iv)配列番号30、92、111、115、及び151に対して少なくとも82%の同一性；もしくは(v)配列番号6及び50に対して少なくとも86%の同一性；もしくは(vi)配列番号137及び141に対して少なくとも94%の同一性；もしくは(vii)配列番号4、26、及び32に対して少なくとも97%の同一性；もしくは(viii)配列番号2、28、34、102、及び102に対して少なくとも98%の同一性；もしくは(ix)配列番号135と少なくとも99%の同一性；もしくは(x)配列番号8、10、14、16、20、22、38、40、58、60、64、66、70、72、76、78、82、84、88、90、94、96、100、105、107、139、及び143との100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
 30
 40
 40

【0024】

本明細書でさらに提供されるのは、殺虫性タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む組換え核酸分子の存在を検出する方法であり、その際、(a)前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18

、 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、
 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 8 、 6 0 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7
 8 、 8 0 、 8 2 、 8 4 、 8 6 、 8 8 、 9 0 、 9 2 、 9 4 、 9 6 、 9 8 、 1 0 0 、 1 0 2 、
 1 0 5 、 1 0 7 、 1 0 9 、 1 1 1 、 1 1 3 、 1 1 5 、 1 1 7 、 1 1 9 、 1 2 1 、 1 2 3 、
 1 2 5 、 1 2 7 、 1 2 9 、 1 3 1 、 1 3 3 、 1 3 5 、 1 3 7 、 1 3 9 、 1 4 1 、 1 4 3 、
 1 4 5 、 1 4 7 、 1 4 9 、 1 5 1 、 1 5 3 、 1 5 5 、 または 1 5 7 のアミノ酸配列を含む
 ; または (b) 前記殺虫性タンパク質は、 (i) 配列番号 4 4 、 4 6 、 4 8 、 1 2 3 、 1
 2 7 、 1 2 9 、 1 3 1 、 1 3 3 、 及び 1 4 5 に対して少なくとも 6 5 % の同一性 ; もしくは
 (i i) 配列番号 1 0 9 、 1 2 1 、 及び 1 2 5 に対して少なくとも 7 0 % の同一性 ; もしくは
 (i i i) 配列番号 1 2 、 1 8 、 2 4 、 3 6 、 4 2 、 6 2 、 6 8 、 7 4 、 8 0 、 8
 6 、 9 8 、 1 1 3 、 1 1 7 、 1 1 9 、 1 4 7 、 1 4 9 、 1 5 3 、 1 5 5 及び 1 5 7 に対して
 少なくとも 8 0 % の同一性 ; もしくは (i v) 配列番号 3 0 、 9 2 、 1 1 1 、 1 1 5 、
 及び 1 5 1 に対して少なくとも 8 2 % の同一性 ; もしくは (v) 配列番号 6 及び 5 0 に対
 して少なくとも 8 6 % の同一性 ; もしくは (v i) 配列番号 1 3 7 及び 1 4 1 に対して少
 なくとも 9 4 % の同一性 ; もしくは (v i i) 配列番号 4 、 2 6 、 及び 3 2 に対して少
 なくとも 9 7 % の同一性 ; もしくは (v i i i) 配列番号 2 、 2 8 、 3 4 、 1 0 2 、 及び 1
 0 2 に対して少なくとも 9 8 % の同一性 ; もしくは (i x) 配列番号 1 3 5 と少なくとも
 9 9 % の同一性 ; もしくは (x) 配列番号 8 、 1 0 、 1 4 、 1 6 、 2 0 、 2 2 、 3 8 、 4
 0 、 5 8 、 6 0 、 6 4 、 6 6 、 7 0 、 7 2 、 7 6 、 7 8 、 8 2 、 8 4 、 8 8 、 9 0 、 9 4
 、 9 6 、 1 0 0 、 1 0 5 、 1 0 7 、 1 3 9 、 及び 1 4 3 との 1 0 0 % の同一性を有するア
 ミノ酸配列を含む ; または (c) 前記ポリヌクレオチドセグメントは、配列番号 1 、 3 、
 5 、 7 、 9 、 1 1 、 1 3 、 1 5 、 1 7 、 1 9 、 2 1 、 2 3 、 2 5 、 2 7 、 2 9 、 3 1 、 3
 3 、 3 5 、 3 7 、 3 9 、 4 1 、 4 3 、 4 5 、 4 7 、 4 9 、 5 1 、 5 2 、 5 3 、 5 4 、 5 5
 、 5 6 、 5 7 、 5 9 、 6 1 、 6 3 、 6 5 、 6 7 、 6 9 、 7 1 、 7 3 、 7 5 、 7 7 、 7 9 、
 8 1 、 8 3 、 8 5 、 8 7 、 8 9 、 9 1 、 9 3 、 9 5 、 9 7 、 9 9 、 1 0 1 、 1 0 3 、 1 0
 4 、 1 0 6 、 1 0 8 、 1 1 0 、 1 1 2 、 1 1 4 、 1 1 6 、 1 1 8 、 1 2 0 、 1 2 2 、 1 2
 4 、 1 2 6 、 1 2 8 、 1 3 0 、 1 3 2 、 1 3 4 、 1 3 6 、 1 3 8 、 1 4 0 、 1 4 2 、 1 4
 4 、 1 4 6 、 1 4 8 、 1 5 0 、 1 5 2 、 1 5 4 、 1 5 6 、 もしくは 1 5 8 のヌクレオチド
 配列を有するポリヌクレオチドとハイブリッド形成する。本発明の一実施形態では、方法
 は、ストリンジエントなハイブリッド形成条件下で、本明細書で提供される殺虫性タンパ
 ク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む植物由来のゲノム D
 NA とハイブリッド形成するが、そのようなハイブリッド形成条件下ではセグメントを含
 まない他の同質遺伝子の植物由来のゲノム DNA とハイブリッド形成しない核酸プローブ
 に核酸の試料を接触させることを含み、その際、プローブは、配列番号 4 9 、 5 1 、 5 2
 、 5 3 、 5 4 、 5 5 、 5 6 、 1 4 6 、 1 4 8 、 1 5 0 、 1 5 2 、 1 5 4 、 1 5 6 、 または
 1 5 8 に対して相同性もしくは相補性であり、または (i) 配列番号 4 4 、 4 6 、 4 8 、
 1 2 3 、 1 2 7 、 1 2 9 、 1 3 1 、 1 3 3 、 及び 1 4 5 に対して少なくとも 6 5 % の同一
 性 ; もしくは (i i) 配列番号 1 0 9 、 1 2 1 、 及び 1 2 5 に対して少なくとも 7 0 % の
 同一性 ; もしくは (i i i) 配列番号 1 2 、 1 8 、 2 4 、 3 6 、 4 2 、 6 2 、 6 8 、 7 4
 、 8 0 、 8 6 、 9 8 、 1 1 3 、 1 1 7 、 1 1 9 、 1 4 7 、 1 4 9 、 1 5 3 、 1 5 5 及び 1
 5 7 に対して少なくとも 8 0 % の同一性 ; もしくは (i v) 配列番号 3 0 、 9 2 、 1 1 1
 、 1 1 5 、 及び 1 5 1 に対して少なくとも 8 2 % の同一性 ; もしくは (v) 配列番号 6 及
 び 5 0 に対して少なくとも 8 6 % の同一性 ; もしくは (v i) 配列番号 1 3 7 及び 1 4 1
 に対して少なくとも 9 4 % の同一性 ; もしくは (v i i) 配列番号 4 、 2 6 、 及び 3 2 に
 対して少なくとも 9 7 % の同一性 ; もしくは (v i i i) 配列番号 2 、 2 8 、 3 4 、 1 0
 2 、 及び 1 0 2 に対して少なくとも 9 8 % の同一性 ; もしくは (i x) 配列番号 1 3 5 と
 少なくとも 9 9 % の同一性 ; もしくは (x) 配列番号 8 、 1 0 、 1 4 、 1 6 、 2 0 、 2 2
 、 3 8 、 4 0 、 5 8 、 6 0 、 6 4 、 6 6 、 7 0 、 7 2 、 7 6 、 7 8 、 8 2 、 8 4 、 8 8
 、 9 0 、 9 4 、 9 6 、 1 0 0 、 1 0 5 、 1 0 7 、 1 3 9 、 及び 1 4 3 との 1 0 0 % の同一性
 を有するアミノ酸配列を含む殺虫性タンパク質をコードする配列に対して相同性もしくは

10

20

30

40

50

相補性である。方法はさらに、(a)試料及びプローブをストリンジェントなハイブリッド形成条件に供することと、(b)プローブと試料のDNAとのハイブリッド形成を検出することとを含んでもよい。

【0025】

本発明によって提供されるのはまた、タンパク質を含む試料にて殺虫性タンパク質またはその断片の存在を検出する方法であり、その際、前記殺虫性タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、または157のアミノ酸配列を含む；または、前記殺虫性タンパク質は、(i)配列番号44、46、48、123、127、129、131、133、及び145に対して少なくとも65%の同一性；もしくは(iii)配列番号109、121、及び125に対して少なくとも70%の同一性；もしくは(iii)配列番号12、18、24、36、42、62、68、74、80、86、98、113、117、119、147、149、153、155及び157に対して少なくとも80%の同一性；もしくは(iv)配列番号30、92、111、115、及び151に対して少なくとも82%の同一性；もしくは(v)配列番号6及び50に対して少なくとも86%の同一性；もしくは(vi)配列番号137及び141に対して少なくとも94%の同一性；もしくは(vii)配列番号4、26、及び32に対して少なくとも97%の同一性；もしくは(viii)配列番号2、28、34、102、及び102に対して少なくとも98%の同一性；もしくは(ix)配列番号135と少なくとも99%の同一性；もしくは(x)配列番号8、10、14、16、20、22、38、40、58、60、64、66、70、72、76、78、82、84、88、90、94、96、100、105、107、139、及び143との100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、この方法は、(a)試料を免疫反応性抗体と接触させることと、(b)抗体と殺虫性タンパク質またはその断片との結合を検出することとを含み。その際、結合はタンパク質の存在を示す。いくつかの実施形態では、検出する工程はELISAまたはウエスタンプロットを含む。

【0026】

配列の簡単な説明

配列番号1はTIC4771 PirA殺虫性タンパク質の配列をコードするXenorhabdusnematophilaのISB000002株から得られた核酸配列である。

【0027】

配列番号2は、TIC4771 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0028】

配列番号3はTIC4772 PirB殺虫性タンパク質の配列をコードするXenorhabdusnematophilaのISB000002株から得られた核酸配列である。

【0029】

配列番号4はTIC4472 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号5はインフレームで操作可能に連結されたTIC4771及びTIC4772のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC6880をコードする核酸配列である。

【0031】

配列番号6はTIC6880 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0032】

10

20

30

40

50

配列番号7はT I C 7 5 7 5 P i r A殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s e h l e r s i iの8 5 8 2 3株から得られた核酸配列である。

【0 0 3 3】

配列番号8はT I C 7 5 7 5 P i r Aタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 3 4】

配列番号9はT I C 7 5 7 6 P i r B殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s e h l e r s i iの8 5 8 2 3株から得られた核酸配列である。

【0 0 3 5】

配列番号10はT I C 7 5 7 6 P i r Bタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 3 6】

配列番号11はインフレームで操作可能に連結されたT I C 7 5 7 5及びT I C 7 5 7 6のコード配列から構成されるP i r A B融合タンパク質、T I C 9 3 1 6をコードする核酸配列である。

【0 0 3 7】

配列番号12はT I C 9 3 1 6 P i r A B融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 3 8】

配列番号13はT I C 7 6 6 0 P i r A殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s c a b a n i l l a s i iの8 5 9 0 8株から得られた核酸配列である。

【0 0 3 9】

配列番号14はT I C 7 6 6 0 P i r Aタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 4 0】

配列番号15はT I C 7 6 6 1 P i r B殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s c a b a n i l l a s i iの8 5 9 0 8株から得られた核酸配列である。

【0 0 4 1】

配列番号16はT I C 7 6 6 1 P i r Bタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 4 2】

配列番号17はインフレームで操作可能に連結されたT I C 7 6 6 0及びT I C 7 6 6 1のコード配列から構成されるP i r A B融合タンパク質、T I C 9 3 1 7をコードする核酸配列である。

【0 0 4 3】

配列番号18はT I C 9 3 1 7 P i r A B融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 4 4】

配列番号19はT I C 7 6 6 2 P i r A殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s e h l e r s i iの8 5 8 8 7株から得られた核酸配列である。

【0 0 4 5】

配列番号20はT I C 7 6 6 2 P i r Aタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 4 6】

配列番号21はT I C 7 6 6 3 P i r B殺虫性タンパク質の配列をコードするX e n o r h a b d u s e h l e r s i iの8 5 8 8 7株から得られた核酸配列である。

【0 0 4 7】

配列番号22はT I C 7 6 6 3 P i r Bタンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 4 8】

配列番号23はインフレームで操作可能に連結されたT I C 7 6 6 2及びT I C 7 6 6 3のコード配列から構成されるP i r A B融合タンパク質、T I C 9 3 1 8をコードする核酸配列である。

【0 0 4 9】

配列番号24はT I C 9 3 1 8 P i r A B融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 0 5 0】

10

20

30

40

50

配列番号 25 は T I C 7 6 6 4 P i r A 殺虫性タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s p o i n a r i i の 8 6 1 9 8 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 5 1 】

配列番号 26 は T I C 7 6 6 4 P i r A タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 27 は T I C 7 6 6 5 P i r B 殺虫性タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s p o i n a r i i の 8 6 1 9 8 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 28 は T I C 7 6 6 5 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 29 は インフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 4 及び T I C 7 6 6 5 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 9 3 1 9 をコードする核酸配列である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 30 は T I C 9 3 1 9 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 6 】

配列番号 31 は T I C 7 6 6 6 P i r A 殺虫性タンパク質の配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の 8 6 1 9 7 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 5 7 】

配列番号 32 は T I C 7 6 6 6 P i r A タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 33 は T I C 7 6 6 7 殺虫性 P i r B タンパク質の配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の 8 6 1 9 7 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 34 は T I C 7 6 6 7 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 0 】

配列番号 35 は インフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 6 及び T I C 7 6 6 7 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 9 3 2 2 をコードする核酸配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号 36 は T I C 9 3 2 2 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号 37 は T I C 7 6 6 8 P i r A 殺虫性タンパク質の配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の 8 6 1 9 4 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号 38 は T I C 7 6 6 8 P i r A タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 4 】

配列番号 39 は T I C 7 6 6 9 P i r B 殺虫性タンパク質の配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の 8 6 1 9 4 株から得られた核酸配列である。

【 0 0 6 5 】

配列番号 40 は T I C 7 6 6 9 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 6 】

配列番号 41 は インフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 8 及び T I C 7 6 6 9 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 9 3 2 0 をコードする核酸配列である。

【 0 0 6 7 】

配列番号 42 は T I C 9 3 2 0 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0068】

配列番号43はTIC7939殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするマイクロバイオーム内に含まれる未知の細菌株から得られた核酸配列である。

【0069】

配列番号44はTIC7939 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0070】

配列番号45はTIC7940 PirB殺虫性タンパク質の配列をコードするマイクロバイオーム内に含まれる未知の細菌株から得られた核酸配列である。

【0071】

配列番号46はTIC7940 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

10

【0072】

配列番号47はインフレームで操作可能に連結されたTIC7939及びTIC7940のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC9321をコードする核酸配列である。

【0073】

配列番号48はTIC9321 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0074】

配列番号49はTIC6880PL PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列であり、TIC4771タンパク質をコードする断片の開始メチオニンコドンの直後に追加のアラニンコドンが挿入されている。

20

【0075】

配列番号50はTIC6880PL PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0076】

配列番号51はTIC9316 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【0077】

配列番号52はTIC9317 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【0078】

配列番号53はTIC9318 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

30

【0079】

配列番号54はTIC9319 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【0080】

配列番号55はTIC9320 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【0081】

配列番号56はTIC9322 PirAB融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

40

【0082】

配列番号57はTIC10357殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするShewanella violaceaのDSS12株から得られた核酸配列である。

【0083】

配列番号58はTIC10357 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0084】

配列番号59はTIC10366殺虫性PirBタンパク質の配列をコードするShewanella violaceaのDSS12株から得られた核酸配列である。

【0085】

配列番号60はTIC10366 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

50

【0086】

配列番号61はインフレームで操作可能に連結されたTIC10357及びTIC10366のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10375をコードする核酸配列である。

【0087】

配列番号62はTIC10375 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0088】

配列番号63はTIC10358殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするPhotorhabdusluminescensのlaumondiTT01株から得られた核酸配列である。

10

【0089】

配列番号64はTIC10358 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0090】

配列番号65はTIC10367殺虫性PirBタンパク質の配列をコードするPhotorhabdusluminescensのlaumondiTT01株から得られた核酸配列である。

【0091】

配列番号66はTIC10367 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0092】

配列番号67はインフレームで操作可能に連結されたTIC10358及びTIC10367のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10376をコードする核酸配列である。

20

【0093】

配列番号68は、TIC10376 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0094】

配列番号69は、TIC10360殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするPhotorhabdusasymbioticaから得られた核酸配列である。

【0095】

配列番号70はTIC10360 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0096】

配列番号71はTIC10369殺虫性PirBタンパク質の配列をコードするPhotorhabdusasymbioticaから得られた核酸配列である。

30

【0097】

配列番号72はTIC10369 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0098】

配列番号73はインフレームで操作可能に連結されたTIC10360及びTIC10369のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10377をコードする核酸配列である。

【0099】

配列番号74はTIC10377 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

40

【0100】

配列番号75はTIC10361殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするXenorhabdusspのNBAlIXenSa04株から得られた核酸配列である。

【0101】

配列番号76はTIC10361 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0102】

配列番号77はTIC10370殺虫性PirBタンパク質の配列をコードするXenorhabdusspのNBAlIXenSa04株から得られた核酸配列である。

【0103】

配列番号78はTIC10370 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

50

【0104】

配列番号79はインフレームで操作可能に連結されたTIC10361及びTIC10370のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10378をコードする核酸配列である。

【0105】

配列番号80はTIC10378 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0106】

配列番号81はTIC10362殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするYeria sinia aldovaeの670-83株から得られた核酸配列である。

【0107】

配列番号82はTIC10362PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0108】

配列番号83はTIC10371殺虫性PirBタンパク質の配列をコードするYeria sinia aldovaeの670-83株から得られた核酸配列である。

【0109】

配列番号84はTIC10371 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0110】

配列番号85はインフレームで操作可能に連結されたTIC10362及びTIC10371のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10379をコードする核酸配列である。

【0111】

配列番号86はTIC10379 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0112】

配列番号87はTIC10363殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするXenorhabdus doucetiaeのFRM16株から得られた核酸配列である。

【0113】

配列番号88はTIC10363 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0114】

配列番号89はTIC10372殺虫性PirB細胞タンパク質の配列をコードするXenorhabdus doucetiaeのFRM16株から得られた核酸配列である。

【0115】

配列番号90はTIC10372 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0116】

配列番号91はインフレームで操作可能に連結されたTIC10363及びTIC10372のコード配列から構成されるPirAB融合タンパク質、TIC10380をコードする核酸配列である。

【0117】

配列番号92は、TIC10380 PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0118】

配列番号93はTIC10364殺虫性PirAタンパク質の配列をコードするXenorhabdus griffiniiaeのBMMC株から得られた核酸配列である。

【0119】

配列番号94はTIC10364 PirAタンパク質のアミノ酸配列である。

【0120】

配列番号95はTIC10373殺虫性PirB細胞タンパク質の配列をコードするXenorhabdus griffiniiaeのBMMC株から得られる核酸配列である。

【0121】

配列番号96はTIC10373 PirBタンパク質のアミノ酸配列である。

【0122】

10

20

30

40

50

配列番号 97 はインフレームで操作可能に連結された T I C 1 0 3 6 4 及び T I C 1 0 3 6 4 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 0 3 8 1 をコードする核酸配列である。

【 0 1 2 3 】

配列番号 98 は T I C 1 0 3 8 1 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 4 】

配列番号 99 は T I C 1 0 3 5 9 殺虫性 P i r A タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a から得られた核酸配列である。

【 0 1 2 5 】

配列番号 100 は T I C 1 0 3 5 9 P i r A タンパク質のアミノ酸配列である。

10

【 0 1 2 6 】

配列番号 101 は T I C 1 0 3 6 8 殺虫性 P i r B 細胞タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a から得られた核酸配列である。

【 0 1 2 7 】

配列番号 102 は T I C 1 0 3 6 8 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 8 】

配列番号 103 はコード配列 T I C 1 0 3 5 9 及び T I C 1 0 3 6 8 から構成されるオペロンをコードする核酸配列である。

【 0 1 2 9 】

配列番号 104 は P i r A _ A B E 6 8 8 7 8 殺虫性 P i r A タンパク質配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の H m 株から得られた核酸配列である。

20

【 0 1 3 0 】

配列番号 105 は P i r A _ A B E 6 8 8 7 8 P i r A タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 1 】

配列番号 106 は、 P i r B _ A B E 6 8 8 7 9 殺虫性 P i r B タンパク質配列をコードする P h o t o r h a b d u s l u m i n e s c e n s の H m 株から得られた核酸配列である。

【 0 1 3 2 】

配列番号 107 は P i r B _ A B E 6 8 8 7 9 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

30

【 0 1 3 3 】

配列番号 108 はインフレームで操作可能に連結された P i r A _ A B E 6 8 8 7 8 及び P i r B _ A B E 6 8 8 7 9 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 0 4 3 4 をコードする核酸配列である。

【 0 1 3 4 】

配列番号 109 は T I C 1 0 4 3 4 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 5 】

配列番号 110 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 5 7 5 及び T I C 7 6 6 5 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 2 1 0 をコードする核酸配列である。

40

【 0 1 3 6 】

配列番号 111 は T I C 1 1 2 1 0 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 7 】

配列番号 112 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 5 7 5 及び T I C 7 6 6 7 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 2 1 1 をコードする核酸配列である。

【 0 1 3 8 】

配列番号 113 は T I C 1 1 2 1 1 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

50

【 0 1 3 9 】

配列番号 114 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 2 及び T I C 7 6 5 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 2 1 2 をコードする核酸配列である。

【 0 1 4 0 】

配列番号 115 は T I C 1 1 2 1 2 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 1 】

配列番号 116 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 5 7 5 及び T I C 7 6 6 1 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 3 0 1 をコードする核酸配列である。

10

【 0 1 4 2 】

配列番号 117 は T I C 1 1 3 0 1 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 3 】

配列番号 118 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 0 及び T I C 7 5 7 6 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 3 0 2 をコードする核酸配列である。

【 0 1 4 4 】

配列番号 119 は T I C 1 1 3 0 2 f P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 5 】

配列番号 120 はインフレームで操作可能に連結された T I C 4 7 7 1、 T I C 4 7 7 1、 及び T I C 4 4 7 2 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 4 4 0 をコードする核酸配列である。

20

【 0 1 4 6 】

配列番号 121 は、 T I C 1 1 4 4 0 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 7 】

配列番号 122 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 5 7 5、 T I C 7 5 7 5 及び T I C 7 5 7 6 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 4 4 1 をコードする核酸配列である。

30

【 0 1 4 8 】

配列番号 123 は、 T I C 1 1 4 4 1 f P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 9 】

配列番号 124 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 5 7 5、 T I C 4 7 7 1、 及び T I C 4 4 7 2 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 4 4 2 をコードする核酸配列である。

【 0 1 5 0 】

配列番号 125 は T I C 1 1 4 4 2 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 1 】

配列番号 126 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 0、 T I C 7 5 7 5、 及び T I C 7 5 7 6 コード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 4 4 3 をコードする核酸配列である。

40

【 0 1 5 2 】

配列番号 127 は T I C 1 1 4 4 3 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 3 】

配列番号 128 は、インフレームで操作可能に連結された T I C 7 6 6 0 及び T I C 7 5 7 6 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、 T I C 1 1 4 4 4 をコードする核酸配列である。

【 0 1 5 4 】

50

配列番号 129 は T I C 11444 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0155】

配列番号 130 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7660、T I C 7662、及び T I C 7663 コード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、T I C 11445 をコードする核酸配列である。

【0156】

配列番号 131 は T I C 11445 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0157】

配列番号 132 はインフレームで操作可能に連結された T I C 7662、T I C 7660、及び T I C 7661 コード配列から構成される融合タンパク質、T I C 11446 をコードする核酸配列である。 10

【0158】

配列番号 133 は T I C 11446 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0159】

配列番号 134 は T I C 11505 殺虫性 P i r B タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a の M D I - 0 0 3 5 7 7 7 株から得られた核酸配列である。

【0160】

配列番号 135 は T I C 11505 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【0161】

配列番号 136 はインフレームで操作可能に連結された T I C 10364 及び T I C 11505 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、T I C 11506 をコードする核酸配列である。 20

【0162】

配列番号 137 は T I C 11506 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0163】

配列番号 138 は T I C 11510 殺虫性 P i r B タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s b o v i e n i i の M D I - 0 0 3 5 8 0 8 株から得られた核酸配列である。

【0164】

配列番号 139 は T I C 11510 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。 30

【0165】

配列番号 140 はインフレームで操作可能に連結された T I C 10364 及び T I C 11510 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、T I C 11512 をコードする核酸配列である。

【0166】

配列番号 141 は T I C 11512 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0167】

配列番号 142 は T I C 11511 殺虫性 P i r B タンパク質の配列をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a の A N 6 / 1 株から得られた核酸配列である。 40

【0168】

配列番号 143 は T I C 11511 P i r B タンパク質のアミノ酸配列である。

【0169】

配列番号 144 はインフレームで操作可能に連結された T I C 10364 及び T I C 11511 のコード配列から構成される P i r A B 融合タンパク質、T I C 11513 をコードする核酸配列である。

【0170】

配列番号 145 は T I C 11513 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【0171】

10

20

30

40

50

配列番号 146 は T I C 1 0 3 7 6 P L P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列であり、 T I C 1 0 3 5 8 タンパク質をコードする断片の開始メチオニンコドンの直後に追加のアラニンコドンが挿入されている。

【 0 1 7 2 】

配列番号 147 は T I C 1 0 3 7 6 P L P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 3 】

配列番号 148 は T I C 1 0 3 7 8 P L P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列であり、 T I C 1 0 3 6 1 タンパク質をコードする断片の開始メチオニンコドンの直後に追加のアラニンコドンが挿入されている。

【 0 1 7 4 】

配列番号 149 は T I C 1 0 3 7 8 P L P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 5 】

配列番号 150 は T I C 1 0 3 8 0 P L P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞における発現に使用される合成コード配列であり、 T I C 1 0 3 6 3 タンパク質をコードする断片の開始メチオニンコドンの直後に追加のアラニンコドンが挿入されている。

【 0 1 7 6 】

配列番号 151 は T I C 1 0 3 8 0 P L P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 7 】

配列番号 152 は T I C 1 0 3 8 1 P L P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列であり、 T I C 1 0 3 6 4 タンパク質をコードする断片の開始メチオニンコドンの直後に追加のアラニンコドンが挿入されている。

【 0 1 7 8 】

配列番号 153 は T I C 1 0 3 8 1 P L P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 9 】

配列番号 154 は操作可能に連結された T I C 7 6 6 1 及び T I C 7 6 6 0 のコード配列から構成される T I C 1 1 1 0 3 P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【 0 1 8 0 】

配列番号 155 は T I C 1 1 1 0 3 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 8 1 】

配列番号 156 は操作可能に連結された T I C 7 6 6 3 及び T I C 7 6 6 2 のコード配列から構成される T I C 1 1 1 0 4 P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【 0 1 8 2 】

配列番号 157 は T I C 1 1 1 0 4 P i r A B 融合タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 8 3 】

配列番号 158 は T I C 1 1 3 0 2 P i r A B 融合タンパク質をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列である。

【 0 1 8 4 】

配列番号 159 は、 E s c h e r i c h i a c o l i で発現され、タンパク質の精製に使用されるコード配列に操作可能に連結されているヒスチジンタグをコードする合成コード配列である。

【 0 1 8 5 】

配列番号 160 はヒスチジンタグのアミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【 0 1 8 6 】

10

20

30

40

50

農業害虫駆除の技術分野における問題は、標的害虫に対して有効であり、標的害虫種に対して広いスペクトルの毒性を示し、望ましくない農業問題を引き起こすことなく植物で発現することができ、且つ植物で商業的に使用されている現在の毒素と比べて代替の作用機序を提供する新しい毒素タンパク質の必要性として特徴付けることができる。

【0187】

本明細書で開示されているのは、鞘翅目、半翅目及び鱗翅目の害虫に耐性を提供する Pir A タンパク質 TIC4771、TIC7575、TIC7660、TIC7662、TIC7664、TIC7666、TIC7668、TIC7939、TIC10357、TIC10358、TIC10360、TIC10361、TIC10362、TIC10363、TIC10364、TIC10359、及び Pir A_ABE68878 (10 まとめて、「Pir A タンパク質」) ; Pir B タンパク質 TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、TIC7667、TIC7669、TIC7940、TIC10366、TIC10367、TIC10369、TIC10370、TIC10371、TIC10372、TIC10373、TIC10368、Pir B_ABE68879、TIC11505、TIC11510、及び TIC11511 (まとめて、「Pir B タンパク質」) ; ならびに Pir A B 融合タンパク質、TIC6880、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9322、TIC9320、TIC9321、TIC6880PL、TIC10375、TIC10376、TIC10377、TIC10378、TIC10379、TIC10380、TIC10381、TIC10434、TIC11210、TIC11211、TIC11212、TIC11301、TIC11302、TIC11440、TIC11441、TIC11442、TIC11443、TIC11444、TIC11445、TIC11446、TIC11506、TIC11512、TIC11513、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、及び TIC11104 (まとめて、「Pir A B 融合タンパク質」) によって例示される新規の Pir A B 殺虫性タンパク質のクラスである。

【0188】

開示されているのはまた、Pir A B 融合タンパク質、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及び TIC11302 をコードする、植物細胞での発現のために設計された合成コード配列である。さらに開示されているのは、Pir A タンパク質、Pir B タンパク質、または Pir A B 融合タンパク質のうちの 1 以上をコードするコード配列に操作可能に連結されたプロモーターを含む組換え核酸分子である。

【0189】

本出願における「Pir A タンパク質」、「Pir A タンパク質毒素」、「Pir A 毒素タンパク質」、「Pir A 殺虫性タンパク質」、「Pir A 関連毒素」、または「Pir A 関連毒素タンパク質」等への言及は、鞘翅目害虫、半翅目害虫及び鱗翅目害虫に対する活性を付与し、そのようなタンパク質の Pir A タンパク質のいずれかとの配列比較が約 20 ~ 約 100 パーセントの画分比率のアミノ酸配列同一性を生じるのであれば殺虫活性または昆虫阻害活性を示す任意のタンパク質を含む、TIC4771 (配列番号 2)、TIC7575 (配列番号 8)、TIC7660 (配列番号 14)、TIC7662 (配列番号 20)、TIC7664 (配列番号 26)、TIC7666 (配列番号 32)、TIC7668 (配列番号 38)、TIC7939 (配列番号 44)、TIC10357 (配列番号 58)、TIC10358 (配列番号 64)、TIC10360 (配列番号 70)、TIC10361 (配列番号 76)、TIC10362 (配列番号 82)、TIC10363 (配列番号 88)、TIC10364 (配列番号 94)、TIC10359 (配列番号 100)、及び Pir A_ABE68878 (配列番号 105) の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質の配列及びそれらの殺虫性セグメントまたは昆虫阻害性セグ

10

20

30

40

50

メントまたはそれらの組み合わせを含む、それから成る、それと実質的に相同である、それに類似するまたはそれに由来する任意の新規の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質を指す。

【0190】

本出願における「PirBタンパク質」、「PirBタンパク質毒素」、「PirB毒素タンパク質」、「PirB殺虫性タンパク質」、「PirB関連毒素」、または「PirB関連毒素タンパク質」等への言及は、鞘翅目害虫、半翅目害虫及び鱗翅目害虫に対する活性を付与し、そのようなタンパク質のPirBタンパク質のいずれかとの配列比較が約24～約100パーセントの画分比率のアミノ酸配列同一性を生じるのであれば殺虫活性または昆虫阻害活性を示す任意のタンパク質を含む、TIC4772（配列番号4）、TIC7576（配列番号10）、TIC7661（配列番号16）、TIC7663（配列番号22）、TIC7665（配列番号28）、TIC7667（配列番号34）、TIC7669（配列番号40）、TIC7940（配列番号46）、TIC10366（配列番号60）、TIC10367（配列番号66）、TIC10369（配列番号72）、TIC10370（配列番号78）、TIC10371（配列番号84）、TIC10372（配列番号90）、TIC10373（配列番号96）、TIC10368（配列番号102）、PirB_ABE68879（配列番号107）、TIC11505（配列番号135）、TIC11510（配列番号139）、及びTIC11511（配列番号143）の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質の配列及びそれらの殺虫性セグメントまたは昆虫阻害性セグメントまたはそれらの組み合わせを含む、それから成る、それと実質的に相同である、それに類似するまたはそれに由来する任意の新規の殺虫性タンパク質または昆虫阻害タンパク質を指す。

【0191】

「PirAB融合タンパク質」という用語は本出願において、PirBタンパク質に隣接するPirAタンパク質の双方を含むタンパク質を記載するのに使用される。PirAB融合タンパク質をコードするDNA配列は、細胞内で発現されると、PirAタンパク質及びPirBタンパク質の双方を含む融合タンパク質を生成するようにPirBタンパク質をコードするコード配列とインフレームで操作可能に連結されたPirAタンパク質をコードするコード配列を含むことができる。PirABタンパク質は、同じ細菌オペロンに由来するPirAタンパク質及びPirBタンパク質から構成することができ、または代わりに、異なる細菌オペロンに由来するPirAタンパク質及びPirBタンパク質から構成することができる。PirAタンパク質がPirBタンパク質と隣接している例示的なPirAB融合タンパク質を表1に提供する。

表1. PirBタンパク質に隣接するPirAタンパク質から構成される例示的なPirAB融合タンパク質及びその中に含まれる対応するPirAタンパク質及びPirBタンパク質。

10

20

30

40

50

| PirAタンパク質 | | PirBタンパク質 | | PirAB融合タンパク質 | |
|-------------------|------------|-------------------|------------|--------------|------------|
| 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 |
| TIC4771 | 2 | TIC4772 | 4 | TIC6880 | 6 |
| TIC7575 | 8. | TIC7576 | 10. | TIC9316 | 12 |
| TIC7660 | 14 | TIC7661 | 16 | TIC9317 | 18 |
| TIC7662 | 20 | TIC7663 | 22 | TIC9318 | 24 |
| TIC7664 | 26 | TIC7665 | 28 | TIC9319 | 30 |
| TIC7666 | 32 | TIC7667 | 34 | TIC9322 | 36 |
| TIC7668 | 38 | TIC7669 | 40 | TIC9320 | 42 |
| TIC7939 | 44 | TIC7940 | 46 | TIC9321 | 48 |
| TIC4771* | 2 | TIC4772 | 4 | TIC6880PL* | 6 |
| TIC10357 | 58 | TIC10366 | 60 | TIC10375 | 62 |
| TIC10358 | 64 | TIC10367 | 66 | TIC10376 | 68 |
| TIC10360 | 70 | TIC10369 | 72 | TIC10377 | 74 |
| TIC10361 | 76 | TIC10370 | 78 | TIC10378 | 80 |
| TIC10362 | 82 | TIC10371 | 84 | TIC10379 | 86 |
| TIC10363 | 88 | TIC10372 | 90 | TIC10380 | 92 |
| TIC10364 | 94 | TIC10373 | 96 | TIC10381 | 98 |
| PirA_ABE688 78 | 105 | PirB_ABE6887 9 | 107 | TIC10434 | 109 |
| TIC10358* | 64 | TIC10367 | 66 | TIC10376PL* | 147 |
| TIC10361* | 76 | TIC10370 | 78 | TIC10378PL* | 149 |
| TIC10363* | 88 | TIC10372 | 90 | TIC10380PL* | 151 |
| TIC10364* | 94 | TIC10373 | 96 | TIC10381PL* | 153 |
| TIC7575 | 8 | TIC7665 | 28 | TIC11210 | 111 |
| TIC7575 | 8 | TIC7667 | 34 | TIC11211 | 113 |
| TIC7662 | 20 | TIC7665 | 28 | TIC11212 | 115 |
| TIC7575 | 8 | TIC7661 | 16 | TIC11301 | 117 |
| TIC7660 | 14 | TIC7576 | 10 | TIC11302 | 119 |
| TIC10364 | 94 | TIC11505 | 135 | TIC11506 | 137 |
| TIC10364 | 94 | TIC11510 | 139 | TIC11512 | 141 |
| TIC10364 | 94 | TIC11511 | 143 | TIC11513 | 145 |

*開始メチオニン残基の直後に追加のアラニン残基を含む。

【0192】

「PirAB融合タンパク質」という用語はまた、本出願において、PirAタンパク質に隣接するPirBタンパク質を含むタンパク質を記載するのに使用される。PirAB融合タンパク質をコードするDNA配列は、細胞内で発現されると、PirBタンパク質及びPirAタンパク質の双方を含む融合タンパク質を生成するようにPirAタンパク質をコードするコード配列とインフレームで操作可能に連結されたPirBタンパク質をコードするコード配列を含むことができる。PirBタンパク質は、同じ細菌オペロンに由来するPirBタンパク質及びPirAタンパク質から構成することができ、または代わりに、異なるオペロンに由来するPirBタンパク質及びPirAタンパク質から構

10

20

30

50

40

成することができる。PirBタンパク質がPirAタンパク質と隣接している例示的なタンパク質を表2に提供する。

表2. PirAタンパク質に隣接するPirBタンパク質から構成される例示的なPirAB融合タンパク質及びその中に含まれる対応するPirBタンパク質及びPirAタンパク質。

| PirBタンパク質 | | PirAタンパク質 | | PirAB融合タンパク質 | |
|-----------|------------|-----------|------------|--------------|------------|
| 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 |
| TIC7661 | 16 | TIC7660 | 14 | TIC11103 | 155 |
| TIC7663 | 22 | TIC7662 | 20 | TIC11104 | 157 |

10

【0193】

「PirAB融合タンパク質」という用語はまた、本出願において、PirBタンパク質に隣接する2つのPirAタンパク質を含むタンパク質を記載するのに使用される。この種類のPirAB融合タンパク質をコードするDNA配列は、細胞内で発現するとPirAタンパク質と別のPirAタンパク質とPirBタンパク質とを含む融合タンパク質が生成するようにPirBタンパク質をコードするコード配列に操作可能に連結された、同じPirAタンパク質または異なるPirAタンパク質をコードするコード配列に操作可能に連結されたPirAタンパク質をコードするコード配列を含むことができる。PirBタンパク質に隣接する2つのPirAタンパク質を含む例示的なPirAB融合タンパク質を表3に提供する。

表3. 別のPirAタンパク質に隣接し、且つPirBタンパク質に隣接するPirAタンパク質から構成される例示的なPirAB融合タンパク質及びその中に含まれる対応するPirAタンパク質及びPirBタンパク質。

| PirAタンパク質 | | PirAタンパク質 | | PirBタンパク質 | | PirAB融合タンパク質 | |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|------------|
| 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | タンパク質の配列番号 |
| TIC4771 | 2 | TIC4771 | 2 | TIC4772 | 4 | TIC11440 | 121 |
| TIC7575 | 8 | TIC7575 | 8 | TIC7576 | 10 | TIC11441 | 123 |
| TIC7575 | 8 | TIC4771 | 2 | TIC4772 | 4 | TIC11442 | 125 |
| TIC7660 | 14 | TIC7575 | 8 | TIC7576 | 10 | TIC11443 | 127 |
| TIC7575 | 8 | TIC7660 | 14 | TIC7661 | 16 | TIC11444 | 129 |
| TIC7660 | 14 | TIC7662 | 20 | TIC7663 | 22 | TIC11445 | 131 |
| TIC7662 | 20 | TIC7660 | 14 | TIC7661 | 16 | TIC11446 | 133 |

20

30

【0194】

「PirAB融合タンパク質」という用語はまた、本出願において、互いに隣接する複数のPirAタンパク質及び/または複数のPirBタンパク質を含むタンパク質を記載するのに使用される。複数のPirAタンパク質及び/またはPirBタンパク質は、複製されたPirAタンパク質またはPirBタンパク質であることができ、または異なるPirAタンパク質またはPirBタンパク質であることができる。融合タンパク質としての複数のPirAタンパク質及び/またはPirBタンパク質の組み合わせは、特定の標的害虫種に対する活性を高めることができ、または活性が存在する害虫種の範囲を増や

50

してもよい。

【0195】

「セグメント」または「断片」という用語は本出願において、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirABタンパク質の1つを記載する完全なアミノ酸配列または核酸配列よりも短い連続するアミノ酸配列または核酸配列を記載するのに使用される。昆虫阻害活性を示すセグメントまたは断片は、そのようなセグメントまたは断片と、配列番号2、8、14、20、26、32、38、44、58、64、70、76、82、88、94、100、または105に記述されたPirAタンパク質；配列番号4、10、16、22、28、34、40、46、60、66、72、78、84、90、96、102、107、135、139、または143に記述されたPirBタンパク質；または配列番号6、12、18、24、30、36、42、48、50、62、68、74、80、86、92、98、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、137、141、145、147、149、151、153、155、または157に記述されたPirAB融合タンパク質、または関連するファミリーメンバーの殺虫性タンパク質の対応する区分との配列比較がセグメントまたは断片と並べたタンパク質の対応する区分との間で約65～約100パーセントの同一性の配列比較を生じるのであれば、本出願でも開示されている。本明細書に記載されているPirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirABタンパク質のうちの1つのセグメントまたは断片は、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirABタンパク質のうちの1つの少なくとも約50個の連続するアミノ酸、少なくとも約75個の連続するアミノ酸、少なくとも約100個の連続するアミノ酸、少なくとも約125個の連続するアミノ酸、少なくとも約150個の連続するアミノ酸、少なくとも約200個の連続するアミノ酸、少なくとも約250個の連続するアミノ酸、少なくとも約300個の連続するアミノ酸、少なくとも約350個の連続するアミノ酸、少なくとも約400個の連続するアミノ酸、少なくとも約450個の連続するアミノ酸、少なくとも約500個の連続するアミノ酸、少なくとも約550個の連続するアミノ酸、または少なくとも約600個の連続するアミノ酸を含んでもよい。本明細書に記載されているPirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirABタンパク質のうちの1つのセグメントまたは断片は塩基配列の活性を示してもよい。

【0196】

本出願における「活性がある」または「活性」、「殺虫活性」または「殺虫性」または「殺虫活性」、「昆虫阻害性」または「殺虫性」という用語への言及は、有効量のPirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質の1以上を含有する特定の作物にて阻害すること（成長、摂食、繁殖力、または生存能力を阻害すること）、抑制すること（成長、摂食、繁殖力、または生存能力を抑制すること）、防除すること（害虫の侵入防除すること、害虫の摂食活動を防除すること）におけるタンパク質毒素のような毒剤の有効性を指す。これらの用語は、害虫が毒性タンパク質にさらされると、病的状態、大量死、繁殖力の低下、または発育阻害をもたらす、殺虫で有効な量の毒性タンパク質を害虫に提供した結果を含むことが意図される。これらの用語には、殺虫で有効な量の毒性タンパク質を植物の中または上に提供した結果としての、植物、植物の組織、植物の一部、種子、植物細胞に由来する害虫、または植物が成長していくてもよい特定の地理的位置由来の害虫の反発作用も含まれる。一般に、殺虫活性は、成長、発達、生存率、摂食行動、交尾行動、繁殖力を阻害することで有効である、または鱗翅目、鞘翅目もしくは半翅目の昆虫を含むが、これらに限定されない特定の標的害虫のこのタンパク質、タンパク質断片、タンパク質セグメントまたはポリヌクレオチドに対する昆虫の摂食によって引き起こされる悪影響の測定可能な減少で有効である毒性タンパク質の能力を指す。毒性タンパク質は、植物によって生成され得る、または植物に、もしくは植物が位置する場所内の環境に適用され得る。「生物活性」、「効果的な」、「有効な」という用語またはこれらの変形はまた、標的害虫に対する本発明のタンパク質の効果を記載するにも本出願において交換可能に利用される用語である。

10

20

30

40

50

【0197】

殺虫で有効な量の毒剤は、標的の害虫の餌で提供されると、毒剤が害虫に接触したときに殺虫活性を示す。毒剤は殺虫性タンパク質または当該技術分野で知られている1以上の化学薬品であることができる。殺虫性または殺虫性の化学薬品及び殺虫性または殺虫性のタンパク質薬剤は、単独で、または互いに組み合わせて使用することができる。化学薬品には、標的害虫の抑制のために特定の遺伝子を標的とするdsRNA分子、有機塩素化合物、有機リン酸塩、カルバメート、ピレスロイド、ネオニコチノイド、及びアノイドが挙げられるが、これらに限定されない。殺虫性または殺虫性のタンパク質薬剤には、本出願に記述されているタンパク質毒素、と同様に鞘翅目、鱗翅目、半翅目、総翅目、または双翅目の害虫種を標的とするものを含む他のタンパク性毒剤が挙げられる。

10

【0198】

「Photorhabdus昆虫関連」タンパク質、またはPirABタンパク質は、一部の昆虫に対して殺虫活性を持つ二成分毒素である。一部のPirABタンパク質は、昆虫の血体腔に注入すると鱗翅目活性を有することが示されている。しかしながら、昆虫食で提示された場合、PirABタンパク質の経口投与はほとんどまたはまったく活性を示さなかった（例えば、Yang, et al. (2017), PirAB protein from *Xenorhabdus nematophila* HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 148: 43-50; Li, et al. (2014), *Photorhabdus luminescens* PirAB-fusion protein exhibits both cytotoxicity and insecticidal activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 356: 23-31; Wu及びYunhong, (2016), *Scientific Reports*, 6, Article number: 34996; doi: 10.1038/srep34996; ならびにZhang, et al. (2013), XaxAB-like binary toxin from *Photorhabdus luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 350: 48-56）を参照のこと）。鱗翅目に対するPirABタンパク質の経口活性が報告されているが、それらの研究は、昆虫の餌で提供される精製毒素ではなく、PirABタンパク質を発現するE. coli細菌を含む餌を昆虫が摂取することに依存している（例えば、Waterfield, et al. (2005), The Photorhabdus Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 245: 47-52及びBlackburn, et al. (2006), Remarkable susceptibility of the diamondback moth (*Plutella xylostella*) to ingestion of Pir toxins from *Photorhabdus luminescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121: 31-37を参照のこと）。全く対照的に、本明細書では、実施例に記載されているように、PirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirAB融合タンパク質のタンパク質調製物は昆虫餌バイオアッセイで提供された。鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目の害虫に対する経口活性が観察され、実施例にて提示されている。加えて、PirAB融合タンパク質、TIC9316、TIC9317、及びTIC9318を発現している植物に由来するリーフディスクを、鱗翅目害虫種である欧州アワノメイガ及び南西部アワノメイガ(SWCB)に対する活性を実証する経口昆虫摂食試験で使用した。さらに、TIC10376、TIC10378、TIC10380、及びTIC10381を発現している植物に由来するリーフディスクはSWCBに

20

30

40

50

対して活性を示した。また、実施例に記載されているように、TIC9315及びTIC11302は安定して形質転換された植物において西洋トウモロコシ根切り虫害虫に対して活性を示した。

【0199】

害虫、特に作物の害虫への言及は、作物の害虫、特にPirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirABタンパク質、関連するファミリーの殺虫性タンパク質、またはそれらのセグメントまたは断片の少なくとも1つによって防除される害虫を意味することが意図される。

【0200】

実施例に記載されているように、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirABタンパク質の1以上は、成虫、蛹、幼虫、及び新生子を含む鞘翅目、半翅目、及び鱗翅目の害虫種由来の害虫に対して殺虫活性を示す。

【0201】

鱗翅目の昆虫には、Noctuidae科のヨトウムシ(*armyworm*)、ヨトウムシ(*cutworm*)、ルーパー、及びヘリオチン、例えば、ツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)、シロイチモジヨト(*Spodoptera exigua*)、クロヨトウムシ(*Spodoptera exempta*)、ベルタヨトウムシ(*Mamestra configurata*)、南部アワヨトウ(*Spodoptera eridania*)、タマナヤガ(*Agrotis ipsilon*)、キャベツルーパー(*Trichoplusia ni*)、ダイズルーパー(*Pseudoplusia includens*)、ベルベットビーンキャタピラー(*Anticarsia gemmatalis*)、グリーンクローバーワーム(*Hypena scabra*)、オオタバコガ(*Heliothis virescens*)、顆粒状カットワーム(*Agrotis subterranea*)、ヨトウムシ(*Pseudaleitia unipuncta*)、西洋根切り虫(*Agrotis Orthogonias*)；Pyralidae科のボーラー、ケイスペアラ、ウェブワーム、コーンワーム、キャベツムシ及びスケリトナイザー、例えば、欧洲アワノメイガ(*Ostrinia nubilalis*)、ネーブルオレンジワーム(*Amyeloides transitella*)、コーンルートウェブワーム(*Crambus caliginosellus*)、ソッドウェブワーム(*Herpetogramma licarsisalis*)、ヒマワリガ(*Homoeosoma electellum*)、レサーコーンストークボーラー(*Elasmopalpus lignosellus*)；Tortricidae科のハマキムシ、バッドワーム、シードワーム、及びフルーツワーム、例えば、コドリンガ(*Cydia pomonella*)、グレープベリーモス(*Endopiza viteana*)、ナシヒメシンクイ(*Grapholita molesta*)、ヒマワリバッドモス(*Suleima helianthana*)；ならびに他の多くの経済的に重要な鱗翅目、例えば、コナガ(*Plutella xylostella*)、ピンクボールワーム(*Pectinophora gossypiella*)、及びマイマイガ(*Lymantria dispar*)が挙げられるが、これらに限定されない。鱗翅目の他の害虫には、例えば、オオタバコガ(*Alabama argillacea*)、フルーツツリーハマキムシ(*Archips argyrospila*)、欧洲ハマキムシ(*Archips rosana*)及び他の*Archips*種(*Chilo suppressalis*、アジアのズイムジ、またはニカメイガ)、イネハマキムシ(*Cnaphalocrocis medinalis*)、コーンルートウェブワーム(*Crambus caliginosellus*)、ブルーグラスウェブワーム(*Crambus teterrellus*)、南西部アワノメイガ(*Diatraea grandiosella*)、サーガルケーンボーラー(*Diatraea saccharalis*)、とげのあるボールワーム(*Earias insularias vittella*)、オオタバコガ(*Helicoverpa armigera*)、アメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*、ダイズポッドワーム及びワタオオタバコガとしても知られる)、オオタバコガ(*Helio* 50

this virescens)、ソッドウェブワーム(*Herpetogramma lichalis*)、西洋ビーン根切り虫(*Striacosta albicosta*)、歐州グレープバインモス(*Lobesia botrana*)、シトラスリーフマイナー(*Phylloconistis citrella*)、オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)、小型モンシロチョウ(*Pieris rapae*、輸入されたアオムシとしても知られている)、タバコ根切り虫(クラスター・キャタピラーとしても知られている *Spodoptera litura*)、及びトマトキバガ(*Tuta absoluta*)が挙げられる。

【0202】

鞘翅目の昆虫には、特に害虫が西洋トウモロコシ根切り虫(*Diabrotica virgifera*、WCR)である場合、*Agriotes spp.*、*Anthonus mus spp.*、*Atomaria linearis*、*Chaetocnema bialis*、*Cosmopolites spp.*、*Curculio spp.*、*Dermostes spp.*、*Diabrotica spp.*、*Epilachna spp.*、*Eremnus spp.*、*Leptinotarsa decemlineata*、*Lissorhoptrus spp.*、*Melolontha spp.*、*Oryctes ephilus spp.*、*Otiorrhynchus spp.*、*Phylactinus spp.*、*Popillia spp.*、*Psylliodes spp.*、*Rhizopertha spp.*、*Scarabeidae*、*Sitophilus spp.*、*Sitotroga spp.*、*Tenebrio spp.*、*Tricholium spp.*、及び *Trogoderma spp.*、北方型トウモロコシ根切り虫(*Diabrotica barberi*、NCR)、メキシコ型トウモロコシ根切り虫(*Diabrotica virgifera zeae*、MCR)、ブラジル型トウモロコシ根切り虫(*Diabrotica balteata*、BZR)、南方型トウモロコシ根切り虫(*Diabrotica undecimpunctata howardi*、SCR)、コロラドハムシ(*Leptinotarsa decemlineata*、CPB)、ブラジル型トウモロコシ根切り虫複合体(BCR、*Diabrotica viridulata*と *Diabrotica speciosa*から成る)、アブラナノミハムシ(*Phyllotreta crucifer*)*Phyllotreta striolata*)、縞模様ノミハムシ(*Phyllotreta striolata*)及び西洋クロノミハムシ(*Phyllotreta pusilla*)が挙げられるが、これらに限定されない。)

【0203】

半翅目の昆虫には、*Pentatomidae*科のカメムシ：*Chinavia*属のミドリカメムシ(*Chinavia hilaris*、*Chinavia marginata*、及び *Chinavia pensylvanica*)、*Chlorochroa*属のカメムシ(*Chlorochroa granulose*、*Chlorochroa kanei*、*Chlorochroa ligata*、*Chlorochroa lineata*、*Chlorochroa opuntiae*、*Chlorochroa persimilis*、*Chlorochroa rossiana*、*Chlorochroa sayi*、*Chlorochroa uhleri*、*Chlorochroa belfragii*、*Chlorochroa faceta*、*Chlorochroa osborni*、*Chlorochroa saucia*、及び *Chlorochroa senilis*)、サザンミドリカメムシ(*Nezara viridula*)、*Edessa*属のカメムシ(*Edessa meditabunda*、*Edessa bifida*、及び *Edessa florida*)、亜熱帯クサギカメムシ(*Euschistus heros*)、*Euschistus*属のカメムシ(*Euschistus acuminatus*、*Euschistus biformis*、*Euschistus conspersus*、*Euschistus crenator*、*Euschistus egglesoni*、*Euschistus ictericus*、*Euschistus inflatus*、*Euschistus latimarginatus*、*Euschistus obs*)

10

20

30

40

50

cures、Euschistus politus、Euschistus quadrator、Euschistus sevus、Euschistus strenuus、Euschistus tristigmus、及びEuschistus variolarius)、クサギカメムシ(Halyomorpha halys)、カタアカカメムシ(Thyanta accerra)、Thyanta属のカメムシ(Thyanta calceata、Thyanta custator、Thyanta pallidovirens、Thyanta perditor、Thyanta maculata、及びThyanta pseudocasta)、Dichelops属のミドリハラカメムシ(Dichelops melacanthus)及び他のカメムシ(Dichelops avilapiresi、Dichelops bicolor、Dichelops dimidatus、Dichelops furcatus、Dichelops furcifrons、Dichelops lobatus、Dichelops miriamae、Dichelops nigrum、Dichelops peruanus、Dichelops phoenix、及びDichelops saltensis)、アカシマカメムシ(Piezodorus guildinii)と同様にPiezodorus lituratus;及びPlataspidae科の昆虫、例えは、タイワンマルカメムシ(Megacopta cribraria)、西洋ミドリメクラガメ(Lygus hesperus)、及びミドリメクラガメ(Lygus lineolaris)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0204】

本出願における「単離されたDNA分子」、または同等の用語もしくは表現への言及は、DNA分子が、単独で存在する、または他の組成物と組み合わせて存在するが、その自然環境内には存在しないものであることを意味するように意図される。例えは、生物のゲノムのDNA内に自然に見いだされるコード配列、イントロン配列、非翻訳リーダー配列、プロモーター配列、転写終結配列等のような核酸要素は、要素が生物のゲノム内にあり、それが天然に見いだされるゲノム内の位置にある限り、「単離された」とは見なされない。しかしながら、これらの要素のそれぞれ、及びこれらの要素の下位区分は、要素が生物のゲノム内なく、それが天然に見いだされるゲノム内の位置にない限り、本開示の範囲内で「単離」されることになる同様に、殺虫性タンパク質またはそのタンパク質の任意の天然に存在する殺虫性変異体をコードするヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列が、タンパク質をコードする配列が天然に見いだされる細菌のDNA内になかった限りにおいて、単離されたヌクレオチド配列であるということになる。天然に存在する殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする合成ヌクレオチド配列は、本開示の目的のために単離されたと見なされる。本開示の目的のために、任意のトランスジェニックヌクレオチド配列、すなわち、植物または細菌の細胞のゲノムに挿入された、または染色体外ベクターに存在するDNAのヌクレオチド配列は、それがプラスミドまたは細胞を形質転換するために使用される同様の構造内に存在してもしなくても、植物もしくは細菌のゲノム内に存在してもしなくても、または植物もしくは細菌に由来する組織、子孫、生物試料または商品生産物に検出可能な量で存在してもしなくても、単離されたヌクレオチド配列であると見なされる。

【0205】

本明細書でさらに記載されているように、PirAタンパク質、TIC4771(配列番号1)及びPirB細胞タンパク質、TIC4772(配列番号3)をコードする2つのオープンリーディングフレーム(ORF)を含むオペロンは、それぞれ配列番号2及び配列番号4として提示されるタンパク質毒素をコードするXenorhabdus nematophilaのISB000002株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC6880(配列番号5)をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号6として提示されるTIC6880 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC4771を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種のアメリカタバ

10

20

30

40

50

コガ (*Helicoverpa zea*、CEW)、コナガ (*Plutella xylostella*、DEM)、欧洲アワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*、ECB)、ベルベットビーンキャタピラー (*Anticarsia gemmatalis*、VBC)、及び南方ヨトウムシ (*Spodoptera eridania*、SAW)；鞘翅目種のコロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*、CPB)；及び半翅目種のミドリメクラガメ (*Lygus lineolaris*、TPB) に対して活性を示した。微生物宿主細胞由来のTIC4772を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、CEW、DBM、VBC 及び半翅目種、TPB に対して活性を示した。TIC4771とTIC4772から構成される、微生物宿主細胞由来のPirAB融合タンパク質であるTIC6880を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種のツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*、FAW)、CEW、南西部アワノメイガ (*Diatraea grandiosella*、SWCB)、DBM、ECB、及びVBC、鞘翅目種 CPB 及び西洋トウモロコシ根切り虫 (*Diabrotica virgifera*、WCR)；半翅目種のミドリメクラガメ (*Lygus lineolaris*、TPB)、西洋ミドリメクラガメ (*Lygus hesperus*、WTP)、南方ミドリカメムシ (*Nezara viridula*、SGB)、及び亜熱帯クサギカメムシ (*Euschistus heros*、NBSB)、及び双翅目種のネッタイシマカ (*Aedes aegypti*、YFM) に対して活性を示した。

【0206】

PirAタンパク質TIC7575 (配列番号7) 及びPirBタンパク質TIC7576 (配列番号9) をコードする2つのORFを含有するオペロンが、それぞれ、配列番号8及び配列番号10として提示されるタンパク質毒素をコードする *Xenorhabdus ehlersii* の85823株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC9316 (配列番号11) をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号12として提示されるTIC9316 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC7575及びTIC7576を用いたバイオアッセイは、アッセイで調べた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC7575とTIC7576から構成されるPirAB融合タンパク質TIC9316を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB、タマナヤガ (*Agrotis ipsilon*、BCW)、SAW、オオタバコガ (*Heliothis virescens*、TBW)、ECB、及びVBC、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、TPB、WTP、SGB、及びNBSBに対して活性を示した。

【0207】

PirAタンパク質TIC7660 (配列番号13) 及びPirBタンパク質TIC7661 (配列番号15) をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号14及び配列番号16として提示されるタンパク質毒素をコードする *Xenorhabdus cabanillasii* の85908株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC9317 (配列番号17) をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号18として提示されるTIC9317 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC7660及びTIC7661を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC7660とTIC7661から構成されるPirAB融合タンパク質TIC9317を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB、ECB、及びVBC、鞘翅目種、CPB 及びWCR、半翅目種、TPB、WTP、及びSGB に対して活性を示した。

【0208】

PirAタンパク質TIC7662 (配列番号19) とPirBタンパク質TIC7663 (配列番号21) をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号20及び配列番号22として提示されるタンパク質毒素をコードする *Xenorhabdus*

10

20

30

40

50

abdus ehlersii の 85887 株から得られた DNA で発見された。2 つの ORF を用いて、DNA 配列、TIC9318（配列番号 23）をコードする PirAB 融合タンパク質を作製し、その際、2 つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号 24 として提示される TIC9318 PirAB 融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来の TIC7662 及び TIC7663 を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC7662 と TIC7663 から構成される PirAB 融合タンパク質 TIC9318 を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB、BCW、TBW、ECB、及び VBC、鞘翅目種、CPB 及び WCR、及び半翅目種、TPB、WTP、SGB、及び NBSB に対して活性を示した。

10

【0209】

PirA タンパク質 TIC7664（配列番号 25）及び PirB タンパク質 TIC7665（配列番号 27）をコードする 2 つの ORF を含有するオペロンは、それぞれ、配列番号 26 及び配列番号 28 として提示されるタンパク質毒素をコードする *Xenorhabdus poinarii* の 86198 株から得られた DNA で発見された。2 つの ORF を用いて、DNA 配列、TIC9319（配列番号 29）をコードする PirAB 融合タンパク質を作製し、その際、2 つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号 30 として提示される TIC9319 PirAB 融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来の TIC7664 を用いたバイオアッセイは鞘翅目種の CPB に対して活性を示した。微生物宿主細胞由来の TIC7665 を用いたバイオアッセイは鱗翅目種の TBW に対して活性を示した。TIC7664 と TIC7665 から構成される PirAB 融合タンパク質 TIC9319 を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB、BCW、ECB、及び VBC、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、TPB、WTP、及び SGB に対して活性を示した。

20

【0210】

PirA タンパク質 TIC7666（配列番号 31）及び PirB タンパク質 TIC7667（配列番号 33）をコードする 2 つの ORF を含有するオペロンは、それぞれ、配列番号 32 及び配列番号 34 として示されるタンパク質毒素をコードする *Photorhabdus luminescens* の 86197 株から得られた DNA で発見された。2 つの ORF を用いて、DNA 配列、TIC9322（配列番号 35）をコードする PirAB 融合タンパク質を作製し、その際、2 つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号 36 として提示される TIC9322 PirAB 融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来の TIC7666 を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。微生物宿主細胞由来の TIC7667 を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB に対して活性を示した。TIC7666 と TIC7667 から構成される PirAB 融合タンパク質 TIC9322 を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB 及び VBC、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、TPB に対して活性を示した。

30

【0211】

PirA タンパク質 TIC7668（配列番号 37）と PirB タンパク質 TIC7669（配列番号 39）をコードする 2 つの ORF を含有するオペロンは、それぞれ、配列番号 38 及び配列番号 40 として提示されるタンパク質毒素をコードする *Photorhabdus luminescens* の 86194 株から得られた DNA で発見された。2 つの ORF を用いて DNA 配列、TIC9320（配列番号 41）をコードする PirAB 融合タンパク質を作製し、その際、2 つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号 42 として提示される TIC9320 PirAB 融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来の TIC7668 及び TIC7669 を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC7668 と TIC7669 から構成される PirAB 融合タンパク質 TIC9320 を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB、ECB、及び VBC、鞘翅目種、CPB 及び WC

40

50

R、及び半翅目種、TPB、SGB、及びNBSBに対して活性を示した。

【0212】

PirAタンパク質TIC7939（配列番号43）とPirBタンパク質TIC7940（配列番号45）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号44及び配列番号46として提示されるタンパク質毒素をコードするマイクロバイオーム内に含まれる未知の細菌種から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC9321（配列番号47）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号48として提示されるTIC9321 PirAB融合タンパク質を生成した。

【0213】

PirAタンパク質TIC10357（配列番号57）とPirBタンパク質TIC10366（配列番号59）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号58及び配列番号60として提示されるタンパク質毒素をコードする*Shewaneella violacea*から得られたDNAで発見された。2つのオープンリーディングフレームを用いて、DNA配列、TIC10375（配列番号61）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号62として提示されるTIC10375 PirAB融合タンパク質を生成した。

10

【0214】

PirAタンパク質TIC10358（配列番号63）及びPirBタンパク質TIC10367（配列番号65）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号64及び配列番号66として提示されるタンパク質毒素をコードする*Photorhabdus luminescens*の*laumondi* TTO1株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC10376（配列番号67）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号68として提示されるTIC10376 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC10358及びTIC10367を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC10358とTIC10367から構成されるPirAB融合タンパク質TIC10376を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、SWCB及び鞘翅目種、北方トウモロコシ根切り虫（*Diabrotica barberi*、NCR）及びWCRに対して活性を示した。

20

【0215】

PirAタンパク質TIC10360（配列番号69）及びPirBタンパク質TIC10369（配列番号71）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ、配列番号70及び配列番号72として提示されるタンパク質毒素をコードする*Photorhabdus asymbiotica*から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列、TIC10377（配列番号73）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号74として提示されるTIC10377 PirAB融合タンパク質を生成した。

30

【0216】

PirAタンパク質TIC10361（配列番号75）及びPirB細胞タンパク質TIC10370（配列番号77）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号76及び配列番号78として提示されるタンパク質毒素をコードする*Xenorhabdus spp.*の*NBAILIXens* 04株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列TIC10378（配列番号79）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号80として提示されるTIC10378 PirAB融合タンパク質を生成した。

40

50

【0217】

PirAタンパク質TIC10362（配列番号81）及びPirBタンパク質TIC10371（配列番号83）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号82及び配列番号84として提示されるタンパク質毒素をコードするYersinia albovaeの670-83株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列TIC10379（配列番号85）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号86として提示されるTIC10379 PirAB融合タンパク質を生成した。

【0218】

PirAタンパク質TIC10363（配列番号87）及びPirBタンパク質TIC10372（配列番号89）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号88及び配列番号90として提示されるタンパク質毒素をコードするXenorhabdus doucetiaeのFRM16株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列TIC10380（配列番号91）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号92として提示されるTIC10380 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC10363及びTIC10372を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC10363とTIC10372から構成されるPirAB融合タンパク質TIC10380を用いたバイオアッセイは、鱗翅目種、FAW、鞘翅目種、NCRとWCR、及び半翅目種、NBSBに対して活性を示した。

10

20

30

【0219】

PirAタンパク質TIC10364（配列番号93）及びPirBタンパク質TIC10373（配列番号95）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号94及び配列番号96として提示されるタンパク質毒素をコードするXenorhabdus griffiniiaeのBMMC株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列TIC10381（配列番号97）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号98として提示されるTIC10381 PirAB融合タンパク質を生成した。微生物宿主細胞由来のTIC10364及びTIC10373を用いたバイオアッセイは、アッセイで用いた昆虫に対する活性を示さなかった。しかしながら、TIC10364とTIC10373から構成されるPirAB融合タンパク質TIC10378を用いたバイオアッセイは、鞘翅目、NCRとWCR、及び半翅目種、NBSBに対して活性を示した。

30

【0220】

PirAタンパク質TIC10359（配列番号99）及びPirBタンパク質TIC10368（配列番号101）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号100及び配列番号102として提示されるタンパク質毒素をコードするXenorhabdus nematophilaから得られたDNAで発見された。TIC10359とTIC10368の双方を含むオペロン配列は配列番号103として提示されている。

40

【0221】

PirAタンパク質PirA_ABE68878（配列番号104）及びPirBタンパク質PirB_ABE68879（配列番号106）をコードする2つのORFを含有するオペロンは、それぞれ配列番号105及び配列番号107として提示されるタンパク質毒素をコードするPhotorhabdus luminescensのHm株から得られたDNAで発見された。2つのORFを用いて、DNA配列TIC10434（配列番号108）をコードするPirAB融合タンパク質を作製し、その際、2つのコード配列はインフレームで操作可能に連結され、配列番号109として提示されるTIC10378 PirAB融合タンパク質を生成した。PirA_ABE68878及びPirB_

50

A B E 6 8 8 7 9 から構成される、微生物宿主細胞由来の P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 0 4 3 4 を用いたバイオアッセイは、鞘翅目種、N C R 及びW C R に対して活性を示した。

【 0 2 2 2 】

T I C 1 1 5 0 5 (配列番号 1 3 4)をコードする P i r B タンパク質の O R F を含有するオペロンは、配列番号 1 3 5 として提示されるタンパク質毒素をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a の M D I - 0 0 3 5 7 7 7 株から発見された。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 0 5 6 のコード配列 (配列番号 1 3 6)は、T I C 1 1 5 0 5 コード配列にインフレームで操作可能に連結された T I C 1 0 3 6 4 コード配列を含んで、配列番号 1 3 7 として提示される T I C 1 1 5 0 6 P i r A B 融合タンパク質を生成した。 10

【 0 2 2 3 】

T I C 1 1 5 1 0 (配列番号 1 3 8)をコードする P i r B タンパク質の O R F を含有するオペロンは、配列番号 1 3 9 として提示されるタンパク質毒素をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a の M D I - 0 0 3 5 7 7 7 株から発見された。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 5 1 2 のコード配列 (配列番号 1 4 0)は、T I C 1 1 5 0 5 コード配列にインフレームで操作可能に連結された T I C 1 0 3 6 4 コード配列を含んで、配列番号 1 4 1 として提示される T I C 1 1 0 5 6 P i r A B 融合タンパク質を生成した。 20

【 0 2 2 4 】

T I C 1 1 5 1 1 (配列番号 1 4 2)をコードする P i r B タンパク質の O R F を含有するオペロンは、配列番号 1 4 3 として提示されるタンパク質毒素をコードする X e n o r h a b d u s n e m a t o p h i l a の M D I - 0 0 3 5 7 7 7 株から発見された。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 5 1 3 のコード配列 (配列番号 1 4 4)は、T I C 1 1 5 1 3 コード配列にインフレームで操作可能に連結された T I C 1 0 3 6 4 コード配列を含んで、配列番号 1 4 5 として提示される T I C 1 1 0 5 6 P i r A B 融合タンパク質を生成した。 30

【 0 2 2 5 】

P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 2 1 0 、 T I C 1 1 2 1 1 、及び T I C 1 1 3 0 1 は、それぞれ P i r A タンパク質 T I C 7 5 7 5 及び P i r B タンパク質 T I C 7 6 6 5 、 T I C 7 6 6 7 、及び T I C 7 6 6 1 を含んでいた。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 2 1 2 は、 P i r A タンパク質 T I C 7 6 6 2 及び P i r B タンパク質 T I C 7 6 6 5 を含む P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 3 0 2 は、 P i r A タンパク質 T I C 7 6 6 0 及び P i r B タンパク質 T I C 7 5 7 6 を含む。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 2 1 0 及び T I C 1 1 2 1 1 は、鱗翅目種、S W C B 及び半翅目種、N B S B に対して活性を示した。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 3 0 1 及び T I C 1 1 3 0 2 は、鱗翅目種、S W C B 、E C B 、及び V B C 、鞘翅目種、W C R 、及び半翅目種、N B S B 及びW T P に対して活性を示した。 40

【 0 2 2 6 】

P i r A B 融合タンパク質、T I C 1 1 1 0 3 及び T I C 1 1 1 0 4 は、P i r A タンパク質と一致する P i r B タンパク質を含んでいた。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 1 0 3 は P i r B タンパク質 T I C 7 6 6 1 と P i r A タンパク質 T I C 7 6 6 0 から構成される。 P i r A B 融合タンパク質 T T I C 1 1 1 0 4 は P i r B タンパク質 T I C 7 6 6 3 と P i r A タンパク質 T I C 7 6 6 2 から構成される。 50

【 0 2 2 7 】

P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 1 4 0 は P i r A タンパク質 T I C 4 7 7 1 と P i r B タンパク質 T I C 4 4 7 2 の複製から構成される。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 1 4 1 は P i r A タンパク質 T I C 7 5 7 5 と P i r B タンパク質 T I C 7 5 7 6 の複製から構成される。 P i r A B 融合タンパク質 T I C 1 1 1 4 2 は P i r A タンパク質 T I C 7 5 7 5 及び T I C 4 7 7 1 と P i r B タンパク質 T I C 4 7 7 2 とから構成さ

れる。PirAB融合タンパク質TIC11443は、PirAタンパク質TIC7660及びTIC7575とPirBタンパク質TIC7576とから構成される。PirAB融合タンパク質TIC11444は、PirAタンパク質TIC7575及びTIC7660とPirBタンパク質TIC7661とから構成される。PirAB融合タンパク質TIC11445は、PirAタンパク質TIC7660及びTIC7662とPirBタンパク質TIC7663とから構成される。PirAB融合タンパク質TIC11446は、PirAタンパク質TIC7662及びTIC7660とPirBタンパク質TIC7661とから構成される。細菌宿主細胞由来のTIC11442は半翅目害虫種、NBSBに対して活性を示した。細菌宿主細胞由来のTIC11444は鱗翅目種、SWCB及び半翅目種、NBSBに対して活性を示した。

10

【0228】

実施例に記載されているように、PirAB融合タンパク質TIC6880PL（配列番号49）、TIC9316（配列番号51）、TIC9317（配列番号53）、TIC9318（配列番号55）、TIC9320（配列番号57）、TIC9322（配列番号59）、TIC10376PL（配列番号146）、TIC10378PL（配列番号148）、TIC10380PL（配列番号150）、TIC10381PL（配列番号152）、TIC11103（配列番号154）、TIC11104（配列番号156）及びTIC11302（配列番号158）をコードする合成DNA配列は植物細胞での発現のために設計された。TIC9316、TIC9317、及びTIC9318を発現するバイナリー形質転換プラスミド構築物で形質転換したトウモロコシ植物は、害虫種である欧洲アワノメイガ及び南西部アワノメイガに対して活性を示した。

20

【0229】

植物細胞での発現については、PirAB融合タンパク質は、細胞質ゾルに存在するように発現させることができ、または植物細胞の種々の細胞小器官を標的とするように発現させることができる。例えば、タンパク質を葉緑体に対して標的指向化することは、オフ表現型の発生を防ぎながら、トランスジェニック植物で発現されるタンパク質のレベルの上昇を生じてもよい。標的指向化はまた、トランスジェニック事象における害虫耐性の有効性の増大も生じてもよい。標的ペプチドまたは輸送ペプチドは、核、ミトコンドリア、小胞体（ER）、葉緑体、アポプラスト、ペルオキシソーム及び原形質膜を含む細胞内の特定の領域へのタンパク質の輸送を指図する短い（3～70のアミノ酸長）ペプチド鎖である。一部の標的ペプチドはタンパク質が輸送された後、シグナルペプチダーゼによってタンパク質から切断される。葉緑体を標的とするために、タンパク質は約40～50アミノ酸である輸送ペプチドを含有する。葉緑体輸送ペプチドの使用の記載については、米国特許第5,188,642号及び同第5,728,925号を参照のこと。多くの葉緑体に局在するタンパク質は、核遺伝子から前駆体として発現され、葉緑体輸送ペプチド（CTP）によって葉緑体に標的指向化される。そのような単離された葉緑体タンパク質の例には、リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ、フェレドキシン、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、集光性複合タンパク質I及びタンパク質II、チオレドキシンF、エノールピルビルシキメートホスフェートシンターゼ（EPSPS）、及び米国特許第7,193,133号に記載されている輸送ペプチドの小サブユニット（SSU）に関連するものが挙げられるが、これらに限定されない。非葉緑体タンパク質は、異種CTPとのタンパク質融合を使用することによって葉緑体に標的指向化されてもよく、CTPは葉緑体に対してタンパク質を標的指向化するのに十分であることが生体内及び試験管内で実証されている。例えば、Arabidopsis thalianaのEPSPS CTP（CTP2）（Klee et al., Mol. Gen. 210: 437-442, 1987を参照のこと）またはPetunia hybrida EPSPS CTP（CTP4）（della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 6873-6877, 1986を参照のこと）のような好適な葉緑体輸送ペプチドの組みみは、トランスジェニック植物にて葉緑体に対して異種EPSPSタンパク質配列を標的指向化することが示されている（米国特許第5,627,061

30

40

50

号；同第5, 633, 435；号；及び同第5, 312, 910号；及びEP 0218571；EP 189707；EP 508909；及びEP 924299を参照のこと）。葉緑体に対してPir A B融合タンパク質の1つを標的指向化するために、葉緑体輸送ペプチドをコードする配列を、植物細胞での最適な発現のために設計されているPir A B融合タンパク質の1つをコードする合成コード配列に対して操作可能な連結且つインフレームで5'に配置する。

【0230】

Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質に関連する追加の毒素タンパク質配列は、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列を用いてアミノ酸配列レベルでの差異を新規アミノ酸配列変異体に統合し、変異体をコードする組換え核酸配列への適切な変更を行うことによって作り出すことができるが企図される。

【0231】

この開示はさらに、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質の改良された変異体が、当該技術分野で知られている種々の遺伝子編集法を使用することによって植物体において操作され得ることを企図する。ゲノム編集に使用されるそのような技術には、ZFN（ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、メガヌクレアーゼ、TALEN（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ）、及びCRISPR（クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート）/Cas（CRISPR関連）システムが挙げられるが、これらに限定されない。これらのゲノム編集法を用いて、植物細胞内で形質転換された毒素タンパク質コード配列を異なる毒素コード配列に変更することができる。具体的には、これらの方法を介して、新しいタンパク質アミノ酸配列を操作するために毒素コード配列内の1以上のコドンが変更される。あるいは、コード配列内の断片を置換するもしくは欠失させる、または追加のDNA断片をコード配列に挿入して、新しい毒素コード配列を操作する。新しいコード配列は、害虫に対する高い活性またはスペクトルのような新しい特性を持つ毒素タンパク質をコードすることができると共に、元の昆虫毒素タンパク質に対して耐性が発達している害虫種に対して活性を提供することができる。当該技術分野で既知の方法によって、遺伝子編集された毒素コード配列を含む植物細胞を用いて、新しい毒素タンパク質を発現する植物全体を生成することができる。

【0232】

Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質に類似するタンパク質は、当該技術分野で知られている種々のコンピューターに基づくアルゴリズムを用いて互いに比較することによって同定することができる。例えば、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質に関連するタンパク質のアミノ酸配列同一性は、次のデフォルトパラメーター：重量マトリクス：blossum、ギャップ開口ペナルティ：10.0、ギャップ拡張ペナルティ：0.05、親水性ギャップ：オン、親水性残基：GPSNDQERK、残基固有のギャップペナルティ：オンを用いたClustal W配列比較を用いて分析することができる（Thompson, et al. (1994) Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680）。アミノ酸同一性パーセントはさらに、100%に（アミノ酸同一性/対象タンパク質の長さ）を乗じた積によって算出される。他の配列比較アルゴリズムも当該技術分野で利用可能であり、Clustal W配列比較を用いて得られたものと同様の結果を提供する。

【0233】

鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の昆虫種に対して昆虫阻害活性を示すタンパク質は、そのようなクエリタンパク質とTIC7939との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%

10

20

30

40

50

、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 6 5 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 7 6 6 4 もしくは T I C 7 6 6 6 との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 1 0 0 % のアミノ酸同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 9 7 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 4 7 7 1 の配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 9 8 %、 9 9 %、 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 9 8 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 7 5 7 5、 T I C 7 6 6 0、 T I C 7 6 6 2、 T I C 7 6 6 8、 T I C 1 0 3 5 7、 T I C 1 0 3 5 8、 T I C 1 0 3 6 0、 T I C 1 0 3 6 1、 T I C 1 0 3 6 2、 T I C 1 0 3 6 4、 T I C 1 0 3 5 9、 または P i r A_A B E 6 8 8 7 8 との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で 1 0 0 % の同一性を示す場合、 P i r A タンパク質に関することが意図される。

10

【 0 2 3 4 】

鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の昆虫種に対して昆虫阻害活性を示すタンパク質は、そのようなクエリタンパク質と T I C 7 9 4 0 との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 6 5 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 4 7 7 2 との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % のアミノ酸同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 9 7 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 7 6 6 5、T I C 7 6 6 7、もしくは T I C 1 0 3 6 8 の配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 9 8 %、9 9 %、1 0 0 % のアミノ酸配列同一性またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 9 8 %～約 1 0 0 % のアミノ酸同一性を示す場合；または、そのようなクエリタンパク質と T I C 7 5 7 6、T I C 7 6 6 1、T I C 7 6 6 3、T I C 7 6 6 9、T I C 1 0 3 6 6、T I C 1 0 3 6 7、T I C 1 0 3 6 9、T I C 1 0 3 7 0、T I C 1 0 3 7 1、T I C 1 0 3 7 2、T I C 1 0 3 7 3、P i r B_A B E 6 8 8 7 9、T I C 1 1 5 1 0、または T I C 1 1 5 1 1 との配列比較が、クエリタンパク質と主題のタンパク質との間で 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を示す場合、P i r B タンパク質に関することが意図される。

20

【 0 2 3 5 】

鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の昆虫種に対して昆虫阻害活性を示すタンパク質は、そのようなクエリタンパク質と T I C 9 3 2 1、T I C 1 1 4 1 1、T I C 1 1 4 4 3、T I C 1 1 4 4 4、T I C 1 1 4 4 5、T I C 1 1 4 4 6、T I C 1 1 5 1 3との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも 6 5 %～約 1 0 0 %のアミノ酸同一性を示す場合；またはそのようなクエリタンパク質の T I C 1 0 4 3 4、T I C 1 1 4 4 0、もしくは T I C 1 1 4 4 2との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %

30

40

、 81%、 82%、 83%、 84%、 85%、 86%、 87%、 88%、 89%、 90%
 、 91%、 92%、 93%、 94%、 95%、 96%、 97%、 98%、 99%、 100%
 のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質
 の長さに沿って少なくとも70%～約100%のアミノ酸同一性を示す場合；またはその
 ようなクエリタンパク質のTIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9
 322、TIC9320、TIC10375、TIC10376、TIC10377、T
 IC10378、TIC10379、TIC10381、TIC11211、TIC11
 301、TIC11302、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10
 381PL、TIC11103、もしくはTIC11104との配列比較がクエリタンパ
 ク質と主題のタンパク質との間で約80%、81%、82%、83%、84%、85%、
 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、
 96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比
 率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも80%～約100%
 のアミノ酸同一性を示す場合；またはそのようなクエリタンパク質のTIC9319、T
 IC10380、TIC11210、TIC11212、もしくはTIC10380PL
 との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約82%、83%、84%
 、85%、86%、87%、88%、89%、90%、93%、94%、95%、96%
 、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任
 意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも82%～約100%のアミ
 ノ酸同一性を示す場合；またはそのようなクエリタンパク質のTIC6880もしくはT
 IC6880PLとの配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約86%
 、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%
 、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性（またはこの範囲の比率の任
 意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも86%～約100%のアミ
 ノ酸同一性を示す場合；またはそのようなクエリタンパク質のTIC11506またはT
 IC11512との配列比較がクエリタンパク質と主題のタンパク質との間で約94%、
 95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性（またはこの
 範囲の比率の任意の一部）であるクエリタンパク質の長さに沿って少なくとも94%～約
 100%のアミノ酸同一性を示す場合、PirAB融合タンパク質に関することが意図さ
 れる。
 10
 20
 30
 30

【0236】

例示的なPirAタンパク質、TIC4771、TIC7575、TIC7660、T
 IC7662、TIC7664、TIC7666、TIC7668、TIC7939、T
 IC10357、TIC10358、TIC10360、TIC10361、TIC10
 362、TIC10363、TIC10364、TIC10359、及びPirA_AB
 E68878は、ClustalWアルゴリズムを用いて互いに並べた。表4及び5に
 報告されているように、完全長タンパク質のそれについてのアミノ酸配列同一性パー
 セントのペアごとのマトリクスを作成した。

表4. PirAタンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC76 66 | TIC766 8 | PirA_ABE6 8878 | TIC103 60 | TIC76 60 | TIC103 61 | TIC76 62 | TIC103 64 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| TIC7666 | - | 94.7 | 92.5 | 85.7 | 51.1 | 48.1 | 48.1 | 49.6 |
| TIC7668 | 94.7 | - | 94 | 88.7 | 51.1 | 49.6 | 48.9 | 50.4 |
| PirA_ABE6 8878 | 89.1 | 90.6 | - | 81.2 | 47.8 | 46.4 | 47.1 | 48.6 |
| TIC10360 | 85.7 | 88.7 | 84.2 | - | 50.4 | 50.4 | 52.6 | 52.6 |
| TIC7660 | 48.2 | 48.2 | 46.8 | 47.5 | - | 93.6 | 75.2 | 71.6 |
| TIC10361 | 44.8 | 46.2 | 44.8 | 46.9 | 92.3 | - | 75.5 | 73.4 |
| TIC7662 | 45.4 | 46.1 | 46.1 | 49.6 | 75.2 | 76.6 | - | 85.1 |
| TIC10364 | 46.5 | 47.2 | 47.2 | 49.3 | 71.1 | 73.9 | 84.5 | - |
| TIC7575 | 43.3 | 45.4 | 44 | 47.5 | 72.3 | 73.8 | 87.2 | 83.7 |
| TIC4771 | 45.2 | 45.9 | 45.9 | 48.1 | 72.6% | 75.6 | 75.6 | 76.3 |
| TIC7664 | 45.2 | 45.9 | 45.9 | 48.9 | 70.4 | 71.9 | 74.1 | 74.1 |
| TIC10363 | 45.3 | 46 | 45.3 | 48.2 | 71.5 | 74.5 | 80.3 | 78.8 |
| TIC10359 | 47.4 | 48.9 | 47.4 | 51.1 | 71.9 | 71.9 | 74.1 | 72.6% |
| TIC7939 | 35.3 | 36.7 | 36 | 36.7 | 41.7 | 42.4 | 41.7 | 41.7 |
| TIC10358 | 40.3 | 41 | 41 | 40.3 | 36.8 | 38.2 | 39.6 | 37.5 |
| TIC10362 | 42.6 | 44.9% | 44.1 | 44.9% | 36.8 | 37.5 | 43.4 | 40.4 |
| TIC10357 | 23.7 | 23.7 | 22.8 | 24.6 | 21.9 | 22.8 | 26.3 | 25.4 |

10

20

30

40

50

表5. PirAタンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC76 66 | TIC76 68 | PirA_ABE68 878 | TIC103 60 | TIC76 60 | TIC103 61 | TIC76 62 | TIC103 64 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| TIC7666 | - | 94.7 | 92.5 | 85.7 | 51.1 | 48.1 | 48.1 | 49.6 |
| TIC7668 | 94.7 | - | 94 | 88.7 | 51.1 | 49.6 | 48.9 | 50.4 |
| PirA_ABE 68878 | 89.1 | 90.6 | - | 81.2 | 47.8 | 46.4 | 47.1 | 48.6 |
| TIC10360 | 85.7 | 88.7 | 84.2 | - | 50.4 | 50.4 | 52.6 | 52.6 |
| TIC7660 | 48.2 | 48.2 | 46.8 | 47.5 | - | 93.6 | 75.2 | 71.6 |
| TIC10361 | 44.8 | 46.2 | 44.8 | 46.9 | 92.3 | - | 75.5 | 73.4 |
| TIC7662 | 45.4 | 46.1 | 46.1 | 49.6 | 75.2 | 76.6 | - | 85.1 |
| TIC10364 | 46.5 | 47.2 | 47.2 | 49.3 | 71.1 | 73.9 | 84.5 | - |
| TIC7575 | 43.3 | 45.4 | 44 | 47.5 | 72.3 | 73.8 | 87.2 | 83.7 |
| TIC4771 | 45.2 | 45.9 | 45.9 | 48.1 | 72.6% | 75.6 | 75.6 | 76.3 |
| TIC7664 | 45.2 | 45.9 | 45.9 | 48.9 | 70.4 | 71.9 | 74.1 | 74.1 |
| TIC10363 | 45.3 | 46 | 45.3 | 48.2 | 71.5 | 74.5 | 80.3 | 78.8 |
| TIC10359 | 47.4 | 48.9 | 47.4 | 51.1 | 71.9 | 71.9 | 74.1 | 72.6% |
| TIC7939 | 35.3 | 36.7 | 36 | 36.7 | 41.7 | 42.4 | 41.7 | 41.7 |
| TIC10358 | 40.3 | 41 | 41 | 40.3 | 36.8 | 38.2 | 39.6 | 37.5 |
| TIC10362 | 42.6 | 44.9% | 44.1 | 44.9% | 36.8 | 37.5 | 43.4 | 40.4 |
| TIC10357 | 23.7 | 23.7 | 22.8 | 24.6 | 21.9 | 22.8 | 26.3 | 25.4 |

【0237】

例示的なPirBタンパク質、TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、TIC7667、TIC7669、及びTIC7940はClustal Wアルゴリズムを用いて互いに並べた。表6及び7に報告されているように、完全長タンパク質のアミノ酸配列同一性パーセントのペアごとのマトリクスを作成した。

10

20

30

40

50

表6. PirBタンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC7 667 | TIC7 669 | PirB_ABE 68879 | TIC1 0369 | TIC7 576 | TIC10 373 | TIC7 663 | TIC7 661 | TIC10 370 |
|---------------|-------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| TIC7667 | - | 95.5 | 93.6 | 93.3 | 49.6 | 48.7 | 49.6 | 48.9 | 49.4 |
| TIC7669 | 95.5 | - | 95.7 | 94.5 | 50.4 | 49.6 | 50.4 | 49.4 | 49.9 |
| PirB_ABE68879 | 93.6 | 95.7 | - | 94 | 50.1 | 49.2 | 50.8 | 49.2 | 49.9 |
| TIC10369 | 93.3 | 94.5 | 94 | - | 49.4 | 48.9 | 50.4 | 49.2 | 49.4 |
| TIC7576 | 48.9 | 49.6 | 49.4 | 48.7 | - | 94.8 | 90.6 | 87.5 | 89.9 |
| TIC10373 | 48 | 48.9 | 48.5 | 48.2 | 94.8 | - | 92.7 | 86.4 | 87.8 |
| TIC7663 | 48.9 | 49.6 | 50.1 | 49.6 | 90.6 | 92.7 | - | 84.2 | 86.1 |
| TIC7661 | 48.2 | 48.7 | 48.5 | 48.5 | 87.5 | 86.4 | 84.2 | - | 95.3 |
| TIC10370 | 48.7 | 49.2 | 49.2 | 48.7 | 89.9 | 87.8 | 86.1 | 95.3 | - |
| TIC10372 | 48.4 | 49.1 | 48.6 | 47.9 | 84.4 | 82.1 | 80.9 | 79.5 | 80.9 |
| TIC11510 | 47.1 | 47.1 | 47.6 | 47.6 | 79.5 | 79 | 79.7 | 77.2 | 78.3 |
| TIC11511 | 47.3 | 47.3 | 47.8 | 47.8 | 80 | 79.5 | 80.2 | 77.6 | 78.8 |
| TIC10368 | 47.6 | 47.6 | 48 | 48 | 80.2 | 79.7 | 80.4 | 77.9 | 79 |
| TIC11505 | 47 | 47 | 47.5 | 47.5 | 79.3 | 78.8 | 79.5 | 77 | 78.1 |
| TIC4772 | 47.2 | 47.9 | 47.9 | 47.2 | 79.7 | 78.5 | 79.7 | 76.2 | 78 |
| TIC7665 | 49 | 49.3 | 49.5 | 49.5 | 81.2 | 80.2 | 80.9 | 78.7 | 79.7 |
| TIC10367 | 41.7 | 42.4 | 42 | 42.7 | 43.2 | 42.7 | 43.6 | 42.7 | 43.2 |
| TIC10371 | 45.2 | 44.7 | 44.5 | 45 | 48.8 | 48.6 | 48.1 | 48.3 | 48.3 |
| TIC7940 | 37 | 38.2 | 37.7 | 37 | 41.5 | 42.5 | 43 | 41.8 | 42.2 |
| TIC10366 | 24.8 | 25.1 | 24.8 | 25.8 | 25.1 | 24.8 | 24.4 | 24.6 | 25.1 |

10

20

30

40

50

表7. PirBタンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC10 372 | TIC11 510 | TIC11 511 | TIC103 68 | TIC115 05 | TIC4 772 | TIC7 665 | TIC10 367 | TIC103 71 | TIC7 940 | TIC103 66 |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| TIC7667 | 49.6 | 48.2 | 48.4 | 48.7 | 48.7 | 48.2 | 48.4 | 41.5 | 44.9% | 37 | 25.3 |
| TIC7669 | 50.4 | 48.2 | 48.4 | 48.7 | 48.7 | 48.9 | 48.7 | 42.2 | 44.4 | 38.2 | 25.5 |
| PirB_ABE 68 879 | 49.9 | 48.7 | 48.9 | 49.2 | 49.2 | 48.9 | 48.9 | 41.8 | 44.2 | 37.7 | 25.3 |
| TIC10369 | 49.2 | 48.7 | 48.9 | 49.2 | 49.2 | 48.2 | 48.9 | 42.5 | 44.6 | 37 | 26.3 |
| TIC7576 | 85.4 | 80.2 | 80.7 | 80.9 | 80.9 | 80.2 | 79.1 | 42.4 | 47.8 | 40.9 | 25.2 |
| TIC10373 | 83.1 | 79.8 | 80.2 | 80.5 | 80.5 | 79.1 | 78.1 | 41.9 | 47.5 | 41.9 | 24.9 |
| TIC7663 | 81.9 | 80.5 | 80.9 | 81.2 | 81.2 | 80.2 | 78.8 | 42.8 | 47.1 | 42.4 | 24.5 |
| TIC7661 | 80.5 | 77.9 | 78.4 | 78.6 | 78.6 | 76.7 | 76.7 | 41.9 | 47.3 | 41.2 | 24.7 |
| TIC10370 | 81.9 | 79.1 | 79.5 | 79.8 | 79.8 | 78.6 | 77.6 | 42.4 | 47.3 | 41.6 | 25.2 |
| TIC10372 | - | 79.1 | 79.5 | 79.8 | 79.8 | 78.8 | 76.5 | 40.5 | 47.2 | 39.8 | 24.2 |
| TIC11510 | 79.3 | - | 99.5 | 99.3 | 99.3 | 86.5 | 81.6 | 42.2 | 46.4 | 41 | 24.5 |
| TIC11511 | 79.7 | 99.5 | - | 99.8 | 99.8 | 86.9 | 81.6 | 42.2 | 46.9 | 41 | 24.2 |
| TIC10368 | 80 | 99.3 | 99.8 | - | 100 | 87.2 | 81.8 | 42 | 46.6 | 41 | 24 |
| TIC11505 | 79 | 98.2 | 98.6 | 98.8 | - | 86.2 | 80.9 | 41.5 | 46.1 | 40.6 | 24 |
| TIC4772 | 79.2 | 86.7 | 87.1 | 87.4 | 87.4 | - | 80.8 | 42.5 | 47 | 41.8 | 24.5 |
| TIC7665 | 79.5 | 84.5 | 84.5 | 84.8 | 84.8 | 83.6 | - | 43 | 47.3 | 41.5 | 25.8 |
| TIC10367 | 41.7 | 43.4 | 43.4 | 43.2 | 43.2 | 43.6 | 42.7 | - | 5.76 | 35 | 22.1 |
| TIC10371 | 48.8 | 47.8 | 48.3 | 48.1 | 48.1 | 48.3 | 47.1 | 57.7 | - | 38.2 | 25.5 |
| TIC7940 | 40.8 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42.7 | 41.1 | 34.8 | 37.9 | - | 24.6 |
| TIC10366 | 24.4 | 24.6 | 24.4 | 24.1 | 24.4 | 24.6 | 25.1 | 21.5 | 24.8 | 24.1 | - |

10

20

30

40

【0238】

例示的なPirAB融合タンパク質TIC6880、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9322、TIC9320、TIC9321、TIC6880PL、TIC10375、TIC10376、TIC10377、TIC10378、TIC10379、TIC10380、TIC10381、TIC10434、TIC11210、TIC11211、TIC11212、TIC11301、TIC11302、TIC11440、TIC11441、TIC11442、TIC11443、TIC11444、TIC11445、TIC11446、TIC11506、TIC11512、TIC11513、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、及びTIC11104はCustom Wアルゴリズムを用いて互いに並べた。表8、9、10、及び11に報告されているように、完全長タンパク質のそれぞれについてアミノ酸配列同一性パーセントのペアごとのマトリクスが作成された。

50

表8. P i r A B 融合タンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC9 322 | TIC9 320 | TIC10 434 | TIC10 377 | TIC11 211 | TIC6 880 | TIC11 440 | TIC 688 0PL | TIC 114 42 | TIC 115 06 |
|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------------|------------------|------------------|
| TIC9322 | - | 95.3 | 93.3 | 91.5 | 87.3 | 47.8 | 47.8 | 47.8 | 47.8 | 48.7 |
| TIC9320 | 95.3 | - | 95.3 | 93.1 | 84.4 | 48.6 | 48.6 | 48.6 | 48.6 | 48.9 |
| TIC10434 | 92.5 | 94.4 | - | 90.8 | 82 | 48.1 | 48.1 | 48.1 | 48.1 | 48.8 |
| TIC10377 | 91.5 | 93.1 | 91.7 | - | 82.6 | 48 | 48 | 48 | 48 | 49.6 |
| TIC11211 | 86.1 | 83.2 | 81.6 | 81.4 | - | 52.7 | 52.7 | 52.9 | 52.7 | 53.4 |
| TIC6880 | 46.9 | 47.6 | 47.6 | 47.1 | 52.4 | - | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 85.3 |
| TIC11440 | 37.8 | 38.4 | 38.4 | 38 | 42.3 | 80.4 | - | 80.2 | 95.6 | 68.8 |
| TIC6880PL | 46.8 | 47.5 | 47.5 | 47 | 52.5 | 99.6 | 99.3 | - | 99.3 | 85.1 |
| TIC11442 | 37.5 | 38.1 | 38.1 | 37.6 | 41.9 | 79.7 | 94.7 | 79.5 | - | 68.2 |
| TIC11506 | 46.7 | 46.9 | 47.2 | 47.6 | 51.9 | 83.3 | 83.3 | 83.3 | 83.3 | - |
| TIC11513 | 46.9 | 47.1 | 47.5 | 47.8 | 52.2 | 83.9 | 83.9 | 83.9 | 83.9 | 99.8 |
| TIC11512 | 46.8 | 46.9 | 47.3 | 47.6 | 52 | 83.5 | 83.5 | 83.5 | 83.5 | 99.5 |
| TIC11210 | 47.2 | 47.7 | 47.6 | 48.3 | 55.5 | 81.1 | 81.1 | 81.1 | 81.1 | 84.7 |
| TIC11212 | 47.2 | 47.6 | 47.7 | 48.5 | 54.2 | 80.9 | 80.9 | 80.9 | 80.9 | 84.7 |
| TIC9319 | 47.7 | 48.1 | 48.3 | 48.8% | 54.3 | 83.2 | 83.2 | 83.1 | 83.2 | 82.5 |
| TIC10380 | 47.8 | 48.5 | 48 | 48.1 | 53.8 | 79.2 | 79.2 | 79 | 79.2 | 79.9 |
| TIC10380PL | 47.7 | 48.4 | 47.9 | 48.1 | 53.9 | 78.9 | 78.9 | 79.2 | 78.9 | 79.8 |
| TIC10381 | 47.4 | 48.3 | 48 | 48.1 | 52.7 | 78 | 78 | 78 | 78 | 84.8 |
| TIC10381PL | 47.4 | 48.2 | 47.9 | 48.1 | 52.6 | 77.8 | 77.8 | 77.8 | 77.8 | 84.5 |
| TIC9318 | 47.5 | 48.2 | 48.6 | 48.9 | 54.4 | 78.4 | 78.4 | 78.4 | 78.4 | 81.8 |
| TIC11445 | 38 | 38.6 | 38.9 | 39.2 | 43.6 | 62.8 | 76.5 | 62.8 | 77.2 | -65.5 |
| TIC9316 | 47.5 | 48.4 | 47.9 | 48.1 | 56 | 79 | 79 | 79 | 79 | 81.3 |
| TIC11441 | 38 | 38.8 | 38.3 | 38.5 | 44.8 | 63.2 | 77.8 | 63.2 | 82.9 | 65.1 |
| TIC11302 | 48.1 | 48.8% | 48.1 | 48.1 | 52.3 | 77.7 | 77.7 | 77.7 | 77.7 | 78.3 |
| TIC11443 | 38.5 | 39 | 38.5 | 38.5 | 41.9 | 62.2 | 62.2 | 62.2 | 62.2 | 62.7 |
| TIC9317 | 47.5 | 48.1 | 47.3 | 47.9 | 51.6 | 75.4 | 75.4 | 75.4 | 75.4 | 76.9 |
| TIC11446 | 38 | 38.5 | 37.9 | 38.3 | 41.3 | 60.4 | 74.8 | 60.4 | 77.5 | 61.5 |
| TIC11444 | 38 | 38.5 | 37.9 | 38.3 | 41.3 | 60.4 | 75 | 60.4 | 80.1 | 61.5 |
| TIC11301 | 46.8 | 47.5 | 47 | 47.7 | 54.9 | 76.5 | 76.5 | 76.5 | 76.5 | 80 |
| TIC10378 | 47.7 | 48.6 | 48.1 | 48.4 | 51.8 | 76.9 | 76.9 | 76.9 | 76.9 | 78 |
| TIC10378PL | 47.6 | 48.5 | 48 | 48.3 | 51.7 | 76.8 | 76.8 | 76.8 | 76.8 | 77.7 |
| TIC11103 | 36.2 | 36.6 | 36.4 | 36.4 | 36.2 | 58.1 | 58.1 | 58.1 | 58.1 | 59 |
| TIC11104 | 36.7 | 37.3 | 37.6 | 37.3 | 36.7 | 60.1 | 60.1 | 60.1 | 60.1 | 60.6 |
| TIC10376 | 41.2 | 41.9 | 41.5 | 41.9 | 40.8 | 41.9 | 41.9 | 41.9 | 41.9 | 41.5 |
| TIC10376PL | 41.1 | 41.8 | 41.5 | 41.8 | 40.7 | 41.8 | 41.8 | 41.8 | 41.8 | 41.5 |
| TIC10379 | 43.7 | 43.7 | 43.7 | 43.5 | 43.1 | 46.2 | 46.2 | 46.2 | 46.2 | 46.6 |
| TIC9321 | 36.4 | 37.5 | 37.3 | 36.2 | 37.6 | 42.1 | 42.1 | 42.1 | 42.1 | 41.2 |
| TIC10375 | 24.4 | 24.6 | 24.2 | 25.3 | 24.2 | 23.7 | 23.7 | 23.7 | 23.7 | 23.3 |

10

20

30

40

50

表9. P i r A B 融合タンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC513 | TIC512 | TIC210 | TIC212 | TIC319 | TIC1380 | TIC0380 | TIC103 | TIC103 | TIC81PL | TIC9318 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| TIC9322 | 48.6 | 48.4 | 47.5 | 47.5 | 47.5 | 49.1 | 49.1 | 48.7 | 48.7 | 48.7 | 48.7 |
| TIC9320 | 48.7 | 48.6 | 48 | 47.8 | 47.8 | 49.8 | 49.8 | 49.6 | 49.6 | 49.6 | 49.5 |
| TIC10434 | 48.7 | 48.5 | 47.4 | 47.6 | 47.6 | 48.8 | 48.8 | 48.8 | 48.8 | 48.8 | 49.4 |
| TIC10377 | 49.5 | 49.3 | 48.6 | 48.7 | 48.6 | 49.5 | 49.5 | 49.5 | 49.5 | 49.5 | 50.2 |
| TIC11211 | 53.2 | 53 | 55 | 53.8 | 53.2 | 54.5 | 54.6 | 53.4 | 53.4 | 55 | |
| TIC6880 | 85.1 | 84.7 | 79.9 | 79.8 | 81.2 | 79.8 | 79.6 | 78.5 | 78.5 | 78.9 | |
| TIC11440 | 68.6 | 68.3 | 64.5 | 64.3 | 65.5 | 64.3 | 64.2 | 63.3 | 63.3 | 63.6 | |
| TIC6880PL | 84.9 | 84.6 | 79.8 | 79.6 | 80.9 | 79.4 | 79.8 | 78.4 | 78.4 | 78.7 | |
| TIC11442 | 68 | 67.8 | 63.9 | 63.8 | 64.9 | 63.8 | 63.6 | 62.8 | 62.8 | 63.1 | |
| TIC11506 | 99 | 98.6 | 81.6 | 81.6 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 83.5 | 83.3 | 80.4 | |
| TIC11513 | - | 99.6 | 82.1 | 82.1 | 79.2 | 79.2 | 79.2 | 84.1 | 83.9 | 80.9 | |
| TIC11512 | 99.6 | - | 82.1 | 82.1 | 79.2 | 78.8 | 78.8 | 83.7 | 83.5 | 80.6 | |
| TIC11210 | 84.5 | 84.5 | - | 96.8 | 93.2 | 79.1 | 79.1 | 80.9 | 80.7 | 82.2 | |
| TIC11212 | 84.5 | 84.5 | 96.8 | - | 92.8 | 79.3 | 79.3 | 80.9 | 80.7 | 85.2 | |
| TIC9319 | 82.3 | 82.3 | 94.2 | 93.8 | - | 79.4 | 79.2 | 78.7 | 78.7 | 79.2 | |
| TIC10380 | 79.7 | 79.4 | 77.4 | 77.6 | 76.9 | - | 99.8 | 81.7 | 81.7 | 81.1 | |
| TIC10380PL | 79.6 | 79.2 | 77.3 | 77.5 | 76.6 | 99.6 | - | 81.5 | 81.5 | 81 | |
| TIC10381 | 84.7 | 84.3 | 79.2 | 79.2 | 76.2 | 81.7 | 81.7 | - | 99.8 | 90.7 | |
| TIC10381PL | 84.3 | 84 | 78.9 | 78.9 | 76.1 | 81.5 | 81.5 | 99.6 | - | 90.3 | |
| TIC9318 | 81.6 | 81.3 | 80.6 | 83.6 | 76.9 | 81.3 | 81.3 | 90.8 | 90.6 | - | |
| TIC11445 | 65.3 | 65.1 | 64.5 | 66.9 | 61.5 | 65.1 | 65.1 | 72.7 | 72.6 | 80.1 | |
| TIC9316 | 81.1 | 80.7 | 83.4 | 80.4 | 77.2 | 83.7 | 83.7 | 92 | 91.9 | 89.8 | |
| TIC11441 | 64.9 | 64.6 | 66.8 | 64.4 | 61.8 | 67 | 67 | 73.7 | 73.6 | 71.9 | |
| TIC11302 | 78.1 | 77.7 | 77.2 | 77.7 | 76.1 | 81.6 | 81.6 | 89 | 88.9 | 86.7 | |
| TIC11443 | 62.5 | 62.2 | 61.8 | 62.2 | 61 | 65.3 | 65.3 | 71.3 | 71.1 | 69.4 | |
| TIC9317 | 76.7 | 76.3 | 75.8 | 76.1 | 74.4 | 77.9 | 77.9 | 82.7 | 82.5 | 82 | |
| TIC11446 | 61.4 | 61.1 | 60.7 | 61 | 59.5 | 62.4 | 62.4 | 66.2 | 66.1 | 65.6 | |
| TIC11444 | 61.4 | 61.1 | 60.7 | 61 | 59.5 | 62.4 | 62.4 | 66.2 | 66.1 | 65.6 | |
| TIC11301 | 79.9 | 79.5 | 82.3 | 79.2 | 75.6 | 79.9 | 79.9 | 85.9 | 85.7 | 84.8 | |
| TIC10378 | 77.8 | 77.5 | 76.6 | 76.9 | 75.4 | 79.4 | 79.4 | 84.3 | 84.2 | 83.5 | |
| TIC10378PL | 77.5 | 77.2 | 76.3 | 76.6 | 75.2 | 79.3 | 79.3 | 84 | 84.4 | 83.1 | |
| TIC11103 | 58.8 | 58.5 | 57.4 | 57.4 | 57.4 | 60.4 | 60.4 | 64.8 | 64.8 | 63.3 | |
| TIC11104 | 60.4 | 60.1 | 59 | 59 | 59 | 61.5 | 61.5 | 69.6 | 69.6 | 75.1 | |
| TIC10376 | 41.7 | 41.7 | 41.4 | 41.7 | 40.8 | 40.6 | 40.6 | 41.5 | 41.5 | 42.8 | |
| TIC10376PL | 41.6 | 41.6 | 41.3 | 41.6 | 40.7 | 40.6 | 40.6 | 41.5 | 41.5 | 42.7 | |
| TIC10379 | 46.7 | 46.4 | 45.5 | 46.6 | 45.3 | 47.1 | 47.1 | 46.9 | 46.7 | 47.3 | |
| TIC9321 | 41.2 | 41.2 | 40.3 | 40.9 | 40.9 | 41 | 41 | 41.9 | 41.9 | 42.5 | |
| TIC10375 | 23.5 | 23.7 | 24.6 | 24.6 | 25 | 24.2 | 24.2 | 24.2 | 24.2 | 24 | |

10

20

30

40

50

表10. P i r A B 融合タンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC11 445 | TIC9 316 | TIC11 441 | TIC11 302 | TIC11 443 | TIC93 17 | TIC11 446 | TIC11 444 | TIC11 301 |
|------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| TIC9322 | 48.7 | 48.7 | 48.7 | 49.3 | 49.3 | 48.7 | 48.7 | 48.7 | 48 |
| TIC9320 | 49.5 | 49.6 | 49.6 | 50 | 50 | 49.3 | 49.3 | 49.3 | 48.7 |
| TIC10434 | 49.4 | 48.7 | 48.7 | 48.8 | 48.8 | 48.1 | 48.1 | 48.1 | 47.8 |
| TIC10377 | 50.2 | 49.3 | 49.3 | 49.3 | 49.3 | 49.1 | 49.1 | 49.1 | 48.9 |
| TIC11211 | 55 | 56.6 | 56.6 | 52.9 | 52.9 | 52.1 | 52.1 | 52.1 | 55.5 |
| TIC6880 | 78.9 | 79.4 | 79.4 | 78.2 | 78.2 | 75.8 | 75.8 | 75.8 | 76.9 |
| TIC11440 | 77.5 | 64 | 78.8 | 63 | 63 | 61.2 | 75.8 | 75.9 | 62 |
| TIC6880PL | 78.7 | 79.3 | 79.3 | 78 | 78 | 75.7 | 75.7 | 75.7 | 76.8 |
| TIC11442 | 77.6 | 63.5 | 83.2 | 62.5 | 62.5 | 60.7 | 77.8 | 80.4 | 61.5 |
| TIC11506 | 80.4 | 79.9 | 79.9 | 76.9 | 76.9 | 75.5 | 75.5 | 75.5 | 78.6 |
| TIC11513 | 80.9 | 80.4 | 80.4 | 77.4 | 77.4 | 76 | 76 | 76 | 79.2 |
| TIC11512 | 80.6 | 80 | 80 | 77.1 | 77.1 | 75.7 | 75.7 | 75.7 | 78.8 |
| TIC11210 | 82.2 | 85 | 85 | 78.7 | 78.7 | 77.3 | 77.3 | 77.3 | 84 |
| TIC11212 | 85.2 | 82 | 82 | 79.3 | 79.3 | 77.7 | 77.7 | 77.7 | 80.7 |
| TIC9319 | 79.2 | 79.6 | 79.6 | 78.5 | 78.5 | 76.7 | 76.7 | 76.7 | 78 |
| TIC10380 | 81.1 | 83.6 | 83.6 | 81.5 | 81.5 | 77.8 | 77.8 | 77.8 | 79.7 |
| TIC10380PL | 81 | 83.5 | 83.5 | 81.3 | 81.3 | 77.6 | 77.6 | 77.6 | 79.6 |
| TIC10381 | 90.7 | 91.9 | 91.9 | 88.9 | 88.9 | 82.5 | 82.5 | 82.5 | 85.7 |
| TIC10381PL | 90.3 | 91.5 | 91.5 | 88.6 | 88.6 | 82.2 | 82.2 | 82.2 | 85.4 |
| TIC9318 | 100 | 89.8 | 89.8 | 86.7 | 86.7 | 82 | 82 | 82 | 84.8 |
| TIC11445 | - | 71.9 | 86.6 | 69.4 | 69.4 | 65.6 | 80.6 | 80.3 | 67.9 |
| TIC9316 | 89.8 | - | 100 | 93.5 | 93.5 | 83.9 | 83.9 | 83.9 | 90.1 |
| TIC11441 | 86.6 | 80.1 | - | 74.8 | 74.8 | 67.2 | 84.6 | 87.1 | 72.1 |
| TIC11302 | 86.7 | 93.5 | 93.5 | - | 100 | 90.1 | 90.1 | 90.1 | 83.9 |
| TIC11443 | 69.4 | 74.8 | 74.8 | 80.1 | - | 72.1 | 72.1 | 72.1 | 67.2 |
| TIC9317 | 82 | 83.9 | 83.9 | 90.1 | 90.1 | - | 100 | 100 | 93.5 |
| TIC11446 | 80.6 | 67.2 | 84.6 | 72.1 | 72.1 | 80.1 | - | 97.5 | 74.8 |
| TIC11444 | 80.3 | 67.2 | 87.1 | 72.1 | 72.1 | 80.1 | 97.5 | - | 74.8 |
| TIC11301 | 84.8 | 90.1 | 90.1 | 83.9 | 83.9 | 93.5 | 93.5 | 93.5 | - |
| TIC10378 | 83.5 | 85.7 | 85.7 | 90.3 | 90.3 | 94.4 | 94.4 | 94.4 | 90 |
| TIC10378PL | 83.1 | 85.4 | 85.4 | 90 | 90 | 94 | 94 | 94 | 89.6 |
| TIC11103 | 63.3 | 65.7 | 65.7 | 65.7 | 65.7 | 75.1 | 75.1 | 75.1 | 75.1 |
| TIC11104 | 75.1 | 68 | 68 | 68 | 68 | 63.3 | 63.3 | 63.3 | 63.3 |
| TIC10376 | 42.8 | 42.1 | 42.1 | 41.7 | 41.7 | 41.4 | 41.4 | 41.4 | 41.7 |
| TIC10376PL | 42.7 | 42 | 42 | 41.6 | 41.6 | 41.3 | 41.3 | 41.3 | 41.6 |

10

20

30

40

| 配列 | TIC11 445 | TIC9 316 | TIC11 441 | TIC11 302 | TIC11 443 | TIC93 17 | TIC11 446 | TIC11 444 | TIC11 301 |
|----------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| TIC10379 | 47.3 | 46.9 | 46.9 | 46 | 46 | 45.7 | 45.7 | 45.7 | 46.4 |
| TIC9321 | 42.5 | 40.9 | 40.9 | 41.2 | 41.2 | 41.4 | 41.4 | 41.4 | 41 |
| TIC10375 | 24 | 24.6 | 24.6 | 24 | 24 | 23.7 | 23.7 | 23.7 | 24.2 |

50

表 11. P i r A B 融合タンパク質のペアごとのマトリクス表示。

| 配列 | TIC10 378 | TIC103 78PL | TIC11 103 | TIC11 104 | TIC10 376 | TIC103 76PL | TIC10 379 | TIC9 321 | TIC10 375 |
|------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|-------------|--------------|
| TIC9322 | 49.1 | 49.1 | 37.1 | 37.7 | 41.8 | 41.8 | 43.7 | 36.8 | 23.9 |
| TIC9320 | 50 | 50 | 37.5 | 38.2 | 42.6 | 42.6 | 43.7 | 37.9 | 24.1 |
| TIC10434 | 49 | 49 | 37 | 38.2 | 41.8 | 41.8 | 43.3 | 37.3 | 23.5 |
| TIC10377 | 49.8 | 49.8 | 37.3 | 38.2 | 42.6 | 42.6 | 43.5 | 36.6 | 24.8 |
| TIC11211 | 52.5 | 52.5 | 36.6 | 37.1 | 40.9 | 40.9 | 42.5 | 37.5 | 23.4 |
| TIC6880 | 77.6 | 77.6 | 58.4 | 60.4 | 41.7 | 41.7 | 45.3 | 41.7 | 22.7 |
| TIC11440 | 62.6 | 62.6 | 47.1 | 48.7 | 33.7 | 33.7 | 36.5 | 33.7 | 18.3 |
| TIC6880PL | 77.5 | 77.5 | 5.83 | 60.3 | 41.7 | 41.7 | 45.2 | 41.7 | 22.7 |
| TIC11442 | 62.1 | 62.1 | 46.7 | 48.3 | 33.4 | 33.4 | 36.2 | 33.4 | 18.2 |
| TIC11506 | 76.9 | 76.7 | 58 | 59.5 | 40.5 | 40.5 | 44.6 | 39.9 | 21.9 |
| TIC11513 | 77.4 | 77.2 | 58.3 | 59.9 | 41 | 41 | 45.2 | 40.3 | 22.2 |
| TIC11512 | 77.1 | 76.9 | 58 | 59.5 | 41 | 41 | 44.8 | 40.3 | 22.4 |
| TIC11210 | 78.4 | 78.2 | 58.6 | 60.2 | 41.8 | 41.8 | 45.2 | 40.5 | 24 |
| TIC11212 | 78.7 | 78.6 | 58.6 | 60.2 | 42.2 | 42.2 | 46.3 | 41.1 | 24 |
| TIC9319 | 78 | 78 | 59.2 | 60.8 | 41.7 | 41.7 | 45.5 | 41.5 | 24.6 |
| TIC10380 | 79.5 | 79.5 | 60.3 | 61.4 | 40.2 | 40.2 | 45.9 | 40.4 | 23.1 |
| TIC10380PL | 79.4 | 79.4 | 60.2 | 61.3 | 40.1 | 40.1 | 45.8 | 40.3 | 23.1 |
| TIC10381 | 84.5 | 84.3 | 64.7 | 69.5 | 41.1 | 41.1 | 45.7 | 41.3 | 23.1 |
| TIC10381PL | 84.2 | 84.5 | 64.6 | 69.4 | 41 | 41 | 45.4 | 41.2 | 23.1 |
| TIC9318 | 83.7 | 83.6 | 63.3 | 75.1 | 42.4 | 42.4 | 46.1 | 41.9 | 23 |
| TIC11445 | 67 | 66.9 | 50.6 | 60.1 | 33.9 | 33.9 | 36.9 | 33.5 | 18.4 |
| TIC9316 | 86 | 85.9 | 65.7 | 68 | 41.7 | 41.7 | 45.8 | 40.3 | 23.5 |
| TIC11441 | 68.9 | 68.7 | 52.6 | 54.5 | 33.4 | 33.4 | 36.6 | 32.2 | 18.8 |
| TIC11302 | 90.6 | 90.5 | 65.7 | 68 | 41.3 | 41.3 | 44.9% | 40.6 | 23 |
| TIC11443 | 72.6 | 72.4 | 52.6 | 54.5 | 33.1 | 33.1 | 35.9 | 32.5 | 18.4 |
| TIC9317 | 94.7 | 94.5 | 75.1 | 63.3 | 41 | 41 | 44.5 | 40.8 | 22.6 |
| TIC11446 | 75.8 | 75.7 | 60.1 | 50.6 | 32.8 | 32.8 | 35.6 | 32.7 | 18.1 |
| TIC11444 | 75.8 | 75.7 | 60.1 | 50.6 | 32.8 | 32.8 | 35.6 | 32.7 | 18.1 |
| TIC11301 | 90.3 | 90.1 | 75.1 | 63.3 | 41.3 | 41.3 | 45.2 | 40.5 | 23.1 |
| TIC10378 | - | 99.8 | 71.3 | 64.4 | 41.5 | 41.5 | 44.5 | 41.4 | 23.1 |
| TIC10378PL | 99.6 | - | 71.2 | 64.3 | 41.5 | 41.5 | 44.3 | 41.3 | 23 |
| TIC11103 | 71.6 | 71.6 | - | 82 | 31.6 | 31.6 | 35.7 | 30.9 | 18.4 |
| TIC11104 | 64.7 | 64.7 | 82 | - | 32.3 | 32.3 | 35.5 | 31.8 | 18.2 |
| TIC10376 | 42.1 | 42.1 | 31.9 | 32.6 | - | 99.8 | 54.9 | 34.8 | 21.6 |
| TIC10376PL | 42 | 42 | 31.9 | 32.6 | 99.6 | - | 54.8 | 34.7 | 21.5 |

| 配列 | TIC10 378 | TIC103 78PL | TIC11 103 | TIC11 104 | TIC10 376 | TIC103 76PL | TIC10 379 | TIC9 321 | TIC10 375 |
|----------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|-------------|--------------|
| TIC10379 | 45.8 | 45.7 | 36.6 | 36.4 | 55.8 | 55.8 | - | 37.1 | 24.5 |
| TIC9321 | 42.1 | 42.1 | 31.4 | 32.3 | 34.9 | 34.9 | 36.7 | - | 22 |
| TIC10375 | 24.2 | 24.2 | 19.2 | 19 | 22.4 | 22.4 | 25 | 22.7 | - |

同一性パーセントに加えて、Pir A タンパク質、Pir B タンパク質、及び Pir A B 融合タンパク質は、一次構造（保存されたアミノ酸モチーフ）によって、長さ（Pir A については約 133 ~ 約 141 アミノ酸、Pir B については約 414 ~ 約 428 アミノ酸、Pir A B 融合タンパク質については約 549 ~ 約 566 アミノ酸）によって、及びその他の特性によって関連付けることができる。Pir A タンパク質、Pir B タンパク質、及び Pir A B 融合タンパク質の特性を表 12 で報告する。

表 12. Pir A タンパク質、Pir B タンパク質、及び Pir A B タンパク質の選択された特性。

| タンパク質 | 分子量 (ダルトン) | アミノ酸の長さ | 等電点 | PH 7.0 での電荷 | 強塩基性 (-) アミノ酸の数 | 強酸性アミノ酸の数 | 疎水性アミノ酸の数 | 極性アミノ酸の数 |
|------------|------------|---------|--------|-------------|-----------------|-----------|-----------|----------|
| TIC4771 | 14963.57 | 135 | 5.6164 | -1.5 | 14 | 14 | 65 | 70 |
| TIC4772 | 48146.05 | 428 | 4.5643 | -16.0 | 41 | 53 | 216 | 212 |
| TIC6880 | 63092.59 | 563 | 4.6836 | -17.5 | 55 | 67 | 281 | 282 |
| TIC6880PL | 63163.67 | 564 | 4.6836 | -17.5 | 55 | 67 | 282 | 282 |
| TIC7575 | 15655.22 | 141 | 5.0636 | 2.0 | 12 | 13 | 68 | 73 |
| TIC7576 | 47775.12 | 425 | 4.7039 | -12.5 | 44 | 53 | 221 | 204 |
| TIC9316 | 63412.32 | 566 | 4.7572 | -14.5 | 56 | 66 | 289 | 277 |
| TIC7660 | 15352.83 | 141 | 4.5839 | -4.0 | 11 | 14 | 72 | 69 |
| TIC7661 | 47774.39 | 425 | 4.7572 | -5.5 | 50 | 51 | 222 | 203 |
| TIC9317 | 63109.20 | 566 | 5.1542 | -9.5 | 61 | 65 | 294 | 272 |
| TIC7662 | 15761.42 | 141 | 4.6130 | 3.5 | 11 | 14 | 68 | 73 |
| TIC7663 | 47895.35 | 425 | 5.0745 | -7.5 | 48 | 52 | 221 | 204 |
| TIC9318 | 63638.76 | 566 | 4.9378 | -11.0 | 59 | 66 | 289 | 277 |
| TIC7664 | 14950.65 | 135 | 5.0636 | -2.0 | 12 | 13 | 68 | 67 |
| TIC7665 | 46819.71 | 414 | 4.6887 | -12.5 | 43 | 52 | 214 | 200 |
| TIC9319 | 61752.34 | 549 | 4.7452 | -14.5 | 55 | 65 | 282 | 267 |
| TIC7666 | 14751.43 | 133 | 4.6137 | -4.0 | 12 | 15 | 68 | 65 |
| TIC7667 | 46246.08 | 419 | 5.4603 | -5.5 | 50 | 51 | 220 | 199 |
| TIC9322 | 60979.49 | 552 | 5.1485 | -9.5 | 62 | 66 | 288 | 264 |
| TIC7668 | 14785.54 | 133 | 5.1215 | -2.5 | 14 | 15 | 68 | 65 |
| TIC7669 | 46249.04 | 419 | 5.3001 | -6.5 | 50 | 52 | 222 | 197 |
| TIC9320 | 61016.56 | 552 | 5.2518 | -9.0 | 64 | 67 | 290 | 262 |
| TIC7939 | 15470.32 | 139 | 6.2480 | -0.5 | 15 | 14 | 70 | 69 |
| TIC7940 | 47493.26 | 419 | 4.8783 | -11.0 | 53 | 60 | 218 | 201 |
| TIC9321 | 62945.57 | 558 | 5.0432 | -11.5 | 68 | 74 | 288 | 270 |
| TIC10357 | 12838.48 | 114 | 4.7910 | -3.0 | 11 | 13 | 68 | 46 |
| TIC10366 | 47691.61 | 427 | 4.3657 | 22.0 | 43 | 62 | 221 | 206 |
| TIC10375 | 60512.07 | 541 | 4.4263 | -25.0 | 54 | 75 | 289 | 252 |
| TIC10358 | 16198.29 | 144 | 7.7512 | 1.5 | 20 | 17 | 68 | 76 |
| TIC10367 | 47147.69 | 417 | 7.7679 | 5.5 | 60 | 49 | 222 | 195 |
| TIC10376 | 63327.96 | 561 | 7.8092 | 7.0 | 80 | 66 | 290 | 271 |
| TIC10376PL | 63399.04 | 562 | 7.8092 | 7.0 | 80 | 66 | 291 | 271 |

10

20

30

40

50

| タンパク質 | 分子量 (ダルトン) | アミノ酸の長さ | 等電点 | P H 7.0 での電荷 | 強塩基性 (-) アミノ酸の数 | 強酸性アミノ酸の数 | 疎水性アミノ酸の数 | 極性アミノ酸の数 |
|---------------|------------|---------|--------|--------------|-----------------|-----------|-----------|----------|
| TIC10360 | 14976.76 | 133 | 4.8490 | -2.5 | 14 | 16 | 64 | 69 |
| TIC10369 | 46322.33 | 419 | 5.6804 | -4.0 | 50 | 50 | 224 | 195 |
| TIC10377 | 61281.07 | 552 | 5.3889 | -6.5 | 64 | 66 | 288 | 264 |
| TIC10361 | 15629.20 | 143 | 4.7632 | -3.0 | 11 | 13 | 71 | 72 |
| TIC10370 | 47710.32 | 425 | 5.0742 | -8.0 | 48 | 52 | 225 | 200 |
| TIC10378 | 63321.51 | 568 | 4.9947 | -11.0 | 59 | 65 | 296 | 272 |
| TIC10378PL | 63392.59 | 5.69 | 4.9947 | -11.0 | 59 | 65 | 297 | 272 |
| TIC10362 | 15173.94 | 136 | 5.1440 | -1.5 | 13 | 14 | 62 | 74 |
| TIC10371 | 46947.97 | 416 | 5.8572 | -3.5 | 47 | 46 | 218 | 198 |
| TIC10379 | 62103.90 | 552 | 5.6801 | -5.0 | 60 | 60 | 280 | 272 |
| TIC10363 | 15195.80 | 137 | 4.7774 | -3.0 | 11 | 13 | 67 | 70 |
| TIC10372 | 48400.97 | 430 | 4.7717 | -11.0 | 45 | 53 | 229 | 201 |
| TIC10380 | 63578.76 | 567 | 4.7697 | -14.0 | 56 | 66 | 296 | 271 |
| TIC10380PL | 63649.84 | 568 | 4.7697 | -14.0 | 56 | 66 | 297 | 271 |
| TIC10364 | 15833.53 | 142 | 4.4792 | -5.0 | 11 | 15 | 72 | 70 |
| TIC10373 | 47791.02 | 425 | 4.7003 | -12.5 | 44 | 53 | 220 | 205 |
| TIC10381 | 63606.54 | 567 | 4.6406 | -17.5 | 55 | 68 | 292 | 275 |
| TIC10381PL | 63677.62 | 568 | 4.6406 | -17.5 | 55 | 68 | 293 | 275 |
| TIC10359 | 14949.54 | 135 | 4.7873 | -3.5 | 12 | 14 | 68 | 67 |
| TIC10368 | 48194.25 | 429 | 4.7481 | -11.5 | 43 | 51 | 219 | 210 |
| PirA_ABE68878 | 15303.18 | 138 | 6.2470 | -5.0 | 15 | 14 | 71 | 67 |
| PirB_ABE68879 | 46424.34 | 419 | 5.2938 | -6.5 | 50 | 52 | 224 | 195 |
| TIC10434 | 61709.50 | 557 | 5.4906 | -7.0 | 65 | 66 | 295 | 262 |
| TIC11103 | 63109.20 | 566 | 5.1542 | -9.5 | 61 | 65 | 294 | 272 |
| TIC11104 | 63638.76 | 566 | 4.9378 | -11.0 | 59 | 66 | 289 | 277 |
| TIC11210 | 62456.91 | 555 | 4.7452 | -14.5 | 55 | 65 | 282 | 273 |
| TIC11211 | 61883.28 | 560 | 5.3591 | -7.5 | 62 | 64 | 288 | 272 |
| TIC11212 | 62563.12 | 555 | 4.6679 | -16.0 | 54 | 66 | 282 | 273 |
| TIC11301 | 63411.60 | 566 | 5.3685 | -7.5 | 62 | 64 | 290 | 276 |
| TIC11302 | 63109.93 | 566 | 4.6735 | -16.5 | 55 | 67 | 293 | 273 |
| TIC11440 | 78037.15 | 698 | 4.7751 | -19.0 | 69 | 81 | 346 | 352 |
| TIC11441 | 79049.52 | 707 | 4.7960 | -16.5 | 68 | 79 | 357 | 350 |

10

20

30

40

50

| タンパク質 | 分子量 (ダルトン) | アミノ酸の長さ | 等電点 | P H 7.0での電荷 | 強塩基性 (-) アミノ酸の数 | 強酸性アミノ酸の数 | 疎水性アミノ酸の数 | 極性アミノ酸の数 |
|----------|------------|---------|--------|-------------|-----------------|-----------|-----------|----------|
| TIC11442 | 78728.81 | 704 | 4.7287 | 19.5 | 67 | 80 | 349 | 355 |
| TIC11443 | 78747.13 | 707 | 4.7204 | 18.5 | 67 | 80 | 361 | 346 |
| TIC11444 | 78746.41 | 707 | 5.1362 | -11.5 | 73 | 78 | 362 | 345 |
| TIC11445 | 78973.57 | 707 | 4.8575 | -15.0 | 70 | 80 | 361 | 346 |
| TIC11446 | 78852.61 | 707 | 5.0123 | -13.0 | 72 | 79 | 362 | 345 |
| TIC10364 | 15833.53 | 142 | 4.4792 | -5.0 | 11 | 15 | 72 | 70 |
| TIC11505 | 48750.86 | 434 | 4.6998 | -12.5 | 43 | 52 | 221 | 213 |
| TIC11506 | 64566.38 | 576 | 4.6400 | -17.5 | 54 | 67 | 293 | 283 |
| TIC11510 | 48184.21 | 429 | 4.7481 | -11.5 | 43 | 51 | 218 | 211 |
| TIC11512 | 63999.72 | 571 | 4.6730 | -16.5 | 54 | 66 | 290 | 281 |
| TIC11511 | 48208.27 | 429 | 4.7481 | -11.5 | 43 | 51 | 219 | 210 |
| TIC11513 | 64023.79 | 571 | 4.6730 | -16.5 | 54 | 66 | 291 | 280 |

【0240】

本出願の実施例でさらに記載されているように、PirAB融合タンパク質をコードする組換え核酸分子の配列は植物で使用するために設計された。植物で使用するために設計された植物で最適化された例示的な組換え核酸分子配列は、配列番号49、51、52、53、54、55、56、146、148、150、152、154、156、及び158として提示されている。

【0241】

これらの組換え核酸分子の配列を含有する発現カセット及びベクターは、当技術分野で既知の形質転換の方法及び技法に従って、構築し、トウモロコシ、ダイズ、ワタまたは他の植物の細胞に導入することができる。例えば、Agrobacterium介在性形の形質転換は、米国特許出願公開第2009/0138985A1(ダイズ)、2008/0280361A1(ダイズ)、2009/0142837A1(トウモロコシ)、2008/0282432(ワタ)、2008/025667(ワタ)、2003/0110531(コムギ)、2001/0042257A1(テンサイ)、米国特許第5,750,871号(キャノーラ)、同第7,026,528号(コムギ)、及び同第6,365,807号(イネ)、及びArenaria, et al., (1998), Transgenic Res. 7:213-222(サトウキビ)に記載されており、そのすべては参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。形質転換細胞は、PirAB融合タンパク質TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、またはTIC9322を発現する形質転換植物に再生することができる。殺虫活性を調べるために、実施例に記載されているように、形質転換植物から得られた植物リーフディスクを用いて、鱗翅目害虫の幼虫の存在下でバイオアッセイを実施する。鞘翅目害虫に対する殺虫活性を調べるために、以下の例で記載するようにR₀及びF₁の世代の形質転換植物が根切り虫アッセイにおいて使用される。半翅目害虫に対する殺虫活性を調べるために、実施例に記載されているように、植物から取り出された組織または植物に残っている組織のいずれかからの形質転換植物の鞘、トウモロコシの穂または葉をアッセイに使用する。

【0242】

従来の形質転換法の代替として、導入遺伝子、発現力セット（複数可）等のようなDNA配列を、部位特異的な組込みを介して植物または植物細胞のゲノム内の特定の部位または遺伝子座に挿入してもよく、または組み込んでもよい。したがって、本開示の組換えDNAの構築物（複数可）及び分子（複数可）は、植物または植物細胞のゲノムに挿入するための少なくとも1つの導入遺伝子、発現力セット、または他のDNA配列を含むドナーテンプレート配列を含んでもよい。部位特異的組込みのためのそのようなドナーテンプレートはさらに、挿入配列（すなわち、植物ゲノムに挿入される配列、導入遺伝子、カセット等）に隣接する1または2の相同性アームを含んでもよい。本開示の組換えDNA構築物（複数可）はさらに、部位特異的ヌクレアーゼ及び／または部位特異的組込みを実行するための任意の関連タンパク質をコードする発現力セット（複数可）を含んでもよい。これらのヌクレアーゼ発現力セット（複数可）は、ドナーテンプレートと同じ分子またはベクター（シス）または別の分子またはベクター（トランス）に存在してもよい。ゲノムDNAを切断して、所望のゲノム部位または遺伝子座で二本鎖切断（DSB）またはニックを生成する様々なタンパク質（またはタンパク質の複合体及び／またはガイドRNA）を含む部位特異的組込みのためのいくつかの方法が当該技術分野で知られている。当該技術分野で理解されるように、ヌクレアーゼ酵素によって導入されたDSBまたはニックを修復する過程の間に、ドナーテンプレートDNAはDSBまたはニックの部位でゲノムに組み込まれるようになってもよい。挿入事象は非相同末端結合（NHEJ）を介して発生してもよいが、ドナーテンプレートにおける相同性アーム（複数可）の存在は、相同組換えを介した修復過程の間での植物ゲノムへの挿入配列の導入及び標的指向化を促進してもよい。使用されてもよい部位特異的ヌクレアーゼの例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、操作されたまたはネイティブのメガヌクレアーゼ、TALEエンドヌクレアーゼ、及びRNA誘導エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）が挙げられる。RNA誘導部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）を使用する方法については、組換えDNA構築物（複数可）はまた、植物ゲノム内の所望の部位にヌクレアーゼを向けるための1以上のガイドRNAをコードする配列も含むであろう。

【0243】

PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または関連する殺虫性タンパク質をコードする組換え核酸分子組成物が企図される。例えば、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または関連する殺虫性タンパク質は、タンパク質をコードするORFを伴うポリヌクレオチド分子が、例えば、プロモーター、及び構築物が意図されるシステムでの発現に必要な他の調節要素のような遺伝子発現要素に操作可能に連結されている組換えDNA構築物で発現させることができる。非限定的な例には、PirAB融合タンパク質、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及びTIC11302または植物におけるタンパク質の発現のための配列をコードする関連ファミリーメンバーの殺虫性タンパク質に操作可能に連結された植物で機能的なプロモーター、またはPirA_ABE68878のようなPirAタンパク質、もしくはPirBタンパク質TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、TIC7667、TIC7669、TIC7940、TIC10366、TIC10367、TIC10369、TIC10370、TIC10371、TIC10372、TIC10373、TIC10368、PirB_ABE68879、TIC11505、TIC11510及びTIC11511；もしくはPirAB融合タンパク質、TIC6880、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9322、TIC9320、TIC9321、TIC6880PL、TIC10375、TIC10376、TIC10377、TIC10378、TIC10379、TIC10380、TIC10381、TIC10434、TIC11210、TIC11211、TIC11

10

20

30

40

50

212、TIC11301、TIC11302、TIC11440、TIC11441、
 TIC11442、TIC11443、TIC11444、TIC11445、TIC1
 1446、TIC11506、TIC11512、TIC11513、TIC10376
 PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC1
 1103、及びTIC11104；または、Bt細菌もしくは他のBacillus種に
 おけるタンパク質の発現のための配列をコードする関連する殺虫性タンパク質に操作可能
 に連結されたBtで機能的なプロモーターが挙げられる。エンハンサー、イントロン、非
 翻訳リーダー、コードされたタンパク質不動化タグ(HISタグ)、転座ペプチド(すな
 わち、プラスチド輸送ペプチド、シグナルペプチド)、翻訳後修飾酵素のためのポリペプ
 チド配列、リボソーム結合部位、及びRNAi標的部位を含むが、これらに限定されない
 他の要素は、PirAタンパク質、PirA_ABE68878、PirBタンパク質、
 TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、
 TIC7667、TIC7669、TIC7940、TIC10366、TIC1036
 7、TIC10369、TIC10370、TIC10371、TIC10372、TIC
 10373、TIC10368、PirB_ABE68879、TIC11505、T
 IC11510、及びTIC11511、またはPirAB融合タンパク質、TIC68
 80、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC93
 22、TIC9320、TIC9321、TIC6880PL、TIC10375、TIC
 10376、TIC10377、TIC10378、TIC10379、TIC103
 80、TIC10381、TIC10434、TIC11210、TIC11211、T
 IC11212、TIC11301、TIC11302、TIC11440、TIC11
 441、TIC11442、TIC11443、TIC11444、TIC11445、
 TIC11446、TIC11506、TIC11512、TIC11513、TIC1
 0376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、
 TIC11103、及びTIC11104、または、関連殺虫性タンパク質コード配列に
 操作可能に連結することができる。

【0244】

本明細書で提供されている例示的な組換えポリヌクレオチド分子には、例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号105、配列番号107、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、及び配列番号157に記述されたようなアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはタンパク質をコードする配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号

10

20

30

40

50

79、配列番号 81、配列番号 83、配列番号 85、配列番号 87、配列番号 89、配列番号 91、配列番号 93、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 99、配列番号 101、配列番号 104、配列番号 106、配列番号 108、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 114、配列番号 116、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、配列番号 124、配列番号 126、配列番号 128、配列番号 130、配列番号 132、配列番号 134、配列番号 136、配列番号 138、配列番号 140、配列番号 142、配列番号 144、配列番号 146、配列番号 148、配列番号 150、配列番号 152、配列番号 154、配列番号 156、及び配列番号 158 のようなポリヌクレオチドに操作可能に連結される異種プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。異種プロモーターはまた、色素体を標的とする T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、及び T I C 1 1 3 0 2、または標的としない T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4 及び T I C 1 1 3 0 2 または関連する殺虫性タンパク質をコードする合成 D N A コード配列に操作可能に連結することもできる。本明細書で開示されているタンパク質をコードする組換え核酸分子のコドンは、同義のコドン（当該技術分野ではサイレント置換として知られている）で置き換えることができる。

【 0 2 4 5 】

本明細書で使用されるとき、「組換え」という用語は、通常は自然界には見られず、ヒトの介入によって作り出された非天然の D N A、タンパク質、または生物を指す。「組換え D N A 分子」は、天然には一緒に存在しないであろう、且つヒトの介入の結果である D N A 分子の組み合わせを含む D N A 分子である。例えば、導入遺伝子を含む D N A 分子及び導入遺伝子に隣接する植物ゲノム D N A のような、互いに異種の少なくとも 2 つの D N A 分子の組み合わせから構成される D N A 分子は組換え D N A 分子である。

【 0 2 4 6 】

本明細書で使用されるとき、「異種」という用語は、そのような組み合わせが通常自然界に見られない場合の 2 以上の D N A 分子の組み合わせを指す。例えば、2 つの D N A 分子は、異なる種に由来してもよく、及び / または 2 つの D N A 分子は、異なる遺伝子、例えば、同じ種に由来する異なる遺伝子または異なる種に由来する同じ遺伝子に由来してもよい。したがって、調節要素は、そのような組み合わせが通常自然界に見られない場合、すなわち、転写可能な D N A 分子が調節要素に操作可能に連結して天然に存在しない場合、操作可能に連結された転写可能 D N A 分子に関して異種である。

【 0 2 4 7 】

P i r A タンパク質、P i r B タンパク質、または P i r A B 融合タンパク質、または関連する殺虫性タンパク質のコード配列を含む組換え D N A 構築物はさらに、P i r A タンパク質、P i r B タンパク質、または P i r A B 融合タンパク質、または関連する殺虫性タンパク質、昆虫阻害性 d s R N A 分子、または補助タンパク質をコードする D N A 配列と同時に発現するまたは共発現するように構成することができる 1 以上の昆虫阻害剤をコードする D N A の領域を含むことができる。補助タンパク質には、補因子、酵素、結合相手、または、例えば、その発現を助け、植物におけるその安定性に影響を与え、オリゴマー化のために自由エネルギーを最適化し、その毒性を増強し、且つその活性のスペクトルを増大することによって昆虫阻害剤の有効性に役立つように機能する他の薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。補助タンパク質は、例えば、1 以上の昆虫阻害剤の取り込みを促進してもよく、または毒剤の毒性効果を増強してもよい。

【 0 2 4 8 】

すべてのタンパク質または d s R N A 分子が 1 つのプロモーターから発現されるように、または各タンパク質または d s R N A 分子が別個のプロモーターの制御下にあるように

10

20

30

40

50

、またはそれらの何らかの組み合わせのないように、組換えDNA構築物を構築することができる。本発明のPirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、及び関連タンパク質は、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または関連タンパク質の1以上が、選択した発現系の種類に応じて、他のオープンリーディングフレーム及びプロモーターも含有する共通のヌクレオチドセグメントから発現される多重遺伝子発現系から発現させることができる。例えば、細菌の多重遺伝子発現系は、単一のプロモーターを利用して、単一のオペロン内からの多重結合/タンデムオープンリーディングフレームの発現（すなわち、ポリシストロン性発現）を駆動することができる。別の例では、植物の多重遺伝子発現系は、それぞれが異なるタンパク質または1以上のdsRNA分子のような他の薬剤を発現する、多重に連結されていない発現カセットを利用することができる。

【0249】

PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または関連するファミリーメンバータンパク質をコードする配列を含む組換え核酸分子または組換えDNA構築物は、ベクター、例えば、プラスミド、バキュロウイルス、合成染色体、ビリオン、コスミド、ファージミド、ファージ、またはウイルスベクターによって宿主細胞に送達することができる。そのようなベクターを用いて、PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または宿主細胞における関連タンパク質コード配列の安定した発現もしくは一過性の発現、またはコードされたポリペプチドのその後の発現を達成することができる。タンパク質をコードする配列を含み、宿主細胞に導入される外因性の組換えポリヌクレオチドまたは組換えDNA構築物は、本明細書では「導入遺伝子」と呼ばれる。

【0250】

PirAタンパク質、PirBタンパク質、またはPirAB融合タンパク質、または関連するタンパク質をコードする配列のいずれか1以上を発現する組換えポリヌクレオチドを含有するトランスジェニック細菌、トランスジェニック植物細胞、トランスジェニック植物、及びトランスジェニック植物の一部。「細菌細胞」または「細菌」という用語は、*Agrobacterium*、*Bacillus*、*Escherichia*、*Salmonella*、*Pseudomonas*、または*Rhizobium*の細胞を含むことができるが、これらに限定されない。「植物細胞」または「植物」という用語は、双子葉植物細胞または単子葉植物細胞を含むことができるが、これらに限定されない。企図される植物及び植物細胞には、アルファルファ、バナナ、オオムギ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ブラッシカ、ニンジン、キャッサバ、トウゴマ、カリフラワー、セロリ、ヒヨコマメ、ハクサイ、柑橘類、ココナッツ、コーヒー、トウモロコシ、クローバー、ワタ、ウリ、キュウリ、ダグラスモミ、ナス、ユーカリ、亜麻、ニンニク、ブドウ、ホップ、ネギ、レタス、ロブロリーパイン、キビ、メロン、ナツツ、オートムギ、オリーブ、タマネギ、観賞用植物、ヤシ、牧草、エンドウマメ、ビーナッツ、コショウ、ハトエンドウ、マツ、ジャガイモ、ポプラ、カボチャ(*pumpkin*)、ラジアータパイン、ダイコン、ナタネ、イネ、根茎、ライムギ、サフラワー、低木、ソルガム、サザンパイン、ダイズ、ホウレンソウ、カボチャ(*squash*)、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、スイートガム、スイートポテト、スイッチグラス、茶、タバコ、トマト、ライコムギ、芝草、スイカ、コムギの植物細胞または植物が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、トランスジェニック植物細胞から再生されたトランスジェニック植物及びトランスジェニック植物の一部が提供される。特定の実施形態では、トランスジェニック植物は、植物から一部を切断する、折る、粉碎する、または他の方法で分離することによって、トランスジェニック種子から得ることができる。特定の実施形態では、植物の一部は、種子、朔果、葉、花、茎、根、またはそれらの任意の部分、またはトランスジェニック植物の一部の再生不可能な部分であることができる。この文脈で使用されるとき、トランスジェニック植物の一部の「再生不可能な」部分は、植物全体を形成するように誘導できない部分、または有性生殖及び/または無性生殖が可能な植物全体を形成

10

20

30

40

50

するように誘導できない部分である。特定の実施形態では、植物の一部の再生不可能な部分は、トランスジェニック植物の種子、朔果、葉、花、茎、または根の一部である。

【0251】

昆虫、鞘翅目または鱗翅目または半翅目を阻害する量のT I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2または関連するタンパク質を含むトランスジェニック植物の製造方法が提供される。そのような植物は、本出願で提供されている任意のT I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2、または関連タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチドを植物細胞に導入することと、昆虫、鞘翅目、鱗翅目、または半翅目を阻害する量のタンパク質を発現する前記植物細胞に由来する植物を選択することによって作製することができる。植物は、再生、種子、花粉、または分裂組織の形質転換技術によって植物細胞から導出することができる。植物を形質転換するための方法は当該技術分野で既知である。

【0252】

加工製品が検出可能な量のT I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2、または関連するタンパク質、その昆虫阻害性のセグメントまたは断片を含む加工植物製品またはその任意の特徴的な部分もまた、本出願において開示されている。特定の実施形態では、加工製品は、植物の一部、植物バイオマス、油、粗びき粉、砂糖、動物飼料、コムギ粉、フレーク、ふすま、糸くず、外皮、加工種子、及び種子から成る群から選択される。特定の実施形態では、加工製品は再生不可能である。植物製品は、トランスジェニック植物またはトランスジェニック植物の一部に由来する商品または商業の他の製品を含むことができ、商品または他の製品は、T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2；または関連タンパク質の特徴的な部分をコードするまたは含むヌクレオチドセグメントまたは発現されたR N Aまたはタンパク質を検出することによって商業を介して追跡することができる。

【0253】

T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2、または関連タンパク質を発現している植物は、他の毒性タンパク質を発現する、及び／または除草剤耐性遺伝子、収量またはストレス耐性形質等を付与する遺伝子等のような他のトランスジェニック形質を発現するトランスジェニック事象と交配することによって交配することができ、または形質がすべて連鎖されるようにそのような形質を単一のベクターで組み合わせることができる。

【0254】

実施例でさらに記載されているように、T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、及びT I C 1 1 3 0 2をコードする配列は植物で使用するために設計された。これらの合成ヌクレオチド配列または人工ヌクレオチド配列を含有する発現カセット及び発現ベクターは、当該技術分野で知られている形質転換の

10

20

30

40

50

方法及び技法に従って、構築され、トウモロコシ、ワタ、及びダイズの植物細胞に導入することができる。形質転換細胞は、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及びTIC11302を発現していることが観察される形質転換植物に再生される。殺虫活性を調べるために、鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目の害虫の存在下でバイオアッセイが実施される。

【0255】

実施例にさらに記載されているように、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302または関連するタンパク質をコードする配列、及びこれらのタンパク質に対して実質的な比率の同一性を有する配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、熱增幅及びハイブリッド形成のような当業者に既知の方法を用いて同定することができる。例えば、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質または関連タンパク質は、関連タンパク質に特異的に結合する抗体を産生させるのに使用することができ、且つ密接に関連している他のタンパク質メンバーを選抜する及び見つけるために使用することができる。

10

【0256】

さらに、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質、または関連タンパク質をコードするスクレオチド配列を、スクリーニング用のプローブ及びプライマーとして使用して、熱サイクル増幅法または等温増幅法及びハイブリッド形成法を用いてクラスの他のメンバーを同定することができる。例えば、配列番号49、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、及び配列番号158として記述されている配列に由来するオリゴスクレオチドを用いて、商品生産物に由来するデオキシリボ核酸試料におけるTIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質または関連タンパク質の導入遺伝子の存在または非存在を決定することができる。オリゴスクレオチドを使用する特定の核酸検出法の感度を考えると、配列番号49、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156及び配列番号158として記述されている配列に由来するオリゴスクレオチドを用いて、商品生産物の一部のみが、配列番号49、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、または配列番号158を含有するトランジェニック植物に由来するプールされた供給源に由来する商品生産物にてTIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302の導入遺伝子を検出できることが期待される。そのようなオリゴスクレオチドを用いて、配列番号49、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54

20

30

40

50

、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 1 4 6 、配列番号 1 4 8 、配列番号 1 5 0 、配列番号 1 5 2 、配列番号 1 5 4 、配列番号 1 5 6 、または配列番号 1 5 8 にてヌクレオチド配列の変異を導入することができるござるに認識されてゐる。そのような「突然変異誘発」オリゴヌクレオチドは、トランスジェニック植物宿主細胞における様々な昆虫阻害活性または多様な発現を示す T I C 6 8 8 0 P L 、 T I C 9 3 1 6 、 T I C 9 3 1 7 、 T I C 9 3 1 8 、 T I C 9 3 1 9 、 T I C 9 3 2 0 、 T I C 9 3 2 2 、 T I C 1 0 3 7 6 P L 、 T I C 1 0 3 7 8 P L 、 T I C 1 0 3 8 0 P L 、 T I C 1 0 3 8 1 P L 、 T I C 1 1 1 0 3 、 T I C 1 1 1 0 4 、または T I C 1 1 3 0 2 、または関連するアミノ酸配列変異体の同定に有用である。

【 0 2 5 7 】

ヌクレオチド配列の相同体、例えば、ハイブリッド形成条件下にて、本出願で開示されている配列のそれぞれまたはいずれかとハイブリッド形成するヌクレオチド配列によってコードされる殺虫性タンパク質もまた本発明の実施形態である。本発明はまた、第 2 のヌクレオチド配列とハイブリッド形成する第 1 のヌクレオチド配列を検出する方法を提供し、その際、第 1 のヌクレオチド配列（またはその逆相補性配列）は、殺虫性タンパク質またはその殺虫性断片をコードし、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で第 2 のヌクレオチド配列とハイブリッド形成する。そのような場合、第 2 のヌクレオチド配列はストリンジェントなハイブリッド形成条件下で配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 7 、配列番号 9 、配列番号 1 1 、配列番号 1 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 7 、配列番号 1 9 、配列番号 2 1 、配列番号 2 3 、配列番号 2 5 、配列番号 2 7 、配列番号 2 9 、配列番号 3 1 、配列番号 3 3 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 、配列番号 3 9 、配列番号 4 1 、配列番号 4 3 、配列番号 4 5 、配列番号 4 7 、配列番号 4 9 、配列番号 5 1 、配列番号 5 2 、配列番号 5 3 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 9 、配列番号 6 1 、配列番号 6 3 、配列番号 6 5 、配列番号 6 7 、配列番号 6 9 、配列番号 7 1 、配列番号 7 3 、配列番号 7 5 、配列番号 7 7 、配列番号 7 9 、配列番号 8 1 、配列番号 8 3 、配列番号 8 5 、配列番号 8 7 、配列番号 8 9 、配列番号 9 1 、配列番号 9 3 、配列番号 9 5 、配列番号 9 7 、配列番号 9 9 、配列番号 1 0 1 、配列番号 1 0 4 、配列番号 1 0 6 、配列番号 1 0 8 、配列番号 1 1 0 、配列番号 1 1 2 、配列番号 1 1 4 、配列番号 1 1 6 、配列番号 1 1 8 、配列番号 1 2 0 、配列番号 1 2 2 、配列番号 1 2 4 、配列番号 1 2 6 、配列番号 1 2 8 、配列番号 1 3 0 、配列番号 1 3 2 、配列番号 1 3 4 、配列番号 1 3 6 、配列番号 1 3 8 、配列番号 1 4 0 、配列番号 1 4 2 、配列番号 1 4 4 、配列番号 1 4 6 、配列番号 1 4 8 、配列番号 1 5 0 、配列番号 1 5 2 、配列番号 1 5 4 、配列番号 1 5 6 、及び配列番号 1 5 8 から成る群から選択されるヌクレオチド配列であることができる。ヌクレオチドコード配列は、適切なハイブリッド形成条件下で互いにハイブリッド形成し、これらのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質は、他のタンパク質のいずれか 1 つに対して生じた抗血清と交差反応する。本明細書で定義されるようなストリンジェントなハイブリッド形成条件は、少なくとも 4 2 でのハイブリッド形成と、それに続く $2 \times S S C$ 、 0 . 1 % SDS による室温でのそれぞれ 5 分間の 2 回の洗浄と、それに続く 0 . 5 $\times S S C$ 、 0 . 1 % SDS における 6 5 でのそれぞれ 3 0 分間の 2 回の洗浄とを含む。一層さらに高い温度での洗浄は一層さらにストリンジェントな条件、例えば、 6 8 でのハイブリッド形成条件、それに続く 0 . 1 % SDS を含有する $2 \times S S C$ における 6 8 での洗浄を構成する。

【 0 2 5 8 】

当業者は、遺伝暗号の冗長性のために、他の多くの配列が P i r A タンパク質、 P i r B タンパク質、または P i r A B 融合タンパク質に関連するタンパク質をコードすることができ、且つこれらの配列は、それらが B a c i l l u s 株または植物細胞のいずれかで殺虫性タンパク質を発現するように機能する程度まで、多くのそのような冗長なコード配列がこれらの条件下で、 P i r A タンパク質、 P i r B タンパク質、または P i r A B 融合タンパク質をコードするネイティブの X e n o r h a b d u s または P h o t o r h a b d u s 配列とハイブリッド形成しないことを当然認識している本発明の実施形態である

10

20

30

40

50

ことを認識するであろう。本出願は、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、またはPir A B融合タンパク質、または関連するタンパク質をコードする配列及びそれに対して実質的な比率の同一性を有する配列を同定するための、当業者に既知のこれら及び他の同定方法の使用を企図する。

【0259】

TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質または関連タンパク質によって昆虫、特に鱗翅目、鞘翅目、または半翅目による作物の侵入を防除する方法も本出願で開示されている。そのような方法は、昆虫、鞘翅目、または鱗翅目または半翅目を阻害する量のTIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302、または関連する毒素タンパク質を含む植物を成長させることを含むことができる。特定の実施形態では、そのような方法はさらに、(i) TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質、または関連する毒素タンパク質を含むまたはコードする任意の組成物を植物または植物を生じさせる種子に適用すること；及び(ii) TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質、または関連する毒素タンパク質をコードするポリヌクレオチドで植物または植物を生じさせる植物細胞を形質転換すること、のいずれか1以上をさらに含むことができる。一般に、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302タンパク質、または関連する毒素タンパク質を、組成物で提供して、微生物で提供して、またはトランスジェニック植物で提供して、または鱗翅目、鞘翅目または半翅目の昆虫に対する昆虫阻害活性を付与することができる企図される。

【0260】

特定の実施形態では、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、またはPir A B融合タンパク質、または関連する毒素タンパク質の組換え核酸分子は、発現に好適な条件下でPir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、またはPir A B融合タンパク質または関連する毒素タンパク質の1つを発現するように形質転換された組換えBacillusまたは任意の他の組換え細菌細胞を培養することによって調製される昆虫阻害性組成物の殺虫活性成分である。そのような組成物は、前記組換えポリペプチドを発現／產生するそのような組換え細胞の培養物の乾燥、凍結乾燥、均質化、抽出、濾過、遠心分離、沈降、または濃縮によって調製することができる。そのようなプロセスは、Bacillusまたは他の昆虫病原性細菌の細胞抽出物、細胞浮遊液、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞上清、細胞濾液、または細胞ペレットを生じることができる。そのように生成された組換えポリペプチドを得ることによって、組換えポリペプチドを含む組成物は、細菌細胞、細菌胞子、及び傍胞子封入体を含むことができ、農業昆虫阻害スプレー製品または食餌バイオアッセイにおける昆虫阻害製剤としてを含む種々の用途のために製剤化することができる。

【0261】

一実施形態では、耐性発生の可能性を低減するために、Pir Aタンパク質、Pir B

10

20

30

40

50

タンパク質、またはPir A B融合タンパク質または関連タンパク質の1つを含む昆虫阻害組成物はさらに、同じ鱗翅目、鞘翅目、または半翅目の昆虫種に対して昆虫阻害活性を示すが、Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、またはPir A B融合タンパク質、または関連する毒素タンパク質とは異なる当業者に既知の少なくとも1つの追加のポリペプチドを含むことができる。そのような組成物のための考えられる追加のポリペプチドには、昆虫阻害タンパク質及び昆虫阻害性dsRNA分子が挙げられる。害虫を防除するためのそのようなリボヌクレオチド配列の使用の一例は、Baum, et al. (米国特許公開2006/0021087 A1)に記載されている。

【0262】

鱗翅目害虫の防除のためのそのような追加のポリペプチドは、例えば、Cry1A (米国特許第5,880,275号)、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1A.105、Cry1Ae、Cry1B (米国特許公開番号10/525,318)、Cry1C (米国特許第6,033,874号)、Cry1D、Cry1Da及びそれらの変異型、Cry1E、Cry1F、及びCry1A/Fキメラ (米国特許第7,070,982号; 同第6,962,705号; 及び同第6,713,063号)、例えば、TIC836、TIC860、TIC867、TIC869、及びTIC1100 (国際出願公開WO2016/061392 (A2))、TIC2160 (国際出願公開WO2016/061392 (A2))のような、しかし、これらに限定されないCry1G、Cry1H、Cry1I、Cry1J、Cry1K、Cry1L、Cry1-型キメラ、Cry2A、Cry2Ab (米国特許第7,064,249号)、Cry2Ae、Cry4B、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry15、Cry43A、Cry43B、Cry51Aa1、ET66、TIC400、TIC800、TIC834、TIC1415、Vip3A、VIP3Ab、VIP3B、AXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI-035、AND AXMI-045 (米国特許公開2013-0117884 A1)、AXMI-52、AXMI-58、AXMI-88、AXMI-97、AXMI-102、AXMI-112、AXMI-117、AXMI-100 (米国特許公開2013-0310543 A1)、AXMI-115、AXMI-113、AXMI-005 (米国特許公開2013-0104259 A1)、AXMI-134 (米国特許公開2013-0167264 A1)、AXMI-150 (米国特許公開2010-0160231 A1)、AXMI-184 (米国特許公開2010-0004176 A1)、AXMI-196、AXMI-204、AXMI-207、AXMI-209 (米国特許公開2011-0030096 A1)、AXMI-218、AXMI-220 (米国特許公開2014-0245491 A1)、AXMI-221z、AXMI-222z、AXMI-223z、AXMI-224z、AXMI-225z (米国特許公開2014-0196175 A1)、AXMI-238 (米国特許公開2014-0033 A1)、AXMI-270 (米国特許公開2014-0223598 A1)、AXMI-345 (米国特許公開2014-0373195 A1)、AXMI-335 (国際出願公開WO2013/134523 (A2))、DIG-3 (米国特許公開2013-0219570 A1)、DIG-5 (米国特許公開2010-0317569 A1)、DIG-11 (米国特許公開2010-0319093 A1)、AfIP-1A及びそれらの誘導体 (米国特許公開2014-0033361 A1)、AfIP-1B及びそれらの誘導体 (米国特許公開2014-0033361 A1)、PIP-1APIP-1B (米国特許公開2014-0007292 A1)、PSEEN3174 (米国特許公開2014-0007292 A1)、AECFG-592740 (米国特許公開2014-0007292 A1)、Pput_1063 (米国特許公開2014-0007292 A1)、DIG-657 (国際出願公開WO2015/195594 (A2))、Pput_1064 (米国特許公開2014-0007292 A1)、GS-135及びそれらの誘導体 (米国特許公開2012-0233726 A1)、GS153及びそれらの誘導体 (米国特許公開2012-0192310 A1)、GS154及びそれらの誘導体 (米国特許公開2012-0192310 A1)、GS155及びそれ

10

20

30

40

50

らの誘導体（米国特許公開 2012-0192310A1）、米国特許公開 2012-0167259 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2012-0047606 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2011-0154536 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2011-0112013 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2010-0192256 A1 に記載されているような配列番号 2 及び 4 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2010-0077507 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2010-0077508 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2009-0313721 A1 に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許公開 2010-0269221 A1 に記載されているような配列番号 2 または 4 及びそれらの誘導体、米国特許第 7,772,465 (B2) に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、WO 2014/008054 A2 に記載されているような CF161_0085 及びそれらの誘導体、米国特許公開 US 2008-0172762 A1、US 2011-0055968 A1、及び US 2012-0117690 A1 に記載されているような鱗翅目毒性タンパク質及びそれらの誘導体；US 7510878 (B2) に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、米国特許第 7812129 (B1) に記載されているような配列番号 2 及びそれらの誘導体、Cry71Aa1 及び Cry72Aa1 (US 特許公開 US 2016-0230187 A1)、Axmi422 (US 特許公開 US 2016-0201082 A1)、Axmi440 (US 特許公開 US 2016-0185830 A1)、Axmi281 (US 特許公開 2016-0177332 A1)、BT-0044、BT-0051、BT-0068、BT-0128 及びそれらの変異型 (WO 2016-094159 A1)、BT-009、BT-0012、BT-0013、BT-0023、BT0067 及びそれらの変異型 (WO 2016-094165 A1)、Cry1JP578V、Cry1JPS1、Cry1 JPS1P578V (WO 2016-061208 A1)；等のような、しかし、これらに限定されない昆虫阻害タンパク質から成る群から選択されてもよい。

【0263】

鞘翅目害虫を防除するためのそのような追加のポリペプチドは、例えば、Cry3Bb (米国特許第 6,501,009 号)、Cry1C 变異体、Cry3A 变異体、Cry3、Cry3B、Cry34/35、5307、AXMI134 (米国特許公開 2013-0167264 A1) AXMI-184 (米国特許公開 2010-0004176 A1)、AXMI-205 (米国特許公開 2014-0298538 A1)、AXMI-207 (米国特許公開 2013-0303440 A1)、AXMI-218、AXMI-220 (米国特許公開 20140245491 A1)、AXMI-221z、AXMI-223z (米国特許公開 2014-0196175 A1)、AXMI-279 (米国特許公開 2014-0223599 A1)、AXMI-R1 及びその変異型 (米国特許公開 2010-0197592 A1)、TIC407、TIC417、TIC431、TIC807、TIC853、TIC901、TIC1201、TIC3131、DIG-10 (米国特許公開 2010-0319092 A1)、eHIP (米国特許出願公開番号 2010/0017914)、IP3 及びその変異型 (米国特許公開 2012 から 0210462 A1)、v-Hexatoxin-Hv1a (米国特許出願公開 2014-0366227 A1)、PHI-4 变異型 (米国特許出願公開 2016-0281105 A1)、PIP-72 变異型 (WO 2016-144688 A1)、PIP-45 变異型、PIP-64 变異型、PIP-74 变異型、PIP-75 变異型、及び PIP-77 变異型 (WO 2016-144686 A1)、DIG-305 (WO 2016109214 A1)、PIP-47 变異型 (米国特許公開 2016-0186204 A1)、DIG-17、DIG-90、DIG-79 (WO 2016-057123 A1)、DIG-303 (WO 2016-070079 A1)；等のような、しかし、これらに限定され

10

20

30

40

50

ない昆虫阻害タンパク質から成る群から選択されてもよい。

【0264】

半翅目害虫を防除するためのそのような追加のポリペプチドは、TIC1415（米国特許公開2013-0097735 A1）、TIC807（米国特許番号8609936）、TIC852及びTIC853（米国特許公開2010-0064394 A1）、TIC834及びその変異型（米国特許公開2013-0269060 A1）、AXMI-036（米国特許公開2010-0137216 A1）、及びAXMI-171（米国特許公開2013-0055469 A1）、Cry64Ba及びCry64Ca（Liu, et al (2018), Cry64Ba and Cry64Ca, Two ETX/MTX2-Type *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Protein Active against Hemipteran Pests. Applied and Environmental Microbiology, 84 (3) : 1-11）のような、しかし、これらに限定されない半翅目に活性があるタンパク質から成る群から選択されてもよい。

10

【0265】

他の実施形態では、そのような組成物／製剤はさらに、本発明の他の昆虫阻害タンパク質によって阻害されない昆虫に対する阻害活性を示して得られる昆虫阻害のスペクトルを拡大する少なくとも1つの追加のポリペプチド、例えば、*Thysanopterans*に対して昆虫阻害活性を示す追加のポリペプチドを含むことができる。

20

【0266】

昆虫が特定の殺虫剤に対する耐性を発達させる可能性は当該技術分野で文書化されている。虫害耐性管理戦略の1つは、異なる作用機序を介して作動する2つの異なる昆虫阻害剤を発現するトランスジェニック作物を採用することである。したがって、昆虫阻害剤のいずれか1つに耐性のある昆虫は他の昆虫阻害剤によって防除することができる。別の虫害耐性管理戦略は、対象となる鞘翅目または鱗翅目の害虫種に対して保護されていない植物を用いて、そのような保護されていない植物の避難を提供することである。1つの特定の例は、その全体が参照によって組み込まれる米国特許第6,551,962号に記載されている。

30

【0267】

種子処理製剤、スプレー製剤、ドリップオン製剤、またはワイプオン製剤でタンパク質とともに使用される、本明細書で開示されているタンパク質によっても防除される害虫を防除するために設計されている局所適用殺虫剤の化学作用のような他の実施形態は、土壤に直接適用することができ（土壤灌注）、本明細書で開示されているタンパク質を発現する成長している植物に適用することができ、または開示されているタンパク質の1以上をコードする1以上の導入遺伝子を含有する種子に適用されるように製剤化することができる。種子処理で使用するためのそのような製剤は、当該技術分野で知られている種々の粘着剤及び粘着付与剤と共に適用することができる。そのような製剤は、開示されているタンパク質と作用様式において相乗的である殺虫剤を含有することができるので、製剤殺虫剤は様々な作用様式を介して作用して、開示されているタンパク質によって防除され得る同じまたは類似の害虫を防除する、またはそのような殺虫剤はPirAタンパク質、PirBタンパク質、PirAB融合タンパク質、または関連する殺虫性タンパク質の1つによって効果的に防除されていない、さらに広い宿主範囲または植物の害虫種の範囲内で害虫を防除するように作用する。

40

【0268】

前述の組成物／製剤はさらに、餌、粉末、粉塵、ペレット、顆粒、スプレー、エマルション、コロイド懸濁液、水溶液、*Bacillus*胞子／結晶調製物、種子処理、1以上のタンパク質を発現するように形質転換された組換え植物細胞／植物組織／種子／植物、または1以上のタンパク質を発現するように形質転換された細菌のような農業的に許容される担体をさらに含むことができる。組換えポリペプチドに固有の昆虫阻害または殺虫性阻害のレベル及び植物または食餌アッセイに適用される製剤のレベルに応じて、組成物／

50

製剤は、種々の重量での量の組換えポリペプチド、例えば、0.0001重量%～0.01重量%～0.01重量%～1重量%～99重量%の組換えポリペプチドを含むことができる。

【実施例】

【0269】

前述を考慮して当業者は、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、開示されている具体的な態様にて変更を行なうことができ、それでも同様のまたは類似する結果を得ることができることを十分に理解するべきである。したがって、本明細書で開示されている具体的な構造的及び機能的詳細は、限定的であると解釈されるべきではない。本明細書で引用された各参考文献の開示全体は本出願の開示の範囲内に組み込まれることが理解されるべきである。

10

【0270】

実施例 1

PirAタンパク質とPirBタンパク質の発見及びPirAB融合タンパク質の構築

この実施例では、殺虫性PirAタンパク質TIC4771、TIC7575、TIC7660、TIC7662、TIC7664、TIC7666、TIC7668、TIC7939、TIC10357、TIC10358、TIC10360、TIC10361、TIC10362、TIC10363、TIC10364、TIC10359、及びPirA_ABE68878(まとめて「PirAタンパク質」)、PirBタンパク質TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、TIC7667、TIC7669、TIC7940、TIC10366、TIC10367、TIC10369、TIC10370、TIC10371、TIC10372、TIC10373、TIC10368、PirB_ABE68879、TIC11505、TIC11510、及びTIC11511(まとめた「PirBタンパク質」)の発見、ならびにPirAB融合タンパク質、TIC6880、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9322、TIC9320、TIC9321、TIC6880PL、TIC10375、TIC10376、TIC10377、TIC10378、TIC10379、TIC10380、TIC10381、TIC10434、TIC11210、TIC11211、TIC11212、TIC11301、TIC11302、TIC11440、TIC11441、TIC11442、TIC11443、TIC11444、TIC11445、TIC11446、TIC11506、TIC11512、TIC11513、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、及びTIC11104(まとめて「PisABタンパク質」)の作出を説明する。

20

【0271】

Photorabdus及びXenorabdusのPirAB殺虫性タンパク質をコードする配列を、独自の収集及び公開配列情報から特定し、合成し、クローニングし、配列決定し、及び昆虫バイオアッセイで調べた。細菌のオペロンは、Photorabdus及びXenorabdusの種から同定し、各オペロンはPirA及びPirBのコード配列を含む。殺虫性PirAタンパク質、TIC4771、TIC7575、TIC7660、TIC7662、TIC7664、TIC7666、TIC7668、TIC7939、TIC10357、TIC10358、TIC10360、TIC10361、TIC10362、TIC10363、TIC10364、TIC10359、及びPirA_ABE68878；ならびにPirBタンパク質、TIC4772、TIC7576、TIC7661、TIC7663、TIC7665、TIC7667、TIC7669、TIC7940、TIC10366、TIC10367、TIC10369、TIC10370、TIC10371、TIC10372、TIC10373、TIC10368、PirB_ABE68879、TIC11505、TIC11510、及びTIC11511は、表13で列記されているPhotorabdus及びXenorabdusの種から単離した。タンパク質TIC7939及びTIC7940に関しては、オペロン

30

40

50

はマイクロバイオーム試料から同定され、それが由来した細菌種はまだ不明である。

表13. 新規のPirA及びPirB殺虫性毒素タンパク質及び対応するPhoto
rhabdus及びXenorhabdusの種。

| 細菌種 | PirAタンパク質 | | | PirBタンパク質 | | |
|---|-------------------|-------------|------------|-------------------|-------------|------------|
| | 毒素 | スクレオチドの配列番号 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | スクレオチドの配列番号 | タンパク質の配列番号 |
| Xenorhabdus nematophila ISB000002 | TIC4771 | 1 | 2 | TIC4772 | 3 | 4 |
| Xenorhabdus ehlersii 85823 | TIC7575 | 7 | 8 | TIC7576 | 9 | 10 |
| Xenorhabdus cabanillasii 85908 | TIC7660 | 13 | 14 | TIC7661 | 15. | 16 |
| Xenorhabdus ehlersii 85887 | TIC7662 | 19 | 20 | TIC7663 | 21 | 22 |
| Xenorhabdus poinarii 86198 | TIC7664 | 25 | 26 | TIC7665 | 27 | 28 |
| Photorhabdus luminescens 86197 | TIC7666 | 31 | 32 | TIC7667 | 33 | 34 |
| Photorhabdus luminescens 86194 | TIC7668 | 37 | 38 | TIC7669 | 39 | 40 |
| マイクロバイオーム | TIC7939 | 43 | 44 | TIC7940 | 45 | 46 |
| Shewanella violacea DSS12 | TIC1035 7 | 57 | 58 | TIC1036 6 | 59 | 60 |
| Photorhabdus luminescens laumontii TT01 | TIC1035 8 | 63 | 64 | TIC1036 7 | 65 | 66 |
| Photorhabdus asymbiotica | TIC1036 0 | 69 | 70 | TIC1036 9 | 71 | 72 |
| Xenorhabdus sp NBAII XenSa04 | TIC1036 1 | 75 | 76 | TIC1037 0 | 77 | 78 |
| Yersinia aldovae 670-83 | TIC1036 2 | 81 | 82 | TIC1037 1 | 83 | 84 |
| Xenorhabdus doucetiae FRM16 | TIC1036 3 | 87 | 88 | TIC1037 2 | 89 | 90 |
| Xenorhabdus griffiniae BMMCB | TIC1036 4 | 93 | 94 | TIC1037 3 | 95 | 96 |
| Xenorhabdus nematophila | TIC1035 9 | 99 | 100 | TIC1036 8 | 101 | 102 |
| Photorhabdus luminescens Hm | PirA_AB E68878 | 104 | 105 | PirB_AB E68879 | 106 | 107 |
| Xenorhabdus nematophila | | | | TIC1150 | 134 | 135 |

10

20

30

40

50

| 細菌種 | Pir Aタンパク質 | | | Pir Bタンパク質 | | |
|----------------------------------|------------|-------------|------------|--------------|-------------|------------|
| | 毒素 | ヌクレオチドの配列番号 | タンパク質の配列番号 | 毒素 | ヌクレオチドの配列番号 | タンパク質の配列番号 |
| MDI-0035777 | | | | 5 | | |
| Xenorhabdus bovienii | | | | TIC1151 0 | 138 | 139 |
| MDI-0035808 | | | | | | |
| Xenorhabdus nematophila AN6/1 | | | | TIC1151 1 | 142 | 143 |

【0272】

Photorabdus 及びXenorhabdus のPir A 及びPir B 殺虫性タンパク質をコードする配列は、独自の収集及び公開配列情報から特定し、合成し、クローニングし、配列を確認し、及び昆虫バイオアッセイで調べた。細菌のオペロンを同定し、表13に列記されている各Photorabdus 及びXenorhabdus 種の配列決定に由来するコンティグに基づいてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のプライマーを設計した。各タンパク質毒素の完全長コード配列のアンプリコンは、表13に列記されている各種から単離された全DNAを用いて作り出した。アンプリコンのそれぞれは、当該技術分野で既知の方法を用いて、Btで発現可能なプロモーターと操作可能に連結したBacillus thuringiensis (Bt) の発現ベクターにクローニングした。

【0273】

Pir Aタンパク質及びPir Bタンパク質を含む融合タンパク質は当該技術分野で既知の方法を用いて作製した。Pir A B融合タンパク質をコードするコード配列は、操作可能に連結されたPir Aタンパク質及びPir Bタンパク質のコード配列を含むので、細胞で発現されると、互いに隣接するPir Aタンパク質及びPir Bタンパク質を含むタンパク質が作り出された。Pir Bタンパク質に隣接するPir Aタンパク質から構成されるPir A B融合タンパク質を表1に提示する。表1に提示したPir A B融合タンパク質は、同じ細菌オペロンに由来するPir Aタンパク質及びPir Bタンパク質、または異なる細菌オペロンに由来するPir Aタンパク質及びPir Bタンパク質から構成される。Pir Aタンパク質に隣接するPir Bタンパク質から構成されるPir A B融合タンパク質を表2に提示する。表2のPir A B融合タンパク質は、同じ細菌オペロンに由来するPir Aタンパク質及びPir Bタンパク質から構成される。別のPir Aタンパク質と隣接し、次にPir Bタンパク質と隣接するPir Aタンパク質から構成されるPir A B融合タンパク質を表3に提示する。表3に提示したPir A B融合タンパク質のPir Aタンパク質成分は、重複Pir Aタンパク質または異なるPir Aタンパク質であることができる。

【0274】

実施例 2

Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質は昆虫バイオアッセイにて鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目に対する活性を示す

この実施例は、鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目の種々の種に対するPir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質によって示される阻害活性を説明する。

【0275】

Pir Aタンパク質、Pir Bタンパク質、及びPir A B融合タンパク質はBt及びE. coliで発現させ、鱗翅目、鞘翅目、半翅目、及び双翅目の種々の種に対する毒性についてアッセイした。各毒素の調製物は、鱗翅目害虫種、ツマジロクサヨトウ (Spho

10

20

30

40

50

doptera frugiperda、FAW)、アメリカタバコガ(Helicoverpa zea、CEW)、ダイズポッドワーム及びオオタバコガとしても知られる)、南西部のアワノメイガ(Diatraea grandiosella、SWCB)、コナガ(Plutella xylostella、DBM)、欧洲アワノメイガ(Ostrinia nubilalis、ECB)、ベルベットビーンキャタピラー(Anthonomus gemmatalis、VBC)、タマナヤガ(Agrotis ipsilon、BCW)、南部ヨトウムシ(Spodoptera eridania、SAW)、ダイズルーパー(Pseudoplusia includens、SBL)、及びオオタバコガ(Heliocassis virescens、TBW)；鞘翅目の害虫種、コロラドハムシ(Leptinotarsa decemlineata、CPB)、北部トウモロコシ根切り虫(Diabrotica barberi、NCR)、南部トウモロコシ根切り虫(Diabrotica undecimpunctata howardi、SCR)、及び西部トウモロコシ根切り虫(Diabrotica virgifera、WCR)；半翅目種、南部アオカメムシ(Nezara viridula、SG)、亜熱帯性クサギカメムシ(Euschistus heros、NBSB)、ミドリメクラガメ(Lygus lineolaris、TPB)、及び西部ミドリメクラガメ(Lygus hesperus、WTP)；ならびに双翅目種、ネッタイシマカ(Aedes aegypti、YFM)に対してアッセイした。

【0276】

PirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirAB融合タンパク質を発現する形質転換されたBt及びE.coliを増殖させ、胞子または可溶化タンパク質をアッセイ用の昆虫餌に加えた。大量死と発育阻害は、PirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirAB融合タンパク質の1以上を含有する食餌での昆虫の成長と発達を、未処理の対照飼育の食餌での昆虫と比較することによって評価した。鱗翅目、鞘翅目、半翅目、及び双翅目の害虫の活動を観察した。各タンパク質で観察されたバイオアッセイの活性を表14(鱗翅目)及び15(鞘翅目、半翅目、双翅目)に提示するが、その際、「+」は活性を示し、空のセルは活性が観察されなかったことを示し、「NT」は毒素がその特定の害虫に対して分析されなかったことを示す。

10

20

30

40

50

表14. 鱗翅目害虫に対するPirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirA-B融合タンパク質のバイオアッセイの活性。

| 種類 | 毒素 | FAW | CEW | SWCB | DBM | ECB | VBC | BCW | SAW | SBL | TBW |
|------|----------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PirA | TIC4771 | | + | | + | + | + | | + | | |
| PirB | TIC4772 | | + | | + | | + | | | | |
| 融合 | TIC6880 | + | + | + | + | + | + | | | | |
| PirA | TIC7575 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7576 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| 融合 | TIC9316 | NT | | + | NT | + | + | + | + | | + |
| PirA | TIC7660 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7661 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| 融合 | TIC9317 | NT | NT | + | NT | + | + | | | | |
| PirA | TIC7662 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7663 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| 融合 | TIC9318 | NT | NT | + | NT | + | + | + | | | + |
| PirA | TIC7664 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7665 | NT | NT | | NT | | | | | | + |
| 融合 | TIC9319 | NT | NT | + | NT | + | + | + | | | |
| PirA | TIC7666 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7667 | NT | NT | + | NT | | | | | | |
| 融合 | TIC9322 | + | + | + | NT | | + | | | | |
| PirA | TIC7668 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirB | TIC7669 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| 融合 | TIC9320 | NT | NT | + | NT | + | + | | | | |
| 融合 | TIC9321 | NT | NT | | NT | | | | | | |
| PirA | TIC10357 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10366 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10375 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10358 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10367 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10376 | NT | NT | + | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10360 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10369 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10377 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10361 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10370 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10378 | NT | NT | + | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10362 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |

10

20

30

40

50

| | | | | | | | | | | | |
|------|----------|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|
| PirB | TIC10371 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10379 | NT | | + | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10363 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10372 | NT | NT | + | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10380 | + | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirA | TIC10364 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10373 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10381 | | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| PirB | TIC10368 | NT | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC10434 | | NT | | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC11103 | NT | NT | + | NT |
| 融合 | TIC11104 | NT | NT | | NT |
| 融合 | TIC11210 | NT | NT | + | NT | NT | NT | + | | | NT |
| 融合 | TIC11211 | NT | NT | + | NT |
| 融合 | TIC11212 | NT | NT | + | NT | NT | NT | | | | NT |
| 融合 | TIC11301 | | NT | + | NT | + | + | | NT | NT | NT |
| 融合 | TIC11302 | | NT | + | NT | + | + | | NT | NT | NT |

10

20

30

40

50

表15. 鞘翅目、半翅目、及び双翅目の害虫に対するPirAタンパク質、PirBタンパク質、及びPirAB融合タンパク質のバイオアッセイ活性。

| 種類 | 毒素 | 鞘翅目 | | | | 半翅目 | | | | 双翅目 |
|------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | | CPB | NCR | SCR | WCR | SGB | NBSB | TPB | WTP | |
| PirA | TIC4771 | + | NT | NT | NT | NT | | + | | NT |
| PirB | TIC4772 | | NT | NT | | NT | | + | | NT |
| 融合 | TIC6880 | + | NT | | + | + | + | + | + | + |
| PirA | TIC7575 | | NT | NT | | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7576 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | |
| 融合 | TIC9316 | + | NT | NT | | + | + | + | + | NT |
| PirA | TIC7660 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7661 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| 融合 | TIC9317 | + | | | + | + | | + | + | NT |
| PirA | TIC7662 | | NT | NT | | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7663 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| 融合 | TIC9318 | + | | | + | + | + | + | + | NT |
| PirA | TIC7664 | + | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7665 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| 融合 | TIC9319 | + | NT | NT | | + | | + | + | NT |
| PirA | TIC7666 | | NT | NT | | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7667 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| 融合 | TIC9322 | + | NT | NT | | | | + | | NT |
| PirA | TIC7668 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| PirB | TIC7669 | | NT | NT | NT | NT | NT | | | NT |
| 融合 | TIC9320 | + | NT | NT | | + | + | + | | NT |
| 融合 | TIC9321 | + | NT | NT | | NT | NT | | | NT |
| PirA | TIC10357 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirB | TIC10366 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| 融合 | TIC10375 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirA | TIC10358 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirB | TIC10367 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| 融合 | TIC10376 | NT | + | NT | + | NT | | NT | | NT |
| PirA | TIC10360 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirB | TIC10369 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| 融合 | TIC10377 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirA | TIC10361 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| PirB | TIC10370 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | | NT |
| 融合 | TIC10378 | NT | + | NT | + | NT | + | NT | | NT |

10

20

30

40

50

| | | | | | | | | | | |
|------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| PirA | TIC10362 | NT | | NT |
| PirB | TIC10371 | NT | | NT |
| 融合 | TIC10379 | NT | + | NT | + | NT | NT | NT | | NT |
| PirA | TIC10363 | NT | | NT |
| PirB | TIC10372 | NT | | NT |
| 融合 | TIC10380 | NT | + | NT | + | NT | + | NT | NT | NT |
| PirA | TIC10364 | NT | | NT |
| PirB | TIC10373 | NT | | NT |
| 融合 | TIC10381 | NT | + | NT | + | NT | + | NT | | NT |
| PirB | TIC10368 | NT | | NT |
| 融合 | TIC10434 | NT | + | NT | + | NT | | NT | NT | NT |
| 融合 | TIC11103 | NT | NT | NT | NT | NT | | NT | | NT |
| 融合 | TIC11104 | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | NT | NT |
| 融合 | TIC11210 | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | | NT |
| 融合 | TIC11211 | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | | NT |
| 融合 | TIC11212 | NT | NT | NT | NT | NT | | NT | NT | NT |
| 融合 | TIC11301 | NT | + | NT | + | NT | + | NT | + | NT |
| 融合 | TIC11302 | NT | NT | NT | + | NT | + | NT | + | NT |

【0277】

表14及び15に見られるように、ほとんどの場合、PirAタンパク質及びPirBタンパク質だけでは殺虫活性を示さなかった。しかしながら、各オペロン由來のPirAタンパク質とPirBタンパク質とを含む融合タンパク質は、鱗翅目、鞘翅目、半翅目、及び双翅目の害虫種に対して広いスペクトルの活性を示した。PirAタンパク質及びPirBタンパク質のいくつかは、個々の能力で調べると経口活性を示した。例えば、PirAタンパク質TIC4771は、鱗翅目種、CEW、DBM、ECB、VBC、SAW、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、TPBに対して活性を示した。PirBタンパク質TIC4772は、鱗翅目種、CEW、DBM、VBC、SAW、及び半翅目種、TPBに対して活性を示した。TIC4771タンパク質及びTIC4772タンパク質をPirAB融合タンパク質TIC6880と組み合わせると、鱗翅目活性に対するほとんどの活性が保持された(CEW、DBM、ECB、及びVBC)。SAWに対する活性は失われたが、さらに2種の昆虫種FAW及びSWCBに対する活性は見られた。TIC6880はまた、鞘翅目及び半翅目の害虫種に関して、個々のTIC4471及びTIC4772と比較して追加の活性を示した。鞘翅目に関しては、TIC6880はCPBに対する活性を保持し、WCRに対する活性を追加した。半翅目に関しては、TIC6880はTPBに対する活性を保持し、SGB、NBSB、及びWTPに対して観察された活性を追加した。TIC6880はまた、TIC4771またはTIC4772では見られなかった双翅目種、YFMに対しても活性を示した。

【0278】

PirAタンパク質及びPirBタンパク質、TIC7575及びTIC7576は、それぞれ、アッセイした昆虫に対して昆虫阻害活性を示さなかった一方で、対応するPirAB融合タンパク質であるTIC9316は、鱗翅目種、SWCB、ECB、VBC、BCW、SAW、及びTBWに対して活性を示した。TIC9316は、鞘翅目種、CP

10

20

30

40

50

B 及び半翅目種、SGB、NBSB、TPB、及びWTP に対しても活性を示した。

【0279】

PirAタンパク質及びPirBタンパク質、TIC7660 及びTIC7661 はそれぞれ活性を示さなかった。しかしながら、対応するPirAB融合タンパク質であるTIC9317 は、鱗翅目種、SWCB、ECB、及びVBC、鞘翅目種、CPB 及びWCR、ならびに半翅目種、SGB、TPB、及びWTP に対して活性を示した。

【0280】

PirAタンパク質及びPirBタンパク質、TIC7662 及びTIC7663 はそれぞれ活性を示さなかった。しかしながら、対応するPirAB融合タンパク質であるTIC9318 は、鱗翅目種、SWCB、ECB、VBC、BCW、及びTBW、鞘翅目種、CPB 及びWCR、ならびに半翅目種、SGB、NBSB、TPB、及びWTP に対して活性を示した。

10

【0281】

PirAタンパク質TIC7664 は鞘翅目、CPB に対して活性を示した。PirBタンパク質TIC7665 は鱗翅目種、TBW に対して活性を示した。対応するPirAB融合タンパク質であるTIC9319 は、鱗翅目種、SWCB、ECB、VBC、及びBCW、鞘翅目種、CPB 及びWCR、及び半翅目種、SGB、TPB、及びWTP に対して活性を示した。

【0282】

PirAタンパク質TIC7666 は昆虫阻害活性を示さなかった。PirBタンパク質TIC7667 は鱗翅目種、SWCB に対して活性を示した。対応するPirAB融合タンパク質であるTIC9322 は鱗翅目種、FAW、CEW、SWCB 及びVBC、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、TPB に対して活性を示した。

20

【0283】

PirAタンパク質及びPirBタンパク質、TIC7668 及びTIC7669 はそれぞれ活性を示さなかった。対応するPirAB融合タンパク質TIC9320 は、鱗翅目種、SWCB、ECB、及びVBC、鞘翅目種、CPB、及び半翅目種、SGB、NBSB、及びTPB に対して活性を示した。

【0284】

PirAB融合タンパク質TIC9321 は鞘翅目の害虫、CPB に対して活性を示した。

30

【0285】

PirAタンパク質TIC10357、PirBタンパク質TIC10366、及び対応するPirAB融合タンパク質TIC10375 は、アッセイされた限られた数の鱗翅目に対して活性を示さなかった。

【0286】

PirAタンパク質TIC10358 及びPirBタンパク質TIC10367 はそれぞれ、アッセイした昆虫種に対して活性を示さなかった。しかしながら、対応するPirAB融合タンパク質であるTIC10376 は、鱗翅目害虫種、SWCB 及び鞘翅目害虫種、NCR 及びWCR に対して活性を示した。

40

【0287】

PirAタンパク質TIC10360 及びPirBタンパク質TIC10369 はそれぞれ、アッセイされた限られた数の鱗翅目害虫種に対して活性を示さなかった。

【0288】

PirAタンパク質TIC10361 及びPirBタンパク質TIC10370 は、それぞれ、アッセイされた限られた数の鱗翅目害虫種に対して活性を示さなかった。しかしながら、対応する融合タンパク質であるTIC10378 は、鱗翅目害虫種、SWCB、鞘翅目害虫種、NCR とWCR、及び半翅目害虫種、NBSB に対して活性を示した。

【0289】

PirAタンパク質TIC10362 及びPirBタンパク質TIC10371 はアッ

50

セイされた限られた数の鱗翅目害虫種に対して活性を示さなかった。

【0290】

Pir Aタンパク質TIC10363はアッセイされた限られた数の害虫種に対して活性を示さなかった。Pir Bタンパク質TIC10372は鱗翅目昆虫種、SWCBに対して活性を示した。対応する融合タンパク質であるTIC10380は、鱗翅目害虫種、SWCBに対する活性を保持し、鞘翅目害虫種、NCR及びWCRと半翅目害虫種、NBSBに対する活性を追加した。

【0291】

Pir Aタンパク質TIC10364及びPir Bタンパク質TIC10373はアッセイされた限られた数の害虫種に対して活性を示さなかった。対応する融合タンパク質TIC10381は、鞘翅目の害虫種NCRとWCR、及び半翅目害虫種NBSBに対して活性を示した。

10

【0292】

Pir AB融合タンパク質であるTIC10434は、鞘翅目害虫種、NCR及びWCRに対して活性を示した。

【0293】

Pir AB融合タンパク質TIC11103は鱗翅目害虫種、SWCBに対して活性を示した。

【0294】

Pir AB融合タンパク質TIC1104は半翅目種、NBSBに対して活性を示した。

20

【0295】

Pir AB融合タンパク質TIC11210は鱗翅目害虫種、SWCBとBCW、及び半翅目害虫種NBSBに対して活性を示した。

【0296】

Pir AB融合タンパク質TIC11211は鱗翅目害虫種、SWCB及び半翅目種、NBSBに対して活性を示した。

【0297】

Pir AB融合タンパク質TIC11212は鱗翅目害虫種、SWCBに対して活性を示した。

【0298】

30

Pir AB融合タンパク質TIC11301は、鱗翅目害虫種、SWCB、ECB、及びVBC、鞘翅目害虫種、NCR及びWCR、及び半翅目害虫種、NBSB及びWTPに対して活性を示した。

【0299】

Pir AB融合タンパク質TIC11302は、鱗翅目害虫種、SWCB、ECB、及びVBC、鞘翅目害虫種、WCR、ならびに半翅目害虫種、NBS及びWTPに対して活性を示した。

【0300】

実施例3

Pir A、Pir Bの混合物、及びPir AB融合タンパク質の混合物は昆虫バイオアッセイにて鱗翅目、鞘翅目、及び半翅目に対する活性を示す。

40

この実施例は、種々の濃度にてPir Aタンパク質TIC7575及びTIC7660をPir Bタンパク質TIC7576及びTIC7661と混合することによって、と同様にPir AB融合タンパク質TIC9316とTIC9317；TIC9316とTIC11301；及びTIC9317とTIC11302とを混合することによって示される阻害活性を説明する。

【0301】

種々の濃度でのPir Aタンパク質とPir Bタンパク質の混合物、及びPir AB融合タンパク質の混合物を昆虫餌で提示し、鱗翅目害虫種、BCW、SWC、及びVBC、鞘翅目害虫種、WCR及びNCR、ならびに半翅目害虫種、NBSBに対する活性につい

50

てアッセイした。混合物は様々な濃度の毒素タンパク質を含んでいた。以下の表16は各混合物で活性が観察された昆虫種を示している。

表16. P i r A 毒素タンパク質とP i r B 毒素タンパク質の混合物及びP i r A B 融合タンパク質の混合物のバイオアッセイ活性。

| 混合物 | 活性 |
|--|-------------------------|
| T I C 7 5 7 5、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 5 7 6、0. 1 8 7 5 m g / m L | B C W ; V B C ; N B S B |
| T I C 7 5 7 5、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 5 7 6、0. 1 8 7 5 m g / m L ; 最終では0. 5 m g / m Lについて2倍 | N C R ; W C R ; N B S B |
| T I C 7 5 7 5、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 6 6 1、0. 1 8 7 5 m g / m L ; 最終では0. 5 m g / m Lについて2倍 | N C R ; W C R |
| T I C 7 6 6 0、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 5 7 6、0. 1 8 7 5 m g / m L ; 最終では0. 5 m g / m Lについて2倍 | N C R ; W C R |
| T I C 7 6 6 0、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 6 6 1、0. 1 8 7 5 m g / m L ; 最終では0. 5 m g / m Lについて2倍 | N C R ; W C R |
| T I C 7 5 7 5、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 5 7 6、0. 1 2 5 m g / m L ; T I C 7 6 6 0、0. 0 6 2 5 m g / m L | W C R ; V B C |
| T I C 7 5 7 5、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 6 6 0、0. 0 6 2 5 m g / m L ; T I C 7 6 6 1、0. 1 2 5 m g / m L | W C R |
| T I C 9 3 1 6、0. 0 4 m g / m L ; T I C 9 3 1 7、0. 0 1 m g / m L | V B C |
| T I C 9 3 1 6、0. 0 2 5 m g / m L ; T I C 9 3 1 7、0. 0 2 5 m g / m L | V B C |
| T I C 9 3 1 6、0. 2 5 m g / m L ; T I C 9 3 1 7、0. 2 5 m g / m L | N B S |
| T I C 9 3 1 6、0. 4 m g / m L ; T I C 9 3 1 7、0. 1 m g / m L | N B S |
| T I C 9 3 1 6、0. 0 4 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 1、0. 0 1 m g / m L | V B C ; S W C |
| T I C 9 3 1 6、0. 0 2 5 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 1、0. 0 2 5 m g / m L | V B C |
| T I C 9 3 1 6、0. 0 1 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 1、0. 0 4 m g / m L | V B C |
| T I C 9 3 1 6、0. 1 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 1、0. 4 m g / m L | N B S |
| T I C 9 3 1 6、0. 4 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 1、0. 1 m g / m L | V B C ; N B S B |

10

20

30

40

| | |
|---|-------|
| T I C 9 3 1 7、0. 0 1 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 2、0. 0 4 m g / m L | V B C |
| T I C 9 3 1 7、0. 2 5 m g / m L ; T I C 1 1 3 0 2、0. 2 5 m g / m L | N B S |

50

【0302】

表16に見られるように、PirAタンパク質TIC7575及びTIC7660とPirBタンパク質TIC7576及びTIC7661の混合物は、対応する融合タンパク質TIC9316及びTIC9317と同様の活性を提供した。PirAB融合タンパク質TIC9316とTIC9317；TIC9316とTIC11301；TIC9317とTIC11302の混合物は、融合タンパク質の一方または双方と同様の活性を示した。

【0303】

実施例4

植物細胞での発現のためのPirAB融合タンパク質TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及びTIC11302をコードする合成コード配列の設計

植物におけるPirAB融合タンパク質TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及びTIC11302の発現に使用するために合成または人工のコード配列を構築した。これらの合成コード配列をバイナリー植物形質転換ベクターにクローニングし、植物細胞を形質転換するのに使用した。PirAB融合タンパク質のアミノ酸配列を維持しながら、ATTAA及びA/Tリッチ植物のポリアデニル化配列のような特定の非現実的な問題配列を回避して、米国特許第5,500,365号に一般的に記載されている方法に従って合成核酸配列を合成した。PirAB融合タンパク質TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、及びTIC11302の合成コード配列を表17に提示する。TIC6880PL、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、及びTIC10381PLをコードするコード配列は、PirAB融合タンパク質コード配列内の対応するPirAコード配列部分の開始メチオニン残基の直後に追加のアラニンコドンを含有していた。

10

20

30

40

50

表17. *PirAB*融合タンパク質TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、及びTIC11302をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列。

| <i>PirAB</i> 融合 タンパク質 | スクレオチド の配列番号 | タンパク質 の配列番号 | <i>PirA</i> タ ンパク質 | <i>PirB</i> タ ンパク質 |
|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| TIC6880PL* | 49 | 50 | TIC4771* | TIC4772 |
| TIC9316 | 51 | 12 | TIC7575 | TIC7576 |
| TIC9317 | 52 | 18 | TIC7660 | TIC7661 |
| TIC9318 | 53 | 24 | TIC7662 | TIC7663 |
| TIC9319 | 54 | 30 | TIC7664 | TIC7665 |
| TIC9320 | 55 | 42 | TIC7668 | TIC7669 |
| TIC9322 | 56 | 36 | TIC7666 | TIC7667 |
| TIC10376PL* | 146 | 147 | TIC10358* | TIC10367 |
| TIC10378PL* | 148 | 149 | TIC10361* | TIC10370 |
| TIC10380PL* | 150 | 151 | TIC10363* | TIC10372 |
| TIC10381PL* | 152 | 153 | TIC10364* | TIC10373 |
| TIC11302 | 158 | 119 | TIC7660 | TIC7576 |

*開始メチオニン残基の直後に追加のアラニン残基を含む。

【0304】

TIC11103及びTIC11104の合成コード配列及び対応するタンパク質配列を以下の表18に提示する。

表18. *PirAB*融合タンパク質TIC11103及びTIC11104をコードする植物細胞での発現に使用される合成コード配列。

| <i>PirAB</i> 融合 タンパク質 | スクレオチド の配列番号 | タンパク質 の配列番号 | <i>PirB</i> タ ンパク質 | <i>PirA</i> タ ンパク質 |
|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| TIC11103 | 154 | 155 | TIC7661 | TIC7660 |
| TIC11104 | 156 | 157 | TIC7663 | TIC7662 |

【0305】

実施例5

植物細胞における*PirAB*融合タンパク質の発現のための発現カセット

種々の植物発現カセットが表17に記述されている配列で設計された。そのような発現カセットは植物プロトプラストにおける一過性発現または植物細胞の形質転換に有用である。典型的な発現カセットは植物細胞内のタンパク質の最終的な配置に関して設計される。色素体を標的とするタンパク質については、合成TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、及びTIC11302殺虫性タンパク質コード配列が葉緑体を標的とするシグナルペプチドのコード配列とインフレームで操作可能に連結される。得られた植物形質転換ベクターは、リーダーに5'で操作可能に連結さ

10

20

30

40

50

れ、イントロンに 5' で操作可能に連結され（または任意でイントロンなし）、色素体を標的とするまたは標的としない T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、及び T I C 1 1 3 0 2 タンパク質をコードする合成コード配列に 5' で操作可能に連結され、次に 3' U T R に 5' で操作可能に連結される構成的プロモーターを含む殺虫性タンパク質の発現のための第 1 の導入遺伝子カセットと、グリホサートまたは抗生物質の選択を用いて形質転換された植物細胞を選択するための第 2 の導入遺伝子カセットとを含む。上記に記載されている要素はすべて、例えば、制限エンドヌクレアーゼ部位またはライゲーション非依存性クローニング部位のような発現カセットの構築のために提供される追加の配列と共に連續して配置されることが多い。

10

【0306】

実施例 6

T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 1 0 3 7 6、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、及び T I C 1 0 3 8 1 を発現しているトランスジェニックトウモロコシ植物は、鱗翅目害虫種に対する活性を示す

この実施例は、トランスジェニックトウモロコシ植物で発現させ、鱗翅目害虫種に対してアッセイした場合の、P i r A B 融合タンパク質 T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、及び T I C 1 0 3 8 1 の阻害活性を説明する。

20

【0307】

T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 1 0 3 7 6、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、または T I C 1 0 3 8 1 を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターを、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングした。植物形質転換ベクターは、リーダーに 5' で操作可能に連結され、イントロンに 5' で操作可能に連結され、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 1 0 3 7 6、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、または T I C 1 0 3 8 1 をコードする合成コード配列に 5' で操作可能に連結され、3' U T R に 5' で操作可能に連結される植物で発現可能なプロモーターを含む T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 1 0 3 7 6、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、または T I C 1 0 3 8 1 殺虫性タンパク質を発現するための第 1 の導入遺伝子カセットと、グリホサートを用いて形質転換植物細胞を選択するための第 2 の導入遺伝子カセットとを含んでいた。得られたベクターを用いて、A g r o b a c t e r i u m が介在する形質転換法を用いてトウモロコシ植物を安定して形質転換した。形質転換された細胞は当該技術分野で既知の方法によって植物を形成するように誘導した。植物のリーフディスクを使用するバイオアッセイは、米国特許第 8,344,207 号に記載されているものと同様に実施した。形質転換されていないトウモロコシ植物を用いて、陰性対照として使用される組織を得た。各バイナリーベクターからの複数の形質転換事象を、鱗翅目害虫種、F A W、C E W、S W C B、E C B、及び B C W に対して評価した。

30

【0308】

T I C 9 3 1 6 を発現するいくつかの形質転換された事象は S W C B 及び E C B に対して良好から中程度の阻害活性を示した。同様に、T I C 9 3 1 7 を発現する形質転換事象も S W C B 及び E C B に対して良好から中程度の阻害活性を示した。T I C 9 3 1 8 を発現する形質転換事象は S W C B 及び E C B に対して良好から優れた阻害活性を示した。T I C 1 0 3 7 6、T I C 1 0 3 7 8、T I C 1 0 3 8 0、及び T I C 1 0 3 8 1 を発現する形質転換事象は S W C B に対して良好から中程度の活性を示した。

40

【0309】

実施例 7

安定して形質転換されたトウモロコシ植物で発現された場合の鞘翅目トウモロコシ根切り虫害虫に対する P i r A B 融合タンパク質の活性のアッセイ

50

この実施例は、トウモロコシの根を常食とする様々な鞘翅目種に対する T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2 の阻害活性を説明する。

【0310】

色素体を標的とする及び標的としない T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2 の双方を発現するように設計した導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターを、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、それらは表17及び18に示されるような配列を含む。得られたベクターを用い、当該技術分野で既知の方法を用いてトウモロコシ植物を安定して形質転換する。単一の T - D N A 挿入事象を選択し、増殖させる。殺虫活性は、安定して形質転換されたトウモロコシ植物の根を常食とする鞘翅目害虫、N C R、S C R、及びW C R に対してアッセイする。

10

【0311】

R₀ の安定して形質転換された植物を用いて、鞘翅目耐性についてアッセイし、同様に F₁ 子孫を生成する。各バイナリーベクターの形質転換から複数の單一コピー事象を選択する。バイナリーベクターの形質転換から生じる事象の一部を R₀ 鞘翅目アッセイで使用する一方で、事象の別の部分を用いてさらなる試験のために F₁ 子孫を生成する。

20

【0312】

R₀ アッセイ植物を 8 インチのポットに移植する。植物に、W C R、N C R、またはS C R の卵を接種する。卵は接種前に約 10 日間インキュベートし、接種後 4 日で孵化が起これり、十分な数の幼虫が確実に生き残るようにし、トウモロコシの根を攻撃することができる。形質転換された植物はおよそ V 2 ~ V 3 のステージで接種される。植物は侵入後およそ 28 日間生育させる。ポットから植物を取り出し、根を慎重に洗浄し、すべての土を取り除く。根への損傷は、表19に提示するように 1 ~ 5 の損傷評価尺度を用いて評価する。陰性対照とも比較を行ってアッセイが適正に実施されていることを保証する。各バイナリーベクターの形質転換のための複数の R₀ の事象を鞘翅目アッセイに使用する。低い根の損傷スコアは、調べた鞘翅目害虫に対する調べた P i r A B 融合タンパク質によって付与された耐性を示す。

30

表19. R₀ の根の損傷の評価尺度。

| 根の損傷尺度 | 説明 |
|--------|------------------|
| 1 | 目に見える摂食なし |
| 2 | 一部の摂食；切り取りなし |
| 3 | 少なくとも 1 つの根の切り取り |
| 4 | 節全体が切り取られた |
| 5 | 複数の節が切り取られた |

40

【0313】

各バイナリーベクターの形質転換から生じる R₀ の安定して形質転換された事象の一部は F₁ 子孫を作り出すために使用される。R₀ の安定して形質転換された植物は自家受精させて、F₁ 子孫を作り出す。F₁ 種子が植えられる。ヘテロ接合性植物は、当該技術分野で既知の分子的方法によって同定され、鞘翅目の害虫に対するアッセイ、と同様に毒素タンパク質の E L I S A 発現測定に使用される。各事象に由来するヘテロ接合性の F₁ 子孫の一部を昆虫アッセイに使用する一方で、別の部分は毒素タンパク質の発現を測定するのに使用する。

50

【0314】

W C R、N C R、またはS C Rからの卵は接種後4日以内に孵化できるように約10日間インキュベートする。W C Rについては、各ポットに約2,000個の卵が接種される。N C Rについては、この種の卵の入手可能性が低いため、使用する卵が少なくてよい。植物はほぼV2～V3のステージで接種される。植物は侵入後およそ28日間生育させる。ポットから植物を取り出し、根を慎重に洗浄し、すべての土を取り除く。根への損傷は、表20に提示するように0～3の損傷評価尺度を用いて評価する。陰性対照と比較を行ってアッセイが適正に実施されていることを保証する。低い根の損傷スコアは、T I C 6 8 8 0 P L、T I C 9 3 1 6、T I C 9 3 1 7、T I C 9 3 1 8、T I C 9 3 1 9、T I C 9 3 2 0、T I C 9 3 2 2、T I C 1 0 3 7 6 P L、T I C 1 0 3 7 8 P L、T I C 1 0 3 8 0 P L、T I C 1 0 3 8 1 P L、T I C 1 1 1 0 3、T I C 1 1 1 0 4、またはT I C 1 1 3 0 2によって付与された鞘翅目の害虫に対する耐性を示す。

表20. F₁の根の損傷の評価尺度。

| 根の損傷尺度 | 説明 |
|-----------------|--|
| 0 | 目に見える摂食なし |
| 0. 0 1 - 0. 0 9 | 食痕及び摂食痕 |
| 0. 1 - 0. 9 | 断根、ただし完全な節に満たない |
| 1. 0 - 1. 9 | 植物の1.5インチ以内に破壊された少なくとも完全な節 (または同等物) |
| 2. 0 - 2. 9 | 2以上の節がなくなった |
| 3 | 3以上の節がなくなった |

10

20

【0315】

実施例8

安定して形質転換されたトウモロコシ、ダイズまたはワタ植物で発現された場合の鱗翅目害虫に対するP i r A B融合タンパク質の活性のアッセイ。

この実施例は、P i r A B融合タンパク質の1つを発現する安定して形質転換されたトウモロコシ、ダイズまたはワタ植物由来の組織を摂食した種々の鱗翅目害虫種に対する活性のアッセイを説明する。

30

【0316】

P i r A B融合タンパク質の色素体を標的とする型及び標的としない型の双方を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターは、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、表17及び18に提示されるコード配列を含む。

【0317】

トウモロコシ、ダイズ、またはワタは、A g r o b a c t e r i u mが介在する形質転換法を用いて上記に記載されているバイナリー形質転換ベクターで形質転換される。形質転換された細胞は、当該技術分野で既知の方法によって植物を形成するように誘導される。植物のリーフディスクを使用するバイオアッセイは米国特許第8,344,207号に記載されているものと同様に実施される。形質転換されていないトウモロコシ、ダイズ、またはワタの植物を用いて陰性対照として使用する組織を得る。各バイナリーベクターからの複数の形質転換事象を、B C W、C E W、D B M、E C B、F A W、S A W、S B L、S W C B、T B W、及びV B Cのような、しかし、これらに限定されない鱗翅目害虫に対して評価する。昆虫バイオアッセイにて発育阻害及び/または大量死を示すこれらの昆虫は、調べたP i r A B融合タンパク質の影響を受けやすいと判定されている。

40

【0318】

実施例9

50

安定的して形質転換されたキャノーラ植物で発現された場合のノミハムシ害虫に対する P i r A B 融合タンパク質の活性のアッセイ

この実施例は、P i r A B 融合タンパク質の 1 つを発現するトランスジェニックキャノーラ植物全体またはトランスジェニックキャノーラ植物に由来する組織を常食とさせた場合のノミハムシの種々の種に対する活性のアッセイを説明する。

【 0 3 1 9 】

P i r A B 融合タンパク質の色素体を標的とする型及び標的としない型の双方を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターは、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、表 1 7 及び 1 8 に提示されるコード配列を含む。

【 0 3 2 0 】

得られたバイナリー形質転換ベクターを用い、当該技術分野で既知の方法を用いてキャノーラ植物細胞を安定して形質転換する。形質転換された細胞は植物を形成するように誘導される。植物のリーフディスクを使用するバイオアッセイは、野外で収集されたノミハムシを用いた米国特許第 8,344,207 号に記載されているものと同様に実行される。形質転換されていないキャノーラ植物を用いて陰性対照として使用する組織を得る。各バイナリーベクターからの複数の形質転換事象は、例えば、アブラナ科ノミハムシ (Phyllotreta cruciferae)、縞模様ノミハムシ (Phyllotreta striolata)、西洋クロノミハムシ (Phyllotreta pusilla 等) のような、しかし、これらに限定されない鞘翅目のノミハムシ害虫に対して評価される。ノミハムシが摂食し続けるので、ノミハムシの大量死を毎日判定する。リーフディスクは 12 日間にわたって 2 日～3 日ごとに交換し、ノミハムシが摂食のために新鮮な材料を利用できるようにし、試料中のタンパク質分解の影響を減らす。

【 0 3 2 1 】

あるいは、形質転換されたキャノーラ植物は、ノミハムシの蔓延が存在する畑に植えることができる。土壤から出てきたノミハムシが実験区画から逃げるのを防ぐために、植物をテントに収容することができる。キャノーラの葉の損傷評価を利用して、どの植物がさらに少ない損傷を経験し、ノミハムシに対する耐性を示したかを判定することができる。

【 0 3 2 2 】

実施例 1 0

安定して形質転換されたダイズ植物における半翅目害虫に対する P i r A B 融合タンパク質の活性のアッセイ

この実施例は、P i r A B 融合タンパク質の 1 つを発現するように安定して形質転換されたダイズ植物における半翅目害虫に対する活性のアッセイを説明する。

【 0 3 2 3 】

P i r A B 融合タンパク質の 1 つの色素体を標的とする型及び標的としない型の双方を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターは、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、表 1 7 及び 1 8 に提示されるコード配列を含む。ダイズ植物は、バイナリー植物形質転換ベクターを用いて形質転換される。形質転換されたダイズ植物細胞は植物全体を形成するように誘導される。半翅目害虫に対する活性のアッセイは、半翅目害虫の種及びその害虫の好ましい標的組織に依存する種々の技術を用いて実施される。例えば、カメムシの半翅目害虫種は通常、ダイズ植物の発育中の種子や鞘を常食とする。カメムシに対する活性をアッセイするために、R 5 ステージの鞘を P i r A B 融合タンパク質の 1 つを発現するトランスジェニックダイズ植物から収穫し、寒天または湿った紙の層を含有するカバー付きペトリ皿または大型マルチウェルプレートに入れて摂食環境に湿度を提供する。2 齢のカメムシの幼虫をペトリ皿または大型マルチウェルプレートに入れる。乾燥を防ぎながら酸素交換を提供するカバーを摂食環境の上に置く。カメムシの幼虫は数日間摂食できるようにする。発育阻害及び大量死の測定を行い、形質転換されていないダイズ植物由来の鞘を常食としているカメムシの幼虫と比較する。

10

20

30

40

50

【0324】

あるいは、活性のアッセイは、安定して形質転換された植物全体で実施することもできる。PirAB融合タンパク質の1つを発現する形質転換植物は栽培箱または温室で生育させる。R5ステージでは、植物は通気性のあるプラスチック製の「受粉」シート(Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL)から作られたケージに封入する。シートスリーブは、Velcro(登録商標)タイを用いて土壤表面のすぐ上の主幹に固定する。各植物には特定の数の2齢のカメムシの幼虫が付く。幼虫はケージ側の小さなスリットから個々のケージに放され、昆虫が逃げないようにケージをしつかりと閉じる。幼虫は数日から1週間以上ダイズの鞘を摂食できるようにする。毎日観察を利用して発育阻害と大量死の測定値を決定する。摂食期間の終了時に、生きている幼虫と死んだ幼虫を回収する。植物をケージの下で切り取り、実験室に移し、そこで各植物の昆虫を回収する。ケージを開ける前に、植物を激しく振って、確実にすべての昆虫が摂食部位からケージの底に落ちるようにする。次に、ケージの底を開け、すべての植物材料を取り出し、黒いシート上に置く。昆虫は、吸引器または他の手段を用いて回収することができる。昆虫の数とその発育段階を各植物について記録する。また、死んだ幼虫の数と発達段階も記録する。これらの測定値を、陰性対照の形質転換されていない植物から得られた測定値と比較する。

10

【0325】

カメムシの幼虫の発育の遅れ(発育阻害)または大量死は、形質転換されていない対照と比較した場合に有意差があれば、毒性の指標として解釈される。

20

【0326】

実施例1 1

安定して形質転換されたトウモロコシ植物における半翅目害虫に対するPirAB融合タンパク質の活性のアッセイ

この実施例は、PirAB融合タンパク質の1つを発現するように安定して形質転換されたトウモロコシ植物における半翅目害虫に対する活性のアッセイを説明する。

30

【0327】

PirAB融合タンパク質の1つの色素体を標的とする型及び標的としない型の双方を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターは、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、表17及び18に提示されるコード配列を含む。トウモロコシ植物はバイナリー植物形質転換ベクターを用いて形質転換される。形質転換されたトウモロコシ植物細胞は植物全体を形成するように誘導される。半翅目害虫に対する活性のアッセイは、半翅目害虫の種及びその害虫の好ましい標的組織に依存する種々の技術を用いて実施される。例えば、カメムシの半翅目害虫種は通常、春の終わりまたは初夏に若いトウモロコシ植物を常食とし、その結果、葉に穴を開け、ひどい場合は植物を変形させる。夏の終わりに、カメムシは通常、穂自体を常食とし、穀粒を直接破壊する。

【0328】

カメムシに対する活性をアッセイする1つの方法は、大型マルチウェルプレートにてPirAB融合タンパク質の1つを発現する安定して形質転換されたトウモロコシ植物に由来するリーフディスクにカメムシの幼虫を曝露することである。2齢期のカメムシの幼虫を、安定して形質転換されたトウモロコシ植物に由来するリーフディスクと共に大型マルチウェルプレートに入れ、数日間摂食させる。発育阻害と大量死の測定を行い、形質転換されていないトウモロコシのリーフディスクを摂食したカメムシの幼虫と比較する。

40

【0329】

あるいは、形質転換された植物全体を用いてカメムシに対する活性をアッセイすることができる。PirAB融合タンパク質の1つを発現する安定して形質転換されたトウモロコシ植物は、実施例4のダイズ植物について記載されたのと同様の方法でケージに封入する。2齢の幼虫をV3ステージのトウモロコシ植物に導入し、数日～1週間摂食させる。所定の摂食期間の後、生きている幼虫及び死んだ幼虫を回収する。発育阻害と大量死の測

50

定値を形質転換されていない対照植物と比較する。

【0330】

安定して形質転換されたトウモロコシの穂を用いてカメムシに対する活性をアッセイするため、V3ステージの植物で分析するのと同様のアプローチを利用することができる。PirAB融合タンパク質の1つを発現する安定して形質転換されたトウモロコシ植物の発育中のトウモロコシの穂は、カメムシの幼虫の逃亡を防ぎながら空気の自由な交換を可能にする材料のシートを用いて被包する。被包した穂には、2齢期のカメムシの幼虫がはびこり、数日～1週間、発達中の穂の穀粒を常食にさせる。発育阻害と大量死の測定値を形質転換されていない対照植物の穂と比較する。

【0331】

実施例12

安定して形質転換されたワタ植物における半翅目害虫に対するPirAB融合タンパク質の活性のアッセイ

この実施例は、PirAB融合タンパク質の1つを発現するように安定して形質転換されたワタ植物における半翅目害虫に対する活性のアッセイを説明する。

【0332】

PirAB融合タンパク質の1つの色素体を標的とする型及び標的としない型の双方を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含むバイナリー植物形質転換ベクターは、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングし、表17及び18に提示されるコード配列を含む。ワタ植物はバイナリー植物形質転換ベクターを用いて形質転換される。形質転換されたワタ植物細胞は植物全体を形成するように誘導される。半翅目害虫に対する活性のアッセイは、半翅目害虫の種及びその害虫の好ましい標的組織に依存する種々の技術を用いて実施される。例えば、カメムシの半翅目害虫種は通常、種子を食べる虫なので、ワタの朔果への損傷が主な懸念事項である。それらは主に朔果に穴を開けて種子を食べることによってワタを損傷する。それらの摂食活動は、摂食が起こった大きな朔果の外側に直径約1/16インチの暗斑を生じることができる。種子の摂食は摂食部位の近くで綿毛の生成を減らし、綿毛を汚す可能性がある。そのサイズのために、成虫と4齢及び5齢の幼虫とは朔果に損傷を与える可能性が最も高く、したがって、幼虫の初期段階で昆虫を殺傷することが重要である。Lygus属の半翅目害虫種は、主にスクエアと若い朔果を常食とする。幼虫はより貪欲な食べる虫であり、最も深刻な被害を引き起こす傾向がある。スクエアを常食にするとき、Lygusは発達中の薬を標的にし、その結果、スクエアが縮んで植物から落下することが多い。朔果に発展するそれらのスクエアについては、朔果は花粉、未受精の種子、及び空の小室を形成することができない薬を有してもよい。朔果を常食とするとき、Lygusは発育中の種子を標的にし、朔果の外側に小さな黒いくぼんだ斑点を生じる。

【0333】

安定して形質転換されたワタ植物におけるPirAB融合タンパク質の活性をアッセイする1つの方法は、昆虫バイオアッセイでスクエアを使用することである。スクエアは、TIC6880PL、TIC9316、TIC9317、TIC9318、TIC9319、TIC9320、TIC9322、TIC10376PL、TIC10378PL、TIC10380PL、TIC10381PL、TIC11103、TIC11104、またはTIC11302を発現している形質転換ワタ植物から回収される。スクエアをペトリ皿に入れることができ、または各スクエアを大型ウェルプレートのウェルに入れることができる。若い新生子のLygusまたはカメムシの幼虫をペトリ皿または大型ウェルプレートに入れ、所定の時間摂食させる。発育阻害と大量死の測定を、摂食の時間経過にわたって行い、形質転換されていないワタ植物に由来するスクエアがアッセイに使用される対照と比較する。

【0334】

あるいは、活性のアッセイは形質転換されたワタ植物全体で実施することができる。例えば、Lygus種に対してアッセイするために、PirAB融合タンパク質の1つを発

10

20

30

40

50

現する植物に由来する R₁ 種子を 10 インチのポットに播種する。形質転換されていないワタ植物、好ましくは形質転換された植物と同じ品種からのものが陰性対照として使用される。植物は、摂氏 32 度で 16 時間の明期と摂氏 23 度で 8 時間の暗期の光周期、及び 800 ~ 900 マイクロアインシュタインの間の光強度での環境室内で維持される。植え付け後 40 日から 45 日で、個々の植物を通気性のあるプラスチックの「受粉」シート (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL) で作られたケージに封入する。シートスリーブは Velcro (登録商標) タイを用いて土壤表面のすぐ上の主幹に固定される。実験室飼育からの性的に成熟したオスとメスの *Lygus lineolaris* または *Lygus hesperus* の成虫 (6 日齢) の 2 つのペアを、14 ミリリットルの丸底プラスチック試験管 (Bacton Dickson Labware, Franklin Lakes, NJ) に回収し、各植物に使用する。成虫はケージ側の小さなスリットから個々のケージに放され、昆虫が逃げないようにケージをしっかりと閉じる。昆虫を交尾させ、植物を 21 日間ケージで保持する。

【0335】

21 日後、植物をケージの下で切り取り、実験室に移し、そこで各植物の昆虫を回収し、数える。ケージを開ける前に、植物を激しく振って、確実にすべての昆虫が摂食部位からケージの底に落ちるようにする。次に、ケージの底を開け、すべての植物材料を取り出し、黒いシート上に置く。吸引器を用いて昆虫を回収する。その後、植物を十分に検査して、残っている昆虫を回収する。回収した昆虫の数とその発育段階を各植物について記録する。*Lygus* の成熟度：3 齢、4 齢、5 齢までの幼虫及び成虫に基づいて昆虫の総数をいくつかの群に分ける。

【0336】

カメムシ種に対してアッセイするために、PirAB 融合タンパク質の 1 つを発現する植物に由来する R₁ 種子を上記に記載されているようにポットに播種し、増殖させてケージに入れる。形質転換されていないワタ植物も陰性対照として使用される。2 齢のカメムシの幼虫を用いて植物に侵入させ、数日または数週間、スクエア及び朔果を摂食させる。ケージに入れられた植物を上記に記載されているように回収し、回収されたカメムシを、記録された幼虫の成熟度と同様に、大量死についても調べ、スコア化する。次いで、これらのスコアを陰性対照植物と比較する。

【0337】

実施例 1 3

安定して形質転換されたトウモロコシ植物で発現した場合 TIC9318 及び TIC11302 は西洋トウモロコシ根切り虫害虫に対する活性を実証する

この実施例は、安定して形質転換されたトウモロコシ植物における西洋トウモロコシ根切り虫 (*Diabrotica virgifera*、WCR) に対する TIC9318 及び TIC11302 の阻害活性を説明する。

【0338】

トウモロコシ植物は、TIC9318 または TIC11302 のいずれかの発現のための発現カセットを含むバイナリー植物形質転換構築物で形質転換された。バイナリー植物形質転換ベクターは、TIC9318 及び TIC11302 を発現するように設計された導入遺伝子カセットを含み、当該技術分野で既知の方法を用いてクローニングされた。植物形質転換ベクターは、リーダーに 5' で操作可能に連結され、イントロンに 5' で操作可能に連結され、TIC9318 または TIC11302 をコードする合成コード配列に 5' で操作可能に連結され、3' UTR に 5' で操作可能に連結される植物で発現可能なプロモーターを含む、TIC9318 または TIC11302 殺虫性タンパク質の発現のための第 1 の導入遺伝子カセットと、グリホサートを用いて形質転換植物細胞を選択するための第 2 の導入遺伝子カセットとを含んだ。得られたベクターを用い、Agrobacterium が介在する形質転換法を用いてトウモロコシ植物を安定して形質転換した。形質転換された細胞は、当該技術分野で知られている方法によって植物を形成するように誘導された。

10

20

30

40

50

【0339】

R_0 の安定して形質転換された植物を用いて WCR 耐性について TIC11302 をアッセイし、同様に F_1 の子孫を生成した。各バイナリーベクターの形質転換から複数の單一コピー事象を選択した。各バイナリーベクター形質転換から生じる事象の一部は R_0 の WCR アッセイに使用した。

【0340】

R_0 のアッセイ植物を 8 インチのポットに移植した。植物に WCR 由来のそれぞれ約 2,000 個の卵が接種した。十分な数の幼虫が確実に生き残るように接種前に卵を約 10 日間インキュベートして、接種後 4 日で孵化させ、トウモロコシの根を攻撃することができた。各ポットに約 2,000 個の WCR の卵を接種した。形質転換された植物にほぼ V2 ~ V3 のステージで接種した。植物は侵入後約 28 日間生育させた。植物をポットから取り出し、根を慎重に洗浄して、すべての土を取り除いた。根への損傷は実施例 17 の表 19 に提示するように、1 ~ 5 の損傷評価尺度を用いて評価した。アッセイが適切に行われたことを保証するために、陰性対照との比較も行った。各 TIC11302 バイナリーベクター形質転換のための複数の R_0 事象を WCR アッセイで使用した。

10

【0341】

TIC9318 と TIC11302 の各バイナリーベクター形質転換から生じる R_0 の安定して形質転換された事象の一部を用いて F_1 子孫を生成した。 R_0 の安定して形質転換された植物を自家受精させて F_1 子孫を生成した。 F_1 種子を 8 インチのポットに播種した。ヘテロ接合性植物は、当該技術分野で既知の分子的方法を介して同定し、WCR に対するアッセイに使用した。WCR 卵の接種は、上記に記載されているように R_0 の安定して形質転換された事象について記載された通りであった。根への損傷は、実施例 7 の表 20 に提示されるように 0 ~ 3 の損傷評価尺度を用いて評価した。アッセイが適切に行われたことを保証するために陰性対照と比較を行った。各構築物の平均根損傷評価 (RDR) を以下の表 21 に提示するが、その際、「NT」は調べられていないことを示す。

20

表 21. TIC9318 または TIC11302 で安定して形質転換されたトウモロコシ植物の平均根損傷評価 (RDR)。

| 構築物 | PirAB 融合タンパク質 | ヌクレオチドの配列番号 | タンパク質の配列番号 | R_0 の RDR | R_0 の陰性対照 RDR | F_1 の RDR | F_1 の陰性対照 RDR |
|-------|------------------|-------------|------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 構築物_1 | TIC9318 | 53 | 24 | NT | NT | 1.4 | 2.8 |
| 構築物_2 | TIC9318 | 53 | 24 | NT | NT | 1.5 | 1.8 |
| 構築物_3 | TIC9318 | 53 | 24 | NT | NT | 1.2 | 1.8 |
| 構築物_4 | TIC11302 | 158 | 119 | 2.9 | 4.1 | 1.5 | 1.8 |
| 構築物_5 | TIC11302 | 158 | 119 | 2.8 | 4.1 | 1.4 | 1.8 |
| 構築物_6 | TIC11302 | 158 | 119 | 2.9 | 4.1 | 1.4 | 1.8 |

30

【0342】

上記の表 21 に見られるように、TIC9318 と TIC11302 は双方とも、陰性対照と比較した場合に西洋トウモロコシ根切り虫 (*Diabrotica virgifera virgifera*) に対する耐性を示した。

40

【0343】

本明細書で開示され、請求されている組成物のすべては、本開示の観点で過度の実験を行なうことなく行い、実行することができる。本発明の組成物は前述の説明に役立つ実施形態という点で記載されてきたが、本発明の真の概念、精神、または範囲から逸脱することなく、本明細書に記載されている組成物に対して変形、変化、改変及び変更が適用されてもよいことが当業者には明らかであろう。さらに具体的には、同一または類似の結果が達成される一方で、化学的及び生理学的の双方に関連する特定の作用物質が、本明細書に記

50

載されている作用物質に置換されてもよいことが明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の置換及び改変はすべて、添付のクレームによって定義される本発明の精神、範囲、及び概念の範囲内にあるとみなされる。

【0344】

刊行物及び公開された特許はすべて、各個々の刊行物または特許出願が、参照によって具体的かつ個々に組み込まれることが指示されたかのようにと同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。

【配列表】

0007532345000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | F | I |
|------------|--|------------|--------|
| A 01 H | 6/34 (2018.01) | A 01 H | 6/34 |
| A 01 H | 6/46 (2018.01) | A 01 H | 6/46 |
| A 01 H | 6/54 (2018.01) | A 01 H | 6/54 |
| A 01 H | 6/58 (2018.01) | A 01 H | 6/58 |
| A 01 H | 6/74 (2018.01) | A 01 H | 6/74 |
| A 01 H | 6/82 (2018.01) | A 01 H | 6/82 |
| A 01 H | 6/88 (2018.01) | A 01 H | 6/88 |
| A 01 N | 63/20 (2020.01) | A 01 N | 63/20 |
| A 01 N | 63/50 (2020.01) | A 01 N | 63/50 |
| A 01 P | 7/04 (2006.01) | A 01 P | 7/04 |
| C 12 N | 5/04 (2006.01) | C 12 N | 5/04 |
| C 12 N | 5/10 (2006.01) | C 12 N | 5/10 |
| C 12 Q | 1/6813(2018.01) | C 12 Q | 1/6813 |
| C 07 K | 14/195 (2006.01) | C 07 K | 14/195 |
| C 12 N | 1/21 (2006.01) | C 12 N | 1/21 |
| C 12 N | 15/82 (2006.01) | C 12 N | 15/82 |
| | | | Z |
| | | | |
| | | 弁理士 安藤 健司 | |
| (74)代理人 | 100143823 | | |
| | | 弁理士 市川 英彦 | |
| (74)代理人 | 100183519 | | |
| | | 弁理士 櫻田 芳恵 | |
| (74)代理人 | 100196483 | | |
| | | 弁理士 川崎 洋祐 | |
| (74)代理人 | 100203035 | | |
| | | 弁理士 五味渕 琢也 | |
| (74)代理人 | 100160749 | | |
| | | 弁理士 飯野 陽一 | |
| (74)代理人 | 100160255 | | |
| | | 弁理士 市川 祐輔 | |
| (74)代理人 | 100202267 | | |
| | | 弁理士 森山 正浩 | |
| (74)代理人 | 100182132 | | |
| | | 弁理士 河野 隆 | |
| (74)代理人 | 100146318 | | |
| | | 弁理士 岩瀬 吉和 | |
| (74)代理人 | 100127812 | | |
| | | 弁理士 城山 康文 | |
| (72)発明者 | ボーウェン , デイビッド・ジェイ | | |
| | アメリカ合衆国、63167・ミズーリ、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード | | |
| | ・800 | | |
| (72)発明者 | チェイ , キャサリン・エー | | |
| | アメリカ合衆国、63167・ミズーリ、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード | | |
| | ・800 | | |
| (72)発明者 | シーシュ , トッド・エー | | |
| | アメリカ合衆国、63167・ミズーリ、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード | | |
| | ・800 | | |
| (72)発明者 | フラシンスキー , スタニスラフ | | |
| | アメリカ合衆国、63167・ミズーリ、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード | | |
| | ・800 | | |
| (72)発明者 | ハウ , アーリーン・アール | | |

アメリカ合衆国、63167・ミズーリ、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード
・800

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 国際公開第2017/035364 (WO, A1)
特表2018-525987 (JP, A)
特表2002-512036 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12N 5/00

A01H 5/00

A01H 6/00

C12Q 1/6813

A01P 7/04

A01N 63/50

A01N 63/20

C07K 14/195

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq