

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成29年3月2日 (2017.3.2)

【公開番号】特開2016-195597(P2016-195597A)

【公開日】平成28年11月24日 (2016.11.24)

【年通号数】公開・登録公報2016-065

【出願番号】特願2016-110908(P2016-110908)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

A 0 1 H 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

A 0 1 H 5/00 A

A 0 1 H 5/10

C 1 2 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月26日 (2017.1.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のヌクレオチド 1 4 3 1 からヌクレオチド 1 4 6 2 までのヌクレオチド配列又はその相補体を含む、核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 3 のヌクレオチド 2 2 0 から 2 6 1 までのヌクレオチド配列又はその相補体を含む、核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 2 のヌクレオチド配列又はその相補体を含む、請求項 1 記載の核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 3 のヌクレオチド配列又はその相補体を含む、請求項 2 記載の核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 1 1 のヌクレオチド配列、又は配列番号 1 1 に対して少なくとも 99% 配列同一性を有し、H P P D 阻害剤及び / 又はグリホセートに対する耐性をもたらしヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ダイズゲノム DNA。

【請求項 7】

ダイズ植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫であって、それぞれが H P P D 阻害剤及び / 又はグリホセートに対して耐性であり、そしてそれぞれが配列番号 2 のヌクレオチド 1 4 3 1 からヌクレオチド 1 4 6 2 までのヌクレオチド配列および配列番号 3 のヌクレオチド 2 2 0 から 2 6 1 までのヌクレオチド配列をそのゲノム中に含む、前記ダイズ

植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫。

【請求項 8】

配列番号 2 および 3 の配列を含む、請求項 7 記載のダイズ植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫。

【請求項 9】

配列番号 11 の配列を含む、請求項 7 記載のダイズ植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫。

【請求項 10】

ダイズ植物、細胞、部分、又は種子であって、それぞれが HPPD 阻害剤及び / 又はグリホセートに対して耐性であり、そしてそれぞれが優良イベント EE - GM3 をそのゲノム中に含み、ここで前記優良イベントは、寄託番号 NCIMB 41659 の下に NCIMB に寄託されているレファレンス種子中に見出される、キメラ HPPD PfW336 コード遺伝子及びキメラ 2mEPSPS コード遺伝子を含む外来性 DNA 並びに前記外来性 DNA に直接隣接する 5' 及び 3' フランキング配列を含む遺伝子座である、前記ダイズ植物、細胞、部分、又は種子。

【請求項 11】

請求項 10 記載のダイズ植物、細胞、部分、又は種子の子孫植物、細胞、部分、又は種子であって、配列番号 2 のヌクレオチド 1431 からヌクレオチド 1462 までのヌクレオチド配列および配列番号 3 のヌクレオチド 220 から 261 までのヌクレオチド配列を含む、前記子孫植物、細胞、部分、又は種子。

【請求項 12】

請求項 10 記載のダイズ植物、細胞、部分、又は種子、或いは該ダイズ植物の子孫であって、そのゲノム DNA が、それぞれ配列番号 4 及び配列番号 5 のヌクレオチド配列を含む 2 つのプライマーによる PCR を使用して分析した場合に、約 263 bp の DNA フラグメントを与える、前記ダイズ植物、細胞、部分、又は種子、或いは該ダイズ植物の子孫。

【請求項 13】

請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載のダイズ植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫から製造される、ダイズ製品。

【請求項 14】

ダイズ穀粉、粉碎種子、ダイズ粉末、若しくはダイズフレークであるか、又はそれを含む、請求項 13 記載のダイズ製品。

【請求項 15】

イベント EE - GM3 に対して診断的又は特異的であるアンプリコンを生成する核酸を含む、請求項 13 又は 14 記載のダイズ製品。

【請求項 16】

請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物、又はその細胞、部分、種子若しくは子孫を得ること、及びそれからダイズ製品を製造することを含む、ダイズ製品を製造する方法。

【請求項 17】

前記ダイズ製品が、ダイズ穀粉、粉碎種子、ダイズ粉末、若しくはダイズフレークであるか、又はそれを含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記ダイズ製品が、イベント EE - GM3 に対して診断的又は特異的であるアンプリコンを生成する核酸を含む、請求項 16 又は 17 記載の方法。

【請求項 19】

雑草を抑制する方法であって、請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ種子を播種した圃場を、ダイズ植物が出芽する前であるが種子を播種した後に、HPPD 阻害剤除草剤で処理することを含む、前記方法。

【請求項 20】

前記 H P P D 阻害剤除草剤がイソキサフルトールであり、ここで前記処理の後、グリホセート又は H P P D 阻害剤 - グリホセート混合物を植物の上面から出芽後除草剤として適用する、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

雑草を抑制する方法であって、請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物を、H P P D 阻害剤除草剤で当該植物の上面から処理することを含む、前記方法。

【請求項 22】

前記 H P P D 阻害剤除草剤が、グリホセートの処理と共に、その後、又はそれに先立って適用される、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

発芽成長中の請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物を雑草による競合から保護する方法であって、前記ダイズ植物を植栽すべき圃場を、前記ダイズ植物を植栽するか又は種子を播く前に、H P P D 阻害剤除草剤で処理し、続いて、予備処理された前記圃場に前記ダイズ植物を植栽するか又は種子を播くことを含む、前記方法。

【請求項 24】

グリホセート又は H P P D 阻害剤 - グリホセート混合物を植物の上面から出芽後除草剤として適用する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

前記 H P P D 阻害剤除草剤がイソキサフルトール系除草剤である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 26】

請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物又は種子を植栽又は播種した圃場において雑草を抑制する方法であって、
前記圃場を、有効量の H P P D 阻害剤除草剤及び / 又はグリホセートで処理することを含み、
前記ダイズ植物又は種子は、前記 H P P D 阻害剤除草剤及びグリホセートに耐性である、
前記方法。

【請求項 27】

請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物又は種子を植栽又は播種すべき圃場において雑草を抑制する方法であって、
前記植物又は種子を植栽又は播種すべき圃場を、有効量の H P P D 阻害剤除草剤及び / 又はグリホセートで処理し、続いて、前記圃場に前記植物又は種子を植栽又は播種することを含み、
前記植物又は種子は、前記 H P P D 阻害剤除草剤及びグリホセートに耐性である、
前記方法。

【請求項 28】

雑草を抑制する方法であって、
請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ種子を播種した圃場を、ダイズ植物が出芽する前であるが種子を播種した後に、有効量の H P P D 阻害剤除草剤で処理することを含み、
前記植物は、前記 H P P D 阻害剤除草剤に耐性である、
前記方法。

【請求項 29】

前記 H P P D 阻害剤除草剤がイソキサフルトール系除草剤である、請求項 26 ~ 28 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

グリホセート及び / 又はイソキサフルトール除草剤に耐性であるダイズ植物を製造する方法であって、
H P P D 阻害剤及び / 又はグリホセートに対する耐性を欠く第 1 のダイズ植物を請求項 7 ~ 12 のいずれか一項記載のダイズ植物と交雑させることにより、H P P D 阻害剤及び /

又はグリホセートに対する耐性をダイズ植物のゲノム内に導入すること、およびグリホセート及び／又はイソキサフルトールに対して耐性である子孫植物を選択すること、を含む、
前記方法。

【請求項 3 1】

生物学的試料中の優良イベント E E - G M 3 の存在又は非存在を検出する方法であって、
前記方法は、2つの特異的プライマーを用いた前記優良イベントの特異的領域の検出を含み、
該プライマーの一方は、前記優良イベントの5'又は3'フランキング領域内の配列を特異的に認識し、他方のプライマーは、前記5'又は3'フランキング領域に隣接する外来性DNA内配列を特異的に認識し、或いは
前記方法は、前記優良イベントの5'又は3'フランキング領域の部分及びそれに隣接する外来性DNAの部分の特異的に認識する特異的プローブを用いた前記優良イベントの特異的領域の検出を含み、
前記5'フランキング領域は、配列番号2のヌクレオチド1からヌクレオチド1451までのヌクレオチド配列又はその相補体を含み、
前記3'フランキング領域は、配列番号3のヌクレオチド241からヌクレオチド1408までのヌクレオチド配列又はその相補体を含み、そして
前記外来性DNAは、配列番号2のヌクレオチド1452からヌクレオチド1843までのヌクレオチド配列若しくは配列番号3のヌクレオチド1からヌクレオチド240までのヌクレオチド配列又はそれらの相補体を含むか、或いは配列番号11のヌクレオチド1452からヌクレオチド16638までのヌクレオチド配列を含む、
前記方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 記載の方法であって、
少なくとも2つのプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応を用いて前記生物学的試料中に存在する核酸から50～1000bpのDNAフラグメントを増幅させることを含み、
前記プライマーの一方は、E E - G M 3 中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性DNAの5'フランキング領域を認識するか、ここで前記5'フランキング領域は配列番号2のヌクレオチド1からヌクレオチド1451までのヌクレオチド配列を含む、またはE E - G M 3 中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性DNAの3'フランキング領域を認識し、ここで前記3'フランキング領域は配列番号3のヌクレオチド241からヌクレオチド1408までの相補体のヌクレオチド配列を含む、
前記プライマーの他方のプライマーは、配列番号2のヌクレオチド1452からヌクレオチド1843までの相補体のヌクレオチド配列または配列番号3のヌクレオチド1からヌクレオチド240までのヌクレオチド配列を含む、外来性DNA内の配列を認識するか、あるいは、
前記プライマーの他方のプライマーは、配列番号1のヌクレオチド188からヌクレオチド7252までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含むか、または配列番号11のヌクレオチド1452からヌクレオチド16638までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含む、外来性DNA内の配列を認識する、
前記方法。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 記載の方法であって、
5'フランキング領域を認識する前記プライマーは、その最3'末端において、配列番号2のヌクレオチド1からヌクレオチド1451までのヌクレオチド配列から選択される少なくとも17個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、
E E - G M 3 の3'フランキング領域を認識する前記プライマーは、その最3'末端において、配列番号3のヌクレオチド241からヌクレオチド1408までのヌクレオチド配

列の相補体のヌクレオチド配列から選択される少なくとも１７個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、

外来性ＤＮＡ内部の配列を認識する前記プライマーは、その最３'末端において、配列番号２のヌクレオチド１４５２からヌクレオチド１８４３までのヌクレオチド配列の相補体のヌクレオチド配列、または配列番号３のヌクレオチド１からヌクレオチド２４０までのヌクレオチド配列、または配列番号１のヌクレオチド１８８からヌクレオチド７２５２までのヌクレオチド配列もしくはその相補体、または配列番号１１のヌクレオチド１４５２からヌクレオチド１６６３８までのヌクレオチド配列もしくはその相補体から選択される少なくとも１７個の連続ヌクレオチドを含む、あるいは

前記プライマーは、それぞれ配列番号５および配列番号４の配列、または、それぞれ配列番号７および配列番号５の配列を含む、

前記方法。

【請求項３４】

ＥＥ－ＧＭ３の特異的検出における使用に適したプライマー対であって、

ＥＥ－ＧＭ３は、５'フランキング領域、外来性ＤＮＡおよび３'フランキング領域を含み、５'フランキング領域は外来性ＤＮＡの直近上流にありそれに近接しており、３'フランキング領域は外来性ＤＮＡの直近下流にありそれに近接しており、

前記プライマー対は、ＥＥ－ＧＭ３中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性ＤＮＡの５'フランキング領域内の配列を認識する第１のプライマーおよび５'フランキング領域に近接する挿入された外来性ＤＮＡ内の配列を認識する第２のプライマーを含むか、またはＥＥ－ＧＭ３中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性ＤＮＡの３'フランキング領域内の配列を認識する第１のプライマーおよび３'フランキング領域に近接する挿入された外来性ＤＮＡ内の配列を認識する第２のプライマーを含み、

ここで前記５'フランキング領域は配列番号２のヌクレオチド１からヌクレオチド１４５１までのヌクレオチド配列を含み、前記外来性ＤＮＡは配列番号１１のヌクレオチド１４５２からヌクレオチド１６６３８までのヌクレオチド配列を含み、そして前記３'フランキング領域は配列番号３のヌクレオチド２４１からヌクレオチド１４０８までのヌクレオチド配列を含む、

前記プライマー対。

【請求項３５】

前記プライマーの一方が、配列番号２のヌクレオチド１からヌクレオチド１４５１までのヌクレオチド配列から選択される１７から２００個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列、または配列番号３のヌクレオチド２４１からヌクレオチド１４０８までのヌクレオチド配列の相補体のヌクレオチド配列から選択される１７から２００個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、請求項３４に記載のプライマー対。

【請求項３６】

前記プライマーの一方が、その３'末端において、配列番号２のヌクレオチド１からヌクレオチド１４５１までのヌクレオチド配列から選択される１７から２００個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列、または配列番号３のヌクレオチド２４１からヌクレオチド１４０８までのヌクレオチド配列の相補体のヌクレオチド配列から選択される１７から２００個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、請求項３４に記載のプライマー対。

【請求項３７】

配列番号５の配列をその最３'末端に含む第１のプライマーおよび配列番号４の配列をその最３'末端に含む第２のプライマーを含む、請求項３４に記載のプライマー対。

【請求項３８】

請求項３１記載の方法であって、

生物学的試料の核酸を、優良イベントの５'または３'フランキング領域の部分およびそれに近接する外来性ＤＮＡの部分を含む領域に特異的にハイブリダイズするＥＥ－ＧＭ３特異的プローブとハイブリダイズさせることを含み、

前記特異的プローブは、E E - G M 3 の 5 ' フランキング領域の部分または 3 ' フランキング領域の部分およびそれに近接する外来性 D N A の部分を含む配列あるいはその相補体と、少なくとも 9 0 % 配列同一性を有する、

前記方法。

【請求項 3 9】

生物学的試料中の優良イベント E E - G M 3 を識別するための特異的プローブであって、

E E - G M 3 は、5 ' フランキング領域、外来性 D N A および 3 ' フランキング領域を含み、5 ' フランキング領域は外来性 D N A の直近上流にありそれに近接しており、3 ' フランキング領域は外来性 D N A の直近下流にありそれに近接しており、

該プローブは、E E - G M 3 中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性 D N A の 5 ' フランキング配列の部分もしくは 3 ' フランキング領域の部分およびそれに近接する外来性 D N A の部分を含む配列またはその相補体と、少なくとも 9 0 % 配列同一性を有し、

ここで前記 5 ' フランキング領域は配列番号 2 のヌクレオチド 1 からヌクレオチド 1 4 5 1 までのヌクレオチド配列を含み、前記外来性 D N A は配列番号 1 1 のヌクレオチド 1 4 5 2 からヌクレオチド 1 6 6 3 8 までのヌクレオチド配列を含み、そして前記 3 ' フランキング領域は配列番号 3 のヌクレオチド 2 4 1 からヌクレオチド 1 4 0 8 までのヌクレオチド配列を含む、

前記プローブ。

【請求項 4 0】

E E - G M 3 を特異的に認識するプライマー対またはプローブを含むキットであって、

前記プライマー対は、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のプライマー対であり、

前記プローブは、請求項 3 9 に記載のプローブである、

前記キット。

【請求項 4 1】

請求項 3 1 記載の方法であって、

前記生物学的試料が種子試料であり、

種子の純度を確認するか、または E E - G M 3 の存在に関して種子をスクリーニングするためであり、

前記種子試料における、E E - G M 3 中の除草剤耐性遺伝子を含む外来性 D N A の 5 ' または 3 ' フランキング領域を特異的に認識する特異的プライマーまたはプローブによる E E - G M 3 特異的領域の検出を含む、

前記方法。

【請求項 4 2】

実質的に相補な標識された核酸プローブとのハイブリダイゼーションを介して生物学的試料中の優良イベント E E - G M 3 の存在を検出する方法であって、

標的核酸配列の再利用を介して該標的核酸配列の検出シグナルが増幅され、

下記工程：

a) 前記標的核酸配列を、配列番号 2 のヌクレオチド 1 4 5 2 からヌクレオチド 1 4 6 9 までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含む第 1 の核酸オリゴヌクレオチド、または配列番号 3 のヌクレオチド 2 2 3 からヌクレオチド 2 4 0 までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含む第 1 の核酸オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせること；

b) 前記標的核酸配列を、配列番号 2 のヌクレオチド 1 4 3 4 からヌクレオチド 1 4 5 1 までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含む第 2 の核酸オリゴヌクレオチド、または配列番号 3 のヌクレオチド 2 4 1 からヌクレオチド 2 5 8 までのヌクレオチド配列もしくはその相補体を含む第 2 の核酸オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせること、ここで前記第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つのヌクレオチドで重複しており、そしてここで前記第 1 または該第 2 のオリゴヌクレオチドのいずれかが標識されて前記標識された核酸プローブとなる；

c) デュプレックス解離をもたらす選択的プローブ切断を起こす酵素により、プローブ：

標的核酸配列デュプレックス内の標識されたプローブのみを切断し、標的配列は未損傷のままとすること；

d) 工程 (a) から (c) を反復することにより標的核酸配列を再利用すること；および
e) 切断された標識されたプローブを検出することにより、標的核酸配列の存在を決定すること；

を含む、前記方法。