

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6182530号
(P6182530)

(45) 発行日 平成29年8月16日(2017.8.16)

(24) 登録日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(51) Int.Cl.	F 1
AO 1 H 5/00	(2006.01)
AO 1 H 5/10	(2006.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
AO 1 N 63/00	(2006.01)
AO 1 P 7/04	(2006.01)
AO 1 H	5/00
AO 1 H	5/10
C 12 N	15/00
AO 1 N	63/00
AO 1 P	7/04

請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-522992 (P2014-522992)
(86) (22) 出願日	平成24年7月26日 (2012.7.26)
(65) 公表番号	特表2014-531197 (P2014-531197A)
(43) 公表日	平成26年11月27日 (2014.11.27)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/048302
(87) 國際公開番号	W02013/016516
(87) 國際公開日	平成25年1月31日 (2013.1.31)
審査請求日	平成27年7月24日 (2015.7.24)
(31) 優先権主張番号	61/521,798
(32) 優先日	平成23年8月10日 (2011.8.10)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/511,664
(32) 優先日	平成23年7月26日 (2011.7.26)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	501035309 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ ー
	アメリカ合衆国 インディアナ州 462 68, インディアナポリス, ジオナ ヴィレ ロード, 9330
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74) 代理人	100126354 弁理士 藤田 尚
(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ダイズイベント p DAB 9582. 814. 19. 1 と p DAB 4468. 04. 16. 1 の昆
虫抵抗性および除草剤耐性育種スタック

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

昆虫を昆虫抵抗性ダイズ植物に曝露させて、それにより昆虫を防除するステップを含む、昆虫を防除する方法であって、前記ダイズ植物が配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される第1の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される第2の配列を含むDNAを含み、前記第1の配列および第2の配列が、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1の存在に特徴的であり、前記ダイズ植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1を含む、方法。
10

【請求項 2】

前記昆虫がスパドテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (ツマジロクサヨ
トウ) である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ダイズ作物において雑草を防除する方法であって、グルホシネット除草剤、フェノキシ
酢酸除草剤、ピリジルオキシ酢酸除草剤、またはそれらの組合せを、ダイズ作物を含む地

域に施用するステップを含み、前記ダイズ作物が配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される第1の配列を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される第2の配列を有するDNAを含むダイズ植物を含み、前記配列がダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1の存在に特徴的であり、前記ダイズ植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、方法。
10

【請求項4】

ダイズ植物を育種する方法であって、

第1の植物と第2のダイズ植物を交雑させて第3のダイズ植物を作出するステップであり、前記第1の植物が配列番号1の1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含み、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含むDNAを含む、ステップと、前記第3のダイズ植物を、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物を含むDNAの存在についてアッセイするステップとを含み、前記第3のダイズ植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、方法。
20
30

【請求項5】

シュードブルシア・インクルデンス(*Pseudoplusia includens*)（ダイズシャクトリムシ）に対して抵抗性であり、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有するDNAを含み、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、ダイズ植物またはその部位。
40

【請求項6】

請求項5に記載の植物の種子であって、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303から選択される少なくとも1つのヌ
50

クレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有するDNAを含み、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、種子。

【請求項7】

ダイズミール、ダイズ粉(soy flour)、ダイズタンパク質濃縮物、およびダイズ油(soy oil)からなる群から選択される生産品である、請求項5に記載のダイズ植物またはその部位に由来する組成物であって、前記ダイズ植物またはその部位が、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有するDNAを含み、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、組成物。

10

20

【請求項8】

ダイズの粒、種子、ミール、または粉において害虫を防除する方法であって、前記粒、種子、ミール、または粉が配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物を含むDNAを含むことによって実証される、前記粒、種子、ミール、または粉にダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含めるステップを含む方法。

30

【請求項9】

ゲノム内に、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；配列番号2のbp3～303からなる群から選択される第1のDNA配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される第2のDNA配列、ならびにその相補物を含むダイズ種子であって、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、種子。

40

【請求項10】

請求項9に記載のダイズ種子から生長させたダイズ植物であって、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp

50

2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される少なくとも1つのスクレオチド配列およびその相補物を有するDNAを含み、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、ダイズ植物。

【請求項11】

花粉、胚珠、花、苗条、根、および葉からなる群から選択され、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、請求項10に記載のダイズ植物の部位。

【請求項12】

ダイズミールおよびダイズ粉(soybean flour)からなる群から選択される生産品である、請求項10に記載のダイズ植物またはその部位に由来する組成物であって、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される少なくとも1つのスクレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される少なくとも1つのスクレオチド配列およびその相補物を有するDNAを含み、前記ダイズ植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を含む、組成物。

10

20

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1とpDAB4468.04.16.1の昆虫抵抗性および除草剤耐性育種スタックに関する。

【背景技術】

【0002】

Cry1FおよびCry1Ac synpro(Cry1Ac)をコードする遺伝子は、昆虫抵抗性、例えば、鱗翅目の昆虫に対する抵抗性をトランスジェニック植物に付与することができ、PAT(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)をコードする遺伝子は、除草剤ホスフィノトリシン(グルホシネート)に対する耐性をトランスジェニック植物に付与することができる。PATは、昆虫抵抗性トランスジェニック作物の作出における選択マーカーとして、および除草剤グルホシネートに対する商業的なレベルの耐性をトランスジェニック作物に付与するための両方に使用するために、ダイズにおいて首尾よく発現されている。AAD-12(アリールオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ-12)をコードする遺伝子は、トランスジェニック植物において発現されると、フェノキシ酢酸除草剤である2,4-DおよびMCPA、ならびにピリジルオキシ酢酸除草剤であるトリクロピルおよびフルロキシピルに対する商業的なレベルの耐性を付与することができる。

【0003】

植物における外来遺伝子の発現は、おそらくクロマチン構造(例えば、ヘテロクロマチン)のため、または組み込み部位に近い転写調節エレメント(例えば、エンハンサー)の近傍にあることに起因して、植物ゲノムにおけるそれらの位置の影響を受けることが公知である(Weisingら、Ann. Rev. Genet. 22巻:421～477頁、1988年)。同時に、ゲノム内の異なる位置に導入遺伝子が存在することが、植物の全体的な表現型に違ったふうに影響を及ぼす。この理由のために、多くの場合、対象の導入された遺伝子の最適な発現を特徴とするイベントを同定するためには、多数のイベントをスクリーニングすることが必要で

50

ある。例えば、植物および他の生物体において、イベント間で導入された遺伝子の発現のレベルが広範に変動する可能性があることが観察された。発現の空間パターンまたは時間パターンにも差があることがある。例えば、種々の植物組織における導入遺伝子の相対的な発現量の差は、導入される遺伝子構築物中に存在する転写調節エレメントから予測されるパターンに対応しない可能性がある。このために、何百から何千もの異なるイベントを作出し、それらのイベントを、導入遺伝子の所望の発現レベルおよび発現パターンを有する単一のイベントについて商業目的のためにスクリーニングすることが一般的である。導入遺伝子の発現の所望のレベルまたはパターンを有するイベントは、従来の育種方法を使用して、有性異系交雑によって導入遺伝子を他の遺伝的背景に遺伝子移入するために有用である。そのような交雑の後代は、元の形質転換体の導入遺伝子の発現特性を維持する。この戦略を使用して、その土地の生長条件によく適合する多数の品種における信頼性の高い遺伝子発現を確実にする。

10

【0004】

有性交雫の後代が対象の導入遺伝子または導入遺伝子の群を含有するかどうかを決定するため、特定のイベントまたは多数のイベントの存在を検出することができる望ましい。さらに、特定のイベントまたは多数のイベントを検出するための方法は、例えば、組換え作物に由来する食物の市販前承認および表示を必要とする規制に合致するため、または、環境のモニタリング、圃場内の作物の形質のモニタリング、または作物収穫で得られる生産物のモニタリングにおいて使用するため、ならびに、規制条項および契約条項に従う関係者のコンプライアンスを確実にすることにおいて使用するために役立つ。

20

【0005】

1つまたは複数のトランスジェニックイベントの存在は、これらに限定されないが、核酸プローブを使用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはDNAのハイブリダイゼーションを含めた当技術分野で公知の任意の核酸検出方法によって検出することが可能である。これらの検出方法では、一般に、多くのDNA構築物に関して、コード領域を交換することができるので、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子などの遺伝エレメントを使用することに焦点を合わせることも多い。結果として、そのような方法は、挿入された異種DNAに近接する隣接DNAのDNA配列が既知でなければ、異なるイベント、特に、同じDNA構築物または非常に類似した構築物を使用して作出されたイベント間を識別するためには有用でない可能性がある。例えば、イベント特異的なPCRアッセイは、トウモロコシイベントDAS-59122-7について米国特許出願第2006/0070139号に記載されている。育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1を同定するための単純かつ識別力のある方法を有することが望ましい。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下を提供する。

[1] 昆虫を昆虫抵抗性ダイズ植物に曝露させて、それにより昆虫を防除するステップを含む、昆虫を防除する方法であって、上記ダイズ植物が配列番号1のbp1385~1415；配列番号1のbp1350~1450；配列番号1のbp1300~1500；配列番号1のbp1200~1600；配列番号2のbp137~168；配列番号2のbp103~203；および配列番号2のbp3~303からなる群から選択される第1の配列；ならびに配列番号15のbp2680~2780；配列番号15のbp2630~2830；配列番号15のbp2530~2930；配列番号15のbp9071~9171；配列番号15のbp9021~9221；および配列番号15のbp8921~9321からなる群から選択される第2の配列を含むDNAを含み、上記第1の配列および第2の配列が、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1の存在に特徴的である、方法。

40

[2] 上記昆虫がシュードブルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includens*) (ダイ

50

ズシャクトリムシ)である、上記[1]に記載の方法。

[3] 上記昆虫がアンチカルシア・ゲムマタリス (Anticarsia gemmatalis) (ハッショウマメイモムシ) である、上記[1]に記載の方法。

[4] 上記昆虫がスプドブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (ツマジロクサヨトウ) である、上記[1]に記載の方法。

[5] ダイズ作物において雑草を防除する方法であって、グルホシネット除草剤、フェノキシ酢酸除草剤、ピリジルオキシ酢酸除草剤、またはそれらの組合せを、ダイズ作物を含む地域に施用するステップを含み、上記ダイズ作物が配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される第1の配列を有し、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される第2の配列を有するDNAを含むダイズ植物を含み、上記配列がダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1の存在に特徴的である、方法。

[6] 配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列を含む単離されたDNA配列。

[7] ダイズ植物を育種する方法であって、

第1の植物と第2のダイズ植物を交雑させて第3のダイズ植物を作出するステップであり、上記第1の植物が配列番号1の1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含み、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含むDNAを含む、ステップと、上記第3のダイズ植物を、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列およびその相補物を含むDNAの存在についてアッセイするステップとを含む方法。

[8] 配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される少なくとも1つの配列およびその相補物を含み、かつ配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号1

10

20

30

40

50

5 の b p 9 0 2 1 ~ 9 2 2 1 ; および配列番号 1 5 の b p 8 9 2 1 ~ 9 3 2 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列およびその相補物を含む接合部配列を含む単離された D N A 分子。

[9] シュードブルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includens*) (ダイズシャクトリムシ) に対して抵抗性であり、配列番号 1 の b p 1 3 8 5 ~ 1 4 1 5 ; 配列番号 1 の b p 1 3 5 0 ~ 1 4 5 0 ; 配列番号 1 の b p 1 3 0 0 ~ 1 5 0 0 ; 配列番号 1 の b p 1 2 0 0 ~ 1 6 0 0 ; 配列番号 2 の b p 1 3 7 ~ 1 6 8 ; 配列番号 2 の b p 1 0 3 ~ 2 0 3 ; および配列番号 2 の b p 3 ~ 3 0 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列およびその相補物を有し、かつ配列番号 1 5 の b p 2 6 8 0 ~ 2 7 8 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 6 3 0 ~ 2 8 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 5 3 0 ~ 2 9 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 7 1 ~ 9 1 7 1 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 2 1 ~ 9 2 2 1 ; および配列番号 1 5 の b p 8 9 2 1 ~ 9 3 2 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列およびその相補物を有する D N A を含む、ダイズ植物またはその部位。

[1 0] 上記 [9] に記載の植物の種子。

[1 1] ダイズミール、ダイズ粉 (soy flour) 、ダイズタンパク質濃縮物、およびダイズ油 (soy oil) からなる群から選択される生産品である、上記 [5] に記載のダイズ植物またはその部位に由来する組成物。

[1 2] ダイズの粒、種子、ミール、または粉において害虫を防除する方法であって、上記粒、種子、ミール、または粉が配列番号 1 の b p 1 3 8 5 ~ 1 4 1 5 ; 配列番号 1 の b p 1 3 5 0 ~ 1 4 5 0 ; 配列番号 1 の b p 1 3 0 0 ~ 1 5 0 0 ; 配列番号 1 の b p 1 2 0 0 ~ 1 6 0 0 ; 配列番号 2 の b p 1 3 7 ~ 1 6 8 ; 配列番号 2 の b p 1 0 3 ~ 2 0 3 ; および配列番号 2 の b p 3 ~ 3 0 3 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列およびその相補物；ならびに配列番号 1 5 の b p 2 6 8 0 ~ 2 7 8 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 6 3 0 ~ 2 8 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 5 3 0 ~ 2 9 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 7 1 ~ 9 1 7 1 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 2 1 ~ 9 2 2 1 ; および配列番号 1 5 の b p 8 9 2 1 ~ 9 3 2 1 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列およびその相補物を含む D N A を含むことによって実証される、上記粒、種子、ミール、または粉にダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含めるステップを含む方法。

[1 3] ゲノム内に、配列番号 1 の b p 1 3 8 5 ~ 1 4 1 5 ; 配列番号 1 の b p 1 3 5 0 ~ 1 4 5 0 ; 配列番号 1 の b p 1 3 0 0 ~ 1 5 0 0 ; 配列番号 1 の b p 1 2 0 0 ~ 1 6 0 0 ; 配列番号 2 の b p 1 3 7 ~ 1 6 8 ; 配列番号 2 の b p 1 0 3 ~ 2 0 3 ; 配列番号 2 の b p 3 ~ 3 0 3 からなる群から選択される第 1 の D N A 配列；ならびに配列番号 1 5 の b p 2 6 8 0 ~ 2 7 8 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 6 3 0 ~ 2 8 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 5 3 0 ~ 2 9 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 7 1 ~ 9 1 7 1 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 2 1 ~ 9 2 2 1 ; および配列番号 1 5 の b p 8 9 2 1 ~ 9 3 2 1 からなる群から選択される第 2 の D N A 配列、ならびにその相補物を含むダイズ種子。

[1 4] 上記 [1 3] に記載のダイズ種子から生長させたダイズ植物。

[1 5] 花粉、胚珠、花、苗条、根、および葉からなる群から選択され、上記ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含む、上記 [1 4] に記載のダイズ植物の部位。

[1 6] ダイズミール、ダイズ粉 (soybean flour) 、およびダイズ油 (soybean oil) からなる群から選択される生産品である、上記 [1 4] に記載のダイズ植物またはその部位に由来する組成物。

本発明は、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 と称される、新しい昆虫抵抗性かつ除草剤耐性のトランスジェニックダイズ育種スタッキイベントに関する。この育種スタッキは、ダイズの細胞のゲノム内の特定の部位に挿入されている、本明細書に記載の c r y 1 F 、 c r y 1 A c および p a t 、ならびに本明細書および国際特許出願第 WO / 2 0 1 2 / 0 7 5 4 2 6 号に記載の a a d

10

20

30

40

50

- 12およびpatを含む。代表的なダイズ種子は、American Type Culture Collection (ATCC) に、パラグラフ [0021] において識別される受託番号で寄託されている。このイベントを含有するダイズ植物のDNAは、ダイズゲノム内の挿入DNAの位置を特徴付ける本明細書に記載の接合部／隣接配列を含む。配列番号1、配列番号2、および配列番号15は、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1に特徴的である。より詳細には、配列番号1のbp1400/1401、bp1536/1537、配列番号2のbp152/153、配列番号15のbp2730/2731、および配列番号15のbp9121/9122にある接合部を取り囲む配列が、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1に特徴的である。下のパラグラフ [00012] には、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1を含有するダイズのDNAの特性であるこれらの接合部を含む配列の例が記載されている。

〔 0 0 0 7 〕

一実施形態では、本発明は、シュードプルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includens*) (ダイズシャクトリムシ) に対して抵抗性であり、配列番号1のbp1385~1415；配列番号1のbp1350~1450；配列番号1のbp1300~1500；配列番号1のbp1200~1600；配列番号2のbp137~168；配列番号2のbp103~203；および配列番号2のbp3~303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680~2780；配列番号15のbp2630~2830；配列番号15のbp2530~2930；配列番号15のbp9071~9171；配列番号15のbp9021~9221；および配列番号15のbp8921~9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含むゲノムを有するダイズ植物またはその部位を提供する。別の実施形態では、本発明は、そのような植物の種子を提供する。

[0 0 0 8]

別の実施形態では、本発明は、昆虫を昆虫抵抗性ダイズ植物に曝露させて、それにより昆虫を防除するステップを含む、昆虫を防除する方法であって、ダイズ植物がダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 が存在することの特徴である配列番号 1 の b p 1 3 8 5 ~ 1 4 1 5 ; 配列番号 1 の b p 1 3 5 0 ~ 1 4 5 0 ; 配列番号 1 の b p 1 3 0 0 ~ 1 5 0 0 ; 配列番号 1 の b p 1 2 0 0 ~ 1 6 0 0 ; 配列番号 2 の b p 1 3 7 ~ 1 6 8 ; 配列番号 2 の b p 1 0 3 ~ 2 0 3 ; および配列番号 2 の b p 3 ~ 3 0 3 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列 ; ならびに配列番号 1 5 の b p 2 6 8 0 ~ 2 7 8 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 6 3 0 ~ 2 8 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 2 5 3 0 ~ 2 9 3 0 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 7 1 ~ 9 1 7 1 ; 配列番号 1 5 の b p 9 0 2 1 ~ 9 2 2 1 ; および配列番号 1 5 の b p 8 9 2 1 ~ 9 3 2 1 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含有するゲノムを有する方法を提供する。ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 に c r y 1 F v 3 (c r y 1 F) 遺伝子および c r y 1 A c s y n p r o (c r y 1 A c) 遺伝子が存在することにより、例えば、シードブルシア・インクルデンス (Pseudoplusia includens) (ダイズシャクトリムシ)、アンチカルシア・ゲムマタリス (Anticarsia gemmatalis) (ハッショウマメイモムシ (velvetbean caterpillar))、エピノチア・アポレマ (Epinotia aporema)、オモイデス・インジカタス (Omoiodes indicatus)、ラチブルシア・ヌ (Rachiplusia nu)、ス Podoptera frugiperda)、ス Podoptera cosmoi des)、ス Podoptera eridania)、ヘリオチス・ビレセンス (Heliothis virescens)、ヘリコベルパ・ゼア (Heliothis zea)、スピロソーマ・ビルギニカ (Spilosoma virginica) およびエラスモパルパス・リグノセルス (Elasmopalpus lignosellus) に対する抵抗性が付与される。

〔 0 0 0 9 〕

一実施形態では、本発明は、フェノキシ酢酸除草剤、例えば、2,4-DおよびMCPAなどに対して耐性であるダイズ植物またはその部位を提供する。別の実施形態では、本発明は、ピリジルオキシ酢酸除草剤、例えば、トリクロピルおよびフルロキシピルなどに対して耐性であるダイズ植物またはその部位を提供する。これらの実施形態では、ダイズ植物は、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～921；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含むゲノムを有する。別の実施形態では、本発明は、そのような植物の種子を提供する。

【0010】

別の実施形態では、本発明は、ダイズ作物において雑草を防除する方法であって、フェノキシ酢酸除草剤、例えば、2,4-DおよびMCPAなどを施用することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、ダイズ作物において雑草を防除する方法であって、ピリジルオキシ酢酸除草剤、例えば、トリクロピルおよびフルロキシピルなどをダイズ作物に施用するステップを含み、ダイズ作物が、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含有するゲノムを有するダイズ植物を含む方法を提供する。育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1にaad-12遺伝子が存在することにより、フェノキシ酢酸除草剤およびピリジルオキシ酢酸除草剤に対する耐性が付与される。

【0011】

別の実施形態では、本発明は、ダイズ作物において雑草を防除する方法であって、グルホシネート除草剤をダイズ作物に施用するステップを含み、前記ダイズ作物が、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含有するゲノムを有するダイズ植物を含み、これらの配列が、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1の存在に特徴的である、方法を提供する。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1にpat_v6(pat)遺伝子が存在することにより、グルホシネート除草剤に対する耐性が付与される。

【0012】

別の実施形態では、本発明は、ダイズDNAを含む試料においてダイズイベントpDAB9582.814.19.1：：pDAB4468.04.16.1を検出する方法であって、

(a) 前記試料を、配列番号1のbp1～1400内の隣接配列またはその相補物に選択

10

20

30

40

50

的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 1 のプライマー、および配列番号 1 の bp 1401 ~ 1836 内の挿入断片配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 2 のプライマーと接触させ、前記プライマー間に生成したアンブリコンについてアッセイするステップ、または

(b) 前記試料を、配列番号 2 の bp 1 ~ 152 内の挿入断片配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 1 のプライマー、および配列番号 2 の bp 153 ~ 1550 内の隣接配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 2 のプライマーと接触させるステップ、もしくは

(c) 前記試料を、配列番号 15 の bp 2731 ~ 9121 内の挿入断片配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 1 のプライマー、および配列番号 15 の bp 1 ~ 2730 内の隣接配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 2 のプライマーと接触させるステップ、もしくは

(d) 前記試料を、配列番号 15 の bp 2731 ~ 9121 内の挿入断片配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 1 のプライマー、および配列番号 15 の bp 9122 ~ 10, 198 内の隣接配列またはその相補物に選択的に結合する、長さが少なくとも 10 bp である第 2 のプライマーと接触させるステップ、および

(c) 前記プライマー間に生成したアンブリコンについてアッセイするステップを含む方法を提供する。

【0013】

別の実施形態では、本発明は、ダイズイベント p DAB9582.814.19.1 : p DAB4468.04.16.1 を検出する方法であって、

(a) 前記試料を、配列番号 1 の bp 1 ~ 1400 および配列番号 2 の bp 153 ~ 1550 からなる群から選択される隣接配列およびその相補物に選択的に結合する第 1 のプライマー；ならびに配列番号 3、またはその相補物に選択的に結合する第 2 のプライマー；ならびに配列番号 15 の bp 1 ~ 2730 および配列番号 15 の bp 9122 ~ 10, 198 の隣接配列およびその相補物に選択的に結合する第 3 のプライマー；ならびに配列番号 15 の 2731 ~ 9121 の挿入断片配列およびその相補物に選択的に結合する第 4 のプライマーと接触させるステップと、

(b) 前記試料をポリメラーゼ連鎖反応に供するステップと、

(c) 前記プライマー間に生成したアンブリコンについてアッセイするステップを含む方法を提供する。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、ダイズ植物を育種する方法であって、第 1 の植物と第 2 のダイズ植物を交雑させて第 3 のダイズ植物を作出するステップであり、前記第 1 の植物が配列番号 1 の bp 1385 ~ 1415；配列番号 1 の bp 1350 ~ 1450；配列番号 1 の bp 1300 ~ 1500；配列番号 1 の bp 1200 ~ 1600；配列番号 2 の bp 137 ~ 168；配列番号 2 の bp 103 ~ 203；および配列番号 2 の bp 3 ~ 30 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列；ならびに配列番号 15 の bp 2680 ~ 2780；配列番号 15 の bp 2630 ~ 2830；配列番号 15 の bp 2530 ~ 2930；配列番号 15 の bp 9071 ~ 9171；配列番号 15 の bp 9021 ~ 9221；および配列番号 15 の bp 8921 ~ 9321 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含む DNA を含む、ステップと、前記第 3 のダイズ植物を、配列番号 1 の bp 1385 ~ 1415；配列番号 1 の bp 1350 ~ 1450；配列番号 1 の bp 1300 ~ 1500；配列番号 1 の bp 1200 ~ 1600；配列番号 2 の bp 137 ~ 168；配列番号 2 の bp 103 ~ 203；配列番号 2 の bp 3 ~ 30 ；配列番号 15 の bp 2680 ~ 2780；配列番号 15 の bp 2630 ~ 2830；配列番号 15 の bp 2530 ~ 2930；配列番号 15 の bp 9071 ~ 9171；配列番号 15 の bp 9021 ~ 9221；および配列番号 15 の bp 8921 ~ 9321 からなる群から選択される 1 つまたは複数の配列およびその相補物を含む DNA の存在について

10

20

30

40

50

てアッセイするステップとを含む方法を提供する。

【0015】

別の実施形態では、本発明は、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 に特徴的である、単離されたDNA分子を提供する。そのような分子は、配列番号1、2、および15に加えて、配列番号1のbp1400～1401および配列番号1のbp1400/1401接合部から各方向に少なくとも10bpを含む、長さが少なくとも25bpの分子；配列番号2の152～153および配列番号2のbp152/153接合部から各方向に少なくとも10bpを含む、長さが少なくとも25bpのアンブリコン；配列番号15のbp2730～2731および配列番号15のbp2730/2731接合部から各方向に少なくとも10bpを含む、長さが少なくとも25bpのアンブリコン；配列番号15のbp9121～9122および配列番号15のbp9121/9122接合部から各方向に少なくとも10bpを含む、長さが少なくとも25bpのアンブリコンを含む。例は、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303；配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321、ならびにその相補物である。

【0016】

別の実施形態では、本発明は、ダイズの粒、種子、または種子ミールにおいて害虫を防除する方法であって、前記粒、種子、または種子ミールが、配列番号1のbp1385～1415；配列番号1のbp1350～1450；配列番号1のbp1300～1500；配列番号1のbp1200～1600；配列番号2のbp137～168；配列番号2のbp103～203；および配列番号2のbp3～303からなる群から選択される1つまたは複数の配列；ならびに配列番号15のbp2680～2780；配列番号15のbp2630～2830；配列番号15のbp2530～2930；配列番号15のbp9071～9171；配列番号15のbp9021～9221；および配列番号15のbp8921～9321からなる群から選択される1つまたは複数の配列、ならびにその相補物を含むDNAを含むことによって実証される、前記粒、種子、または種子ミールにダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含めるステップを含む方法を提供する。

【0017】

本発明は、これらに限定されないが、花粉、胚珠、花、苗条、根、および葉、ならびに栄養細胞の核、花粉細胞、種子および種子ミール、および卵細胞を含めた、育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含有するダイズ植物の細胞および植物の部位も包含する。

【0018】

一部の実施形態では、育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 は、例えば、他の除草剤耐性遺伝子（複数可）および/または昆虫抑制タンパク質ならびに転写調節配列（すなわち、RNA干渉、dsRNA、転写因子など）を含めた他の形質と組み合わせることができる。追加的な形質は、植物の育種、育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含有するトランスジェニック植物の再形質転換、または標的化組み込みによる新しい形質の付加によって植物ゲノムに掛け合わせができる。

【0019】

他の実施形態は、例えば、pat遺伝子発現カセットを含めた、育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含むポリヌクレオチド配列を削除することを含む。ポリヌクレオチド配列を削除したら、改

10

20

30

40

50

変されたイベントを特定の染色体上の部位で再標的化し、そこで追加的なポリヌクレオチド配列に育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を掛け合わせることができる。

【 0 0 2 0 】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 および配列番号 2 に記載の隣接配列間の第 0 2 染色体に位置するダイズ染色体上の標的部位を包含する。

【 0 0 2 1 】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 5 に記載の隣接配列間の第 0 4 染色体に位置するダイズ染色体上の標的部位を包含する。

【 0 0 2 2 】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 および配列番号 2 に記載のゲノム配列間、すなわち、配列番号 1 の b p 1 ~ 1 4 0 0 と配列番号 2 の b p 1 5 3 ~ 1 5 5 0 の間の第 0 2 染色体上の位置に異種核酸を挿入するステップを含むトランスジェニックダイズ植物を作製する方法を包含する。

【 0 0 2 3 】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 5 に記載のゲノム配列間、すなわち、配列番号 1 5 の b p 1 ~ 2 7 3 0 と配列番号 1 5 の b p 9 1 2 2 ~ 1 0 , 1 9 8 の間の第 0 4 染色体上の位置に異種核酸を挿入するステップを含むトランスジェニックダイズ植物を作製する方法を包含する。

【 0 0 2 4 】

さらに、本発明は、試料（例えば、ダイズの）中の本主題のイベントの存在を検出するためのアッセイを提供する。アッセイは、ダイズゲノムに挿入された組換え構築物の D N A 配列、および挿入部位に隣接しているゲノム配列に基づくことができる。アッセイの実施において有用なキットおよび条件も提供される。

【 0 0 2 5 】

本発明は、一部において、p D A B 9 5 8 2 および p D A B 4 4 6 8 由来の T - D N A をトランスジェニックダイズ系統に挿入することによって生じる境界領域の D N A 配列のクローニングおよび分析に関する。これらの配列は独特である。挿入断片配列および接合部配列に基づいて、イベント特異的なプライマーを生成することができ、これを生成した。P C R 分析により、これらのイベント特異的なプライマーセットを用いて生成した P C R アンプリコンを分析することによってこれらのイベントを同定することができることが実証された。したがって、これらおよび他の関連する手順を用いて、本発明のイベントを含むダイズ系統を一意的に同定することができる。

【 0 0 2 6 】

種子寄託物

本開示の一部として、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 を含むダイズ系統の少なくとも 2 5 0 0 種子およびダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含むダイズ系統の 2 5 0 0 種子が A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) 、 1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d 、 M a n a s s a s 、 V A 、 2 0 1 1 0 に寄託され、制限なく一般に公開されている（しかし、特許権に支配される）。A T C C 寄託番号 P T A - 1 0 4 4 2 (p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1) および A T C C 寄託番号 _____ (p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1) と称される寄託物は、それぞれ D o w A g r o S c i e n c e s L L C o n O c t o b e r 2 2 、 2 0 0 9 および _____ を代表して作製された。これらの寄託物は、特許手続のための種子寄託物に関するブタペスト条約の条項に従い、その下で作製されたものであり、また、それに従い、その下で維持される。

【 0 0 2 7 】

配列の簡単な説明

配列番号 1 はダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 についての 5 ' D N A 隣接境界配列である。ヌクレオチド 1 ~ 1 4 0 0 はゲノム配列である。ヌクレオチド 1

10

20

30

40

50

4 0 1 ~ 1 5 3 5 は、 p D A B 9 5 8 2 から再配置された配列である。ヌクレオチド 1 5 3 6 ~ 1 8 3 6 は挿入断片配列である。

【 0 0 2 8 】

配列番号 2 は、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 についての 3 ' D N A 隣接境界配列である。ヌクレオチド 1 ~ 1 5 2 は挿入断片配列である。ヌクレオチド 1 5 3 ~ 1 5 5 0 はゲノム配列である。

【 0 0 2 9 】

配列番号 3 は、 p D A B 9 5 8 2 の D N A 配列であり、下の表 1 において注釈を付けて いる。

【 0 0 3 0 】

配列番号 4 は、 5 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 8 1 4 1 9 _ F W 3 である。

【 0 0 3 1 】

配列番号 5 は、 3 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 8 1 4 1 9 _ R V 1 である。

【 0 0 3 2 】

配列番号 6 は、 3 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 8 1 4 1 9 _ R V 2 である。

【 0 0 3 3 】

配列番号 7 は、 3 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 8 1 4 1 9 _ R V 3 である。

【 0 0 3 4 】

配列番号 8 は、 5 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 5 ' I R E n d - 0 1 である。

【 0 0 3 5 】

配列番号 9 は、 5 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 5 ' I R E n d - 0 2 である。

【 0 0 3 6 】

配列番号 1 0 は、 5 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー A t U b i 1 0 R V 1 である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 1 1 は、 5 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー A t U b i 1 0 R V 2 である。

【 0 0 3 8 】

配列番号 1 2 は、 3 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 3 ' P A T E n d 0 5 である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 1 3 は、 3 ' 境界ゲノム D N A を確認するためのオリゴヌクレオチドプライマー 3 ' P A T E n d 0 6 である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 4 は、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の確認された配列である。5 ' ゲノム隣接配列、 p D A B 9 5 8 2 T 鎖挿入断片、および 3 ' ゲノム隣接配列を含む。

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 5 は、ダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の確認された配列である。5 ' ゲノム隣接配列、 p D A B 4 4 6 8 T 鎖挿入断片、および 3 ' ゲノム隣接配列を含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 2 】

【 図 1 】 c r y 1 F 、 c r y 1 A c および p a t 発現カセットを含有する p D A B 9 5 8

10

20

30

40

50

2のプラスミドマップである。

【図2】ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の5'境界配列および3'境界配列を確認するためのプライマーの位置を示す図である。

【図3】ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 におけるゲノム配列配置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0043】

ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 挿入物の隣接配列を配列決定し特徴付けた。イベント特異的なアッセイを開発した。これは、ダイズゲノム(ダイズの第02および04染色体)上にマッピングされた。イベントを別の優良な系統に、ともに遺伝子移入し得る。 10

【0044】

上の背景技術のセクションにおいて言及されている通り、導入遺伝子の植物ゲノムへの導入および組み込みは、いくつかのランダムなイベントを伴う(したがって発現される所与の挿入物について「イベント」と称する)。すなわち、多くの形質転換技法、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)形質転換、微粒子銃形質転換(すなわち遺伝子銃)、および炭化ケイ素媒介性形質転換(すなわちWHISKERS(商標))などを用いると、導入遺伝子がゲノム内のどこに挿入されるかは予測不可能である。したがって、挿入断片の両側の隣接植物ゲノムDNAを同定することは、所与の挿入イベントを有する植物を同定するために重要であり得る。例えば、挿入断片と宿主ゲノムとの接合領域にわたってPCRアンプリコンを生成するPCRプライマーを設計することができる。このPCRアンプリコンを使用して、独特のまたは別個の種類の挿入イベントを同定することができる。 20

【0045】

本発明の説明に役立つように、また当業者が本発明を実施する指針となるために、本明細書において定義および例が提供される。特に断りのない限り、用語は、当業者による従来の使用法に従って理解される。米国特許法施行規則第1.822条に明記されているDNA塩基の命名法を使用する。

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「後代」は、育種スタックダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含む親植物の任意の世代の子孫を意味する。 30

【0047】

トランスジェニック「イベント」は、植物細胞を異種DNA、すなわち、対象の導入遺伝子を含む核酸構築物で形質転換すること、植物のゲノムに導入遺伝子を挿入することによって生じる植物の集団を再生させること、および特定のゲノム上の位置への挿入を特徴とする特定の植物を選択することによって作出される。用語「イベント」は、元の形質転換体および異種DNAを含むその形質転換体の後代を指す。用語「イベント」は、ゲノムDNA/導入遺伝子DNAを含む、形質転換体と別の品種との間の有性異系交雑によって作出される後代も指す。反復親との戻し交雑を繰り返した後であっても、形質転換された親由来の挿入された導入遺伝子DNAおよび隣接ゲノムDNA(ゲノムDNA/導入遺伝子DNA)は、交雑の後代において同じ染色体上の位置に存在する。用語「イベント」は、元の形質転換体由来のDNA、および挿入DNAを含む一方の親系統(例えば、元の形質転換体および自殖によって生じる後代)と挿入DNAを含有しない親系統との有性交雑の結果として、対象の導入遺伝子を含む挿入DNAを受け取る後代に伝達されることが予測され得る挿入DNAおよび挿入DNAのすぐ近接の隣接ゲノム配列を含むその後代も指す。 40

【0048】

「接合部配列」または「境界の配列」は、ゲノムに挿入されたDNAが、挿入点に隣接するダイズのネイティブなゲノム由来のDNAに連結している点にわたり、植物の遺伝物 50

質中の方または他方の接合部配列の特定または検出は、十分にイベントに特徴的である。本明細書に記載のダイズイベントにおける挿入物にわたるDNA配列および同様の長さの隣接DNAが含まれる。そのような特徴的な配列の特定の例が本明細書において提供されるが、挿入物の接合部、または挿入物とゲノム配列との接合部とオーバーラップする他の配列も特徴的であり、本発明に従って使用することができる。

【0049】

本発明は、そのような隣接配列、接合部配列、および挿入断片配列を使用してイベントを特定することに一部関する。関連するPCRプライマーおよびアンプリコンは、本発明に包含される。本発明に従って、挿入DNAおよびその端までわたるアンプリコンを使用するPCR分析方法を使用して、対象の登録商標を持つトランスジェニックダイズ系統に由来する商業化されたトランスジェニックダイズの品種または系統を検出または特定することができる。

10

【0050】

隣接 / 接合部配列は、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1に特徴的である。これらの配列に基づいて、イベント特異的なプライマーを生成した。PCR分析により、これらのイベント特異的なプライマーセットを用いて生成したPCRアンプリコンを分析することによって、異なるダイズ遺伝子型においてこれらのダイズ系統を同定することができることが実証された。したがって、これらおよび他の関連する手順を用いて、これらのダイズ系統を一意的に同定することができる。本明細書において同定される配列は独特である。

20

【0051】

本発明の検出技法は、植物育種と併せて、1つまたは複数の追加的な対象の形質を後代に与える取り組みにおいて、対象のイベントを含む親植物を別の植物系統と交雑した後に、どの後代植物が所与のイベントを含むかを決定するために特に有用である。これらのPCR分析方法は、ダイズの育種計画ならびに品質管理、特に商業化されたトランスジェニックダイズ種子に有益である。これらのトランスジェニックダイズ系統のPCR検出キットも、現在製造され、使用することができる。これは、製品登録および製品管理にも有益である。

【0052】

さらに、隣接ダイズ / ゲノム配列を使用して、それぞれの挿入断片の遺伝子位置を特異的に同定することができる。この情報を使用して、それぞれのイベントに特異的な分子マーカー系を作製することができる。これらは、育種戦略を加速させるために、および連鎖データを確立するために使用することができる。

30

【0053】

さらに、隣接配列の情報を使用して、導入遺伝子の組み込みプロセス、ゲノムの組み込み部位の特性、イベントの選別、導入遺伝子およびそれらの隣接配列の安定性、ならびに遺伝子発現（特に遺伝子サイレンシング、導入遺伝子のメチル化パターン、位置の影響、およびMARS [マトリックス付着領域]などの潜在的な発現関連エレメントなどに関連する）を試験し、特徴付けることができる。

【0054】

本開示全てに照らして、本発明は、パラグラフ [0021] において識別されるATC C寄託番号の下で入手可能な種子を包含することが明白でなければならない。本発明は、パラグラフ [0021] において識別されるATC C寄託番号で寄託された種子から生長させた除草剤耐性ダイズ植物も包含する。本発明は、さらに、前記植物の部位、例えば、葉、組織試料、前記植物体によって生産される種子、花粉などを包含する（これらは、ad-12、patおよび配列番号15に加えて、cry1F、cry1Ac、pat、ならびに配列番号1および配列番号2を含む）。

40

【0055】

さらに、本発明は、寄託されている種子から生長させた植物の後裔植物および/または後代植物、好ましくは除草剤耐性ダイズ植物であって、本明細書に記載の検出可能な野生

50

型接合部配列を含むゲノムを有する植物を包含する。本明細書で使用される場合、用語「ダイズ」は、Glycine maxを意味し、ダイズ植物を用いて育種することができるその全品種を包含する。

【0056】

本発明は、本発明の植物を少なくとも一方の親として使用して交雑を行うプロセスをさらに包含する。例えば、本発明は、これらに限定されないが、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1を含む一方の親およびpDAB4468.04.16.1を含む他方の親を有するものを含めた、本明細書において例示されている植物のいずれかを一方の親または両親として有するF₁ハイブリッド植物を包含する。また、本発明のそのようなF₁ハイブリッドによって生産される種子も本発明の範囲内である。本発明は、例示した植物と、異なる（例えば、純系の親）植物を交雫し、得られたハイブリッド種子を収穫することによってF₁ハイブリッド種子を作出するための方法を包含する。本発明は、雌親または雄親のいずれかである、例示した植物を包含する。得られる植物の特性は、親植物を慎重に考察することによって改良することができる。

【0057】

本発明の昆虫抵抗性/2,4-D耐性/グルホシネート耐性ダイズ植物は、本明細書で言及されている系統の任意の1つの種子から生長させたダイズ植物からなる第1の親ダイズ植物と、第2の親ダイズ植物との有性交雫を最初に行い、それによって複数の第1の後代植物を作出すること；次いで、グルホシネートおよび/または2,4-Dに対して抵抗性である第1の後代植物を選択すること；第1の後代植物を自殖させ、それによって、複数の第2の後代植物を作出すること；次いで、第2の後代植物から、グルホシネートおよび/または2,4-Dに対して抵抗性である植物を選択することによって育種することができる。これらのステップは、第1の後代植物または第2の後代植物を第2の親ダイズ植物または第3の親ダイズ植物と戻し交雫することをさらに含んでよい。次いで本発明のダイズ種子を含むダイズ作物、またはその後代を植え付けることができる。

【0058】

2つの異なるトランスジェニック植物を交配して、それぞれ独立に分離して付加された2つの外因性遺伝子を含有する子孫を作出することもできることがまた理解される。適切な後代を自殖させることにより、付加された外因性遺伝子のどちらについてもホモ接合性である植物を作出することができる。栄養繁殖のように、親植物と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意図されている。種々の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は当技術分野で公知である。反復親である望ましいホモ接合性の栽培品種または純系統に、単純に遺伝した、高度に遺伝性の形質の遺伝子を伝達するために戻し交雫育種が使用してきた。伝達される形質の供給源は、供与親と称されている。生じた植物は、反復親（例えば、栽培品種）の属性および供与親から伝達された望ましい形質を有することが予測される。最初の交雫の後、供与親の表現型を保有する個体を選択し、反復親と繰り返し交雫（戻し交雫）する。生じた親は、反復親（例えば、栽培品種）の属性および供与親から伝達された望ましい形質を有することが予測される。

【0059】

同様に、本発明の昆虫抵抗性/2,4-D耐性/グルホシネート耐性ダイズ植物を、当技術分野で公知の方法を用いて追加的な導入遺伝子で形質転換することができる。形質転換技法、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)形質転換、微粒子銃形質転換（すなわち遺伝子銃）、および炭化ケイ素媒介性形質転換（すなわちWHISKERS）などを用いて、追加的な導入遺伝子（複数可）を育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1のゲノムに導入することができる。新しく挿入された導入遺伝子を含有するトランスジェニック植物の選択および特徴付けを完了して、本発明のaad-12遺伝子、cry1F遺伝子、cry1Ac遺伝子、pat遺伝子に加えて、新規の導入遺伝子の安定な組み込み体を含有する植物を同定することができる。

【0060】

10

20

30

40

50

本発明のDNA分子は、マーカー利用育種(MAB)法において分子マーカーとして使用することができる。本発明のDNA分子は、当技術分野で公知の通り、遺伝的に連鎖している作物学的に有用な形質を特定する方法(例えば、AFLPマーカー、RFLPマーカー、RAPDマーカー、SNPおよびSSRなど)において使用することができる。MAB法を使用して、本発明のダイズ植物(またはその後代および任意の他のダイズの栽培品種または品種)との交雑の後代において昆虫抵抗性および除草剤耐性形質を追跡することができる。DNA分子はこの形質についてのマーカーであり、当技術分野で周知のMAB法を使用して、本発明の少なくとも1つのダイズ系統、またはその後代が親または祖先であったダイズ植物における除草剤抵抗性形質(複数可)を追跡することができる。本発明の方法を使用して、対象イベントを有する任意のダイズ品種を特定することができる。

10

【0061】

本発明の方法は、本発明の植物を用いて育種するステップを含む、昆虫抵抗性/除草剤耐性ダイズ植物を作出する方法を包含する。より詳細には、前記方法は、本発明の2つの植物、または本発明の1つの植物と任意の他の植物とを交雑するステップを含んでよい。好ましい方法は、前記交雑の後代を、本発明に従って検出可能なイベントおよび好都合な品種性能(例えば、収量)について前記後代を分析することによって選択するステップをさらに含む。例えば、本発明を用いて、他の望ましい形質、例えば、農業形質、病害に対する耐性もしくは抵抗性、線形動物に対する耐性もしくは抵抗性および成熟日を含む植物を用いた育種サイクルを通して本主題のイベントを追跡することができる。対象イベントおよび所望の形質を含む植物を検出し、特定し、選択し、例えば育種のさらなるラウンドに直ちに使用することができる。対象イベント/形質は、さらなる昆虫抵抗性形質(複数可)および/または別の除草剤耐性形質と育種を通じて組み合わせ、本発明に従って追跡することもできる。後者の実施形態は、本主題のイベントを、除草剤グリホサートに対する耐性を付与するグリホサート耐性遺伝子と組み合わせて含む植物である。

20

【0062】

したがって、本発明は、例えば、グリホサート抵抗性(例えば、抵抗性植物または細菌のEPSPS、GOX、GAT)、グルホシネート抵抗性(例えば、pat、bar)、アセト乳酸合成酵素(ALS)阻害性除草剤への抵抗性(例えば、イミダゾリノン[イマゼタピルなど]、スルホニル尿素系、トリアゾロピリミジンスルホニアリド、ピリミジニルチオベンゾエート系、および他の化学物質[Csrl、SurAなど])、プロモキシニル抵抗性(例えば、Bxn)、HPPD(4-ヒドロキシルフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ)酵素の阻害剤に対する抵抗性、フィトエンデサチュラーゼ(PDS)の阻害剤に対する抵抗性、光化学系II阻害性除草剤に対する抵抗性(例えば、psbA)、光化学系I阻害性除草剤に対する抵抗性、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼIX(PPO)阻害性除草剤に対する抵抗性(例えば、PPO-1)、フェニル尿素除草剤に対する抵抗性(例えば、CYT76B1)、ジカンバ分解酵素(例えば、US20030135879を参照されたい)をコードする形質と組み合わせることができ、その他のものを、単独で、または多数の組合せで積み重ねて、雑草のシフト(weed shift)および/または上述のクラスの任意の除草剤に対する抵抗性を有效地に制御する、または妨げる能力をもたらすことができる。

30

【0063】

さらに、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1に、1つまたは複数の追加的なインプット形質(例えば、昆虫抵抗性、病原体抵抗性、もしくはストレス耐性など)またはアウトプット形質(例えば、生産量の増加、油プロファイルの改良、纖維品質の改良など)を組み合わせることができる。したがって、本発明を使用して、任意の数の作物害虫を柔軟かつ費用効果的に制御する能力を伴う改良された作物の品質の完全な作物パッケージをもたらすことができる。

40

【0064】

植物細胞の特定の染色体上の部位内に、相同組換えによってポリヌクレオチド配列を組み込むための方法は、当技術分野の範囲内で記載されている。例えば、参照により本明細

50

書に組み込まれる米国特許出願公開第2009/0111188A1号に記載の部位特異的な組み込みでは、ドナーポリヌクレオチド配列の染色体上の標的への導入を媒介するためのリコンビナーゼまたはインテグラーゼの使用が記載されている。さらに、参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願第WO2008/021207号には、1つまたは複数のドナーポリヌクレオチド配列をゲノムの特定の位置内に組み込むためのジンクフィンガー媒介相同組換えが記載されている。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6720475号に記載のFLP/FRT、または参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5658772号に記載のCRE/LOXなどのリコンビナーゼの使用を利用して、ポリヌクレオチド配列を特定の染色体上の部位に組み込むことができる。最終的に、ドナーポリヌクレオチドを特定の染色体上の位置に標的化するためのメガヌクレアーゼの使用が、Puchtaら、PNAS USA 93巻(1996年)5055~5060頁)に記載されている。

【0065】

植物細胞内に部位特異的に組み込むための他の方法は、一般に、公知であり、適用可能である(Kumarら、Trends in Plant Sci. 6巻(4号)(2001年)155~159頁)。さらに、いくつかの原核生物および下等真核生物において同定された部位特異的な組換え系を植物における使用に適用することができる。そのような系の例としては、これらに限定されないが、酵母であるジゴサッカロマイセス・ロキシー(Zygosaccharomyces rouxii)のpSR1プラスミ由来のR/R Sリコンビナーゼ系(Arakiら(1985年)J. Mol. Biol. 182巻:191~203頁)、およびファージMuのGin/gix系(MaeserおよびKahlmann(1991年)Mol. Gen. Genet. 230巻:170~176頁)が挙げられる。

【0066】

本発明の一部の実施形態では、既存のトランスジェニックイベントに近接して新しい導入遺伝子(複数可)を組み込む、または掛け合わせることが望ましい場合がある。トランスジェニックイベントは、単一の挿入部位、正常なメンデル分離および安定発現、ならびに、多数の環境区域における、およびそれ全てにわたる除草剤耐性および農業生産力を含めた効力の優れた組合せなどの独特的の特性に基づいて選択された好ましいゲノム遺伝子座とを考えることができる。新しく組み込まれた導入遺伝子は、既存の形質転換体の導入遺伝子の発現特性を維持すべきである。さらに、新しく組み込まれたイベントのゲノム隣接配列および染色体上の位置はすでに同定されているので、新しく組み込まれたイベントを検出し、確認するためのアッセイの開発は克服されるであろう。最終的に、既存の導入遺伝子に連結された特定の染色体上の位置に新しい導入遺伝子を組み込むことにより、従来の育種方法を使用した有性異系交雑による導入遺伝子の他の遺伝的背景への遺伝子移入が促進される。

【0067】

本発明の一部の実施形態では、トランスジェニックイベントからポリヌクレオチド配列を削除することが望ましい場合がある。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許出願第61/297,628号に記載の導入遺伝子の削除では、染色体に組み込まれたトランスジェニックイベントから、遺伝子発現カセットからなるポリヌクレオチド配列を除去するためのジンクフィンガーヌクレアーゼの使用が記載されている。除去されるポリヌクレオチド配列は、選択マーカーであってよい。ポリヌクレオチド配列を削除および除去したら、改変されたトランスジェニックイベントを、ポリヌクレオチド配列を挿入することによって再標的化することができる。ポリヌクレオチド配列を削除し、その後、改変されたトランスジェニックイベントを再標的化することにより、選択マーカーの再使用、または特定の遺伝子が発現することによって生じる、植物のトランスクリプトームに対する意図されたものではない変化を克服する能力などの利点がもたらされる。

【0068】

本発明は、本明細書において、異種核酸を挿入するために優れた、ダイズゲノム内の第02染色体上の特定の部位を開示している。したがって、本発明は、対象とする異種核酸をこの予め確立した標的部位に、またはこの標的部位の付近に導入するための方法を提供する。本発明は、開示されている標的部位またはそのような部位の概ね近くに挿入された

10

20

30

40

50

任意の異種ヌクレオチド配列を含むダイズ種子および／またはダイズ植物も包含する。そのような標的化組み込みを実現するための1つの選択肢は、本明細書において例示されているp a t 発現力セットの代わりに異なる挿入断片を削除することおよび／または置換することである。この一般的な点について、例えば、またこれらに限定することなく、本発明に従って標的化相同組換えを使用することができる。

【0069】

本明細書で使用される場合、遺伝子、イベントまたは形質を「掛け合わせること」は、所望の形質を1つのトランスジェニック系統に組み合わせることである。植物育種家は、それぞれが所望の形質を有する親同士の交雑を行い、次にこれらの所望の形質を両方とも有する子孫を同定することによってトランスジェニック形質を掛け合わせる。遺伝子を掛け合わせるための別の方法は、形質転換の間に、2種以上の遺伝子を同時に植物の細胞核に移入することによる。遺伝子を掛け合わせるための別の方法は、トランスジェニック植物を、対象とする別の遺伝子を用いて再形質転換することによる。例えば、遺伝子を掛け合わせることを用いて、例えば、2種以上の異なる昆虫形質、昆虫抵抗性形質（複数可）および病害抵抗性形質（複数可）、2種以上の除草剤への抵抗性形質、および／または昆虫抵抗性形質（複数可）および除草剤抵抗性形質（複数可）を含めた2種以上の異なる形質を組み合わせることができる。対象の遺伝子に加えて選択マーカーを使用することも、遺伝子を掛け合わせることと考えることができる。

10

【0070】

「相同組換え」とは、2つのヌクレオチド配列が相互作用して（組み換えられて）新しい組換えDNA配列を形成し得る類似したヌクレオチド配列を含有する対応する部位を有するヌクレオチド配列の任意の対の間の反応を指す。類似したヌクレオチド配列の部位は、本明細書ではそれぞれが「相同配列」と称される。一般に、相同組換えの頻度は、相同配列の長さが増加するにつれて増加する。したがって、相同組換えは、同一には満たない2つのヌクレオチド配列間で起こり得るが、組換え頻度（または効率）は、2つの配列間の相違が増加するにつれて減退する。組換えは、ドナー分子および標的分子のそれぞれの1つの相同配列を使用して実現することができ、それによって「単一乗換え」組換え産物を生成することができる。あるいは、標的ヌクレオチド配列およびドナーヌクレオチド配列のそれに2つの相同配列を置くことができる。ドナー上の2つの相同配列と標的上の2つの相同配列との間の組換えにより、「2重乗換え」組換え産物が生成する。ドナー分子上の相同配列が、操作される配列（例えば、対象の配列）に隣接する場合、標的分子との2重乗換え組換えにより、対象の配列が元々標的分子上の相同配列の間にあったDNA配列と交換された組換え産物がもたらされる。2重乗換え組換えイベントによって標的とドナーとの間でDNA配列を交換することは、「配列交換」と称される。

20

【0071】

本発明の好ましい植物、または種子は、そのゲノム内に、本明細書において同定される、作動的なa a d - 1 2 ヌクレオチド配列、c r y 1 F v 3 ヌクレオチド配列、c r y 1 A c s y n p r o ヌクレオチド配列およびp a t v 6 ヌクレオチド配列と、本明細書において同定される、挿入断片の両側の少なくとも20～500以上の連続した隣接ヌクレオチドを一緒に含む。別段の指定のない限り、隣接配列に言及する場合、それは配列番号1、2および15について特定されたものを指す。これらの隣接配列の全部または一部は、イベントを含む親系統の有性交雑の結果として挿入DNAを受け取る後代に伝達されることが予測され得る。

30

【0072】

本発明は、本発明の植物の再生可能な細胞の組織培養物を包含する。また、そのような組織培養物から再生された植物も、特に前記植物が例示されている品種の形態学的性質および生理的性質の全てを発現することができる場合、包含される。本発明の好ましい植物は、寄託されている種子から生長させた植物の生理的特性および形態学的特性の全てを有する。本発明は、そのような種子および対象の品質形質を保有する種子の後代をさらに含む。

40

50

【0073】

本明細書で使用される場合、「系統」は、少なくとも1つの形質について、個体間で遺伝的変異をほとんど示さない、または示さない植物の群である。そのような系統は、何世代か自家受粉させ、選択すること、または組織または細胞の培養技法を使用して、単一の親から栄養繁殖させることによって創出することができる。

【0074】

本明細書で使用される場合、用語「栽培品種」および「品種」は同義であり、商業生産のために使用される系統を指す。

【0075】

「安定性」または「安定な」は、所与の構成要素に関しては、構成要素が代々、好ましくは、少なくとも3世代維持されることを意味する。 10

【0076】

「商業的有用性」は、従来の農業設備を使用して農業者が作物を生産することができるよう、および従来の圧搾および抽出用設備を使用して記載の構成要素を有する油を種子から抽出することができる良好な植物生長力および高い稔性を有することと定義される。

【0077】

「作物学的に優良」は、系統が対象イベント（複数可）に起因する昆虫抵抗性および除草剤耐性に加えて、例えば生産量、成熟度、病害抵抗性などの望ましい作物学的特性を有することを意味する。これらの作物学的特性およびデータポイントの全てを使用して、そのような植物を、そのような植物を定義するために使用する特性の範囲内的一点として、または一端もしくは両端で特定することができる。 20

【0078】

本開示に照らして当業者に理解されるように、検出キットの好ましい実施形態は、例えば、「接合部配列」または「移行部配列」（ダイズゲノムの隣接配列と挿入断片配列が接する場所）を対象とし、かつ／またはそれを含むプローブおよび／またはプライマーを含んでよい。これは、例えば、上記の表に示されている一方のまたは両方の接合部配列（挿入断片と隣接配列が接する場所）を同定するために設計されたポリヌクレオチドプローブ、プライマー、および／またはアンプリコンを含む。1つの一般的な設計は、隣接領域内でハイブリダイズする1つのプライマー、および挿入断片内でハイブリダイズする1つのプライマーを有する。そのようなプライマーは、多くの場合、およそ、それぞれの長さが少なくとも約15残基である。この配置を用いて、プライマーを使用して、本発明のイベントの存在を示す検出可能なアンプリコンを生成／增幅することができる。これらのプライマーを使用して、上に示されている接合部配列にわたる（およびそれを含む）アンプリコンを生成することができる。 30

【0079】

隣接配列に「接している」プライマー（複数可）は、一般には、約1200塩基を越えて、または接合部を越えてハイブリダイズするように設計されない。したがって、典型的な隣接プライマーは、挿入断片の最初から隣接配列に入って1200塩基の範囲内のどちらかの鎖の少なくとも15残基を含むように設計され得る。すなわち、配列番号1の塩基対800～1400および／または配列番号2の塩基対153～753および／または配列番号15の塩基対2130～2730および／または配列番号15の塩基対9122～9722由来の（またはそれとハイブリダイズする）適切なサイズの配列を含むプライマーは、本発明の範囲内である。挿入プライマーは、配列番号3の挿入断片のどこにでも、または配列番号15の塩基対2731から9121の間のどこにでも同様に設計することができ、また、例えば、そのようなプライマーの設計のために非排他的に使用することができる。 40

【0080】

当業者は、さまざまな標準のハイブリダイゼーションおよび／またはPCRの条件の下で、ハイブリダイズするようにプライマーおよびプローブを設計することができ、ここで 50

プライマーまたはプローブが例示された配列と完全に相補的ではないことも認識されよう。すなわち、ある程度のミスマッチが容認され得る。およそ 20 ヌクレオチドのプライマーについて、例えば、一般には、ミスマッチ塩基がアンプリコンと逆のプライマーの内部または末端にある場合、1 または 2 ヌクレオチド程度は逆の鎖と結合しなくてよい。種々の適切なハイブリダイゼーション条件が以下に提供される。イノシンなどの合成ヌクレオチド類似体は、プローブにも使用することができる。ペプチド核酸 (PNA) プローブ、ならびに DNA プローブおよび RNA プローブも使用することができる。重要なのは、そのようなプローブおよびプライマーが、本発明のイベントの存在に対して特徴的である（独自に特定し、区別することができる）ことである。

【0081】

10

PCR 増幅において、例えば、軽微な配列決定のエラーを生じる可能性があるエラーが起こり得ることに留意するべきである。すなわち、別段の指定のない限り、本明細書において列挙されている配列は、ダイズのゲノム DNA から長いアンプリコンを生成し、次いでそのアンプリコンをクローニングし、配列決定することによって決定した。ゲノム DNA から配列決定するために十分なアンプリコンを生成するために必要な多数回の増幅を考慮すると、このように生成し、決定した配列においてわずかな差異および軽微な不一致が見いだされることは珍しいことではない。当業者は、これらの型の一般的な配列決定のエラーまたは不一致に起因して必要になる調整はいずれも本発明の範囲内であることを認識し、留意するべきである。

【0082】

20

例えば、イベントを創出する間に配列を挿入する場合、いくらかのゲノム配列が欠失することは珍しくないことにも留意すべきである。したがって、本主題の隣接配列と、例えば GENBANK に列挙されているゲノム配列との間にもいくらかの差異が出現する可能性がある。

【0083】

DNA 配列「挿入断片」の構成成分が図面に例示されており、以下の実施例においてより詳細に考察されている。これらの構成要素の DNA ポリヌクレオチド配列、またはその断片を、本発明の方法において DNA 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。

【0084】

30

本発明の一部の実施形態では、ダイズ植物由来の植物および種子などにおける導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域の存在を検出するための組成物および方法が提供される。本明細書において提供される本主題の 5' 導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域接合部配列（配列番号 1 の塩基対 800 ~ 1400 と配列番号 3 の間）、そのセグメント、ならびに例示された配列の相補物およびその任意のセグメントを含む DNA 配列が提供される。本明細書において提供される本主題の 3' 導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域接合部配列（配列番号 2 の塩基対 153 ~ 753 と配列番号 3 の間）、そのセグメント、ならびに例示された配列の相補物およびその任意のセグメントを含む DNA 配列が提供される。本明細書において提供される本主題の 3' 導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域接合部配列（配列番号 15 の塩基対 1 ~ 2730 と配列番号 15 の 2731 ~ 9121 の間）、そのセグメント、ならびに例示された配列の相補物およびその任意のセグメントを含む DNA 配列が提供される。本明細書において提供される本主題の 3' 導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域接合部配列（配列番号 15 の塩基対 9122 ~ 10, 198 と配列番号 15 の 2731 ~ 9121 の間）、そのセグメント、ならびに例示された配列の相補物およびその任意のセグメントを含む DNA 配列が提供される。挿入領域の接合部配列は、ゲノムに挿入された異種 DNA と、挿入部位に隣接しているダイズの細胞由来の DNA の接合部にわたる。そのような配列は、所与のイベントに対して特徴的であり得る。

【0085】

これらの挿入断片および境界の配列に基づいて、イベント特異的なプライマーを生成することができる。PCR 分析により、これらのイベント特異的なプライマーセットを用い

40

50

て生成した P C R アンプリコンを分析することによって、異なるダイズ遺伝子型において本発明のダイズ系統を同定することができる事が実証された。これらおよび他の関連する手順を用いて、これらのダイズ系統を一意的に同定することができる。したがって、そのようなプライマー対に由来する P C R アンプリコンは独特であり、これらのダイズ系統を同定するために使用することができる。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、新規の導入遺伝子 / ゲノムの挿入領域の連続した断片を含む D N A 配列は本発明の態様である。導入遺伝子挿入断片配列の十分な長さのポリヌクレオチドおよび 3 つの上述のダイズ植物の 1 つまたは複数由来のダイズのゲノム配列の十分な長さのポリヌクレオチドを含む D N A 配列および / またはこれらのダイズ植物の 1 つまたは複数に対して特徴的なアンプリコン産物を生成するためのプライマー配列として有用である配列が包含される。

【 0 0 8 7 】

関連する実施形態は、本明細書において特定される D N A 配列（例えば、配列番号 1 およびそのセグメントなど）の導入遺伝子部分の少なくとも 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含む D N A 配列、またはその相補物、およびこれらの配列由来の同様の長さのダイズの隣接 D N A 配列、またはその相補物に関する。そのような配列は、 D N A 増幅方法において、 D N A プライマーとして有用である。これらのプライマーを使用して生成されるアンプリコンは、本明細書で言及されるダイズイベントのいずれかに対して特徴的である。したがって、本発明は、そのような D N A プライマーおよび相同プライマーによって生成されるアンプリコンも包含する。

【 0 0 8 8 】

本発明は、試料中の、本明細書で言及されるダイズイベントに対応する D N A の存在を検出する方法も包含する。そのような方法は、（ a ） D N A を含む試料を、これらのダイズイベントの少なくとも 1 つ由来の D N A を用いた核酸の増幅反応において使用したとき、前記イベント（複数可）に対して特徴的であるアンプリコンを生成するプライマーセットと接触させるステップと；（ b ）核酸の増幅反応を実施し、それによって、アンプリコンを生成するステップと；（ c ）アンプリコンを検出するステップとを含んでよい。

【 0 0 8 9 】

本発明の別の検出方法は、試料中の、前記イベントに対応する D N A の存在を検出する方法であって、（ a ） D N A を含む試料を、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で前記ダイズイベントの少なくとも 1 つ由来の D N A とハイブリダイズさせ、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で対照のダイズ植物（対象のイベントがない D N A ）とハイブリダイズしないプローブと接触させるステップと；（ b ）試料およびプローブをストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に供するステップと；（ c ）プローブの D N A とのハイブリダイゼーションを検出するステップとを含む方法を包含する。

【 0 0 9 0 】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明のダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含むダイズ植物を作出する方法であって、（ a ）第 1 の親ダイズ系統（前記系統の植物にグルホシネート耐性を付与する本発明の発現力セットを含む）と第 2 の親ダイズ系統（この除草剤耐性形質を欠く）を有性交雑し、それによって、複数の後代植物を作出するステップと；（ b ）分子マーカーを使用することによって後代植物を選択するステップとを含む方法を包含する。そのような方法は、場合によって、後代植物を第 2 の親ダイズ系統と戻し交雑して、前記昆虫抵抗性、 2 , 4 - D およびグルホシネート耐性形質を含む真の育種（ true-breeding ）ダイズ植物を作出するさらなるステップを含んでよい。

【 0 0 9 1 】

本発明の別の態様によると、前記イベントを用いて交雑の後代の接合性を決定する方法

10

20

30

40

50

が提供される。前記方法は、ダイズDNAを含む試料を本発明のプライマーセットと接触させるステップを含んでよい。前記プライマーは、前記ダイズイベントの少なくとも1つ由来のゲノムDNAを用いた核酸の増幅反応において使用したとき、前記ダイズイベントの少なくとも1つに対して特徴的である第1のアンプリコンを生成する。そのような方法は、核酸の増幅反応を実施し、それによって、第1のアンプリコンを生成するステップと；第1のアンプリコンを検出するステップと；ダイズDNAを含む試料を、第2のプライマーセットと接触させるステップと（前記第2のプライマーセットは、ダイズ植物由来のゲノムDNAを用いた核酸の増幅反応において使用したとき、ダイズのゲノム領域と相同なネイティブなダイズのゲノムDNAを含む第2のアンプリコンを生成する）；核酸の増幅反応を実施し、それによって、第2のアンプリコンを生成するステップとをさらに含む。この方法は、第2のアンプリコンを検出するステップと、試料中の第1のアンプリコンと第2のアンプリコンとを比較するステップであって、両方のアンプリコンが存在することにより、試料が、導入遺伝子挿入物についてヘテロ接合性であることが示されるステップとをさらに含む。10

【0092】

DNA検出キットは、本明細書に開示されている組成物およびDNAの検出の技術分野で周知の方法を使用して開発することができる。このキットは、試料中の対象のダイズイベントDNAを特定するために有用であり、このDNAを含有するダイズ植物を育種するための方法に適用することができる。キットは、例えば、本明細書に開示されているアンプリコンと相同または相補的であるDNA配列、または対象イベントの導入遺伝子の遺伝エレメントに含有されるDNAと相同または相補的であるDNA配列を含有する。これらのDNA配列は、DNA増幅反応において、またはDNAのハイブリダイゼーション方法においてプローブとして、使用することができる。キットは、検出方法を実行するために必要な試薬および材料も含有することができる。20

【0093】

「プローブ」は、従来の検出可能な標識またはレポーター分子（例えば、放射性同位元素、リガンド、化学発光剤、または酵素など）を付着させた単離された核酸分子である。そのようなプローブは、標的核酸の鎖、本発明の場合では、ダイズ植物由来であるかイベント由来のDNAを含む試料由来であるかにかかわらず、前記ダイズイベントの1つ由来のゲノムDNAの鎖と相補的である。本発明によるプローブは、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、標的DNA配列に特異的に結合し、その標的DNA配列の存在を検出する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む。30

【0094】

「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な標的DNA鎖とアニーリングしてプライマーと標的DNA鎖との間のハイブリッドを形成し、次いでポリメラーゼ、例えば、DNAポリメラーゼによって標的DNA鎖に沿って伸長される、単離された／合成された核酸である。本発明のプライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または他の従来の核酸の増幅方法によって標的核酸配列を増幅するためのそれらの使用を指す。

【0095】

プローブおよびプライマーは、一般に、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、14050

2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1
 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 4、1
 4 5、1 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1
 5 5、1 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 4、1
 6 5、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1
 7 5、1 7 6、1 7 7、1 7 8、1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 8 2、1 8 3、1 8 4、1
 8 5、1 8 6、1 8 7、1 8 8、1 8 9、1 9 0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、1
 9 5、1 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2 0 0、2 0 1、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2
 0 5、2 0 6、2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 1 0、2 1 1、2 1 2、2 1 3、2 1 4、2
 1 5、2 1 6、2 1 7、2 1 8、2 1 9、2 2 0、2 2 1、2 2 2、2 2 3、2 2 4、2 10
 2 5、2 2 6、2 2 7、2 2 8、2 2 9、2 3 0、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2
 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4 3、2 4 4、2
 4 5、2 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2
 5 5、2 5 6、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2
 6 5、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 1、2 7 2、2 7 3、2 7 4、2
 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、2 8 3、2 8 4、2
 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、2 9 1、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2
 9 5、2 9 6、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 0 0、3 0 1、3 0 2、3 0 3、3 0 4、3
 0 5、3 0 6、3 0 7、3 0 8、3 0 9、3 1 0、3 1 1、3 1 2、3 1 3、3 1 4、3
 1 5、3 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3 2 0、3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 20
 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3
 3 5、3 3 6、3 3 7、3 3 8、3 3 9、3 4 0、3 4 1、3 4 2、3 4 3、3 4 4、3
 4 5、3 4 6、3 4 7、3 4 8、3 4 9、3 5 0、3 5 1、3 5 2、3 5 3、3 5 4、3
 5 5、3 5 6、3 5 7、3 5 8、3 5 9、3 6 0、3 6 1、3 6 2、3 6 3、3 6 4、3
 6 5、3 6 6、3 6 7、3 6 8、3 6 9、3 7 0、3 7 1、3 7 2、3 7 3、3 7 4、3
 7 5、3 7 6、3 7 7、3 7 8、3 7 9、3 8 0、3 8 1、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3
 8 5、3 8 6、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3
 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4
 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2、4 1 3、4 1 4、4
 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 30
 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 3 0、4 3 1、4 3 2、4 3 3、4 3 4、4
 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、4 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3、4 4 4、4
 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、4 5 0、4 5 1、4 5 2、4 5 3、4 5 4、4
 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、4 6 0、4 6 1、4 6 2、4 6 3、4 6 4、4
 6 5、4 6 6、4 6 7、4 6 8、4 6 9、4 7 0、4 7 1、4 7 2、4 7 3、4 7 4、4
 7 5、4 7 6、4 7 7、4 7 8、4 7 9、4 8 0、4 8 1、4 8 2、4 8 3、4 8 4、4
 8 5、4 8 6、4 8 7、4 8 8、4 8 9、4 9 0、4 9 1、4 9 2、4 9 3、4 9 4、4
 9 5、4 9 6、4 9 7、4 9 8、4 9 9、5 0 0、または1 0 0 0 または2 0 0 0 または
 5 0 0 0 ポリヌクレオチドまたはそれ以上の長さである。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標的配列と特異的にハイブリダイズする。好ましくは、本発明によるプローブおよびプライマーは、標的配列と完全な配列類似性を有するが、標的配列とは異なり、標的配列とハイブリダイズする能力を保持するプローブを従来の方法によって設計することができる。 40

【0096】

プローブおよびプライマーを調製し、使用するための方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、1~3巻Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年に記載されている。PCRのプライマー対は、公知の配列から、例えば、その目的のためのコンピュータプログラムを使用することによって得ることができる。

【0097】

10

20

30

40

50

本明細書に開示されている隣接DNAおよび挿入断片の配列に基づくプライマーおよびプローブを使用して、従来の方法によって、例えば、そのような配列を再クローニングし、配列決定することによって、開示されている配列を確認すること（および、必要であれば、補正すること）ができる。

【0098】

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標的DNA配列とハイブリダイズする。任意の従来の核酸ハイブリダイゼーションまたは增幅の方法を使用して、試料中のトランスジェニックイベント由来のDNAの存在を特定することができる。核酸分子またはその断片は、ある特定の状況下で他の核酸分子と特異的にハイブリダイズすることができる。本明細書で使用される場合、2つの核酸分子は、2つの分子が、逆平行の、二本鎖核酸構造を形成することができる場合、互いと特異的にハイブリダイズすることができると言える。核酸分子は、別の核酸分子と完全な相補性を示す場合、その「相補物」であると言える。本明細書で使用される場合、分子は、分子の一方のあらゆるヌクレオチドが、他方のヌクレオチドと相補的である場合、「完全な相補性」を示すと言える。2つの分子は、少なくとも従来の「低ストリンジエンシー」条件下で、互いとアニーリングしたままであることを可能にするために十分な安定性で互いとハイブリダイズすることができる場合、「最小限相補的」であると言える。同様に、分子は、従来の「高ストリンジエンシー」条件下で、互いとアニーリングしたままであることを可能にするために十分な安定性で互いとハイブリダイズすることができる場合、「相補的」であると言える。従来のストリンジエンシー条件は、Sambrookら、1989年に記載されている。したがって、完全な相補性から逸脱することは、そのような逸脱により、二本鎖構造を形成する分子の能力が完全に妨げられない限りは許容できる。核酸分子がプライマーまたはプローブとしての機能を果たすためには、用いる特定の溶媒および塩濃度の下で安定な二本鎖構造を形成するために十分に配列内で相補的であることのみが必要である。

10

20

【0099】

本明細書で使用される場合、実質的に相同な配列は、高ストリンジエンシー条件下で比較されている核酸配列の相補物と特異的にハイブリダイズし得る核酸配列である。用語「ストリンジエントな条件」は、Sambrookら、1989年、9.52～9.55において考察されている特定のハイブリダイゼーション手順による、核酸プローブの標的核酸（すなわち、対象とする特定の核酸配列）とのハイブリダイゼーションに関して機能的に定義される。Sambrookら、1989年、9.47～9.52および9.56～9.58も参照されたい。したがって、本発明のヌクレオチド配列は、相補的なDNA断片のひと続きと2重鎖分子を選択的に形成するそれらの能力に関して使用することができる。

30

【0100】

構想される適用に応じて、プローブの標的配列に対する選択性のさまざまな程度を実現するためにハイブリダイゼーションのさまざまな条件を使用することができる。高い選択性を必要とする適用のために、一般には、ハイブリッドを形成するために比較的ストリンジエントな条件を用いることがある、例えば、約50～約70の温度で約0.02M～約0.15MのNaClによってもたらされるような比較的低塩かつ/または高温の条件を選択することができる。ストリンジエントな条件は、例えば、ハイブリダイゼーション濾過器を高ストリンジエンシー洗浄緩衝液（0.2×SSC、0.1%のSDS、65）で少なくとも2回洗浄することを伴ってよい。DNAのハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件、例えば、約45で6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）、その後50で2.0×SSCで洗浄することは、当業者に公知である。例えば、洗浄ステップにおける塩濃度は、低ストリンジエンシーである50

40

で約2.0×SSCから高ストリンジエンシーである50で約0.2×SSCまでから選択することができる。さらに、洗浄ステップにおける温度は、低ストリンジエンシー条件である室温、約22から高ストリンジエンシー条件である約65まで増加させることができる。温度と塩との両方が変動してよい、または、温度もしくは塩濃度のいずれかは、他方の変数が変化する一方で一定に保たれてよい。そのような選択的な条件は、も

50

しあれば、プローブと鑄型または標的鎖との間のミスマッチを少し容認する。ハイブリダイゼーションによってDNA配列を検出することは当業者に周知であり、米国特許第4,965,188号および同第5,176,995号の教示は、ハイブリダイゼーション分析の方法の例である。

【0101】

特に好ましい実施形態では、本発明の核酸は、高ストリンジエンシー条件下で、本明細書において例証または提案される、その相補物および断片を含めたプライマー（またはアンプリコンもしくは他の配列）の1つまたは複数と特異的にハイブリダイズする。本発明の一態様では、本発明のマーカー核酸分子は、本明細書において例示された配列の1つに記載されている核酸配列、またはその相補物および／もしくは断片を有する。

10

【0102】

本発明の別の態様では、本発明のマーカー核酸分子は、そのような核酸配列と、80%から100%の間または90%から100%の間の配列同一性を共有する。本発明の別の態様では、本発明のマーカー核酸分子は、そのような配列と95%から100%の間の配列同一性を共有する。そのような配列は、遺伝的交雑の後代を特定するための植物育種方法において、マーカーとして使用することができる。プローブの標的DNA分子とのハイブリダイゼーションは、当業者に公知の任意の数の方法によって検出することができ、それらとしては、これらに限定されないが、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。

【0103】

20

特定の増幅プライマー対を使用する標的核酸配列の増幅（例えば、PCRによる）に関して、「ストリンジエントな条件」は、プライマー対が、対応する野生型配列（またはその相補物）を有するプライマーが結合し得る標的核酸配列のみとハイブリダイズすること、および好ましくは特有の増幅産物、アンプリコンを生成することを可能にする条件である。

【0104】

用語「（標的配列）に特異的な」は、プローブまたはプライマーが、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、標的配列を含む試料中の標的配列のみとハイブリダイズすることを示す。

【0105】

30

本明細書で使用される場合、「増幅されたDNA」または「アンプリコン」は、核酸鑄型の一部である標的核酸配列の核酸増幅産物を指す。例えば、有性交雑によって生じたダイズ植物が、本発明のダイズ植物由来のトランスジェニックイベントゲノムDNAを含有するかどうかを決定するために、ダイズ植物の組織試料から抽出したDNAを、挿入された異種DNAの挿入部位の近接する植物のゲノム内の隣接配列に由来するプライマー、および挿入された異種DNAに由来する第2のプライマーを含むプライマー対を使用して、イベントDNAの存在に対して特徴的であるアンプリコンを生成する核酸の増幅方法に供することができる。アンプリコンは、ある長さであり、同じくイベントに対して特徴的である配列を有する。アンプリコンの長さは、プライマー対の全て合わせた長さ足す1ヌクレオチド塩基対、および／またはプライマー対の全て合わせた長さ足す約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130

40

50

3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1
 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 4、1 4 5、1 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1
 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 5、1 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1
 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1
 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7 5、1 7 6、1 7 7、1 7 8、1 7 9、1
 8 0、1 8 1、1 8 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、1 8 6、1 8 7、1 8 8、1 8 9、1
 9 0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、1 9 5、1 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2
 0 0、2 0 1、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2 0 5、2 0 6、2 0 7、2 0 8、2 0 9、2
 1 0、2 1 1、2 1 2、2 1 3、2 1 4、2 1 5、2 1 6、2 1 7、2 1 8、2 1 9、2
 2 0、2 2 1、2 2 2、2 2 3、2 2 4、2 2 5、2 2 6、2 2 7、2 2 8、2 2 9、2 10
 3 0、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2
 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4 3、2 4 4、2 4 5、2 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2
 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2
 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6 5、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2
 7 0、2 7 1、2 7 2、2 7 3、2 7 4、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 7 9、2
 8 0、2 8 1、2 8 2、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2
 9 0、2 9 1、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3
 0 0、3 0 1、3 0 2、3 0 3、3 0 4、3 0 5、3 0 6、3 0 7、3 0 8、3 0 9、3
 1 0、3 1 1、3 1 2、3 1 3、3 1 4、3 1 5、3 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3
 2 0、3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 20
 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 6、3 3 7、3 3 8、3 3 9、3
 4 0、3 4 1、3 4 2、3 4 3、3 4 4、3 4 5、3 4 6、3 4 7、3 4 8、3 4 9、3
 5 0、3 5 1、3 5 2、3 5 3、3 5 4、3 5 5、3 5 6、3 5 7、3 5 8、3 5 9、3
 6 0、3 6 1、3 6 2、3 6 3、3 6 4、3 6 5、3 6 6、3 6 7、3 6 8、3 6 9、3
 7 0、3 7 1、3 7 2、3 7 3、3 7 4、3 7 5、3 7 6、3 7 7、3 7 8、3 7 9、3
 8 0、3 8 1、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 6、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3
 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4
 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4
 1 0、4 1 1、4 1 2、4 1 3、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4
 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 30
 3 0、4 3 1、4 3 2、4 3 3、4 3 4、4 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、4
 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3、4 4 4、4 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、4
 5 0、4 5 1、4 5 2、4 5 3、4 5 4、4 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、4
 6 0、4 6 1、4 6 2、4 6 3、4 6 4、4 6 5、4 6 6、4 6 7、4 6 8、4 6 9、4
 7 0、4 7 1、4 7 2、4 7 3、4 7 4、4 7 5、4 7 6、4 7 7、4 7 8、4 7 9、4
 8 0、4 8 1、4 8 2、4 8 3、4 8 4、4 8 5、4 8 6、4 8 7、4 8 8、4 8 9、4
 9 0、4 9 1、4 9 2、4 9 3、4 9 4、4 9 5、4 9 6、4 9 7、4 9 8、4 9 9、ま
 たは5 0 0、7 5 0、1 0 0 0、1 2 5 0、1 5 0 0、1 7 5 0、2 0 0 0、またはそれ
 以上のヌクレオチド塩基対（上に列挙されている増大のいずれかを足すまたは引く）にわたってよい。あるいは、プライマー対は、挿入断片のヌクレオチド配列全体を含むアンブリコンが生成されるように、挿入DNAの両側の隣接配列に由来してもよい。植物の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てよい。この距離は、1ヌクレオチド塩基対から最大約2万ヌクレオチド塩基対までにわたることができる。用語「アンブリコン」の使用は、DNAの熱増幅反応において形成される可能性があるプライマーニ量体を特に除外する。 40

【0106】

核酸の増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含めた当技術分野で公知の種々の核酸の増幅方法のいずれかによって実現することができる。種々の増幅方法が当技術分野で公知であり、とりわけ、米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号に記載されている。22kbに至るまでのゲノムDNAを増幅するためにPCR 50

増幅方法が開発されてきた。これらの方法ならびにDNA増幅の技術分野で公知の他の方法を、本発明の実施において使用することができる。本明細書において提供される配列に由来するプライマーを使用してイベントからそのような配列を増幅し、その後PCRアンプリコンまたはクローニングされたDNAの標準のDNA配列決定を行うことにより、本主題のダイズイベント由来の異種導入遺伝子DNA挿入断片の配列または隣接ゲノム配列を検証すること（および必要であれば、補正すること）ができる。

【0107】

これらの方法によって生成されるアンプリコンは、複数の技法によって検出することができる。アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウムを用いた染色は、DNAアンプリコンを検出する周知の一般的な方法である。別のそのような方法は、近接する隣接ゲノムDNA配列および挿入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を設計する遺伝子ビット分析（Genetic Bit Analysis）である。オリゴヌクレオチドは、マイクロウェルプレートのウェル内に固定化されている。対象の領域のPCR後（挿入配列内の1つのプライマーおよび近接する隣接ゲノム配列内の1つのプライマーを使用する）、一本鎖のPCR産物は、固定化されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、DNAポリメラーゼおよび予測される次の塩基に特異的な標識したddNTPを使用する一塩基伸長反応の鋳型としての機能を果たし得る。読み取りは、蛍光またはELISAに基づいてよい。信号により、上首尾の増幅、ハイブリダイゼーション、および一塩基伸長に起因して、挿入断片／隣接配列が存在することが示される。

【0108】

別 の 方法 は 、 Winge (Innov. Pharma. Tech. 00巻:18~24頁、2000年) に 記 載 さ れ て い る よ う な パ イ ロ シ ク エ ネ ス 技 法 で あ る 。 こ の 方 法 で は 近 接 す る ゲ ノ ム D N A と 挿 入 D N A の 接 合 部 と オ バ ハ ラ ッ プ す る オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド を 設 計 す る 。 こ の オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド を 、 対 象 の 領 域 (挿 入 配 列 内 の 1 つ の プ ラ イ マ ズ お よ び 隣 接 ゲ ノ ム 配 列 内 の 1 つ の プ ラ イ マ ズ) 由 来 の 一 本 鎖 の P C R 産 物 と ハ イ ブ リ ダ イ ズ さ セ 、 D N A ポ リ メ ラ ゼ 、 A T P 、 ス ル フ リ ラ ゼ 、 ル シ フ ェ ラ ゼ 、 ア ピ ラ 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 ク ト す る 。 d N T P を 個 々 に 加 え 、 そ れ が 取 り 込 ま れ た 結 果 、 測 定 さ れ る 光 信 号 が も た ら さ れ る 。 光 信 号 に よ り 、 増 幅 、 ハ イ ブ リ ダ イ ズ シ ョ ン 、 お よ び 单 一 塩 基 ま た は 多 塩 基 の 伸 長 が 上 首 尾 で あ り 、 し た が て 導 入 遺 伝 子 挿 入 断 片 / 隣 接 配 列 が 存 在 す る こ と が 示 さ れ る 。

【0109】

蛍光偏光は、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別の方法である。この方法に従って、オリゴヌクレオチドを、ゲノムの隣接DNAと挿入DNAの接合部とオーバーラップするように設計する。このオリゴヌクレオチドを、対象の領域（挿入DNA内の1つのプライマーおよび隣接ゲノムDNA配列内の1つのプライマー）由来の一本鎖のPCR産物とハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼおよび蛍光標識したddNTPの存在下でインキュベートする。一塩基伸長により、ddNTPが取り込まれる。取り込みは、蛍光光度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、および一塩基伸長の成功によって、導入遺伝子挿入断片／隣接配列が存在することを示す。

【0110】

TAQMAN（登録商標）（P E A p p l i e d B i o s y s t e m 、 F o s t e r C i t y 、 C a l i f . ）は、DNA配列の存在を検出し、定量する方法である。簡単に述べると、ゲノムの隣接と挿入DNAの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を設計する。FRETプローブおよびPCRプライマー（挿入DNA配列内の1つのプライマーおよび隣接ゲノム配列内の1つのプライマー）を、耐熱性ポリメラーゼおよびddNTPの存在下でサイクルにかける。特異的な増幅の間に、Taq DNAポリメラーゼにより、FRETプローブ上のクエンチング部分から蛍光部分が離れて除かれ、放出される。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って、隣接配列／導入遺伝子挿入断片配列が存在することを示す。

10

20

30

40

50

【0111】

配列の検出において使用するための分子ビーコンが記載されている。簡単に述べると、隣接ゲノムDNAと挿入DNAの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を設計する。FRETプローブの独特的構造により、蛍光部分およびクエンチング部分が極めて近傍に保たれる二次構造が含有される。FRETプローブおよびPCRプライマー（挿入DNA配列内の1つのプライマーおよび隣接ゲノム配列内の1つのプライマー）を、耐熱性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下でサイクルにかける。PCR増幅が上手くいった後、FRETプローブが標的配列にハイブリダイズすることにより、プローブの二次構造が除去され、蛍光部分およびクエンチング部分が空間的に分離される。蛍光シグナルが結果として生じる。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って、隣接ゲノム配列／導入遺伝子挿入断片配列が存在することを示す。 10

【0112】

ダイズゲノム内の挿入するために優れた位置を開示し、本発明は、この遺伝子位置の概ね近くに少なくとも1つの非ダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1挿入断片を含むダイズ種子および/またはダイズ植物も含む。1つの選択肢は、本明細書において例示されているダイズイベントpDAB9582.814.19.1: : pDAB4468.04.16.1挿入断片を異なる挿入断片で置換することである。これらの一般的な点については、例えば、本発明に従って、標的化相同組換えを使用することができる。この種類の技術は、例えば、WO03/080809A2および対応する公開された米国特許出願(U.S.20030232410)の主題である。したがって、本発明は、本明細書において同定される隣接配列の全てまたは認識できる部分が隣接する異種挿入断片（多コピーのaad-12、cry1F、cry1Acまたはpat遺伝子の代わりにまたはそれと一緒に）を含む植物および植物細胞を包含する（配列番号1のbp1-1400および配列番号2のbp153-1550および配列番号15のbp1-2730および配列15のbp9122-10,198）。aad-12、cry1F、cry1Acまたはpatの1つの追加的なコピー（または複数の追加的なコピー）も、この/これらのように挿入の標的とすることができます。 20

【0113】

本明細書において言及または引用された全ての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、それらが本明細書の明確な教示と相反しない限りは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。 30

【0114】

以下の実施例は、本発明を実施するための手順を例示するため、および本発明のある特定の好ましい実施形態を実証するために含まれる。これらの実施例は、限定するものと解釈されるべきではない。当業者には、以下の実施例に開示されている技法は、それを実施するための好ましい方式を例示するために使用される特定の手法を表していることが理解されたい。しかし、当業者には、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、なお同様または類似の結果を得ながら、これらの特定の実施形態において多くの変更を行うことができる事が理解されたい。別段の指定のない限り、全ての百分率は重量により、特に断りのない限り、全ての溶媒混合物の割合は体積による。 40

【0115】

別段の指定のない限り、以下の略語が使用されている。

b p 塩基対

摂氏温度

D N A デオキシリボ核酸

E D T A エチレンジアミン四酢酸

k b キロベース

μ g マイクログラム

μ L マイクロリットル

m L ミリリットル

M モル質量

P C R ポリメラーゼ連鎖反応

P T U 植物転写単位

S D S ドデシル硫酸ナトリウム

S S C 塩化ナトリウムとクエン酸ナトリウムとの混合物を含有する緩衝溶液、pH 7.0

T B E トリス塩基、ホウ酸およびEDTAの混合物を含有する緩衝溶液、pH 8.3

【0116】

本発明の実施形態は以下の実施例においてさらに定義される。これらの実施例は、単に例示として示されていることが理解されるべきである。上記の考察およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特性を確認することができ、また、その主旨および範囲から逸脱することなく、本発明の実施形態に種々の変更および改変を行って、種々の用法および条件に適合させることができる。したがって、本明細書に示され、記載されている実施形態に加えて、本発明の実施形態の種々の改変が、前述の説明から当業者に明らかになるであろう。そのような改変も添付の特許請求の範囲の範囲内に入るものとする。

【0117】

本明細書に記載されている各参考文献の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

(実施例)

【実施例1】

【0118】

cry1F および cry1Ac ダイズイ vent pDAB9582.814.19.1 の形質転換および選抜

ダイズイ vent pDAB9582.814.19.1 を含むトランスジェニックダイズ (Glycine max) を、ダイズ子葉節の外植片をアグロバクテリウム媒介形質転換によって生成した。T鎖DNA領域内に選抜マーカー、patv6 および対象の遺伝子 cry1F v3 および cry1Ac synpro を含むバイナリーベクター pDAB9582 (図 1) を保有する武装解除したアグロバクテリウム株 EHA101 (Hoodら、1993年) を使用して形質転換を開始した。pDAB9582 のDNA配列は配列番号 3 に示され、下の表 1 において注釈を付けている。

【0119】

10

20

30

【表1】

表1.pDAB9582に位置する遺伝子エレメント

bp (配列番号3)	構築物エレメント	参考文献
272～1593	AtUbi10プロモーター	Callisら、(1990) <i>J. Biol. Chem.</i> 、265: 12486～12493
1602～5048	Cry1F	上記
5151～5607	ORF23 3'UTR	米国特許第5,428,147号
5671～6187	CsVMVプロモーター	Verdaguerら、(1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> 、31: 1129～1139
6197～9667	Cry 1AC	上記
9701～10157	ORF23 3'UTR	米国特許第5,428,147号
10272～10788	CsVMVプロモーター	Verdaguerら、(1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> 、31: 1129～1139
10796～11347	PAT	Wohllebenら、(1988) <i>Gene</i> 70: 25～37
11450～12153	ORF1 3'UTR	Huangら、(1990) <i>J. Bacteriol.</i> 172:1814～1822

【0120】

Zengら(2004年)の手順を改変して用いてアグロバクテリウム媒介形質転換を行った。簡単に述べると、ダイズ種子(Maverick栽培品種)を基本培地上で発芽させ、子葉節を単離し、アグロバクテリウムに感染させた。アグロバクテリウムを除去するために、苗条誘導(shoot initiation)培地、苗条伸長培地、および発根培地にセフォタキシム、チメンチンおよびバンコマイシンを補充した。グルホシネットによる選択を使用して、形質転換されていない苗条の生長を阻害した。選択された苗条を、根を発生させるために発根培地に移し、次に、小植物を順化させるために土壤混合物に移した。

【0121】

選択された小植物の頂小葉にグルホシネットを塗布して推定形質転換体についてスクリーニングした。スクリーニングされた小植物を温室に移して、気候順化させ、次に葉にグルホシネットを塗布して耐性を再確認し、推定形質転換体であるとみなした。スクリーニングされた植物の試料を採取し、選択マーカー遺伝子および/または対象の遺伝子を確認するための分子解析を行った。 T_0 植物を温室内で自家受精させて T_1 種子を生じさせた。

【0122】

このイベント、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1は、独立した形質転換分離株から生成した。 T_1 植物を戻し交雑し、その後の世代にわたって優良品種に遺伝子移入した。イベントをその独特の特性、例えば、単一の挿入部位、正常なメンデル分離、安定発現、ならびに除草剤耐性および農業生産力を含めた効力の優れた組合せに基づいて選抜した。以下の実施例は、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1を特徴付けるために使用したデータを含有する。

【実施例2】

【0123】

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1におけるタンパク質の発現の特徴付け

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1において発現させた組換え型のC

10

20

30

40

50

Cry1F タンパク質、*Cry1Ac* タンパク質、および *PAT* タンパク質の生化学的性質を特徴付けた。定量的酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) は、タンパク質の生化学的性質を特徴付け、ダイズイベント pDAB9582.814.19.1 におけるこれらのタンパク質の発現を確認するために用いることができる、当技術分野の範囲内で公知の生化学的アッセイである。

【0124】

実施例 2.1 : 植物組織における *PAT* タンパク質、*Cry1F* タンパク質、および *Cry1Ac* タンパク質の発現

ダイズ組織の試料を試験植物から単離し、発現を解析するために調製した。0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含有する界面活性剤 Tween-20 (PBST) を含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を用いてダイズ植物の組織から *PAT* タンパク質を抽出した。植物組織を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、*PAT* ELISA キットをサンドイッチ形式で使用して解析した。キットは製造者 (Envirologix, Portland, ME) の推奨プロトコールに従って使用した。このアッセイにより、発現された *PAT* タンパク質を測定した。

【0125】

界面活性剤 Tween-20 (PBST) を含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を用いてダイズ植物の組織から *Cry1F* タンパク質を抽出した。植物組織を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、*Cry1F* ELISA キットをサンドイッチ形式で使用して解析した。キットは製造者 (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE) の推奨プロトコールに従って使用した。このアッセイにより、発現された *Cry1F* タンパク質を測定した。

【0126】

0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含有する界面活性剤 Tween-20 (PBST) を含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を用いてダイズ植物の組織から *Cry1Ac* タンパク質を抽出した。植物組織を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、*Cry1Ac* ELISA キットをサンドイッチ形式で使用して解析した。キットは製造者 (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE) の推奨プロトコールに従って使用した。このアッセイにより、*Cry1Ac* タンパク質を測定した。

【0127】

ダイズイベント pDAB9582.814.19.1において、検出解析を実施して発現の安定性および遺伝性を垂直方向 (世代間) および水平方向 (世代内の系列間) の両方で調査した。

【0128】

実施例 2.2 : 植物組織における *PAT* タンパク質、*Cry1F* タンパク質、および *Cry1Ac* タンパク質の発現

ダイズイベント pDAB9582.814.19.1における *Cry1F* タンパク質、*Cry1Ac* タンパク質および *PAT* タンパク質のレベルを決定した。ダイズの葉組織から、可溶性の抽出可能なタンパク質を、定量的酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 方法を使用して測定した。T₂ ~ T₆ 世代のダイズイベント pDAB9582.814.19.1 で発現は安定であり (分離性でない)、系列全てにわたって一貫していた。表 2 に、ダイズイベント pDAB9582.814.19.1におけるトランスジェニックタンパク質の平均発現レベルが列挙されている。

【0129】

【表2】

表2.ダイズイベント pDAB9582.814.19.1 における異なるトランスジェニックタンパク質の平均発現レベル

異なるタンパク質の発現レベル(ng/cm ²)			
イベント	Cry1F	Cry1 Ac	PAT
ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	133	17.4	12

10

【実施例3】

【0130】

ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の挿入断片および隣接境界領域におけるDNA配列のクローニングおよび特徴付け

ゲノムの挿入部位を特徴付け、説明するために、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の隣接ゲノムT-DNA境界領域の配列を決定した。1400bpの5'隣接境界配列(配列番号1)および1398bpの3'隣接境界配列(配列番号2)を含むダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のゲノム配列を確認した。ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の境界配列に基づくPCR増幅により、境界領域がダイズ起源であること、および接合領域がダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 に独特の配列であることが検証された。接合領域をダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のイベント特異的な同定のために使用することができる。さらに、T鎖の挿入部位を、形質転換されていないダイズのゲノム由来の同定された隣接境界配列の領域に対応するゲノムの断片を増幅することによって特徴付けた。ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 を形質転換されていないゲノム配列と比較することにより、T鎖の組み込みの間に元の遺伝子座から約57bpが欠失したことが明らかになった。全体的に、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の挿入断片および境界配列を特徴付けることにより、p D A B 9 5 8 2 由来のT鎖のインタクトなコピーがダイズゲノム内に存在することが示された。

20

【0131】

30

【表3】

表3.ダイズイベントpDAB9582.814.19.1におけるダイズゲノムDNAを確認するために使用したプライマーおよびその配列の一覧

配列番号	プライマーの名称	サイズ(bp)	配列(5'から3')	目的
配列番号4	81419_FW3	30	TTTCTCCTATCCGTCA AATAAATCTGCTCC	5'境界ゲノムDNAの確認 、AtUbi10RV1またはRV2 と一緒に;5'IREnd-01または 5'IREnd-02と一緒に使用
配列番号5	81419_RV1	27	GGGTGATTTGGTGCCA AAAGTTATGTT	3'境界ゲノムDNAの確認 、3'PATEnd05または3' PATEnd06と一緒に使用
配列番号6	81419_RV2	24	TGGAGGGTCATATCGC AAAAGACT	3'境界ゲノムDNAの確認 、3'PATEnd05または3' PATEnd06と一緒に使用
配列番号7	81419_RV3	24	GTTCTGCGTCGTGGAG GGTCATAT	3'境界ゲノムDNAの確認 、3'PATEnd05または3' PATEnd06と一緒に使用
配列番号8	5'IREnd-01	29	CGAGCTTCTAATTTC AAACTATTGGGC	5'境界ゲノムDNAの確認 、81419_FW3と一緒に使用
配列番号9	5'IREnd-02	30	TCCTAGATCATCAGTT CATACAAACCTCCA	5'境界ゲノムDNAの確認 、81419_FW3と一緒に使用
配列番号10	AtUbi10RV1	29	CGGTCTAGATCATCA GTTCATACAAACC	5'境界ゲノムDNAの確認 、81419_FW3と一緒に使用
配列番号11	AtUbi10RV2	28	CACTCGTGTTCAGTCC AATGACCAATAA	5'境界ゲノムDNAの確認 、81419_FW3と一緒に使用
配列番号12	3'PATEnd05	20	GCTCCTCCAAGGCCAG TTAG	3'境界ゲノムDNAの確認 、81419_RV1、RV2または RV3と一緒に使用
配列番号13	3'PATEnd06	20	CCAGTTAGGCCAGTTA CCCA	3'境界ゲノムDNAの確認 、81419_RV1、RV2または RV3と一緒に使用

【0132】

【表4】

表4.ダイズイベント pDAB9582.814.19.1における境界領域およびイベント特異的な配列の標準PCR増幅の条件

標的配列	プライマーセット	PCR 混合物	前変性 (°C/分)	変性(°C/ 秒)	伸長(°C/分: 秒)	最終的な伸 長(°C/分)
5'境界	81419_FW3/ AtUbi10R V1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32サイクル		
5'境界	81419_FW3/5'IREnd- 01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32サイクル		
3'境界	3'PATEnd05/81419_R V2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35サイクル		
3'境界	3'PATEnd05/81419_ RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35サイクル		
3'境界	3'PATEnd06/81419_ RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35サイクル		
3'境界	3'PATEnd06/81419_ R V3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32サイクル		
挿入断片の遺伝子座全てにわたる	81419_FW3/81419_RV 3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32サイクル		

10

20

30

【0 1 3 3】

【表5】

表5.ダイズイベントpDAB9582.814.19.1における境界領域およびイベント特異的な配列の標準PCR增幅用のPCR混合物

PCR混合物A		PCR混合物B	
試薬	1×反応(μL)	試薬	1×反応(μL)
H2O	0.8	H2O	14.6
ACCPRIME PFX SUPERMIX	20	10X LA TAQ BUFFER	2
---	---	MgCl ₂ (25mM)	0.6
---	---	dNTP (2.5uM)	1.6
10μMのプライマー	0.2	10μMのプライマー	0.1
gDNA消化物	1	gDNA消化物	1
---	---	LA TAQ (5U/ul)	0.1
反応体積:	22	反応体積:	20
PCR混合物C		PCR混合物D	
試薬	1×反応(μL)	試薬	1×反応(μL)
H2O	28	H2O	11.6
10×PCR緩衝液II(Mg-プラス)	5	10×PCR緩衝液II(Mg-プラス)	2
MgCl ₂ [25mM]	1.5	MgCl ₂ [25mM]	0.6
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	3.2
アダプターPCRプライマー(10μM)	1	プライマー1 (10μM)	0.4
GOIネステッドプライマー(10μM)	1	プライマー2 (10μM)	0.4
DNA結合ビーズ	5	DNA鑄型	0.2
LA TAQ (5U/ul)	0.5	LA TAQ (5U/ul)	1.6
反応体積:	50	反応体積:	20

【0134】

実施例3.1: ダイズのゲノム配列の確認

5'隣接境界および3'隣接境界を第02染色体由来のダイズ(Glycine max)全ゲノムショットガン配列に対しアラインメントし、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1の導入遺伝子がダイズゲノムの第02染色体に挿入されたことが示されている。ダイズゲノムからダイズイベントpDAB9582.814.19.1の挿入部位を確認するために、異なるプライマー対を用いてPCRを行った(図2、表3、表4、および表5)。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1由来のゲノムDNAおよび他のトランスジェニックダイズ系統または非トランスジェニックダイズ系統由来のゲノムDNAを鑄型として使用した。5'境界配列が正確であることを確認するために、AtUBi10プロモーター遺伝子エレメント、例えば、AtUBi10RV1に結合するように設計したプライマー、および、ダイズゲノムの第02染色体上のクローニングされた5'末端境界に結合するように設計したプライマー、81419_FW3と称されるプライマーを、AtUBi10プロモーター遺伝子エレメントから5'末端境界配列にわたるDNAセグメントを增幅するために使用した。同様に、クローニングされた3'境界配列を確認するために、pat特異的なプライマー、例えば、3'PATEnd05、ならびに、81419_RV1、81419_RV2および81419_RV3と称される、

10

20

30

40

50

クローニングされた3'末端境界配列に従って設計した3つのプライマーを、p a t 遺伝子から3'境界配列にわたるDNAセグメントを増幅するために使用した。予測されたサイズを有するDNA断片は、各プライマー対を用いたダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のゲノムDNAからのみ増幅されたが、他のトランスジェニックダイズ系統または非トランスジェニック対照由来のDNA試料からは増幅されなかった。結果は、クローニングされた5'境界配列および3'境界配列が、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のT鎖挿入断片の隣接境界配列であることを示している。

【0135】

ダイズゲノム内のDNA挿入物をさらに確認するために、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のT鎖挿入断片を含有しないゲノムDNAにおいてダイズ境界配列にわたるPCR増幅を完了した。5'末端境界配列に従って設計したプライマー8 1 4 1 9 _ F W 3、および3'末端境界配列に対して設計した1つのプライマー8 1 4 1 9 - R V 3を使用して、p D A B 9 5 8 2 T鎖が組み込まれた遺伝子座を含有したDNAセグメントを増幅した。予測通り、8 1 4 1 9 _ F W 3および8 1 4 1 9 _ R V 3のプライマー対を用いて完了したPCR増幅により、全ての他のダイズ対照系統からおよそ1.5kbのDNA断片が生じたが、p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1からは生じなかった。同定されたダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1の5'境界配列および3'境界配列を第02染色体由来のダイズ(Glycine max)全ゲノムショットガン配列とアライメントすることにより、元の遺伝子座からの約57bpの欠失が明らかになった(図3)。これらの結果により、ダイズイベントp D A B 8 2 9 4の導入遺伝子がダイズゲノムの第02染色体の部位に挿入されたことが実証された。

【実施例4】

【0136】

ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のサザンプロットによる特徴付け
サザンプロット分析を使用して、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1の組み込みパターンを確立した。これらの実験により、c r y 1 A c およびc r y 1 F導入遺伝子のダイズゲノム内への組み込みおよびその完全性を実証するデータが生成した。ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1は、プラスミドp D A B 9 5 8 2 由来のc r y 1 A c およびc r y 1 F植物転写単位(PTU)の單一コピーを含有する全長の、単純な組み込みイベントであると特徴付けられた。

【0137】

サザンプロットのデータにより、T鎖断片がダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のゲノムに挿入されたことが示唆された。詳細なサザンプロット分析を、p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1のT鎖組み込み領域に含有されるc r y 1 A c およびc r y 1 F遺伝子に特異的なプローブ、およびプラスミド内に位置する切断部位を有し、プラスミドまたはプラスミドとダイズのゲノムDNAの接合部にわたる断片(境界断片)内にハイブリダイズ断片を生じる説明的な制限酵素を使用して行った。サザンハイブリダイゼーションによって示された制限酵素とプローブの組合せについての分子量は、このイベントに独特であり、その同定パターンを確立した。これらの分析により、c r y 1 A c およびc r y 1 F PTUの再配置を伴わずにプラスミド断片がダイズのゲノムDNAに挿入されたことも示された。

【0138】

実施例4.1

ダイズの葉の試料の収集およびゲノムDNA(gDNA)の単離

ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1を含有する個々のダイズ植物から回収した葉組織からゲノムDNAを抽出した。さらに、c r y 1 A c およびc r y 1 F遺伝子が存在しない物質系統の代表である遺伝的背景を含有する従来のダイズ植物であるM a v e r i c kからgDNAを単離した。標準のCTAB法(Sambrookら(1989年))の後、凍結乾燥した葉組織から個々のゲノムDNAを抽出した。抽出した後、DNAを、P ICO GREEN試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して

10

20

30

40

50

分光蛍光分析によって定量した。次いで、DNAをアガロースゲル上で可視化してP I C O G R E E N分析からの値を確認し、DNAの質を決定した。

【0139】

実施例4.2

DNAの消化および分離

ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1をサザンプロットによって分子キヤラクタリゼーションするために、10マイクログラム(10 μ g)のゲノムDNAを消化した。ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1および非トランスジェニックダイズ系統であるM a v e r i c k由来のゲノムDNAを、各DNA試料にDNA 1 μ g当たりおよそ5ユニットの選択された制限酵素および対応する反応緩衝液を加えることによって消化した。各試料を、およそ37¹⁰で一晩インキュベートした。単独消化のために、制限酵素A s e I、H i n d I I I、N s i I、およびN d e Iを個々に使用した(New England BioLabs、I p s w i c h、MA)。二重消化のために制限酵素N o t IおよびA p a L Iと一緒に使用した(New England BioLabs、I p s w i c h、MA)。さらに、陽性ハイブリダイゼーション対照試料を、プラスミドDNAであるp D A B 9 5 8 2を非トランスジェニックダイズ品種であるM a v e r i c k由来のゲノムDNAと混ぜ合わせることによって調製した。プラスミドDNA/ゲノムDNA反応混液を、試験試料の場合と同じ手順および制限酵素を用いて消化した。

【0140】

消化物を一晩インキュベートした後、Q U I C K - P R E C I P P L U S S O L U T I O N (E d g e B i o s y s t e m s、G a i t h e r s b u r g、M D) 25 μ Lを加え、消化されたDNA試料を、イソプロパノールを用いて沈澱させた。沈澱したDNAペレットを、1 \times ローディング緩衝液(0.01%プロモフェノールブルー、10.0 mMのE D T A、10.0%グリセロール、1.0 mMのトリス、p H 7.5)15 μ Lに再懸濁させた。次いで、DNA試料および分子サイズマーカーを、0.4 \times T A E緩衝液(F i s h e r S c i e n t i f i c、P i t t s b u r g h、P A)を用いた0.85%アガロースゲルにより、35ボルトでおよそ18~22時間、電気泳動して断片の分離を実現した。ゲルを臭化工チジウム(I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A)で染色し、DNAを紫外線(U V)の下で可視化した²⁰

【0141】

実施例4.3

サザンプロット分析を基本的にM e m e l i n kら(1994年)に記載されている通り実施した。簡単に述べると、DNA断片を電気泳動によって分離し、可視化した後、ゲルを、0.25MのH C lを用い、およそ20分にわたって脱プリン化し、次いで、変性溶液(0.4MのN a O H、1.5MのN a C l)におよそ30分間、その後、中和溶液(1.5MのN a C l、0.5Mのトリス、p H 7.5)に少なくとも30分間曝露させた。ナイロンメンブレンへのサザン転写を、10 \times S S Cを伴うウイッキング系を用いて一晩実施した。転写後、U V架橋によってDNAをメンブレンに結合させ、その後、メンブレンを2 \times S S C溶液で簡単に洗浄した。このプロセスにより、ハイブリダイゼーションのためのサザンプロットメンブレンの準備ができた。³⁰

【0142】

実施例4.4

DNAプローブの標識化およびハイブリダイゼーション

標識したプローブを使用してナイロンメンブレンに結合したDNA断片を検出した(表6)。ジゴキシゲニン(D I G)標識されたヌクレオチド[D I G - 1 1] - d U T Pを、遺伝子エレメントに特異的なプライマーを使用してプラスミドp D A B 9 5 8 2から増幅されたDNA断片にP C Rに基づいて組み込むことによってプローブを生成した。P C R合成によるDNAプローブの生成を、P C R D I G P r o b e S y n t h e s i s K i t (R o c h e D i a g n o s t i c s、I n d i a n a p o l i s、I N)⁴⁰

を製造者の推奨手順に従って使用して行った。

【0143】

標識したプローブをアガロースゲル電気泳動によって解析して、それらの質および数量を決定した。次いで、基本的にDIG EASY HYB SOLUTION (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) について記載されている手順を用いて、特異的な断片を検出するために、所望の量の標識したプローブをナイロンメンブレン上の標的DNAとハイブリダイズさせるために使用した。簡単に述べると、固定されたDNAを含有するナイロンメンブレンプロットを2×SSCで簡単に洗浄し、ハイブリダイゼーションビン中の予め温めたDIG EASY HYB SOLUTION 10 20~25mLと、ハイブリダイゼーションオープン内、およそ45~55で約2時間にわたってプレハイブリダイズさせた。次いで、プレハイブリダイゼーション溶液をデカントし、ウォーターバス中でおよそ5分間煮沸することによって変性させた所望の量の特異的なプローブを含有する予め温めたDIG EASY HYB SOLUTION 約15mLと交換した。次いで、ハイブリダイゼーションステップをハイブリダイゼーションオープン内、およそ45~55で一晩行った。

【0144】

プローブハイブリダイゼーションの最後に、プローブを含有するDIG EASY HYB SOLUTIONを清潔なチューブ内にデカントし、およそ-20で保管した。これらのプローブは、製造者の推奨手順に従って2回まで再使用することができた。メンブレンプロットを簡単にすすぎ、清潔なプラスチック容器中で低ストリンジエンシー洗浄緩衝液(2×SSC、0.1%SDS)を用いて室温でおよそ5分にわたって2回洗浄し、その後、高ストリンジエンシー洗浄緩衝液(0.1×SSC、0.1%SDS)を用いて2回、それぞれおよそ65で15分間洗浄した。メンブレンプロットを、DIG WASH AND BLOCK BUFFER SET (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)の1×マレイン酸緩衝液を用いておよそ5分にわたって簡単に洗浄した。その後、1×ブロッキング緩衝液で2時間にわたってブロッキングし、同じく1×ブロッキング緩衝液中の抗DIG-AP(アルカリホスファターゼ)抗体(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)と一緒に最低でも30分間インキュベートした。1×洗浄緩衝液を用いて2~3回洗浄した後、特異的なDNAプローブはメンブレンプロットに結合したままであり、DIG標識されたDNA標準物質を、CDP-STAR CHEMILUMINESCENT NUCLEIC ACID DETECTION SYSTEM (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を製造者の推奨に従って使用して可視化した。1つまたは複数の時点でプロットを化学発光フィルムに曝露させて、ハイブリダイズした断片を検出し、分子サイズ標準物質を可視化した。フィルムをALL-PRO 100 PLUSフィルム現像剤(Konica Minolta, Osaka, Japan)を用いて現像し、画像をスキャンした。検出されたバンドの数およびサイズを各プローブについて実証した。記載の通りDIG検出後に可視化されるDIG-LABELLED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER II (DIG MWM II)およびDIG-LABELLED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER VII (DIG MWM VII)を使用して、サザンプロット上にハイブリダイズした断片サイズを決定した。

【0145】

【表6】

表6.サザン分析において使用したプローブの位置および長さ

プローブの名称	遺伝エレメント	長さ(bp)
<i>Cry1Ac</i>	<i>cry1Ac</i>	1720
<i>Cry1F</i>	<i>cry1F</i>	1746
<i>specR</i>	スペクチノマイシン抵抗性遺伝子	750
<i>OriRep</i>	<i>Ori Rep</i>	852
<i>trfA</i>	複製開始タンパク質trfA	1119

10

【0146】

実施例4.5

サザンプロットの結果

cry1Ac および *cry1FPTU* の公知の制限酵素部位に基づく、特定の消化物およびプローブに関して予測された断片サイズおよび観察された断片サイズが表7に示されている。これらの消化およびハイブリダイゼーションから2種類の断片を同定した：公知の酵素部位がプローブ領域に隣接し、*cry1Ac* および *cry1FPTU* の挿入領域内に完全に含有されている内部の断片、および公知の酵素部位がプローブ領域の一端に位置し、第2の部位がダイズゲノム内にあると予測される境界断片。ほとんどの場合、DNA断片の組み込み部位はそれぞれのイベントに独特であるので、境界断片のサイズはイベントごとに変動する。境界断片により、組み込まれたDNAに対して制限酵素部位を位置づける手段およびDNA挿入物の数を評価する手段がもたらされる。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1を含有するダイズの多世代に対して完了したサザンプロット分析により、プラスミドpDAB9582由来の低コピー、インタクトな*cry1Ac* および *cry1FPTU* が、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1のダイズゲノムに挿入されたことを示唆するデータがもたらされた。

20

【0147】

【表7】

表7.サザンプロット分析において予測されたハイブリダイズ断片および観察されたハイブリダイズ断片。1.予測された断片サイズはpDAB9582のプラスミドマップに基づく。2.観察された断片サイズは、これらの分析からの概算とみなされ、DIG-LABELLED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER IIおよびMARK VII断片の指示サイズに基づく。

D N A プロー ^ブ	制限酵素	試料	予測された断片サイズ(bp) ¹	観察された断片サイズ(bp) ²
Cry1Ac	AseI	pDAB9582	13476	>14000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	>7286	約7400
	Nsi I	pDAB9582	15326	>15000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
	Not I+ApaLI	pDAB9582	4550	約4500
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	4550	約4500
Cry1F	NdeI	pDAB9582	8071	約8000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	5569	約7500
	Nsi I	pDAB9582	11044	11000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
	Hind III	pDAB9582	7732	約7700
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	7732	約7700
SpecR	NsiI	pDAB9582	15320	約15000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	なし	なし
trfA	NsiI	pDAB9582	15320	約15000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	なし	なし
oriREP	NdeI	pDAB9582	5239	約5000
		Maverick	なし	なし
		ダイズイベント pDAB9582.814.19.1	なし	なし

【0148】

制限酵素 AseI および NsiI は、プラスミド pDAB9582 に独特の制限部位を結合および分割する。続いて、これらの酵素を、ダイズイベント pDAB9582.814.19.1 における cry1Ac 遺伝子挿入断片を特徴付けるために選択した。7286 bp より大きいまたは 9479 bp より大きい境界断片は、それぞれ AseI および NsiI で消化した後、プローブとハイブリダイズすることが予測された（表7）。それぞ

れ A s e I および N s i I 消化を使用したとき、約 7 4 0 0 b p および 1 0 0 0 0 より大きい b p の単一の c r y 1 A c ハイブリダイゼーションバンドが観察された。プローブがこのサイズのバンドにハイブリダイズすることにより、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のダイズゲノム内に c r y 1 A c 遺伝子に対する単一の挿入部位が存在することが示唆される。制限酵素 N o t I および A p a L I を、 c r y 1 A c 植物転写単位 (P T U 、プロモーター / 遺伝子 / ターミネーター) を含有する断片を放出し、二重消化をさせるために選択した (表 7) 。予測された 4 5 5 0 b p の断片は、 N o t I および A p a L I 二重消化した後、プローブを用いて観察された。酵素を用いて p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 試料を消化し、その後プローブとハイブリダイズさせることで得られた結果により、プラスミド p D A B 9 5 8 2 由来のインタクトな c r y 1 A c P T U の単一コピーがダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のダイズゲノムに挿入されたことが示された。

【 0 1 4 9 】

制限酵素 N d e I および N s i I は、プラスミド p D A B 9 5 8 2 の制限部位に結合し、切断する。続いて、これらの酵素を、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 における c r y 1 F 遺伝子挿入断片を特徴付けるために選択した。5 5 6 9 b p より大きい境界断片および 9 4 7 9 より大きい境界断片は、それぞれ N d e I および N s i I で消化した後、プローブとハイブリダイズすることが予測された (表 7) 。 N d e I および N s i I を使用したとき、それぞれ約 7 5 0 0 b p および 1 0 0 0 0 b p より大きい単一の c r y 1 F ハイブリダイゼーションバンドが観察された。プローブがこのサイズのバンドにハイブリダイズすることにより、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のダイズゲノム内に c r y 1 F 遺伝子に対する単一の挿入部位が存在することが示唆される。制限酵素 H i n d I I I を、 c r y 1 F 植物転写単位 (P T U ; プロモーター / 遺伝子 / ターミネーター) を含有する断片を放出させるために選択した (表 7) 。予測された 7 7 3 2 b p の断片が、 H i n d I I I 消化後にプローブを用いて観察された。 p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 試料を酵素で消化し、その後プローブとハイブリダイズさせることで得られた結果により、プラスミド p D A B 9 5 8 2 由来のインタクトな c r y 1 F P T U がダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 のダイズゲノムに挿入されたことが示された。

【 0 1 5 0 】

実施例 4 . 6 : 骨格配列が存在しないこと

ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 にスペクチノマイシン抵抗性遺伝子 (s p e c R) 、 O r i R e p エレメントおよび複製開始タンパク質 t r f A (T R f A エレメント) が存在しないことを検証するために、サザンプロット分析も行った。適切な陽性対照 (M a v e r i c k ゲノム D N A に p D A B 9 5 8 2 を付加したもの) および陰性対照 (M a v e r i c k ゲノム D N A) をサザン分析に含めた場合、スペクチノマイシン抵抗性、 O r i R e p エレメントまたは t r f A エレメントに対する特異的なハイブリダイゼーションは予測されなかった。 N s i I 消化し、 s p e c R 特異的なプローブとハイブリダイズさせた後、陽性対照試料 (M a v e r i c k ゲノム D N A に p D A B 9 5 8 2 を付加したもの) において、 1 5 3 2 0 b p の、 1 つの予測されたサイズのバンドが観察された。 s p e c R プローブは陰性対照の試料およびダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の試料とはハイブリダイズしなかった。同様に、 N s i I 消化し、 t r f A プローブとハイブリダイズさせた後、 1 5 3 2 0 b p の、 1 つの予測されたサイズのバンドが陽性対照試料 (p D A B 9 5 8 2 プラス m a v e r i c k) において検出されたが、陰性対照の試料およびダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の試料では検出されなかった。 N d e I 消化し、 O r i R e p 特異的なプローブとハイブリダイズさせた後、 5 3 2 9 b p の、別の予測されたサイズのバンドが陽性対照試料 (M a v e r i c k ゲノム D N A に p D A B 9 5 8 2 を付加したもの) において検出されたが、陰性対照の試料およびダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の試料では検出されなかった。これらのデータは、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8

10

20

30

40

50

14.19.1にスペクチノマイシン抵抗性遺伝子、*Ori* Repエレメントおよび複製開始タンパク質trfAが存在しないことを示している。

【実施例5】

【0151】

農業形質および収量圃場試験ならびに除草剤耐性

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1の農業特性および有効性を試験するため、2010年10月および2011年2月のペルトリコ、サンタイサベルにおける有効性試験において該イベントを植えた。イベントpDAB9582.814.19.1を作出するために最初に形質転換した栽培品種Maverickを各苗床に植え、実験に対照として含めた。T3苗床の種子はT2段階における単一植物選択から得、T4苗床の種子はT3段階における単一植物選択から得た。各世代において4系列のイベントを試験した。作条4つの広さ、7.5フィートの長さの小区画に各系列を植えた。作条間の間隔は30インチであった。ペルトリコの日の短さを補償するために、小区画を光の下でおよそ2.5週間にわたって生長させた。各苗床にグルホシネットを411g ae/haの比率で噴霧した。対照植物であるMaverickの1つの小区画に、グルホシネットと同じ比率で噴霧し、第2の小区画には噴霧せず、イベントに対する対照比較として使用した。

【0152】

出芽、全体的な外観、生長力、高さ、倒伏、および成熟度についてデータを収集した。萎黄病、葉の壊死および植物の枯死について視覚的に調べることによって除草剤耐性を評価した（表8）。

【0153】

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1とMaverickを比較するために、Maverickの噴霧していない区域からのデータのみを使用した。噴霧処理と噴霧なし処理を比較するために、所与の処理で噴霧したダイズイベントpDAB9582.814.19.1区域からのデータを、Maverick対照の噴霧していない区域からのデータと比較した。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1はグルホシネット除草剤施用に対する耐性を示した。対照的に、除草剤処理に対して耐性のMaverick植物は存在しなかった。

【0154】

【表8】

表8.ダイズイベントpDAB9582.814.19.1とMaverickの比較。値はT₃苗床およびT₄苗床の平均である。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1の各苗床に、V3段階で411g ae/haの比率でグルホシネットを噴霧した。

イベント	出芽(%)	外観 (1=不良～9=良好)	生長力 (1=不良～9=良好)	高さ (cm)	倒伏(%)	成熟度 (日数)
pDAB9582.814.19.1	90	8	8	69	1	91
Maverick	82	8	8	64	1	91

【実施例6】

【0155】

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1についての殺虫活性の特徴付け
アンチカルシア・ゲムマタリス (Anticarsia gemmatalis) (ハッショウマメイモムシ)、シードブルシア・インクルデンス (Pseudoplusia includens) (ダイズシャクトリムシ) およびスプドブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (ツマジロクサヨトウ (fall armyworm)) を含めた、実験室で飼育したダイズ害虫に対するダイズイベントpDAB9582.814.19.1におけるCry1AcおよびCry1Fの活性を特徴付けるために、圃場および温室における評価を行った。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1を形質転換されていないダイズ品種Maverickと比較して

10

20

30

40

50

、Cry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質によってもたらされる植物の保護のレベルを決定した。

【0156】

およそ4週齢の植物に対して温室試験を行った。15の植物を使用してダイズイベントpDAB9582.814.19.1およびMaverick対照を評価した。試験した各昆虫種(アンチカルシア・ゲムマタリス(Anticarsia gemmatalis)、シュードプラシア・インクルデス(Pseudoplusia includens)、およびスドブテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda))について、合計45のリーフディスク/植物/昆虫種のために各植物から3つのリーフパンチを作製した。直径1.4cm(または1.54cm²)のリーフパンチを2%の素寒天の上部の試験アリーナに置き、新生幼虫1匹を外寄生させ、穴のあいたプラスチックの蓋で密閉した。外寄生させた4日後に死亡率および葉の消費を評価した。穏やかな触針に反応しなかった幼虫は死亡したとみなした。昆虫に消費されたりーフパンチの百分率を視覚的にスコアリングすることによって葉の損傷を評価した。

【0157】

エルトリコ、サンタイサベルにおける種子増加苗床小区画から葉の試料を収集し、これらの葉を試験するためにIN、インディアナポリスに送ることによって圃場評価を行った。ダイズイベントpDAB9582.814.19.1のための苗床小区画は2011年2月に植え付けされ、4つの作条に配置されたおよそ180の植物からなった。各作条は長さ2.3mであり、76.2cmの間隔があけられ、個々の植物は各作条内に5.1cmの間隔で植えられた。2011年3月に、10のダイズイベントpDAB9582.814.19.1植物および10の「Maverick」植物から、分裂組織のおよそ4節下に位置する完全に増大した主茎の三出葉を1枚切除した。葉を、ラベルを付けたプラスチックの袋に入れ(袋当たり1枚)、密閉した。袋に入れた葉を包装して実験室に移した。実験室において、各三出葉から直径3.33cm(1.31in)のリーフディスク1つまたは2つを押し抜き、合計16のリーフディスクを準備した。各リーフディスクを2%の寒天の上部の試験アリーナに置き、新生ヨトウガ(S. frugiperda)幼虫1匹を外寄生させ、穴のあいたプラスチックの蓋で密閉した。リーフディスクを、制御された環境のチャンバー内で7日間保持し、7日の時点で死亡率および葉の消費を評価した。穏やかな触針に反応しない幼虫は死亡したとみなした。昆虫に消費されたりーフパンチの百分率を視覚的にスコアリングすることによって葉の損傷を評価した。

【0158】

これらの反復実験から得られた結果は、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1では、試験した昆虫全てに対して、Maverick対照植物と比較して有意に低い損傷が持続されることを示した。したがって、ダイズイベントpDAB9582.814.19.1はこの広範な宿主域にわたって殺虫活性を有する。

【実施例7】

【0159】

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1の配列

配列番号14にダイズイベントpDAB9582.814.19.1の配列が提供されている。この配列は、5'ゲノム隣接配列、pDAB9582のT鎖挿入断片および3'ゲノム隣接配列を含有する。配列番号14に関して、残基1~1400は5'ゲノム隣接配列であり、残基1401~1536はpDAB9582プラスミドからの再配置の残基であり、1537~13896は、pDAB9582T鎖挿入断片の残基であり、残基13897~15294は3'隣接配列である。したがって挿入断片の5'末端に関して接合部配列または移行部は配列番号14の残基1400~1401に生じる。したがって挿入断片の3'末端に関して接合部配列または移行部は配列番号14の残基13896~13897に生じる。

【0160】

ダイズイベントpDAB9582.814.19.1由来の後代は、配列番号14からわずかに逸脱した配列を有する可能性があることに留意するべきである。ダイズイベント

10

20

30

40

50

p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 を植物細胞のゲノムに導入する遺伝子移入および育種プロセスの間に、挿入断片のいくつかの欠失または他の変更が起こることは珍しくない。さらに、P C R 増幅において、軽微な配列決定のエラーを生じる可能性があるエラーが起こり得る。例えば、本明細書において列挙されている隣接配列は、ダイズのゲノムD N A からアンブリコンを生成し、次いでアンブリコンをクローニングし、配列決定することによって決定した。ゲノムD N A から配列決定するために十分なアンブリコンを生成するために必要な多数回の増幅を考慮すると、このように生成し、決定した配列においてわずかな差異および軽微な不一致が見いだされることは珍しいことではない。当業者は、これらの型の一般的な配列決定のエラーまたは不一致に起因して必要になる調整はいずれも本発明の範囲内であることを認識し、留意するべきである。10 したがって、本明細書において提供されるプラスミド配列の関連するセグメントは、いくつかの軽微な変動を含んでよい。したがって、本主題の挿入断片配列に対していくらかの範囲の同一性を有するポリヌクレオチドを含む植物は本発明の範囲内である。配列番号1 4 の配列に対する同一性とは、本明細書で例示または記載されている配列に対して少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または1 0 0 %の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列であってよい。したがって、配列番号1 4 とダイズイベン20トp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の後代植物の間のいくつかの差異を同定することができ、それは本発明の範囲内である。

【実施例8】

【0 1 6 1】

育種スタックダイズイベントp D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 およびダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1

【0 1 6 2】

実施例8 . 1 : ダイズイベントp D A B x 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 とダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の有性交雑

国際特許出願第W O / 2 0 1 2 / 0 7 5 4 2 6 号に記載のダイズイベントp D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 をダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 と有性交雑させた。ダイズイベントp D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の薬を、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 の柱頭全体にわたって手動でこすりつけ、それにより、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 を受精させた。その結果生じた、ダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 およびダイズイベントp D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の両方由来の組み込みイベントを含有するF₁ 後代を、2 , 4 - D およびグルホシネット除草剤に対する耐性についてスクリーニングして、両方の組み込みイベントを含有する後代植物を同定した。30

【0 1 6 3】

実施例8 . 2 : 育種スタックダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 におけるタンパク質の発現の特徴付け

育種スタックダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 8 2 6 4 . 4 4 . 0 6 . 1 において発現させた組換え型のC r y 1 F タンパク質、C r y 1 A c タンパク質、A A D 1 2 タンパク質およびP A T タンパク質の生化学的性質を特徴付けた。合計5 1 のF₁ 植物がダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 およびp D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 を含有することが、それぞれ米国特許出願第6 1 / 5 1 1 6 5 8 号および国際特許出願第W O / 2 0 1 1 / 0 6 6 3 6 0 号に開示されているものに基づくアッセイを用いたイベント特異的なT A Q M A N (登録商標) アッセイによって確認された。次に、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) を用いて、P A T タンパク質およびA A D 1 2 タンパク質の発現を数量化し、一方、C r y 1 A c タンパク質およびC r y 1 F タンパク質を、M e s o - S c a l e D i s c o v e r y (M S D) からの電気化学発光技術を利用したマルチプレックス免疫測定法によって数量化した。集合的に、これらのアッセイを使用してタンパク質の生化学的性質を特徴付け、育種スタックダイズイベントp D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1

におけるこれらのタンパク質の発現を確認した。

【0164】

植物組織におけるPATタンパク質の発現

育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1におけるPATタンパク質のレベルを決定した。可溶性の抽出可能なPATタンパク質を、ダイズの葉組織を試験するための定量的酵素結合免疫吸着検定法(Envirologix, Portland, ME)を使用して測定した。

【0165】

合計51のF₁植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1とpDAB4468.04.16.1の両方を含有することがイベント特異的なTAQMAN(登録商標)アッセイによって確認された。ダイズの葉組織の試料をこれらの温室で生長させた試験植物からV3~V4生長段階で単離し、発現を解析するために調製した。界面活性剤Tween-20(PBST)を含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液および1%ポリビニルピロリドン40(PVP-40)を用いて、ダイズ植物の組織からPATタンパク質を抽出した。次いで、GENOGRINDER(商標)を使用し、1500rpmで5分間にわたって試料を抽出した。植物抽出物を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、PAT E LISAキットをサンドイッチ形式で使用して解析した。キットは製造者の推奨プロトコールに従って使用した。このアッセイにより、葉組織において発現されたPATタンパク質を測定した。

【0166】

検出解析を実施して、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における発現遺伝率を調査した。F₁世代で、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1の植物においてPATが発現された(表9)。

【0167】

【表9】

表9.育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における平均PAT発現

イベント	平均PAT発現(ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1	3.99

【0168】

植物組織におけるCry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質の発現

育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1におけるCry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質のレベルを決定した。ダイズの葉組織用のマルチプレックスMSDアッセイ(Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD)を用いて可溶性の抽出可能なCry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質を測定した。

【0169】

合計51のF₁植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1とpDAB4468.04.16.1の両方を含有することがイベント特異的なTAQMAN(登録商標)アッセイによって確認された。ダイズの葉組織の試料をこれらの温室で生長させた試験植物からV3~V4生長段階で単離し、発現を解析するために調製した。PBSTおよび1%PVP40を用いてCry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質をダイズ植物の組織から抽出した。次いで、GENOGRINDER(商標)を使用し、1500rpmで5分間にわたって試料を抽出した。植物抽出物を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、Meso-Scale DiscoveryからのCry1F/Cry1AcマルチプレックスMSDアッセイを使用して分析した。このアッセイにより、葉組織におけるCry1Fタンパク質およびCry1Acタンパク質

10

20

30

40

50

を測定した。

【0170】

検出解析を実施して、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における発現遺伝率を調査した。F₁植世代で、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1の植物においてCry1FおよびCry1Acが発現された(表10)。

【0171】

【表10】

表10.育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における平均のCry1FおよびCry1Acの発現

イベント	平均Cry1F発現(ng/cm ²)	平均Cry1Ac発現(ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1	139.73	33.90

10

【0172】

植物組織におけるAAD12タンパク質の発現

育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1におけるAAD12タンパク質のレベルを決定した。可溶性の抽出可能なAAD12タンパク質を、ダイズの葉組織を試験するための定量的酵素結合免疫吸着検定法(Acadia Bioscience, Portland, ME)を使用して測定した。

20

【0173】

合計51のF₁植物がダイズイベントpDAB9582.814.19.1とpDAB4468.04.16.1の両方を含有することがイベント特異的なTaqman(登録商標)アッセイによって確認された。ダイズの葉組織の試料をこれらの温室で生長させた試験植物からV3~V4生長段階で単離し、発現を解析するために調製した。界面活性剤Tween-20(PBST)を含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液および0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)を用いてAAD12タンパク質をダイズ植物の組織から抽出した。次いで、GENOGRINDER(商標)を使用し、1500rpmで5分間にわたって試料を抽出した。植物抽出物を遠心分離し、水性上清を収集し、必要に応じて適切な緩衝液で希釈し、AAD12ELISAキットをサンドイッチ形式で使用して解析した。キットは製造者の推奨プロトコールに従って使用した(Acadia, Portland, ME)。このアッセイにより、葉組織において発現されたAAD12タンパク質を測定した。

30

【0174】

検出解析を実施して、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における発現遺伝率を調査した。F₁世代で、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1の植物においてAAD12が発現された(表11)。

40

【0175】

【表11】

表11.育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1における平均AAD12発現

イベント	平均AAD12発現(ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1	110.2

50

【0176】

実施例 8.3 : 育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の除草剤耐性

育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の除草剤耐性を温室試験においてアッセイした。ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の種子をポットに植え、成熟するまで生長させた。53の成熟 F₁ 植物を、V3～V4生長段階（単葉および最初の3～4つの三出葉が完全に発達していることを特徴とする）で840g a e / h a の2,4-Dからなる単一の除草剤施用を噴霧した。その結果生じたこれらの除草剤に対する耐性を、生存している植物の数を計数することによって測定した。53の植物全てが除草剤施用に対して抵抗性であることが見いだされた。比較として、a a d - 1 2 遺伝子を含有せず、2,4-D除草剤の施用に対して感受性であることが予測される対照植物を試験に含めた。 10

【0177】

要約すると、ダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 親系統に存在した a a d - 1 2 遺伝子により、2,4-D除草剤に対する耐性が付与された。この形質はダイズ p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 に受け渡され、遺伝し、それにより、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 に除草剤耐性がもたらされた。比較として、a a d - 1 2 遺伝子を含有しない対照植物は2,4-D除草剤の施用に対して感受性であった。 20

【0178】

実施例 8.4 : ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 の殺虫活性の特徴付け

アンチカルシア・ゲムマタリス (*Anticarsia gemmatalis*) (ハッショウマメイモムシ) およびシュードブルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includens*) (ダイズシャクトリムシ) を含めた、実験室で飼育したダイズ害虫に対する育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 におけるCry1Ac および Cry1F の活性を特徴付けるために温室評価を行った。育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 をダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 、ダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 および形質転換されていないダイズ品種 *Maverick* と比較して、掛け合わせた場合に Cry1F タンパク質および Cry1Ac タンパク質によってもたらされる植物の保護のレベルが変化するかどうかを決定した。さらに、昆虫に対する除草剤由来の負の生物学影響がないことを確認するために、バイオアッセイの前に育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 およびダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 に840g a e / h a の2,4-Dを含有する単一の除草剤施用を噴霧した。 30

【0179】

およそ3週齢の植物に対して温室試験を行った。それぞれ5～10の植物を使用して、育種スタックダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 : : p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 、ダイズイベント p D A B 9 5 8 2 . 8 1 4 . 1 9 . 1 、ならびに陰性对照である噴霧したダイズイベント p D A B 4 4 6 8 . 0 4 . 1 6 . 1 および *Maverick* を評価した。試験した各昆虫種（アンチカルシア・ゲムマタリス (*Anticarsia gemmatalis*) およびシュードブルシア・インクルデンス (*Pseudoplusia includens*) ）について、昆虫種当たり各植物から3つのリーフパンチを作製した。直径1.4cm（または1.54cm²）のリーフパンチを1.5%の素寒天の上部の試験アリーナに置き、新生幼虫1匹を外寄生させ、穴のあいたプラスチックの蓋で密閉した。外寄生させた4日後に死亡率および葉の消費を評価した。穏やかな触針に反応しなかった幼虫は死亡したとみなした。昆虫に消費された葉の面積の百分率を視覚的にスコアリングすることによって葉の損傷を評価した。 40

【0180】

これらの反復実験から得られた結果(表12)により、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1がダイズイベントpDAB9582.814.19.1と一致し、ダイズシャクトリムシおよびハッショウマメイモムシに対して、ダイズイベントpDAB4468.04.16.1(94~99%)およびMaverick(96~97%)対照よりも有意に低い葉組織への損傷が持続した(0.6~0.8%)ことが示された。育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1とダイズイベントpDAB9582.814.19.1の両方について高死亡率(100%)が記録されたが、pDAB4468.04.16.1およびMaverick植物では低死亡率(0%)がもたらされ、これらの対照植物に置いた昆虫は全て残存した。したがって、育種スタックダイズイベントpDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1はダイズイベントpDAB9582.814.19.1に匹敵する殺虫活性を有する。

【0181】

【表12】

表12.平均パーセント葉の損傷ならびに種々のダイズイベントを与えたシードプルシア・インクルデンス(*Pseudoplusia includens*)、ダイズシャクトリムシ(SBL)およびアンチカルシア・ゲムマタリス(*Anticarsia gemmatalis*)、ハッショウマメイモムシ、(VBC)の死亡率(n=15~24)

処理	昆虫	4DAI*における平均%葉の損傷	平均%死亡率
pDAB4468.04.16.1	SBL	99.2	0
pDAB4468.04.16.1	VBC	93.7	0
pDAB9582.814.19.1	SBL	0.6	100
pDAB9582.814.19.1	VBC	0.6	100
pDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1	SBL	0.5	100
pDAB9582.814.19.1::pDAB4468.04.16.1	VBC	0.8	100
Maverick	SBL	96.1	0
Maverick	VBC	96.8	0

*DAI=外寄生後の日数

【0182】

本発明の原理が例示され、記載され、本発明は、そのような原理から逸脱することなく取り合わせおよび詳細を改変することができる事が当業者には明らかであるはずである。我々は添付の特許請求の範囲の主旨および範囲内に入る全ての改変について特許請求する。

【0183】

本明細書において引用されている刊行物および公開特許文書は全て、個々の刊行物または特許出願が具体的にかつ個別に参照により組み込まれることが示された場合と同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

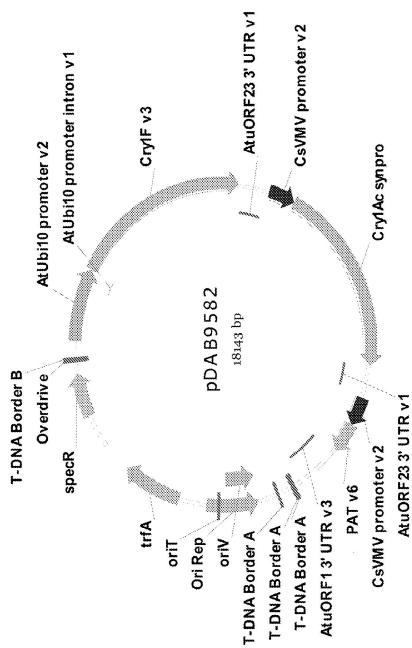
10

20

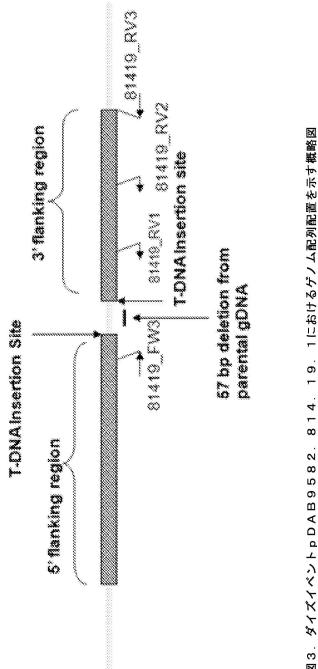
30

40

【図1】



【 四 3 】



【 四 2 】

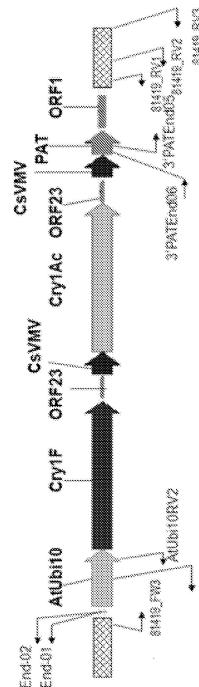


図1. cry1F v3、cry1Acおよびpat v6発現カセットを含有するpDAB9582のプラスミドマップ

図2. ダイズイベントローダB9582.814.19.1の5, 基準配列および3, 基準配列を確認するためのプライマーの位置を示す概略図

【配列表】

0006182530000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
 A 0 1 P 21/00 (2006.01) A 0 1 P 21/00

- (72) 発明者 キュイ, ユンシン, コリー
 アメリカ合衆国 46032 インディアナ州, カーメル, ロイヤル サドル ドライブ 137
 36
- (72) 発明者 ホフマン, トマス
 アメリカ合衆国 46077 インディアナ州, ズイオンスヴィレ, キングスバリー ウェイ 6
 526
- (72) 発明者 パークハースト, ドーン, エム.
 アメリカ合衆国 46123 インディアナ州, エイボン, アムステルダム コート 7844
- (72) 発明者 チョウ, ニング
 アメリカ合衆国 46077 インディアナ州, ズイオンスヴィレ, ペブルポイント パス 47
 76
- (72) 発明者 ウィギンズ, バリー
 アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, ウエストフィールド, アポロ パークウェイ 6
 17
- (72) 発明者 パレディー, デヤカ
 アメリカ合衆国 46033 インディアナ州, カーメル, ウッドバイン ドライブ 665
- (72) 発明者 ブラッドフィッシュ, グレゴリー, エー.
 アメリカ合衆国 46033 インディアナ州, カーメル, ジェイティー レーン 14572
- (72) 発明者 ドリップス, ジェームス, イー.
 アメリカ合衆国 46032 インディアナ州, カーメル, セドナ コート 14032
- (72) 発明者 トレド, サンドラ, グレイス
 アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウエスト ラファイエット, ダートマス コート
 3160
- (72) 発明者 バード, ナサン
 アメリカ合衆国 53534 ウィスコンシン州, エドガートン, ステビンスヴィレ ロード 8
 502
- (72) 発明者 ベルコーテレン, マイケル
 アメリカ合衆国 47904 インディアナ州, ラファイエット, サンライズ アベニュー 91
 8
- (72) 発明者 ナガラジ, ナンディ
 アメリカ合衆国 46268 インディアナ州, インディアナポリス, ベインベリー レーン 2
 602, アパートメント 813
- (72) 発明者 ビショップ, ブランダン, ビージー
 アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, ホワイトタウン, ダスティー サンズ ロード
 3878
- (72) 発明者 ギレス, グレゴリー, ジェームス
 アメリカ合衆国 30004 ジョージア州, アルファレッタ, サンドボアント トレイス 15
 155
- (72) 発明者 ライト, テリー, アール.
 アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, カーメル, チャリティー チェース サークル
 14162
- (72) 発明者 コロン, ジュリッサ
 アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウエスト ラファイエット, レインボー ドライ
 ブ 2200
- (72) 発明者 パーンズ, リカルド, エー.

ブルエルトリコ国 00731 ポンセ, カレ カスター ユーアールビー. テラ セノリアル
124

(72)発明者 アノブドーブ, ナサン, ジョエル
アメリカ合衆国 イリノイ州 61254, ジェネスコ, イースト 1350ティーエイチ スト
リート 27507

(72)発明者 バイ, ヨンエ
アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, ウエストフィールド, ファレル ドライブ 32
22

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 特表2009-513139 (JP, A)
特表2010-526535 (JP, A)
国際公開第2011/084622 (WO, A1)
Theor. Appl. Genet., 2008, Vol.116, No.4, pp.455-463

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
A01H 1/00 - 17/00
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq