

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-523251
(P2014-523251A)

(43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	2B030
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H 5/00 ZNAA	4B024
AO1H 1/02 (2006.01)	AO1H 1/02 Z	4B063
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 103	4B065
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4H011

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-520377 (P2014-520377)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月13日 (2012.7.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月27日 (2014.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/046706
 (87) 国際公開番号 W02013/010094
 (87) 国際公開日 平成25年1月17日 (2013.1.17)
 (31) 優先権主張番号 61/507,444
 (32) 優先日 平成23年7月13日 (2011.7.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/515,634
 (32) 優先日 平成23年8月5日 (2011.8.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501035309
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462
 68, インディアナポリス, ジオンス
 ヴィレ ロード, 9330
 (71) 出願人 512135137
 エムエス・テクノロジーズ・エルエルシー
 MS TECHNOLOGIES LLC
 アメリカ合衆国、アイオワ 52656、
 ウェスト・ポイント、アベニュー・ディー
 103
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 積み重ねられた除草剤耐性イベント8264.42.32.1、関連する形質転換大豆株、およびその検出

(57) 【要約】

本発明は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関連し、グリホサート、アリアルオキシアルカノアートおよびグルホシネートの除草剤に対する抵抗性を付与する複数の特性を含む、新規な発現カセットおよび形質転換インサートを含む。本発明は、部分的に、抵抗性雑草を抑制する方法、および、除草剤耐性植物を育種する方法にも関連する。一部の実施形態では、前記イベント配列は、他の形質、例えば、他の除草剤耐性遺伝子および/または害虫阻害性タンパク質が積み重ねられ得る。本発明はさらに、部分的に、大豆および関連する植物材料中のイベントpDAB8264.42.32.1の検出のための、エンドポイントTAQMAN PCRアッセイに関連する。一部の実施形態は、植物材料の高いスループットの接合性アッセイを行い得る。他の実施形態は、本主題の発明のイベントを含む大豆株の接合性を独特に特定し、前記大豆株を独特に育種するのに使用され得る。これらのアッセイを行うのに有用なキットおよび条件も提供される。

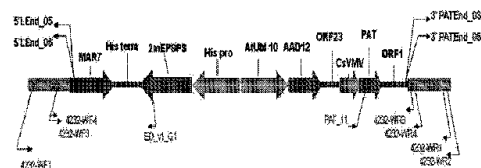


Figure 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大豆のゲノム DNA のセグメント中に遺伝子組換えインサートを含み、前記セグメントが、配列番号 1 および配列番号 2 を含む、遺伝子組換え大豆植物体。

【請求項 2】

アクセッション No. P T A - 1 1 9 9 3 で、アメリカ培養細胞系統保存機関 (A T C C) に寄託された、代表的な種子に存在する、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含むゲノムを含む、大豆種子。

【請求項 3】

前記セグメント中に前記遺伝子組換えインサートを含む、請求項 1 に記載の植物体の大豆種子。 10

【請求項 4】

大豆のゲノム DNA のセグメント中に遺伝子組換えインサートを含み、前記セグメントが、配列番号 1 および配列番号 2 を含む、請求項 2 に記載の種子を生長させることにより産出された大豆植物体。

【請求項 5】

イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む、請求項 4 に記載の大豆植物体の子孫植物体。

【請求項 6】

前記セグメント中に除草剤耐性遺伝子を含む、請求項 1 に記載の大豆植物体の除草剤耐性子孫植物体。 20

【請求項 7】

大豆植物用の発現カセットを製造する方法であって、作動可能にプロモータに結合され、配列番号 1 および配列番号 2 を含む大豆ゲノム DNA のセグメント内に挿入された、異種性ポリヌクレオチドを産生する工程を含む、前記方法。

【請求項 8】

花粉、胚珠、花、シュート、根および葉からなる群から選択され、前記インサートを含む、請求項 4 に記載の植物体の部分。

【請求項 9】

単離されたポリヌクレオチド分子であって、前記分子が、少なくとも 15 個のヌクレオチドを含み、ストリンジェントな洗浄条件下において、配列番号 1 および配列番号 2 からなる群から選択される核酸配列とのハイブリダイゼーションを維持する、前記分子。 30

【請求項 10】

単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3 ~ 2 1 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

大豆ゲノムを修飾する方法であって、前記大豆ゲノムの DNA セグメント内に導入遺伝子を挿入する工程を含み、前記 DNA セグメントが、配列番号 1 を含む 5' 末端、および、配列番号 2 のヌクレオチド残基を含む 3' 末端を含む、前記方法。

【請求項 12】

大豆植物を育種する方法であって、配列番号 1 および配列番号 2 を含む、大豆ゲノム DNA の前記セグメント中に遺伝子組換えインサートを含む第 1 の大豆植物を、第 2 の大豆植物と交雑させて、ゲノムを含む第 3 の大豆植物を産生する工程と、前記ゲノムにおける前記セグメント中に前記遺伝子組換えインサートの存在に関して、前記第 3 の植物をアッセイする工程とを含む、前記方法。 40

【請求項 13】

前記方法が、前記大豆植物内に除草剤耐性形質を遺伝子移入するのに使用され、前記第 1 の大豆植物が、配列番号 19 および配列番号 20 を含み、前記第 3 の大豆植物が、前記ゲノムにおける、配列番号 19 および配列番号 20 の少なくとも 1 つの存在についてアッセイされる、請求項 12 に記載の方法。 50

【請求項 14】

雑草を抑制する方法であって、少なくとも1つのアリアルオキシアルカノアート、グリホサート、ピアラホス、ホスフィントリシンまたはグルホシネートの除草剤をフィールドに散布する工程を含み、前記フィールドが、請求項1の植物体を含み、前記遺伝子組換えインサートが、配列番号18の残基1247～11507を含む、前記方法。

【請求項 15】

前記除草剤が、同時に、または/および、連続して選択および散布される、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記アリアルオキシアルカノアート除草剤が、2,4-D; 2,4-DB; MCPA; およびMCPBからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記方法が、少なくとも1つの更なる除草剤を前記フィールドに散布する工程を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも1つの更なる除草剤が、ジカンパである、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記方法が、前記除草剤の散布の14日以内に前記フィールドに種子を播く工程を含み、前記植物体が前記種子から生長する、請求項14に記載の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも1つの更なる除草剤が、同じ生長時期内に散布される、請求項14に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記少なくとも1つの更なる除草剤が、前記植物体表面上に散布される、請求項14に記載の方法。

【請求項 22】

配列番号18、配列番号19および配列番号20を含む核酸分子に、少なくとも95%の同一性を含むポリヌクレオチドを含む、安定的に形質転換された双子葉植物。

【請求項 23】

前記双子葉植物が、ダイズ (*Glycine max*) 由来である、請求項22に記載の安定的に形質転換された双子葉植物。

30

【請求項 24】

請求項1の植物体から製造される粉末またはオイル製品。

【請求項 25】

アリアルオキシアルカノアート除草剤、グリホサート除草剤およびグルホシネート除草剤からなる群から選択される少なくとも1つの除草剤に抵抗性であり、前記遺伝子組換えインサートが、配列番号18の残基1247～11507を含む、請求項1に記載の大豆植物体。

【請求項 26】

発現カセットを含む植物細胞であって、配列番号1および配列番号2に隣接される、または、配列番号1および配列番号2を含む遺伝子座において、15番染色体内に遺伝子導入で挿入され、前記発現カセットが、

40

a. グリホサート除草剤耐性遺伝子を発現する第1の植物転写ユニット;

b. アリアルオキシアルカノアート除草剤耐性遺伝子を発現する第2の植物転写ユニット; および、

c. グルホシネート除草剤耐性遺伝子を発現する第3の植物転写ユニットを含む、前記植物細胞。

【請求項 27】

ATCCアクセッションNo. PTA-11993で寄託された種子に存在する、pDAB8264.42.32.1のジャンクション配列を、前記ジャンクション配列に特異

50

的に結合し、または、前記ジャンクション配列を増幅するプローブまたは少なくとも1つのプライマーにより検出する工程を含み、前記ジャンクション配列が、配列番号19の残基1246～1247または配列番号20の残基176～177を含む、試料中のイベントpDAB8264.42.32.1を特定するための方法。

【請求項28】

さらに、少なくとも2つのプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応を使用して、前記試料中に存在する核酸から、DNAフラグメントを増幅する工程を含み、前記第1のプライマーが、配列番号18内の挿入配列もしくはその相補体の特異的に結合し、および、第2のプライマーが、配列番号1および配列番号2からなる群から選択されるフランキング配列内の配列に特異的に結合する、請求項27に記載の方法。

10

【請求項29】

ATCCアクセッションNo. PTA-11993で寄託された種子に存在する、大豆イベントpDAB8264.42.32.1を含む大豆植物のイベント接合性を判定するための方法であって、前記イベントが、導入遺伝子構築物を含み、前記導入遺伝子構築物が、5'フランキング大豆ゲノムDNAおよび3'フランキング大豆ゲノムDNAに隣接され、前記方法が、

前記大豆植物からのゲノムDNAのDNA試料を取得する工程；

a. TAQMAN PCR条件に供された場合、イベント増幅産物を産生する、前記導入遺伝子構築物に特異的に結合する第1のイベントプライマー、および、前記5'大豆ゲノムフランキングDNAまたは前記3'大豆ゲノムフランキングDNAに特異的に結合する第2のイベントプライマー

20

b. TAQMAN PCR条件に供された場合、内因性大豆参照遺伝子由来の参照増幅産物を産生する参照フォワードプライマーおよび参照リバースプライマー

c. 前記イベント増幅産物とハイブリダイズする蛍光イベントプローブ

d. 前記参照増幅産物とハイブリダイズする蛍光参照プローブ

と、前記DNA試料とを接触させることにより、接触試料を産生する工程；

蛍光ベースのエンドポイントTAQMAN PCR条件に、前記接触試料を供する工程；

前記イベント増幅産物にハイブリダイズする前記蛍光イベントプローブを定量化する工程；

30

前記参照増幅産物にハイブリダイズする前記蛍光参照プローブを定量化する工程；

ハイブリダイズした蛍光参照プローブに対する、ハイブリダイズした蛍光イベントプローブの量を比較する工程；ならびに、

ハイブリダイズした蛍光イベントプローブとハイブリダイズした蛍光参照プローブとの蛍光比を比較することにより、pDAB8264.42.32.1の接合性を判定する工程を含む、

前記方法。

【請求項30】

前記5'フランキングDNAが、配列番号1を含み、前記3'フランキングDNAが、配列番号2を含む、請求項29に記載の方法。

40

【請求項31】

前記第2のイベントプライマーが、配列番号21に結合する、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記参照遺伝子が、配列番号15、配列番号16および配列番号17からなる群から選択される配列を含むか、または、前記配列にハイブリダイズする、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

前記イベントプローブが、配列番号14を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項34】

50

前記イベントプライマーが、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記イベントプライマーが、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 からなり、前記参照プライマーが、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 からなり、前記イベントプローブが、配列番号 1 4 からなり、ならびに、前記参照プローブが、配列番号 1 7 からなる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第 1 のイベントプライマー、前記第 2 のイベントプライマー、前記参照フォワードプライマー、前記参照リバースプライマー、前記イベントプローブおよび前記参照プローブを含む、請求項 2 9 に記載の方法を行うためのキット。

10

【請求項 3 7】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0 およびそれらの相補体からなる群から選択される配列に、少なくとも 9 5 % の同一性を有する、単離されたポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 1 年 7 月 1 3 日に提出された米国仮出願番号第 6 1 / 5 0 7 , 4 4 4 号および 2 0 1 1 年 8 月 5 日に提出された米国仮出願番号第 6 1 / 5 1 5 , 6 3 4 号の 3 5 U . S . C 1 1 9 条 (e) に基づく利益を主張する。これらの出願は、全ての目的について、その全体が参照により本願明細書に組み込まれる。

20

【0 0 0 2】

幅広いスペクトルの除草剤である、グリホサート (N - ホスホノメチルグリシン) は、植物細胞において、必須の芳香族アミノ酸を生成するシキミ酸代謝経路における酵素である、5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸合成酵素 (E P S P S) を阻害する。E P S P S の阻害は、効果的にタンパク質合成を妨害し、これにより、影響を受けた植物細胞を枯死させる。グリホサートは、植物細胞に対して非選択的であるため、雑草および作物の両方を枯死させる。このため、作物をグリホサートに抵抗性に修飾し、所望の植物をグリホサートへの曝露に生存させ得る場合、農業生産に有用である。

30

【0 0 0 3】

組換え DNA 技術は、グリホサート抵抗性の変異 E P S P 合成酵素を単離するのに使用されてきた。このようなグリホサート抵抗性の変異 E P S P 合成酵素は、植物に形質転換され、形質転換された植物にグリホサート抵抗性を付与し得る。例として、グリホサート耐性遺伝子が、米国特許第 5 , 6 3 3 , 4 3 5 号に記載のアグロバクテリウム株 C P 4 から単離された。この参考文献および全ての引用された参考文献は、参照により本願明細書に組み込まれる。

【0 0 0 4】

他のグリホサート耐性遺伝子は、変異の導入により作製されてきた。これらは、C o m a i により単離され、米国特許第 5 , 0 9 4 , 9 4 5 号、同第 4 , 7 6 9 , 0 6 1 号および同第 4 , 5 3 5 , 0 6 0 号に記載されている、A r o A 遺伝子を含む。米国特許第 5 , 3 1 0 , 6 6 7 号に記載のように、1 つの変異体が、アミノ酸部位 8 0 と 1 2 0 との間のグリシン残基をアラニン残基に置換することにより、使用されてきた。二重変異体が、米国特許第 6 , 2 2 5 , 1 1 4 号および同第 5 , 8 6 6 , 7 7 5 号に記載されており、ここでは、上記変異に加えて、第 2 の変異 (1 7 0 位と 2 1 0 位との間のアラニン残基に関するスレオニン残基) が、野生型 E P S P S 遺伝子内に導入された。

40

【0 0 0 5】

他の取り組みは、G e n B a n k アクセション N o . X 6 3 3 7 4 によりコードされるアミノ酸配列の残基 1 0 2 (スレオニンをイソロイシンに変更) および残基 1 0 6 (プ

50

ロリンをセリンに変更)での変異を有する、修飾トウモロコシEPSPS遺伝子の導入により、グリホサート抵抗性トウモロコシの産生をもたらした。米国特許第6,566,587号および同第6,040,497号を参照のこと。

【0006】

大豆においてグリホサートに対する抵抗性を提供するイベントとしては、例えば、大豆イベントGST 40-3-2 (Padgettら、1995)および、大豆イベントMON89788 (米国特許第7,608,761号)が挙げられる。

【0007】

グリホサート耐性作物系の幅広い採用およびグリホサートの用途拡大は、近年、グリホサート抵抗性の蔓延および抑制しがたい雑草の原因となってきた。栽培者がグリホサート抵抗性雑草またはより抑制しがたい雑草種へのシフトに直面する区域において、栽培者は、見逃された雑草を抑制するであろう他の除草剤をタンク混合する、または、他の除草剤に変更することにより、グリホサートの除草剤スペクトルにおけるギャップを補償し得る。

10

【0008】

除草剤である、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)は、グリホサートに対する耐性または抵抗性であり得る、広葉または双子葉の雑草のスペクトルの拡大を期待して、グリホサートと併せて使用され得る。60年より長く除草剤として使用されてきた2,4-Dは、幅広いスペクトルの一年生、二年生および多年生の広葉雑草の、幅広いスペクトルの発芽後抑制を提供する。トウモロコシ、大豆および綿花では、2,4-D(560~1120g a e / h a量)が、主要な雑草、例えば、ブタクサ(Ambrosia artemisiifolia)、オオブタクサ(Ambrosia trifida)、オオモミ(Xanthium strumarium)、アカザ(Chenopodium album)、ヘリアンサス・アナス(Helianthus annuus)、アサガオ属の一種(Ipomoea sp.)、イチビ(Abutilon theophrasti)、ヒメムスカシヨモギ(Conyza Canadensis)およびエビスグサ(Senna obtusifolia)を抑制する。2,4-Dは、複数の主要な雑草、例えば、アメリカサナエタデ(Polygonum pennsylvanicum)、ハルタデ(Polygonum persicaria)、セウヨウトゲアザミ(Cirsium arvense)、セイヨウタンポポ(Taraxacum officinale)ならびにヒユ属の一種(Amaranthus sp.)、例えば、ホソバイヌビユ(Amaranthus rudis)およびオオホナガアサゲイトウ(Amaranthus palmeri)の部分的な抑制を提供する。

20

30

【0009】

2,4-Dの更なる使用に対する制限は、双子葉作物、例えば、大豆または綿花に対するその選択性が非常に低いことである。このため、2,4-Dは、典型的には、(一般的には、とうてい)感受性の双子葉作物に使用されない。さらに、飼料用作物における2,4-Dの使用は、発生し得る作物傷害の性質により制限される。グリホサートとの組み合わせにおける2,4-Dは、無耕作大豆および綿花の種まき前に、より強力な下火処理を提供するのに使用されてきた。しかしながら、2,4-Dに対するこれらの双子葉種の感受性のために、これらの下火処理は、種まき前の少なくとも14~30日に行わなければならない(Agrilience、2005)。

【0010】

2,4-Dを分解するその能力に関して広範囲にわたって研究されてきた1つの生命体は、無機化経路における最初の工程を触媒する酵素(TfdA)をコードするtfdA遺伝子を含む、ラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha)である(米国特許第6,153,401号およびGenBankアクセッションNo. M16730を参照のこと)。TfdAは、-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ反応を介した、2,4-D酸のジクロロフェノール(DCP)への変換を触媒する(Smejkalら、2001)。DCPは、2,4-Dと比較して、ほとんど除草剤活性を有しない。tfdAは、通常2,4-Dに対して感受性の双子葉植物(例えば、綿花およびタバコ)に、2,4-D抵抗性を付与する遺伝子組換え植物に使用されてきた(Streberら(1989)、Lyonら(1989)、Lyon(1993)および米国特許第5,608,147号

40

50

)。

【0011】

2, 4-Dを分解可能なタンパク質をコードする、数多くのtfdA種の遺伝子が、環境から特定され、GenBankデータベースに寄託されてきた。多くのホモログは、TfdAに類似し(>85%のアミノ酸同一性)、TfdAに対して類似の酵素特性を有する。しかしながら、TfdAに対する明らかにより低い同一性(25~50%)を有し、さらに、 α -ケトグルタル酸ジオキシゲナーゼFe(II)ジオキシゲナーゼに関連する特徴的な残基を有する、数多くのホモログが存在する。このため、多岐にわたるTfdAタンパク質の基質特異性は、明らかでない。

【0012】

tfdAに対する低い相同性(<35%)を有する2, 4-D分解遺伝子の一例は、デルフチア・アシドボランス(*Delftia acidovorans*)由来のaad-12遺伝子である(Schleinitzら(2004)およびWestendorfら(2002))。aad-12遺伝子は、特定のフェノキシオーキシシン除草剤、例えば、制限されず、フェノキシアルカノアート除草剤(例えば、フェノキシ酢酸除草剤、例えば、2, 4-DおよびMCPA;ならびに、フェノキシブタン酸除草剤、例えば、2, 4-DBおよびMCPB)およびピリジロキサルカン酸除草剤(例えば、ピリジロキシ酢酸除草剤、例えば、トリクロピルおよびフルロキリピル)ならびに、例えば、活性成分の酸、塩またはエステル型に対する耐性を付与するために、植物に使用されてきた、S-光学異性体特異的 α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼをコードする(例えば、国際公開第2007/053482号)。

【0013】

グルホシネート-アンモニウム(「グルホシネート」)は、除草剤のホスホトリシン分類における、非浸透性で、非選択的な除草剤である。幅広い範囲の広葉およびイネ科雑草の発芽後抑制に最初に使用された、グルホシネートにおける活性成分であるL-ホスホトリシンは、植物におけるアンモニア解毒に必要な酵素である、グルタミン合成酵素の不可逆的な阻害により雑草を抑制する。グルホシネート除草剤は、例えば、商品名IGNITE(登録商標)およびLIBERTY(登録商標)で、市販されている。

【0014】

土壤細菌ストレプトミセス・ピリドクロモゲネス(*Streptomyces viridochromogenes*)から単離された酵素である、ホスホトリシンN-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)は、アセチル化により、L-ホスホトリシンの、その不活性型への変換を触媒する。PATを発現する遺伝子の植物最適化型は、グルホシネート除草剤に耐性を付与するために、大豆に使用されてきた。このようなグルホシネート抵抗性大豆の一例は、イベントA5547-127である。ごく最近、グルホシネート耐性形質との組み合わせにおける、グルホシネート除草剤の使用が、ALS抵抗性およびグリホサート抵抗性雑草を効果的に管理するための非選択的な手段として提案されてきた。

【0015】

植物における異種性または外来性の遺伝子の発現は、外来性遺伝子が、染色体に挿入される箇所に影響を受ける。これは、例えば、クロマチン構造(例えば、ヘテロクロマチン)または転写制御因子(例えば、エンハンサー)の近接が、組み込み部位に近いためであり得る(Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22:421-477, 1988)。同じ型の遺伝子組換え植物(または他の生命体)における同じ遺伝子は、種々のイベントの中でも、発現レベルに広い変動を示し得る。発現の空間的または時間的パターンにおける差も存在し得る。例えば、種々の植物組織における導入遺伝子の相対発現における差は、導入された遺伝子構築物に存在する転写制御因子から予期されるパターンに対応しない場合がある。

【0016】

このため、所定の目的に関する満足の行くレベルに、当該導入された遺伝子を発現するイベントを特定するために、多くの場合、多数のイベントが、作製およびスクリーニングされる。商業目的のために、数百から数千の種々のイベントを産生し、所望の導入遺伝子

10

20

30

40

50

の発現レベルおよびパターンを有する、1つのイベントについて、それらのイベントをスクリーニングするのが一般的である。導入遺伝子発現の所望のレベルおよび/またはパターンを有するイベントは、従来の育種法を使用する有性外部交雑による他の遺伝的背景における導入遺伝子を遺伝子移入するのに有用である。このような交配種の子孫は、元の形質転換体の導入遺伝子発現特徴を維持する。この戦略は、現場での生長条件に十分適応した、多くの品種における信頼性のある遺伝子発現を確保するのに使用される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】米国特許第5,633,435号

10

【特許文献2】米国特許第5,094,945号

【特許文献3】米国特許第4,769,061号

【特許文献4】米国特許第4,535,060号

【特許文献5】米国特許第5,310,667号

【特許文献6】米国特許第6,225,114号

【特許文献7】米国特許第5,866,775号

【特許文献8】米国特許第6,566,587号

【特許文献9】米国特許第6,040,497号

【特許文献10】米国特許第7,608,761号

【特許文献11】米国特許第6,153,401号

20

【特許文献12】米国特許第5,608,147号

【特許文献13】国際公開第2007/053482号

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】Weising et al., Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本主題の発明は、部分的に、雑草抵抗性を管理するための効果的な手段を提供し得る。前記手段は、除草剤耐性技術の有用性を維持するのに役立つ。本主題の発明は、雑草抑制の選択肢において、素晴らしい柔軟性および利便性を、栽培者に提供し得る。

30

【課題を解決するための手段】

【0020】

より具体的には、本発明は、部分的に、アクセションNo. PTA-11993で、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に寄託された代表的な種子を有する、pDAB8264.42.32.1と命名された大豆(ダイズ(*Glycine max*))イベント(「イベントpDAB8264.42.32.1」)およびそれ由来の子孫に関連する。本主題の発明は、イベントpDAB8264.42.32.1を含む大豆植物体を含む(ならびに、配列番号1と配列番号2との間に遺伝子組換えインサートを含む大豆植物体を含む)。

40

【0021】

本主題のイベントおよび寄託された種子に存在する遺伝子組換えインサートは、3つの除草剤耐性遺伝子: aad-12、2mepspsおよびpatの遺伝子を含む。デルフト・アシドボランス(*Delftia acidovorans*)由来のaad-12遺伝子は、アリアルオキシアルカノアートジオキシゲナーゼ(AAD-12)タンパク質をコードする。タンパク質は、例えば、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸およびピリジルオキシアセテートの除草剤に対する耐性を付与する。トウモロコシから単離された修飾EPSPS配列である、2mepsps遺伝子は、グリホサート除草剤に対する耐性を付与するタンパク質を産生する。土壌細菌ストレプトミセス・ピリドクロモゲネス(*Streptomyces viridochromogenes*)由来のpat遺伝子は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

50

【0022】

本発明の他の態様は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む、子孫植物体、大豆、種子ならびに / または、植物体および種子および子孫の再生可能な部分、ならびに、それらのいずれかから製造された食品および飼料製品を含む。本発明は、制限されず、花粉、胚珠、花、シュート、根および葉を含む、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の植物体の部分、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む、栄養細胞、花粉細胞および他の植物細胞の核も含む。本発明は、さらに、複数の除草剤、例えば、フェノキシオーキシンおよび / またはアリアルオキシアルカノアート除草剤、グリホサートおよび / またはグルホシネートに対する耐性を有する、大豆植物体に関連する。このような大豆植物体は、種々の他の非選択的および選択的除草剤、例えば、制限されず、ジカンバ、イミダゾリノンおよび H P P D 除草剤に対する耐性を付与する遺伝子と積み重ねられてもよい。本発明は、さらに、新規な遺伝子構成のイベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1、および、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む大豆植物体の農業生産力の態様を含む。

10

【0023】

この発明は、部分的に、植物育種および除草剤耐性植物に関連する。この発明は、大豆細胞のゲノム内の特定のサイトに挿入された、本願明細書に記載のポリヌクレオチドを含む大豆植物における、新規な形質転換イベントを含む。

【0024】

一部の実施形態では、イベント / ポリヌクレオチドは、他の形質、例えば、農業形質および / または害虫阻害タンパク質等と積み重ねられ得る。ただし、本主題の発明は、本願明細書に記載の1つのイベントを有する植物体を含む。

20

【0025】

更なる形質は、植物ゲノム内、または、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 と同じ遺伝子座内に、例えば、植物育種、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む遺伝子導入植物の再形質転換、または、相同的組換えを介した標的組み込みによる新たな形質の付加により、積み重ねられてもよい。

【0026】

他の実施形態は、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の遺伝子組換えインサートおよび / またはフランキング配列の一部または全部の切除を含む。切除に基づいて、別のインサートおよび / または更なるインサートが、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の特定の染色体サイトに、標的され得る。例示のインサートが、この方法において、主題の大豆イベントの例示となるインサートと交換され得るか、または、更なるインサートが積み重ねられ得る。

30

【0027】

一実施形態では、本発明は、15番染色体上に位置する大豆染色体標的サイトを包含する。一部の実施形態では、標的サイトは、異種性核酸を含む。一部の実施形態では、大豆染色体標的サイトは、配列番号1および配列番号2で説明されたフランキング配列間に位置する。

【0028】

一実施形態では、本発明は、15番染色体上の位置に異種性核酸を挿入する工程を含む、遺伝子導入大豆植物を製造する方法を包含する。別の実施形態では、異種性核酸は、15番染色体上の、本願明細書に記載の種々の例示したポリヌクレオチドセグメントの近くまたは同セグメント間に挿入される。

40

【0029】

さらに、本主題の発明は、(例えば、大豆の)試料における、主題のイベントの存在を検出するためのアッセイを提供する。アッセイは、大豆ゲノム内に挿入される組換え構築物のDNA配列、および、挿入サイトに隣接するゲノム配列に基づき得る。アッセイを行うのに有用なキットおよび条件も、提供される。

【0030】

50

このため、本主題の発明は、部分的に、(遺伝子組換え大豆株における、) 例示したインサートおよびそのボーダー領域全体のDNA配列のクローニングおよび分析に関連する。これらの配列は、他に存在しない。これらのインサートおよびボーダー(およびジャンクション) 配列に基づいて、イベント特異的プライマーが生成されることができ、これを生成させた。PCR分析は、これらのイベントが、これらのイベント特異的プライマーセットにより産生されたPCR増幅産物の分析により特定され得ることを説明した。したがって、これらおよび他の関連する手順は、本主題の発明のイベントを含む大豆株を独特に特定するのに使用され得る。

【0031】

本主題の発明は、部分的に、イベントpDAB8264.42.32.1の検出のための、エンドポイントTAQMAN PCRアッセイにも関連する。一部の実施形態は、接合性分析が可能なアッセイを対象にする。本主題の発明は、さらに、部分的に、接合性を判定するのに使用するための、GMFL01-25-J19 (GenBank : AK286292.1) 参照遺伝子の使用に関連する。これらおよび他の関連する手順は、独特に、イベントpDAB8264.42.32.1の接合性を特定し、イベントを含む大豆株を育種するのに使用され得る。

10

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は、pDAB8264のプラスミドマップである。

【図2】図2は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の5'および3'ボーダー配列を確認するためのプライマー配置を説明する模式図である。

20

【図3】図3は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の形質転換されていないゲノムDNAを確認するためのプライマー配置を説明する模式図である。

【図4】図4は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1のTAQMAN PCRアッセイ検出に関する、プライマー配置を説明する模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

配列の簡単な説明

配列番号1は、本主題の大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、5'フランキングボーダー配列を提供する。

30

配列番号2は、本主題の大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、3'フランキングボーダー配列を提供する。

配列番号3は、プライマー4232__WF1を提供する。

配列番号4は、プライマー4232__WF3を提供する。

配列番号5は、プライマー4232__WF4を提供する。

配列番号6は、プライマー4232__WR1を提供する。

配列番号7は、プライマー4232__WR2を提供する。

配列番号8は、プライマー4232__WR3を提供する。

配列番号9は、プライマー4232__WR4を提供する。

配列番号10は、プライマーED__v1__C1を提供する。

40

配列番号11は、プライマーPAT__11を提供する。

配列番号12は、プライマー4232__3'Fを提供する。

配列番号13は、プライマー4232__3'Rを提供する。

配列番号14は、プローブ4232__3'Pを提供する。

配列番号15は、プライマーGMS116Fを提供する。

配列番号16は、プライマーGMS116Rを提供する。

配列番号17は、プローブGMS116Pプローブを提供する。

配列番号18は、pDAB8264 T鎖インサートおよび部分的な5'および3'ゲノムフランキング配列を提供する。

配列番号19は、本主題の大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、

50

5'ゲノム～インサート配列(そのジャンクションを含む)を提供する。

配列番号20は、本主題の大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、3'インサート～植物ジャンクションを提供する。

配列番号21は、プラスミドpDAB8264に関する配列を提供する。

【0034】

本願明細書に記載の本発明は、大豆細胞のゲノム内の特定の遺伝子座に挿入された、複数の除草剤耐性遺伝子の発現用のカセットを含む、大豆植物体(大豆)の新規な形質転換イベントを含む。具体的には、pDAB8264.42.32.1イベントを含む、新規な大豆株が開発された。この遺伝子組換えイベントは、複数の除草剤、例えば、フェノキシオーキシンおよび/またはアリアルオキシアルカノアート除草剤、グリホサートおよび/またはグルホシネートに対する耐性を提供する。複数の除草剤に対する耐性は、栽培者が、その個々の雑草群を最も良好に管理するために、除草剤の最適な組み合わせを選択することを可能にする。

10

【0035】

例示した、イベントpDAB8264.42.32.1を含む遺伝子組換えインサートは、3つの異なる除草剤耐性遺伝子：(1)合成aad-12遺伝子；(2)野生型のEPSPSポリペプチドと比較して、アミノ酸残基102(スレオニンからイソロイシン)および106(プロリンからセリン)での変異を含むタンパク質をコードし、グリホサート除草剤に対する抵抗性または耐性を付与する、トウモロコシ由来の修飾EPSPS配列；ならびに、(3)グルホシネート除草剤に対する耐性または抵抗性を付与するpat遺伝子の発現用の遺伝要素を含む。aad-12遺伝子は、デルフトシア・アシドボランス(Delftia acidovorans)由来であり、 β -ケトグルタル酸部分、例えば、フェノキシアルカノアート除草剤(例えば、フェノキシ酢酸除草剤、例えば、2,4-DおよびMCPA；フェノキシブタン酸除草剤、例えば、2,4-DBおよびMCPB)およびピリジルオキシアルカン酸除草剤(例えば、ピリジルオキシ酢酸除草剤、例えば、トリクロピルおよびフルロキリピル)ならびに、例えば、活性成分の酸、塩またはエステル型を有する除草剤を非活性化可能な、アリアルオキシアルカノアートジオキシゲナーゼ(AAD-12)タンパク質酵素をコードする。

20

【0036】

本主題の発明は、試料中の本主題のイベントの存在を検出するためのアッセイも提供する。本主題の発明の態様は、本願明細書で例示され、または、示唆された、任意の診断核酸分子、具体的には、本主題のランキング配列の全体または部分に基づく分子の、設計および/または製造をする方法を含む。

30

【0037】

この発明は、部分的に、植物育種および除草剤耐性植物に関連する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、他の形質(例えば、他の除草剤耐性遺伝子および/または、害虫阻害性タンパク質もしくは阻害性RNA配列等をコードする遺伝子)と「積み重ね」られ得る。ただし、本主題の発明は、本願明細書に記載の1つのイベントを含む植物体も含む。

【0038】

より具体的には、本主題の発明は、部分的に、遺伝子組換え大豆イベントpDAB8264.42.32.1、これらのイベントを含む植物株、ならびに、このインサートおよび/またはそのボーダー領域のDNA配列のクローニングおよび分析に関連する。本主題の発明の植物株は、本願明細書に開示および示唆の配列を使用して検出され得る。

40

【0039】

一部の実施形態では、本願明細書に例示または記載のポリヌクレオチドセグメント(例えば、配列番号1および配列番号2、ならびに/または、例えば、図2に示される、それらの間のインサート等)が、切除され、続けて、更なるポリヌクレオチド配列で再標的化され得る。

【0040】

50

一部の実施形態では、この発明は、除草剤耐性大豆株およびその特定に関連する。本主題の発明は、部分的に、有性交雑の子孫が、当該イベントを含むかどうかを判定するために、本主題のイベントの存在を検出することに関連する。加えて、イベントを検出するための方法は、例えば、組換え作物等に由来の食品の市場導入前に必要な規制を遵守し、標識するために含まれ、有用である。任意の周知の核酸検出法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または核酸プローブを使用するDNAハイブリダイゼーションにより、本主題のイベントの存在を検出することが可能である。イベント特異的PCRアッセイは、本願明細書に記載される（例えば、別の例に関して、Windels et al. (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999)を参照のこと）。これらの例の一部は、インサートとフランキングDNAとの間のジャンクションにまたがるプライマーセットを使用することに関連する。

10

【0041】

本願明細書では、大豆イベントpDAB8264.42.32.1、ならびに、安定性のためその選択および特徴付け、ならびに、何世代にもわたって植物全体および分子レベルでの発現が例示されている。イベントpDAB8264.42.32.1の両フランキング配列は、本願明細書において、配列番号1および配列番号2として、シークエンスされ、記載されている。イベント特異的アッセイが開発された。イベントpDAB8264.42.32.1は、同種交雑およびハイブリッドの大豆株において、フェノキシオーキシン、グリホサートおよびグルホシネートの除草剤に対する耐性を付与されるであろう、エリートな品種に遺伝子移入され得る。

20

【0042】

本主題のEPSPS遺伝子は、変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（EPSPS）をコードする。野生型のEPSPS遺伝子は、最初は、トウモロコシ（Zea mays）から単離され、その配列は、GenBankアクセッションNo. X63374で寄託された。米国特許第6,566,587号（具体的には、その配列番号3）も参照のこと。

【0043】

植物において異種性遺伝子の高い発現を得るために、遺伝子が植物細胞においてより効率的に発現されるように、遺伝子を再設計するのが好ましい場合がある。野生型植物のEPSPS核酸配列の修飾は、植物細胞において発現された際に、このような抵抗性を提供し得る。587特許に記載のように、EPSPSポリペプチドを野生型ポリペプチドと比較した場合、タンパク質における、残基102でのスレオニンをイソロイシンに置換、および、106位でのプロリンをセリンに置換する修飾は、その結果、本主題のインサートに使用される、二重変異EPSPSポリペプチド（2mEPSPS）である。植物細胞において発現された場合、グリホサートに対する耐性を提供する。または、「2mepsps遺伝子」またはDMMGとも呼ばれる、本主題のEPSPS遺伝子は、双子葉植物および単子葉植物の両方、ならびに、具体的には、大豆における発現を改善するために最適化され得る。コドン使用頻度は、タンパク質が、単子葉植物および双子葉植物の両方の使用頻度に向けてバイアスを有するコドンによりコードされるように、好ましいヘミコット（hemicot）コドン使用頻度に基づいて選択、すなわち再設計され得る。有害な配列および余分な制限サイトは、2mepspsコーディング配列の転写/翻訳の効率を向上し、DNA操作工程を容易にするために除去され得る。本主題の単子葉遺伝子のヘミコット最適化されたバージョンは、発明の名称を「OPTIMIZED EXPRESSION OF GLYPHOSATE RESISTANCE ENCODING NUCLEIC ACID MOLECULES IN PLANT CELLS」とする、2010年12月3日に出願された、米国仮出願（番号第61/419,703号）に、より詳細に説明されている。

30

40

【0044】

本願明細書において先に参照したように、植物ゲノムへの導入遺伝子の導入および組み込みは、一部の偶発的な事象を含む（このため、所定の挿入に関して、「イベント」の名称で表される）。すなわち、数多くの形質転換技術、例えば、アグロバクテリウム形質転

50

換、「遺伝子銃」およびWHISKERSに関して、ゲノムにおいて、導入遺伝子が挿入されるであろう箇所を予測できない。このため、インサートの両側における、フランキング植物ゲノムDNAを特定することは、所定の挿入イベントを有する植物を特定するのに、重要であり得る。例えば、PCRプライマーは、インサートおよび宿主ゲノムのジャンクション領域にまたがる、PCR増幅産物を産生するように設計され得る。このPCR増幅産物は、挿入イベントの固有または区別できる種類を特定するのに使用され得る。

【0045】

植物細胞のゲノム内に、インサートを導入する過程に、インサートおよび/またはゲノムフランキング配列に、一部の欠損または他の変化が起こることは、珍しくない。このため、本願明細書で提供されるプラスミド配列の関連するセグメントは、一部の小さな変異を含んでもよい。同じことは、本願明細書で提供されるフランキング配列にも当てはまる。このため、一部の範囲における、本主題のフランキングおよび/またはインサートの配列との同一性を有するポリヌクレオチドを含む植物体は、本主題の発明の範囲内である。本発明の配列についての同一性は、本願明細書に例示または記載の配列と、少なくとも65%の配列同一性、より好ましくは少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは少なくとも75%の配列同一性、より好ましくは少なくとも80%の配列同一性、およびより好ましくは、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列であり得る。本願明細書で提供される、ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション条件は、本主題の発明のこのような植物体およびポリヌクレオチド配列を規定するのにも使用され得る。完全なインサート配列に加えて、フランキング配列を含む配列は、寄託された種子を参照して、確認され得る。

10

20

30

40

50

【0046】

「イベント」が、最初の偶発的な事象である場合、この開示の一環として、イベントを含む大豆株の少なくとも2,500個の種子が寄託され、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110により、制限されることなく(ただし、特許権の対象である)、公衆に利用可能にされた。寄託は、ACTT寄託No. PTA-11993として指定されている。ダイズ(*Glycine max*)の種子(大豆種子*Glycine max* L.: p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1)、100パック(1パックあたりに25個の種子)が、2011年7月11日に寄託された。寄託は、2011年7月26日に検証され、その日に種子は、生存していた。この寄託は、特許手続上の種子の寄託に関するブダペスト条約の条件に基づいてなされ、同条約下で維持されるであろう。寄託は、公衆の預託機関であるATCCの預託機関において、30年の期間、または最新の要求後5年間、または特許の有効期間のいずれか長い方の間、制限されずに維持され、その期間中に生育不能となる場合には、置き替えられるであろう。

【0047】

寄託された種子は、本主題の発明の一部である。明らかに、大豆植物体は、これらの種子から生長し得る。このような植物体は、本主題の発明の一部である。本主題の発明は、これらの植物体およびその子孫を検出するのに有用な、これらの大豆植物体に含まれるDNA配列にも関連する。本主題の発明の検出方法およびキットは、検査の最終目的に応じて、これらのイベントの任意の1つ、2つまたは3つ全てさえも特定することを対象とし得る。

【0048】

本願明細書では、定義および例示が、本発明を説明するのに役立つ、本発明の実施に当業者を導くために提供される。特に断らない限り、用語は、関連する分野における当業者による従来からの使用に基づいて理解されるものである。37 CFR 1.822で説明されるDNA塩基に関する用語体系が使用される。

【0049】

本願明細書で使用する時、「子孫」の用語は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 .

32.1を含む親植物の任意の世代の子孫を提供する。

【0050】

遺伝子組換え「イベント」は、異種性DNA、すなわち、当該導入遺伝子を含む核酸構築物による植物細胞の形質転換、植物のゲノム中の導入遺伝子の挿入に起因する植物群の再生、および、特定のゲノム位置への挿入により特徴付けられる特定の植物体の選択により産生される。「イベント」の用語は、異種性DNAを含む、元の形質転換体および形質転換体の子孫を意味する。「イベント」の用語は、ゲノム/導入遺伝子DNAを含む、形質転換体と別の品種との間での有性外部交雑により産生される子孫も意味する。反復親への戻し交雑後でも、形質転換された親からの挿入された導入遺伝子DNAおよびフランキングゲノムDNA（ゲノム/導入遺伝子DNA）が、交雑の子孫において、同じ染色体位置に存在する。「イベント」の用語は、挿入されたDNAを含む一方の親株（例えば、元の形質転換体および自系接合に起因する子孫）と、挿入されたDNAを含まない親株との有性交雑の結果として、当該導入遺伝子を含む、挿入されたDNAを受け取る子孫に伝達すると期待されるであろう、挿入されたDNAおよび、挿入されたDNAにすぐ隣接するフランキングゲノム配列を含む、元の形質転換体およびその子孫も意味する。

10

【0051】

「ジャンクション配列」は、ゲノムに挿入されたDNAが、挿入点に隣接する大豆の本来のゲノムに結合される位置にわたる。植物ゲノム材料における、一方または他方のジャンクション配列の特定または検出は、イベントに関して診断するのに十分である。本願明細書に記載の大豆イベントおよび類似の長さのフランキングDNAにおける挿入にわたるDNA配列が含まれる。このような診断配列の具体的な例は、本願明細書において提供されるが、挿入のジャンクションまたは挿入およびゲノム配列のジャンクションと重複する他の配列も、診断に関するものであり、本主題の発明に基づいて使用され得る。

20

【0052】

本主題の発明は、部分的に、このようなフランキング、ジャンクションおよびインサート配列を使用するイベント特定に関連する。関連するPCRプライマーおよび増幅産物は、本発明に含まれる。本主題の発明に基づいて、挿入されたDNAおよびそのボーダーにわたる、増幅産物を使用するPCR分析法は、本主題の独占所有権のある遺伝子組換え大豆株由来の、商品化された遺伝子組換え大豆品種または株を検出または特定するのに使用され得る。

30

【0053】

バイナリープラスミドである、pDAB8264（配列番号21）は、図1に説明される遺伝要素を含む。下記遺伝要素（T鎖ボーダー配列は、含まれない）は、pDAB8264のT鎖領域内に含まれる。表1に、遺伝要素の残基番号が、本願明細書に開示の配列番号21に関して提供される。

【表 1】

表 1：バイナリープラスミド pDAB8264（配列番号 21）を含む遺伝要素の残基番号

遺伝要素	位置	参考文献
RB7 MAR v3（マトリクス付着領域）	137 bp - 1302 bp	Thompson and Myatt, (1997) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 34: 687-692. ; W09727207
介在配列	1303 bp - 1341 bp	該当なし
ヒストンII4A7 48 3' UTR（非翻訳領域）	1342 bp - 2002 bp	Chabouté et al., (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8: 179-191
介在配列	2003 bp - 2025 bp	該当なし
<i>2mepsps v1</i>	2026 bp - 3363 bp	米国特許第 6, 566, 587 号
OTPc（最適化輸送ペプチド）	3364 bp - 3735 bp	米国特許第 5, 510, 471 号
介在配列	3736 bp - 3748 bp	該当なし
イントロン 2	3749 bp - 4214 bp	Chaubet et al., (1992) <i>J. Mol. Bio.</i> , 225: 569-574
ヒストンII4A7 48 プロモータ	4215 bp - 5169 bp	Chabouté et al., (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8:179-191
介在配列	5170 bp - 5261 bp	該当なし
AtUbi10 プロモータ (Arabidopsis thaliana ユビキチン 10 プロモータ)	5262 bp - 6583 bp	Callis, et al., (1990) <i>J. Biol. Chem.</i> , 265: 12486-12493
介在配列	6584 bp - 6591 bp	該当なし
<i>aad-12 v1</i>	6592 bp - 7473 bp	WO 2007/053482
6つのフレーム全てにおける終止コドンを含む介在配列	7474 bp - 7575 bp	該当なし
AtuORF23 3' UTR (Agrobacterium tumefaciens オープン・リーディング・フレーム 2 3 UTR)	7576 bp - 8032 bp	米国特許第 5, 428, 147 号
介在配列	8033 bp - 8146 bp	該当なし
CsVMV プロモータ (Cassava Vein Mosaic)	8147 bp - 8663 bp	Verdaguer et al., (1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 31: 1129-1139

10

20

30

40

ウイルスプロモータ)		
介在配列	8664 bp - 8670 bp	該当なし
<i>pat v6</i>	8671 bp - 9222 bp	Wohlleben <i>et al.</i> , (1988) <i>Gene</i> 70: 25-37
6つのフレーム全てにおける終止コドンを含む介在配列	9223 bp - 9324 bp	該当なし
AtuORF1 3' UTR (Agrobacterium tumefaciens オープン・リーディング・フレーム1 UTR)	9325 bp - 10028 bp	Huang <i>et al.</i> , (1990) <i>J. Bacteriol.</i> 172:1814-1822

10

【0054】

配列番号19および20は、それぞれ、以下により詳細に記載される、インサート配列の5'および3'部分を含む、5'および3'のフランキング配列である。したがって、配列番号19および20は、インサートおよびゲノムDNAの、5'および3'「ジャンクション」または「トランジション」配列を含む。配列番号19に関して、残基1~1246は、5'ゲノムフランキング配列であり、残基1247~1550は、インサートの5'末端の残基である。配列番号20に関して、残基1~176は、インサートの3'末端の残基であり、残基177~680は、3'ゲノムフランキング配列である。このため、インサートの5'末端に関するジャンクション配列またはトランジションは、配列番号19の残基1246~1247に存在する。このため、インサートの3'末端に関するジャンクション配列またはトランジションは、配列番号20の残基176~177に存在する。本主題の発明のポリヌクレオチドは、例えば、5、10、20、50、100、150もしくは200個、または、それ以上の塩基、および、ジャンクション配列の両側における、その間の任意の増分を含むものを含む。このため、ジャンクション配列にわたるプライマーは、例えば、フランキング配列とハイブリダイズするであろう5~10個の塩基、および、インサート配列とハイブリダイズするであろう5~10個の塩基を含み得る。プローブおよび増幅産物は、同様に設計され得るが、多くの場合、プライマーより長いであろう。

20

30

【0055】

本主題の配列(例えば、フランキング配列)は、固有である。これらのインサートおよびボダー配列に基づいて、イベント特異的プライマーが作製された。PCR分析は、これらの大豆株が、これらのイベント特異的プライマーセットにより産生されたPCR増幅産物の分析により、種々の大豆遺伝子型において特定され得ることを説明した。このため、これらおよび他の関連する手順は、独特に、これらの大豆株を特定するのに使用され得る。本願明細書で特定された配列は、固有である。

40

【0056】

本主題の発明における検出技術は、植物育種との併用で、子孫において、当該1またはそれ以上の更なる形質を付与するための取り組みにおいて、当該イベントを含む親植物が別の植物株と交雑された後に、子孫植物が所定のイベントを含むことを判定するのに特に有用である。これらのPCR分析法は、特に商品化された遺伝子組換え大豆種子に関する、大豆育種計画および品質管理に役立つ。これらの遺伝子組換え大豆株に関するPCR検出キットも、すぐに製造され、使用され得る。これも、製品登録および製品管理に役立つ。

【0057】

50

さらに、フランキング大豆ノゲノム配列は、各インサートのゲノム位置を具体的に特定するのに使用され得る。この情報は、各イベントに特異的な分子マーカー系を製造するのに使用され得る。これらは、促進された育種戦略および結合データを確立するのに使用され得る。

【0058】

さらに、フランキング配列情報は、導入遺伝子組み込み過程、ゲノム組み込みサイト特性、イベントの分類、導入遺伝子およびそのフランキング配列の安定性ならびに、（特に、遺伝子サイレンシング、導入遺伝子のメチル化パターン、位置効果および潜在的な発現関連因子、例えば、MARS [マトリクス結合領域] 等に関連する）遺伝子発現を、研究および特徴付けするのに使用され得る。

10

【0059】

本主題の開示を踏まえると、本主題の発明が、2011年7月11日に本主題のイベントに関して寄託され、ATCC寄託No. PTA-11993で利用可能な種子を含むことが明らかにはずである。本主題の発明は、この日にこのアクセッション番号でATCCに寄託された種子から生長した除草剤耐性大豆植物体も含む。本主題の発明は、さらに、植物体の一部、例えば、葉、組織試料、植物体に入った種子、花粉、粉末（大豆粉）等（それらは、配列番号1および配列番号2に隣接する、遺伝子組換えインサートを含む）を含む。本主題の発明は、さらに、本主題の植物のいずれか由来の非全能細胞（例えば、上記列記したこのような植物体の部分由来の細胞）を含む。

20

【0060】

さらに、本主題の発明は、寄託された種子から生長した植物体、好ましくは、除草剤抵抗性大豆植物体の子孫および/または子孫植物体を含む。植物体は、本願明細書に記載の、検出可能な野生型ゲノムDNA/インサートDNAジャンクション配列を含むゲノムを有する。本願明細書で使用する時、「大豆」の用語は、ダイズ (*Glycine max*) を意味し、大豆植物として栽培され得る、その全ての品種を含む。

【0061】

本発明は、さらに、少なくとも一方の親として本主題の発明の植物を使用して交雑を行う方法を含む。例えば、本主題の発明は、本願明細書で例示した植物の一方または両方のいずれかの親を有するF₁ハイブリッド植物を含む。本主題の発明のこのようなF₁ハイブリッドに入った種子も、本主題の発明の範囲内である。この発明は、例示した植物と、異なる（例えば、自殖親）植物とを交雑し、得られたハイブリッド種子を収穫することにより、F₁ハイブリッド種子を製造するための方法を含む。本主題の発明は、雌親または雄親のいずれかである、例示となる植物体を含む。得られた植物体の特徴は、親植物の注意深い考察により改善され得る。

30

【0062】

本主題の発明の除草剤耐性大豆植物体は、まず、本願明細書で言及した株のいずれか1つの種子から生長した大豆植物体からなる第1の親大豆植物体と、第2の親大豆植物体とを有性交雑することにより、複数の第1の子孫植物体を産生し；ついで、除草剤に抵抗性である（または、本主題の発明の少なくとも1つのイベントを有する）、第1の子孫植物体を選択し；第1の子孫植物体を自殖させることにより、複数の第2の子孫植物体を産生し；および、ついで、第2の子孫植物体から、除草剤に対する抵抗性である（または、本主題の発明の少なくとも1つのイベントを有する）植物体を選択することにより育種し得る。これらの工程は、さらに、第1の子孫植物体または第2の子孫植物体の第2の親大豆植物体または第3の親植物体への戻し交雑を含み得る。ついで、本主題の発明の大豆種子を含む大豆作物またはその子孫は、植えられ得る。

40

【0063】

2つの異なる遺伝子組換え植物も、2つの、独立して分離している、追加された外因性遺伝子を含む子孫を産生するために、交配させられ得ることも理解される。適切な子孫の自殖は、両方の追加された外因性遺伝子に関してホモ接合性である植物を産生し得る。栄養繁殖の場合、親植物への戻し交雑および、非遺伝子組換え植物との外部交雑も検討され

50

る。一般的に、異なる形質および作物に使用される他の育種法は、当分野において公知である。戻し交雑育種は、反復親である、望ましいホモ接合性の栽培品種または同系交配株において、単純に遺伝的で、非常に遺伝性の形質に関する遺伝子を移動させるのに使用されてきた。移動させる形質の供給源は、ドナー親と呼ばれる。得られた植物は、反復親（例えば、栽培品種）の特性、および、ドナー親から移動された望ましい形質を有することが期待される。最初の交雑後、ドナー親の表現型を有する個体が選択され、反復親に対して、繰り返し交雑（戻し交雑）される。得られた植物は、反復親（例えば、栽培品種）の特性、および、ドナー親から移動された望ましい形質を有することが期待される。

【0064】

本発明のDNA分子は、マーカー支援育種(MAB)法における分子マーカーとして使用され得る。本発明のDNA分子は、当分野において公知のように、遺伝的に結合された農学的に有用な形質を特定する方法に使用され得る(例えば、AFLPマーカー、RFLPマーカー、RAPDマーカー、SNP、SSR)。除草剤抵抗性形質は、本主題の発明の大豆植物との交雑の子孫(または、その子孫、および、任意の他の大豆栽培品種または品種)において、MAB法を使用して追跡され得る。DNA分子は、この形質に関するマーカーであり、当分野において周知のMAB法は、本主題の発明の少なくとも1つの大豆株、またはその子孫が、親または原種である、大豆植物体における除草剤抵抗性形質を追跡するのに使用され得る。本発明の方法は、本主題のイベントを有する任意の大豆品種を特定するのに使用され得る。

10

【0065】

本主題の方法は、除草剤耐性大豆植物体を製造する方法であって、前記方法は、イベントpDAB8264.42.32.1を、大豆栽培品種に遺伝子移入する工程を含む。より具体的には、本発明の方法は、本主題の発明の2つの植物、または、本主題の発明の1つの植物と任意の他の植物とを交雑させる工程を含む。好ましい方法は、さらに、本主題の発明に基づいて検出可能なイベントに関して、子孫を分析することにより、交雑の子孫を選択する工程を含む。例えば、本主題の発明は、他の望ましい形質、例えば、農学的特質、例えば、種々の実施例において本願明細書で検証されたものを含む植物による育種サイクルにより、本主題のイベントを追跡するのに使用され得る。本主題のイベントおよび所望の形質を含む植物は、例えば、育種の更なるラウンドにおいて、検出され、特定され、選択され、および素早く使用され得る。本主題のイベント/形質も、害虫抵抗性形質および/または更なる除草剤耐性形質と、育種により組み合わせられ、本主題の発明に基づいて追跡され得る。後者の一実施形態は、除草剤であるジカンバに対する抵抗性をコードする遺伝子と組み合わせられた、本主題のイベントを含む植物である。

20

30

【0066】

このため、本主題の発明は、例えば、グリホサート抵抗性(例えば、抵抗性植物または細菌のグリホサートオキシダーゼ(GOX)、グリホサートアセチルトランスフェラーゼ(GAT)をコードする更なる形質、グルホシネート抵抗性に関する更なる形質(例えば、ピアラホス抵抗性(bar)、アセト乳酸合成酵素(ALS)阻害性除草剤抵抗性(例えば、イミダゾリノン[例えば、イマゼタピル]、スルホニル尿素、トリアゾロピリミジンスルホナミド、ピリミジニルチオベンゾアート、および他の化学物質[Csr1、SurA等])を付与する形質、プロモキシニル抵抗性形質(例えば、Bxn)、ジカンバ除草剤に対する抵抗性に関する形質(例えば、米国特許出願公開第2003/0135879号を参照のこと)、HPPD(4-ヒドロキシルフェニル-ビルビン酸-ジオキシゲナーゼ)酵素の阻害剤に対する抵抗性に関する形質、フィトエン脱飽和酵素(PDS)の阻害剤に対する抵抗性に関する形質、光化学系II阻害性除草剤(例えば、psbA)に対する抵抗性に関する形質、光化学系I阻害性除草剤に対する抵抗性に関する形質、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼIX(PPo)阻害性除草剤(例えば、PPo-1)に対する抵抗性に関する形質、フェニル尿素除草剤(例えば、CYP76B1)に対する抵抗性に関する形質と組み合わせられ得る。1つ以上のこのような形質は、本主題の発明と組み合わせられて、雑草のシフトおよび/または複数分類の除草剤に対する抵抗性を効

40

50

果的に抑制、遅延および/または予防する能力を提供し得る。

【0067】

本主題の発明に使用される a a d - 1 2 遺伝子が、フェノキシ酢酸オーキシシ除草剤（例えば、2, 4 - D B、M C P B 等）に変換される化合物に対する抵抗性も提供することが、当業者に理解されるであろう。2, 4 - D B 除草剤に存在する酪酸部分は、 β -酸化により、植物毒性の2, 4 - ジクロロフェノキシ酢酸に変換される。同様に、M C P B は、 β -酸化により、植物毒性のM C P A に変換される。酪酸除草剤は、それ自体は非除草性であるが、感受性の植物内での β -酸化により、その各酸型に変換されて、植物毒性の酢酸型の除草剤を産生する。急速な β -酸化ができない植物は、酪酸除草剤により害されない。しかしながら、急速な β -酸化が可能で、酪酸除草剤を酢酸型に変換し得る植物は、引き続き、A A D - 1 2 により保護される。

10

【0068】

除草剤を散布する方法は、当分野において周知である。このような散布は、2 またはそれ以上の除草剤のタンク混合を含み得る。本主題の発明に基づいて使用するのに好ましい除草剤は、グリホサート、グルホシネートおよびフェノキシオーキシシ除草剤（例えば、2, 4 - D ; 2, 4 - D B ; M C P A ; M C P B ）の組み合わせである。他の好ましい組み合わせとしては、グリホサートと2, 4 - D またはグルホシネートと2, 4 - D の混合物が挙げられる。これら3種類の除草剤は、本主題の開示の利益を有する当業者に明らかであろう、有利な組み合わせに使用され得る。1 またはそれ以上の本主題の除草剤は、本主題の発明の種子を播く前に、フィールド/区画に散布され得る。このような散布は、例えば、本主題の発明の種子を播く14日以内であり得る。1 またはそれ以上の本主題の除草剤は、種まき後発芽前にも散布され得る。1 またはそれ以上の本主題の除草剤は、（雑草を抑制するために）地面、または、雑草の表面上、および/または、本主題の発明の遺伝子組換え植物の表面上にも散布され得る。本主題の3つの除草剤は、例えば、1つの除草剤に対して耐性であるが、別のものには耐性であり得ない雑草を抑制または予防するのに、交代され、または、組み合わせで使用され得る。本主題の3種類の除草剤に関する種々の散布時間が、当分野において公知であろうように、種々の方法で使用され得る。

20

【0069】

さらに、本主題のイベントは、1 またはそれ以上の更なる除草剤耐性形質、1 またはそれ以上の更なる入力（例えば、害虫抵抗性、真菌抵抗性もしくはストレス耐性等）または出力（例えば、収量向上、オイルプロファイルの改善、繊維品質の改善等）の形質と、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換えの両方で、積み重ねられ得る。このため、本主題の発明は、かなり多くの農学的有害生物を柔軟に、コスト効率よく抑制する能力を有する、改善された作物品質の完全な農学的パッケージを提供するのに使用され得る。

30

【0070】

相同組換えにより、植物細胞の特定の染色体サイト内に、ポリヌクレオチド配列を組み込む方法は、当分野で説明されてきた。例えば、米国特許出願公開第2009/0111188号に記載のサイト特異的組み込みは、染色体標的へのドナーポリヌクレオチド配列の導入を媒介する、リコンビナーゼまたはインテグラーゼの使用を説明している。さらに、国際公開第2008/021207号A1には、ゲノムの特定の位置に、1 またはそれ以上のポリヌクレオチド配列を組み込むための、ジンクフィンガー媒介性の相同組換えが記載されている。リコンビナーゼ、例えば、米国特許第6,720,475号に記載のF L P / F R T、または、米国特許第5,658,772号に記載のC R E / L O X の使用は、特定の染色体サイト内に、ポリヌクレオチド配列を組み込むのに使用され得る。最後に、特定の染色体位置内のドナーポリヌクレオチドを標的にするためのメガヌクレアーゼの使用が、Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) pp. 5055-5060に記載された。

40

【0071】

植物細胞内へのサイト特異的組み込みに関する種々の方法は、一般的に公知であり、適用可能である（Kumar et al., Trends in Plant Sci. 6(4) (2001) pp. 155-159）。さらに、複数の原核生物および低級の真核生物において、特定されてきたサイト特異的組換え

50

系が、植物における使用に適用され得る。このような系としては、例えば、制限されず、酵母チゴサッカロミセス・ルーキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) の p S R 1 プラスミド由来の R / R S リコンビナーゼ系 (Araki et al.(1985)J. Mol. Biol. 182:191-203) および、ファージ M u の G i n / g i x 系 (Maeser and Kahlmann (1991) Mol. Gen. Gen et. 230:170-176) が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

本発明の一部の実施形態では、新たな導入遺伝子を、既存の遺伝子組換えイベントに近接して組み込むか、または、積み重ねるのが望ましくあり得る。遺伝子組換えイベントは、固有の特徴、例えば、単独挿入サイト、正常なメンデル分離および安定した発現ならびに、優れた組み合わせの効果、例えば、複数の環境ロケーションにおける、および、同ロケーションにわたる、除草剤耐性および農業生産力に基づいて選択された好ましいゲノム遺伝子座を考慮され得る。新たに組み込まれた導入遺伝子は、既存の形質転換体における導入遺伝子の発現特徴を維持すべきである。さらに、新たに組み込まれたイベントの検出および確認のためのアッセイの開発が、ゲノムフランキンク配列および新たに組み込まれたイベント染色体位置が既に特定されている場合、克服され得る。最後に、既存の導入遺伝子に結合される、特定の染色体位置への新たな導入遺伝子の組み込みは、従来の育種法を使用する有性外部交雑による、他の遺伝的背景への導入遺伝子の遺伝子移入を促進するであろう。

【 0 0 7 3 】

本発明の一部の実施形態では、遺伝子組換えイベント由来のポリヌクレオチド配列を切除するのが望ましくあり得る。例えば、米国仮特許出願第 6 1 / 2 9 7 , 6 2 8 号に記載の導入遺伝子の切除は、染色体に組み込まれた遺伝子組換えイベント由来の遺伝子発現カセットからなる、ポリヌクレオチド配列を除去するための、ジンクフィンガーヌクレアーゼの使用を説明する。除去されるポリヌクレオチド配列は、選択的マーカーであり得る。ポリヌクレオチド配列の切除および除去に基づいて、修飾された遺伝子組換えイベントは、ポリヌクレオチド配列の挿入により、再標的され得る。ポリヌクレオチド配列の切除および、修飾された遺伝子組換えイベントの後の再標的は、選択的マーカーの再利用、または、特定の遺伝子の発現の原因となる植物トランスクリプトームへの意図しない変化を克服する能力等の利点を提供する。

【 0 0 7 4 】

本主題の発明は、本願明細書において、異種性核酸の挿入に優れた、大豆ゲノム中の 1 5 番染色体上の特異的サイトを開示する。1 5 番染色体上の挿入 / 標的サイトの位置を特定および / または標的するのに有用でもあり得る、5 ' フランキンク配列および 3 ' フランキンク配列も開示される。このため、本主題の発明は、この予め確立された標的サイト、または、この標的サイト付近に当該異種性核酸を導入する方法を提供する。本主題の発明は、開示の標的サイトまたはこのようなサイトの概ね近傍に挿入された、任意の異種性ヌクレオチド配列を含む大豆種子および / または大豆植物体も包含する。このような標的組み込みを達成するための 1 つの選択肢は、本願明細書に例示の p a t 発現カセットの代わりに異なるインサートを切除および / または置換することである。この一般的な認識では、標的の相同組換えが、例えば、制限されず、本主題の発明に基づいて使用され得る。

【 0 0 7 5 】

本願明細書で使用する時、遺伝子イベントまたは形質の「積み重ね」は、1 つの遺伝子組換え株に所望の形質を組み合わせることであり得る。植物育種家は、それぞれが所望の形質を有する親の間で交雑させ、ついで、これらの所望の形質の両方を有する子孫を特定することにより、遺伝子組換え形質を積み重ねる。遺伝子を積み重ねるための別の方法は、形質転換中に同時に、2 またはそれ以上の遺伝子を、植物の細胞核内に移動させることによる。遺伝子を積み重ねるための別の方法は、当該別の遺伝子により、遺伝子組換え植物を再形質転換することによる。例えば、遺伝子の積み重ねは、2 またはそれ以上の異なる形質、例えば、2 またはそれ以上の異なる害虫形質、害虫抵抗性形質と疾患抵抗性形質、2 またはそれ以上の除草剤抵抗性形質および / または害虫抵抗性形質と除草剤抵抗性形質を

組み合わせるのに使用され得る。当該遺伝子に加えて、選択的マーカーの使用も、遺伝子積み重ねを検討され得る。

【0076】

「相同組換え」は、2つのヌクレオチド配列が相互作用して（組換えられて）、新たな組換えDNA配列を形成し得ることにより、類似のヌクレオチド配列を含む対応するサイトを有する、ヌクレオチド配列の任意のペア間での反応を意味する。本願明細書では、類似するヌクレオチド配列のサイトは、それぞれ「相同配列」と呼ばれる。一般的に、相同配列が長くなる場合に、相同組換えの頻度は向上する。このため、相同組換えは、同一性がより低い2つのヌクレオチド配列間で起こり得るが、2つの配列間の相違が大きくなる場合、組換えの頻度（または、効率）は低下する。組換えは、ドナーおよび標的分子それぞれ上の1つの相同配列を使用して達成され得る。これにより、「単独のクロスオーバー」組換え生成物を産生する。または、2つの相同配列が、標的およびドナーヌクレオチド配列それぞれ上に置かれてもよい。標的についての2つの相同配列を有するドナー上の2つの相同配列間での組換えは、「二重クロスオーバー」組換え生成物を産生する。ドナー分子上の相同配列が、操作される配列（例えば、当該配列）に隣接する場合、標的分子による二重クロスオーバー組換えは、組換え生成物をもたらすであろう。組換え生成物では、当該配列は、標的分子上の相同配列間に元からあったDNA配列を置き替える。二重クロスオーバー組換えイベントによる、標的とドナーとの間のDNA配列の交換は、「配列置換」と呼ばれる。

10

【0077】

本主題のイベントは、ほとんど全ての広葉およびイネ科雑草を抑制するであろう、除草剤の組み合わせに対する耐性をもたらす、3つの異なる除草剤耐性タンパク質の遺伝子組換え発現を可能にする。このマルチ除草剤耐性形質の発現カセット/遺伝子組換えインサートは、例えば、他の除草剤耐性形質（例えば、グリホサート抵抗性、グルホシネート抵抗性、イミダゾリノン抵抗性、ジカンバ抵抗性、HPPD抵抗性、プロモキシニル抵抗性等）ならびに、害虫抵抗性形質（例えば、Cry1F、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry34/45、Cry1Be、Cry1Ca、Cry1Da、Cry1Ea、Cry1Fa、植物殺虫性タンパク質（「VIPs」）（VIP3A等を含む））と積み重ねられ得る。さらに、本主題の発明の発現カセット/遺伝子組換えインサートにおける除草剤耐性タンパク質は、第2の遺伝子または遺伝子群で遺伝的に操作された植物の初代形質転換体の選択を支援するための、1またはそれ以上の選択的マーカーとして役立ち得る。

20

30

【0078】

これらの組み合わせの形質は、除草剤（例えば、グリホサート）に対する新たに獲得した抵抗性または固有の耐性により、雑草（および類似）種を抑制する新規な方法を生じさせる。このため、イベントpDAB8264.42.32.1を使用して、雑草を抑制するための新規な方法は、本発明の範囲内である。

【0079】

作物内に積み重ねられるか、または、個々に形質転換された、本主題の遺伝子組換え形質の使用は、フェノキシ、ピリジロキシ、グリホサートおよび/またはグルホシネートの除草剤に対する耐性を付与するための遺伝子を含まない、他の除草剤耐性の自生作物を抑制するためのツールを提供する。

40

【0080】

本主題の好ましい植物体または種子は、そのゲノムに、本願明細書で特定したインサート配列と併せて、本願明細書に記載のように、インサートの両側に、少なくとも200~500個以上の連続的なフランキングヌクレオチドを含む。特に断らない限り、フランキング配列への言及は、配列番号1および配列番号2に関して特定されたものを意味する。改めて、本主題のイベントは、挿入されたDNAに隣接する本主題のフランキングゲノム配列間に挿入された異種性DNAを含む。これらのフランキング配列の全部または一部は、イベントを含む親株の有性交雑の結果として、挿入されたDNAを受け取る子孫に移動させられることが期待され得る。

50

【0081】

本主題の発明は、本主題の発明の植物体の再生細胞の組織培養を含む。このような組織培養から再生された植物体も含まれる。具体的には、植物体は、例示した品種の全ての形態学および生理学的特性を発現可能である。本主題の好ましい植物体は、寄託された種子から生長した植物の、全ての生理学的および形態学的特性を有する。この発明は、さらに、このような種子および、当該品質形質を有する種子の子孫を含む。

【0082】

植物体もしくは種子またはそれらの部分の操作（例えば、変異、更なるトランスフェクションおよび更なる育種）は、「本質的に派生した」品種と呼ばれ得るものの創作をもたらす。植物新品種保護国際同盟（UPOV）は、品種が保護された品種から本質的に派生したかを判定するための下記のガイドラインを提供してきた。

[A] 品種は、下記の場合、別の品種（「原品種」）から本質的に派生したとみなされるべきである：

(i) 当該品種が、主として原品種からまたはそれ自体主として原品種から派生した品種から派生し、かつ、原品種の遺伝子型または遺伝子型の組み合わせから生じた本質的発現の維持していること；

(ii) 原品種から明確に区別することができ；かつ、

(iii) 派生させる行為から生じた差異を除くほか、原品種の遺伝子型または遺伝子型の組み合わせから生じた本質的発現において原品種に合致すること。

【0083】

1992年10月30日、UPOV、国際機関による第6回会合、Geneva；連合の事務局により作成された記録文書。

【0084】

本願明細書で使用する時、「株」は、少なくとも1つの形質に関する個体間の遺伝的ばらつきがほとんどないか、または遺伝的ばらつきがない植物のグループである。このような株は、自家受粉および選択の複数世代、または、組織もしくは細胞培養技術を使用する単独の親由来の栄養繁殖により作製され得る。

【0085】

本願明細書で使用する時、「栽培品種」および「品種」の用語は、同義語であり、商業生産に使用される株を意味する。

【0086】

「安定性」または「安定な」とは、所定の要素に関して、要素が、何世代にもわたって、好ましくは、少なくとも3世代にわたって、実質的に同じレベル、例えば、好ましくは $\pm 15\%$ 、より好ましくは $\pm 10\%$ 、最も好ましくは $\pm 5\%$ で維持されることを意味する。安定性は、温度、ロケーション、ストレスおよび種まきのタイミングにより影響を受ける場合がある。フィールド条件下での次の世代の比較は、類似の方法で要素を生じさせるべきである。

【0087】

「商業的実用性」は、従来 of 耕作機械を使用する農家により、作物が生産され、記載の成分によるオイルが、従来 of 粉碎および抽出装置を使用して種子から抽出され得るように、良好な植物の生長力および高い生殖能力を有することと規定される。商業的に有用であるために、種子重量、オイル含量、1エーカーあたりに生産される合計オイルにより測定される場合、収量は、同じ区画で生長した高品質な価値を有する形質を有しない、他に比較可能な商業的な大豆品種の平均収率の15%以内である。

【0088】

「農学的にエリート」とは、本主題のイベントによる除草剤耐性に加えて、望ましい農学的特徴、例えば、収率、成熟度、疾患抵抗性等を有する株を意味する。本主題の発明のイベントを含む植物において、以下の実施例で説明するように、個々または任意の組み合わせで取得された農学的な形質は、本主題の発明の範囲内である。任意および全てのこれらの農学的特徴およびデータポイントは、このような植物を規定するのに使用される特徴

10

20

30

40

50

の範囲における、一点、またはどちらかの端部もしくは両端部のいずれかとして、このような植物を特定するのに使用され得る。

【0089】

この開示を踏まえると、検出キットの好ましい実施形態が、「ジャンクション配列」もしくは「トランジション配列」（大豆ゲノムスランキング配列が、インサート配列と一致する）を対象にし、および/またはこれを含む、プローブおよび/またはプライマーを含み得ることを、当業者は認識するであろう。例えば、このことは、表1に示したように、一方または両方のジャンクション配列（インサートは、フランキング配列と一致する）を特定するために設計された、ポリヌクレオチドプローブ、プライマーおよび/または増幅産物を含む。1つの一般的な設計は、フランキング領域にハイブリダイズする1つのプライマー、および、インサートにハイブリダイズする1つのプライマーを有することである。このようなプライマーは、多くの場合、長さが少なくとも約15個の残基である。この配置により、プライマーは、本主題の発明のイベントの存在を示す検出可能な増幅産物を産生/増幅するのに使用され得る。これらのプライマーは、上記に示したジャンクション配列にまたがる（および含む）増幅産物を産生するのに使用され得る。

10

【0090】

フランキング配列に「タッチダウン」するプライマーは、典型的には、ジャンクションを越える約200塩基程度を越えてハイブリダイズするようには設計されない。このため、典型的なフランキングプライマーは、インサートの開始からフランキング配列内の200塩基以内のいずれかの鎖の少なくとも15残基を含むように設計されるであろう。すなわち、上記特定したジャンクション配列の一方または両方からの、100から200~500程度の塩基以内の残基からの（またはハイブリダイズする）適切なサイズ配列を含むプライマーは、本主題の発明の範囲内である。インサートプライマーは、同様に、インサート上のいずれかの場所に設計され得るが、上記特定したジャンクション配列からの、100から200~500程度以内の、インサート上の残基（例えば、相補体）が、例えば、このようなプライマー設計について、非排他的に使用され得る。

20

【0091】

プライマーおよびプローブが、標準的なハイブリダイゼーションおよび/またはPCRの条件の範囲下において、本願明細書で例示した配列のセグメントにハイブリダイズするように設計され得ることも、当業者は認識するであろう。プライマーおよびプローブは、例示した配列に完全に相補的ではない。すなわち、ある程度のミスマッチは、容認され得る。おおよそ20塩基のプライマーに関して、例えば、典型的には、ミスマッチの塩基が、増幅産物の反対側である、プライマーの内部または末端にある場合、1つまたは2つ程度のヌクレオチドは、反対側の鎖に結合するのに必要ではない。種々の適切なハイブリダイゼーション条件が、以下に提供される。合成ヌクレオチド類似体、例えば、イノシンも、プローブに使用され得る。ペプチド核酸（PNA）プローブならびにDNAおよびRNAプローブも、使用され得る。重要なことは、このようなプローブおよびプライマーは、本主題の発明のイベントの存在に関して診断的（独特に特定および区別可能）であることである。

30

【0092】

例えば、小さなシーケンシングエラーをもたらす、PCR増幅におけるエラーが発生し得ることがあることに留意すべきである。すなわち、特に示さない限り、本願明細書に列記した配列は、大豆ゲノムDNAからの長い増幅産物を産生し、ついで、増幅産物をクローニングおよびシーケンスすることにより決定された。ゲノムDNAからのシーケンシングに対して十分な増幅産物を生成するために必要である多くのラウンドの増幅を考えると、この方法において産生され、決定された配列において、わずかな差異および小さな食い違いを発見することは珍しいことではない。これらの種類の一般的なシーケンシングエラーまたは食い違いにより必要となる任意の調節は、本発明の範囲内であることを、当業者は認識し、気づくはずである。

40

【0093】

50

例えば、配列が、イベントの作製中に挿入された場合、一部のゲノム配列が欠損されることは珍しいことではないことにも留意すべきである。このため、本主題のフランキング配列と、GENBANK等に列記されたゲノム配列との間に、一部の差異も表れ得る。

【0094】

「インサート」の構成は、図面に示され、以下の実施例においてより詳細に記載される。これらの構成のDNAポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントは、本発明の方法における、DNAプライマーまたはプローブとして使用され得る。

【0095】

本発明の一部の実施形態では、大豆植物由来の植物体および種子等において、導入遺伝子/ゲノム挿入領域の存在を検出するための組成物および方法が提供される。本願明細書で提供された本主題の導入遺伝子/ゲノム挿入領域ジャンクション配列、本願明細書で特定したジャンクション配列を含むセグメント、ならびに、このように例示した任意の配列の構成およびそれらの任意のセグメントを含むDNA配列が提供される。挿入領域ジャンクション配列は、ゲノム内に挿入された異種性DNAと、挿入サイトに隣接する大豆細胞由来のDNAとの間のジャンクションをまたぐ。このような配列は、所定のイベントに関して診断的であり得る。

10

【0096】

これらのインサートおよびボーダー配列に基づいて、イベント特異的プライマーが、産生され得る。PCR分析は、本主題の発明の大豆株が、これらのイベント特異的プライマーセットにより産生されたPCR増幅産物の分析により、異なる大豆の遺伝子型に特定され得ることを説明した。これらおよび他の関連する手順は、独特に、これらの大豆株を特定するのに使用され得る。このため、このようなプライマーペアから派生したPCR増幅産物は、他に存在せず、これらの大豆株を特定するのに使用され得る。

20

【0097】

一部の実施形態では、新規な導入遺伝子/ゲノム挿入領域の連続的なフラグメントを含むDNA配列は、この発明の態様である。導入遺伝子インサート配列の十分な長さのポリヌクレオチド、ならびに、1またはそれ以上のこれらの大豆植物に関して診断的な増幅産物生成物の産生に関するプライマー配列として有用である、1またはそれ以上の前述の大豆植物および/または配列からの、大豆ゲノム配列の十分な長さのポリヌクレオチドを含むDNA配列が含まれる。

30

【0098】

関連する実施形態は、本願明細書で特定したDNA配列の、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個以上の連続的なヌクレオチドの導入遺伝子部分を含むDNA配列、またはそれらの相補体、ならびに、これらの配列からの類似する長さのフランキング大豆DNA配列（例えば、配列番号1および配列番号2ならびにそのセグメント）またはそれらの相補体に関連する。このような配列は、DNA増幅法におけるDNAプライマーとして有用である。これらのプライマーを使用して産生された増幅産物は、本願明細書で言及した大豆イベントのいずれかに関して、診断的である。したがって、本発明は、このようなDNAプライマーおよび相同プライマーにより産生された増幅産物も含む。

40

【0099】

本発明は、本願明細書で言及した大豆イベントに対応する試料中にDNAの存在を検出する方法も含む。このような方法は、(a) DNAを含む試料を、少なくとも1つのこれらの大豆イベントからのDNAを用いた核酸増幅反応に使用される場合にイベントに関して診断的な増幅産物を産生するプライマーセットと接触させる工程；(b) 核酸増幅反応を行うことにより、増幅産物を産生する工程；ならびに、(c) 増幅産物を検出する工程を含み得る。

【0100】

本主題の発明の更なる検出方法は、イベントに対応する試料中にDNAの存在を検出す

50

る方法を含む。前記方法は、(a) DNAを含む試料を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、少なくとも1つの大豆由来のDNAとハイブリダイズし、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、対照大豆植物(当該イベントを含まないDNA)とハイブリダイズしないプローブと接触させる工程；(b) 試料およびプローブを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；ならびに、(c) DNAに対するプローブのハイブリダイゼーションを検出する工程を含む。

【0101】

更なる実施形態では、本主題の発明は、イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む大豆植物体を製造する方法を含む。前記方法は、(a) 第1の親大豆株(株の植物体に除草剤抵抗性形質を付与する、本発明の発現カセットを含む)と、第2の親大豆株(この除草剤耐性形質を欠く)とを有性交雑することにより、複数の子孫植物体を産生する工程；および(b) 分子マーカーの使用により、子孫植物体を選択する工程を含む。このような方法は、場合により、子孫植物体を、第2の親大豆株に戻し交雑して、除草剤耐性形質を含む、何世代にもわたって同じ特徴を示す大豆植物体を産生する、更なる工程を含んでもよい。

10

【0102】

本発明の別の態様に基づいて、イベントとの交雑の子孫における接合性を判定する方法が提供される。前記方法は、大豆DNAを含む試料を、本主題の発明のプライマーセットと接触させる工程を含む。プライマーは、少なくとも1つの大豆イベント由来のゲノムDNAとの核酸増幅反応に使用される場合、少なくとも1つの大豆イベントに関して診断的な第1の増幅産物を産生する。このような方法は、さらに、核酸増幅反応を行うことにより、第1の増幅産物を産生し；第1の増幅産物を検出し；および、大豆DNAを含む試料を、プライマーセットと接触させることを含む(大豆植物体からのゲノムDNAとの核酸増幅反応に使用される場合、プライマーセットは、大豆ゲノム領域に相同な野生型の大豆ゲノムDNA含む第2の増幅産物を産生し；および、核酸増幅反応を行うことにより、第2の増幅産物を生成する)。前記方法は、さらに、第2の増幅産物を検出し、および、試料中の第1の増幅産物と第2の増幅産物とを比較することを含む。両増幅産物の存在は、試料が、導入遺伝子挿入に関して、ヘテロ接合性であることを示す。

20

【0103】

DNA検出キットは、本願明細書に開示の組成物およびDNA検出の分野において周知の方法を使用して開発され得る。キットは、試料中における本主題の大豆イベントDNAの特定に有用であり、このDNAを含む大豆植物を育種するための方法に適用され得る。キットは、例えば、本願明細書に開示の増幅産物に相同的もしくは相補的なDNA配列、または、本主題のイベントの導入遺伝子の遺伝要素に含まれるDNAに相同的または相補的なDNA配列を含む。これらのDNA配列は、DNA増幅反応に使用され、または、DNAハイブリダイゼーション法におけるプローブとして使用され得る。キットは、検出法の実行に必要な試薬および材料を含んでもよい。

30

【0104】

「プローブ」は、従来の検出可能な標識またはレポータ分子(例えば、放射性同位体、リガンド、化学発光剤または酵素)を付着する、単離された核酸分子である。このようなプローブは、標的核酸の鎖に相補的であり、本発明の場合、大豆植物体からでも、または、イベント由来のDNAを含む試料からでも、大豆イベントの1つからのゲノムDNAの鎖に相補的である。本発明に基づくプローブは、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、標的DNA配列に特異的に結合し、その標的DNA配列の存在を検出するのに使用され得るポリアミドおよび他のプローブ材料も含む。「単離された」ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが非天然の状態にあり、例えば、操作可能にヘテロ接合性のプロモータに結合されることを示唆する。同様に、「精製された」タンパク質は、タンパク質が非天然の状態にあることを示唆する。

40

【0105】

「プライマー」は、核酸ハイブリダイゼーションにより相補的な標的DNA鎖にアニー

50

ルされて、プライマーと標的DNA鎖との間のハイブリッドを形成し、ついで、ポリメラーゼ、例えば、DNAポリメラーゼにより、標的DNA鎖に沿って伸長される、単離され/合成された核酸である。本発明のプライマーペアは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または他の従来の核酸増幅法により、標的核酸配列の増殖に関するその使用を意味する。

【0106】

プローブおよびプライマーは、一般的には、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、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、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464

、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499または500個以上の長さのポリヌクレオチドである。このようなプローブおよびプライマーは、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、特異的に標的配列にハイブリダイズする。好ましくは、本発明に基づくプローブおよびプライマーは、標的配列に完全な配列類似性を有するが、標的配列とは異なり、標的配列にハイブリダイズする能力を保持するプローブが、従来の方法により設計されてもよい。

【0107】

プローブおよびプライマーの調製および使用をする方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989に記載されている。PCR-プライマーペアは、例えば、その目的を意図したコンピュータプログラムを使用することにより、公知の配列から派生され得る。

【0108】

本願明細書に開示のフランキングDNAおよびインサート配列に基づくプライマーおよびプローブは、開示の配列を、従来の方法、例えば、このような配列の再クローニングおよびシーケンシングにより、確認（および、必要であれば、補正）するのに使用され得る。

【0109】

本発明の核酸プローブおよびプライマーは、ストリンジェントな条件下で、標的DNA配列にハイブリダイズする。任意の従来核酸ハイブリダイゼーションまたは増幅法は、試料中における導入遺伝子イベント由来のDNAの存在を特定するのに使用され得る。核酸分子およびそのフラグメントは、特定の環境下において、他の核酸分子に、特異的にハイブリダイズ可能である。本願明細書で使用する時、2つの核酸分子は、2つの核酸分子が、逆平行の、二本鎖核酸構造を形成可能である場合、互いに特異的にハイブリダイズ可能であると言われる。核酸分子は、核酸分子が完全な相補性を示す場合、別の核酸分子の「相補体」とであると言われる。本願明細書で使用する時、分子は、分子の1つの各ヌクレオチドが、他のもののヌクレオチドに相補的である場合、「完全な相補性」を示すと言われる。2つの分子は、2つの分子が、少なくとも従来「低ストリンジェントな」条件下において、互いにアニールされたままであることを許容するための十分な安定性を有して、互いにハイブリダイズし得る場合、「最小限に相補的」とであると言われる。同様に、分子は、分子が、従来「高ストリンジェントな」条件下において、互いにアニールされたままであることを許容するための十分な安定性を有して、互いにハイブリダイズし得る場合、「相補的」とであると言われる。従来ストリンジェントな条件は、Sambrook et al., 1989により記載されている。このため、完全な相補性からの出発は、このような出発が、二本鎖構造を形成する、分子の能力を完全に不可能にしない限り、許容される。核酸分子が、プライマーまたはプローブとして役立つために、使用される具体的な溶媒および塩濃度下において、安定的な二本鎖構造を形成可能であるように、配列において十分に相補的であることのみが必要である。

【0110】

本願明細書で使用する時、実質的に相同な配列は、高いストリンジェントな条件下で比較される、核酸配列の相補体に、特異的にハイブリダイズするであろう、核酸配列である。「ストリンジェントな条件」の用語は、Sambrook et al., 1989, 9.52-9.55に記載の特異的なハイブリダイゼーション手順により、核酸プローブの標的核酸（すなわち、当該特定の核酸配列）へのハイブリダイゼーションに関して機能的に規定される。Sambrook et al., 1989, 9.47-9.52および9.56-9.58も参照のこと。したがって、本発明のヌクレオチド配列は、DNAフラグメントの相補的なストレッチとの二本鎖分子を選択的に形成する、その機能に使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0111】

想定される用途に応じて、標的配列に対するプローブの選択性の度合いの変化を達成するための、ハイブリダイゼーションの各種条件が使用され得る。高い選択性を要求する用途に関して、典型的には、例えば、エンドポイント T A Q M A N およびリアルタイム P C R 用途に関して、ハイブリッドを形成するための比較的ストリンジェントな条件が使用されるであろう。約 60 から約 75 の温度で、1.5 mM から約 4.0 mM M g C l₂ が選択されるであろう。ストリンジェンシーの向上に関して、保持時間を変化させ得る。他のハイブリダイゼーション技術に関して、典型的には、比較的低い塩および/または高い温度条件、例えば、約 0.02 M から約 0.15 M N a C l で、約 50 から約 70 の温度により提供される条件が、使用されるであろう。ストリンジェントな条件は、例えば、高ストリンジェントな洗浄バッファー (0.2 × S S C、0.1% S D S、65) で、少なくとも 2 回、ハイブリダイゼーションフィルタを洗浄することを含む。D N A ハイブリダイゼーションを促進する適切にストリンジェントな条件 (例えば、約 45 での、6.0 × 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (S S C)、続けて、50 での 2.0 × S S C で洗浄される) が、当業者に公知である。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50 での約 2.0 × S S C の低ストリンジェンシーから、50 での約 0.2 × S S C の高ストリンジェンシーまで選択され得る。さらに、洗浄工程における温度は、室温である 22 での低いストリンジェントな条件から、約 65 での高いストリンジェントな条件まで上昇され得る。温度および塩の両方が、変動されてもよく、または、温度もしくは塩濃度のいずれかが、一定に保持され、一方、他方の値は、変化されてもよい。このような選択的な条件は、プローブとテンプレートまたは標的鎖との間に任意のミスマッチがあれば、ほとんど許容されない。ハイブリダイゼーションによる D N A 配列の検出は、当業者に周知であり、米国特許第 4,965,188 号および同第 5,176,995 号の教示が、ハイブリダイゼーション分析法の典型例である。

10

20

【0112】

特に好ましい実施形態では、本発明の核酸は、高ストリンジェントな条件下において、本願明細書に例示され、または、示唆された、相補体およびそのフラグメントを含む 1 またはそれ以上のプライマー (もしくは増幅産物または他の配列) に、特異的にハイブリダイズするであろう。本発明の一態様では、本発明のマーカーク酸分子は、例示された配列または相補体および/もしくはそのフラグメントの 1 つにおいて、本願明細書で説明された核酸配列を有する。

30

【0113】

本発明の別の態様では、本発明のマーカーク酸分子は、このような核酸配列と、80% と 100% との間または 90% と 100% との間の配列同一性を共有する。本発明の更なる態様では、本発明のマーカーク酸分子は、このような配列と、95% と 100% との間の配列同一性を共有する。このような配列は、遺伝的交雑の子孫を特定するための植物育種法におけるマーカークとして使用されてもよい。標的 D N A 分子へのプローブのハイブリダイゼーションは、当業者に公知のかなり多くの方法により検出され得る。これらは、制限されず、蛍光タグ、放射性タグ、抗体ベースのタグおよび化学発光タグを含み得る。

40

【0114】

特定の増幅プライマーペアを使用する (例えば、P C R による) 標的核酸配列の増幅に関して、「ストリンジェントな条件」は、プライマーペアが、対応する野生型配列 (または、その相補体) を有するプライマーが結合して、好ましくは固有の増幅生成物である増幅産物を産生するであろう、標的核酸配列のみにハイブリダイズすることを許容する条件である。

【0115】

「(標的配列) に特異的」の用語は、プローブまたはプライマーが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、標的配列を含む試料における標的配列のみにハイブリダイズすることを示す。

【0116】

50

本願明細書で使用する時、「増幅されたDNA」または「増幅産物」(amplicon)は、核酸テンプレートの一部である、標的核酸配列の核酸増幅の生成物を意味する。例えば、有性交雑に起因する大豆植物体が本発明の大豆植物体由来の遺伝子組換えイベントのゲノムDNAを含むかどうかを判定するために、大豆植物の組織試料から抽出されたDNAが、挿入された異種性DNAの挿入サイトに隣接する植物のゲノムにおける、フランキング配列から派生したプライマー、および、イベントDNAの存在に関して診断的な増幅産物を産生するための、挿入された異種性DNAから派生した第2のプライマーを含むプライマーペアを使用する、核酸増幅法に供され得る。増幅産物は、イベントに関して診断的な長さであり、イベントに関して診断的な配列を有する。増幅産物の長さは、プライマーペアと1つのヌクレオチド塩基対との組み合わせられた長さ、および/または、プライマー

10

16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、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、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、4

20

30

40

50

27、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499または500、750、1000、1250、1500、1750、2000以上のヌクレオチド塩基対（上記列記した増分のプラスまたはマイナスのいずれか）との組み合わせられた長さからの範囲であり得る。または、プライマーペアは、インサートヌクレオチド配列全体を含む増幅産物を産生するために、挿入されたDNAの両側のフランキング配列から派生され得る。植物ゲノム配列から派生した数多くのプライマーペアが、挿入されたDNA配列から距離を置いて配置されてもよい。この距離は、1つのヌクレオチド塩基対から、約2万個のヌクレオチド塩基対までの範囲であり得る。「増幅産物」の用語の使用は、具体的には、DNA熱増幅反応において形成され得る、プライマー二量体を除外する。

10

【0117】

核酸増幅は、当分野において公知の種々の核酸増幅法のいずれか、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により達成され得る。各種の増幅法が当分野において公知であり、とりわけ、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に記載されている。PCR増幅法は、22kb以下のゲノムDNAを増幅するのに開発されてきた。これらの方法および、DNA増幅の分野において公知の他の方法が、本発明の実施に使用され得る。主題の大豆イベント由来の、前記ヘテロ接合性の導入遺伝子DNAインサートの配列またはフランキングゲノム配列は、本願明細書で提供された配列から派生したプライマーを使用して、イベント由来のこのような配列を増幅し、続けて、PCR増幅産物またはクローンされたDNAの標準的なDNAシーケンスにより、検証され（および、必要であれば補正され）得る。

20

【0118】

これらの方法により産生される増幅産物は、複数の技術により検出され得る。アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドによる染色は、DNA増幅産物を検出する一般的な周知の方法である。別のこのような方法は、DNAオリゴヌクレオチドが、隣接するフランキングゲノムDNA配列と挿入されたDNA配列との両方を重複するように設計される、遺伝子ビット解析（Genetic Bit Analysis）である。オリゴヌクレオチドは、マイクロウェルプレートのウェルに固定化される。（挿入された配列における1つのプライマーと、隣接するフランキングゲノム配列における1つとを使用する）当該領域のPCR後に、一本鎖PCR生成物が、固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼおよび、予測される次の塩基に特異的な標識化ddNTPを使用する一塩基伸長反応用のテンプレートとしての役割を果たし得る。読み出しは、蛍光またはELISAベースでもよい。シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーションおよび一塩基伸長の成功による、インサート/フランキング配列の存在を示す。

30

40

【0119】

別の方法は、Wingにより記載された（Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000）、パイロシーケンシング技術である。この方法では、オリゴヌクレオチドが、隣接するゲノムDNAとインサートDNAジャンクションに重複するように設計される。オリゴヌクレオチドは、当該領域（挿入された配列における1つのプライマーと、フランキングゲノム配列における1つ）由来の一本鎖PCR生成物にハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼ、ATP、スルフィラーゼ、ルシフェラーゼ、アピラーゼ、アデノシン5'ホスホスルフェートおよびルシフェリンの存在下で、インキュベートされる。DNTPが個々に添加され、取り込みは、測定される光シグナルをもたらす。光シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーションおよび一塩基もしくは多塩基伸長の成功による、導入遺伝子インサート

50

ノフランキング配列の存在を示す。

【0120】

蛍光分極法は、本発明の増幅産物を検出するのに使用され得る別の方法である。この方法後に、オリゴヌクレオチドが、ゲノムフランキングと挿入されたDNAジャンクションに重複するように設計される。オリゴヌクレオチドは、当該領域（挿入されたDNAにおける1つのプライマーと、フランキングゲノムDNA配列における1つ）由来の一本鎖PCR生成物にハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼおよび蛍光標識ddNTPの存在下で、インキュベートされる。一塩基伸長が、ddNTPの取り込みをもたらす。取り込みは、蛍光計を使用する極性の変化として測定され得る。極性の変化は、増幅、ハイブリダイゼーションおよび一塩基伸長の成功による、導入遺伝子インサートノフランキング配列の存在を示す。

10

【0121】

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif) は、DNA配列の存在を検出および定量化する方法である。簡潔に、FRETオリゴヌクレオチドプローブが、ゲノムフランキングとインサートDNAジャンクションに重複するように設計される。FRETプローブおよびPCRプライマー（インサートDNA配列における1つのプライマーと、フランキングゲノム配列における1つ）が、熱安定性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下において、サイクルされる。特異的な増幅中に、Taq DNAポリメラーゼは、FRETプローブ上のクエンチング部分から蛍光部分を除去および放出する。蛍光シグナルは、増幅およびハイブリダイゼーションの成功による、フランキングノ導入遺伝子インサート配列の存在を示す。

20

【0122】

分子ビーコンは、配列検出における使用に関して説明されてきた。簡潔に、FRETオリゴヌクレオチドプローブが、フランキングゲノムとインサートDNAジャンクションに重複するように設計される。FRETプローブの独特な構造は、蛍光およびクエンチング部分をごく近接して維持する二次構造を含むFRETプローブをもたらす。FRETプローブおよびPCRプライマー（インサートDNA配列における1つのプライマーと、フランキングゲノム配列における1つ）が、熱安定性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下において、サイクルされる。PCR増幅の成功後、標的配列へのFRETプローブのハイブリダイゼーションは、プローブの二次構造の除去と、蛍光およびクエンチング部分の空間的な分離をもたらす。蛍光シグナルが生じる。蛍光シグナルは、増幅およびハイブリダイゼーションの成功による、フランキングゲノムノ導入遺伝子インサート配列の存在を示す。

30

【0123】

挿入に優れた大豆ゲノムにおける位置が開示されてきた。本主題の発明は、少なくとも1つの非aad12/pat/2mepspsコード配列を、このゲノム位置の概ね近くにもしくは近く付近に含む、大豆種子および/または大豆植物体も含む。1つの選択肢は、本願明細書に例示されたインサートに代えて、異なるインサートを置換することである。これらの一般的な関心において、例えば、標的相同組換えが、本主題の発明に基づいて使用され得る。この種の技術は、例えば、国際公開第03/080809号および、対応して公開された米国出願（米国特許出願公開第2003/0232410号）の主題である。このため、本主題の発明は、本願明細書において、配列番号1および配列番号2として特定されたフランキング配列の全部または認識可能部分に隣接した、（例示されたインサートのマルチコピーに代えて、または、マルチコピーと共に）異種性インサートを含む植物体および植物細胞を含む。例示したインサートまたはそのいずれかの相補体の更なるコピー（または更なる複数のコピー）も、これ/これらの方法における挿入に関して、標的とされ得る。

40

【0124】

本願明細書で参照され、または、引用された、全ての特許、特許出願、仮出願および刊行物は、それらが本明細書の明確な教示と不一致でない程度まで、その内容が参照により

50

本願明細書に組み込まれる。

【0125】

下記実施例は、本発明を実施するための手順を示し、本発明の特定の好ましい実施形態を説明するために含まれる。これらの実施例は、限定して解釈されるべきでない。下記実施例に開示の技術は、その実施に関して好ましい方式を説明するのに使用される具体的な取り組みを表すことが、当業者により理解されるべきである。ただし、当業者は、本開示を踏まえれば、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果をまだ得られるうちは、多くの変更が、これらの具体的な実施形態になされ得ることを理解する。特に断らない限り、全ての割合は、重量によるものであり、全ての溶媒混合割合は、特に断らない限り、体積によるものである。

10

【0126】

特に断らない限り、下記の略称が使用される。

b p 塩基対

セ氏温度

D N A デオキシリボ核酸

D I G ジゴキシゲニン

E D T A エチレンジアミン四酢酸

k b キロベース

μ g マイクログラム

μ L マイクロリットル

m L ミリリットル

M モル量

O L P 重複プローブ

P C R ポリメラーゼ連鎖反応

P T U 植物転写ユニット

S D S トデシル硫酸ナトリウム

S O P 標準操作手順

S S C 塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムの混合物を含むバッファー溶液

、p H 7 . 0

T B E トリス塩基、ホウ酸およびE D T Aの混合物を含むバッファー溶液、p H

8 . 3

V ボルト

20

30

【実施例】

【0127】

実施例1：2 m E P S P S およびA A D - 1 2 大豆イベントp D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の形質転換および選択

大豆イベントp D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む遺伝子組換え大豆(ダイズ(Glycine max))を、大豆子葉節外植片のアグロバクテリウム媒介性形質転換により発生させた。選択的マーカーp a t v 6、および当該遺伝子であるa a d - 1 2 v 1 および2 m E P S P S v 1 をT鎖D N A領域内に含むバイナリーベクターp D A B 8 2 6 4 (図1)を運ぶ、武装解除したアグロバクテリウム株E H A 1 0 1 (H o o d ら、1 9 9 3)を、形質転換を開始するのに使用した。

40

【0128】

アグロバクテリウム媒介性形質転換を、Z e n g ら(2 0 0 4)の改良した手順を使用して行った。簡潔に、大豆種子(cv Maverick)を、基礎培地上に発芽させ、子葉節を単離し、アグロバクテリウムに感染させた。シュート開始、シュート伸長および発根の培地に、アグロバクテリウムを除去するために、セフォタキシム、チメンチンおよびバンコマイシンを補った。形質転換されなかったシュートの生長を阻害するために、グルホシネート選択を採用した。選択されたシュートを、根を発達させるために発根培地に移し、ついで、小植物の馴化用の土壌ミックスに移した。

50

【0129】

選択した小植物の末端小葉が、推定上の形質転換体に関するスクリーニングのために、グルホシネートを塗った葉であった。スクリーニングされた小植物を温室に移し、馴化させ、ついで、耐性を再確認するために、グルホシネートを葉に塗布し、推定上の形質転換体とみなした。スクリーニングされた植物体をサンプリングし、選択的マーカー遺伝子および/または当該遺伝子を確認するための分子分析を行った。T₀植物を、温室において自家受粉させ、T₁種子を生じさせた。

【0130】

このイベントである、大豆イベントpDAB8264.42.32.1を、独立して形質転換された分離株から生じさせた。T₁植物を、戻し交雑し、次の世代にわたって、エリート品種に遺伝子移入した。イベントを、その固有の特徴、例えば、1つの挿入サイト、正常なメンデル分離および安定した発現ならびに、有効性の優れた組み合わせ、例えば、除草剤耐性および農業生産力に基づいて選択した。下記実施例には、大豆イベントpDAB8264.42.32.1を特徴付けるのに使用されるデータが含まれる。

10

【0131】

実施例2：大豆イベントpDAB8264.42.32.1におけるタンパク質発現の特徴付け

大豆イベントpDAB8264.42.32.1において発現された、組換えAAD-12、2mEPSPSおよびPATのタンパク質の生化学的特性を特徴付けた。定量的酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)は、タンパク質の生化学的特性を特徴付け、大豆イベントにおけるこれらのタンパク質の発現を確認するのに使用され得る、当分野において公知の生化学アッセイである。

20

【0132】

実施例2.1：植物組織におけるPATタンパク質の発現

PATタンパク質のレベルを、大豆イベントpDAB8264.42.32.1において決定した。可溶性で、抽出可能なPATタンパク質を、定量的酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)法を使用して、大豆葉の組織から測定した。

【0133】

大豆組織の試料を、試験植物から単離し、発現分析用に調製した。PATタンパク質を、界面活性剤であるTween-20を含み(PBST)、1%ポリビニルピロリドン(PVP)を含む、リン酸緩衝生理食塩水で、大豆植物組織から抽出した。植物組織を遠心分離し；水性上清を収集し、必要な場合、適切なバッファーで希釈し、サンドイッチフォーマットにおいて、PAT ELISAキットを使用して分析した。キットを、製造者の提示したプロトコル(Envirologix、Portland、ME)に従って使用した。このアッセイは、発現されたPATタンパク質を測定した。

30

【0134】

大豆イベントpDAB8264.42.32.1における、発現安定性ならびに、垂直的(世代間)および水平的(世代内の系統間)の両方の遺伝性を研究するために、検出分析を行った。大豆イベントpDAB8264.42.32.1のT₃からT₅の世代までにおいて、発現は、全ての系統にわたって安定し、一貫していた。

40

【0135】

実施例2.2：植物組織におけるAAD-12および2mEPSPSのタンパク質の発現

AAD-12および2mEPSPSのタンパク質のレベルを、大豆イベントpDAB8264.42.32.1において決定した。可溶性で、抽出可能なタンパク質を、定量的酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)法を使用して、大豆葉の組織から測定した。

【0136】

大豆組織の試料を、試験植物から単離し、発現分析用に調製した。AAD-12および2mEPSPSのタンパク質を、界面活性剤であるTween-20を含み(PBST)、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む、リン酸緩衝生理食塩水で、大豆植物組織か

50

ら抽出した。植物組織を遠心分離し；水性上清を収集し、必要な場合、適切なバッファーで希釈し、サンドイッチフォーマットにおいて、A A D - 1 2 および G A 2 1 E L I S A キットをそれぞれ使用して分析した。キットを、製造者の提示したプロトコル（A A D - 1 2 : カタログ番号 2 0 - 0 1 6 1、Beacon Analytical Systems, Inc., Saco, Maine；2 m E P S P S : カタログ # 7 0 2 0 1 0 0、Strategic Diagnostics, Newark, DE）に従って使用した。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の T₄ から T₆ の世代までにおいて、A A D - 1 2 および 2 m E P S P S の発現は、全ての系統にわたって安定し、一貫していた。

【 0 1 3 7 】

実施例 2 . 3 : 発現効率研究

V 3 植物段階でのフィールド発現レベル研究を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 について行った。発現レベル研究を、全ての散布処理および散布しなかったプロットについて行った。これらの実験を、先に記載のプロトコルを使用して完了させた。発現値は、全ての散布処理ならびに、除草剤の種々の組み合わせ（表 2）で散布しおよび散布しなかったプロットに関して、同様であった。明らかな傷害は、研究の任意のポイントでの植物において観察されなかった。

【 表 2 】

表 2. 除草剤処置および、タンパク質発現研究に使用された除草剤の濃度

処置番号	処理の種類
1	非噴霧
2	グルホシネート、8 2 2 g a e / h a
3	2,4-D 2240g ac/ha
4	グリホサート、2 2 4 0 g a e / h a
5	グリホサート+2, 4-D、各 1 1 2 0 g a e / h a
6	グリホサート+2, 4-D、各 2 2 4 0 g a e / h a

【 0 1 3 8 】

実施例 3 : 大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のインサートおよびフラン

キングボーダー領域における D N A 配列のクローニングおよび特徴付け
ゲノム挿入サイトを特徴付け、説明するために、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のフランキングゲノム T - D N A ボーダー領域の配列を決定した。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノム配列は、1, 2 4 6 b p の 5 ' フランキングボーダー配列（配列番号 1）および、5 0 4 b p の 3 ' フランキングボーダー配列（配列番号 2）を含むことが確認された。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 ボーダー配列に基づく P C R 増幅について、ボーダー領域が大豆由来であったこと、および、ジャンクション領域が大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 に関する固有の配列であることを検証した。ジャンクション領域を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のイベント特異的特定に使用し得る。加えて、T 鎖挿入サイトを、野生型の形質転換されていない大豆のゲノム由来の、特定されたフランキングボーダー配列の領域に対応するゲノムフラグメントを増幅することにより特徴付けた。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 と、野生型ゲノム配列との比較により、元の遺伝子座からの約 3 8 b p の欠損が証明された。全体としては、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のインサートおよびボーダー配列の特徴付けにより、T 鎖の完全なコピーが、大豆ゲノムに存在したことが示された。

【表 3】

表 3. 大豆イベント pDAB8264_42_32_1 における大豆ゲノム DNA の確認に使用されたプライマーおよびその配列のリスト

配列番号	プライマー名称	サイズ (bp)	配列 (5' から 3')	目的
配列番号 3	4232 WF1	25	GATTTCGCATCATTATGACCAGG	5' ボーダーゲノム DNA の確認、ED_v1_C1 と共に使用される
配列番号 4	4232 WF3	25	TGTAATGCTTCACAACATGAGTCA	5' ボーダーゲノム DNA の確認、ED_v1_C1 と共に使用される
配列番号 5	4232 WF4	25	ATGTAATGCTTCACAACATGAGTC	5' ボーダーゲノム DNA の確認、ED_v1_C1 と共に使用される
配列番号 6	4232 WR1	26	TTTCTACAGCTAGCACAACAGACCT	3' ボーダーゲノム DNA の確認、PAT_11 と共に使用される
配列番号 7	4232 WR2	28	CGTATCTGATACTAACCAGTTCGAATTC	3' ボーダーゲノム DNA の確認、PAT_11 と共に使用される
配列番号 8	4232 WR3	25	AAGAGATACGAAGCGTTTGCTATT	3' ボーダーゲノム DNA の確認、PAT_11 と共に使用される
配列番号 9	4232 WR4	26	AAACACTACTACCAGAAACCAAGTGT	3' ボーダーゲノム DNA の確認、PAT_11 と共に使用される
配列番号 10	ED_v1_C1	26	GAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTT	5' ボーダーゲノム DNA の確認、4232 WF1、4232 WF3 または 4232 WF4 と共に使用される
配列番号 11	PAT_11	24	ACAGAGCCACAACACCACAAGAG	3' ボーダーゲノム DNA の確認、4232 WR1、4232 WR2、4232 WR3 または 4232 WR4 と共に使用される

10

20

【表 4】

表 4. 大豆イベント pDAB8264_42_32_1 における、ボーダー領域およびイベント特異的配列の標準的な PCR 増幅に関する条件

標的配列	プライマーセット	PCR 混合物	予備変性 (°C/分)	変性 (°C/秒)	アニーリング (°C/秒)	伸長 (°C/分:秒)	最後の伸長 (°C/分)
5' ボーダー	4232 WF1/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
5' ボーダー	4232 WF3/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
5' ボーダー	4232 WF4/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
3' ボーダー	4232 WR1/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
3' ボーダー	4232 WR2/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
3' ボーダー	4232 WR3/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
3' ボーダー	4232 WR4/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
インサート遺伝子座にまたがる	4232 WF1/4232 WR1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			
インサート遺伝子座にまたがる	4232 WF1/4232 WR2	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 サイクル			

30

40

【表 5】

表5. 大豆イベント pDAB8264.42.32.1における、ボーダー領域およびイベント特異的配列の標準的なPCR増幅に関するPCR混合物

PCR混合物A		PCR混合物B	
試薬	1×反応 (μ L)	試薬	1×反応 (μ L)
H2O	0.8	H2O	14.6
AccPrime pfx SuperMix	20	10× LA Taq バック アップ	2
---	---	MgCl ₂ (25mM)	0.6
---	---	dNTP (2.5 μ M)	1.6
10 μ M プライマー	0.2	10 μ M プライマー	0.1
g DNA消化	1	g DNA消化	1
-----	-----	LA Taq(5U/ μ L)	0.1
rxn vol:	22	rxn vol:	20
PCR混合物C		PCR混合物D	
試薬	1×反応 (μ L)	試薬	1×反応 (μ L)
H2O	28	H2O	11.6
10× PCRバック アップ I I (Mg- ブラス)	5	10× PCRバック アップ I I (Mg- ブラス)	2
MgCl ₂ [25mM]	1.5	MgCl ₂ [25mM]	0.6
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	3.2
アダプター PCR プライマー(10 μ M)	1	プライマー 1 (10 μ M)	0.4
GOI ネストプライ マー(10 μ M)	1	プライマー 2 (10 μ M)	0.4
DNA結合ビーズ	5	DNAテンプレート	0.2
LA Taq(5U/ μ L)	0.5	LA Taq(5U/ μ L)	1.6
rxn vol:	50	rxn vol:	20

10

20

30

40

【0139】

実施例 3.1: 大豆ゲノム配列の確認

5'および3'フランキングボーダーを、大豆イベント pDAB8264.42.32.1の導入遺伝子が、大豆ゲノムの15番染色体に挿入されていることを示す、15番染色体由来のダイズ (*Glycine max*) 全ゲノムショットガン配列に整列させた。大豆ゲノム由来の大豆イベント pDAB8264.42.32.1 導入遺伝子の挿入サイトを確認するために、PCRを、種々のペアのプライマー(図2、表3、表4および表5)により行った。大豆イベント pDAB8264.42.32.1、および他の遺伝子組換えまたは非遺伝子組換えの大豆株由来のゲノムDNAを、テンプレートとして使用した。このため

50

、5'ボーター配列が正しいかを確認するために、2mEPSPS v1特異的プライマー、例えば、ED_v1_C1、および、クローニングされた5'末端ボーター配列および/または大豆ゲノム15番染色体上のそのアライメント配列に基づいて設計され、4232-WF1、4232-WF3および4232-WF4と命名されたプライマーを、2mEPSPS v1遺伝子から5'末端ボーター配列にまたがるDNAセグメントを増幅するのに使用した。同様に、クローニングされた3'末端ボーター配列の確認のために、pat特異的プライマー、例えば、PAT_11ならびに、クローニングされた3'末端ボーター配列および/または大豆ゲノム15番染色体上のそのアライメント配列に基づいて設計され、4232-WR1、4232-WR2、4232-WR3および4232-WR4と命名された4つのプライマーを、pat遺伝子から3'末端ボーター配列にまたがるDNAセグメントを増幅するのに使用した。予測されたサイズのDNAフラグメントが、各プライマーペア、大豆イベントpDAB8264.42.32.1のフランキンクボーター上に配置される1つのプライマー、および、1つの導入遺伝子特異的プライマーにより、大豆イベントpDAB8264.42.32.1のゲノムDNAからのみ増幅されたが、他の遺伝子組換え大豆株または非遺伝子組換え対照由来のDNA試料からは増幅されなかった。その結果は、クローニングされた5'および3'ボーター配列が、大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関するT鎖インサートのフランキンクボーター配列であることを示す。

10

【0140】

大豆ゲノムにおけるT鎖DNA挿入のゲノムサイトをさらに確認するために、大豆ボーター配列にまたがるPCR増幅を、大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関するT鎖インサートを含まないゲノムDNAについて完了した。5'末端ボーター配列に基づいて設計された1つのプライマー、4232-WF1ならびに、3'末端ボーター配列に関する2つのプライマー、4232-WR1および4232-WR2を、pDAB8264 T鎖が組み込まれた、5'末端ボーター配列および3'末端ボーター配列のDNAセグメントを増幅するのに使用した。予測された通り、4232-WF1および4232-WR1のプライマーペアによるPCR増幅により、非遺伝子組換え大豆対照および他の大豆遺伝子組換え株のゲノムDNAから、おおよそ2.4kbのDNAフラグメントが増幅されたが、大豆イベントpDAB8264.42.32.1からは増幅されなかった。同様に、4232-WF1および4232-WR2のプライマーペアにより完了したPCR反応により、非遺伝子組換え大豆対照および他の大豆遺伝子組換え株のゲノムDNAから、おおよそ2.5kbのDNAフラグメントが産生されたが、大豆イベントpDAB8264.42.32.1からは産生されなかった。大豆イベントpDAB8264.42.32.1の、特定された5'および3'ボーター配列を、15番染色体由来のダイズ (*Glycine max*) 全ゲノムショットガン配列と整列させることにより、元のゲノム遺伝子座から38bpの欠損が証明された(図3)。これらの結果は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の導入遺伝子が、大豆ゲノムの15番染色体のサイト内に挿入されたことを説明した。

20

30

【0141】

実施例4：サザンプロットによる大豆イベントpDAB8264.42.32.1の特徴付け

40

サザンプロット分析を、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の組み込みパターンを確立するのに使用した。これらの実験から、大豆ゲノム内のaad-12 v1および2mEPSPS v1導入遺伝子の組み込みおよび完全性を説明するデータを生成した。大豆イベントpDAB8264.42.32.1を、プラスミドpDAB8264由来のaad-12 v1および2mEPSPS v1 PTUの1つのコピーを含む、全長の、単純な組み込みイベントとして特徴付けた。

【0142】

サザンプロットデータは、全長T鎖フラグメントが、大豆イベントpDAB8264.42.32.1のゲノム内に挿入されたことを示唆した。詳細なサザンプロット分析を、

50

p D A B 8 2 6 4 の T 鎖組み込み領域に含まれる、a a d - 1 2 v 1 および 2 m E P S P S v 1 の遺伝子に特異的なプローブ、ならびに、プラスミド内に配置された切断サイトを有し、大豆ゲノム DNA を含むプラスミドのジャンクションをまたぐ、プラスミドまたはフラグメントに対して内部にハイブリダイズするフラグメント（ボーダーフラグメント）を産生する、説明的な制限酵素を使用して行った。制限酵素とプローブとの組み合わせに関する、サザンハイブリダイゼーションから示された分子量は、イベントに固有であり、その特定パターンを確立した。これらの分析は、プラスミドフラグメントが、a a d - 1 2 v 1 および 2 m E P S P S v 1 P T U の再配列なしに、大豆ゲノム DNA 内に挿入されたことも示した。

【 0 1 4 3 】

実施例 4 . 1 : 大豆葉試料の収集およびゲノム DNA (g D N A) 単離

ゲノム DNA を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む個々の大豆植物体から収集した葉組織から抽出した。さらに、g D N A を、従来大豆植物である、M a v e r i c k から単離した。M a v e r i c k は、a a d - 1 2 v 1 および 2 m E P S P S v 1 遺伝子を含まない、実体株の代表である遺伝的背景を含む。個々のゲノム DNA を、標準的な C T A B 法 (S o m b r o o k ら (1 9 8 9)) に従って、凍結乾燥した葉組織から抽出した。抽出後、その DNA を、P I C O G R E E N 試薬 (I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A) を使用して、分光蛍光計により定量した。ついで、DNA を、アガロースゲル上で可視化して、P I C O G R E E N 分析から濃度を確認し、DNA 品質を決定した。

【 0 1 4 4 】

実施例 4 . 2 : DNA 消化および分離

大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のサザンプロット分子特徴付けのために、10 マイクログラム (1 0 μ g) のゲノム DNA を消化した。大豆 p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 および非遺伝子組換え大豆株である M a v e r i c k 由来のゲノム DNA を、DNA 1 μ g あたり、おおよそ 5 ユニットの選択された制限酵素および対応する反応バッファを、各 DNA 試料に添加することにより消化した。各試料を、おおよそ 3 7 で一晩、インキュベートした。制限酵素である H i n d I I I 、N c o I 、N s i I および P a c I を、消化用に個々に使用した (N e w E n g l a n d B i o l a b s 、I p s w i c h 、M A) 。さらに、陽性ハイブリダイゼーション対照試料を、プラスミド DNA である p D A B 8 2 6 4 と、非遺伝子組換え大豆品種である M a v e r i c k 由来のゲノム DNA とを組み合わせることにより調製した。プラスミド DNA / ゲノム DNA 混合物を、試験試料と同じ手順および制限酵素を使用して消化した。消化後、一晩でインキュベートし、25 μ L Q U I K - P R E C I P P L U S 溶液 (E d g e B i o s y s t e m s 、G a i t h e r s b u r g 、M D) を添加し、消化された DNA 試料を、イソプロパノールで沈殿させた。沈殿した DNA ペレットを、15 μ L 1 x 充填バッファ (0 . 0 1 % プロモフェノールブルー、10 . 0 m M E D T A 、10 . 0 % グリセロール、1 . 0 m M トリス p H 7 . 5) に再懸濁した。ついで、DNA 試料および分子サイズマーカーを、0 . 4 x T A E バッファを含む 0 . 8 5 % アガロースゲルにより、35 ボルトで、おおよそ 18 ~ 22 時間電気泳動して、フラグメント分離を達成した。ゲルを、エチジウムブロマイドで染色し、DNA を、紫外線 (U V) 光下において可視化した。

【 0 1 4 5 】

実施例 4 . 3 : サザントランスファーおよび膜処理

サザンプロット分析を、基本的に、M e m e l i n k ら (1 9 9 4) による記載の通りに行った。簡潔に、DNA フラグメントの電気泳動分離および可視化後、ゲルを、0 . 2 5 M H C l で、おおよそ 20 分間脱プリン化し、ついで、変性溶液 (0 . 4 M N a O H 、1 . 5 M N a C l) に、おおよそ 30 分間曝し、続けて、変性溶液 (1 . 5 M N a C l 、0 . 5 M トリス p H 7 . 5) に、少なくとも 30 分間曝した。サザントランスファーを、10 x S S C を含むウィッキングシステムを使用して、ナイロン膜上に一晩で行

10

20

30

40

50

った。トランスファー後、DNAを、UV架橋により、膜に結合させた後、 $2 \times \text{SSC}$ 溶液で膜を簡単に洗浄した。この処理により、ハイブリダイゼーション用のサザンプロット膜を生成した。

【0146】

実施例4.4：DNAプローブ標識およびハイブリダイゼーション

ナイロン膜に結合したDNAフラグメントを、標識プローブを使用して検出した。遺伝子素子に特異的なプライマーを使用して、プラスミドpDAB8264から増幅されたDNAフラグメント内に、ジゴキシゲニン(DIG)標識ヌクレオチド、[DIG-11]-dUTPのPCRベースの取り込みにより、プローブを産生した(表6)。PCR合成によるDNAプローブの産生は、PCR DIG PROBE SYNTHESISキット(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を使用して、製造者が推奨する手順に従って行った。

10

【0147】

標識プローブを、アガロースゲル電気泳動により分析して、その品質および量を決定した。ついで、所望の量の標識プローブを、基本的に、DIG EASY HYB溶液(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)に記載の通りの手順を使用する特異的フラグメントの検出用のナイロン膜上の標的DNAに対するハイブリダイゼーションに使用した。簡潔に、固定されたDNAを含むナイロン膜プロットを、 $2 \times \text{SSC}$ で簡単に洗浄し、ハイブリダイゼーションボトル中で20~25mL 予め温めたDIG EASY HYB溶液で、おおよそ45~55℃で、約2時間、ハイブリダイゼーションオープンにおいて、プレハイブリダイズした。ついで、プレハイブリダイゼーション溶液をデカントし、おおよそ5分間の水浴でのボイルにより変性した、所望の量の特異的プローブを含む、約15mLの予め温めたDIG EASY HYB溶液で置き替えた。ついで、ハイブリダイゼーション工程を、ハイブリダイゼーションオープンにおいて、おおよそ45~55℃で、一晩行った。

20

【0148】

プローブハイブリダイゼーションの終了時に、プローブを含むDIG EASY HYB溶液を、清浄なチューブにデカントし、おおよそ-20℃で保存した。これらのプローブを、製造者の推奨する手順に基づいて、二回再利用できた。膜のプロットを、簡単にゆすぎ、低ストリンジェンシー洗浄バッファー($2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS)により、清浄なプラスチック容器において、室温でおおよそ5分間、2回洗浄し、続けて、高ストリンジェンシー洗浄バッファー($0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS)により、それぞれおおよそ65℃で、15分間、2回洗浄した。膜のプロットを、DIG WASH AND BLOCKバッファーセット(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)からの、 $1 \times$ マレイン酸バッファーで、おおよそ5分間、簡単に洗浄した。続けて、これを、 $1 \times$ ブロッキングバッファーにおいて2時間ブロッキングし、 $1 \times$ ブロッキングバッファー中の抗DIG-AP(アルカリホスファターゼ)抗体(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)においても、最短で30分間インキュベートした。 $1 \times$ 洗浄バッファーで2~3回洗浄後、特異的DNAプローブを、膜のプロットに結合したままにし、DIG標識DNA標準を、CDP-STAR CHEMILUMINESCENT NUCLEIC ACID DETECTION SYSTEM(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を使用して、製造者の推奨に従って可視化した。プロットを、1またはそれ以上の時点の間、化学発光フィルムに曝し、ハイブリダイズしたフラグメントを検出し、分子サイズ標準を可視化した。フィルムを、ALL-PRO 100 PLUSフィルム現像液(Konica Minolta, Osaka, Japan)により現像し、画像をスキャンした。検出されたバンドの数およびサイズを、各プローブに関して実証した。記載のように、DIG検出後に可視化可能な、DIG標識DNA分子量マーカーII(DIG MWM II)およびDIG標識DNA分子量マーカーVII(DIG MWM VII)を、サザンプロット上にハイブリダイズしているフラグメントのサイズを決定

30

40

50

するのに使用した。

【表 6】

表 6. サザン分析に使用されるプローブの位置および長さ

プローブ名称	遺伝要素	長さ (b p)
<i>2mEPSPS</i>	<i>2mEPSPS v1</i>	1238
<i>aad-12</i>	<i>aad-12 v1</i>	671
<i>speeR</i>	ストレプトマイシン抵抗性遺伝子	750
O r i R e p	O r i R e p	852
<i>trfA</i>	複製開始タンパク質 <i>trfA</i>	1119

10

【 0 1 4 9 】

実施例 4 . 5 : サザンプロットの結果

aad-12 v1 および *2mEPSPS v1* PTU の公知の制限酵素サイトに基
づく、特定の消化およびプローブによる、予測および観察されたフラグメントサイズは、
表 7 に与えられる。2 種類のフラグメント：公知の酵素サイトが、プローブ領域に隣接し
、*aad-12 v1* および *2mEPSPS v1* PTU の挿入領域内に完全に含まれ
る、内部フラグメント、ならびに、公知の酵素サイトが、プローブ領域の少なくとも一
方の端部に位置し、第 2 のサイトが、大豆ゲノム中に予測されるボーダーフラグメントを、
これらの消化およびハイブリダイゼーションから特定した。ほとんどの場合、DNA フラ
グメント組み込みサイトが各イベントに固有であるため、ボーダーフラグメントのサイズ
は、イベントにより変動する。ボーダーフラグメントは、組み込まれた DNA と比較して
制限酵素サイトを配置し、DNA 挿入数を評価するための手段を提供する。サザンプロ
ット分析を、プラスミド p D A B 8 2 6 4 からの低コピー、無傷の *aad-12 v1* およ
び *2mEPSPS v1* PTU が、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の
大豆ゲノム内に挿入されたことを示唆するデータを生成する、複数世代の大豆イベント p
D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 で完了した。

20

【表 7】

表 7. サザンブロット分析において予測および観察されたハイブリダイズするフラグメント

1. 予測されたフラグメントサイズは、pDAB8264のプラスミドマップに基づいている。2. 観察されたフラグメントサイズは、これらの分析からおおよそ検討され、DIG標識DNA分子量マーカー I I およびマーカー V I I フラグメントの示されたサイズに基づいている。

DNAプローブ	制限酵素	試料	予測されたフラグメント サイズ (b p) ¹	観察されたフラグメン トサイズ (b p) ²
<i>aad 12</i>	<i>Hind III</i>	pDAB8264	4731	4700
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264. 42. 32. 1	>4078	4100
	<i>Nco I</i>	pDAB8264	7429	7400
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264. 42. 32. 1	>3690	6700
	<i>Nsi I</i>	pDAB8264	4974	4900
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264. 42. 32. 1	4974	4900
<i>2mEPSPS</i>	<i>Hind III</i>	pDAB8264	9322	9300
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264. 42. 32. 1	>4260	5300

10

20

30

	<i>Nco I</i>	pDAB8264	5203	5200
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	>3749	18000
	<i>Nsi I</i>	pDAB8264	11044	11000
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	>5199	7500
	<i>Pac I</i>	pDAB8264	6768	6700
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	6768	6700
<i>SpecR</i>	<i>Hind III</i>	pDAB8264	9322	9300
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	なし	なし
	<i>Nco I</i>	pDAB8264	5203	5200
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	なし	なし
OriRep	<i>Nco I</i>	pDAB8264	7429	7400
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	なし	なし
<i>trfA</i>	<i>Hind III</i>	pDAB8264	9322	9300
		Maverick	なし	なし
		大豆イベント pDAB 8264.42.32. 1	なし	なし

10

20

30

40

【0150】

制限酵素 *Hind III* および *Nco I* は、プラスミド pDAB8264 における固有の制限サイトに結合し、同制限サイトを切断する。続けて、これらの酵素を、大豆イベン

50

ト p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 における a a d - 1 2 v 1 遺伝子インサートの特徴付けるために選択した。H i n d I I I または N c o I それぞれの消化後に、> 4 0 7 8 b p または > 3 6 9 0 b p のボーダーフラグメントが、プローブとハイブリダイズすると予測された(表7)。H i n d I I I または N c o I それぞれを使用した場合、約 4 1 0 0 b p および約 6 7 0 0 の単独の a a d - 1 2 v 1 ハイブリダイゼーションバンドが観察された。それらのサイズのバンドに対するプローブのハイブリダイゼーションは、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノムにおいて、a a d - 1 2 v 1 遺伝子用の、1つの挿入サイトの存在を示唆する。制限酵素 N s i I を、a a d - 1 2 v 1 植物転写ユニット(P T U : プロモータ/遺伝子/ターミネータ)を含むフラグメントを放出するのに選択した(表7)。N s i I 消化後に、予測された約 4 9 0 0 b p のフラグメントが、プローブにより観察された。p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 試料の酵素消化、続けて、プローブハイブリダイゼーションにより得られた結果は、プラスミド p D A B 8 2 6 4 由来の無傷の a a d - 1 2 v 1 P T U が、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノム内に挿入されたことを示した。

【0151】

制限酵素 H i n d I I I 、 N c o I および N s i I は、プラスミド p D A B 8 2 6 4 における制限サイトに結合し、同制限サイトを切断する。続けて、これらの酵素を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 における 2 m E P S P S v 1 遺伝子インサートの特徴付けるために選択した。H i n d I I I 、 N c o I および N s i I それぞれの消化後に、> 4 2 6 0 b p 、 > 3 7 4 9 または > 5 1 9 9 b p のボーダーフラグメントが、プローブとハイブリダイズすると予測された(表7)。H i n d I I I 、 N c o I および N s i I それぞれを使用した場合、約 5 3 0 0 b p 、 1 8 0 0 0 および約 7 5 0 0 b p の単独の 2 m E P S P S v 1 ハイブリダイゼーションバンドが観察された。このサイズのバンドに対するプローブのハイブリダイゼーションは、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノムにおいて、2 m E P S P S v 1 遺伝子用の、1つの挿入サイトの存在を示唆する。制限酵素 P a c I を、2 m E P S P S v 1 植物転写ユニット(P T U : プロモータ/遺伝子/ターミネータ)を含むフラグメントを放出するのに選択した(表7)。P a c I 消化後に、予測された約 6 7 0 0 b p のフラグメントが、プローブにより観察された。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 試料の酵素消化、続けて、プローブハイブリダイゼーションにより得られた結果は、プラスミド p D A B 8 2 6 4 由来の無傷の 2 m E P S P S v 1 P T U が、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の大豆ゲノム内に挿入されたことを示した。

【0152】

実施例 4 . 6 : バックボーン配列の不存在

サザンプロット分析を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 に、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子(s p e c R)、O r i R e p 要素および複製開始タンパク質 t r f A (t r f A 要素)が存在しないことを検証するためにも行った。スペクチノマイシン抵抗性、O r i R e p 要素または t r f A 要素に対する特異的なハイブリダイゼーションは、適切な陽性(M a v e r i c k のゲノムDNAに追加された p D A B 8 2 6 4 プラスミドDNA)および陰性(M a v e r i c k のゲノムDNA)の対照がサザン分析用に含まれる場合、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 試料において予測されない。H i n d I I I または N c o I 消化および s p e c R 特異的プローブによるハイブリダイゼーション後、約 9 3 0 0 b p または約 5 2 0 0 b p の1つの予測されたサイズのバンドがそれぞれ、陽性対照試料(M a v e r i c k のゲノムDNAに追加された p D A B 8 2 6 4)において観察された。s p e c R プローブは、陰性対照および大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の試料に、ハイブリダイズしなかった。同様に、N c o I 消化および O r i R e p 特異的プローブによるハイブリダイゼーション後、約 7 4 0 0 b p の1つの予測されたサイズのバンドが、陽性対照試料(M a v e r i c k のゲノムDNAに追加された p D A B 8 2 6 4)において検出されたが、陰性対照および大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の試料からは検出されなかった。さらに、H i

10

20

30

40

50

nd III 消化および t r f A 特異的プローブによるハイブリダイゼーション後、約 9 , 3 0 0 b p の 1 つの予測されたサイズのバンドが、陽性対照試料 (M a v e r i c k のゲノム DNA に追加された p D A B 8 2 6 4) において検出されたが、陰性対照および大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の試料からは検出されなかった。これらのデータは、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子、O r i R e p 要素および複製開始タンパク質 t r f A が、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 に存在しないことを示す。

【 0 1 5 3 】

実施例 5 : 農学および収量のフィールド試験ならびに除草剤耐性

反復的な農学的試験を、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の農学的特徴を評価するのに行った。フィールド試験の大部分において、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む大豆品種を栽培する、米国全体を通して区別できる地理的ロケーションで植えた。3 セットの試験を完了した。第 1 シリーズの試験は、除草剤を噴霧しなかった大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物と比較して、除草剤 2 , 4 - D およびグリホサートを噴霧した大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物の農学的効率を比較した。第 2 シリーズの試験は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物の農学的効率を、近い同質遺伝子系統の M a v e r i c k 対照植物と比較した。最後に、第 3 シリーズの試験を、グルホシネートの散布に対する、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物の耐性を検証するために完了させた。

10

【 0 1 5 4 】

第 1 の試験は、噴霧しなかった大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物に対して、2 , 4 - D ジメチルアミン塩 (W e e d a r 6 4 , N u f a r m , B u r r R i d g e , I L) を 1 1 2 0 g a e / h で噴霧され、および、グリホサート (D u r a n g o , D o w A g r o S c i e n c e s , I n d i a n a p o l i s , I N) を 1 1 2 0 g a e / h a で噴霧された、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物を比較した。除草剤処理を、V 3 および R 2 生長段階で適用した。噴霧および非噴霧のセクションからなるフィールド試験を、2 つの別々の生長年に関して、完全な乱塊法計画として配置した。2 0 1 0 年のフィールド試験は、各ブロックにおける 2 5 エントリーあたりに、2 回の反復からなった。2 0 1 1 年のフィールド試験は、各ブロックにおける 2 6 エントリーあたりに、4 回の反復からなった。両試験に関して、各プロットは、2 列、長さ 1 2 . 5 フィートからなり、プロット間の 2 . 5 フットのレーンにより、3 0 インチ離して植えた。季節を通して、フィールドプロットを、通常の農耕法下において維持し、雑草がない状態にしておいた。季節を通して、多くの農学的特徴を測定した。データを収集した時のこれらの特徴および生長段階を、表 8 に列記した。

20

30

【表 8】

表 8. 大豆イベント pDAB8264_42_32_1 と、Maverick とを比較するために、フィールド試験で測定された農学的特徴のリスト

測定された農学的特徴または形質	測定がなされた時の生長段階
発芽：100で掛けた、1メートルセクションにおける、種まきした種子数で割った木立数。	早期の木立数に基づいて算出
苗木の生命力：パーセント生命力、0%は、全ての植物が枯死したプロット、および、100%は、非常の健康に見えるプロットを表す。	V1 - V3
開花までの日数：プロットにおける50%の植物が咲き始めた時の種まきからの日数。	R1
R2での木立数：R2生長段階での、列の典型的な1メートルセクションにおける植物数。	R2
疾患の発生率：0～100%のスケールで評価した、プロットにおける疾患の重症度。	R6
害虫傷害：害虫により傷害を受けたプロットにおける植物組織の割合。	R6
植物体の高さ：土壌表面から、葉が落とした後の先端までの、各プロットにおける植物体のセンチメートルにおける平均高さ。	R8
充填：収穫時のパーセント充填、0%＝充填なし、および、100%＝プロットにおける地面全ての植物。	R8
成熟までの日数：プロットにおける95%の群が、ドライダウン色に達した時の種まきからの日数。	R8
脱粒：プロットあたりの脱粒した群の割合。	R8
収量：水分を13%に調節した、エーカーあたりのブッシェル。	R8
100個の種子重量：各プロットに関して、100個の種子を数え、グラムで重量を記録する。	R8
種子の着色：淡褐色の着色量を、1から5のスケールで評価する。	1＝淡褐色の着色なし、から、5＝ひどい褐色の着色
散布1傷害1 d a a (%)：V3での化学物質散布後6から24時間での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。2, 4-D	0から100%のスケール (0＝傷害なし、100＝完全な植物の枯死)。

10

20

30

40

<p>傷害の典型である上偏生長の任意のサインを探す。これは、葉および茎の捻じれまたはしおれとして示される。</p>	
<p>散布1 傷害 7 d a a (%) : V 3での化学物質散布後7日での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。</p>	<p>0から100%のスケール (0 = 傷害なし、100 = 完全な植物の枯死)。</p>
<p>散布1 傷害 14 d a a (%) : V 3での化学物質散布後14日での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。</p>	<p>0から100%のスケール (0 = 傷害なし、100 = 完全な植物の枯死)。</p>
<p>散布2 傷害 1 d a a (%) : R 2での化学物質散布後6から24時間での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。2, 4-D 傷害の典型である上偏生長の任意のサインを探す。これは、葉および茎の捻じれまたはしおれとして示される。</p>	<p>0から100%のスケール (0 = 傷害なし、100 = 完全な植物の枯死)。</p>
<p>散布1 傷害 7 d a a (%) : R 2での化学物質散布後7日での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。</p>	<p>0から100%のスケール (0 = 傷害なし、100 = 完全な植物の枯死)。</p>
<p>散布1 傷害 14 d a a (%) : R 2での化学物質散布後14日での、視認できる作物の傷害、白化および壊死全体を評価する。</p>	<p>0から100%のスケール (0 = 傷害なし、100 = 完全な植物の枯死)。</p>

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

生長時期の最後に、全てのロケーションからのデータを組み合わせ、ロケーションをまたぐ分析を行った。データ分析を行い、分析からの最小二乗法を、種々の作物特徴に関して、表9に報告する。明らかな入口効果が測定された変数に関して、噴霧されたおよび噴霧されていない大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 植物間の比較を行うために、後の平均分離を、スチューデント T 検定を使用して行った。有意性を決定するための確率水準を、 $p = 0.05$ に設定した。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 は、2, 4-D とグリホサートとのタンク混合に対して耐性を示した。対照的に、2, 4-D とグリホサートとのタンク混合を噴霧された M a v e r i c k 植物は、除草剤処理に対する耐性がなかった。

【表 9】

表9. 2010年と2011年とにわたる、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の噴霧された植物と非噴霧の植物とを比較する、ロケーションをまたぐ分析からの最小二乗法。各形質に関して、同じ文字が続かない値は、スチューデントT検定に基づいて差異がある。

農学的特徴または形質	大豆イベントpDAB8264.42.32.1			
	噴霧		非噴霧	
発芽 (%)	70.3	A	71.4	A
生命力V1-V3 (%)	48.0	A	48.8	A
散布1 傷害1 d a a (%)	1.6	A	0.0	B
散布1 傷害7 d a a (%)	1.0	A	0.0	B
散布1 傷害14 d a a (%)	0.0	A	0.0	A
開花までの日数 (種まきからの日数)	40.1	A	39.8	A
木立数R2	20.1	A	20.7	A
散布2 傷害1 d a a (%)	3.4	A	0.1	B
散布2 傷害7 d a a (%)	2.3	A	0.0	B
散布2 傷害14 d a a (%)	1.3	A	0.1	A
疾患の発生率 (%)	7.9	A	3.4	B
害虫傷害 (%)	10.1	A	8.7	A
高さ (cm)	111.1	A	108.2	A
成熟 (種まきからの日数)	115.9	A	115.1	A
充填 (%)	15.2	A	12.8	A
脱粒 (%)	0.4	A	0.1	A
収量 (ブッシュ/ヘクタール)	44.6	A	42.9	A
100個の種子重量 (g)	12.4	A	11.9	B
種子の着色 (1 (なし) から5 (ひどい))	2.1	A	1.9	A

10

20

30

【0156】

大豆イベントpDAB8264.42.32.1は、V3およびR2段階の生長発達の両方において、グリホサートおよび2,4-Dのタンク混合散布に対する、強い耐性を提供した。除草剤が最初に散布された時、わずかな傷害があったが、植物は、有意に傷害されず、散布後14日までに傷害応答を生じなかった。100個の種子重量および疾患の発生率以外の測定された全ての形質は、除草剤で処理された大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物と、除草剤で処理されなかった大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物との間で、同等であった。このため、大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物に対する、2,4-Dおよびグリホサートのフィールド量の散布は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物の農業生産力に有害であろう、農学的特徴または形質の任意の有意な変化をもたらさない。

40

【0157】

第2の実験は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1と、近い同質遺伝子系

50

統のMaverick対照植物との間の選択した農学的特徴に関する農業生産力を比較した。フィールド試験を、2つの別々の生長年に関して、完全な乱塊法計画として配置した。2010年のフィールド試験は、各ブロックにおける25エントリーあたりに、2回の反復からなった。2011年のフィールド試験は、各ブロックにおける26エントリーあたりに、4回の反復からなった。両実験に関して、各プロットは、2列、長さ12.5フィートからなり、プロット間の2.5フットのレーンにより、30インチ離して植えた。季節を通して、フィールドプロットを、通常の農耕法下において維持し、雑草がない状態にしておいた。季節を通して、多くの農学的特徴を測定した。データを収集した時のこれらの特徴および生長段階を、表8に列記した。

【0158】

生長時期の最後に、全てのロケーションからのデータを組み合わせ、ロケーションをまたぐ分析を行った。データ分析を行い、分析からの最小二乗法を、種々の作物特性に関して、表10に報告する。明らかな入口効果が測定された変数に関して、Maverickと大豆イベントpDAB8264.42.32.1との間の比較を行うために、後の平均分離を、スチューデントT検定を使用して行った。有意性を決定するための確率水準を、 $p = 0.05$ に設定した。

【表10】

表10. 2010年と2011年とにわたる、大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物とMaverick植物とを比較する、ロケーションをまたぐ分析からの最小二乗法。各形質に関して、同じ文字が続かない値は、スチューデントT検定に基づいて差異がある。

農学的特徴または形質	Maverick		大豆イベントpDAB8264.42.32.1	
発芽 (%)	72.5	A	72.2	A
生命力V1 (1乏しい~9良好)	48.2	A	49.2	A
開花までの日数(種まきからの日数)	42.3	A	42.1	A
木立R1	19.6	A	20.8	A
疾患の発生率 (%)	6.4	A	7.0	A
害虫傷害 (%)	12.8	A	12.9	A
高さ (cm)	114.6	A	112.5	A
成熟 (種まきからの日数)	119.7	A	119.0	A
充填 (%)	15.8	A	14.0	A
脱粒	0.1	A	0.4	A
収量 (ブッシェル/ヘクタール)	47.2	A	45.7	A
100個の種子重量	13.0	A	12.6	A
種子の着色 (1(なし)から5(ひどい))	1.3	B	1.8	A

【0159】

種子の着色以外の測定された全ての形質は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1とMaverickとの間で、同等であった。大豆イベントpDAB8264.42.32.1植物は、1.3の種子着色評価をもたらしたMaverickと比較して、1.8の種子着色評価をもたらした。この差は、生産者にとって重大な差ではなく、作物の性能を損なわず、この差は、作物の性能を損なうであろう、有意義な農学的差異をもたらさないであろう。結果は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1が、同じ農学的特徴に関して、Maverickとは異なって発展し得ることを示すが、差は、最小限であり、商業的に栽培される大豆の正常な範囲の外側ではない。

【0160】

大豆イベントpDAB8264.42.32.1のグルホシネート除草剤耐性を試験するために、イベントを、2010年の生長時期の間に、インディアナにおける有効性試験において、種まきした。大豆イベントpDAB9582.816.15.1を産生するために最初に形質転換された、栽培品種Maverickを、各苗床に種まきし、本実験に

おける対照として含めた。イベントを、試験における同じ段階であり、4回の反復からなる、他のイベントとランダム化した。Maverickを、非形質転換対照として含めた。試験を、全プロットとしての処理および分割プロットとしてのイベントを含む、改良された分割法として設定した。822g ae/haで散布されたグルホシネート処理および非噴霧対照処理を、大豆植物に適用した。処理を、V5およびR2の生長段階に適用した。除草剤耐性を、処理後6時間から7日での、傷害に関して植物を評価することにより測定した。白化、葉の壊死および植物の枯死を目視で探すことにより、傷害を評価した。大豆イベントpDAB8264.42.32.1は、グルホシネート除草剤散布に対して、強い耐性を示した。対照的に、Maverick植物は、除草剤処理に対する耐性がなかった。

10

【0161】

実施例6：イベント特異的TaqManアッセイ

イベント特異的TAQMANアッセイを、大豆イベントpDAB8264.42.32.1の存在を検出し、育種群における植物の接合状態を判定するために開発した。大豆イベントpDAB8264.42.32.1は、バイナリーベクターpDAB8264のT鎖を含む(図4)。大豆イベントpDAB8264.42.32.1の特異的な検出のために、特異的TAQMANプライマーおよびプローブを、5' (配列番号19)または3' (配列番号20)インサート~植物ジャンクションに配置されるDNA配列(図4)に基づいて設計した。大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、1つのイベント特異的アッセイを、2つのプライマーと、その5'末端にFAMレポータを含むApplied Biosystems (ABI)により合成された標的特異的MGBプローブとを使用して、3'組み込みジャンクションをまたぐ131bpのDNAフラグメントを特異的に検出するために設計した。大豆イベントpDAB8264.42.32.1に関する、このTAQMAN検出法の特異性を、2mEPSPS v1およびaad-12 v1 PTUを含む11種類のイベント、ならびに、対照の非遺伝子組換え大豆品種(Maverick)に対して、大豆特異的な内因性参照遺伝子である、GMFL01-25-J19(ダイズ(Glycine max) cDNA、GenBank: AK286292.1)との二重方式において試験した。

20

【0162】

実施例6.1：gDNA単離

11種類の大豆イベントおよび非遺伝子組換え大豆品種のゲノムDNA(gDNA)試料を、この研究において試験した。ゲノムDNAを、改良されたQiagen MAGA TTRACT PLANT DNAキット(Qiagen, Valencia, CA)を使用して抽出した。新鮮な大豆のリーフディスクを、試料あたりに8つ、gDNA抽出に使用した。試料を、DNaseフリー水で希釈し、この研究の目的のための、おおよそ10ng/μLの濃度にした。

30

【0163】

実施例6.2：TaqManアッセイおよび結果

特異的TaqManプライマーおよびプローブを、大豆イベントpDAB8264.42.32.1特異的TaqManアッセイ用に設計した。これらの試薬を、大豆イベントpDAB8264.42.32.1を検出するために、以下に列記された条件で使用し得る。表11は、大豆イベントpDAB8264.42.32.1を検出するために特別に開発された、プライマーおよびプローブの配列を列記する。

40

【表 1 1】

表 1 1. TAQMAN PCRプライマーおよびプローブ

イベント標的の反応			
	名称	説明	配列
配列番号 1 2	4232 3' F	イベント特異的のフォワードプライマー	CGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGC
配列番号 1 3	4232 3' R	イベント特異的のリバースプライマー	CTCTATCGGTTAATTGGGATCCTAT
配列番号 1 4	4232 3' P	4 2 3 2 3' Fおよび4 2 3 2 3' Rと共に使用される、イベント特異的のプローブ	5' FAM/ATGCCAATTACCAACAAT-MGB

参照標的の反応			
	名称	説明	配列
配列番号 1 5	GMS116 F	フォワードプライマー	GTAATATGGGCTCAGAGGAATGGT
配列番号 1 6	GMS116 R	リバースプライマー	ATGGAGAAGAACATTGGAATTGC
配列番号 1 7	GMS 1 1 6 プローブ	プローブ	5' HEX/CCATGGCCCGGTACCATCTGGTC/3BHQ 1/3'

10

【 0 1 6 4 】

増幅に関するマルチプレックス PCR 条件は、下記：10 μ L の合計反応において、1 \times Roche PCR バッファー、0.4 μ M イベント特異的のフォワードプライマー、0.4 μ M イベント特異的のリバースプライマー、0.4 μ M プライマー-GMS 1 1 6 F、0.4 μ M プライマー-GMS 1 1 6 R、0.2 μ M イベント特異的のプローブ、0.2 μ M GMS 1 1 6 プローブ、0.1% PVP、6~20 ng gDNA の通りである。混合物を、下記条件：i) 95 で10分間、ii) 95 で10秒間、iii) 60 で40秒間、iv) 工程 ii~iii を40サイクル繰り返す、v) 40 を保持、を使用して増幅した。リアルタイム PCR を、ROCHE LIGHT CYCLER 480 において行った。データ分析は、LIGHT CYCLER 480 ソフトウェアにより決定されるクロッシングポイント (Cp 値) の測定に基づいた。Cp 値は、蛍光における変化の割合がその最大に達する PCR のサイクル数である。

20

【 0 1 6 5 】

大豆イベント pDAB 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 用の TAQMAN 検出法を、2 mEPSPS v1 および aad-12 v1 PTU を含む 11 種類のイベント、ならびに、非遺伝子組換え大豆品種に対して、大豆特異的な内因性参照遺伝子である、GMFL 0 1 - 2 5 - J 1 9 (GenBank: AK286292.1) との二重方式において試験した。アッセイは、大豆イベント pDAB 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を特異的に検出し、対照 (すなわち、2 mEPSPS v1 および aad-12 v1 PTU を含む 11 種類のイベント、ならびに、非遺伝子組換え大豆品種) に起因する任意の偽陽性を産生または増幅しなかった。イベント特異的のプライマーおよびプローブを、大豆イベント pDAB 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の検出に使用することができ、これらの条件および試薬を、接合性アッセイに適用可能である。

30

40

【 0 1 6 6 】

実施例 7 : 大豆イベント pDAB 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の予測配列

配列番号 1 8 は、大豆イベント pDAB 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の予測配列を提供する。この配列は、5' ゲノムフランキンク配列、pDAB 8 2 6 4 の予測された T 鎖インサートおよび 3' ゲノムフランキンク配列を含む。配列番号 1 8 に関して、残基 1 ~ 1 2 4 6 は、5' ゲノムフランキンク配列であり、残基 1 2 4 7 ~ 1 1 5 0 7 は、pDAB 8 2 6 4 の T 鎖インサートの残基であり、残基 1 1 5 0 8 ~ 1 2 0 1 1 は、3' ゲノムフランキンク配列である。このため、インサートの 5' 末端に関するジャンクション配列またはトランジションは、配列番号 1 8 の残基 1 2 4 6 ~ 1 2 4 7 に存在する。このため、インサートの 3' 末端に関するジャンクション配列またはトランジションは、配列番号 1 8

50

の残基 11507 ~ 11508 に存在する。

【0167】

配列番号 18 が、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の予測表示であり、配列番号 19、配列番号 20 および p D A B 8 2 6 4 の t - 鎖のアライメントから組み立てられたことに留意すべきである。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の T 鎖インサートの実際の配列は、配列番号 18 とわずかにずれる場合がある（例えば、残基 1247 ~ 11507）。植物細胞のゲノム内に T 鎖インサートを導入する形質転換過程中に、インサートの一部の欠損または他の変化が起こることは、珍しいことではない。さらに、小さなシーケンシングエラーをもたらし得る、PCR 増幅におけるエラーが起こり得る。例えば、本願明細書で列記したフランキング配列を、大豆ゲノム DNA 由来の増幅産物を産生し、ついで、増幅産物をクローニングおよびシーケンスすることにより決定した。ゲノム DNA からのシーケンシングに対して十分な増幅産物を産生するのに必要である多くのラウンドの増幅を考えると、この方法において産生され、決定された配列において、わずかな差および小さな食い違いを発見することは珍しいことではない。これらの種類の一般的なシーケンシングエラーまたは食い違いにより必要となる任意の調節は、本主題の発明の範囲内であることを、当業者は認識し、気づくはずである。このため、本願明細書で提供されたプラスミド配列の関連するセグメントは、一部の小さな変異を含んでもよい。このため、一部の範囲における、本主題のインサート配列との同一性を有するポリヌクレオチドを含む植物体は、本主題の発明の範囲内である。配列番号 18 の配列に対する同一性、または、本願明細書に記載の任意のそのセグメントは、本願明細書に例示または記載の配列と、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列であり得る。インサート配列に加えて、フランキング配列の配列は、寄託された種子を参照して、確認され得る。このため、配列番号 18 と、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の実際の T 鎖インサートとの一部の差が、特定される場合があり、本発明の範囲内である。

10

20

【0168】

実施例 8：標的組み込み用の大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の挿入サイトの使用

フィールド条件下における数世代にわたる、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の導入遺伝子の一致した農業生産力は、15番染色体上の大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 挿入サイト付近のこれらの特定された領域が、当該他の遺伝子組換え遺伝子の標的組み込みのための、良好なゲノム位置を提供する。このような標的組み込みは、「位置効果」と呼ばれる課題、および、宿主への導入遺伝子の組み込みによるゲノムにおける変異作製のリスクを克服する。このような標的組み込みの更なる利点としては、制限されず、宿主ゲノムにおける重要な遺伝子座内への導入遺伝子の不適切な挿入に起因する異常を示すこともなく、所望のレベルの導入遺伝子発現を示す遺伝子組換え植物体を取得する前にスクリーニングし、試験されなければならない大量の形質転換イベントを減少させることが挙げられる。さらに、このような標的組み込みは、より有能な両遺伝子を有するエリート植物株の育種を提供する、導入遺伝子の積み重ねを可能にする。

30

40

【0169】

本開示の教示を使用して、当業者は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 における、同じ挿入サイトに対して、または、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 における、挿入サイトに近接するサイトに対して、さらに、当該核酸を標的にすることができる。このような方法の 1 つは、国際公開第 2008/021207 号に開示されており、その内容は参照により本願明細書に組み込まれる。

【0170】

簡潔に、挿入サイトに対する 5' に隣接する 20 K b 以下のゲノム配列、および、挿入サイトに対する 3' に隣接する 20 K b 以下のゲノム配列である、配列番号 18 は、相同組換えを介して、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノム内に挿入され

50

ることが意図される当該1またはそれ以上の遺伝子を、側部に位置させるために使用される。当該1またはそれ以上の遺伝子は、植物における有害作用なしに、一致したレベルの導入遺伝子発現を付与するために、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の挿入サイトに正確に配置され得るか、または、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の挿入サイト付近の 2 0 K b 以内の箇所に配置され得る。当該1またはそれ以上の遺伝子およびフランキンゲ配列を含む D N A ベクターは、当業者に公知の複数の方法の1つ、例えば、制限されず、アグロバクテリウム媒介性形質転換により、植物細胞内に輸送され得る。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の標的サイトへのドナー D N A ベクターの挿入は、複数の方法の1つ、例えば、制限されず、組換え向上遺伝子の共発現もしくは上方制御、または、内因性組換え抑制遺伝子の下方制御により、さらに向上され得る。

10

【 0 1 7 1 】

さらに、ゲノムにおける特定の配列の二本鎖切断が、相同組換え頻度を向上するのに使用され得ることは、当分野において公知である。このため、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 の挿入サイトおよびそのフランキンゲ領域への挿入は、これらの配列を切断するための天然または設計された配列特異的エンドヌクレアーゼの発現により向上され得る。したがって、本願明細書で提供される教示を使用して、任意の相同な核酸が、配列番号1と配列番号2との間、もしくは、配列番号1および配列番号2の近辺に、ならびに、一部の例では、配列番号18内もしくは配列番号18の近辺に位置する標的サイトに挿入され得る。

20

【 0 1 7 2 】

実施例9：大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 から p a t 遺伝子発現カセットの切除

選択的マーカー遺伝子発現カセットの除去は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 への標的挿入に有利であり得る。大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 から p a t 選択的マーカーの除去は、後の世代の大豆における、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 のゲノム位置への、ポリ核酸の標的組み込みにおける、 p a t 選択的マーカーの再利用を可能にする。

【 0 1 7 3 】

本開示の教示を使用して、当業者は、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 から、当該ポリ核酸を切除することができる。このような方法の1つは、米国特許出願特願第 1 3 / 0 1 1 , 6 6 6 号に開示されており、その内容は参照により本願明細書に組み込まれる。

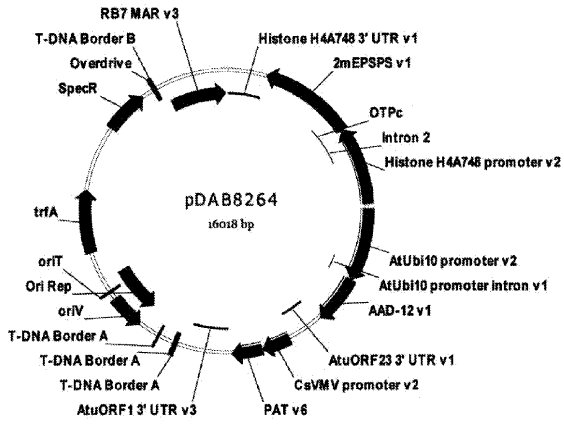
30

【 0 1 7 4 】

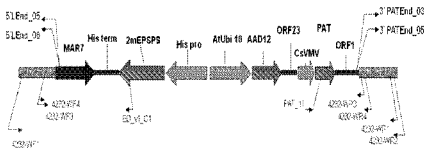
簡潔に、配列特異的エンドヌクレアーゼ、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、遺伝子発現カセットに隣接する特異的 D N A 配列を認識、結合および切断するように設計される。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、大豆イベント p D A B 8 2 6 4 . 4 2 . 3 2 . 1 を含む第2の親植物体に対する、遺伝子組換えジンクフィンガーヌクレアーゼ発現カセットを含む親植物体の交雑により、植物細胞内に送達される。得られた子孫を成熟させ、グルホシネートを含む除草剤を葉に塗ることにより、 p a t 発現カセットを失ったことに関して分析する。除草剤に対する抵抗性がない得られた子孫を、分子的に確認し、自家受粉に進めた。 p a t 発現カセットの切除または除去は、自家受粉から得られた子孫において、分子的に確認される。本願明細書で提供される教示を使用して、任意のヘテロ接合性核酸が、配列番号1と配列番号2との間、好ましくは、配列番号18内に位置する標的サイトにおける、大豆の15番染色体から切除され得る。

40

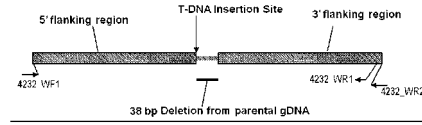
【 図 1 】



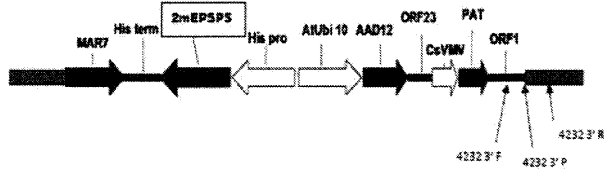
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2014523251000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/46706
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01H 5/00, C12N 5/04, C12N 5/10 (2012.01) USPC - 800/312, 800/300, 435/418, 435/419 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 800/312, 800/300, 435/418, 435/419, 800/298, 435/410 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST - PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files -- 654, 652, 349, 348, 340, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms -- transgenic soybean, heterologous gene integration, herbicide resistance, glyphosphate, glufosinate, high stringency hybridization, backcrossing seed, progeny, stable insertion, cassette		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- A A A A	US 2007/0083945 A1 (BYRUM et al.) 12 April 2007 (12.04.2007) para [0033], [0036], [0037], [0044], [0046], [0053], [0059], [0086], [0102], [0104], [0105], [0115], [0137], [0149], [0151]-[0154], [0179], [0180], [0186], [0189], SEQ ID NOS: 85689 and 201524 EMBL Accession Number HN002532, GSS_Ba205J12.R GSS_Ba Glycine soja genomic 3', genomic survey sequence. 09 May 2010, downloaded from the internet <http://www.ebi.ac.uk/Tools/dbfetch/dbfetch?db=embl&id=HN002532&f...> 20 September 2012, pg 1 US 2008/0051288 A1 (CRESSMAN et al.) 28 February 2008 (28.02.2008) para [0008], [0032], [0039], [0069], [0083], [0089], [0115], [0200], [0288], [0289], [0339] WO 2011/066382 A1 (HANGER et al.) 03 June 2011 (03.06.2011) SEQ ID NO: 1	9, 10 ----- 1-8, 11-28, 37 1, 3, 6-8, 14-28, 37 26, 29-36 22, 23, 37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 September 2012 (22.09.2012)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">04 OCT 2012</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <div style="text-align: right;">Lee W. Young</div> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/46706

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 0 1 N 39/02 (2006.01)	A 0 1 N 39/02	A
A 0 1 N 39/04 (2006.01)	A 0 1 N 39/04	A
A 0 1 N 57/20 (2006.01)	A 0 1 N 57/20	G
A 0 1 P 13/00 (2006.01)	A 0 1 N 57/20	L
A 0 1 N 37/40 (2006.01)	A 0 1 P 13/00	
	A 0 1 N 37/40	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74) 代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74) 代理人 100126354

弁理士 藤田 尚

(74) 代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72) 発明者 ホフマン, トーマス

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンズビル, キングスベリー ウェイ 6 5 2 6

(72) 発明者 パーカースト, ドーン マリエ

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 1 2 3, エイボン, アムステルダム コート 7 8 4 4

(72) 発明者 ジョウ, ニン

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンズビル, ペブルポインテ パス 4 7 7 6

(72) 発明者 パレディ, ダヤカー

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 3, カーメル, ウッドバイン ドライブ 6 6 5

(72) 発明者 クイ, ユンシン コリー

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 2, カーメル, ロイヤル サドル ドライブ 1 3 7 3 6

(72) 発明者 バード, ナザン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 3, マディソン, エリザベス ストリート 1 2 2 5

(72) 発明者 トレド, サンドラ グレイス

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 9 0 6, ウエスト ラファイエット, ダートマス コート 3 1 6 0

(72) 発明者 ブラッドフィッチ, グレゴリー アラン

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 3, カーメル, ジェイテ レーン 1 4 5 7 2

(72) 発明者 ヘルド, ブルース

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 0 1 4, エームズ, クレメンズ ブルバード 5 3 2 6

(72) 発明者 スカル, ヴァイシリンガム

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 0 1 4, エームズ, ウェセックス ドライブ 2 9 0 1

(72) 発明者 ワン, ヤン

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 1 3 1, ジョンストン, エヌ. ダブリュ. 5 0 ティーエイチ

- ストリート 6104
 (72)発明者 クラーク, ローレン
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46075, ホワイトストーン, アプト. 105, セントラル
 ブールバード 6150
 (72)発明者 ラッセル, ショーン マイケル
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46032, カーマル, ラークスパー レーン 11574
 (72)発明者 スミス, ケリー アン
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46052, レバノン, イースト 750 ノース 729
 (72)発明者 ライト, テリー アール.
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46074, カーマル, チャリティ チェイス サークル 1
 4162

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA17 CB02
 4B024 AA08 CA04 CA09 CA20 EA04 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ04 QQ09 QQ42 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34
 QX02
 4B065 AA88X AB01 AC20 BA02
 4H011 AB01 BA01 BB06 BB17 BC18 DA15 DA16 DC05 DD03 DE15
 DF05