

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6315481号  
(P6315481)

(45) 発行日 平成30年4月25日(2018.4.25)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 Q	1/68	(2018.01)	C 12 Q	1/68	A
A 01 H	5/00	(2018.01)	A 01 H	5/00	A
A 01 H	1/00	(2006.01)	A 01 H	1/00	A
C 12 N	5/04	(2006.01)	C 12 N	5/04	

請求項の数 32 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-511667 (P2015-511667)  
 (86) (22) 出願日 平成25年5月8日(2013.5.8)  
 (65) 公表番号 特表2015-519051 (P2015-519051A)  
 (43) 公表日 平成27年7月9日(2015.7.9)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/040173  
 (87) 國際公開番号 WO2013/169923  
 (87) 國際公開日 平成25年11月14日(2013.11.14)  
 審査請求日 平成28年3月23日(2016.3.23)  
 (31) 優先権主張番号 61/644,368  
 (32) 優先日 平成24年5月8日(2012.5.8)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-12669

前置審査

(73) 特許権者 501231613  
 モンサント テクノロジー エルエルシー  
 アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン  
 トルイス、ノース・リンドバーグ・ブル  
 バード800番、メール・ゾーン・イー1  
 エヌエイ  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100157956  
 弁理士 稲井 史生  
 (74) 代理人 100170520  
 弁理士 笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】トウモロコシイベントMON87411

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

トウモロコシDNAを含有する試料中に検出することができる組換えDNA分子であつて、該分子のヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号21、および配列番号25からなる群より選択されるか、または

(b) (a)に完全に相補的なヌクレオチド配列であり、

当該DNA分子の存在が、該試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAに特徴的である、組換えDNA分子。

10

## 【請求項2】

トウモロコシDNAを含有する試料中に検出することができる組換えDNA分子であつて、該分子のヌクレオチド配列は配列番号1またはその完全相補体に対して少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列であり、当該DNA分子の存在が、該試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAに特徴的である、組換えDNA分子。

## 【請求項3】

トウモロコシDNAを含有する試料中に検出することができる組換えDNA分子であつて、該分子のヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、

20

および配列番号 5 2 からなる群より選択されるか、または  
 ( b ) ( a ) に完全に相補的なヌクレオチド配列であり、  
 当該 D N A 分子の存在が、該試料中のトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 D N A 内  
 に含まれるコンストラクトに特徴的である、組換え D N A 分子。

**【請求項 4】**

該 D N A 分子がトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 に由来し、トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 を含む種子の代表試料が A T C C 受託番号 P T A - 1 2 6 6 9 として寄託されている、請求項 1、請求項 2 または請求項 3 に記載の組換え D N A 分子。

**【請求項 5】**

該試料がトウモロコシ植物、トウモロコシ植物細胞、トウモロコシ種子、後代トウモロコシ植物、トウモロコシ植物部分、またはコモディティートウモロコシ製品を含む、請求項 1、請求項 2 または請求項 3 に記載の組換え D N A 分子。 10

**【請求項 6】**

ストリングエントなハイブリダイゼーション条件下で試料中のトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 D N A またはそこに含まれるコンストラクトとハイブリダイズする D N A プローブとして機能するのに十分な長さのポリヌクレオチドセグメントを含む D N A 分子であって、該プローブが、配列番号 1 に示すトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 またはそこに含まれるコンストラクトに特徴的である 1 つ以上の接合部セグメントに、該条件下で特異的にハイブリダイズし、該ハイブリダイゼーション条件下での該 D N A プローブのハイブリダイゼーションの検出が、該試料中のトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 D N A またはそこに含まれるコンストラクトに特徴的であり、該 D N A プローブが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 2 1、配列番号 2 5、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、および配列番号 5 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、D N A 分子。 20

**【請求項 7】**

第 1 D N A 分子と、第 1 D N A 分子とは異なる第 2 D N A 分子とを含む、一対の D N A 分子であって、該第 1 および第 2 D N A 分子は、それぞれ、D N A プライマーとして機能して、增幅反応においてトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 テンプレート D N A を含有する試料と共に、一緒に使用した場合に、該試料中の該トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 D N A に特徴的であるアンプリコンが作製されるように、配列番号 1 または配列番号 2 または配列番号 3 または配列番号 4 の十分な長さの連続ヌクレオチドのポリヌクレオチドセグメントを含み、前記アンプリコンが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 2 1、および配列番号 2 5 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、一対の D N A 分子。 30

**【請求項 8】**

第 1 D N A 分子と、第 1 D N A 分子とは異なる第 2 D N A 分子とを含む、一対の D N A 分子であって、該第 1 および第 2 D N A 分子は、それぞれ、D N A プライマーとして機能して、增幅反応においてトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 テンプレート D N A を含有する試料と共に、一緒に使用した場合に、該試料中の該コンストラクトを含む D N A に特徴的であるアンプリコンが作製されるように、配列番号 1 または配列番号 2 または配列番号 3 または配列番号 4 の十分な長さの連続ヌクレオチドのポリヌクレオチドセグメントを含み、該アンプリコンが、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、および配列番号 5 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、一対の D N A 分子。 40

**【請求項 9】**

試料中のトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 に特徴的である D N A セグメントの存 50

在を検出する方法であって、

- (a) 試料を請求項6に記載のDNA分子と接触させること；
  - (b) 試料および該DNA分子をストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に付すこと；および
  - (c) トウモロコシイベントMON87411に特徴的である該DNAセグメントへの該DNA分子のハイブリダイゼーションを検出すること
- を含み、該検出ステップが該試料中の該トウモロコシイベントMON87411分子の存在に特徴的である、方法。

**【請求項10】**

試料中のトウモロコシイベントMON87411に特徴的であるDNAセグメントの存在を検出する方法であって、10

- (a) 試料を、請求項7に記載の一対のDNA分子と接触させること；
  - (b) DNAアンプリコンを作製するのに十分な増幅反応を行うこと；および
  - (c) 該反応中の該DNAアンプリコンの存在を検出すること
- を含み、該DNAアンプリコンは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号21および配列番号25からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含み、該アンプリコンの存在の該検出が、該試料におけるトウモロコシイベントMON87411 DNAの存在に特徴的である、方法。

**【請求項11】**

試料中のトウモロコシイベントMON87411内に含まれるコンストラクトに特徴的であるDNAセグメントの存在を検出する方法であって、20

- (a) 試料を、請求項8に記載の一対のDNA分子と接触させること；
  - (b) DNAアンプリコンを作製するのに十分な増幅反応を行うこと；および
  - (c) 該反応中の該DNAアンプリコンの存在を検出すること
- を含み、該DNAアンプリコンは、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含み、該アンプリコンの存在の該検出が、該試料におけるトウモロコシイベントMON87411 DNA内に含まれる該コンストラクトの存在に特徴的である、方法。30

**【請求項12】**

配列番号1のヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド分子を含む、トウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。

**【請求項13】**

グリホサート除草剤処置に対して耐性である、請求項12に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。

**【請求項14】**

Diabrotica種の食物に入れて提供された場合に殺虫性である、請求項12に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。

**【請求項15】**

該Diabrotica種が、Diabrotica virgifera virgifera (ウエスタンコーンルートワーム、WCR)、Diabrotica barberi (ノーザンコーンルートワーム、NCR)、Diabrotica virgifera zea (メキシカンコーンルートワーム、MCR)、Diabrotica balteata (プラジリアンコーンルートワーム、BZR)、Diabrotica balteata (Diabrotica viridulaとDiabrotica speciosaとからなるプラジリアンコーンルートワーム複合体、BCR)、およびDiabrotica undecimpunctata howardi (サザンコーンルートワーム、SCR)からなる群より選択される、請求項14に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。4050

**【請求項 16】**

該トウモロコシ植物がさらに、該イベントMON87411を含むトウモロコシ植物の任意の世代の後代植物と規定される、請求項12に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。

**【請求項 17】**

該トウモロコシ植物が、少なくとも片方はイベントMON87411を含む親から育種された雑種である、請求項16に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。

**【請求項 18】**

該トウモロコシ植物が、DAS-59122-7; MON89034; MON8801  
7; MIR604; MON87427; TC1507; 5307; DAS-06275-  
8; BT176; BT11; およびMIR162からなる群より選択されるトランスジェ  
ニックイベントをさらに含む、請求項12に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロ  
コシ植物部分。 10

**【請求項 19】**

配列番号1のヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド分子を含む、トウモロコシ種子。

**【請求項 20】**

検出可能な量の、イベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトにユ  
ニークなDNA分子を含むトウモロコシコモディティー製品であって、該分子が請求項1  
、請求項2または請求項3に記載の組換えDNA分子を含む、トウモロコシコモディティ  
ー製品。 20

**【請求項 21】**

全粒または加工トウモロコシ種子、トウモロコシを含む動物用飼料、トウモロコシ油、  
コーンミール、コーンフラワー、コーンフレーク、コーンブラン、トウモロコシバイオマス、  
ならびにトウモロコシおよびトウモロコシ部分を使って生産された燃料製品からなる  
群より選択されるコモディティー製品とさらに規定される、請求項20に記載のトウモロ  
コシコモディティー製品。

**【請求項 22】**

DNA增幅方法で試験した場合にテンプレートとして機能しうるDNAを含むトウモロ  
コシ植物またはそのトウモロコシ植物部分であって、該テンプレートを使った該DNA增幅  
方法を実行することで、イベントMON87411 DNAまたはそこに含まれるコン  
ストラクトの存在に特徴的であるアンプリコンが作製され、トウモロコシイベントMON  
87411を含む種子の代表試料がATCC受託番号PTA-12669として寄託され  
ており、該アンプリコンが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番  
号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12  
、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号  
42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列  
番号51、および配列番号52からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、トウ  
モロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分。 40

**【請求項 23】**

グリホサート除草剤に対して耐性なトウモロコシ植物を作製する方法であって、該トウ  
モロコシ植物のゲノムにトウモロコシイベントMON87411を提供することを含み、  
該トウモロコシ植物がイベントMON87411に関してホモ接合である近交系トウモロ  
コシ植物であるか、または少なくとも片方はイベントMON87411を含む親トウモロ  
コシ植物のF1雑種後代であり、トウモロコシイベントMON87411を含む種子の代  
表試料がATCC受託番号PTA-12669として寄託されている、方法。

**【請求項 24】**

トウモロコシコモディティー製品を生産する方法であって、

(a) 請求項12に記載のトウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分を取得する 50

こと；および

(b) 前記トウモロコシ植物またはそのトウモロコシ植物部分からトウモロコシコモディティー製品を生産すること  
を含む、方法。

【請求項 25】

圃場における雑草の生長を管理するための方法であって、圃場でイベントMON87411を含むトウモロコシ植物を生長させること、および雑草の生長を管理するために該圃場を有効量のグリホサートで処置することを含み、トウモロコシイベントMON87411を含む種子の代表試料がATCC受託番号PTA-12669として寄託されている、方法。 10

【請求項 26】

該有効量のグリホサートが1エーカーあたり0.125ポンド～6.4ポンドである、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

検出可能な量の請求項1、請求項2または請求項3に記載の組換えDNA分子を含む、生きていなない植物材料。

【請求項 28】

検出可能な量の請求項1、請求項2または請求項3に記載の組換えDNA分子を含む微生物。 20

【請求項 29】

細菌および植物細胞からなる群より選択される、請求項28に記載の微生物。

【請求項 30】

(a) 配列番号12に示す組換えポリヌクレオチドと  
(b) 配列番号14に示す組換えポリヌクレオチドと  
(c) 配列番号16に示す組換えポリヌクレオチドと  
を含むDNA分子であって、

該組換えポリヌクレオチド配列がホスホジエステル結合によって一つに連結されている、DNA分子。

【請求項 31】

配列番号4を含むと規定される、請求項30に記載のDNA分子。 30

【請求項 32】

トウモロコシイベントMON87411を含むトウモロコシ植物が50～100パーセントを構成するトウモロコシ植物の圃場を耕作することを含む、トウモロコシ植物の圃場を保護する方法であって、トウモロコシイベントMON87411を含む種子の代表試料がATCC受託番号PTA-12669として寄託されている、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本願は、2012年5月8日に出願された米国仮特許出願第61/644,368号の利益を主張し、当該仮特許出願は引用によりそのまま本明細書に組み込まれる。 40

【0002】

配列表の組み込み

230キロバイト(Microsoft Windows(登録商標)で測定したサイズ)であって2013年5月6日に作成された「MONS308WO\_ST25.txt」という名称のファイルに含まれる配列表は、電子申請により本願に添付して提出され、引用により本明細書に組み込まれる。

【0003】

発明の分野

本発明は、トランスジェニックZea maysイベント(event)MON874 50

11に関する。本イベントは、コーンルートワーム寄生に対する抵抗性のための二重の作用機序と除草剤グリホサート耐性とを提供する。また本発明は、イベントMON87411に関係する植物、植物部分、植物種子、植物細胞、農産物、および方法にも関係し、本イベントにユニークなヌクレオチド分子であってZea mays植物のゲノムへのトランスジェニックDNAの挿入に関連して作出されたヌクレオチド分子を提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

##### 発明の背景

トウモロコシ(Zea mays)は世界の多くの地域において重要な作物であり、望ましい形質を有するトウモロコシを作製するために、この作物には生物工学の方法が応用されてきた。植物における昆虫抵抗性または除草剤耐性トランスジーンの発現は、昆虫抵抗性および/または除草剤耐性という望ましい形質を植物に付与しうるが、そのようなトランスジーンの発現は、植物染色体に導入された個々の遺伝子の発現を駆動するカセットの配向および組成、ならびにトランスジーン挿入の染色体上の位置およびゲノム結果を含む、多くの異なる因子によって左右されうる。例えば、トランスジーンの染色体挿入部位の相違を除けば他の点では同一である個々のイベント間でも、トランスジーン発現のレベルおよびパターンにはばらつきが存在しうる。いくつかのイベントの間には、望ましくない表現型上または農学上の相違も存在しうる。したがって、そのイベントを商業的目的に適したものにするのに必要な望ましい形質ならびに最適な表現型上および農業上の特徴に関して優れた性質を有するイベントを選択するためには、多数の個別植物形質転換イベントを作製し、解析することが、しばしば必要になる。そのような選択は、多くの場合、相当量の農学的データ、表現型データ、および分子データを収集することができるよう、大規模な分子キャラクタリゼーションと、複数年にわたって複数の立地においてさまざまな条件下で数多くのイベントを使って行われる温室試験および圃場試験とを必要とする。その結果得られたデータおよび観察記録は、次に、商業的に好適なイベントを選択することを目指して、科学者と農学者のチームによって解析されなければならない。そのようなイベントがひとたび選択されたら、次に、その望ましい形質を植物育種方法で他の遺伝的背景に遺伝子移入し、よって望ましい形質を持ちかつ具体的な局所生長条件に適切に適応したいくつかの異なる作物品種を作製するために、そのイベントを使用することができる。

#### 【0005】

単一の形質転換イベントを含有するトランスジェニック植物を作るには、組換えDNAコンストラクトの一部をトウモロコシ細胞のゲノム中に導入し、次に、そのトウモロコシ細胞を植物へと生長させる。イベントが最初に導入されたトウモロコシ細胞を再生することでR<sub>0</sub>世代を作製する。R<sub>0</sub>植物とR<sub>1</sub>植物からの後代植物を所望する任意の形質について試験することができるが、イベントの有効性は、形質転換イベントにおける挿入部位に対してシスおよび/またはトランスの因子による影響を受けうる。イベントによって付与される表現型は、DNAコンストラクトのサイズと設計による影響も受け、それは発現カセットにおける遺伝要素の組み合わせ、トランスジーンの数、発現カセットの数、ならびにそのような要素およびそのようなカセットの配置によって変動しうる。望ましい形質を伴うイベントの同定は、トランスジーン発現の植物発生的、日周的、時間的、または空間的パターンなどといった因子によって、または外因、例えば環境的植物生長条件、水利用可能性、窒素利用可能性、熱、もしくはストレスなどによって、さらに複雑になりうる。したがって、望ましい一組の表現型形質を付与するイベントが得られるかどうかは、容易には予測することができない。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

##### 発明の概要

本発明者らは、既存のトランスジェニックトウモロコシ植物と比べて、そしてまた、並行して構築された新しいイベントと比べて、優れた性質および成績を呈するトランスジェ

10

20

30

40

50

ニックトウモロコシイベントMON87411を同定した。トウモロコシイベントMON87411は、連結された3つの発現カセットを含有し、これらのカセットは全体として、トランスジェニックイベントMON87411を含有するトウモロコシ細胞、トウモロコシ組織、トウモロコシ種子およびトウモロコシ植物に、コーンルートワーム抵抗性およびグリホサート除草剤耐性の形質を付与する。トウモロコシイベントMON87411は、コーンルートワーム病害虫種(*Diabrotica*種を含む；とりわけ病害虫が、*Diabrotica virgifera virgifera*(ウェスタンコーンルートワーム、WCR)、*Diabrotica barberi*(ノーザンコーンルートワーム、NCR)、*Diabrotica virgifera zeae*(メキシカンコーンルートワーム、MCR)、*Diabrotica balteata*(ブラジリアンコーンルートワーム(BZR)もしくは*Diabrotica viridula*と*Diabrotica speciosa*とからなるブラジリアンコーンルートワーム複合体(BCR))、または*Diabrotica undecimpunctata howardi*(サザンコーンルートワーム、SCR)である場合)に対して、2つの作用機序を提供する。二重の作用機序は冗長性を与え、病害虫防除形質に対する抵抗性が発生する可能性を著しく低減する。

**【課題を解決するための手段】**

**【0007】**

イベントMON87411は、試料中のイベントの存在を検出するのに役立つユニークな特異的DNAセグメントによって特徴づけられる。試料とは、実質的に純粋なトウモロコシDNAである組成物またはトウモロコシDNAを含有する組成物のどちらかを指すものとする。どちらの場合も試料は生物学的試料である。すなわち試料は生体物質、例えば限定するわけではないが、トウモロコシイベントMON87411のゲノムから直接的にまたは間接的に取得されるまたは由来するDNAなどを含有する。「直接的に」とは、当業者が、トウモロコシ細胞を破碎し(または破碎されたトウモロコシ細胞を含有するトウモロコシの試料を取得し)、検出を目的としてゲノムDNAを露出させることによって、トウモロコシゲノムからDNAを直接的に取得できることを指す。「間接的に」とは、当業者が、トウモロコシ細胞の破碎によるかまたは破碎されたトウモロコシ細胞を含有するトウモロコシの試料を取得することによる直接的な手段以外の手段で、ターゲットまたは特異的リファレンスDNA、すなわち、特定試料中のイベントMON87411の存在に特徴的であると本明細書に記載する新規でユニークな接合部セグメントを取得できることを指す。そのような間接的手段には、ターゲット配列に特異的に結合するように設計された特定プローブのターゲットとなるDNA配列を含有するDNAセグメントの増幅、または測定し、特徴づけることができるDNAセグメントの増幅、すなわち、アガロースゲルやアクリルアミドゲルなどといった効率のよい何らかのマトリックスによるDNAの他のセグメントからの分離によって測定することができる、またはアンプリコンの直接配列解析によって特徴づけることができるか、アンプリコンをベクターにクローニングし、そのベクター内に存在する挿入されたアンプリコンのダイレクトシークエンスによって特徴づけることができるDNAセグメントの増幅などがあるが、それらに限定されるわけではない。あるいは、トウモロコシ染色体内の位置であって、トランスジェニックDNAはその位置でトウモロコシ染色体に挿入されており、イベントMON87411を規定するために使用することができるよう位置に対応するDNAのセグメントを、さまざまな手段によってクローニングしてから、特定試料または特定トウモロコシゲノムにおけるその存在について同定し、特徴づけることもできる。そのようなDNAセグメントは接合部セグメントまたは接合部配列と呼ばれ、挿入DNAとトウモロコシゲノムの間の接合点がそのセグメントに含まれている限り、任意の長さの挿入DNAと近接(隣接)トウモロコシ染色体DNAとあることができる。配列番号12および配列番号21ならびにこれらの配列のそれぞれの逆相補体は、そのようなセグメントを代表するものである。

**【0008】**

本明細書に記載する特異的配列は、イベントMON87411中に、またはそこに含ま

10

20

30

40

50

れるコンストラクト中に、ユニークに存在することができ、これらの配列の同定は、それが直接配列解析によるものであるか、そのような配列に結合したプローブを検出することによるものであるか、または本明細書に記載する特定アンプリコンのサイズと場合によつては組成とを観察することによるものであるかを問わず、それが特定トウモロコシの生殖質またはゲノム中に存在しかつ／またはトウモロコシDNAを含有する特定生物学的試料中に存在するのであれば、そのような試料におけるイベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトの存在に特徴的である。隣接ゲノムセグメント（すなわち、挿入されたトランスジェニックDNAに近接するDNA配列のトウモロコシゲノムセグメント）はわずかな変異を起こしやすいことが知られており、したがって少なくとも99%またはそれ以上の同一性という限定は、トウモロコシゲノムごとのそのような異常または多型に関連している。ここで参照される特定の特徴的配列と比較してその全長にわたって完全に相補的なヌクレオチドセグメントは、本発明の範囲内にあるものとする。

#### 【0009】

本発明のヌクレオチドセグメントの、互いの相対的な、そしてトウモロコシゲノム内の位置を、図3に図解し、それぞれのヌクレオチド配列を配列番号1に示すように説明する。イベントMON87411を特徴づけ、試料中のイベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトの存在に特徴的であるヌクレオチドセグメントには、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、および配列番号25；配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、または配列番号52が含まれる。試料中にこれらのヌクレオチド配列のうちの1つもしくは2つまたはそれ以上が存在することは、その試料がトウモロコシ組織を含有し、したがってトウモロコシDNAを含有する場合には、イベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトの存在に特徴的である。

#### 【0010】

「由来」という単語の使用は、ある特定DNA分子がトウモロコシ植物ゲノム中にあるか、トウモロコシ植物DNA中に検出されうることを意味している。「検出されうる」とは、ある特定DNAセグメントが増幅され、DNA配列解析によって、そのサイズおよび／または配列が特徴づけられるまたは解明されることができることを指し、また、あるプローブがその特定DNAセグメント、すなわちターゲットDNAセグメントに特異的に結合することができ、続いて、そのターゲットへのプローブの結合を検出できることも指す。本発明の特定DNAセグメントまたはターゲットDNAセグメントは、挿入イベントMON87411を含有するトウモロコシ内に存在する。

#### 【0011】

トウモロコシへの言及は、各実施形態が、トウモロコシイベントMON87411 DNAの存在に特徴的であると本明細書に記載するセグメントのうちの任意の1つ、2つまたはそれ以上に対応する検出可能な量のDNAを含有する限り、トウモロコシ細胞、トウモロコシ種子、トウモロコシ植物部分およびトウモロコシ植物が本発明の範囲内であることを意味するものとする。トウモロコシ植物部分には、細胞；花粉；胚珠、莢（pod）；花および花の一部、例えば穂軸、絹糸、および雄穂；根組織；茎組織；および葉組織が含まれる。イベントMON87411の存在に特徴的であると本明細書に記載するDNAのセグメントを検出可能な量で含有するトウモロコシから作られたコモディティー製品は、本発明の範囲内である。そのようなコモディティー製品には、全粒または加工トウモロコシ種子、トウモロコシまたはトウモロコシ副産物を含有する動物用飼料、トウモロコシ油、コーンミール、コーンフラワー、トウモロコシデンブン、コーンフレーク、コーンブラン、トウモロコシのバイオマスおよび茎葉、ならびにトウモロコシまたはトウモロコシ植物およびトウモロコシ植物部分から作られた場合の燃料製品および燃料副産物などを含めることができる。

10

20

30

40

50

## 【0012】

トウモロコシイベントMON87411のDNAは、典型的には、本イベントを含有するトウモロコシ植物、トウモロコシ種子、およびトウモロコシ組織の各細胞および各染色体中に存在する。トウモロコシゲノムはメンデルの法則に従って後代に遺伝するので、トウモロコシ植物がホモ接合であるなら、各後代トウモロコシ植物および細胞は、親から後代へと生成される親染色体のそれぞれに、イベントDNAを含有するであろう。しかし、イベントMON87411 DNAを含有するトウモロコシゲノムがヘテロ接合親または雑種親である場合は、雑種親からの交配に関与する花粉の50%および胚珠の50%しかトウモロコシイベントMON87411 DNAを含有せず、イベントMON87411 DNAを含有する後代の混合個体群をもたらすことになり、そのような雑種を使った交雑から生じる後代であって、後代に遺伝されたイベントMON87411 DNAを有するもののパーセンテージは、約50パーセントないし約75パーセントにわたりうる。  
10

## 【0013】

本発明のDNA分子は、トウモロコシイベントMON87411挿入DNAにユニークであるか、トランスジェニック挿入DNAとその挿入DNAの一端に近接するトウモロコシゲノムDNAとの間の2つの接合部にユニークでありうる。これらの分子は、それが、本明細書に記載する方法により、プローブ、プライマーを使って、また場合によってはDNA配列解析を使って解析される特定試料中に存在する場合、その試料におけるある量のイベントMON87411トウモロコシの存在に特徴的でありうる。トウモロコシイベントMON87411 DNAにユニークであるそのようなDNA分子は、そのユニークDNA分子に特異的に結合するように設計されたプローブ核酸分子を使用し、続いてユニークDNAへのそのようなプローブの結合を検出することによる方法や、プローブとして作用する少なくとも2つの異なるDNA分子（ただし、そのような分子の配列は、上述のプローブよりは特異性が多少低くてもよい）を使用する熱増幅方法による方法など、いくつかの方法で同定し、特徴づけることができる。適当なハイブリダイゼーション条件下で特定のターゲットDNAをプローブまたはプライマーと接触させると標的DNAセグメントへのプローブまたはプライマーの結合が起こることになることは、当業者には理解される。  
20

## 【0014】

DNAのターゲットセグメントである本発明のDNA分子は増幅が可能であり、特定試料の増幅方法によって得られた該当する長さの1つ以上のアンプリコンとして検出される場合、それは、その試料におけるイベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトの存在に特徴的でありうる。そのようなDNA分子またはポリヌクレオチドセグメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52のそれぞれに示すヌクレオチド配列を有し、本明細書と下記の実施例においてさらに詳しく規定する。プライマー分子および/またはプローブは、対照を含む必要な試薬類と共にキットの形態で、使用説明書を同梱して提供することができる。  
30  
40

## 【0015】

本発明の組換えDNA分子は、それが微生物内にあるか、または微生物に由来する場合、本発明の範囲内であるとみなされる。微生物は、原核生物であるか真核生物であるかを問わず、あるいはDNAをゲノムまたは染色体内に含有するか、染色体外DNA構造、より一般的にはプラスミドまたはベクターと呼ばれるものに含有するかを問わず、任意の顕微鏡的細胞を包含するものとする。顕微鏡的生物には、平均的なヒトの視覚域を下回る、典型的には50立方ミクロン未満の、より一般的には10立方ミクロン未満の、細菌（原核生物）および、より高等な生物（真核生物）に対応する細胞が含まれる。細菌は、配列番号1に示すように存在する各発現カセットのそれぞれを含む本発明の新規DNAセグメントの1つもしくは複数または全部を含有するベクターまたはプラスミドをおそらく含  
50

有するであろう、一般的な顕微鏡的微生物である。植物細胞、特にトウモロコシ植物細胞は、それらが本発明の新規DNAセグメントの任意の1つ、2つもしくはそれ以上または全部を含有する場合、本発明の範囲内である。

#### 【0016】

ここで使用されるプローブは、典型的には、本明細書において規定するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で機能して、特定のターゲットDNAセグメント、すなわち、試料内に存在して、試料中のイベントMON87741 DNAの存在に特徴的である、ユニークなDNAのセグメントと結合するのに十分な長さのDNA分子またはポリヌクレオチドセグメントと特徴づけられる。そのようなプローブは、トウモロコシイベントMON87411 DNA中にのみ存在する単一の接合部または他の新規配列だけに結合するか、または2つ以上のそのような単一接合部セグメントに結合するように設計することができる。いずれにせよ、トウモロコシDNAを含有すると疑われる特定試料中のDNA分子へのそのようなプローブの結合の検出は、その試料におけるトウモロコシイベントMON87411の存在に特徴的である。

10

#### 【0017】

プライマーは、典型的には、特定のDNAターゲットセグメントを増幅する熱増幅反応において使用するための異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドセグメントのペアとして提供される。ペア内の各プライマーは、増幅のために、目的のDNAセグメント内またはその近くにある、かなり特異的なDNAセグメントに結合するように設計される。プライマーは、それらが、次いで、1つ以上のアンプリコン（増幅されたターゲットDNAセグメント）の作製をもたらす局在化した核酸配列重合の領域として働くような形で結合する。本発明において、特定の生物学的試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAのユニークなセグメントに結合するように設計されたプライマーであって、本明細書に記載の接合部セグメントの1つ以上を含有する特定のアンプリコンを増幅するものの使用、ならびにポリメラーゼ反応が完了または終結した時のそのようなアンプリコンの検出および/またはキャラクタリゼーションは、その特定試料におけるトウモロコシイベントMON87411の存在に特徴的である。当業者はこの増幅方法を熟知しており、ここで増幅の詳細を細かく説明する必要はない。

20

#### 【0018】

トウモロコシ植物、トウモロコシ植物細胞、トウモロコシ植物組織およびトウモロコシ種子は、配列番号1に示すように3'遠位端にある発現カセット中のイネRcc3プロモーターからのグリホサート非感受性CP4-EPSPS酵素の発現により、グリホサート除草剤の施用に対して非感受性である。そのような種子は圃場に播種することができる。発芽および苗条の出現の数日後に、雑草防除有効量のグリホサート除草剤を施用することができ、これは、圃場内の雑草の実質的に全てを排除するが、トウモロコシイベントMON87411 DNAを含有するトウモロコシ植物の継続的生育は許すことになる。本植物は、ルートワーム*Diabrotica*の全ての既知種のコーンルートワーム、例えば限定するわけではないが、*Diabrotica virgifera virgifera* (ウエスタンコーンルートワーム、WCR)、*Diabrotica barberi* (ノーザンコーンルートワーム、NCR)、*Diabrotica virgifera zeae* (メキシカンコーンルートワーム、MCR)、*Diabrotica balteata* (ブラジリアンコーンルートワーム (BZR) または*Diabrotica viridulata*と*Diabrotica speciosa*とからなるブラジリアンコーンルートワーム複合体 (BCR))、および*Diabrotica undecimpunctata howardi* (サザンコーンルートワーム、SCR)による寄生に対して抵抗性でもある。*Diabrotica*種に対する抵抗性は、挿入トランスジェニックDNA内で作動的かつ共有結合的に連結された2つの異なるDNAセグメントの発現に関連して生じる。すなわちdsRNAは、配列番号1に示す挿入トランスジェニックDNAの5'近位端にある発現カセット (図1に[G]配列番号12の位置で図解するもの) から転写され、コーンルートワーム中の必須遺伝子を抑制のターゲットとする。また

30

40

50

、コウチュウ毒性Cry3Bbタンパク質は、dsRNA[G]を発現するカセットと、配列番号1に示す挿入トランスジェニックDNAの3'遠位端にあるカセット(図1に[I]配列番号16によって図解するグリホサート耐性発現カセット)との間の中央にある発現カセット(図1に[H]配列番号14の位置で示されるように配列番号1のほぼ中央にある)から発現される。dsRNAは、snf7と呼ばれる酵母オルソログ遺伝子を抑制のターゲットとし、CAMV e35Sプロモーターから発現される。一方、Cry3Bbタンパク質は、Zea mays PIIIGプロモーターから発現される。これらのdsRNAおよびCry3Bbタンパク質は、コーンルートワーム種にとって有毒作用物質である。

## 【0019】

dsRNAおよびCry3Bb毒性作用物質の発現を駆動するプロモーターは分岐的に置かれているので、各毒性作用物質の各プロモーターからの発現は、2つのプロモーター間の中央にある点から離れていく。すなわち、各発現カセットの転写は反対の向きに進行し、一点には集まらない。グリホサート耐性CP4 EPSPS発現カセットは、Cry3Bbタンパク質の発現を駆動するカセットの下流、すなわち配列番号1に示すように3'端に近い方、3'遠位側にある。Cry3BbとEPSPSの発現を駆動するカセットはタンデム配向の転写(Cry3BbがEPSPSの上流)を使ってそれぞれのタンパク質を生産し、同じ配向で、ただし各自別個のプロモーターから、それぞれ転写される。dsRNA発現カセットとグリホサート耐性カセットを無傷のまま、トウモロコシゲノムへの挿入を意図したDNAセグメントの遠位端に置いておき、Cry3Bbカセットの配向をイベントMON87411 DNA内に存在する設計とは反転または逆転させた、他の変異型コンストラクトを作製した。これらの変異型コンストラクトでは、Cry3Bbの発現を駆動するのに、Zea mays PIIIGプロモーターまたはイネRccc3プロモーターを利用した。

## 【0020】

Cry3Bb発現カセットのこれらの変異型コンストラクト/配向だけを含有するトランスジェニックイベントを、イベントMON87411、ならびに現在市販されているイベントMON863(Cry3Bb発現カセットだけを含有するもの)、MON88017(CP4 EPSPS発現カセットに作動的に連結されたCry3Bb発現カセットを含有するもの)、およびDAS-59122-7(作動的に連結された3つの発現カセットを含有し、そのうちの2つが二重Bt毒素コンポーネントCry34およびCry35をタンデムに発現すると共に、1つがグルホシネート耐性を付与するもの)と比較した。以下に実施例で説明する結果は、イベントMON87411がCry3Bbタンパク質の根指向的発現に関して優れた性質を呈すること、そしてイベントMON87411を生成させるために使用したコンストラクトを使って作製したトランスジェニックイベントの多くは、他のコンストラクトを使って作製した他のイベントよりも、それぞれコーンルートワームの有効な防除を呈する可能性が高いことを示している。

## 【0021】

イベントMON87411に対応するDNAをそれぞれ含有する、本発明のトウモロコシ植物およびその部分、例えば種子は、本発明の範囲内である。そのような植物はコーンルートワームの寄生に対して抵抗性であり、除草剤グリホサートの施用に対して非感受性である。そのような植物には、MON87411アレルを1つしか含有しない雑種、すなわちイベントMON87411 DNAに対応する座位に関してヘテロ接合と特徴づけられるゲノムを含有する雑種が含まれる。そのような雑種は、雑種強勢および他の農業上望ましいトウモロコシの性質を確保するために、望ましい生殖質を使った育種によって作製される。雑種はいくつもの方法によって作製することができるが、好ましい一方法では、イベントMON87411特異的アレルを、どちらの染色体でも、イベントMON87411 DNAが挿入された座位に含有する第1近交系(ホモ接合)親を利用し、その第1近交系を、MON87411 DNAを含有しない第2近交系と交配する。どちらの親近交系品種も、後代種子、すなわち雑種種子に望まれる1つ以上の有利な性質を有するで

10

20

30

40

50

あろう。

【0022】

イベントMON87411 DNAを含有する植物に何らかの追加形質を付与するトランスジェニック特性またはトランスジェニックアレルは、特に望ましい。そのようなトランスジェニックアレルとして、コーンルートワーム抵抗性を付与する他のトランスジェニックイベント、例えば限定するわけではないが、DAS-59122-7；MIR604；および5307などのイベントが挙げられる。これらのイベントはそれぞれ追加のコーンルートワーム毒性作用物質を与える（DAS-59122-7は、ルートワーム毒性を呈するPS149B1（Cry34/Cry35）およびグリホシネットに対する除草剤耐性を与え；MIR604は、ルートワーム毒性を呈する修飾Cry3Aaを与え；イベント5307は、ルートワーム毒性を呈するFR8a遺伝子を与える）。これらのような追加のコーンルートワーム抵抗性形質を与えることにより、与えられたコーンルートワーム毒性作用物質のいずれか一つに対する抵抗性が発生する可能性を減少させうる。他の望ましい形質には、収量およびストレス抵抗性または耐性形質、窒素固定形質、水の使用を調整する形質、真菌寄生に対する抵抗性、ジカンバ（MON87427）、グリホシネットなどの除草剤に対する抵抗性、ならびに鱗翅類寄生に対する抵抗性などがある。鱗翅類寄生抵抗性形質は当技術分野において提供されており、これには、トランスジェニックトウモロコシイベント（およびそれぞれの鱗翅類活性タンパク質）MON810（Cry1Ab）、MON89034（Cry1A.105およびCry2Ab）；TC1507（Cry1AcおよびCry1Fa）；DAS-06275-8（TC-6275とも呼ばれる）（Cry1Faおよびbar（グリホシネット耐性を与える））；MIR162（Vip3Aa）、BT176（Cry1Ab）；およびBT11（Cry1Ab）などがある。これらの形質、特にイベントMON87411形質に対応する昆虫抵抗性形質、他の列挙したコーンルートワーム抵抗性形質、または鱗翅類抵抗性形質の何らかの組み合わせまたは全部を単一の植物に与えることに代わる選択肢は、これらをさまざまな組み合わせの種子ブレンドとして提供することであるだろう。この場合、ブレンド中の種子のうち、あるものは、MON87411形質および列挙したコウチュウ抵抗性形質のみの何らかの組み合わせを含有し、地下でコーンルートワームの寄生を防止するように協同して作用する一方、ブレンド中の他の種子は鱗翅類抵抗性形質だけを含有し、地上でトウモロコシの鱗翅類寄生に対する抵抗性を付与する。このようにして、ブレンド中の種子は互いにとつてのリフュージ（refugee）になる。すなわち、コウチュウ防御種子および植物は鱗翅類抵抗性を付与する植物にとってのリフュージとして働き、逆もまた同じである。しかし典型的には、これらの形質は、次に述べるような何らかの形質の組み合わせまたはパッケージとして提供される。すなわち、MON87411形質は、圃場の作物に病害虫抵抗性の完全なパッケージが提供されるように、鱗翅類抵抗性形質の1つ以上との交配により、単一の植物中に一緒に提供される。そして、わずかな割合の種子（おそらく1～20パーセントまたはその間の任意の数字、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19パーセント）には、除草剤耐性だけが付与されていて、それらは病害虫防御形質を欠き、圃場には、病害虫抵抗性形質を付与された種子と共にランダムに混植されるか、区画化された（別個の）作物群落として植え付けられ、それらが、地上でトウモロコシ植物を攻撃する病害虫にとっても地下でトウモロコシ植物を攻撃する病害虫にとっても、リフュージとして働くことになるだろう。

【0023】

イベントMON87411に挿入されたコンストラクトにはEPSPS発現カセットに関連して特別な利点がある。第1に、このカセットの存在は、コンストラクトが挿入されているトランスジェニックイベントの選択を容易にする。第2に、このカセットは、イベントMON87411に対応する種子が植え付けられた圃場における雑草の防除を可能にする。そのようなMON87411植物が入っている圃場には、グリホサートに感受性である雑草の、圃場における生長を管理するために、有効量のグリホサートを散布すること

ができる。グリホサートに感受性でない雑草については、上述のように、他の除草剤に対する耐性、例えばジカンバに対する耐性またはグルホシネートに対する耐性などをもたらす他のトランスジェニックイベントを、イベントMON87411と共に単一の雑種に導入することで、除草剤グリホサート、ジカンバ、またはグルホシネートのうちの2つ以上を施用することによる圃場の雑草を防除するための有効な手段を提供することができる。というのも、これらの除草剤のうちの2つ以上に対して耐性を呈する雑草が存在する可能性は考えがたく、上述の場合、トウモロコシ作物は、上述のような除草剤の併用施用に対して抵抗性を呈する雑種からなるだろうからである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

10

【図1】トウモロコシイベントMON87411のゲノムにおけるトランスジェニックインサートの概略図：[A]は、トウモロコシLH244のゲノムに組み込まれたトランスジェニックDNAインサートと挿入DNAに隣接する5'および3'ゲノムDNAとの連続配列である配列番号1を表す；[B]および[C]は、それぞれイベントMON87411の5'および3'トランスジーン/ゲノムDNA接合部配列を形成する配列番号2および3の相対的位置に対応する；[D]は、ゲノムに組みこまれてイベントMON87411をもたらすトランスジェニックDNAインサートの配列である配列番号4を表す；[E]は、それぞれトランスジェニック挿入DNAの末端と隣接ゲノムDNAとの間の5'接合部をまたぐ配列番号5、配列番号6および配列番号7の相対的位置に対応する；[F]は、それぞれトランスジェニック挿入DNAの末端と隣接ゲノムDNAとの間の3'接合部をまたぐ配列番号8、配列番号9および配列番号10の相対的位置に対応する；[G]、[H]および[I]は、それぞれ、トウモロコシ植物ゲノムに挿入されてイベントMON87411をもたらすトランスジェニックDNAコンストラクトに対応する3つの異なる発現力セットを表す；[J]および[K]は、イベントMON87411の接合部に対応するオリゴヌクレオチドプライマー、オリゴヌクレオチドプローブ、およびDNAアンプリコンを表す。

20

【図2】ウェスタンコーンルートワーム(WCR)をターゲットとする2つの植物内保護物質(PIP)カセットおよび1つの除草剤耐性カセットを含む、最高3つの異なるカセットを発現するように工学的に操作された、11の異なるDNAコンストラクト(417、416、418、419、402、403、404、423、405、406、および890)の図解。2つのPIPカセットは、(a) Dv\_Snf7o\_240マー逆方向反復用の発現力セット、および(b) Cry3Bbタンパク質用の発現力セットを含む。図示したコンストラクトのそれぞれは、これらの発現力セットをさまざまな順序および配向で含む。コンストラクト405および406は除草剤耐性カセットを含有せず、コンストラクト890はDv\_Snf7o\_240マー逆方向反復用の単一発現力セットだけを含む。3つのコンストラクトは、左境界(LB)から右境界(RB)までに、全部で16の遺伝要素、すなわち[1]LB；[2]P\_s.RbcS2-E9\_3'UTR；[3]240マー-Dv\_Snf7o逆方向反復遺伝子；[4]トウモロコシDnaKイントロン；[5]CaMV\_35Sリーダー；[6]eCaMV\_35Sプロモーター；[7]トウモロコシPⅡIGプロモーター；[8]コムギLhcblリーダー；[9]イネAct1イントロン；[10]cry3Bb\_ORF；[11]コムギHsp17\_3'UTR；[12]イネTubA(プロモーター、リーダー、イントロン)；[13]CTP；[14]CP4\_EPSPS；[15]イネTubA\_3'UTR；および[16]RBを含む。

30

40

【図3】[A]～[N]および[a a]～[mm]は、作動的に連結された要素および隣接トウモロコシゲノム、ならびにそれらがトウモロコシイベントMON87411ゲノム中のトランスジェニックDNA挿入位置内に存在する時の、それらの互いの相対的な位置を図解している。以下の説明では、配列番号1に示す要素のそれぞれについて、組成、機能および位置を特定する。[A]配列番号1に示すヌクレオチド位置1～500は、トウモロコシイベントMON87411中でトランスジェニック挿入DNAに近接している

50

トウモロコシゲノムDNAに対応し、この例では、これを随意にトランスジェニック挿入DNAの5'端に割り当てている。[B]配列番号1に示すヌクレオチド位置807～1439は、*Pisum sativum*リプロースニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットE9 3'転写終結およびポリアデニル化シグナルの逆相補配列に対応する。[C]配列番号1に示すヌクレオチド位置1469～2098は、*Diabrotica*種の食物に入れて提供された場合に、*Snf7*タンパク質をコードする酵母遺伝子の*Diabrotica*種オルソログを抑制のターゲットとするように設計された、240ヌクレオチドのdsRNAと150ヌクレオチドのヘアピン構造に折りたたまれるRNA分子として発現するように設計された、逆相補配列に対応する。*Diabrotica snf7*オルソログ遺伝子の一部分に対応する第1の240ヌクレオチドセグメントは、配列番号1に示すヌクレオチド位置1469～1708に与えられ、第1セグメントの逆相補体に対応する第2の240ヌクレオチドセグメントは、配列番号1に示すヌクレオチド位置1850～2098に示されており、第1セグメントと第2セグメントは配列番号1に示すヌクレオチド位置1709～1858にある150ヌクレオチドのスペーサーによって作動的に連結されている。[D]配列番号1に示すヌクレオチド位置2135～2938は、*Zea mays dnaK*遺伝子に由来するイントロンの逆相補配列に対応する。[E]配列番号1に示すヌクレオチド位置2839～3298は、カリフラワーモザイクウイルス強化35Sプロモーター配列の逆相補体および非翻訳5'リーダー配列に対応する。このプロモーター、付隨の非翻訳リーダー、イントロン要素[D]ならびに転写終結およびポリアデニル化要素[B]は、トウモロコシ植物細胞における要素[C]の発現を調節する。[F]配列番号1に示すヌクレオチド位置3586～4534は、*Zea mays*の物理的障害誘導タンパク質(*physical impedance induced protein*)遺伝子(*Zm.PIG*)由来のプロモーター配列に対応する。このプロモーター、付隨の非翻訳リーダー[G]、イントロン要素[H]ならびに転写終結およびポリアデニル化要素[J]は、要素[I]の発現を調節する。このプロモーターは、プロモーター[E]に対して、各プロモーター([E]と[F])が各々の要素([C]および[I])の分岐発現を駆動するような配向にある(図2のプロック矢印を参照されたい;図2では、矢印が、表示した各プロモーターからの発現の方向に、それぞれのプロモーター([E]および[F])を表現している)。[G]配列番号1に示すヌクレオチド位置4541～4601は、*Triticum aestivum*集光複合体b1遺伝子(*Ta.Lhc b1*)由来の非翻訳5'リーダー配列に対応する。[H]配列番号1に示すヌクレオチド位置4618～5097は、*Oryza sativa*アクチン-1遺伝子(*Os.Act1*)由来のイントロン配列に対応する。[I]配列番号1に示すヌクレオチド位置5107～7068は、*Cry3Bb*コーンルートワーム毒性タンパク質(*cry3Bb*)をコードするヌクレオチド配列に対応する。コードされている*Cry3Bb*タンパク質は、*Diabrotica*(コーンルートワーム)種の食物に入れて提供された場合に殺虫性である。[J]配列番号1に示すヌクレオチド位置7088～7297は、*Triticum aestivum*熱ショックタンパク質17(HSP17)転写終結およびポリアデニル化シグナルの配列に対応する。[K]配列番号1に示すヌクレオチド位置7346～9526は、*Oryza sativa*チユーブリン-3遺伝子(*TubA-3*)由来の連続プロモーター-リーダー-イントロン配列に対応する。このプロモーターは、付隨のリーダーおよびイントロン、ならびに転写終結およびポリアデニル化要素[M]と共に、要素[L]の発現を調節する。[L]配列番号1に示すヌクレオチド位置9531～11126は、*Arabidopsis thaliana*細胞質ターゲティングペプチド(*cytoplasmic targeting peptide*)(CTP;ヌクレオチド位置9531～9758)の配列、および*Agrobacterium CP4*由来のEPSPSの配列(ヌクレオチド位置9759～11126)に対応する。この配列がトウモロコシ植物細胞中で転写され、タンパク質に翻訳されると、CTPがEPSPSに作動的に連結される。イベントMON87411を含むトウモロコシ植物細胞中で発現すると、このCTP-EPSPSは除草剤グ

リホサートに対する耐性を提供する。 [ M ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 111 34 ~ 11715 は、 Oryza sativa チューブリン - 3 遺伝子 (TubA-3) 転写終結およびポリアデニル化シグナルの配列に対応する。 [ N ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 11749 ~ 12248 は、トウモロコシイベントMON87411 中でトランスジェニック挿入DNAに近接しているトウモロコシゲノムDNAに対応し、この例では、これを随意にトランスジェニック挿入DNAの3' 端に割り当てている。

[ a a ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 501 ~ 806 は、 417 コンストラクトの Agrobacterium tumefaciens オクトピン左境界配列のうち、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサートの随意に割り当てられた 5' 端において、ゲノムに近接している部分に対応する。配列番号 1 に示す [ a a ] の 5' 端は要素 [ A ] の 3' 端に連結されて、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、および配列番号 21 に包含されるユニークな 5' トランスジェニック挿入DNA / トウモロコシゲノム接合部を形成する。要素 [ a a ] の 3' 端は要素 [ B ] の 5' 端に連結されて、配列番号 41 に包含されるトランスジェニック挿入DNA内のユニークな接合部を形成する。 [ b b ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 1440 ~ 1468 は、要素 [ B ] と [ C ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ b b ] の 5' 端は要素 [ B ] の 3' 端に連結され、要素 [ b b ] の 3' 端は要素 [ C ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 42 に包含されるユニークな接合部を形成する。

[ c c ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 2099 ~ 2134 は、要素 [ C ] と [ D ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ c c ] の 5' 端は要素 [ C ] の 3' 端に連結され、要素 [ c c ] の 3' 端は要素 [ D ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 43 に包含されるユニークな接合部を形成する。

[ e e ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 3299 ~ 3585 は、要素 [ E ] と [ F ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ e e ] の 5' 端は要素 [ E ] の 3' 端に連結され、要素 [ e e ] の 3' 端は要素 [ F ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 44 に包含されるユニークな接合部を形成する。

[ f f ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 4535 ~ 4540 は、要素 [ F ] と [ G ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ f f ] の 5' 端は要素 [ F ] の 3' 端に連結され、要素 [ f f ] の 3' 端は要素 [ G ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 45 に包含されるユニークな接合部を形成する。

[ g g ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 4602 ~ 4617 は、要素 [ G ] と [ H ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ g g ] の 5' 端は要素 [ G ] の 3' 端に連結され、要素 [ g g ] の 3' 端は要素 [ H ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 46 に包含される接合部を形成するが、この接合部はイベントMON87411 にユニークではない。

[ h h ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 5098 ~ 5106 は、要素 [ H ] と [ I ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ h h ] の 5' 端は要素 [ H ] の 3' 端に連結され、要素 [ h h ] の 3' 端は要素 [ I ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 47 に包含される接合部を形成するが、この接合部はイベントMON87411 にユニークではない。

[ i i ] 配列番号 1 に示すヌクレオチド位置 7069 ~ 7087 は、要素 [ I ] と [ J ] の間の介在配列に対応する。配列番号 1 に示す [ i i ] の 5' 端は要素 [ I ] の 3' 端に連結され、要素 [ i i ] の 3' 端は要素 [ J ] の 5' 端に連結されて、イベントMON87411 を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号 48 に包含される接合部を形成するが、この接合部は

10

20

30

40

50

イベントMON87411にユニークではない。 [ j j ] 配列番号1に示すヌクレオチド位置7298～7345は、要素[ J ]と[ K ]の間の介在配列に対応する。配列番号1に示す[ j j ]の5'端は要素[ J ]の3'端に連結され、要素[ j j ]の3'端は要素[ K ]の5'端に連結され、イベントMON87411を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号49に包含されるユニークな接合部を形成する。 [ k k ] 配列番号1に示すヌクレオチド位置9527～9530は、要素[ K ]と[ L ]の間の介在配列に対応する。配列番号1に示す[ k k ]の5'端は要素[ K ]の3'端に連結され、要素[ k k ]の3'端は要素[ L ]の5'端に連結されて、イベントMON87411を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号50に包含されるユニークな接合部を形成する。 [ l l ] 配列番号1に示すヌクレオチド位置11127～11133は、要素[ L ]と[ M ]の間の介在配列に対応する。配列番号1に示す[ l l ]の5'端は要素[ L ]の3'端に連結され、要素[ l l ]の3'端は要素[ M ]の5'端に連結されて、イベントMON87411を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサート内に、配列番号51に包含されるユニークな接合部を形成する。 [ mm ] 配列番号1に示すヌクレオチド位置11716～11748は、417コンストラクトのAgrobacterium tumefaciensノパリン右境界配列のうち、イベントMON87411を形成させるためにトウモロコシゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAインサートの随意に割り当てられた3'端において、ゲノムに近接している部分に対応する。配列番号1に示す[ mm ]の5'端は要素[ M ]の3'端に連結され、要素[ mm ]の3'端は要素[ N ]の5'端に連結されて、配列番号52に包含されるユニークなトランスジェニック挿入DNA／トウモロコシゲノム接合部を形成する。

【図4】コーンルートワーム毒性作用物質の発現を駆動する分岐プロモーターの効力が、コーンルートワーム毒性作用物質の発現を駆動するタンデム配向のプロモーターを持つベクターと比べて高いことを示すために試験したベクターの図解。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0025】

###### 配列の簡単な説明

配列番号1は、イベントMON87411のヌクレオチド配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411中の、挿入トランスジェニックDNAに隣接(近接)する5'ゲノムDNAのセグメント(500ヌクレオチド)、挿入トランスジェニックDNA(11,248ヌクレオチド)、および挿入トランスジェニックDNAに隣接(近接)する3'ゲノムDNAのセグメント(500ヌクレオチド)を表す。

配列番号2は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAに近接する5'ゲノムDNAのセグメント(500ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAの境界残余部(263ヌクレオチド)とを表す。

配列番号3は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAの境界残余部(15ヌクレオチド)と挿入ゲノムDNAに近接する3'ゲノムDNAのセグメント(500ヌクレオチド)とを表す。

配列番号4は、イベントMON87411のヌクレオチド配列であり、イベントMON87411の挿入ゲノムDNA(11248ヌクレオチド)を表す。

配列番号5は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAに近接する5'ゲノムDNAのセグメント(50ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAの境界残余部(263ヌクレオチド)とを表す。

##### 【0026】

配列番号6は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から

3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAに近接する5'ゲノムDNAのセグメント(110ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAの境界残余部(263ヌクレオチド)とを表す。

配列番号7は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAに近接する5'ゲノムDNAのセグメント(145ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAの境界残余部(263ヌクレオチド)とを表す。

配列番号8は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAのセグメント(83ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAに近接する3'ゲノムDNAのセグメント(34ヌクレオチド)とを表す。 10

配列番号9は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAのセグメント(83ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAに近接する3'ゲノムDNAのセグメント(90ヌクレオチド)とを表す。

配列番号10は、イベントMON87411のヌクレオチド接合部配列であり、5'から3'に向かって、イベントMON87411の挿入トランスジェニックDNAのセグメント(83ヌクレオチド)と挿入トランスジェニックDNAに近接する3'ゲノムDNAのセグメント(255ヌクレオチド)とを表す。

#### 【0027】

20

配列番号11は、酵母Snf7にオルソロガスなESCRT-III複合体サブユニットをコードするDiabroticavirgiferavirgifera(ウエスタンコーンルートワーム)由来のcDNA配列のヌクレオチド配列である。

配列番号12は、逆方向反復RNA分子を発現するように工学的に操作された組換え遺伝子を含むDNA発現力セットのアンチセンス鎖を表すヌクレオチド配列である。逆方向反復DNAセグメントは位置663~902と位置1292~1053に対応する。これらの逆方向反復DNA配列は配列番号11のヌクレオチド位置151~390のヌクレオチド配列に対応する。

配列番号13は、配列番号12に示すDNAから転写されるリボヌクレオチド配列である。 30

配列番号14は、コーンルートワーム毒性Cry3Bbタンパク質をコードし発現するように工学的に操作された組換え遺伝子を含むDNA発現力セットのセンス鎖を表すヌクレオチド配列である。

配列番号15は、配列番号14の位置1522~3480に対応するポリヌクレオチドのアミノ酸配列翻訳であって、コーンルートワーム毒性Cry3Bbタンパク質を表す。

#### 【0028】

配列番号16は、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ(EPSPS)タンパク質をコードし発現するように工学的に操作された組換え遺伝子を含むDNA発現力セットのセンス鎖を表すヌクレオチド配列である。

配列番号17は、配列番号16の位置2186~3781に対応するポリヌクレオチドのアミノ酸配列翻訳であって、除草剤グリホサートに対して非感受性を呈するEPSPSタンパク質を表す。 40

配列番号18は、SQ27011と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号1の位置462~490に対応するヌクレオチド配列と同一である。

配列番号19は、PB3552と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号1の位置502~515に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。PB3552は、一対の熱増幅プライマー、例えばSQ27011およびSQ9085と組み合わせて使用するために、6-カルボキシフルオレセイン成分(6-FAM(商標))で5'標識し、クエンチャー成分で3'標識することができ、トウモロコシイベントMON87411DNAを含有する生物学的試料中のイベントMON87411 50

D N A の存在を検出するために、T A Q M A N (登録商標) D N A 増幅方法で使用することができる。

配列番号 2 0 は、S Q 9 0 8 5 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 5 1 6 ~ 5 4 1 に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。

#### 【 0 0 2 9 】

配列番号 2 1 は、イベントM O N 8 7 4 1 1 のヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 4 6 2 ~ 5 4 1 に対応する。この配列を呈するアンプリコンは、一対の熱増幅プライマー、例えば S Q 2 7 0 1 1 および S Q 9 0 8 5 を使って作製することができる。

配列番号 2 2 は、S Q 2 7 0 6 6 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 1 1 7 1 0 ~ 1 1 7 2 8 に対応するヌクレオチド配列と同一である。

配列番号 2 3 は、P B 1 1 3 0 0 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 1 1 7 3 1 ~ 1 1 7 5 5 に対応するヌクレオチド配列と同一である。P B 1 1 3 0 0 は、6 - カルボキシフルオレセイン成分 (6 - F A M (商標)) で 5' 標識し、クエンチャー成分で 3' 標識することができる。こうして標識された P B 1 1 3 0 0 は、T A Q M A N (登録商標) アッセイでイベントM O N 8 7 4 1 1 を検出するために、一対の P C R プライマー、例えば S Q 2 7 0 6 6 および S Q 2 6 9 7 7 と組み合わせて使用することができる。

配列番号 2 4 は、S Q 2 6 9 7 7 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 1 1 7 5 6 ~ 1 1 7 8 4 に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。

配列番号 2 5 は、イベントM O N 8 7 4 1 1 のヌクレオチド配列であり、配列番号 1 の位置 1 1 7 1 0 ~ 1 1 7 8 4 に対応する。この配列を呈するアンプリコンは、一対のプライマー、例えば S Q 2 7 0 6 6 および S Q 2 6 9 7 7 で増幅することができ、イベントM O N 8 7 4 1 1 に特徴的である。

#### 【 0 0 3 0 】

配列番号 2 6 は、D N A コンストラクト # 4 1 7 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 2 7 は、D N A コンストラクト # 4 1 6 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 2 8 は、D N A コンストラクト # 4 1 8 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 2 9 は、D N A コンストラクト # 4 1 9 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 0 は、D N A コンストラクト # 4 0 2 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 1 は、D N A コンストラクト # 4 0 3 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 2 は、D N A コンストラクト # 4 0 4 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 3 は、D N A コンストラクト # 4 2 3 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 4 は、D N A コンストラクト # 4 0 5 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 5 は、D N A コンストラクト # 4 0 6 を表すヌクレオチド配列である。

#### 【 0 0 3 1 】

配列番号 3 6 は、D N A コンストラクト # 8 9 0 を表すヌクレオチド配列である。

配列番号 3 7 は、イベントM O N 8 7 4 1 1 の野生型アレルを表す L H 2 4 4 トウモロコシ植物のヌクレオチド配列である。このヌクレオチド配列を呈するアンプリコンは一対の P C R プライマー、例えば S Q 2 7 0 1 1 および S Q 2 6 9 7 7 で作製することができ、イベントM O N 8 7 4 1 1 の野生型アレルに特徴的である。

配列番号 3 8 は、S Q 2 0 2 2 1 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

配列番号 3 9 は、P B 1 0 0 6 5 と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。P B 1 0 0 6 5 は、V I C (商標) で 5' 標識し、クエンチャー成分で 3' 標識することができる。こうして標識された P B 1 0 0 6 5 は、T A Q M A N (登録商標) アッセイでトウモロコシの内在性遺伝子のセグメントの存在を検出するために、一対の P C R プライマー、例えば S Q 1 0 0 6 5 および S Q 2 0 2 2 2 と組み合わせて使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。

配列番号40は、SQ20222と呼ばれる合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

配列番号41～52は、配列番号1の領域のヌクレオチド配列であり、各配列番号は、図3に関する簡単な説明で詳述した介在配列と発現力セット要素とによって形成される接合部を包含する。

### 【0032】

#### 詳細な説明

本発明者らは、既存のトランスジェニックトウモロコシ植物と比べて優れた性質および成績を呈するトランスジェニックトウモロコシイベントMON87411を同定した。10 トウモロコシイベントMON87411は、作動的に連結された3つの発現力セットを含有し、これらのカセットは全体として、トランスジェニックイベントMON87411を含有するトウモロコシ細胞、トウモロコシ組織、トウモロコシ種子およびトウモロコシ植物に、コーンルートワーム抵抗性およびグリホサート除草剤耐性の形質を付与する。トウモロコシイベントMON87411は、コーンルートワーム病害虫種(*Diabrotica virgifera virgifera* (ウエスタンコーンルートワーム、WCR)、*Diabrotica barberi* (ノーザンコーンルートワーム、NCR)、*Diabrotica virgifera zeae* (メキシカンコーンルートワーム、MCR)、*Diabrotica balteata* (ブラジリアンコーンルートワーム(BZR)もしくは*Diabrotica viridula*と*Diabrotica speciosa*とからなるブラジリアンコーンルートワーム複合体(BCR)、または*Diabrotica undecimpunctata howardi* (サザンコーンルートワーム、SCR)である場合)に対して、2つの作用機序を提供する。当技術分野では、他に、一つずつ付与されるさまざまな実施形態を与えるトランスジェニックトウモロコシイベント、例えばMON863(Cry3Bb殺虫性毒素タンパク質の発現によってコーンルートワームに対する抵抗性の形質を付与するもの)、またはトウモロコシイベントMON88017(Cry3Bb殺虫性毒素タンパク質の発現によるコーンルートワームに対する抵抗性の形質とグリホサート非感受性EPSPSの発現によるグリホサート除草剤に対する抵抗性の形質とを付与するもの)やトウモロコシイベントDAS59122-7(Cry34/Cry35とも呼ばれる二元*Bacillus thuringiensis*毒素PS149B1の発現によるコーンルートワームに対する抵抗性の形質と除草剤グルホシネットに対する耐性の形質とを付与するもの)の場合のように、2つ以上の形質を与えるトランスジェニックトウモロコシイベントも言及されている。他に、トウモロコシイベントMON88017またはDAS59122-7によって付与される形質を、ルートワームの生存にとって不可欠なコーンルートワーム遺伝子を抑制のターゲットとするdsRNAの発現によってもたらされるコーンルートワーム抵抗性の形質を付与するトランスジェニックトウモロコシイベント(US7,943,819)と交配することによる組み合わせも開示されている。そのような組み合わせには、トウモロコシゲノム内の複数の異なる座位および複数の染色体上に位置するこれら複数の形質を、まとめて单一のトウモロコシ植物に導入し、これらの形質を、何百とはいわないまでも何十という異なるトウモロコシ生殖質品種に、雑種として維持することの必要に関連する課題がつきまとう。そのような課題の解決策は、これらの形質の組み合わせを、まとめて单一の座位に含めることであるだろう。本発明者らは、ここに、この課題に対するそのような解決策の一つを、共有結合で連結された3つの発現力セットをトウモロコシゲノム内の单一の座位に併せもつトウモロコシイベントMON87411の形態で提供するものであり、これらの発現力セットは、トランスジェニックイベントMON87411を含有するトウモロコシ細胞、トウモロコシ組織、トウモロコシ種子およびトウモロコシ植物に、コーンルートワーム抵抗性およびグリホサート除草剤耐性の形質を付与する。トウモロコシイベントMON87411の使用により、トウモロコシ栽培者は、a)2つの異なるコーンルートワーム抵抗性作用機序を用意す4050

ることによる、コーンルートワーム幼虫に起因する経済的損失からの保護、およびb)広スペクトル雑草防除のためにトウモロコシ作物にグリホサート含有農業用除草剤を施用することができるここという、大きな利益を得る。加えて、コーンルートワーム耐性形質とグリホサート耐性形質をコードするトランスジーンは同じDNAセグメント上で連結されており、MON87411のゲノム中の単一座位に見いだされるので、それが育種効率の強化をもたらし、また育種個体群およびその後代においてトランスジーンインサートを追跡するために分子マーカーを使用することを可能にする。

#### 【0033】

トウモロコシイベントMON87411は、プラスミドコンストラクトpMON120417による近交系トウモロコシ系統のAgrobacterium媒介形質転換プロセスによって作製された。このプラスミドコンストラクトは、連結された植物発現カセットを、CP4-EPSPSタンパク質、ならびにCry3Bbタンパク質、およびトウモロコシイベントMON87411を含有するトウモロコシ細胞がコーンルートワームの食物に入れて提供された時にコーンルートワームの細胞において必須遺伝子を抑制のターゲットとするdsRNAのトウモロコシ植物細胞における発現に必要な調節遺伝要素と共に含有する。トウモロコシ細胞を完全なトウモロコシ植物に再生させ、植物の個体群から、植物発現カセットの完全性ならびにグリホサートおよびコーンルートワーム幼虫食害に対する抵抗性を示す個々の植物を選択した。トウモロコシイベントMON87411中に存在する連結された植物発現カセットをそのゲノムに含有するトウモロコシ植物は、本発明の一態様である。

#### 【0034】

トウモロコシイベントMON87411のゲノムに挿入されたプラスミドDNAを詳細な分子解析によって特徴づけた。これらの解析には、インサート数（トウモロコシゲノム内の組み込み部位の数）、コピー数（1つの座位内のT-DNAのコピー数）、およびトランスジェニック挿入DNAの完全性が含まれた。トウモロコシゲノムに挿入されてイベントMON87411を生じさせる連結された3つの発現カセットを含有するプラスミドコンストラクトは、トウモロコシゲノムにも、トウモロコシの他のベクターもしくはトランスジェニックイベントにも、それ以外にも、自然に出現することは知られていない複数のセグメント（いくつかの発現カセットを製作または構築するために使用された要素間の接合部配列）を含有する（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10；配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52に示す配列）。加えて、イベントMON87411中の挿入トランスジェニックDNAを生じさせる形質転換イベントは、ここに、トウモロコシゲノム中の単一座位への挿入であって、挿入DNAとトウモロコシゲノムDNAとの間に、イベントMON87411を含むトウモロコシゲノムだけにユニークたりうる十分な長さを有する、2つの新しい座位または接合部配列（追加の接合部配列）をもたらすものであると特徴づけられる。これらの接合部配列は、トウモロコシ細胞、組織、種子および植物または植物製品（コモディティー製品）におけるイベントMON87411-DNAの存在を検出するのに役立つ。イベントMON87411-DNAを含有するトウモロコシ細胞、種子、植物部分または植物組織を含有すると疑われる生物学的試料中のこれらさまざまな接合部セグメントの存在を同定するために開発されたDNA分子プローブおよびプライマー対を、本明細書に記載する。データは、イベントMON87411が単一のT-DNA挿入を持ち、挿入されたトランスジェニックDNAが1コピーであることを示している。トウモロコシゲノムへの植物形質転換プラスミドからのトランスジェニックDNA導入に使用されたAgrobacteriumtumefaciens左および右境界領域の一部分以外の形質転換ベクターpMON120714からの追加要素は、イベントMON87411中に同定されていない。最後に、試料中の上記イベントMON87411-DNAの存在に特徴的である特異的アンプリコンを作製する熱増幅と

10

20

30

40

50

D N A 配列解析とを行って、隨意に割り当てられた 5' および 3' インサート - 植物ゲノム接合部を決定し、インサート内の要素の構成を確認し、トウモロコシ植物イベント M O N 8 7 4 1 1 中の挿入トランスジーン D N A の全 D N A 配列（配列番号 1）を決定した。

#### 【 0 0 3 5 】

トランスジェニックイベント M O N 8 7 4 1 1 の作製に使用したコンストラクトを使って數十のトランスジェニックイベントを作製した。また、異なるコンストラクトを作製し、それらを使って、何十という他のトランスジェニックトウモロコシイベントを作製し、それらを M O N 8 7 4 1 1 および類似のイベントと比べた。これらのイベントを全て、トランスジェニックトウモロコシ植物イベント組織をコーンルートワーム幼虫の食物に入れて提供する食物バイオアッセイにおいて、コーンルートワームの防除に関する効力について試験した。さまざまなイベントにコーンルートワーム抵抗性形質を付与する原因となる 10 2 つの異なる発現カセットの発現の配向は、これらの抵抗性形質を発現するトウモロコシイベント細胞をコーンルートワーム幼虫の食物に入れて提供した時にコーンルートワーム防除をもたらすイベントの効力にとって、決定的に重要であることが決定された。2つの異なるプロモーター C A M V e 3 5 S および Z m . P I I G は、e 3 5 S プロモーターから d s R N A コーンルートワーム保護物質を発現し、e 3 5 S プロモーターに近接しつつ同プロモーターから分岐している Z m . P I I G プロモーターから C r y 3 B b コーンルートワーム毒性タンパク質を発現する発現カセットを含有するトウモロコシイベントの、驚くべき優れた効力をもたらすことが観察された。これらのプロモーターがこの特定の配向にあると、効力を呈するトランスジェニックイベントの割合が著しく改善された。 20

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書に別段の注記がある場合を除き、用語は、関連技術分野における通常の技能を有する者による従来の用法に従って理解されるものとする。分子生物学における一般的用語の定義は、R i e g e r ら「G l o s s a r y o f G e n e t i c s : C l a s s i c a l a n d M o l e c u l a r」第5版 (S p r i n g e r - V e r l a g : ニューヨーク、1991) および L e w i n 「G e n e s V」(O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s : ニューヨーク、1994) に見いだすことができる。本明細書において使用する用語「トウモロコシ」は Z e a m a y s を意味し、M O N 8 7 4 1 1 を含むトウモロコシ植物と交配することができる全ての植物品種を包含する。本明細書において使用する用語「を含む (c o m p r i s i n g ) 」は「を含むが、それらに限 30 定されるわけではない (i n c l u d i n g b u t n o t l i m i t e d t o ) 」を意味する。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明は、少なくとも3つの発現カセット、すなわち、酵母 s n f 7 遺伝子にオルソロガスなコーンルートワーム必須遺伝子を抑制するように設計されたコーンルートワーム毒性量の d s R N A を発現する第1発現カセット、コーンルートワーム毒性量の C r y 3 B b - エンドトキシンを発現する第2発現カセット、およびグリホサート阻害に対して非感受性であるグリホサート耐性酵素 C P 4 E P S S P S を発現する第3発現カセットを含有する D N A コンストラクトで形質転換された、トランスジェニック植物を提供する。本明細書において開示する方法に従って、本明細書に開示する D N A コンストラクトで形質転換されたトウモロコシ植物は、C R W に対して抵抗性であり、グリホサート除草剤の施用に対して耐性である。連結された農業形質は、育種個体群内にこれらの形質をまとめて維持することを容易にし、単一のコーンルートワーム阻害遺伝子だけを含有する植物または育種素材として組み合わされた同じコーンルートワーム阻害遺伝子 (C r y 3 B b および d s R N A ) を含有する植物よりも高いコーンルートワーム効力を呈する。 40

#### 【 0 0 3 8 】

トランスジェニック「植物」は、異種 D N A 、すなわち目的のトランスジーンを含むポリ核酸コンストラクトによる植物細胞の形質転換、植物細胞のゲノムへのトランスジーンの挿入によって得られる植物の個体群の再生、および特定ゲノム位置への挿入を特徴とする特定植物の選択によって作製される。「イベント」という用語は、異種 D N A を含む最 50

初の形質転換体植物およびその形質転換体の後代を指す。「イベント」という用語は、イベントと別の植物との間の有性異系交雑によって作製される、異種DNAを含む後代も包含する。反復親への反復戻し交雫後でも、形質転換親イベントからの挿入DNAおよび隣接ゲノムDNAは、交雫の後代において、同じ染色体位置に存在する。「イベント」という用語は、挿入DNAと挿入DNAにじかに近接する隣接ゲノム配列とを含む最初の形質転換体からのDNAであって、挿入DNAを含む一方の親系統（例えば最初の形質転換体および自殖によって得られる後代）と挿入DNAを含有しない親系統との有性交雫の結果として目的のトランスジーンを含む挿入DNAを受け取る後代に導入されると予想されるものも指す。本発明は、MON87411を含むトランスジェニックイベントトウモロコシ植物、その後代、およびそこに含まれるDNA組成物に関する。

10

## 【0039】

「プローブ」は、従来の検出可能ラベルまたはレポーター分子、例えば放射性同位体、リガンド、化学発光剤、または酵素が取り付けられている単離された核酸である。そのようなプローブはターゲット核酸の鎖に、本発明の場合であればMON87411からのゲノムDNAの鎖に、それがMON87411植物からであるか、MON87411 DNAを含む試料からであるかを問わず、相補的である。本発明のプローブには、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、ターゲットDNA配列に特異的に結合し、そのターゲットDNA配列の存在を検出するために使用することができる、ポリアミドおよび他のプローブ材料も含まれる。

## 【0040】

20

DNAプライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的ターゲットDNA鎖にアニールすることでプライマーとターゲットDNA鎖とのハイブリッドを形成し、次にポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼによって、ターゲットDNA鎖に沿って伸長される、単離されたポリ核酸である。本発明のDNAプライマー対またはDNAプライマーセットは、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または他の従来のポリ核酸増幅方法によるターゲット核酸配列の増幅に役立つ2つのDNAプライマーを指す。

## 【0041】

DNAプローブおよびDNAプライマーは、一般的には、長さが11ポリヌクレオチド以上、多くの場合、18ポリヌクレオチド以上、24ポリヌクレオチド以上、または30ポリヌクレオチド以上である。そのようなプローブおよびプライマーは、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下でターゲット配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さであるように選択される。本発明のプローブおよびプライマーは、好ましくは、ターゲット配列との完全な配列類似性を有するが、ターゲット配列とは異なるプローブであって、ターゲット配列にハイブリダイズする能力を保っているものを、従来の方法で設計することもできる。

30

## 【0042】

本明細書に開示する隣接ゲノム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、従来の方法、例えば当該DNA分子の再クローニングおよび配列決定などによって、開示されたDNA配列を確認（そして必要であれば修正）するために使用することができる。

40

## 【0043】

本発明の核酸プローブおよびプライマーはストリンジエントな条件下でターゲットDNA分子にハイブリダイズする。試料中のトランスジェニック植物からのDNAの存在を同定するには、従来の任意の核酸ハイブリダイゼーション法または増幅方法を使用することができる。ポリ核酸分子（核酸セグメントともいう）またはそのフラグメントは、一定の状況下で他の核酸分子に特異的にハイブリダイズする能力を有する。本明細書では、2つのポリ核酸分子が逆平行二本鎖核酸構造を形成する能力を有するのであれば、それら2つの分子は互いに特異的にハイブリダイズする能力を有するという。ある核酸分子がもう一つの核酸分子の「相補体（complement）」であるといわれるのは、それらが完全な相補性を呈する場合である。本明細書では、一方の分子の全てのヌクレオチドが他方

50

の分子のヌクレオチドに相補的である場合に、それらの分子は「完全な相補性」を呈するという。2つの分子が、少なくとも従来の「低ストリンジエンシー」条件下で互いにアニールした状態を保つことができるほど十分な安定性で互いにハイブリダイズすることができる場合、それら2つの分子は「最低限に相補的」であるという。また、従来の「高ストリンジエンシー」条件下で互いにアニールした状態を保つことができるほど十分な安定性で互いにハイブリダイズすることができる場合、それらの分子は「相補的」であるという。従来のストリンジエンシー条件は、Sambrookら(1989)およびHaymesら「Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach」(IRL Press、ワシントンDC(1985))に記載されている。したがって完全な相補性からの逸脱は、その逸脱が二本鎖構造を形成する分子の能力を完全に妨げるものでない限り、許容される。ある核酸分子がプライマーまたはプローブとして役立つには、使用する特定溶媒および特定塩濃度において安定な二本鎖構造を形成することができるよう、配列が十分に相補的でありさえすればよい。

#### 【0044】

本明細書にいう実質的に相同な配列とは、比較しようとしている核酸配列の相補体に高ストリンジエンシー条件下で特異的にハイブリダイズするであろう核酸配列である。例えば約45の $6.0 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)の後、50の $2.0 \times$ SSCで洗浄などといった、DNAハイブリダイゼーションを促進する適当なストリンジエンシー条件は当業者に知られているか、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons、ニューヨーク(1989))の6.3.1-6.3.6に見いだすことができる。例えば洗浄ステップにおける塩濃度は、50で約 $2.0 \times$ SSCの低ストリンジエンシーから、50で約 $0.2 \times$ SSCの高ストリンジエンシーまで選択することができる。加えて、洗浄ステップにおける温度を、室温(約22)の低ストリンジエンシー条件から、約65の高ストリンジエンシー条件まで増加させることができる。温度と塩の両方を変動させるか、または温度もしくは塩濃度のどちらか一方を一定に保った上で、他方の変数を変化させることができる。好ましい一実施形態では、本発明のポリ核酸が、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、21、25、41、42、43、44、45、49、50、51、または52に示す核酸分子もしくはその相補体またはどちらかのフラグメントの1つ以上に、中等度にストリンジエントな条件下で、例えば約 $2.0 \times$ SSCおよび約65で、特異的にハイブリダイズするであろう。特に好ましい実施形態では、本発明の核酸が、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、21、25、41、42、43、44、45、49、50、51、または52に示す核酸分子もしくはその相補体またはどちらかのフラグメントの1つ以上に、高ストリンジエンシー条件下で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、好ましい本発明のマーカー核酸分子が、配列番号1、または配列番号2、または配列番号3、または配列番号4、または配列番号5、または配列番号6、または配列番号7、または配列番号8、または配列番号9、または配列番号10；または配列番号12、または配列番号14、または配列番号16、または配列番号21、または配列番号25、または配列番号41、または配列番号42、または配列番号43、または配列番号44、または配列番号45、または配列番号49、または配列番号50、または配列番号51、または配列番号52に示す核酸配列もしくはその相補体またはどちらかのフラグメントを有する。ターゲットDNA分子へのプローブのハイブリダイゼーションは、当業者に知られているいくつもの方法で検出することができ、例えば限定するわけではないが、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挙げることができる。

#### 【0045】

特定增幅プライマー対を使った(例えばPCRによる)ターゲット核酸配列の增幅に関して、「ストリンジエントな条件」とは、DNA熱增幅反応において、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、好ましくはユニークな增幅産物、アンプリコンを作製するターゲット核酸配列だけに、プライマー対がハイブリダイズす

10

20

30

40

50

ることを許す条件である。

【0046】

「(ターゲット配列)に特異的」という用語は、プローブまたはプライマーが、ストリングエントなハイブリダイゼーション条件下で、ターゲット配列を含む試料中のターゲット配列だけにハイブリダイズすることを示す。

【0047】

本明細書にいう「増幅されたDNA」または「アンプリコン」とは、ポリ核酸テンプレートの一部であるターゲットポリ核酸分子に向けられたポリ核酸増幅方法の産物を指す。例えば、有性交雑の結果生じたトウモロコシ植物が、本発明のMON87411を含むトウモロコシ植物からのトランスジェニック植物ゲノムDNAを含有するかどうかを決定するには、MON87411植物DNAの存在に特徴的であるアンプリコンを作製するために、トウモロコシ植物組織試料から抽出されたDNAを、MON87411を含む植物のゲノム中の挿入異種DNA(トランスジーンDNA)の挿入部位に近接するDNA配列に由来するプライマーと、挿入異種DNAに由来する第2のプライマーとを含むプライマー対を使ったポリ核酸増幅方法に付すことができる。特徴的アンプリコンは、植物ゲノムDNAに特徴的でもある長さとDNA配列を有する。アンプリコンの長さは、プライマー対の長さを合わせたもの+1ヌクレオチド塩基対から、好ましくは+約50ヌクレオチド塩基対、より好ましくは+約250ヌクレオチド塩基対、さらに好ましくは+約450ヌクレオチド塩基対またはそれ以上に及びうる。あるいは、プライマー対は、インサートポリヌクレオチド配列全体を含むアンプリコンが作製されるように、挿入異種DNAの両側にあるゲノム配列に由来することもできる(例えば配列番号1のゲノム部分から単離されたフォワードプライマーと、イベントMON87411ゲノム中の本明細書に特定する接合部配列を含むDNA分子を増幅する配列番号1のゲノム部分から単離されたリバースプライマー)。挿入トランスジェニックDNAに近接する植物ゲノム配列に由来するプライマー対のメンバーは、挿入DNA配列から、ある距離に位置し、この距離は1ヌクレオチド塩基対から約2000ヌクレオチド塩基対までに及ぶことができる。「アンプリコン」という用語を使用する場合、DNA熱増幅反応中に形成されうるプライマーニ量体は、特に除外される。

【0048】

ポリ核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む当技術分野において知られるさまざまなポリ核酸増幅方法のいずれかによって達成することができる。増幅方法は当技術分野では知られており、とりわけ、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号ならびに「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」(Innisら編、Academic Press、サンディエゴ、1990)に記載されている。22kb(キロベース)までのゲノムDNAおよび42kbまでのバクテリオファージDNAを増幅するためのPCR増幅方法が開発されている(Chengら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994)。本発明を実施する際には、これらのDNA増幅方法および当技術分野で知られている他のDNA増幅方法を使用することができる。イベントMON87411からの異種DNAインサートの配列または隣接ゲノムDNA配列は、ATCCに寄託された、受託番号がPTA-12669である、イベントMON87411を含む種子、またはその種子から生長させた植物から、当該DNA分子を、ここに提供する配列に由来するプライマーを使って増幅した後、PCRアンプリコンまたはそのクローン化DNAフラグメントの標準的なDNA配列決定によって、検証(そして必要であれば修正)することができる。

【0049】

DNA増幅方法に基づくDNA検出キットには、ターゲットDNAに特異的にハイブリダイズして、適当な反応条件下で特徴的アンプリコンを増幅する、DNAプライマー分子が含まれる。本キットは、アガロースゲルベースの検出方法、または当技術分野で知られているいくつもの特徴的アンプリコン検出方法を提供しうる。配列番号1に示すトウモロ

10

20

30

40

50

コシゲノム領域の任意の部分および配列番号1に示す挿入トランスジェニックDNAの任意の部分に相同または相補的なDNAプライマーを含むキットは、本発明の一目的である。DNA増幅の技術分野の当業者であれば、開示されたMON87411のトランスジーン/ゲノムDNA配列(配列番号1)から、DNAプライマーとして役立つDNA分子を選択することができる。

#### 【0050】

これらの方針によって作製された特徴的アンプリコンは、多数の技法によって検出することができる。そのような技法の一つが遺伝子ビット解析(Genetic Bit Analysis)(Nikiforovら, Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994)であり、ここでは、近接する隣接ゲノムDNA配列と挿入DNA配列の両方とオーバーラップするDNAオリゴヌクレオチドが設計される。オリゴヌクレオチドはマイクロタイタープレートのウェルに固定化される。(挿入配列中の1プライマーと、近接する隣接ゲノム配列中の1プライマーとを用いる)関心領域のPCR後に、一本鎖PCR産物を固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ、それを、DNAポリメラーゼと、予想される次の塩基に特異的な標識ジデオキシヌクレオチド三リン酸(ddNTP)とを使った1塩基伸長反応のテンプレートとして、役立たせることができる。読出しは、蛍光に基づくか、ELISAに基づくことができる。シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーション、および1塩基伸長の成功により、トランスジーン/ゲノム配列の存在を示す。

#### 【0051】

もう一つの方法は、Wingeによって記載されたパイロシーケンシング技法である(Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000)。この方法では、近接ゲノムDNAおよびインサートDNA接合部とオーバーラップするオリゴヌクレオチドが設計される。オリゴヌクレオチドを関心領域からの一本鎖PCR産物(挿入配列中の1プライマーと、隣接ゲノム配列中の1プライマー)にハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼ、ATP、スルフリラーゼ、ルシフェラーゼ、アピラーゼ、アデノシン5'ホスホ硫酸およびルシフェリンの存在下でインキュベートする。dNTPが個別に加えられ、組込みがもたらす光シグナルが測定される。光シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーション、および1塩基または多塩基伸長の成功により、トランスジーン/ゲノム配列の存在を示す。

#### 【0052】

Chenらが記載する蛍光偏光(Genome Res. 9:492-498, 1999)は、本発明のアンプリコンを検出するために使用することができる一方法である。この方法では、ゲノム隣接および挿入DNA接合部とオーバーラップするオリゴヌクレオチドが設計される。オリゴヌクレオチドを関心領域からの一本鎖PCR産物(挿入DNA中の1プライマーと、隣接ゲノムDNA配列中の1プライマー)にハイブリダイズさせ、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する。1塩基伸長がddNTPの組込みをもたらす。組込みは、蛍光計を使用して偏光の変化として測定することができる。偏光の変化は、増幅、ハイブリダイゼーション、および1塩基伸長の成功により、トランスジーン/ゲノム配列の存在を示す。

#### 【0053】

Taqman(登録商標)(PE Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティ)は、製造者が提供する説明書では、DNA配列の存在を検出し定量する方法と記載され、よく理解されている。簡単に述べると、ゲノム隣接およびインサートDNA接合部とオーバーラップするFRETオリゴヌクレオチドプローブが設計される。FRETプローブおよびPCRプライマー(インサートDNA配列中の1プライマーと、隣接ゲノム配列中の1プライマー)を耐熱性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下でサイクルさせる。FRETプローブのハイブリダイゼーションは、FRETプローブ上の消光成分からの蛍光成分の切断と放出をもたらす。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り、トランスジーン/ゲノム配列の存在を示す。

10

20

30

40

50

**【 0 0 5 4 】**

Tyangiら(Nature Biotech. 14:303-308, 1996)に記載されているように、配列検出用の分子ビーコンが記述されている。簡単に述べると、隣接ゲノムおよびインサートDNA接合部とオーバーラップするFRETオリゴヌクレオチドプローブが設計される。FRETプローブのユニークな構造により、プローブは、蛍光成分と消光成分とを極めて接近した状態に保つ二次構造を含むことになる。FRETプローブとPCRプライマー(インサートDNA配列中の1プライマーと、隣接ゲノム配列中の1プライマー)を耐熱性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下でサイクルさせる。PCR增幅の成功に続いて、ターゲット配列へのFRETプローブのハイブリダイゼーションが、プローブ二次構造の解除および蛍光成分と消光成分との空間的分離をもたらす。その結果、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り、隣接/トランスジーンインサート配列の存在を示す。  
10

**【 0 0 5 5 】**

本明細書に開示する組成物とDNA検出の技術分野において周知の方法とを使って、DNA検出キットを開発することができる。キットは試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAの同定に役立ち、MON87411 DNAを含有するトウモロコシ植物を育種するための方法に応用することができる。キットには、プライマーまたはプローブとして役立ち、かつ本明細書に記載の配列番号1の少なくとも適用可能部分に相同または相補的な、DNA分子が含まれる。これらのDNA分子はDNA増幅方法(PCR)で使用するか、ポリ核酸ハイブリダイゼーション法、すなわちサザン解析、ノーザン解析においてプローブとして使用することができる。  
20

**【 0 0 5 6 】**

接合部配列は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10；配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52からなる群からの配列によって表すことができる。例えば接合部配列は、随意に、配列番号5および配列番号8として提供されるヌクレオチド配列によって表すことができる。あるいは接合部配列は、随意に、配列番号6および配列番号9として提供されるヌクレオチド配列によって表すこともできる。あるいは接合部配列は、随意に、配列番号7および配列番号10として提供されるヌクレオチド配列によって表すこともできる。これらのヌクレオチドはホスホジエステル結合によってつながれ、トウモロコシイベントMON87411中では、組換え植物細胞ゲノムの一部として存在する。トウモロコシ植物、種子、または植物部分に由来する試料における配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号2、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、または配列番号52の1つ以上の同定は、そのDNAがトウモロコシイベントMON87411から得られたことを決定づけ、トウモロコシイベントMON87411からのDNAを含有する試料における存在に特徴的である。したがって本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、または配列番号52として提供されるヌクレオチド配列の少なくとも1つを含有するDNA分子を提供する。配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、または配列番号52として提供されるヌクレオチド配列の少なくとも1つを含むのに十分なトランスジェニックトウモロコシイベントMON87411に由来するDNAの任意のセグメントは、本発明の範囲内である。加えて、この段落内に記載した配列のいずれかに相補的な配列を含む任意のポリヌクレオチド  
30  
40  
50

も、本発明の範囲内である。

**【0057】**

本発明は、試料中の、イベントMON87411 DNAを含むトウモロコシ植物由來のDNAの存在を検出するためのプライマーまたはプローブとして使用することができる例示的DNA分子を提供する。そのようなプライマーまたはプローブはターゲット核酸配列に特異的であり、したがって、本明細書に記載する発明の方法によるトウモロコシイベントMON87411核酸配列の同定に役立つ。

**【0058】**

「プライマー」は、典型的には、熱増幅を伴う特異的アニーリングまたはハイブリダイゼーション法において使用するために設計された高純度の単離ポリヌクレオチドである。  
ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの熱増幅では、アンプリコンを作製するために、一对のプライマーをトウモロコシゲノムDNAの試料などのテンプレートDNAと共に使用することができ、そのような反応から作製されたアンプリコンは、プライマーがテンプレートにハイブリダイズした2つの部位の間ににあるテンプレートDNAの配列に対応するDNA配列を有するであろう。本明細書にいう「アンプリコン」とは、増幅技法を使って合成されたDNAの一片またはフラグメントである。本発明のアンプリコンは、配列番号21または配列番号25として提供される配列の少なくとも1つを含む。プライマーは、典型的には、相補的ターゲットDNA鎖にハイブリダイズしてプライマーとターゲットDNA鎖のハイブリッドを形成するように設計され、プライマーの存在は、ターゲットDNA鎖をテンプレートとして使用するプライマーの伸長（すなわち、伸びているヌクレオチド分子への追加ヌクレオチドの重合）を開始するための、ポリメラーゼによる認識点である。本明細書にいうプライマー対とは、プライマー対の個々のメンバーによる結合のターゲットとした位置に挟まれたポリヌクレオチドセグメントを典型的には熱増幅反応でまたは他の従来の核酸増幅方法で線形に増幅するための、二本鎖ヌクレオチドセグメントの反対の鎖に結合する2つのプライマーの使用を指すものとする。この応用に役立つプライマー対は、第1DNA分子および第1DNA分子とは異なる第2DNA分子を含むべきであり、この場合、両者はそれぞれ、DNAプライマーとして機能して、熱増幅反応においてトウモロコシイベントMON87411由來のテンプレートDNAと共に、一緒に使用した場合に、試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAに特徴的であるアンプリコンが作製されるように、十分な長さを持つ、DNA配列の連続ヌクレオチドである。プライマーとして役立つ例示的DNA分子を、配列番号18、配列番号20、配列番号22、または配列番号24として提供する。

**【0059】**

「プローブ」は、ターゲット核酸の鎖に相補的な、単離された核酸である。プローブには、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、ターゲットDNA配列に特異的に結合するポリアミドおよび他のプローブ材料も含まれ、そのような結合の検出は、特定試料における当該ターゲットDNA配列の存在を診断、識別、決定、検出、または確認するのに役立ちうる。プローブは、従来の検出可能ラベルまたはレポーター分子、例えば放射性同位体、リガンド、化学発光剤、または酵素に取り付けることができる。プローブとして役立つ例示的DNA分子を配列番号19および配列番号23として提供する。

**【0060】**

プローブおよびプライマーは、ターゲット配列との完全な配列同一性を有しうるが、ターゲット配列とは異なるプライマーおよびプローブであって、ターゲット配列に優先的にハイブリダイズする能力を保っているものを従来の方法によって設計することもできる。ある核酸分子がプライマーまたはプローブとして役立つには、使用する特定溶媒および特定塩濃度において安定な二本鎖構造を形成することができるように、配列が十分に相補的でありさえすればよい。従来の核酸ハイブリダイゼーション法または増幅方法はいずれも、試料中のトウモロコシイベントMON87411由來のトランスジェニックDNAの存在を同定するために使用することができる。プローブおよびプライマーは長さが一般に少なくとも約11ヌクレオチド、少なくとも約18ヌクレオチド、少なくとも約24ヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、もしくは少なくとも約30ヌクレオチドまたはそれ以上である。そのようなプローブおよびプライマーは、ストリングエントなハイブリダイゼーション条件下でターゲットDNA配列に特異的にハイブリダイズする。従来のストリングエンシー条件は、Sambrookら(1989)およびHaymesら「Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach」(IRL Press、ワシントンDC(1985))に記載されている。

#### 【0061】

本明細書に開示するDNA分子またはそのフラグメントを単離し操作するには、熱増幅方法を含めて、当業者に周知のいくつもの方法を使用することができる。DNA分子またはそのフラグメントは、例えば、自動オリゴヌクレオチド合成装置を使ってよく実施されているように、そのフラグメントを化学的手段で直接合成することなど、他の技法によって取得することもできる。  
10

#### 【0062】

したがって、ここに提供するDNA分子および対応するヌクレオチド配列は、とりわけ、トウモロコシイベントMON87411の同定、トウモロコシイベントMON87411を含む植物品種または雑種の選択、試料中のトランスジェニックトウモロコシイベントMON87411に由来するDNAの存在の検出、およびトウモロコシイベントMON87411またはイベントMON87411を含むトウモロコシ植物に由来する植物部分の存在および/または不在に関する試料のモニタリングに役立つ。

#### 【0063】

本発明はトウモロコシ植物、後代、種子、植物細胞、植物部分(花粉、胚珠、穂または絹糸組織、雄穂組織、根組織、茎組織、および葉組織など)、およびコモディティー製品を提供する。これらの植物、後代、種子、植物細胞、植物部分、およびコモディティー製品は、検出可能な量の本発明のポリヌクレオチド、すなわち、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、または配列番号52として提供される配列の少なくとも1つを有するポリヌクレオチドなどを含有する。本発明の植物、後代、種子、植物細胞、および植物部分は1つ以上の追加トランスジーンも含有しうる。そのような追加トランスジーンは、望ましい形質、例えば限定するわけではないが、増加した昆虫抵抗性、増加した水利用効率、増加した収量成績、増加した乾燥抵抗性、増加した種子品質、改良された栄養品質、および/または増加した除草剤耐性などを付与するタンパク質またはRNA分子をコードする任意のヌクレオチド配列であることができ、ここで、望ましい形質は、そのような追加トランスジーンを欠くトウモロコシ植物を基準として測定される。  
30

#### 【0064】

本発明は、イベントMON87411を含むトランスジェニックトウモロコシ植物に由来するトウモロコシ植物、後代、種子、植物細胞、および植物部分、例えば花粉、胚珠、穂または絹糸組織、雄穂組織、根または茎組織、および葉を提供する。イベントMON87411を含むトウモロコシ種子の代表試料は、ブダペスト条約に従ってAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されている。ATCC寄託機関は、イベントMON87411を含む種子に、特許寄託物名(Patent Deposit Designation)PTA-12669を割り当てている。  
40

#### 【0065】

本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、およ  
50

び配列番号 5 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つの配列を有する D N A 分子をそのゲノム中に含んでなる微生物を提供する。そのような微生物の一例はトランスジェニック植物細胞である。本発明の植物細胞などの微生物は、例えば限定するわけではないが、( i ) 科学的探求または工業的研究のための研究ツールとしての使用；( i i ) 後続の科学的研究に使用するか工業製品として使用することができる内在性または組換え糖質、脂質、核酸、もしくはタンパク質産物または小分子を生産するための培養における使用；および( i i i ) 農業上の研究または生産に使用することができるトランスジェニック植物または植物組織培養物を作製するための現代的植物組織培養技法による使用など、多くの工業的応用に役立つ。トランスジェニック植物細胞などの微生物の作製および使用では、現代的微生物学技法および人間の介入を利用して、人造のユニークな微生物が作製される。この過程で、組換え D N A が植物細胞のゲノムに挿入されて、自然界に存在する植物細胞とは別個のユニークなトランスジェニック植物細胞が作製される。次に、このトランスジェニック植物細胞は現代的微生物学技法を使って細菌および酵母細胞と同様に培養することができ、未分化な単細胞状態で存在することができる。トランスジェニック植物細胞の新しいまたは改変された遺伝子組成および表現型は、細胞のゲノムへの異種 D N A の組込みが生み出す技術的効果である。トランスジェニック植物細胞などの本発明の微生物には、( i ) 細胞のゲノムに組換え D N A を組み込むことによってトランスジェニック細胞を作製した後、この細胞を使って、同じ異種 D N A を保持するさらなる細胞を派生させる方法；( i i ) 組換え D N A を含有する細胞を現代的微生物学技法を使って培養する方法；( i i i ) 培養細胞から内在性または組換え糖質、脂質、核酸、またはタンパク質産物を生産し、精製する方法；および( i v ) 現代的植物組織培養技法をトランスジェニック植物細胞と共に使って、トランスジェニック植物またはトランスジェニック植物組織培養物を作製する方法が含まれる。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明の植物は、トランスジーンを含むイベント D N A を後代に伝えることができる。本明細書にいう「後代」には、祖先植物に由来するイベント D N A を含み、かつ／または配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 25；配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、および配列番号 5 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つの配列を有する D N A 分子を含む、任意の植物、種子、植物細胞、および／または再生可能な植物部分が含まれる。植物、後代、および種子は、トランスジーンに関してホモ接合でもヘテロ接合でもよい。後代は、トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 含有植物によって生産された種子から、および／またはトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 含有植物からの花粉で受精させた植物によって生産された種子から、生長させることができる。

#### 【 0 0 6 7 】

後代植物を自家受粉（「自殖」ともいう）させて純粹種系統の植物、すなわちトランスジーンに関してホモ接合である植物を生成させることができる。適当な後代の自殖により、両方の付加された外因性遺伝子に関してホモ接合である植物を作製することができる。

#### 【 0 0 6 8 】

あるいは、後代植物を異系交雑して、例えば別の無関係な植物と交配して、品種または雑種種子または植物を作製してもよい。他の無関係な植物はトランスジェニックでも非トランスジェニックでもよい。したがって本発明の品種または雑種種子または植物は、トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 の特異的かつユニークな D N A を欠く第 1 の親を、トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 を含む第 2 の親と交雑し、その結果としてトウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 の特異的かつユニークな D N A を含む雑種を得ることによって、派生させることができる。各親は、交雑または交配が本発明の植物または種子、すなわち、トウモロコシイベント M O N 8 7 4 1 1 の D N A および／または配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8

、配列番号 9 、配列番号 10 、配列番号 12 、配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 21 、配列番号 25 ; 配列番号 41 、配列番号 42 、配列番号 43 、配列番号 44 、配列番号 45 、配列番号 49 、配列番号 50 、配列番号 51 、および配列番号 52 からなる群より選択される少なくとも 1 つの配列を有する DNA 分子を含有するアレルを少なくとも 1 つは有する種子をもたらす限り、雑種または近交系 / 品種であることができる。したがって、2 つの異なるトランスジェニック植物を交雑して、独立して分離する 2 つの付加された外因性遺伝子を含有する雑種次代を作製することができる。例えば、コーンルートワーム寄生に対する抵抗性とグリホサート耐性とを持つイベント MON 87411 トウモロコシを、異なるトランスジェニクットウモロコシ植物と交雑させて、両方のトランスジェニック親の特徴を有する雑種または近交系植物を作製することができる。その一例は、コーンルートワーム寄生に対して抵抗性でありかつグリホサートに対して耐性であって少なくとも 1 つ以上の追加形質を有する後代植物または種子をもたらす、コーンルートワーム寄生に対する抵抗性およびグリホサート耐性を持つイベント MON 87411 と、1 つ以上の追加形質、例えば除草剤耐性および / または昆虫防除を有するトウモロコシ植物との交雑であるだろう。栄養生殖と同様、親植物への戻し交雫および非トランスジェニック植物との異系交雫も考えられる。さまざまな形質および作物のために一般に使用される他の育種方法の説明は、例えば Fehr 「 Breeding Methods for Cultivar Development 」 Wilcox J. 編、 American Society of Agronomy 、 ウィスコンシン州マディソン (1987) など、いくつかある参考文献の 1 つに見いだすことができる。

#### 【 0069 】

本発明は、イベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物に由来する植物部分を提供する。本明細書にいう「植物部分」とは、イベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物に由来する材料から構成される植物の任意の部分を指す。植物部分には、花粉、胚珠、穂または絹糸、雄穂、根または茎組織、纖維、および葉などがあるが、これらに限定されるわけではない。植物部分は、生育可能、生育不能、再生可能、および / または再生不能であることができる。

#### 【 0070 】

本発明は、イベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物に由来し、かつ検出可能な量の、イベント MON 87411 に特異的な核酸を含有する、コモディティー製品を提供する。本明細書にいう「コモディティー製品」とは、トウモロコシイベント MON 87411 DNA を含有するトウモロコシ植物、全粒または加工トウモロコシ種子、1 つ以上の植物細胞および / または植物部分に由来する材料を含有する任意の組成物または製品を指す。コモディティー製品は消費者に販売することができ、生育可能であっても生育不能であってもよい。生育不能コモディティー製品には、発芽不能トウモロコシ種子；加工トウモロコシ種子、トウモロコシ種子部分、およびトウモロコシ植物部分；飼料または食品、油、荒粉、細粉、フレーク、ふすま、バイオマス、および燃料製品用に加工されたトウモロコシ種子およびトウモロコシ植物部分などがあるが、これらに限定されるわけではない。生育可能コモディティー製品には、トウモロコシ種子、トウモロコシ植物、およびトウモロコシ植物細胞などがあるが、これらに限定されるわけではない。したがって、イベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物は、通例トウモロコシから得られる任意のコモディティー製品を製造するために使用することができる。トウモロコシイベント MON 87411 DNA を含有するトウモロコシ植物に由来するそのようなコモディティー製品はいずれも、その存在がトウモロコシイベント MON 87411 を決定づける 1 つ以上の特異的かつユニークな DNA 分子を少なくとも検出可能な量で含有し、具体的には、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、配列番号 10 、配列番号 12 、配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 21 、配列番号 25 ; 配列番号 41 、配列番号 42 、配列番号 43 、配列番号 44 、配列番号 45 、配列番号 49 、配列番号 50 、配列番号 51 、および配列番号 52 からなる群より選択される少なくとも 1 つの配列を有する DNA 分子を含むポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドを、検出可能な量で含有しうる。本明細書に開示する検出方法を含めて、任意の標準的なスクレオチド分子検出方法を使用することができる。コモディティー製品は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25；配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52からなる群より選択される少なくとも1つの特徴的配列を有するDNA分子が、コモディティー製品中に、いくらかでも検出可能な量で存在するのであれば、本発明の範囲内である。

## 【0071】

10

それゆえに、本発明の植物、後代、種子、植物細胞、植物部分（花粉、胚珠、穂または絹糸、雄穂、根または茎組織、および葉など）、およびコモディティー製品は、とりわけ、農業上の目的でトウモロコシイベントMON87411を含む種子および／または植物部分を生産するために植物を生長させること、植物育種および研究目的でトウモロコシイベントMON87411を含む後代を生産すること、工業的応用および研究的応用のために微生物学技法と共に使用すること、および消費者への販売に有用である。

## 【0072】

本発明は、グリホサート除草剤およびトウモロコシイベントMON87411を使って雑草を防除するための方法および植物を生産するための方法を提供する。圃場において雑草を防除するための方法が提供され、これは、トウモロコシイベントMON87411含有品種または雑種植物を圃場に植え付けること、およびMON87411含有植物に被害を与えることなく圃場における雑草を防除する目的で圃場に除草有効量のグリホサートを施用することからなる。そのようなグリホサート除草剤の施用は出芽前、すなわちMON87411含有種子が植え付けられた後、かつMON87411含有植物が出芽する前の任意の時点であってもよいし、出芽後、すなわちMON87411含有植物が出芽した後の任意の時点であってもよい。圃場において雑草を防除するためのもう一つの方法が提供され、それは、圃場における雑草を防除するために有効量のグリホサート除草剤を施用すること、そして次に、その圃場にイベントMON87411を含むトウモロコシ植物を植え付けることからなる。そのようなグリホサート除草剤の施用は植え付け前、すなわちMON87411含有種子が植え付けられる前であり、植え付け前の任意の時点で、例えば限定するわけではないが、植え付けの約14日前～植え付けの約1日前に行うことができるだろう。本発明は、MON87411を含むグリホサート耐性トウモロコシ植物の種子を圃場に植え付け、雑草を殺すのに十分な出芽後有効量のグリホサート除草剤を圃場に施用し、その圃場から種子を収穫することによって、雑草種子を本質的に含まないトウモロコシ種子を生産するための方法も提供する。圃場で使用するためのグリホサートの除草有効量は、1栽培期で1エーカーあたり約0.125ポンドから1エーカーあたり約6.4ポンドまでの範囲のグリホサートからなるはずである。一実施形態では、1栽培期で1エーカーあたり合計約1.5ポンドのグリホサートが施用される。1栽培期で複数回のグリホサート施用、例えば2回の施用（植え付け前施用と出芽後施用または出芽前施用と出芽後施用など）または3回の施用（植え付け前施用、出芽前施用および出芽後施用など）を使用してもよい。

20

## 【0073】

30

本発明のイベントMON87411に特異的かつユニークなDNA配列を含む昆虫および除草剤耐性トウモロコシ植物を生産するための方法が提供される。これらの方法で使用されるトランスジェニック植物はトランスジーンに関してホモ接合でもヘテロ接合でもよい。これらの方法によって生産される後代植物は品種植物でも雑種植物でもよく；トウモロコシイベントMON87411含有植物によって生産された種子および／またはトウモロコシイベントMON87411含有植物からの花粉で受精させた植物によって生産された種子から生長させることができ；トランスジーンに関してホモ接合でもヘテロ接合でもよい。次に、後代植物を自家受粉させて純粹種系統の植物、すなわちトランスジーンに関

40

50

してホモ接合である植物を生成させるか、あるいは異系交雑して、例えば別の無関係な植物と交配して、品種または雑種種子または植物を生産してもよい。

【0074】

試料中の、トウモロコシイベントMON87411を含むトウモロコシ細胞、組織、種子、または植物に由来するDNAの存在を検出する方法を提供する。一方法は、(i)少なくとも1つのトウモロコシ細胞、組織、種子、または植物からDNA試料を抽出すること、(ii)DNA配列決定にとって適当な条件下で、DNA試料を、イベントMON87411 DNAに特異的なDNA配列を作製する能力を有する少なくとも1つのプライマーと接触させること、(iii)DNAシークエンス反応を行うこと、そして次に(iv)ヌクレオチド配列が、イベントMON87411またはそこに含まれるコンストラクトに特異的なヌクレオチド配列、例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52からなる群より選択される1つを含むことを確認することからなる。もう一つの方法は、(i)少なくとも1つのトウモロコシ細胞、組織、種子、または植物からDNA試料を抽出すること、(ii)DNA增幅にとって適当な条件下で、DNA試料を、イベントMON87411 DNAからアンプリコンを作製する能力を有するプライマー対と接触させること、(iii)DNA增幅反応を行うこと、そして次に(iv)アンプリコン分子を検出し、かつ/またはアンプリコンのヌクレオチド配列がイベントMON87411に特異的なヌクレオチド配列、例えば配列番号21および配列番号25からなる群より選択される1つを含むことを確認することからなる。アンプリコンは、イベントMON87411に特異的なもの、例えば配列番号21または配列番号25を含むアンプリコンなどであるべきである。アンプリコン中の、イベントMON87411に特異的なヌクレオチド配列の検出は、試料中のトウモロコシイベントMON87411特異的DNAの存在を決定づけ、かつ/またはその存在に特徴的である。DNA増幅にとって適当な条件下でイベントMON87411 DNAからアンプリコンを作製する能力を有するプライマー対の例を、配列番号18、配列番号24、配列番号20、および配列番号22として提供する。当業者は他のプライマー対を容易に設計することができ、それらは配列番号21または配列番号25を含むアンプリコンを作製するであろう。この場合、そのようなプライマー対は、インサートに隣接するゲノム領域内にある少なくとも1つのプライマーと、インサート内にある第2のプライマーとを含む。試料中の、トウモロコシイベントMON87411を含むトウモロコシ細胞、組織、種子、または植物由来のDNAの存在を検出するもう一つの方法は、(i)少なくとも1つのトウモロコシ細胞、組織、種子、または植物からDNA試料を抽出すること、(ii)DNA試料を、イベントMON87411 DNAに特異的なDNAプローブと接触させること、(iii)ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でプローブとDNA試料とをハイブリダイズさせること、そして次に(iv)プローブとターゲットDNA試料とのハイブリダイゼーションを検出することからなる。イベントMON87411 DNAに特異的なDNAプローブの配列の例を、配列番号19または配列番号23として提供する。当業者は他のプローブを容易に設計することができ、それらは、例えば限定するわけではないが、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号21、および配列番号25に提供する配列など、インサートに隣接するゲノムDNAの少なくとも1つのフラグメントと、インサートDNAの少なくとも1つのフラグメントとを含むであろう。DNA試料へのプローブハイブリダイゼーションの検出は、試料中のトウモロコシイベントMON87411特異的DNAの存在に特徴的である。あるいは、ハイブリダイゼーションの不在は、試料中のトウモロコシイベントMON87411特異的DNAの不在に特徴的である。

【0075】

試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAを同定するのに役立ち、適當

10

20

30

40

50

なイベントDNAを含有するトウモロコシ植物を育種するための方法に応用することもできる、DNA検出キットが提供される。そのようなキットには、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52のフラグメントを含むDNAプライマーおよび／またはプローブが入っている。そのようなキットの一例は、試料中の、イベントMON87411を含むトランスジェニックトウモロコシ植物由来のDNAの存在および／または不在を検出するのに役立つDNAプローブとして機能するために、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52の十分な長さの連続ヌクレオチドのDNA分子を、少なくとも1つは含む。イベントMON87411を含むトランスジェニックトウモロコシ植物に由来するDNAは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52からなる群より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子を含むであろう。試料中のトウモロコシイベントMON87411 DNAの存在および／または不在を決定、検出、または診断するのに役立つDNAプローブとしての使用にとって十分なDNA分子が、配列番号19および配列番号23として提供される。当業者は他のプローブを容易に設計することができ、それらは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号21、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52の十分な数の連続核酸、例えば少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、または少なくとも40連続ヌクレオチドを含むべきであり、イベント由来のDNAを同定するためにトウモロコシイベントMON87411 DNAに十分にユニークであるべきである。もう一つのタイプのキットは、試料中のトランスジェニックトウモロコシイベントMON87411由来のDNAの存在および／または不在を検出するのに役立つアンプリコンを作製するのに役立つプライマー対を含む。そのようなキットでは、ターゲットDNA試料を本明細書に記載のプライマー対と接触させ、次に配列番号21および配列番号25からなる群より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子を含むアンプリコンを作製するのに十分な核酸増幅反応を行い、次にアンプリコンの存在および／または不在を検出することを含む方法が使用されるであろう。そのような方法は、ターゲットDNA試料中のトウモロコシイベントMON87411特異的DNAの存在を決定づける、すなわちその存在に特徴的であるであろう、アンプリコンまたはそのフラグメントを配列決定することも含みうる。当業者は他のプライマー対も容易に設計することができ、それらは、限定するわけではないが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52に提供する配列の十分な数の連続核酸、例えば少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも1

8、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、または少なくとも 30 連続ヌクレオチドを含むべきであり、イベント由来の DNA を同定するためにトウモロコシイベント MON 87411 DNA に十分にユニークであるべきである。

#### 【0076】

本発明のキットおよび検出方法は、とりわけ、トウモロコシイベント MON 87411 の同定、トウモロコシイベント MON 87411 を含む植物品種または雑種の選択、試料中のイベント MON 87411 を含むトランスジェニックトウモロコシ植物に由来する DNA の存在の検出、およびトウモロコシイベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物またはイベント MON 87411 を含むトウモロコシ植物に由来する植物部分の存在および / または不在に関する試料のモニタリングに役立つ。 10

#### 【0077】

トウモロコシイベント MON 87411 からの異種 DNA インサート、接合部配列、または隣接配列の配列は、ここに提供する配列に由来するプライマーを使って、イベントからそのような配列を増幅した後、アンプリコンまたはクローン化 DNA の標準的 DNA 配列決定を行うことによって、検証（そして必要であれば修正）することができる。

#### 【0078】

本発明の一定の好ましい実施形態の例を実証するために以下に実施例を挙げる。以下の実施例において開示する技法は、本発明の実施においてよく機能することを本発明者らが見いだしたアプローチを表し、したがってその実施にとって好ましい形態の例を構成するのみならずことは、当業者には理解されるはずである。しかし当業者は、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、ここに開示する具体的な実施形態に多くの変更を加えても、なお同様の結果を得ることが可能であることも、本開示に照らして、理解するはずである。 20

#### 【0079】

##### 寄託情報

イベント MON 87411 を含むトウモロコシ種子の代表試料の寄託は、ブダペスト条約に従って、2012年3月14日に、郵便番号 20110 米国バージニア州マナッサス、ユニバーシティ・ブルーバード 10801 に住所を有する American Type Culture Collection (ATCC) になされ、ATCC 受託番号 PT A - 12669 が割り当てられている。本願の係属中、特許商標庁長官および長官が権限を有すると決定した者は、請求により、本寄託物を利用することが可能である。特許の発行後は直ちに、公衆に対する利用可能性に関する全ての制約が、取消不能に取り除かれるであろう。寄託物は、30年間、または最後の請求後 5 年間、または特許の有効期間中は、そのいずれが長くても、受託機関に維持され、その期間中は必要に応じて補充されるであろう。 30

#### [実施例]

##### 【実施例 1】

#### 【0080】

この実施例では、417 と呼ばれるコンストラクトの設計および選択ならびにさまざまな DNA コンストラクトの工学的操作および評価を説明する。表 1 にこれらの DNA コンストラクトを試験基準および結果によって表にする。 40

#### 【0081】

ウェスタンコーンルートワーム (WCR) をターゲットとする RNA ベースの植物内保護物質 (PIP) をトウモロコシ内で発現するように、DNA コンストラクトを工学的に操作した。RNA 転写産物のバリエーションを、WCR のターゲット遺伝子の相違 (グループ 1)、RNA の長さの相違 (グループ 2)、中立的 RNA キャリアの有無 (グループ 2)、二次構造の相違 (グループ 4)、および Dv\_Snf70 のターゲットセグメントの相違 (グループ 2 および 3) について試験した。複数トランスジーンのバリエーション 50

、例えばRNA転写産物+WCR活性タンパク質（グループ3および5）、および2つのWCRターゲットをターゲットとする2つのRNA転写産物（グループ1および4）も試験した。使用した発現カセットおよび要素の数および配置のバリエーションも試験した（全てのグループ）。

【0082】

[表1] 45のDNAコンストラクトをトウモロコシ植物に安定に形質転換した。1つのDNAコンストラクトにつき複数の形質転換イベントからの後代植物を評価した。

【表1-1】

コンストラクト	グループ	基準および結果
043	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>4つの異なるWCR内在性遺伝子の転写産物をターゲットとするRNAセグメントのベクタースタックドの組み合わせ (vector stacked combination) を発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した。</li> <li>WCR活性はDv_Snf7o遺伝子転写産物をターゲットとするRNAセグメントを発現する植物で阻害された。</li> </ul>
043		
059		
503	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dv_Snf7o遺伝子転写産物をターゲットとするさまざまなサイズのRNAセグメント (27マーから429マーまで) (逆方向反復RNA (IR)として発現するように工学的に操作されたもの) を発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した。Dv_Snf7oをターゲットとする27マーが埋め込まれた150マーの中立的IRキャリア、および同27マーが埋め込まれていない150マーの中立的IRキャリアも試験した。</li> <li>最適なWCR活性は長さが100塩基対以上のDv_Snf7oターゲットセグメントを発現する植物で観察された。</li> </ul>
475		
970		
474		
477		
306		
476		
713		
868	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>(a) 240マーのDv_Snf7o IRと (b) WCR阻害活性を有する一対のタンパク質TIC809およびTIC810とを発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した；どちらも1つのDNAコンストラクト中の1つの発現カセット下にある。</li> <li>(a) 240マーのDv_Snf7o IRと (b) WCR阻害活性を有する一対のタンパク質TIC809およびTIC810とを発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した；それぞれが1つのDNAコンストラクト中で別々の発現カセットに独立して作動的に連結されている。</li> <li>これらのIR+タンパク質の組み合わせを、異なるプロモーターおよび発現カセット配置の異なる組合せを使って試験した。</li> <li>240マーDv_Snf7o IRの植物内発現は、TIC809およびTIC810タンパク質対の発現ありまたは同発現なしで、当該植物におけるWCR活性を阻害した。</li> </ul>
870		
871		
875		
310		
311		
330		
331		
950		
890		
867		
946		
878		
823		
879		
880		
401		

10

20

30

40

【表1 - 2】

コンストラクト	グループ	基準および結果
354	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNAコンストラクト#503 (429マーのDv_Snf7o IR) を内包するイベントを含有する植物と、イベントMON88017 (Cry3Bb) を含む植物との雑種交雑の後代植物を試験した。</li> <li>150マーまたは240マーのDv_Snf7o IRを発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した。</li> <li>(a) Dv_Snf7o IRと (b) vATPase A IRとを発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した。</li> <li>IR二次RNA構造と非IR二次RNA構造とを、Dv_Snf7o、vATPase A、およびその組み合わせの抑制について、対比して試験した。</li> <li>240マーDv_Snf7o IRの植物内発現は、vATPase A RNAセグメントの発現ありまたは同発現なしで、WCR活性を阻害した。</li> <li>WCR阻害は、Dv_Snf7o IRだけまたはCry3Bbだけを発現させた場合と比べて、Dv_Snf7o IRをCry3Bbと一緒に発現させた場合の方が、植物内で良好であった。</li> </ul>
253		
254		
255		
256		
892		
365	5	
416		<ul style="list-style-type: none"> <li>(a) the 240マーのDv_Snf7o IRと (b) <i>Diabrotica virgifera</i>殺虫活性を有するCry3Bbタンパク質とを、どちらも発現する植物において、WCR活性の阻害を試験した；各トランスジーンは1つのDNAコンストラクト中の別々の発現カセットにある。</li> <li>異なるプロモーターの組み合わせ、および異なる発現カセット配置の組み合わせを有する、10個のDNAコンストラクトを試験した。</li> <li>DNAコンストラクト#417を選択した。</li> </ul>
417		
418		
419		
423		
402		
403		
404		
405		
406		

## 【0083】

グループ2のDNAコンストラクトを一例として用いると、さまざまな長さのDv\_Snf7o (27nt長から429nt長まで)のターゲティングを試験するために、7つのDNAコンストラクトを工学的に操作した。各DNAコンストラクトを作製し、植物細胞を形質転換し、植物を取得し、近交系をグロースチャンバー効力バイオアッセイで評価した。結果は逆方向反復RNA (IR) の長さとWCR活性の間の相関関係を示した(表2、(B)列および(H)列)。

40

## 【0084】

[表2] IRの長さとWCR活性の間の相関関係

【表2】

(A) DNAコントラクト番号	(B) Dv-Snf7o RNAセグメント長 (nt)	(C) 形質転換された胚の数	(D) 苗条を伴う胚の数	(E) 土壤に移植したR <sub>0</sub> 植物の数	(F) 单一イベントを内包すると予想されるR <sub>0</sub> 植物の数	(G) 多施設試験に進んだイベントの数	(H) 植物でのWCR活性?
503	429	2085	433	308	233	78	+++++
475	150	230	57	45	39	23	+++++
970	27†	220	79	47	44	21	++
474	27	230	81	51	49	23	-
477	50	220	50	36	31	23	++
306	75	230	37	27	18	15	++
476	100	220	53	40	33	22	+++++

## 【0085】

(B)列は、トウモロコシ植物中で逆方向反復RNA(IRR)二次構造として発現するように工学的に操作されたDv-Snf7oターゲットRNAのさまざまな長さを示している。(C)列は、形質転換されたトウモロコシ胚の数を示している。(D)列は、苗条

10

20

30

40

50

を発生させたトウモロコシ胚の数を示している。(E)列は、土壤で生育可能な再生トウモロコシ植物(世代R0と呼ぶ)の数を示している。(F)列は、形質転換イベント中に1コピーのインサートDNAを内包すると予想されるR0植物の数を示している。(G)列は、単一形質転換イベントを内包すると予想され、かつ多施設グロースチャンバーバイオアッセイ用に十分な種子を生産したR0植物の数を示している。(H)列は、WCR活性を評価するために計画された植物グロースチャンバー研究の結果を示している。「+++」は平均RDRが0.5RDR未満であったことを示す。「++」は平均RDRが0.5RDR~2.0RDRであったことを示す。「-」は、平均RDRが約2.0RDRであったことを意味し、これはグロースチャンバー効力研究では陰性対照に匹敵した。

## 【0086】

†DNAコンストラクト#474と同じ27マーであるが、中立的な150マーIRに埋め込まれている。グロースチャンバーで生長させた植物におけるWCR活性を評価するために、1コンストラクトあたり10~20のイベントのそれぞれについて6~8体の植物を、ピート鉢で生長させた。植物を、インサートDNAの存在およびトランスジーンの発現について、葉組織と根組織の両方で試験した。次に、トランスジーンの発現が確認された植物を、WCR卵を寄生させた大きな鉢に植え替えた。非トランスジェニックトウモロコシ系統LH59およびLH244を陰性対照として含めた。イベントMON88017(Cry3Bbを発現するもの)を含有する植物を陽性対照として含めた。生長するトウモロコシ植物の根損傷を4週間後に評価した。根損傷評点(root damage rating)(RDR)を3点尺度で評価し、0RDRを根損傷なし、3RDRを最大根損傷とした。

## 【0087】

研究結果から、グループ5のDNAコンストラクトは、(a)240マー-Dv\_Snf7o IR用の発現カセットおよび(b)Cry3Bbタンパク質用の発現カセットを含有するように設計した(図2)。240マー-Dv\_Snf7o IRを選択した理由は、(a)同じ240マー-Dv\_Snf7o IRを発現する植物がCRW活性の阻害に何度も成功していたこと(グループ2~4)、(b)長さが100ntより大きいセグメントではWCR抵抗性の発生確率が減少すること、および(c)240ntより大きいセグメントではトウモロコシゲノムに無傷で導入することが困難になるであろうことであった。各発現カセット中の異なる調節遺伝要素およびDNAコンストラクトにおける各発現カセ

ットの異なる配置を試験するために、DNAコンストラクトを設計した。グループ5のDNAコンストラクトには、グリホサート耐性発現カセットを伴うコンストラクトとグリホサート耐性発現カセットを伴わないコンストラクト；および240マー-Dv\_Snf7o IRだけを発現するグループ3からの対照コンストラクトも含めた。各DNAコンストラクトを設計し、植物細胞を形質転換し、植物を取得し、近交系をグロースチャンバー効力バイオアッセイで評価した(表3(C)~(H))。

## 【0088】

[表3] グループ5のDNAコンストラクトの形質転換からの植物作製数

10

20

30

【表3】

(A) DNAコントラクト番号	(B) DNAコントラクト組成	(C) 形質転換された胚の数	(D) 苗条を伴う胚の数	(E) 土壤に移植したR <sub>0</sub> 植物の数	(F) 単一イベントを内包すると予想されるR <sub>0</sub> 植物の数	(G) グロースチャンバーに進んだR <sub>0</sub> イベントの数	(H) 近交系おおよび雜種後代植物成績
(1) 416		820	72	72	42	27	+++++
(2) 417		521	212	94	71	44	+++++
(3) 418	Dv_Snf7o IR + Cry3Bb + EPSPS	538	79	65	44	28	+++++
(4) 419		651	106	95	68	43	++++
(5) 423		754	93	84	66	41	+++
(6) 402		786	84	84	58	43	+++
(7) 403		714	199	84	46	40	+++
(8) 404		740	50	50	34	29	+++
(9) 405	Dv_Snf7o IR + Cry3Bb	21663	1586	1586	86	58	+++
(10) 406		21965	1539	1539	170	112	+++
(11) 890	Dv_Snf7o IR	3996	656	394	235	136	+++

(A)列は、ステージ5で試験されたDNAコントラクトを列挙している（遺伝要素の内訳については図2も参照されたい）。(B)列は、トランジションの組み合せを示している。(C)列は、形質転換されたトウモロコシ胚の数を示している。(D)列は、苗条を発生させたトウモロコシ胚の数を示している。(E)列は、土壤で生育可能な再生トウモロコシ植物（世代R0と呼ぶ）を示している。(F)列は、單一形質転換コピーワークを内包すると予想されるR0植物の数を示している。(G)列は、單一形質転換イベントを内包すると予想され、かつ後続の多施設試験用に十分な種子を生産したR0植物の数を示している。(H)列は、WCRを寄生させた植物の成績を要約している（詳細は以下の段落を参照されたい）。

## 【0089】

表3の(H)列に示すように、「+++++」は、平均すると、発生全体を通してトランジショニック植物に最も高い持続的遺伝子発現と、発生中に最も高いWCR阻害と、自

家受精世代および交雑世代において最も高いWCR阻害を与えたDNAコンストラクトを表す。「++++」は、平均すると、トランスジェニック植物にWCR阻害を与えるが、「+++++」植物と比べると遺伝子発現量は少ないDNAコンストラクトを表す。「++」は、平均すると、トランスジェニック植物に与えられるWCR阻害が「++++」植物および「+++++」植物と比べて低いDNAコンストラクトを表す。そこで、DNAコンストラクト#417をさらなる解析に進めた。このコンストラクトは、左境界(LB)から右境界(RB)までに、3つの発現カセットに編成された16の遺伝要素を有する。このコンストラクトを図2に示し、配列を配列番号26に記載する。ベクターコンポーネントは、次のとおりである。

## 【0090】

10

[1] LB : 配列番号26の位置1~442の逆相補体に対応する。この要素は*Agr obacterium tumefaciens*のオクトピン左境界配列に相当する。

[2] Ps.RbcS2-E9'UTR : 配列番号26の位置486~1118の逆相補体に対応する。*Pisum sativum*(エンドウ)のリブロース1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットE9(rbcS-E9)遺伝子転写産物からの3'非翻訳領域(UTR)に相当する。

[3] 240マー-Dv\_Snf7o逆方向反復遺伝子 : 配列番号26の位置1148~1777の逆相補体に対応する。この遺伝子は、互いに全く同一に逆相補的に一致する2つの240マー-リボヌクレオチドセグメントを、150リボヌクレオチドの中立的セグメントによって分離された状態で含有するRNAに転写されて、逆方向反復RNA(IIR)を形成する。240bpセグメントの配列は酵母Snf7にオルソロガスなWCR遺伝子と一致する。

20

[4] トウモロコシDnaKイントロン : 配列番号26の位置1814~2617の逆相補体に対応する。この要素は、*Zea mays*(トウモロコシ)の熱ショックタンパク質70遺伝子からのエクソン1の10ヌクレオチド、イントロン1、およびエクソン2の11ヌクレオチドからなる。エクソン2の11ヌクレオチドには開始メチオニン残基を除去する修飾が加えられている。

[5] CaMV 35Sリーダー : 配列番号26の位置2618~2626の逆相補体に対応する。カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35S RNA転写産物からの5'非翻訳領域(UTR)であって、その遺伝子のmRNA転写開始点の+1位置から始まるものに相当する。

30

## 【0091】

[6] eCaMV 35Sプロモーター : 配列番号26の位置2627~3238の逆相補体に対応する。-90~-350領域の重複を含有するカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーターに相当する。

[7] トウモロコシP1IGプロモーター : 配列番号26の位置3265~4213に対応する。この遺伝要素は、*Zea mays*の物理的障害誘導タンパク質(P1IG)遺伝子のプロモーターに相当する。

[8] コムギLhcb1リーダー : 配列番号26の位置4220~4280に対応する。この遺伝要素は*Triticum aestivum*(コムギ)の集光複合体b1(Lhcb1)遺伝子の5'非翻訳領域(UTR)に相当する。

40

[9] イネAct1イントロン : 配列番号26の位置4297~4776に対応する。*Oryza sativa*(イネ)のアクチン1(Act1)遺伝子からのエクソン1の12ヌクレオチド、イントロン1、およびエクソン2の7ヌクレオチドの連続配列からなる。

[10] Cry3Bb ORF : 配列番号26の位置4786~6747に対応する。ネイティブBt Cry3Bbタンパク質コード遺伝子と比べて修飾H231R、S311L、N313T、E317K、およびQ349Rを呈するように工学的に操作された非天然殺虫性Cry3Bタンパク質のコード領域に相当する。このヌクレオチド配列はイベントMON88017に含まれるcry3Bb遺伝子配列と一致する。

50

## 【0092】

[11] コムギ Hsp17 3'UTR：配列番号26の位置6767～6976に対応する。この遺伝要素は、*Triticum aestivum*（コムギ）からの熱ショックタンパク質17（HSP17）遺伝子の3'UTRに相当する。

[12] イネTubA（プロモーター、リーダー、イントロン）：配列番号26の位置7025～9205に対応する。*Oryza sativa*（イネ）のチューブリン遺伝子（TubA-3）からの連続するプロモーター、リーダー、イントロン、およびエクソン2の4ヌクレオチドに相当する。

[13] CTP：配列番号26の位置9210～9437に対応する。A. thalianaの5-エノールビルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ（EPSPS）からのN末端CTPをコードする工学的に操作されたコード領域に相当する。この要素は、最後のGAGコドン（グルタミン酸）がTGC（システイン）に修飾されている点で、ネイティブ遺伝子（GenBankアクセション番号X06613）とは異なる。

[14] CP4 EPSPS：配列番号26の位置9438～10805に対応する。*Agrobacterium* CP4からのEPSPSの工学的に操作されたコード領域に相当する。第2コドンがセリンをコードするものからCTT（ロイシン）へと修飾されている点と、4つのサイレント置換とが、ネイティブ*Agrobacterium*遺伝子とは異なる。

[15] イネTubA 3'UTR：配列番号26の位置10813～11394に対応する。*Oryza sativa*（イネ）からのチューブリン遺伝子（TubA-3）の3'非翻訳領域（UTR）に相当する。

[16] RRB：配列番号26の位置11413～11743に対応する。A. tumefaciensからのノパリン右境界配列に相当する。

## 【実施例2】

## 【0093】

この実施例では、形質転換と多数のトランスジェニックイベントからのイベントMON87411の選択を説明する。

## 【0094】

トウモロコシ系統LH244の穀粒から胚を摘出し、DNAコンストラクト#417を内包する組換え*Agrobacterium*を接種した。同時培養した胚を選択および生長培地に移して、発生中の苗条を伴うトランスジェニックカルス組織を生成させた。発生中の苗条を、小植物に発生させるための発根培地に移した。小植物を土壤で全R<sub>0</sub>植物に再生させた。こうして回収したR<sub>0</sub>植物を、導入されたコンストラクトDNAが1コピーであるものについてスクリーニングした。表3に示すように、推定1コピーのイベントが、71のユニークなR<sub>0</sub>形質転換体に得られた。各R<sub>0</sub>形質転換体を育苗条件下に置くことで、後代R<sub>1</sub>種子を生産した。44のイベントを先に進めた。44のR<sub>0</sub>植物のそれによって生産されたR<sub>1</sub>種子を少なくとも8つは土壤に植え付け、R<sub>1</sub>植物を生長させてR<sub>2</sub>種子を生産した。1つのイベントにつき1つのR<sub>1</sub>植物を選択して、各々のイベントを含有する各系統を継続させ、その1つのR<sub>1</sub>植物からの種子を、(a)自家受精(R<sub>3</sub>,<sub>4</sub>, ..., N)または(b)他のトウモロコシ系統、例えばトウモロコシ系統93IDI3との交雑受精によって、以後の試験のために増やした。DNAコンストラクト#890(表3の行11)の形質転換からのイベントに相当する植物も再生して、本実施例において後述する後続の圃場試験のための比較対照とした。

## 【0095】

Cry3Bb発現を含む表現型に基づいて、44イベントのうち、25イベントを選択して、先に進めた。これら25イベントに相当するR<sub>1</sub>植物をさらに、実施例1に記載のグロースチャンバー効力方法でWCR阻害について評価し、インサートDNAの多重遺伝要素のコピー数についても評価した。4つのイベントは2コピー以上のP<sub>s</sub>.R<sub>b</sub>cS2-E9 3'UTR遺伝要素を呈し、他の4つのイベントに相当するR<sub>1</sub>植物が0.8RDRを上回る根損傷評点を呈したので、25イベントのうちの17イベントを先に進めた

10

20

30

40

50

。

【 0 0 9 6 】

残り 17 のイベント、すなわち「 A 」、MON87411、および「 C 」～「 Q 」を含む後代植物をさらに、分子成績および圃場内成績について、並行して解析した（表 4 および表 5 参照）。

【 0 0 9 7 】

[ 表 4 ] D N A 形質転換ベクター # 417 からのインサート D N A を内包する 17 のトランスジェニックトウモロコシイベントの分子解析

【表4】

イベント	(A) バックボーン の不在	(B) 单一インサート かつ単コピー数	(C) 無傷のインサート	(D) Cry3Bb1タンパク質 発現	(E) 閾値を上回る IR Dv_Snf7o dsRNA発現	(F) 中立的挿入部 位	(G) 予想転写産 物サイズ
A	+	+	+	+	+	+	+
MON8411	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	-	-	-	-	+
E	+	+	+	+	+	+	NA
F	+	+	+	+	+	+	NA
G	+	+	+	+	+	+	NA
H	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
I	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
J	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
K	+	-	NA	NA	NA	NA	NA
L	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
M	-	+	NA	NA	NA	NA	NA
N	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
O	-	+	NA	NA	NA	NA	NA
P	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
Q	-	-	NA	NA	NA	NA	NA

「-」は、そのイベントが対応する分子解析の分子基準を満たさなかつたことを示す。「+」は、そのイベントが対応する分子解析の分子基準を満たしたことと示す。「NA」は、利用できるデータがなかったことを示す。

## 【0098】

イベントを、*Agrobacterium*形質転換ベクターのバックボーンDNAセグ

メントについて、また意図したインサートDNAの全ての部分の単コピー数について、スクリーニングした（表4（A）列および（B）列）。7つのイベント（MON87411、A、C、D、E、F、およびG）を、Agro媒介挿入中に起こるアグロバクテリウム左境界および右境界のニック部位変異を除けば形質転換ベクター#417と同一である挿入DNAの配列について解析したところ、イベントDはこの配列解析に不合格だった（表4（C）列）。これら7つのイベントを、植物発生全体および数世代を通したCry3Bbタンパク質およびDv\_Snf7o\_I R RNAの持続的植物発現についても評価したところ、7つのイベント全てが持続的植物発現に関する合格基準を満たした（表4（D）列）。7つのイベントのそれぞれをゲノム挿入部位特徴（すなわち中立的挿入部位）、例えばDNAの置換、重複および反復、内在性遺伝子との近さ、内在性遺伝子の中斷、およびQTLへの近さ、ならびにバイオテクノロジー形質について解析したところ、イベントE、F、およびGはこの解析に不合格だった（表4、（F）列）。Cry3BbをコードするまたはDv\_Snf7o\_I R RNAを生産する2つのRNA転写産物の予想されるサイズが、イベントからのRNA中に存在するかどうかを決定するために、イベントMON87411、A、C、およびDを含有する植物組織でノーザンプロットを行ったところ、評価したイベントの全てがこの基準に合格した（表4（G）列）。

#### 【0099】

これら17のイベントを農学的圃場試験、昆虫効力圃場試験およびグリホサート耐性効力圃場試験で評価した。その結果を表5に要約する。表5の列見出しあは圃場試験のタイプ（「農学」、「昆虫」、または「グリホサート」）を表し、イベントと比較／対比された対照を列挙し、イベント雑種を生成させるために使用した遺伝的近交系も列挙している。（A）～（C）列に要約した圃場試験は、（D）～（H）列に要約した圃場試験の1暦年前に、また（I）列に要約した圃場試験の2年前に植え付けられた。

#### 【0100】

[表5] 形質転換ベクター#417で生成したイベントの農学的圃場試験、昆虫効力圃場試験、およびグリホサート効力圃場試験からの結果

【表5】

圃場試験のタイプ	(A) 農学	(B) 農学	(C) 昆虫効力	(D) 農学	(E) グリホサート効力	(F) グリホサート効力	(G) グリホサート効力	(H) 昆虫効力	(I) 農学
比較として 使用した対照	LH244, #890	LH244×93ID13, #890	LH244, MON88017, #890	LH244, MON88017					
近交系または雜種	R3近交系	R3近交系	R2近交系 ×93ID13	R5近交系	R5近交系	R4近交系 ×MON89034	R4近交系 ×MON89034	R5近交系 ×R5近交系	
試験イベン	ト		<0.10 RDR	=	=		=	~0.10 RDR	-
A	=	=	NA	=	=	NA	NA	~0.10 RDR	=
MON87411	=	=	~0.10 RDR	=	=	NA	NA	~0.10 RDR	=
C	=	=	~0.10 RDR	=	=	NA	NA	~0.20 RDR	NA
D	=	=	~0.10 RDR	+	=	NA	NA	~0.15 RDR	=
E	=	=	NA	+	=	NA	NA	~0.15 RDR	=
F	=	=	NA	+	=	NA	NA	~0.15 RDR	=
G	=	=	NA	+	=	NA	NA	~0.15 RDR	=
H <sup>‡</sup>	-	=	~0.10 RDR	NA	NA	NA	NA	NA	NA
I <sup>‡</sup>	-	=	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
J†	=	=	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K	-	=	~0.15 RDR	=	NA	NA	NA	NA	NA
L	=	=	NA	=	NA	NA	NA	NA	NA
M	=	=	~0.20 RDR	+	NA	NA	NA	NA	NA
N	-	=	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA
O	=	=	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P	-	=	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Q	=	=	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【0101】

イベントを各圃場試験において対照と比べた。各圃場試験に関するデータは、複数の立

地にわたる反復試験区で平均した。L H 2 4 4 は形質転換系統に関する対照である。D N Aベクター「# 8 9 0」は、2 4 0 マー D v \_ S n f 7 o I R だけを発現するイベントを作製するために使用した。コウチュウ抵抗性およびグリホサート耐性をトウモロコシ植物に与える市販イベントM O N 8 8 0 1 7 を対照として使用した。「R N 近交系」は第N世代の後代を示している。圃場試験で評価した雑種イベントは、評価対象であるイベントからの片親(M O N 8 7 4 1 1、またはA ~ Q)と、表5(C、G、またはH列)に示す片親との交雑から収穫された種子から生長させた。具体的に述べると、表5において、列R 2 近交系 × 9 3 I D I 3 は、評価対象であるイベントのR 2 近交系を近交系トウモロコシ9 3 I D I 3と交雑して雑種種子を作ったことを示している。同様に、表5のG列およびH列において、R 4 近交系 × M O N 8 9 0 3 4 は、評価対象であるイベントのR 4 近交系後代を、イベントM O N 8 9 0 3 4を含有する植物と交雑して雑種種子を作ったことを示している。「N A」は、この試験イベントに関するデータ入手できなかったことを示す。「=」は、対照と比べて形質が等価であることを表す。「-」は、対照と比べた形質ヒットを表す。「+」は、対照と比べた成績の向上を表す。「R D R」は根損傷評点である。「ヰ」は、当該イベントが苗床で生長させた植物において表現型異型を呈したことを、同時期の温室研究が示したことを表す。「†」は、当該イベントがW C R効力を与えなかつたことを、同時期の温室研究が示したことを表す。

#### 【0102】

農学的圃場試験を北アメリカおよび南アメリカにある複数の立地で行い、表5のA列、B列、D列、およびI列に要約するように、結果を全ての立地にわたって平均した。これらの農学的圃場試験では、トウモロコシ穀粒を、完全乱塊(R C B)法で、1立地あたり1イベントあたり三重の試験区に植え付けた。各複製試験区は100個の穀粒からなった。試験保守は、穀粒生産量を最適化し、天然W C R圧を排除するように計画した。以下の標準的な農学的圃場試験評点の1つ以上を収集した：50%花粉飛散までの積算成長度日(degree units to 50% shed)(G D U)、育種家スコア(Breeder's score)(B R)、実生の活力(seedling vigor)(S D V)、茎倒伏(stalk lodging)(S T L C)、根倒伏(root lodging)(R T L C)、成熟植物の穗高(ear height of mature plants)(E H T)、成熟植物の草高(plant height of mature plants)(P H T)、穀粒水分(grain moisture)(M S T)、および穀粒試験重量(grain test weight)(T W T)、表現型異型(phenotypic off-types)、および穀粒収量(grain yield)。近交系イベントと雑種イベントをどちらも評価した。結果を表5のA、B、D、およびI列に要約する。1立地あたり1対照あたり三重の試験区に適当な対照を含めた。評点を全ての立地にわたる試験区で平均した。データを分散分析に付し、平均を5%確率水準の最小有意差(L S D(0.05))で分離した。

#### 【0103】

北アメリカにある複数の立地にわたって平均したW C R損傷についての解析を含む昆虫効力圃場試験の結果を表5のC列およびH列に要約する。これらの効力圃場試験では、トウモロコシ穀粒が、R C B法で、1立地あたり1イベントあたり三重の試験区に植え付けられ、各複製試験区は25個の穀粒からなった。試験イベントは雑種植物として提示された。適当な対照を1立地あたり1対照あたり三重の試験区に含めた。トウモロコシの試験区がそのV 2 生長段階に到達したら、1試験区あたり5つの植物に、1植物あたり3,330卵の割合で、W C R卵を寄生させた。V 1 0 生長段階中に、1試験区あたり5つの被害植物の根を掘り起こし、洗浄し、0 R D Rを根損傷なし、3 R D Rを最大根損傷とする、0 ~ 3の根損傷評点(R D R)に基づいて、食害を評価した。試験イベントと対照植物のR D Rを、全ての立地における全ての試験区にわたる植物で平均した。各昆虫効力圃場試験の陰性対照植物は、それぞれ1.7 R D Rおよび1.5 R D Rの平均R D Rを呈した。各昆虫効力圃場試験の市販品査照標準は、それぞれ0.25 R D Rおよび0.20 R D Rの平均R D Rを呈した。DNAコンストラクト# 8 9 0からのイベントを含有する植物

10

20

30

40

50

は、約 0 . 3 5 ~ 0 . 5 0 R D R の範囲の R D R を呈した。D N A コンストラクト # 4 1 7 からのイベントは、一貫して、平均 R D R スコアが 0 . 2 5 R D R の経済的被害閾値未満である植物を与えた。

**【 0 1 0 4 】**

北アメリカにある複数の立地で行われたグリホサート除草剤処置に対する生育耐性 ( v e g e t a t i v e t o l e r a n c e ) を評価する効力圃場試験の結果を表 5 の F 列および G 列に要約する。これらの効力圃場試験について、個々の試験に使用したグリホサート施用レジメンを表 6 ( 表 5 の F 列に対応 ) および表 7 ( 表 5 の G 列に対応 ) に提示する。

**【 0 1 0 5 】**

[ 表 6 ] 除草剤圃場試験処置

**【 表 6 】**

処置	施用量(1 b s a e / A)	日程(植物段階による)
グリホサート	1. 5	V 2
グリホサート	1. 5、0. 75、0. 75	V 2、V 8、V 1 0
グリホサート	1. 5、1. 125、1. 125	V 2、V 8、V 1 0

10

20

「 1 b s a e 」はポンド ( 酸換算 ) を示す。 「 A 」はエーカーを示す。

**【 0 1 0 6 】**

[ 表 7 ] 除草剤圃場試験処置

**【 表 7 】**

処置	施用量(1 b s a e / A)	日程(植物段階による)
無処置	0. 0	該当なし
グリホサート	1. 5、1. 5	V 4、V 8
グリホサート	3. 0、3. 0	V 4、V 8
グリホサート	4. 5、4. 5	V 4、V 8

30

「 1 b s a e 」はポンド ( 酸換算 ) を示す。 「 A 」はエーカーを示す。

**【 0 1 0 7 】**

植物 1 0 0 体の各試験区を、各処置の最後の散布の 7 ~ 1 0 日後に、作物被害について評定した。作物被害評点には萎黄病、奇形、および平均低草高を含めた。これらはいずれもグリホサート除草剤に対する低い耐性を示す。各試験区を、P H T 、E H T 、5 0 % 花粉飛散までの日数 ( D 5 0 P ) 、5 0 % 絹糸出現までの日数 ( D 5 0 S ) 、T W T 、M S T 、および収量についても評定した。イベントは近交系植物および雑種植物として提供され、イベント M O N 8 8 0 1 7 と比べられた。イベント「 A 」、M O N 8 7 4 1 1 、「 D 」、「 E 」、および「 G 」は、作物被害、P H T 、E H T 、D 5 0 P 、D 5 0 S 、T W T 、M S T 、および収量評点に関して、イベント M O N 8 8 0 1 7 と等価であった。他のイベントおよび市販の M O N 8 8 0 1 7 イベントと比べたイベント M O N 8 7 4 1 1 の有意な R D R 優位性を加味したこれらの結果に基づいて、イベント M O N 8 7 4 1 1 を選択した。

40

**【 実施例 3 】**

**【 0 1 0 8 】**

この実施例ではイベント M O N 8 7 4 1 1 の分子キャラクタリゼーションを説明する。葉組織の試料を ( R <sub>0</sub> ) M O N 8 7 4 1 1 植物から採取した。イベント M O N 8 7 4 1 1

50

中のトランスジェニック挿入部位に対応するゲノムDNAの配列決定を行ったところ、ベクター#417に対応する形質転換ベクター中の配列と比べて相違は認められなかった。

#### 【0109】

隣接配列を、トウモロコシB73リファレンスゲノム(Ref B73)を含むトウモロコシゲノムリファレンス配列にマッピングした。イベントMON87411は物理的に第9染色体上にあると決定された。左隣接/インサートDNA接合部における隣接配列の末端は、位置ZM\_B73\_CRO9:39261797に対応する。右隣接/インサートDNA接合部における隣接配列の末端は、位置ZM\_B73\_CRO9:39261915に対応する。イベントMON87411の隣接配列を、ゲノム重複、反復、および内在性遺伝子について解析した。いずれも検出されなかった。

10

#### 【0110】

イベントMON87411中の挿入DNAの配列解析により、Agrobacterium左境界(随意にインサートの5'端と設定した)の263ヌクレオチドだけ、およびAgrobacterium右境界(随意にインサートの3'端と設定した)の15ヌクレオチドだけが、イベントMON87411のゲノム挿入部位にある挿入DNAに保たれていることが確認された。

#### 【0111】

イベントMON87411の挿入DNAに隣接するゲノム配列と、LH244からの野生型アレルにおける挿入部位の対応ゲノム領域とを、比較解析した。この解析により、LH244ゲノムDNAの118塩基対セグメントが、イベントMON87411の生成過程で、形質転換ベクター#417の挿入DNAによって置き換えられることが決定された。

20

#### 【実施例4】

#### 【0112】

この実施例では、トウモロコシ試料におけるイベントMON87411に由来するDNAの存在を同定するのに役立つ方法を説明する。ゲノムDNAとイベントMON87411の挿入DNAの随意に割り当てられた5'端との間に形成され、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号21に包含される、ユニークな接合部(すなわち左接合部)を同定することを目的として、一対のプライマーおよびプローブを設計した。オリゴヌクレオチドフォワードプライマーSQ27011の配列(配列番号18)は、配列番号1および配列番号2の位置462~490、配列番号7の位置107~135、配列番号6の位置72~100、配列番号5の位置12~40、および配列番号21の位置1~29に対応するヌクレオチド配列と同一である。オリゴヌクレオチドリバースプライマーSQ9085の配列(配列番号20)は、配列番号1および配列番号2の位置516~541、配列番号7の位置161~186、配列番号6の位置126~151、配列番号5の位置66~91、配列番号4の位置16~41、および配列番号21の位置55~80に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。オリゴヌクレオチドプローブPB3552の配列(配列番号19)は、配列番号1および配列番号2の位置502~515、配列番号7の位置147~160、配列番号6の位置112~125、配列番号5の位置52~65、配列番号4の位置2~15、および配列番号21の位置41~54に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。PCRプライマーSQ27011(配列番号18)およびSQ9085(配列番号20)は、イベントMON87411の左接合部にあるユニークなゲノム/インサートDNAの79ヌクレオチドアンプリコンを增幅する。これと同じプライマー対を、蛍光標識(すなわち6FAM(商標)蛍光ラベル)されたプローブPB3552(配列番号19)と共に、試料におけるイベントMON87411に由来するDNAの存在を同定するためのEnd point TaqMan(登録商標)PCRアッセイにおいて使用することができる。

30

#### 【0113】

ゲノムDNAとイベントMON87411の挿入DNAの随意に割り当てられた3'端との間に形成され、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号8、配列番号9、配

40

50

列番号 10、または配列番号 25 に包含される、ユニークな接合部（すなわち右接合部）を同定することを目的として、一対のプライマーおよびプローブを設計した。オリゴヌクレオチドフォワードプライマー S Q 2 7 0 6 6 の配列（配列番号 22）は、配列番号 1 の位置 1 1 7 1 0 ~ 1 1 7 2 8、配列番号 4 の位置 1 1 2 1 0 ~ 1 1 2 2 8、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 の位置 4 5 ~ 6 3、および配列番号 25 の位置 1 ~ 1 9 に対応するヌクレオチド配列と同一である。オリゴヌクレオチドリバースプライマー S Q 2 6 9 7 7 の配列（配列番号 24）は、配列番号 1 の位置 1 1 7 5 6 ~ 1 1 7 8 4、配列番号 8 の位置 9 1 ~ 1 1 7、配列番号 9 および配列番号 10 の位置 9 1 ~ 1 1 9、配列番号 3 の位置 2 3 ~ 5 1、および配列番号 25 の位置 4 7 ~ 7 5 に対応するヌクレオチド配列の逆相補体と同一である。オリゴヌクレオチドプローブ P B 1 1 3 0 0 の配列（配列番号 23）は、配列番号 1 の位置 1 1 7 3 1 ~ 1 1 7 5 5、配列番号 4 の位置 1 1 2 3 1 ~ 1 1 2 4 8、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 の位置 6 6 ~ 9 0、配列番号 3 の位置 1 ~ 2 2、および配列番号 25 の位置 2 2 ~ 4 6 に対応するヌクレオチド配列と同一である。P C R プライマー S Q 2 7 0 6 6（配列番号 22）および S Q 2 6 9 7 7（配列番号 24）は、イベント M O N 8 7 4 1 1 の右接合部にあるユニークなゲノム／インサート D N A の 7 5 ヌクレオチドアンプリコンを増幅する。これと同じプライマー対を、蛍光標識（すなわち 6 F A M（商標）蛍光ラベル）されたプローブ P B 1 1 3 0 0（配列番号 23）と共に、試料におけるイベント M O N 8 7 4 1 1 に由来する D N A の存在を同定するための E n d p o i n t T a q M a n（登録商標）P C R アッセイにおいて使用することができる。10  
20

#### 【 0 1 1 4 】

試料中のイベント M O N 8 7 4 1 1 に由来する D N A にユニークであってその存在を検出するのに役立つ配列番号 1 内の配列を増幅しかつ／またはその配列にハイブリダイズするように、S Q 2 7 0 1 1、S Q 9 0 8 5、P B 3 5 5 2、S Q 2 7 0 6 6、S Q 2 6 9 7 7、および P B 1 1 3 0 0 に加えて、他のプライマーおよび／またはプローブも設計できることは、当業者には明らかなはずである。

#### 【 0 1 1 5 】

分子解析および配列解析に基づいて、イベント同定アッセイのための P C R アッセイをイベント M O N 8 7 4 1 1 用に開発した。標準的な分子生物学実験実務に従って、標準的 P C R アッセイまたは T a q M a n（登録商標）P C R アッセイのいずれかのパラメータを、試料におけるイベント M O N 8 7 4 1 1 に由来する D N A の存在を検出するために使用したプライマー対とプローブ（すなわち 6 F A M（商標）などの蛍光タグで標識されたプローブ）の各セット（S Q 2 7 0 1 1、S Q 9 0 8 5、および／もしくは P B 3 5 5 2、または S Q 2 7 0 6 6、S Q 2 6 9 7 7、および／もしくは P B 1 1 3 0 0）で最適化した。一般に、最適化されたパラメータには、プライマー濃度、プローブ濃度、テンプレート D N A の量、P C R 増幅サイクルパラメータが含まれた。P C R 反応用の対照には、トウモロコシゲノム中の内部対照单コピー遺伝子に特異的なプライマー（S Q 2 0 2 2 1（配列番号 38）および S Q 2 0 2 2 2（配列番号 40））および／またはプローブ（P B 1 0 0 6 5（配列番号 39））（V I C（商標）などの蛍光タグで標識されたプローブ）を含めた。内部対照プローブとして使用するかまたは P C R アッセイ（例えば T a q M a n（登録商標））における内部対照として使用するためのアンプリコンを増幅するためには、使用することができるトウモロコシゲノム中の单コピー遺伝子に特異的な他の P C R プライマーを設計する方法は、当業者にはわかるであろう。次のそれぞれについて D N A を葉組織から抽出した：[ 1 ] 解析対象である葉試料；[ 2 ] 陰性対照（非トランスジェニックトウモロコシ D N A）；[ 3 ] 陰性水対照（テンプレートなし）；および [ 4 ] 陽性対照 M O N 8 7 4 1 1 D N A。標準的 P C R アッセイからのアンプリコンの検出は、D N A ゲル電気泳動によって可視化され、T a q M a n（登録商標）P C R アッセイの場合は蛍光検出によって可視化されるであろう。30  
40

#### 【 0 1 1 6 】

接合性アッセイは、あるイベントを含む植物がそのイベント D N A についてホモ接合で50

あるか、すなわち染色体対の各染色体上の同じ場所に外因性DNAを含むか、それともあるイベントDNAに関してヘテロ接合であるか、すなわち外因性DNAを染色体対の一方の染色体上にのみ含むか、それともそのイベントDNAについてヌル、すなわち野生型であるかを決定するのに役立つ。イベントMON87411を含有するトウモロコシ植物の接合性は、熱増幅(PCR)方法によって、またはEnd point TaqMan(登録商標)方法によって、決定することができる。例えばPCR増幅の場合は、プライマー対SQ27011(配列番号18)およびSQ26977(配列番号22)が、イベントMON87411インサートに隣接するゲノムDNA内でハイブリダイズする。このプライマー対は、イベントMON87411に由来するDNAが試料中に存在すれば、11323ヌクレオチド長のアンプリコンを生成させることになる。試料中のトウモロコシDNAがイベントMON87411に由来していない場合は、これと同じプライマー対が、約150ヌクレオチド長しかないアンプリコンを生成することになる。DNAゲル電気泳動において、11323bpの単一バンドは、試料中のDNAがホモ接合MON87411イベントであることを示し、約150bpの単一バンドは試料中のDNAがMON87411イベントからのものではないことを示し、11323bpのバンドと約150bpのバンドの両方の存在は、試料中のDNAがMON87411イベントに関してヘテロ接合であるトウモロコシ植物からのものであることを示す。

## 【0117】

イベントMON87411を含有するトウモロコシ植物の接合性を決定するためのTaqMan(登録商標)アッセイを開発することができる。このアッセイのために、3つまたは4つのプライマーと2つのプローブとが設計され、この際、[1]第1プライマー対と第1プローブは試料中のイベントMON87411 DNAの存在の検出に関して特異的であり、[2]第1プライマー対とは異なる第2プライマー対と、第1プローブとは異なる第2プローブは、野生型トウモロコシDNAの存在(すなわちイベントMON87411を含有しない試料)の検出に関して特異的である。TaqMan(登録商標)または類似のアッセイでは、第1プローブだけからの蛍光シグナルが、イベントMON87411に関してホモ接合である植物を示し、それに特徴的であり、第1プローブと第2プローブの両方からの蛍光シグナルが、イベントMON87411に関してヘテロ接合である植物を示し、それに特徴的であり、第2プローブだけからの蛍光シグナルが、野生型アレルに関してホモ接合である(すなわちイベントMON87411に関してヌルである)植物を示し、それに特徴的である。

## 【実施例5】

## 【0118】

この実施例では、現行の市販品(MON88017およびDAS-59122-7)および陰性対照植物と比べた時の、イベントMON87411を含む植物の、コーンルートワーム損傷からの優れた保護を説明する。イベントMON87411、MON88017、DAS-59122-7、および陰性対照をそれぞれ135体の植物で比較する効力圃場試験を行った。根損傷評点(RDR)を収集した。RDRが経済的被害レベル(0.25RDR)未満である植物のパーセンテージを表8に示す。

## 【0119】

表8は、イベントMON87411を含有する植物のうち、0.25RDRの経済的閾値を上回るRDRを呈したのは、約4%だけであったことを示している。対照的に、MON88017を含有する市販植物の22%は、0.25RDRの経済的閾値を上回るRDRを呈した。また、DAS-59122-7を含有する市販植物の20%は、0.25RDRの経済的閾値を上回るRDRを呈した。また、陰性対照植物の96%は、0.25RDRの経済的閾値を上回るRDRを呈した。これらのデータからの結論は、イベントMON87411は、市販品MON88071およびDAS-59122-7ならびに陰性対照と比べて、コーンルートワーム損傷からの保護を提供するのに、明らかに優れているというものである。

## 【0120】

10

20

30

40

50

[表8] 0.25RDRを呈する植物のおよそのパーセンテージによる効力圃場試験の結果

【表8】

試験したイベント	$\leq 0.25\text{RDR}$ を呈する植物のおよそのパーセンテージ
イベントMON87411	96
MON88017	78
DAS-59122-7	80
陰性対照植物	4

試験には各試験イベントにつき135体の植物を含めた。

10

## 【0121】

コーンルートワームの極端な寄生圧でのイベントMON87411の成績を試験するために、効力温室試験を行った。この試験では次のイベントを評価した：イベントMON87411、dsRNAだけを発現するDNAベクター#890による形質転換からのイベント、MON88017、DAS-59122-7、および陰性対照。これら高圧効力試験のために、評価対象であるトウモロコシ植物を温室中の鉢で生長させた。極端な寄生圧は、V2生長段階で1鉢あたり約2,000個のWCR卵、次に1~1/2週間の間隔でさらに4回、1回あたり1鉢あたり約1,000個のWCR卵により、各ポットに合計で約6,000個のWCR卵を加える、各鉢植え植物の逐次的寄生によって達成した。VT生長段階で植物の根を取り出し、洗浄し、RDRについて評定した。全13体(N=13)の陰性対照植物からの根は最大根損傷、すなわち3RDRの絶対RDRを呈した。これらの結果は、イベントMON87411が、コーンルートワームの防除に関して、入手可能な他のトウモロコシイベントより優れていることを例証している(表9)。

20

## 【0122】

[表9] 高コーンルートワーム寄生圧下での根損傷評点(RDR)(N=評価した植物の数)

【表9】

イベント	平均RDR	下側および上側95%信頼限界
陰性対照(N=13)	3.0	絶対的
dsRNAのみ(N=11)	0.36	0.17/0.54
MON88017(N=11)	2.1	1.8/2.4
DAS-59122-7(N=16)	0.29	0.17/0.42
MON87411(N=13)	0.06	0.03/0.08

30

## 【0123】

コーンルートワームトランスジェニックイベントの効力の一つの尺度は、温室で栽培された植物の鉢植え土壌からの成体甲虫の出現を決定することによる。鉢で生長させたイベントMON87411植物の土壌からの成体コーンルートワーム甲虫の出現を決定するために、上述したものと同様に、WCR卵を寄生させた土壌が入っている鉢で10~15体の植物を発芽させた。生長期間中は常に各トウモロコシ植物をメッシュ袋で覆って、出現した成体甲虫があれば全て入るようにした。

40

## 【0124】

上記地上成体甲虫の計数を、植物出芽の6、12、および18週間後に行い、試験の最後に、根をRDRについて評価した。イベントMON87411を含有する植物を陰性対照植物および他のコーンルートワーム防御トランスジェニックイベントと比べた。イベントMON87411植物を鉢植えした土壌からの出現が観察された甲虫の数は、他のコーンルートワーム防御トランスジェニックイベントと比べて有意に少ないという結果になり、コーンルートワーム損傷から保護するイベントMON87411の優れた性質が例証された。

## 【実施例6】

50

## 【0125】

この実施例では、それぞれ異なるコーンルートワーム毒性作用物質の発現を駆動するトウモロコシ細胞中の2つの異なるプロモーターの配向が、コーンルートワーム幼虫の食物に入れて提供された場合に効力を呈するトランスジェニックイベントの割合を、著しく改善しうることを例証する。

## 【0126】

トウモロコシ細胞を、4つの異なる植物形質転換ベクターpMON120417、pMON120434、pMON120416、またはpMON120419のうちの1つで形質転換してトランスジェニックイベントを取得し、それをトランスジェニックトウモロコシ植物に再生させた。

10

## 【0127】

図4に関して、植物形質転換ベクターはいずれも、3つの発現カセット1、2、および3を含み、それらは一端をAgrobacterium左境界(LB)で、また他端をAgrobacterium右境界(RB)で区切られている。コーンルートワーム毒性dsRNAは、4つのベクターのいずれにおいても、カセット1から、強化カリフラワー・ザイクウイルス35S(e35S)プロモーターによって発現する。ベクターpMON120417、pMON120434中のコーンルートワーム毒素タンパク質Cry3Bbは、カセット2から、Zm.PIIGプロモーターによって発現する。ベクターpMON120416、pMON120419中のコーンルートワーム毒素タンパク質Cry3Bbは、カセット2から、Os.Rcc3プロモーターによって発現する。4つのベクターのいずれにおいても、グリホサート除草剤耐性を付与するタンパク質CTP-EPSPS

20

CP4は、カセット3から、Os.TubA3プロモーターによって発現する。4つのベクターのいずれにおいても、カセット1とカセット3は同じ相対的配向にある。図4に関して、ブロック矢印は各カセットのそれぞれにおけるプロモーターからの発現の向きを示している。

## 【0128】

ベクターpMON120417およびpMON120434におけるカセット2の相対的配向は、プロモーターからの発現の向きを示すブロック矢印(図4)によって図解されるように、逆である。pMON120417におけるカセット2からのCry3Bbコーンルートワーム毒素タンパク質の発現は、カセット1から発現するコーンルートワーム毒性dsRNAの発現の向きからは分岐している。pMON120434におけるカセット2からのCry3Bbコーンルートワーム毒素タンパク質の発現は、カセット1からのコーンルートワーム毒性dsRNAの発現と同じ配向にある。

30

## 【0129】

ベクターpMON120416とpMON120419におけるカセット2の相対的配向は、プロモーターからの発現の向きを示すブロック矢印(図4)によって図解されるように、逆である。pMON120416におけるカセット2からのCry3Bbコーンルートワーム毒素タンパク質の発現は、カセット1から発現するコーンルートワーム毒性dsRNAの発現の向きからは分岐している。pMON120419におけるカセット2からのCry3Bbコーンルートワーム毒素タンパク質の発現は、カセット1からのコーンルートワーム毒性dsRNAの発現と同じ配向にある。

40

## 【0130】

表10からわかるように、トランスジェニックトウモロコシ植物からの組織をコーンルートワームのDiabrotica種の食物に入れて与えると、コンストラクトpMON120417またはpMON120416(コーンルートワーム毒性コンポーネントの分岐発現)のどちらかを使った形質転換によって生成した植物は、コンストラクトpMON120434またはpMON120419(タンデム配向または同じ配向の発現)のどちらかを使った形質転換によって生成した植物と比べると、殺虫活性に関して、より有効であった(表10)。表10のデータによって示されるとおり、ベクターpMON120417およびpMON120416を使った形質転換から生成した有効なイベントの割合は

50

、ベクター pMON120416 および pMON120419 からの有効なイベントの割合と比べて、有意に大きかった。例えば、分岐プロモーターがコーンルートワーム毒性コンポーネントの発現を駆動するベクター pMON120417 から生成したイベントの場合、43イベントのうちの11イベント、すなわちほぼ25%のイベントが、ルートワームの有効な防除を呈した。対照的に、プロモーターがコーンルートワーム毒性コンポーネントのタンデム配向での発現を駆動するベクター pMON120434 から生成したイベントについては、有効なイベントが得られなかった。分岐プロモーターがコーンルートワーム毒性コンポーネントの発現を駆動するベクター pMON120416 から生成したイベントについては、27イベントのうちの17イベント、すなわち約63%のイベントが、ルートワームの有効な防除を呈した。対照的に、プロモーターがコーンルートワーム毒性コンポーネントのタンデム配向での発現を駆動するベクター pMON120419 から生成したイベントについては、有効なイベントが約18.5%しか得られなかった。これらのデータは、2つの異なるコーンルートワーム毒性作用物質の発現を分岐した向きにそれぞれ駆動する2つの異なるプロモーターを持つ植物形質転換ベクターからトランスジェニックトウモロコシ植物を生成させ、そのトランスジェニックトウモロコシ植物をコーンルートワーム幼虫の食物に入れて提供すれば、有効イベント数が著しく改善され、効力を呈するトランスジェニックイベントの割合が改善されることを実証している。  
10

## 【0131】

[表10] 4つの植物形質転換ベクターから得られたR0イベントの数および有効イベントの数を示す結果  
20

## 【表10】

コンストラクト	R0イベントの数	有効イベント数
pMON120417	43	11
pMON120434	8	0
pMON120416	27	17
pMON120419	43	8

## 【実施例7】

## 【0132】

強化された農学的性質、殺虫特性、または除草剤特性を含むトウモロコシ植物またはその植物部分を作製するために、イベントMON87411を含有するトウモロコシ植物を、潜在的に任意の他のトウモロコシイベントまたはそれらの組み合わせを含有するトウモロコシ植物と交雑し、表現型を評価することで、その結果生じる後代植物の性質を決定することができる。限定でない一例として、MON87411を次の1つ以上の組み合わせを含むトウモロコシ植物と交雑することができる：DAS-59122-7；MIR604；MON89034；MON87411；MON87427；TC1507；5307；DAS-06275-8；BT176；BT11；およびMIR162。  
30

【図 1】

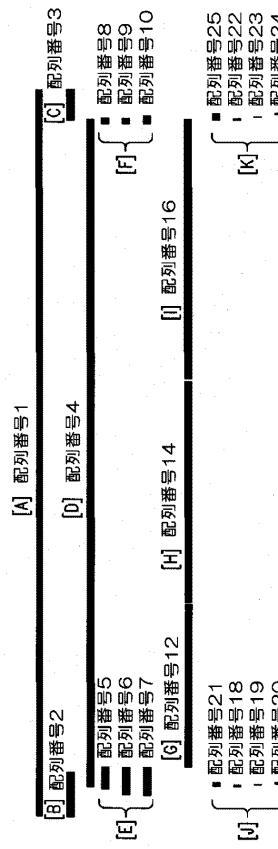


FIG.1

【図 2】

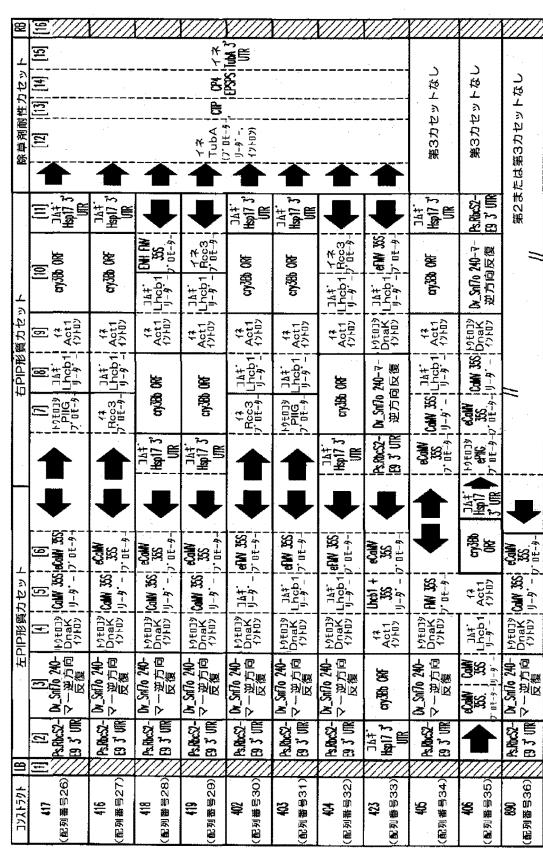


FIG.2



右から左に向かうカセットの方向性を示す

【図 3】

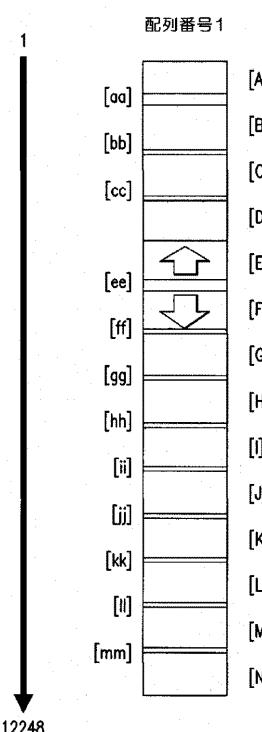


FIG.3

【図 4】

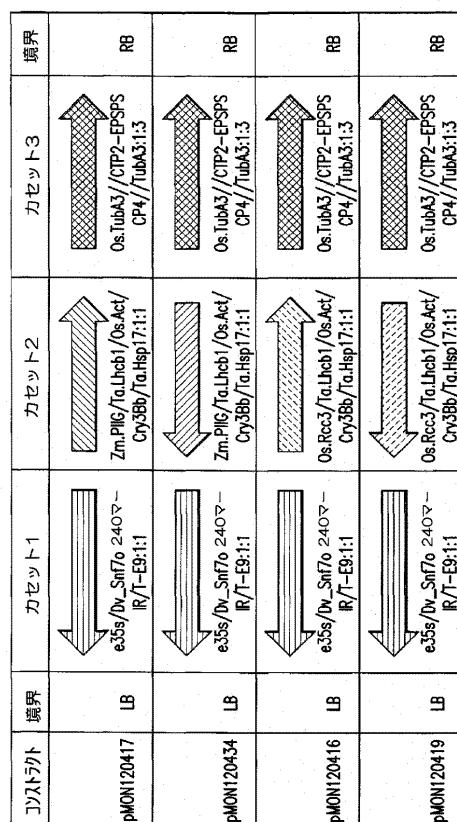
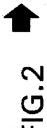


FIG.4



左から右に向かうカセットの方向性を示す

【配列表】

0006315481000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 2 3 K 10/30 (2016.01)	A 2 3 K 10/30
A 2 3 L 7/10 (2016.01)	A 2 3 L 7/10 H
A 2 3 D 9/00 (2006.01)	A 2 3 D 9/00

(72)発明者 ウエン・シー・バーンズ  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 キャサリン・エイ・チャイ  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 シェリル・エル・クローニンガー  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 デン・ミンチー  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 スタニスラフ・フラシンスキ  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 クンシェン・ウ  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 特表2 0 0 7 - 5 1 3 6 4 1 (JP, A)

Nat.Biotech.2007,25(11),p.1322-1326

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
P u b M e d