

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6635916号
(P6635916)

(45) 発行日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日(2019.12.27)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	Z N A
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6895	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6895	Z
A O 1 H	5/00	(2018.01)	A O 1 H	5/00	A
C 1 2 N	5/14	(2006.01)	C 1 2 N	5/14	

請求項の数 25 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願2016-519646 (P2016-519646)	(73) 特許権者	501231613
(86) (22) 出願日	平成26年6月12日 (2014. 6. 12)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(65) 公表番号	特表2016-521576 (P2016-521576A)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン
(43) 公表日	平成28年7月25日 (2016. 7. 25)		トルイス、ノース・リンドバーグ・プール
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/042100		バード800番
(87) 国際公開番号	W02014/201235	(74) 代理人	100106518
(87) 国際公開日	平成26年12月18日 (2014. 12. 18)		弁理士 松谷 道子
審査請求日	平成29年5月15日 (2017. 5. 15)	(74) 代理人	100132263
(31) 優先権主張番号	61/834, 899		弁理士 江間 晴彦
(32) 優先日	平成25年6月14日 (2013. 6. 14)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 田中 光雄
微生物の受託番号	ATCC PTA-120166	(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100156122
			弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイズトランスジェニックイベントMON87751、その検出方法及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ダイズDNAを含む試料中の検出可能な組換えDNA分子であって、前記分子のヌクレオチド配列が、

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及び配列番号10から成る群より選ばれ；または

b) (a) に対して完全に相補的なヌクレオチド配列であり、

このようなDNA分子の存在は、前記試料中にダイズイベントMON87751が存在する診断となる、前記組換えDNA分子。

【請求項2】

前記組換えDNA分子は、PTA-120166のATCC受託番号で寄託されている、ダイズイベントMON87751を含む種子の代表試料である、ダイズイベントMON87751に由来する、請求項1記載の組換えDNA分子。

【請求項3】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、試料中のダイズイベントMON87751と特異的にハイブリダイズするDNAプローブとして機能する十分な長さのポリヌクレオチドセグメントを含むDNA分子であって、ここに前記DNA分子は配列番号：1および配列番号：2を含み、前記ハイブリダイゼーション条件下で前記DNA分子のハイブリダイゼーションを検出することは、前記試料中におけるダイズイベントMON87751が存在する診断となる、前記DNA分子。

10

20

【請求項 4】

前記試料が、ダイズ植物、ダイズ植物細胞、ダイズ種子、ダイズ植物部分、ダイズ子孫植物、ダイズ油、ダイズタンパク質、またはダイズ商品生産物を含む、請求項 1 記載の組換え DNA 分子。

【請求項 5】

一对の DNA 分子であって、第 1 の DNA 分子と、前記第 1 の DNA 分子と異なる第 2 の DNA 分子とを含み、前記第 1 及び第 2 の DNA 分子は、ダイズイベント MON 8 7 7 5 1 鋳型を含む試料と共に増幅反応に用いた場合に、前記試料中の前記ダイズイベント MON 8 7 7 5 1 が存在する診断となるアンプリコンを生成する DNA プライマーとして機能し、前記アンプリコンは、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 および配列番号 1 0 から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含む、前記一对の DNA 分子。

10

【請求項 6】

試料中にダイズイベント MON 8 7 7 5 1 が存在することの診断となる DNA セグメントの存在の検出方法であって、

- a) 前記試料と請求項 3 記載の DNA プローブとを接触させること；
- b) 前記試料と前記 DNA プローブとをストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下に供すること；及び
- c) 前記 DNA プローブの、前記試料とのハイブリダイゼーションを検出することを含み、

20

前記検出工程は、前記試料中の前記ダイズイベント MON 8 7 7 5 1 の存在の診断となる、検出方法。

【請求項 7】

試料中にダイズイベント MON 8 7 7 5 1 が存在することの診断となる DNA セグメントの存在の検出方法であって、

- a) 前記試料と請求項 5 記載の DNA 分子とを接触させること；
 - b) DNA アンプリコンを生成するのに十分な増幅反応を行うこと；及び
 - c) 前記反応物中の前記 DNA アンプリコンを検出することを含み、
- 前記 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 1 0、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含み、前記アンプリコンの存在の前記検出は、前記試料中にダイズイベント MON 8 7 7 5 1 が存在することの診断となる、前記検出方法。

30

【請求項 8】

ダイズイベント MON 8 7 7 5 1 を含む組換えポリヌクレオチド分子を含む、ダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ細胞。

【請求項 9】

前記ダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ細胞は、鱗翅目害虫の餌中に提供されると殺虫性である請求項 8 記載のダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ細胞。

40

【請求項 10】

前記鱗翅目害虫は、*Chrysodeixis* spp.、*Spodoptera* spp.、*Helicoverpa* spp.、*Crocidosema* spp.、*Rachiplusia* spp.、*Anticarsia* spp.、*Elasmopalpus* spp. 及び *Plathypena* spp から成る群より選ばれる請求項 9 記載のダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ細胞。

【請求項 11】

前記ダイズ植物は、前記ダイズイベント MON 8 7 7 5 1 を含むダイズ植物のいずれかの世代の子孫であるとさらに定義される、請求項 8 記載のダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ細胞。

50

【請求項 12】

昆虫の寄生からダイズ植物を保護する方法であって、ダイズの鱗翅目害虫の餌中に、イベントMON 87751を含むダイズ植物の細胞または組織の殺虫有効量を提供することを含む、前記方法。

【請求項 13】

前記鱗翅目害虫は、*Chrysodeixis* spp.、*Spodoptera* spp.、*Helicoverpa* spp.、*Crocidosema* spp.、*Rachiplusia* spp.、*Anticarsia* spp.、*Elasmopalpus* spp. 及び *Plathypena* spp から成る群より選ばれる請求項 12 記載の方法。

10

【請求項 14】

耐昆虫性ダイズ植物の製造方法であって、

a) 2つの異なるダイズ植物であってそのうちの少なくとも1つがトランスジェニックダイズイベントMON 87751を含む、2つの異なるダイズ植物を性的に交配すること；

b) 前記交配の子孫から種子または組織をサンプリングすること；

c) 工程 b) からの試料中に、ダイズイベントMON 87751の存在の診断となるDNAセグメントを検出して、ダイズイベントMON 87751を含む子孫を同定すること；及び

d) ダイズイベントMON 87751 DNAを含む前記子孫を選択することを含み、前記子孫は、トランスジェニックダイズイベントMON 87751を含む耐昆虫性ダイズ植物である、前記方法。

20

【請求項 15】

ダイズイベントMON 87751を、検出可能な量含むダイズ種子。

【請求項 16】

請求項 1 記載の組換えDNA分子を検出可能な量含む非生存ダイズ植物材料。

【請求項 17】

請求項 1 記載の組換えDNA分子を検出可能な量含む微生物。

【請求項 18】

前記微生物が植物細胞である、請求項 17 記載の微生物。

30

【請求項 19】

イベントMON 87751を検出可能な量含むダイズ商品生産物であって、前記分子が請求項 1 記載の組換えDNA分子を含む、前記ダイズ商品生産物。

【請求項 20】

全体または加工ダイズ種子、ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズ糠、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズ含有動物餌、ダイズ含有紙、ダイズ含有クリーム、ダイズバイオマス並びにダイズ植物及びダイズ植物部分を用いて製造された燃料生産物から成る群より選ばれる商品生産物としてさらに定義される請求項 19 記載のダイズ商品生産物。

【請求項 21】

イベントMON 87751の存在の診断となるアンプリコンを生成するDNA増幅法において試験する際に鋳型として機能するDNAを含む、ダイズ植物、ダイズ植物部分またはそのダイズ種子。

40

【請求項 22】

イベントMON 87751を含むダイズ植物またはダイズ種子の接合状態を決定する方法であって、

a) ダイズDNAを含む試料と、イベントMON 87751の存在の診断となる第1のアンプリコン及びイベントMON 87751を含まないネイティブのダイズゲノミックDNAの存在の診断となる第2のアンプリコンを生成することができるプライマーセットとを接触させること；

50

i) 前記試料と前記プライマーセットとで核酸増幅反応を行うこと；及び

ii) 前記核酸増幅反応物中の、イベントMON87751の存在の診断となる前記第1のアンプリコン、またはイベントMON87751を含まないネイティブなダイズゲノミックDNAの存在の診断となる前記第2のアンプリコンを検出することを含み、

前記第1のアンプリコンのみが存在することは、前記試料中、イベントMON87751がホモ接合であることの診断となり、前記第1のアンプリコンと前記第2のアンプリコンの両方が存在することは、ダイズ植物がイベントMON87751アレルのヘテロ接合であることの診断となる；または

b) ダイズDNAを含む試料と、少なくとも、イベントMON87751と特異的にハイブリダイズする第1のプローブ及び少なくとも、イベントMON87751である異種のDNAの挿入により破壊されたダイズゲノミックDNAに特異的にハイブリダイズし、イベントMON87751とハイブリダイズしない第2のプローブを含むプローブセットとを接触させること、

i) 前記プローブセットと前記試料とをストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせることを含み、

前記ハイブリダイゼーション条件下において前記第1のプローブのみのハイブリダイゼーションが検出されることは、前記試料中のイベントMON87751のアレルがホモ接合である診断となり、前記ハイブリダイゼーション条件下において前記第1のプローブ及び前記第2のプローブが検出されることは、前記試料中のイベントMON87751のアレルがヘテロ接合である診断となる、前記方法。

【請求項23】

前記プライマーセットは、配列番号11、配列番号14及び配列番号15を含む、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記プローブセットは、配列番号13及び配列番号16を含む、請求項22記載の方法。

【請求項25】

前記ダイズ植物は、MON87751、MON89788、MON87708、MON87701、MON87712、MON87769、MON87705、MON87754、GTS 40-3-2、A2704-12、A2704-21、A5547-35、A5547-127、BPS-CV127-9、DP-305423、DP356043、G94-1、G94-19、G168、GU262、OT96-15、W62、W98、DAS-44406-6、DAS-68416-4、FG72、BPS-CV127-9 Soybean、SYHT04R、pDAB4472-1606、pDAB4468-0416、pDAB8291.45.36.2、pDAB9582.814.19.1、SYHT0H2、3560.4.3.5、EE-GM3及びイベント127から成る群より選ばれるトランスジェニックイベントをさらに含む、請求項10記載のダイズ植物またはそのダイズ植物部分。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年6月14日に出願の米国仮出願第61/834,899号の優先権の利益を主張し、その全体が、参照として本明細書に包含される。

【0002】

MONS357WO_ST25.txtと名付けられたファイルに含まれ、2014年6月12日に作成されたシーケンスリスト(43キロバイトである)(サイズはMicrosoft Windows(登録商標)で測定)を、電子提出により本願と共に出願し、参照として本明細書に包含される。

【0003】

本発明は、MON87751と呼ばれるトランスジェニックダイズ(ダイズ: Glyc

10

20

30

40

50

ine max) イベントに関する。このイベントは、以前はダイズ植物には利用できなかった殺虫毒素タンパクの独自の組み合わせを提供することにより、ダイズに鱗翅類の寄生に対し耐性をもたせる2つの別々の作用様式を提供する。これらの殺虫毒素タンパクの組み合わせは、ダイズ植物に対する鱗翅類種の寄生特性を制御するのに、非常に有効である。また、本発明は、ダイズ植物、植物パーツ、植物の種、植物細胞、子孫植物、農産品及びイベントMON87751に関する方法に関し、ダイズ(ダイズ)細胞のゲノムへの遺伝形質転換DNAの挿入に関連して作成され、かつ、ダイズ核酸を含む生体サンプルにおけるこのイベントの存在を検出するために有用な、上記イベントに固有のヌクレオチド分子を提供する。

【背景技術】

10

【0004】

ダイズ(ダイズ)は、世界中の多くの地域で重要な作物であり、望ましい形質を有するダイズの種類を生産する目的で、この作物には生物工学的方法が適用されてきた。この望ましい形質の一つに、虫害抵抗性が挙げられる。虫害抵抗性導入遺伝子の植物における発現は、望ましい虫害抵抗性の形質を植物に与えることができるものの、導入遺伝子の発現は、植物染色体から移動する個々の遺伝子の発現を誘導するカセットの配向及び組成、染色体の位置及び導入遺伝子挿入のゲノムの結果を含む、多くの様々な因子により影響され得る。例えば、植物では、異なる個々のイベント間では、導入遺伝子の染色体挿入部位における導入遺伝子発現のレベル及びパターンには、変動があるものの、それ以外では同一であったことが観測されていた。また、イベント間で、望ましくない及び/または望ましい表現型のあるいは農学上の差も存在する。したがって、望ましい形質及び商業的な成功のために適切な最適表現型特性及び農業特性の両方を有するイベントを選択するため、多数の個々の植物細胞形質転換イベントを生産及び分析することが、しばしば必要となる。好ましい遺伝形質転換イベントの選択には、大規模な分子キャラクタリゼーション、ならびに、複数年間、複数の場所で、及び様々な条件下での多くのイベントを含む温室及び野外試験が、必要となる。膨大な量の有効性、表現型及び分子データを収集し、そして、1つ以上の商業的に適切なイベントを選択することを目的として、得られたデータ及び観察を、科学者及び農学者のチームにより、その後分析する。このようなイベントは、一旦選択されれば、それを用いて、所望の遺伝形質転換形質を、植物育種法を用いて他の遺伝的背景に遺伝子移入し、したがって、所望の形質を含む及び特定の地域の農学の条件に適した、様々な種類の作物を多数産出することができる。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

昆虫寄生に対して殺虫による制御を行うための、発現毒素が一つしかないトランスジェニックダイズでは、害虫が毒素に対する耐性を発現する可能性が高いため、持続性が制限されるというリスクがあり得る。同様に、固有の作用形態を複数提供しない毒物を含んだトランスジェニックダイズは、持続性が制限されるリスクがあり得る。鱗翅類に有毒なタンパクを生成する第1の利用可能なダイズが含む毒素タンパクは、一つ(Cry1Ac)である。近年、Cry1Ac及びCry1F毒素タンパクを含むダイズ遺伝形質転換イベントが、開示された。Cry1Acへの耐性が生じれば、Cry1Ac及びCry1F遺伝形質転換イベントは、その有効性の源としては、Cry1F毒素のみが残っているだけである。したがって、Cry1Acにより制御された、害虫を制御する2以上の毒物を有し、それら毒物はいずれも、Cry1Acが結合するターゲットの昆虫中腸内では同じまたは実質的に同じ受容体を結合しないような、ダイズ植物を提供することが必要である。本明細書に記載される発明は、ダイズの鱗翅類の害虫を制御するためのターゲットングの目的ではダイズ植物には以前は含まれていなかった、鱗翅類の害虫種に有毒な2以上の薬剤を提供することにより、先行技術に記載されたトランスジェニックダイズイベントに対して上述した持続性の問題を克服する、トランスジェニックダイズイベントMON87751を提供する。

40

50

【0006】

単一の形質転換イベントを含む遺伝子導入植物を作製するため、組換えDNA構築物の一部を、細胞サイズのゲノムに移植し、続いて、細胞サイズを植物に成長させる。イベントを最初に移植したサイズ細胞を再生させて、R0世代を産生させる。R0植物及びR0植物からの子孫植物に対して、いずれかの所望の形質の試験を行うことができるが、このイベントの効果は、形質転換イベントの組込み部位に対するシス及び/またはトランス因子により影響され得る。イベントにもたらされるフェノタイプは、DNA構築物の大きさ及びデザインにより影響され得るとともに、その影響は、発現カセットの遺伝因子の組み合わせ、導入遺伝子の数、発現カセットの数及びこれら要素及びこれらカセットの設定によって、変化し得る。所望の形質を有するイベントを特定することは、例えば、導入遺伝子発現の、植物発育パターン、日周パターン、一時的パターンまたは空間的模式等の因子により、または環境植物成長条件、水有効性、有効態窒素、熱またはストレス等の外因子により、さらに複雑化され得る。したがって、表現型形質の所望のセットをもたらすイベントを得る能力は、容易に予測できるものではない。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、既存のトランスジェニックサイズ植物及び並列に構成される新イベントと比較して、優れた特性及び性能を示す、イベントMON87751を含む、トランスジェニックサイズ植物を提供する。サイズイベントMON87751は、独立して鱗翅類の害虫に抵抗の形質をもたらす2つのリンク発現カセットを、サイズゲノムへの挿入の単一の座位に含む。2つのリンク発現カセットをサイズイベントMON87751に組み込むことにより、鱗翅類の害虫種に対して2つの作用形態を提供するものであり、この鱗翅類には、*Chrysodeixis*種、*Spodoptera*種、*Helicoverpa*種、*Crocidosema*種、*Rachiplusia*種、*Anticarsia*種、*Elasmopalpus*種及び*Plathypena*種が含まれる。二元的作用形態により、殺虫制御の重複性を鱗翅類の害虫種に対して提供するとともに、害虫制御形質への耐性の発現の可能性を有意に低減する。

20

【0008】

イベントMON87751は、サンプル中のイベントの存在を検出する際に有用な、特定の固有のDNAセグメントにより特徴づけられる。サンプルとは、実質的に純粋なサイズDNAまたはサイズDNAを含む組成物のいずれかの組成物を指すことを意図する。いずれの場合においても、サンプルは生体サンプル、すなわち生物物質を含み、その非限定的な例として、イベントMON87751を含んでいるサイズのゲノムから直接または間接的に得られるまたは由来するDNAが挙げられる。「直接的に」とは、サイズ細胞を破壊して（または分裂したサイズ細胞を含むサイズのサンプルを得て）、検出のためにゲノムDNAを露出することにより、当業者が直接サイズゲノムからDNAを得る能力のことをいう。「間接的に」とは、サイズ細胞を破壊すること、または破壊されたサイズ細胞を含むサイズのサンプルを得ることを通じた直接的手段以外の手段により、ターゲットまたは特異的な参照DNAを得る、すなわち、特定のサンプル中のイベントMON87751の存在に対して特徴を与えると本明細書に記載された、新規かつ独特な接合部のセグメントを得る、当業者の能力のことをいう。このような間接的な手段は、ターゲットシーケンスに特異性と結合するようにデザインされた特定のプローブによる、ターゲットのDNAの塩基配列を含むDNAセグメントの増幅、または測定及びキャラクタリゼーション、すなわち、アガロースまたはアクリルアミドゲル等の有効なマトリックスによりDNAの他のセグメントから分離しての測定、またはアンプリコンの直接のシーケンス分析による、またはアンプリコンのベクターへのクローン化及びこのベクター中に存在する間挿アンプリコンの直接配列決定によるキャラクタリゼーション、が可能なDNAセグメントの増幅を非限定的に含む。代替的に、イベントMON87751を定義するために使用可能な、サイズ染色体中の移植遺伝子のDNAがサイズ染色体に挿入された位置、に対応するDNAのセグメントを、様々な手段によりクローン化して、その後、特定のサンプル中または

30

40

50

特定のダイズゲノム中にその存在が特定及びキャラクタリゼーションすることができる。このようなDNAセグメントは、接合部部分またはシーケンスと呼ばれ、間挿DNAとダイズゲノムとの間の接合点が、このセグメントに含まれる限りにおいて、間挿DNA及び隣接(側面)ダイズ染色体DNAのいずれかの長さとするすることができる。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及び配列番号：10及びこれらの各々の逆補完体は、このセグメントを代表する。

【0009】

本明細書に特定される特異的なシーケンスは、イベントMON87751またはその中に含まれる構築物中に固有に存在してもよく、また、直接のシーケンス分析による、このシーケンスに結合されるプローブを検出することによる、または特定のダイズ生殖質またはゲノムに存在し及び/またはダイズDNAを含有する特定の生体サンプル中に存在する場合に本明細書に記載される特定のアンプリコンのサイズ及びおそらく組成を観測することによる、これらのシーケンスの同定は、そのサンプル中のイベントMON87751またはその中に含まれる構築物の存在に特徴的である。フランキングゲノムセグメント(すなわち、間挿形質転換DNAに隣接したDNAの塩基配列のダイズゲノムセグメント)は、わずかな変異性を受けることが知られており、そしてこのように、個々のダイズゲノムの間のこの異形または多型性に関連して、少なくとも99%以上の同一性に対しての制限となる。本明細書に参照される特定の特徴的シーケンスと比較して、その長さ全体にわたって完全に相補的であるヌクレオチドセグメントが、本発明の範囲内に入ることを意図するものである。

【0010】

本発明のヌクレオチドセグメントの相互に相対的なダイズゲノムの範囲内の位置は、図1に例示されており、また、それぞれのヌクレオチド配列は、配列番号：10に例示されている。サンプル中において、イベントMON87751のキャラクタリゼーションを行いかつイベントMON87751の存在に特徴的なヌクレオチドセグメントまたはそこに含まれる構築物は、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：17、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、配列番号：25、または配列番号：26を含む。サンプル中のこれらのヌクレオチド配列が1個または2個、またはそれ以上の存在は、このようなサンプルがダイズ組織を含み、したがってダイズDNAを含む場合は、イベントMON87751またはそこに含まれる構築物の存在に特徴的である。

【0011】

「由来する」という語の使用は、特定のDNA分子が、ダイズ植物ゲノム中に存在する、またはダイズ植物DNA中で検出可能であるということ在意図するものである。「検出可能である」とは、特定のDNAセグメントが増幅される能力及びDNAシーケンス分析によりキャラクタリゼーションされまたは解明されるそのサイズ及びまたはシーケンスのことをいい、また、特異的に特定のDNAセグメント、すなわちターゲットDNAセグメントに結合するプローブの能力、及びつづくプローブのターゲットへの結合を検出する能力のことをいうこともできる。本発明の特定のDNAセグメントまたはターゲットDNAセグメントは、間挿イベントMON87751を含むダイズ中に存在する。

【0012】

ダイズへの言及に関し、ダイズイベントMON87751DNAの存在に対して特徴的であると本明細書に記載されたセグメントのいずれか1つ、2またはそれ以上に対応して、それぞれの実施形態が検出可能な量のDNAを含む限りにおいて、ダイズ細胞、ダイズ種子、ダイズ植物の一部及びダイズ植物は、本発明の範囲内であることが意図されている。ダイズ植物部分は、以下の細胞を含む；花粉；胚珠；花；さや；種；塊根組織；茎組織；及び葉組織。検出可能な量のDNAのセグメントが、イベントMON87751の存在に対して特徴的であると本明細書に記載されたような、ダイズから作製される商品生産物

10

20

30

40

50

は、本発明の範囲内である。このような商品生産物は、全粒または加工ダイズ種、ダイズ油、ダイズタンパク、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズ破片、ダイズふすま、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズを含む飼料、ダイズを含む紙、ダイズを含むクリーム、ダイズバイオマス及びダイズ植物及びダイズ植物部分を用いて生産される燃料製品を含んでいてもよい。

【 0 0 1 3 】

ダイズイベントMON87751のDNAは、それぞれの細胞及びダイズ植物、ダイズ種、並びに、イベントを含むダイズ組織の1つの染色体のそれぞれのゲノムに、存在してもよい。ダイズゲノムがメンデル形態で後代に伝えられる際、ダイズ植物がイベントMON87751間挿に対してホモ接合している場合は、それぞれの後代ダイズ植物及び細胞は、イベントMON87751間挿を含みかつ親から後代に受け継がれたペアレント染色体のそれぞれの対立遺伝子上に、イベントDNAを含んでいる。しかしながら、イベントMON87751DNAを含むダイズゲノムが、ヘテロ接合ペアレントまたはハイブリッドペアレントである場合は、ハイブリッドペアレントから交配される花粉の約50パーセント及び胚珠の約50パーセントは、ダイズイベントMON87751DNAを含むことになり、その結果、後代の混合個体群がイベントMON87751DNAを含むようになり、また、このようなハイブリッドによる交配から生じる後代のパーセンテージは、約50～約75パーセントのいずれかのパーセンテージで、この後代に伝えられたイベントMON87751DNAを有し得る。

【 0 0 1 4 】

本発明のDNA分子は、間挿形質転換イベントMON87751DNAの両末端上の2つの別々の接合部及びMON87751間挿DNAのそれぞれの末端に隣接、すなわち側面にあるダイズゲノムDNAに特有となり得るものであり、またはダイズイベントMON87751間挿DNAに特有となり得るものである。これらの分子は、プローブ、プライマーを用い、また一部の 경우에는DNAシーケンス分析を用いて、本明細書に記載される方法により分析される特定のサンプル中に存在する場合は、そのサンプル中、一定量のイベントMON87751ダイズの存在に対して特徴的となり得る。ダイズイベントMON87751DNAに特有のこのようなDNA分子は、特有のDNA分子に特異的に結合するようにデザインされたプローブ核酸分子を使用した後このプローブの特有のDNAへの結合を検出することによる方法及びプローブとして作用する少なくとも2つの別々のDNA分子を使用した熱増幅法による方法を含む、多数の方法で、同定及びキャラクタリゼーションが可能であるが、この分子のシーケンスは、上記のプローブに比べてさほど特異的でなくてもよい。適切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に接触させることにより、プローブまたはプライマーが、ターゲットDNAセグメントに結合するようになることを、当業者は理解する。

【 0 0 1 5 】

本発明のDNA分子は、増幅可能なDNAのターゲットセグメントでもよく、また、特定のサンプルの増幅法により得られた代表長さの1つ以上のアンプリコンとして検出される場合は、このサンプル中に含まれるイベントMON87751またはそこに含まれる構築物の存在に対して特徴的となってもよい。この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：17、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、配列番号：25、及び配列番号：26の、それぞれに記載のヌクレオチド配列を有してもよく、また、本明細書及び下記の実施例で、さらに定義される。プライマー分子及び/またはプローブは、制御を含む必要な試薬に加えてキット形態で提供されてもよく、また、使用のための説明書と共にパッケージ化されてもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の組換え型DNA分子は、微生物中または微生物に由来して、存在してもよい。

微生物は、原核生物または真核生物、あるいはプラスミドまたはベクターと一般に呼ばれる、ゲノムまたは染色体または染色体外細胞質DNA構造を含むいずれかの微細な細胞を含むことを意図するものである。一実施形態では、微生物は、バクテリア（原核生物）及びより高い生物形態に対応する細胞（真核生物）を含んでもよく、これらはヒトの平均的な視覚範囲よりも小さく、典型的に50立方ミクロン以下、より一般に10立方ミクロン以下である。バクテリアは、配列番号：9に記載の発現カセットのそれぞれを含む1以上または全ての本発明の新規なDNAセグメントを含む、ベクターまたはプラスミドを含み得る共通の微細な微生物である。本発明の植物細胞及び特にダイズ植物細胞は、1つ、2つ、またはそれ以上の本発明の新規なDNAセグメントのいずれかまたは全てを含んでもよい。

10

【0017】

本明細書での使用のためのプローブは、特定のターゲットDNAセグメント、すなわち、サンプル中のイベントMON87751DNA内に存在し、かつ、このイベントMON87751DNAの存在に対して特徴的な、DNAに特有のセグメントと、本明細書に定義されるストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で結合するように機能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を備えていてもよい。このプローブは、ダイズイベントMON87751DNAにのみ存在する単一の接合部または他の新規なシーケンスにのみ結合するように、または、2以上のこの単一の接合部セグメントに結合するように、デザインすることができる。ダイズDNAを含むと推測される特定のサンプル中で、このプローブのDNA分子への結合を検出することは、サンプル中のダイズイベントMON87751の存在に対して特徴的である。

20

【0018】

プライマーは、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使用するために、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を備えていてもよい。ペアの各々のプライマーは、増幅のため着目したDNAのセグメント中またはその近傍で、DNAの特異的なセグメントに結合するようにデザインされている。プライマーは、その後これらが核酸配列ポリメリゼーションの局在性領域として作用して、1つ以上のアンプリコン（DNAの増幅ターゲットセグメント）を生成するような方法で、結合する。本発明では、特定の生体サンプル中のダイズイベントMON87751DNAの特有のセグメントに結合するようにデザインされ、かつ、本明細書に記載される接合部セグメントの一つ以上を含む特定のアンプリコンを増幅する、プライマーの使用及びポリメラーゼ反応の完了または終了におけるこのアンプリコンの検出及び/またはキャラクタリゼーションは、特定のサンプルでダイズイベントMON87751の存在に対して特徴的である。当業者は、この増幅方法にかなり精通しており、増幅の詳細の引用は、ここでは必要ではない。

30

【0019】

本発明のダイズ植物、ダイズ植物細胞、ダイズ植物組織及びダイズ種子は、*Chrysodeixis*種、*Spodoptera*種、*Helicoverpa*種、*Crocidosema*種、*Rachiplusia*種、*Anticarsia*種、*Elasmopalpus*種及び*Plathypena*種を非限定的に含む鱗翅類の害虫による寄生に対する耐性を示し得る。鱗翅類種による寄生に対する耐性は、2つの異なる殺虫タンパク毒素をコードする2つの異なるDNAセグメントの発現に関連して発生し、これら2つのDNAセグメントは、間挿形質転換DNAの範囲内で操作可能にかつ共有結合的に結合し、これら2つの殺虫タンパク毒素は、配列番号：10に記載及び図2に例示される間挿形質転換DNAの5'近末端で、発現カセットから発現されるCry2Aタンパク；及び配列番号：10に記載及び図2に例示される間挿形質転換DNAの3'末端で発現カセットから発現されるCry1A.105タンパクである。Cry2Aタンパクは、At.Act2プロモータから発現され、Cry1A.105タンパクは、At.RbcS4プロモータから発現される。Cry2A及びCry1A.105タンパクは、鱗翅類の害虫種に有毒な薬剤である。

40

50

【0020】

ダイズイベントMON87751を生成するために用いられる構築物は、各Cryタンパクの各プロモータからの発現が同じ方向に進むがそれぞれは別々の各プロモータからできるように、転写の相対的縦方向に並んだ配向で配置されるCry2Ab及びCry1A.105タンパクの発現を誘導するプロモータを有する(図2を参照)。評価された他の構築物は、発現要素の使用の組み合わせにより異なっており、すなわち、エンハンサ(E)、プロモータ(P)、リーダー(L)、イントロン(I)、クロロプラストターゲットペプチド(CTP)及び3'UTR(T)である。また、構築物は、両方のCryタンパクのベクタースタック(Cry2Ab及びCry1A.105)を含むか、または単一のCryタンパク、すなわちCry2AbまたはCry1A.105を含んでいた。発現構築物では更に、ベクタースタック構築物中のCryタンパクに対する2つのカセットの相対的な配向が異なっていた。具体的に、2つのカセットは、転写の縦に並んだ配向にあったか、または2つのカセットは、拡散する配向のいずれかであったため、2つのCryタンパクの各プロモータからの発現が、2つのプロモータ間の中心点から離れるようになる、すなわち、各発現カセットの転写は、逆方向に進み、かつ、収束しないようになる。Cry1A.105をコードするDNAシーケンスは、イベントMON87751に間挿される導入遺伝子のシーケンスに対して、構築物中に多様化されるシーケンスであった。最後に、転写と逆の配向に指向される、2つのCry発現カセットを有する構築物の2つにおいて、転写エンハンサは、発散プロモータの間に配置された(図2を参照)。

10

【0021】

イベントMON87751は、図2で例示されるように、それぞれがT-DNAセグメントを含む構築物の1つで変換される何千もの異なる独立形質転換イベントとの比較及びイベントMON87701及び/またはイベントGM_A19478(MON87701として同時に発生し共にCry1Acを発現)との比較、形質転換イベント40-3-2(除草剤グリフォセートに耐性をもたらす)との比較及び非移植遺伝子の制御ダイズ(A3555またはA5547)との比較に基づき選択された。下に示す実施例の結果は、Cry2Ab及びCry1A.105タンパクを発現しているため、イベントMON87751は、優れた特性を示したことを示す。イベントMON87751の発生に用いた構築物を用いて生成した複数の形質転換イベントの方が、他の構築物で生成される他のイベントよりも、鱗翅類の害虫に対する有効な制御を示す可能性が高かった。

20

30

【0022】

各イベントMON87751に対応するDNAを含む、種子を含むダイズ植物及びその部分のそれぞれが、本発明の範囲内である。種子を含むその植物及び部分は、鱗翅類の寄生に対する耐性を示す。特定の実施形態では、この植物及び種子は、ハイブリッド及び近交系、並びに、1つのイベントMON87751対立遺伝子のみ、すなわち、イベントMON87751DNAに対応する座位に関してヘテロ接合としてキャラクタリゼーションされたゲノムのみ、を含む植物及び種子を含む。商業的な生長過程の一部としての所望の生殖質及びダイズの他の農業上所望の特性を有するイベントMON87751を含む植物を交配することにより、このハイブリッドを生産することができる。ハイブリッドは、多くの方法により生産されてもよいが、好ましい方法は、イベントMON87751DNAが間挿される座位での両方の染色体上にあるイベントMON87751特性対立遺伝子を含む、第1の近交系(同種接合)ペアレントの利点を利用し、MON87751DNAを含まない第2の近交系と第1の近交系を交配する。両方のペアレント近交系種類は、後代の種子、すなわちハイブリッド種子で所望の1つ以上の有利な特性を有し、そして、これらのハイブリッド種子は、イベントMON87751対立遺伝子に対してヘテロ接合である。

40

【0023】

イベントMON87751DNAを含んでいる植物に追加の形質をもたらす移植遺伝子の特性または対立遺伝子が望まれる場合もある。他の形質転換対立遺伝子のもたらす所望の形質としては、除草剤耐性:GTS 40-3-2、MON87708、MON897

50

88、A2704-12、A2704-21、A5547-35、A5547-127、BPS-CV127-9、DP356043、GU262、W62、W98、DAS-44406-6、DAS-68416-4、FG72、BPS-CV127-9、SYHT04R、SYHT0H2、3560.4.3.5、EE-GM3、pDAB4472-1606、pDAB4468-0416、pDAB8291.45.36、127、AAD-12；虫害抵抗性：MON87701、DAS-81419-2；強化油組成物の増強：DP-305423、G94-1、G94-19、G168、OT96-15、MON87705、MON87769；産出高の増加：MON87712、または窒素固定形質、水使用調節形質、菌類寄生耐性、ネマトーダ寄生耐性等が挙げられる。非移植遺伝子の特性（例えば、QTLまたは成熟グループ）は、所望の形質をもたらすとともに、当業者は、この非形質転換形質及びイベントMON87751DNAを含むようにダイズを交配する方法を知っている。

10

【0024】

本発明の前述及びその他の態様は、以下の詳細な説明からさらに明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】各水平線により例示される、異種の形質転換DNAのセグメント、フランキングゲノムDNA、任意に表わされた5'及び3'ゲノム/間挿DNA接合部の相対的な位置及びダイズイベントMON87751を同定するために使用可能な異種の形質転換DNA内のイベントMON87751に特有のシーケンスの相対的な位置線図である。〔1〕、〔2〕、〔3〕、〔4〕、〔5〕、〔6〕、〔7〕、〔8〕、〔9〕〔10〕、〔17〕、〔18〕、〔19〕、〔20〕、〔21〕、〔22〕、〔23〕、〔24〕、〔25〕及び〔26〕で標識された水平線は、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：17、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、配列番号：25及び配列番号：26にそれぞれ対応する。太線による水平線は、イベントMON87751で間挿される異種の形質転換DNAの複合体（配列番号：9）及び5'及び3'フランキングゲノムDNAの両方を代表し、また、配列番号：7、配列番号：9及び配列番号：8を含む配列番号：10を表示する。太い水平矢印は、配列番号：15、配列番号：11、配列番号：12及び配列番号：14にそれぞれに対応するSQ26901、SQ20267、SQ25826及びSQ27115を表わす。細い水平矢印は、イベントMON87751の異種の形質転換間挿DNAの2つの別々の発現カセットの相対的な構成を表し、Pはプロモータ要素を表し、Lはリーダーを表し、P-Lは、プロモータ及びリーダーを表し、Iはイントロンを表し、CTPはクロロプラスト輸送ペプチドを表し、Cry2AbはCry2Abタンパク、T=3'転写終了及びポリアダニル化要素（3'UTR）のためのコード領域を表し、Cry1A.105は、Cry1A.105タンパクのコード領域を表す。

20

30

【図2】ダイズイベントMON87751の選択中に評価されるトランスジェニックダイズイベントを生成するために用いられる11の形質転換構築物中でCryタンパク発現カセットをコードするT-DNAセグメント及び各構築物中の各Cryタンパク発現カセットの組成物を例示する図である。

40

【図3】非トランスジェニックダイズ株（A3555）と比較した、構築物1、構築物2及び構築物3で発生するイベント中の、Cryタンパク発現のELISA分析の結果のグラフ図である。パネルAは、植物成長のR1及びR3段階で収集される葉組織中のCry2Abタンパク質レベルを示す。パネルBは、植物成長のR1及びR3段階で収集される葉組織中のCry1A.105タンパク質レベルを示す。

【図4】非トランスジェニックダイズ株（A3555）と比較した、構築物1、構築物5、構築物6及び構築物4で発生するイベント中の、Cryタンパク発現のELISA分析の結果のグラフ図である。パネルAは、2つの別々のスクリーンハウス試験で成長させた

50

植物から植物成長のR3段階で収集した葉組織中のCry2Abタンパク質レベルを示す。パネルBは、2つの別々のスクリーンハウス試験で成長させた植物から植物成長のR3段階で収集した葉組織中のCry1A.105タンパク質レベルを示す。

【図5】植物成長のR3及びR5段階で収集した葉サンプルに対して、構築物1、構築物2、構築物3、構築物4、構築物5、構築物6、構築物9、構築物7及び構築物11で発生させたイベント中のCry2Abタンパク質発現のELISA分析の結果のグラフ図である。

【図6】植物成長のR3及びR5段階で収集された葉サンプルに対して、構築物1、構築物2、構築物3、構築物4、構築物5、構築物6、構築物9、構築物7及び構築物11で発生させたイベント中の、Cry2.1A.105タンパク質発現のELISA分析の結果のグラフ図である。パネルAは、Y軸0~5000ppmの乾燥重量をプロットし、パネルBは、Y軸0~500ppmの乾燥重量をプロットし、R3段階のためのデータは、パネルBによりよく示される。シーケンスの簡単な説明

【0026】

配列番号：1は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの5'接合部領域を表す20のヌクレオチド配列である。

【0027】

配列番号：1は、ヌクレオチド位置1325~1344で配列番号：10中に配置される。

【0028】

配列番号：2は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの3'接合部領域を表す20のヌクレオチド配列である。

【0029】

配列番号：2は、ヌクレオチド位置1144~1163で配列番号：10中に配置される。

【0030】

配列番号：3は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの5'接合部領域を表す60のヌクレオチド配列である。

【0031】

配列番号：3は、ヌクレオチド位置1305~1364で配列番号：10中に配置される。

【0032】

配列番号：4は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの3'接合部領域を表す60のヌクレオチド配列である。

【0033】

配列番号：4は、ヌクレオチド位置1142~1183で配列番号：10中に配置される。

【0034】

配列番号：5は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの5'接合部領域を表す100のヌクレオチド配列である。

【0035】

配列番号：5は、ヌクレオチド位置1285~1384で配列番号：10中に配置される。

【0036】

配列番号：6は、ダイズゲノムDNA及び一体型の形質転換発現カセットの3'接合部領域を表す100のヌクレオチド配列である。

配列番号：6は、ヌクレオチド位置1140~11503で配列番号：10中に配置される。

【0037】

配列番号：7は、ゲノムDNA及び移植遺伝子の間挿DNAの接合部まで及びそれを含

10

20

30

40

50

む、5'フランキングサイズゲノム配列を表す1626のヌクレオチド配列であり、フランキングゲノムDNAの(5'~3')1334及び間挿形質転換DNAの任意に指定された5'末端の292のヌクレオチドを含む。

【0038】

配列番号：8は、ゲノムDNA及び移植遺伝子の間挿DNAの接合部まで及びそれを含む、フランキングサイズゲノム配列を表す1452のヌクレオチド配列であり、間挿形質転換DNAの任意に指定された3'末端の(5'~3')265のヌクレオチド及び3'フランキングゲノムDNAの1187のヌクレオチドを含む。

【0039】

配列番号：9は、サイズイベントMON87751のゲノムに間挿される移植遺伝子のDNAに対応し10119のヌクレオチド配列である。

10

【0040】

配列番号：10は、イベントMON87751に間挿される形質転換ゲノムDNAの複合ヌクレオチド配列及び5'フランキングゲノムDNAヌクレオチド配列及び3'フランキングゲノムDNAヌクレオチド配列に対応する12640のヌクレオチド配列であり、配列番号：7及び配列番号：9及び配列番号：8を含む。

【0041】

配列番号：11は、サンプル中のサイズイベントMON87751DNAを同定するために用いられるSQ20267と呼ばれる熱増幅プライマーに対応した27のヌクレオチド配列であり、配列番号：10の位置11400~11426に対応するヌクレオチド配列と同一である。

20

【0042】

配列番号：12は、サンプル中のサイズイベントMON87751DNAを同定するために用いられるSQ25826と呼ばれる熱増幅プライマーに対応した26のヌクレオチド配列であり、配列番号：10の位置11454~11479に対応するヌクレオチド配列の逆補完体と同一である。

【0043】

配列番号：13は、サンプル中のサイズイベントMON87751DNAを同定するために用いられるPB10263と呼ばれるプローブに対応した19のヌクレオチド配列であり、配列番号：10の位置11428~11446に対応するヌクレオチド配列と同一である。

30

【0044】

配列番号：14は、サンプル中のサイズ野生型対立遺伝子DNA及び/またはサイズイベントMON87751DNAの存在を同定するために用いられるSQ27115と呼ばれる熱増幅プライマーに対応した24のヌクレオチド配列であり、配列番号：10の位置11458~11481に対応するヌクレオチド配列の逆の逆補完体と同一である。

【0045】

配列番号：15は、サイズから誘導されるサンプル中の野生型対立遺伝子DNAの存在を同定するために接合子性アッセイで用いられるSQ26901と呼ばれる熱増幅プライマーに対応する30のヌクレオチド配列であり、配列番号：10の位置1288~1317に対応するヌクレオチド配列と同一である。

40

【0046】

配列番号：16は、PB11254と呼ばれるプローブに対応する18のヌクレオチド配列であり、サイズから誘導されるサンプル中の野生型対立遺伝子DNAの存在を同定するために、接合子性アッセイで用いられる。

【0047】

配列番号：17は、サイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA(配列番号：9)中の特有のヌクレオチド配列に対応する112のヌクレオチド配列であり、配列番号：9の36~147の位置と同一であり、かつ配列番号：10の1370~1481の位置と同一である。

50

【 0 0 4 8 】

配列番号：18は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する52のヌクレオチド配列であり、配列番号：9の1305～1356で位置と同一であり、かつ配列番号：10の1639～1690位置と同一である。

【 0 0 4 9 】

配列番号：19は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する283のヌクレオチド配列であり、配列番号：9の位置1561～1843と同一であり、かつ配列番号：10の位置2895～3177と同一である。

10

【 0 0 5 0 】

配列番号：20は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する486ヌクレオチド配列であり、配列番号：9の2340～2825の位置と同一であり、かつ配列番号：10の3674～4159の位置と同一である。

【 0 0 5 1 】

配列番号：21は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する179のヌクレオチド配列であり、配列番号：9の3326～3504の位置と同一であり、かつ配列番号：10の位置4660～4838と同一である。

20

【 0 0 5 2 】

配列番号：22は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する106のヌクレオチド配列であり、サンプル中のイベントMON87751DNAを同定するために有用であり、配列番号：9の3749～3854の位置と同一であり、かつ配列番号：10の位置5083～5188と同一である。

【 0 0 5 3 】

配列番号：23は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する60のヌクレオチド配列であり、サンプル中のイベントMON87751DNAを同定するために有用であり、配列番号：9の位置9320～9379と同一であり、かつ配列番号：10の位置10654～10713と同一である。

30

【 0 0 5 4 】

配列番号：24は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応する66のヌクレオチド配列であり、サンプル中のイベントMON87751DNAを同定するために有用であり、配列番号：9の位置9620～9685と同一であり、かつ配列番号：10の位置10954～11019と同一である。

【 0 0 5 5 】

配列番号：25は、ダイズイベントMON87751に間挿される形質転換DNA（配列番号：9）中の特有のヌクレオチド配列に対応し、サンプルでイベントMON87751DNAを同定するために有用な、156のヌクレオチド配列であり、配列番号：9の位置9720～9875と同一であり、かつ配列番号：10の位置11054 - 11209と同一である。

40

【 0 0 5 6 】

配列番号：26は、ダイズイベントMON87751中に発現されるCry2Abタンパクをコードするオープンナリーディングフレームに対応した、1905のヌクレオチド配列である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 5 7 】

50

本発明者らは、特に、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (フォールアーミーワーム (fall armyworm), FAW)、スポドプテラ・エリダニア (*Spodoptera eridania*) (サウザンアーミーワーム (southern armyworm), SAW)、スポドプテラ・エクシグア (*Spodoptera exigua*) (ビートアーミーワーム (beet armyworm), BAW)、スポドプテラ・オルニトガリイ (*Spodoptera ornithogalli*) (イエローストライプドアーミーワーム (yellow striped armyworm), YSAW)、クロシドセマ・アポレマ (*Crocidosema aporema*) (ビーンシュートモス (bean shoot moth), BSM)、ラキプルスシア・ヌ (*Rachiplusia nu*) (サンフラワーローパー (sunflower looper), SFL)、アンチカルシア・ゲマタリス (*Anticarsia gemmatalis*) (ベルベットビーンキャタピラー (velvetbean caterpillar), VBC)、クリソデイキス・インクルデンス (*Chrysodeixis includens*) (ソイビーンローパー (soybean looper), SBL)、ヘリコベルパ・ゼア (*Helicoverpa zea*) (ソイビーンポッドウオーム (soybean podworm), SPW)、ヘリコベルパ・ゲロトペオン (*Helicoverpa gelotopeon*) (サウスアメリカンボールワーム (South American bollworm)、エラスモパルプス・リグノセルス (*Elasmopalpus lignosellus*) (レッサーコーンストークボーラー (lesser cornstalk borer)、エスチグマン・アクレア (*Estigmene acrea*) (ソルトマーシュキャタピラー (saltmarsh caterpillar) 及びプラチペナ・スカブラ (*Plathypena scabra*) (グリーンクローパーワーム (green clover worm) などの鱗翅目における農業上重要な害虫に対し、商業的に許容可能な耐性を示すトランスジェニックダイズイベント MON87751 を同定した。当該イベントは、2つの異なる操作可能に連結した発現カセットを有し、1つは Cry2Ab 殺虫タンパク質をコードし、他方は Cry1A.105 殺虫タンパク質をコードし、ダイズが鱗翅目の寄生に対し耐性を示すための2種の異なる作用様式を示す。他のトランスジェニックダイズイベントも当該技術分野で公知であり、即ち、Cry1Ac パチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) (Bt) 毒素タンパク質を発現する MON88701 がある (MacRae et al. 2005, Fischhoff & Perlak 1995)。MON88701 は、スポドプテラ種 (*Spodoptera spp.*) に対する有効性は不十分であるが、ダイズの主な鱗翅目の害虫に耐性を示す単一の作用様式を示す。ダイズの主要害虫に有効性を示し、スポドプテラ種の制御に関与する2種以上の異なる殺虫タンパク質を発現するトランスジェニックダイズを提供することが好ましい。本発明者らは、上記課題に対する少なくとも1つの解決策をダイズイベント MON87751 の形態で提供するが、この MON87751 はダイズゲノム内の1遺伝子座において2つの共有結合した発現カセットを結合し、これらのカセットは鱗翅目種に対する耐性特性を拡張し、更には、ダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ葉、ダイズさや、ダイズ種子及びダイズ植物に、鱗翅目種間の耐性進化を阻害または遅延させる2以上の作用様式を提供する。

【0058】

ダイズイベント MON87751 は、プラスミド構築物1を用いるダイズ分裂組織のアグロバクテリウム媒介形質転換法により作製された。このプラスミド構築物は2つの領域を含み、各々がアグロバクテリウムの境界セグメント (T-DNAセグメント) に挟まれている。第1のT-DNAセグメントは、2つの連結した植物発現カセットを含み、1つの発現カセットは選択マーカーをコードし、もう1つの発現カセットはスコア化可能マーカーをコードする。第2のT-DNAセグメントは、2つの異なる殺虫タンパク質 Cry2Ab 及び Cry1A.105 がダイズ植物細胞中で発現するのに必要な調節遺伝因子を有する2つの連結した植物発現カセットを含む。プラスミド構築物1中の2つのT-DN

Aセグメントにより、Cry2Ab及びCry1A.105の発現カセットを含むT-DNAセグメントの組込み部位から離れた部位に、選択/スコア化可能マーカ遺伝子を含むT-DNAセグメントがダイズゲノムに無作為に挿入され、その結果自家受粉及び/または戻し交配、例えば、R1及びこれより高い世代のトランスジェニック植物のスクリーニングのプロセスの間に、形質転換されたダイズ植物ゲノム内の2つのT-DNAセグメントの隔離が可能となる。形質転換したダイズ細胞は無傷のダイズ植物に再生し、個々の植物をCry2Ab及びCry1A.105タンパク質をコードする第2のT-DNAセグメントの完全性を示す植物固体群から選択した。R1とその次の世代では、イベントは、Cry2Ab及びCry1A.105タンパク質をコードする第2のT-DNAセグメントの完全性に基づき、また選択/スコア化可能マーカカセットをコードする第1のT-DNAセグメントの不在(即ち、隔離)に基づいて選択され、プラスミドのいかなるバックボーン配列も含まない植物用として選択される。イベントMON87751のダイズ細胞が昆虫の餌中に供される場合には、ダイズイベントMON87751の細胞中に発現されたCry2Ab及びCry1A.105殺虫性毒性タンパク質が、鱗翅目害虫に対する耐性を与える。

10

【0059】

ダイズイベントMON87751のゲノムに挿入されたプラスミドDNAは、詳細な分子分析により特徴付けられる。これらの分析は以下を含む：挿入数(ダイズゲノム内の組込み部位数)、ゲノム挿入位置(挿入が生じたダイズゲノム中の特定部位)、コピー数(1遺伝子座内のT-DNAのコピー数)、及びトランスジェニック挿入DNAの完全性。当該イベントMON87751を生じるダイズゲノムに挿入された2つの連結した発現カセットを含むプラスミド構築物は、ダイズゲノムにも、その他のベクターまたはダイズ若しくはトランスジェニックイベントにも天然に存在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作製または構築するのに使用される要素間の結合配列)を含む(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17、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、配列番号25及び配列番号26に示される配列)。更に、イベントMON87751に挿入されたトランスジェニックDNAを生じさせた形質転換イベントは、本明細書では、ダイズゲノム内の単一遺伝子座に対する挿入物として特徴付けられ、結果的に挿入DNAとダイズゲノムDNAの間の2つの新たな遺伝子座、即ち結合配列をもたらす。また、本明細書で特徴付けられるのは、イベントMON87751のダイズゲノムに挿入された異種DNA内の更なるユニーク配列であり、イベントMON87751 DNAを含むダイズゲノムに対してのみユニークとなるのに十分な長さを有する配列である。これらの結合配列は、ダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子及びダイズ植物またはダイズ植物生産物(ダイズ商品生産物)中のイベントMON87751 DNAの存在を検出するのに有用である。DNA分子のプロープ及びプライマー対は、本明細書には、イベントMON87751 DNAを含有するダイズ細胞、ダイズ種子、ダイズ植物部分またはダイズ植物組織を含む、または含むことが疑われる生体試料中のこれらの様々な結合セグメントの存在の同定に使用するために開発されたことが記載されている。データは、イベントMON87751が、挿入されたトランスジェニックDNAの1コピーと共に、単一のT-DNA挿入物を含有することを示している。イベントMON87751 DNAには、植物形質転換プラスミドからダイズゲノムへのトランスジェニックDNAの転移に使用される、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの左及び右境界領域部分以外の形質転換構築物1からの更なる要素は同定されなかった。最後に、試料中のかかるイベントMON87751 DNAが存在する診断となる特定のアンプリコンを作製する熱増幅と、DNA配列分析を行い、任意に特定した5'及び3'挿入物と植物ゲノムの結合部を決定し、挿入物中の要素の構成を確認し、ダイズイベントMON87751中に挿入された導入遺伝子DNA(配列番号9)の完全DNA配列を決定した。

20

30

40

【0060】

50

多くのトランスジェニックイベントが、トランスジェニックダイズイベントMON87751の作製に使用される形質転換構築物1を用いて作製され、10個の更なる形質転換構築物が生成され使用されて、ダイズイベントMON87751及びこれに類似するダイズイベントと比較される他の多くのトランスジェニックダイズイベントが作製された。これらのイベントについては、2種類の殺虫タンパク質Cry2Ab及びCry1A.105の葉組織における発現を、ELISAアッセイにより試験した。各々の形質転換により作製されたイベントのサブセットと、前記構築物の大部分について、スモールプロットスクリーンハウス試験(small-plot screenhouse trials)における鱗翅目害虫の制御能力を試験した。植物の発現要素、及び形質転換構築物1中のCry2Ab及びCry1A.105の発現カセットの相対的位置(relative orientation)が、試験される最も広い範囲の鱗翅目害虫に対する最も優れた効力をイベントに与えることが確認された。

10

【0061】

本明細書中で特記しない限り、用語は、関連技術分野の当業者の通常の使用法に従い理解すべきである。分子生物学における一般用語の定義は、Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; 及びLewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994においても見出すことができる。本明細書で使用する「ダイズ」という用語は、ダイズ(Glycine max)を意味し、イベントMON87751 DNAを含有するダイズ植物を用いて育種できる全ての植物種を包含し、ダイズ野生種と、種間の育種が可能なダイズ属に属する植物も包含する。本明細書で使用する「含む(comprising)」という用語は、「包含する(including)」が、これに限定されない」ことを意味する。

20

【0062】

本発明は、少なくとも2つの発現カセットを含むDNA構築物により形質転換されたトランスジェニック植物を提供し、第1の発現カセットは毒性量の殺虫タンパク質Cry2Abを発現し、第2の発現カセットは毒性量の殺虫タンパク質Cry1A.105を発現する。毒性量の意味は、有効量、殺虫量、有効殺虫量(an efficacious insecticidal amount)、殺虫有効量、標的昆虫抑制量、有効殺虫量(an efficacious pesticidal amount)、鱗翅目昆虫の餌中の殺虫量、及び当該関連技術分野の当業者による従来の使用法に従い理解されるその他の類似語である。前記方法に従い、本明細書に開示されたDNA構築物を用いて形質転換されたダイズ植物は、鱗翅目害虫に耐性を有する。農業的な形質を組み合わせることにより、育種集団においてこれらの特性を共に維持することが容易となり、鱗翅目害虫に対する耐性を与える単一遺伝子のみ(即ち、Cry1Ac)を含む植物よりも、広範囲の鱗翅目害虫に対する耐性を示す。

30

【0063】

トランスジェニック「植物」は、異種DNA、即ち、注目する複数の有効形質(efficacious features)を含むポリ核酸構築物による植物細胞の形質転換；導入遺伝子を植物細胞のゲノムに挿入して得られた植物の再生；及び特定のゲノム位置への挿入と、再生されたトランスジェニック植物の有効形質数により特徴付けられる特定植物の選択、により作製される。「イベント」という用語は、挿入DNA、及び挿入DNAに直接隣接するフランキングゲノム配列を含む元来の形質転換体からのDNAをいう。かかるDNAはユニークであり、挿入DNAを含む1つの親系(例えば、自家受粉により生じる元来の形質転換体及び子孫)と、挿入DNAを含まない親系との性的交配の結果、注目される導入遺伝子を含む挿入DNAを受け取る子孫に伝達されることが期待されるであろう。本発明は、異種DNAを含む元来の形質転換植物及びその形質転換体の子孫も提供する。かかる子孫は、当該イベントを含む植物と別の植物との性的異種交配により作製することができ、その子孫は異種DNAを含む。反復親への戻し交配の反復後であっても

40

50

、当該イベントは、同一の染色体位置での交配による子孫に存在する。本発明は、トランスジェニックイベント、MON 87751を含むダイズ植物、その子孫及びそこに含まれるDNA組成物に関する。

【0064】

「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、放射活性同位体、リガンド、化学発光剤または酵素が結合し得る単離された核酸である。かかるプローブは、標的核酸の鎖、本発明の場合には、MON 87751を含有する植物に由来するか、またはMON 87751 DNAを含む試料に由来するかにかかわらず、MON 87751からのDNA鎖に相補的である。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のみならず、標的DNA配列に特異的に結合するポリアミド及び他のプローブ材料をも包含し、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。

10

【0065】

DNAプライマーは、核酸ハイブリダイゼーションにより相補的な標的DNA鎖にアニールし、プライマーと標的DNA鎖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ポリメラーゼにより標的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プライマーセットとは、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って、標的核酸配列の増幅のために有用な2つのDNAプライマーをいう。

【0066】

DNAプローブ及びDNAプライマーは、11個以上の長さのポリヌクレオチドであってよく、18個以上のポリヌクレオチド、24個以上のポリヌクレオチド、または30個以上のポリヌクレオチドであってもよい。かかるプローブ及びプライマーは、高ストリンジエンなハイブリダイゼーション条件下で標的配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有するよう選択される。好ましくは、本発明によるプローブ及びプライマーは、標的配列との完全な配列類似性を有するが、標的配列にハイブリダイズする能力を保持する、その標的配列とは異なるプローブは従来の方法により設計し得る。

20

【0067】

本明細書に開示されたフランキングゲノムDNA及び挿入配列に基づくプライマー及びプローブを用いて、従来の方法、例えば、かかるDNA分子を再クローニングし配列決定することにより、開示されたDNA配列を確認(及び必要ならば修正)することができる。

30

【0068】

本発明の核酸プローブ及びプライマーは、ストリンジェント条件下で標的DNA分子にハイブリダイズする。あらゆる従来の核酸ハイブリダイゼーションまたは増幅法を用いて、試料中のトランスジェニック植物由来のDNAの存在を同定することができる。核酸セグメントまたはそのフラグメントとも称されるポリ核酸分子は、ある種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ことができる。本明細書に用いた2つのポリ核酸分子は、その2つの分子が逆平行二本鎖の核酸構造を形成できる場合、相互に特異的にハイブリダイズできると言われる。核酸分子は、それらが完全な相補性を示す場合、別の核酸分子の「相補体」と言われる。本明細書に用いた分子は、その分子の1つのすべてのヌクレオチドが他方のヌクレオチドに相補的である場合に「完全な相補性」を示すと言われる。2つの分子は、少なくとも従来の「低ストリンジェンシー」条件下で、それらが相互にアニールされた状態を維持可能とするのに十分な安定性を持って相互にハイブリダイズできる場合、「最小に相補的である」と言われる。同様に、それらの分子は、従来の「高ストリンジェンシー」条件下で、それらが相互にアニールされた状態を維持可能とするのに十分な安定性を持って相互にハイブリダイズできるならば、「相補的」と言われる。従来のストリンジェンシー条件は、Sambrook et al.により1989年に、及びHaymes et al.により、Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC(1985)において記載されている

40

50

。従って、完全な相補性からの逸脱は、かかる逸脱が二本鎖構造を形成する分子の能力を完全に除外しない限りは、許容される。核酸分子がプライマーまたはプローブとして機能するためには、使用した特定の溶媒及び塩濃度下で、配列が安定な二本鎖構造を形成するのに十分相補性であることだけが必要である。

【0069】

本明細書に用いた、実質的に相同性の配列は、高ストリンジェンシー条件下で、それが比較される核酸配列の相補体に特異的にハイブリダイズするであろう核酸配列である。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ェンシー条件、例えば、約45の6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)に続く、50の2.0×SSCによる洗浄は、当業者に公知であるか、またはCurrent Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50の約2.0×SSCの低ストリンジェンシーから50の約0.2×SSCの高ストリンジェンシーまで選択できる。加えて、洗浄工程における温度は、室温、約22の低ストリンジェンシー条件から約65の高ストリンジェンシー条件まで上げることができる。温度及び塩の双方は変更でき、または温度もしくは塩濃度のいずれかを一定に保持しつつ、他方の変数を変化させることができる。好ましい実施形態では、本発明のポリ核酸は、中程度のストリンジェント条件下、例えば、約2.0×SSC及び約65で、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、17、18、19、20、21、22、23または24に記載された1以上の核酸分子またはその相補体またはそのいずれかのフラグメントに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、本発明の核酸は、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、17、18、19、20、21、22、23または24に記載された1以上の核酸分子またはそのいずれかの相補体もしくはフラグメントに特異的にハイブリダイズするであろう。本発明の1つの態様において、本発明の好ましいマーカー核酸分子は、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17または配列番号18または配列番号19または配列番号20または配列番号21または配列番号22または配列番号23に記載された核酸配列、またはその相補体またはそのいずれかのフラグメントを有する。標的DNA分子に対するプローブのハイブリダイゼーションは当業者に公知の多くの方法により検出することができ、これらの方法としては蛍光性タグ、放射活性タグ、抗体ベースのタグ及び化学発光タグが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0070】

特定の増幅プライマー対を用いる(例えば、PCRによる)標的核酸配列の増幅に関して、「ストリンジェント条件」は、プライマー対が、対応する野生型配列(またはその相補体)を有するプライマーが結合する標的核酸配列にだけハイブリダイズするのを可能とし、好ましくは、DNAの熱増幅反応において、ユニークな増幅生産物であるアンプリコンを生成する条件である。

【0071】

「(標的配列)に特異的な」という用語は、プローブまたはプライマーが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、標的配列を含む試料中の標的配列にだけハイブリダイズすることを示す。

【0072】

本明細書で用いた「増幅されたDNA」または「アンプリコン」とは、ポリ核酸鋳型の一部である標的ポリ核酸分子に対するポリ核酸増幅法の生産物をいう。例えば、性的交配により得られたダイズ植物が、本発明のイベントMON87751を含むダイズ植物からのトランスジェニック植物ゲノミックDNAを含むか否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、イベントMON87751の異種挿入DNAに隣接する領域のゲノミックDNA配列に由来する第1のプライマーを含むプライマー対を用いる

10

20

30

40

50

ポリ核酸増幅法に供してもよく、ポリメラーゼにより挿入DNAの5'から3'の方向に伸長される。第2のプライマーは、ポリメラーゼにより、第1のプライマーが由来するフランキングゲノミックDNAの5'から3'の方向に伸長される異種挿入DNA分子に由来する。アンプリコンの長さは、プライマー対+1ヌクレオチド塩基対、または+約50ヌクレオチド塩基対、または+約250ヌクレオチド塩基対、または+約450ヌクレオチド塩基対以上を組み合わせた長さの範囲に及ぶ。あるいは、プライマー対は、全挿入ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンを生成するように、挿入異種DNAの両端のゲノム配列から得ることができる(例えば、配列番号10の5'末端のゲノム位置から単離されたフォワードプライマー、及びイベントMON87751を含有するゲノムにおいて本明細書で同定された、挿入異種DNA配列(配列番号9)を含むDNA分子を増幅する配列番号10の3'末端のゲノム位置から単離されたリバースプライマー)。挿入されたトランスジェニックDNAに隣接する植物ゲノム配列から誘導されたプライマー対のメンバーは、挿入DNA配列からある距離を置いて位置し、この距離は1ヌクレオチド塩基対から約2万ヌクレオチド塩基対までの範囲に及ぶ。「アンプリコン」という用語の使用は、DNAの熱増幅反応において形成し得るプライマー二量体を明確に除外する。

10

【0073】

実用的な目的のためには、限定されたサイズ範囲、例えば100~1000塩基のアンプリコンを生成させるプライマーを設計すべきである。一般に、より小さい(より短いポリヌクレオチド長)サイズのアンプリコンは、熱増幅反応においてより確実に生成させることができ、より短いサイクル時間を可能とし、アガロースゲル上で容易に分離され視覚化され、またはエンドポイントTAQMAN(登録商標)様アッセイの使用に適合させることができる。より小さいアンプリコンは、DNAアンプリコン検出の技術分野で公知の方法により作製し検出することができる。更に、プライマー対を用いて作製したアンプリコンをバクターにクローニングし、増殖させて単離し、配列決定するか、または当該分野で十分確立された方法で直接配列決定することができる。MON87751またはその子孫を含む植物が存在する診断となるアンプリコンを作製するためのDNA増幅法に有用な、配列番号7と配列番号9の組み合わせ、または配列番号8と配列番号9の組み合わせに由来するあらゆるプライマー対が本発明の態様である。MON87751またはその子孫を含む植物が存在する診断となるアンプリコンを作成するためのDNA増幅法に有用な、配列番号7で示される少なくとも15の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含むあらゆる単一の単離DNAポリヌクレオチドプライマー分子が本発明の態様である。MON87751またはその子孫を含む植物が存在する診断となるアンプリコンを作製するためのDNA増幅法に有用な、配列番号8で示される少なくとも15の連続したヌクレオチドまたはその相補体を含む、あらゆる単一の単離DNAポリヌクレオチドプライマー分子が本発明の態様である。MON87751またはその子孫を含む植物が存在する診断となるアンプリコンを作成するためのDNA増幅法に有用な、配列番号9で示される少なくとも15の連続したヌクレオチドを含む、あらゆる単一の単離DNAポリヌクレオチドプライマー分子が本発明の態様である。

20

30

【0074】

ポリ核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含めた、当該技術分野で公知の様々なポリ核酸増幅法により達成できる。増幅法は当該技術分野で公知であり、特に、U.S. Patent Nos. 4,683,195及び4,683,202、並びにPCRプロトコル: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990に記載されている。PCR増幅法は、22kb(キロベース)以下のゲノミックDNA及び42kb以下のバクテリオファージDNAを増幅するために開発されてきた(Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994)。これらの方法ならびにDNA増幅の分野で公知の他の方法を、本発明の実施に用いてもよい。ダイズイベントMON87751に由来する異種DNA挿入物の配列またはフランキングゲノミックDNA配列は、本明

40

50

細書で提供された前記配列から得られたプライマーを用いて、イベントMON87751 DNAを含むダイズ種子、またはATCC受入番号PTA-120166で寄託されたイベントMON87751 DNAを含むダイズ種子から育成されたダイズ植物からのDNA分子を増幅させ、次いでPCRアンプリコンまたはそのクローニングしたDNAフラグメントについて標準的なDNA配列決定を行うことにより確認できる（必要ならば、修正できる）。

【0075】

これらの方法により作製された診断となるアンプリコンは、複数の技術により検出することができる。かかる方法の1つは、Genetic Bit分析法（Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175、1994）であり、この方法では、隣接するフランキングゲノミック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。この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。（挿入配列における1つのプライマーと隣接するフランキングゲノミック配列における1つを用いる）注目する領域のPCRの後には、一本鎖PCR生産物は、固定化したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、DNAポリメラーゼと、予想される隣の塩基に特異的な標識ジデオキシヌクレオチドトリホスフェート（ddNTP）を用いる単一塩基伸長反応のための鋳型として機能し得る。読み出しは蛍光またはELISAに基づくものであってよい。増幅、ハイブリダイゼーション及び単一塩基伸長反応の成功により、シグナルが導入遺伝子/ゲノム配列の存在を示す。

【0076】

もう一つの方法は、Winge（Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000）によって記載されたピロシーケンス（Pyrosequencing）技術である。この方法では、隣接するゲノミックDNAと挿入DNAの結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ている。このオリゴヌクレオチドは、注目する領域からの一本鎖PCR生産物にハイブリダイズし（挿入された配列における1つのプライマー及びフランキングゲノム配列における1つ）、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'ホスホスルファート及びルシフェリンの存在下でインキュベートされる。DNTPは個々に添加され、その組み込みの結果、光シグナルが生じ、これが測定される。増幅、ハイブリダイゼーション及び単一または多重の塩基伸長の成功により、光シグナルが導入遺伝子/ゲノム配列の存在を示す。

【0077】

Chen, et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999)によって記載された蛍光偏光法は、本発明のアンプリコンを検出するために使用できる方法である。この方法を用いて、ゲノムフランキングと挿入DNAの結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。このオリゴヌクレオチドは注目する領域からの一本鎖PCR生産物にハイブリダイズし（挿入DNAにおける1つのプライマー及びフランキングゲノミックDNA配列における1つ）、DNAポリメラーゼ及び蛍光標識ddNTPの存在下でインキュベートされる。単一塩基伸長の結果、ddNTPの組み込みが起こる。組み込みは、蛍光測定器を用いて偏光の変化として測定できる。増幅、ハイブリダイゼーション及び単一塩基伸長の成功により、偏光の変化が導入遺伝子/ゲノム配列の存在を示す。

【0078】

TaqMan（商標登録）（PE Applied Biosystems, Foster City, CA）は、DNA配列の存在を検出及び定量する方法として記載され、製造者が提供する説明書において十分に理解される。簡潔に言えば、ゲノムフランキングと挿入DNAの結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プローブ及びPCRプライマー（挿入DNA配列における1つのプライマー及びフランキングゲノム配列における1つ）が熱安定性ポリメラーゼ及びdNT

Pの存在下で循環する。FRETプローブのハイブリダイゼーションの結果、蛍光性部分がFRETプローブ上の消光部分から離れて切断及び遊離する。増幅及びハイブリダイゼーションの成功により、蛍光シグナルが導入遺伝子/ゲノム配列の存在を示す。

【0079】

分子標識 (Molecular Beacon) は、Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996) に記載されるように、配列検出における使用が記載されてきた。簡潔に言うと、フランキングゲノムと挿入DNAの結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プローブは、そのユニークな構造に起因して、蛍光性部分と消光部分とを隣接に保つ二次構造を含む。FRETプローブ及びPCRプライマー (挿入DNA配列における1つのプライマー及びフランキングゲノム配列における1つ) が、熱安定性ポリメラーゼ及びdNTPの存在下で循環する。PCR増幅の成功に続いて、FRETプローブが標的配列にハイブリダイゼーションする結果、プローブ二次構造が除去され、蛍光性部分と消光部分の空間的分離が起こる。蛍光シグナルが生じる。増幅及びハイブリダイゼーションの成功により、蛍光シグナルがフランキング/導入遺伝子挿入配列の存在を示す。

【0080】

DNA増幅法に基づくDNA検出キットは、標的DNAに特異的にハイブリダイズし、適切な反応条件下で診断となるアンプリコンを増幅させるDNAプライマー分子を含む。当該キットは、アガロースゲルベースの検出方法、または当該技術分野で公知の診断となるアンプリコンを検出するあらゆる数の方法を提供し得る。DNA検出キットは本明細書に開示される組成物を用いて開発することができ、試料中のダイズイベントMON87751 DNAの同定に有用であり、イベントMON87751 DNAを含むダイズ植物を育種する方法に適用できる。配列番号10に記載されたダイズゲノム領域のいかなる部分、及び配列番号10に記載された挿入トランスジェニックDNAのいかなる部分に対し、相同的または相補的であるDNAプライマーを含むキットは、本発明の対象物である。当該DNA分子は、DNA増幅法 (PCR) において、またはポリ核酸ハイブリダイゼーション法、即ちサザン分析法、ノーザン分析法におけるプローブとして使用することができる。

【0081】

結合配列は、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17、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、配列番号25及び配列番号26から成る群からの配列により表すことができる。例えば、当該結合配列は、配列番号1及び配列番号2で示されるヌクレオチド配列により任意に表すことができる。あるいは、当該結合配列は、配列番号3及び配列番号4で示されるヌクレオチド配列により任意に表すことができる。あるいは、当該結合配列は、配列番号5及び配列番号6で示されるヌクレオチド配列により任意に表すことができる。これらのヌクレオチドは、フォスフォジエステル結合により結合され、ダイズイベントMON87751中に組換え植物の細胞ゲノムの一部として存在する。ダイズ植物、ダイズ種子またはダイズ植物部分に由来する試料において、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17、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、配列番号25及び配列番号26のうち1以上が同定されることは、そのDNAがダイズイベントMON87751から得られたことを決定する要因であり、ダイズイベントMON87751に由来するDNAを含有する試料におけるその存在の診断となるものである。従って、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17、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、配列番号25及び配列番号26として示されるヌクレオチド配列のうち少なくとも1つを含有するDNA分子を提供す

10

20

30

40

50

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 17、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、配列番号 25 または配列番号 26 として示される配列のうちの少なくとも 1 つを含むのに十分なトランスジェニックダイズイベント MON 87751 に由来する DNA のいかなるセグメントも本発明の範囲内である。

【0082】

本発明は、試料中における、イベント MON 87751 DNA を含むダイズ植物に由来する DNA の存在を検出するための、プライマーまたはプローブのいずれかとして使用できる典型的な DNA 分子を提供する。かかるプライマーまたはプローブは標的核酸配列に特異的であり、それ自体が、本明細書に記載された本発明の方法により、ダイズイベント MON 87751 の核酸配列の同定に有用である。

10

【0083】

「プライマー」は、熱増幅を含む特定のアニーリング法またはハイブリダイゼーション法に用いられるように設計された、高純度に精製され単離されたポリヌクレオチドでもよい。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような熱増幅において、ダイズゲノミック DNA 試料のような鋳型 DNA とともに一对のプライマーを用いてアンプリコンを生成してもよく、このような反応から生成されるアンプリコンであれば、プライマーと鋳型とがハイブリダイズした 2 つの部位の間に位置する鋳型 DNA の配列に対応する DNA 配列を有するものと考えられる。本明細書で使用する「アンプリコン」とは、増幅技術を用いて合成した一片の DNA 断片の複製のことである。本発明のアンプリコンは、配列番号 11 または配列番号 12 として提供されるように提供される配列の少なくとも 1 つを含んでもよい。プライマーは典型的に、相補的ターゲット DNA 鎖とハイブリダイズしてプライマーとターゲット DNA 鎖の間に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、鋳型としてターゲット DNA 鎖を用いてプライマーの伸長 (即ち、伸ばすヌクレオチド分子の中への追加的ヌクレオチドのポリメリゼーション) を開始しようとするポリメラーゼが認識する点である。本発明で用いるプライマー対は、典型的には熱増幅または他の従来式核酸増幅法において、プライマー対の個々の構成要素によって結合のターゲットとされる位置の間にポリヌクレオチドセグメントを直鎖状に増幅することを目的とした、二本鎖ヌクレオチドセグメントの相対する鎖を結合させる 2 つのプライマーの使用に関連することを意図する。プライマーとして有用な例示的な DNA 分子は、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 15 として提供される。配列番号 11 及び配列番号 12 として提供されるプライマー対は、第 1 の DNA 分子及び第 1 の DNA 分子とは異なる第 2 の DNA 分子として有用であり、両方ともそれぞれ、ダイズイベント MON 87751 に由来する鋳型 DNA との熱増幅反応において共に用いられた場合に、試料中のダイズイベント MON 87751 DNA が存在する診断となるアンプリコンを生成するよう DNA プライマーとして機能するのに十分な長さの、配列番号 10 の連続ヌクレオチドである。

20

30

【0084】

「プローブ」とは、ターゲット核酸の鎖に相補的な、単離された核酸である。本発明によるプローブとしては、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、ポリアミドと、ターゲット DNA 配列に特異的に結合する他のプローブ材料も挙げられ、このような結合の検出は、特定の試料中にそのターゲット DNA 配列の存在を診断、判別、決定、または確認するのに有用であり得る。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、例えば放射性同位体、リガンド、化学発光剤、または酵素に付加してもよい。プローブとして有用な例示的な DNA 分子は、配列番号 13 及び配列番号 16 として提供される。

40

【0085】

本発明によるプローブ及びプライマーは、ターゲット配列との完全な配列相同性を有してもよいが、ターゲット配列と優先的にハイブリダイズすることのできる能力を保持する、ターゲット配列とは異なるプライマー及びプローブを従来の方法によって設計してもよ

50

い。核酸分子がプライマーまたはプローブとして働くためには、用いる特定の溶媒及び塩の濃度の下で安定した二本鎖構造が形成できるよう配列が十分相補的でありさえすればよい。従来のいずれの核酸ハイブリダイゼーションまたは増幅方法を用いて、試料中のダイズイベントMON87751からトランスジェニックDNAの存在を同定することができる。プローブ及びプライマーは、概して、長さが少なくとも約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ヌクレオチド、または少なくとも約30ヌクレオチド以上である。このようなプローブ及びプライマーは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でターゲットDNA配列と特異的にハイブリダイズする。従来のストリンジェント条件は、Sambrook et al., 1989, 及びHaymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985)に記載される。

10

【0086】

熱増幅方法を含め、当業者に周知のいずれの方法を用いても、本発明に開示されるDNA分子またはその断片を単離し、操作することができる。DNA分子またはその断片はまた、自動オリゴヌクレオチドシンセサイザーを用いることによって一般的に実践されているように、化学的手段によって直接断片を合成するなど、他の技術によって得ることもできる。

【0087】

したがって、本明細書で提供されるDNA分子及び対応するヌクレオチド配列は、とりわけ、ダイズイベントMON87751を同定し、ダイズイベントMON87751を含む植物種またはハイブリッドを選定し、トランスジェニックダイズイベントMON87751に由来するDNAの存在を試料中に検出し、ダイズイベントMON87751か、またはイベントMON87751を含むダイズ植物に由来する植物部分のいずれかの存在及び/または不存在について試料を調べるのに有用である。

20

【0088】

本発明は、ダイズ植物、ダイズ植物細胞、ダイズ種子、ダイズ植物部分（花粉、胚珠、さや、花組織、根組織、茎組織、及び葉組織など）、ダイズ子孫植物、ダイズ油、ダイズワイン、豆乳、ダイズタンパク質、及びダイズ商品生産物を提供する。これらのダイズ植物、ダイズ植物細胞、ダイズ種子、ダイズ植物部分、ダイズ子孫植物、ダイズ油、ダイズワイン、豆乳、ダイズタンパク質、及びダイズ商品生産物は、本発明の検出可能な量のポリヌクレオチド、即ち、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17、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、配列番号25、または配列番号26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。本発明のダイズ植物、植物細胞、種子、植物部分、及び子孫植物はまた、1つまたは複数の追加的な導入遺伝子を含有してもよい。このような追加的導入遺伝子は、向上した虫害抵抗性、向上した水利用効率、向上した収量性、向上した耐乾性、向上した種子品質、改善した栄養価、及び/または向上した除草剤耐性を含め、しかしそれらに限定されない望ましい形質を与えるタンパク質またはRNA分子をコードするいずれのヌクレオチド配列でもよく、尚、それらの望ましい形質は、このような追加的導入遺伝子を欠くダイズ植物と比較して評価された場合のものである。

30

40

【0089】

本発明は、イベントMON87751 DNAを含有するトランスジェニックダイズ植物に由来するダイズ植物、ダイズ植物細胞、ダイズ種子、ダイズ植物部分（花粉、胚珠、さや、花組織、根組織、茎組織、及び葉組織など）、ダイズ子孫植物を提供する。イベントMON87751 DNAを含有するダイズ種子の代表試料が、ブダペスト条約に従って、米国培養細胞系統保存機関（ATCC（登録商標））に寄託されている。ATCC貯蔵所は、イベントMON87751 DNAを含有する種子に特許寄託番号PTA-12

50

0166を割り当てている。

【0090】

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17、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、配列番号25、及び配列番号26より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子の存在をゲノムに含む微生物を提供する。このような微生物の例としては、トランスジェニック植物細胞が挙げられる。本発明の植物細胞のような微生物は、(i)科学的調査または産業研究のための研究用手段としての使用；(ii)後続科学研究のため、あるいは産業生産物として用いることのできる、内在性もしくは組換えの炭水化物、脂質、核酸、またはタンパク質の生成物もしくは小分子を生成するための培養物における使用；及び(iii)後に農業における研究または生産に用いることの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成するための、近代的な植物組織培養技術との併用、を含み、しかしそれらに限定されない多くの産業用途において有用である。トランスジェニック植物細胞のような微生物の作成と使用においては、近代的な微生物学的技術及び人的介入を利用して、人造のユニークな微生物を作成する。この方法では、組換えDNAが植物細胞のゲノムの中に挿入され、天然の植物細胞とは別個でユニークなトランスジェニック植物細胞を作成する。このトランスジェニック植物細胞は、次いで近代的な微生物学的技術を用いて、細菌及び酵母菌細胞とほぼ同様に培養することができ、未分化の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規遺伝子組成物及び表現型は、異種性DNAを細胞のゲノムの中に組み込むことによって創出された技術的効果である。本発明の他の態様は、本発明の微生物を用いる方法である。トランスジェニック植物細胞など、本発明の微生物を用いる方法は、(i)組換えDNAを細胞のゲノムの中に組み込み、次いで、この細胞を用いて、同じ異種性DNAを保有する追加的細胞を誘導することによって、トランスジェニック細胞を生成する方法と；(ii)組換えDNAを含有する細胞を、近代的な微生物学的技術を用いて培養する方法と；(iii)培養された細胞から、内在性もしくは組換えの炭水化物、脂質、核酸、またはタンパク質の生成物を生成し精製する方法と；(iv)近代的植物組織培養技術をトランスジェニック植物細胞と併用し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を生成する方法と、を含む。

【0091】

本発明の植物は、ダイズイベントMON87751の中に挿入された導入遺伝子を含め、イベントMON87751 DNAを子孫に伝えることができる。本明細書で使用する「子孫」は、祖先植物に由来するイベントMON87751 DNA、及び/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17、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、配列番号25、及び配列番号26から成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、を含むいかなる植物、種子、植物細胞、及び/または再生可能な植物部分をも含む。植物、子孫、及び種子は、導入遺伝子がホモ接合でもヘテロ接合でもよい。子孫は、ダイズイベントMON87751を含有する植物によって作った種子、及び/またはダイズイベントMON87751を含有する植物の花粉で受精させた植物によって作った種子より育成することができる。

【0092】

子孫植物は、自家受粉(「自家受粉(selfing)」ともいう)させて、純粋種系統の植物、即ち、導入遺伝子がホモ接合の植物を生じさせることができる。適切な子孫の自家授粉は、付加された外来遺伝子の両方がホモ接合である植物を生じさせることができる。

【0093】

あるいは、子孫植物は、異系交配して、例えば、無関係な別の植物と交配して、変種ま

10

20

30

40

50

たはハイブリッドの種子または植物を生じさせることができる。その無関係な別の植物はトランスジェニックのもので非トランスジェニックのものでよい。このようにして、本発明の変種またはハイブリッドの種子または植物は、ダイズイベントMON87751の特異的でユニークなDNAを欠く第1の親と、ダイズイベントMON87751を含む第2の親とを性的に交配することによって誘導することができ、ダイズイベントMON87751の特異的でユニークなDNAを含むハイブリッドにすることができる。各親は、交配または育種が、本発明の植物または種子、即ち、ダイズイベントMON87751のDNA及び/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17、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、配列番号25、及び配列番号26より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子、を含有する少なくとも1つのアレルを有する種子を生じさせる限り、ハイブリッドまたは近交系/変種であり得る。このようにして、2つの異なるトランスジェニック植物を交配して、2つの互いに独立して分離している付加された外来遺伝子を含有するハイブリッド子孫を作製することができる。例えば、二重作用様式虫害抵抗性をダイズに与えるCry2Ab及びCry1A.105を含有するMON87751を別のトランスジェニックダイズ植物と交配して、両方のトランスジェニック親の特性を有する植物を生じさせることができる。これの一例として考えられるのは、二重作用様式虫害抵抗性をダイズに与えるCry2Ab及びCry1A.105を含有するMON87751と、除草剤耐性（例えば、ダイズイベントMON89788またはダイズイベントMON87708）及び/または昆虫制御（例えば、ダイズイベントMON88701）など、1つまたは複数の追加的形質を有する植物との交配種であり、鱗翅目害虫に対する二重作用様式抵抗性を有し、少なくとも1つまたは複数の追加的形質を有する子孫植物または種子を生じさせるものである。親植物への戻し交配、及び非トランスジェニック植物との異系交配もまた、栄養繁殖と同様に、企図される。異なる形質及び作物に一般的に用いられる他の育種方法に関する記載が、いくつかの参考文献のひとつ、例えば、Fehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987)に見出せる。

【0094】

本発明は、イベントMON87751を含むダイズ植物に由来する植物部分を提供する。本明細書で使用される「植物部分」とは、イベントMON87751を含むダイズ植物に由来する材料から成る植物のいずれの部分をも指す。植物部分としては、花粉、胚珠、さや、花、根組織または茎組織、繊維、及び葉が挙げられ、但しそれらに限定されない。植物部分は、成育可能、生育不能、再生可能、及び/または再生不能であってもよい。

【0095】

本発明は、イベントMON87751を含むダイズ植物に由来し、イベントMON87751に特異的な核酸を検出可能な量含有する商品生産物を提供する。本明細書で使用される「商品生産物」とは、ダイズイベントMON87751 DNAを含有するダイズ植物、全粒または加工ダイズ種子、1つまたは複数の植物細胞及び/または植物部分に由来する材料から成るいずれの組成物または生成物をも指す。商品生産物は、消費者に販売してもよく、成育可能でも生育不能でもよい。生育不能商品生産物としては、生育不能種子；全粒または加工種子、種子部分、及び植物部分；ダイズ油、ダイズタンパク質、ダイズミール、ダイズ粉、ダイズフレーク、ダイズ糠、豆乳、ダイズチーズ、ダイズワイン、ダイズ含有動物餌、ダイズ含有紙、ダイズ含有クリーム、ダイズバイオマス、並びにダイズ植物及びダイズ植物部分を用いて製造された燃料生産物が挙げられ、但しそれらに限定されない。成育可能商品生産物としては、種子、植物、及び植物細胞が挙げられ、但しそれらに限定されない。イベントMON87751を含むダイズ植物は、このようにして、ダイズから典型的に得られるいずれの商品生産物をも生産するのに用いることができる。イベントMON87751を含むダイズ植物に由来するいずれのこのような商品生産物も、

10

20

30

40

50

ダイズイベントMON87751に対応する特異的でユニークなDNAを少なくとも検出可能な量含有してもよく、特に、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17、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、配列番号25、及び配列番号26より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子を含む検出可能な量のポリヌクレオチドを含有してもよい。本明細書に開示される検出方法を含め、ヌクレオチド分子を検出するいずれの標準的な方法を用いてもよい。商品生産物は、その商品生産物の中に、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17、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、配列番号25、及び配列番号26より選択される少なくとも1つの配列を有する、検出可能な量のDNA分子があれば、本発明の範囲に入る。

10

【0096】

したがって、本発明の植物、子孫、種子、植物細胞、植物部分（花粉、胚珠、さや、花、根組織または茎組織、及び葉など）、ならびに商品生産物は、とりわけ、農業目的にダイズイベントMON87751を含む種子及び/または植物部分を生産する目的で植物を育成すること、植物の育種及び研究を目的にダイズイベントMON87751を含む子孫を生産すること、工業用途及び研究用途に微生物学的技術と併用すること、及び消費者に販売することに有用である。

20

【0097】

本発明のイベントMON87751に特異的でユニークなDNA配列を含む耐昆虫性のダイズ植物を生産する方法が提供される。これらの方法で用いるトランスジェニック植物は、導入遺伝子がホモ接合またはヘテロ接合でもよい。これらの方法によって生産される子孫植物は、変種植物でもハイブリッド植物でもよく；ダイズイベントMON87751を含有する植物によって生産した種子及び/またはダイズイベントMON87751を含有する植物の花粉で受精させた植物によって生産した種子から育成してもよく；導入遺伝子がホモ接合でもヘテロ接合でもよい。子孫植物は、引き続き自家受粉させて、純粋種系統の植物、即ち、導入遺伝子がホモ接合の植物を生じさせることができ、あるいは、異系交配して、例えば、無関係な別の植物と交配して、変種またはハイブリッドの種子または植物を生じさせることができる。

30

【0098】

ダイズイベントMON87751を含むダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子、またはダイズ植物に由来するDNAの存在を試料中に検出する方法が提供される。一方法は、(i)少なくとも1つのダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子、またはダイズ植物からDNA試料を抽出すること、(ii)DNA配列決定に適切な条件下で、上記DNA試料と、イベントMON87751 DNAに特異的なDNA配列を生成することのできる少なくとも1つのプライマーとを接触させること、(iii)DNA配列決定反応を行うこと、次に、(iv)そのヌクレオチド配列が、イベントMON87751に特異的なヌクレオチド配列、またはそこに含まれる、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17、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、配列番号25、及び配列番号26から成る群より選択される1つなど、構築物を含むことを確認すること、から成る。別の一方法は、(i)少なくとも1つのダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子、またはダイズ植物からDNA試料を抽出すること、(ii)DNA増幅に適切な条件下で、そのDNA試料と、イベントMON87751 DNAからアンプリコンを生成することのできるプライマー対とを接触させること、(iii)DNA増幅反応を行うこと、及び次に、(iv)アンプリコン分子を検出すること、及び/または、そのアンプリコンのヌクレオチド配列が、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、及び配列番号6から成る群より選択され

40

50

る1つなど、イベントMON87751に特異的なヌクレオチド配列を含むことを確認すること、から成る。アンプリコンは、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を含むアンプリコンなど、イベントMON87751に特異的なものとなる。アンプリコン中におけるイベントMON87751に特異的なヌクレオチド配列の検出は、試料中におけるダイズイベントMON87751特異的DNAの存在の決定及び/または診断となる。DNA増幅に適切な条件下でイベントMON87751 DNAからアンプリコンを生成することのできるプライマー対の例は、配列番号11及び配列番号12として提供される。他のプライマー対は、当業者が容易に設計することができ、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を含むアンプリコンを生成すると考えられ、このようなプライマー対は、挿入断片に隣接するゲノム領域の中の少なくとも1つのプライマー、及び挿入断片の中の第2のプライマーを含む。ダイズイベントMON87751を含むダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子、またはダイズ植物に由来するDNAの存在を試料中に検出する他の一方法は、(i)少なくとも1つのダイズ細胞、ダイズ組織、ダイズ種子、またはダイズ植物からDNA試料を抽出すること、(ii)そのDNA試料と、イベントMON87751 DNAに特異的なDNAプローブとを接触させること、(iii)そのプローブ及びDNA試料がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズできるようにすること、次に、(iv)プローブとターゲットDNA試料との間にハイブリダイゼーションを検出すること、から成る。イベントMON87751 DNAに特異的なDNAプローブの配列の一例が配列番号13または配列番号16として提供される。他のプローブも、当業者は容易に設計することができ、挿入断片に隣接するゲノミックDNAの少なくとも1つの断片と、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、及び配列番号10において提供され、但しそれらに限定されない配列など、少なくとも1断片の挿入断片DNAと、を含むものとなる。DNA試料とのプローブハイブリダイゼーションを検出することは、試料中におけるダイズイベントMON87751特異的DNAが存在する診断となる。あるいはまた、ハイブリダイゼーションの不在は、試料中におけるダイズイベントMON87751特異的DNAが存在しない診断となる。

【0099】

試料中のダイズイベントMON87751 DNAの同定に有用であり、また、適切なイベントDNAを含有するダイズ植物を育種する方法にも適用することができる、DNA検出キットが提供される。このようなキットは、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17、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、配列番号25、及び配列番号26の断片を含むDNAプライマー及び/またはプローブを含有する。このようなキットの一例は、イベントMON87751を含むトランスジェニックダイズ植物に由来するDNAの存在及び/または不在を試料中に検出するのに有用なDNAプローブとして機能するのに十分な長さの、配列番号10中の連続ヌクレオチドの少なくとも1つのDNA分子を含む。イベントMON87751を含むトランスジェニックダイズ植物に由来する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17、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、配列番号25、及び配列番号26より選択される少なくとも1つの配列を有するDNA分子を含むと考えられる。試料中におけるダイズイベントMON87751 DNAの存在及び/または不在を決定、検出、または診断するために有用なDNAプローブが提供される通りに用いられるのに十分なDNA分子が配列番号13として提供される。他のプローブも、当業者によって容易に設計することができ、配列番号10の少なくとも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

10

20

30

40

50

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の連続ヌクレオチドを含むものとなり、イベントに由来するDNAを同定するために、ダイズイベントMON87751 DNAに十分ユニークなものとなる。また別の種類のキットは、トランスジェニックダイズイベントMON87751に由来するDNAの存在及び/または不在を試料中に検出するのに有用なアンプリコンを生成するために有用なプライマー対を含む。このようなキットは、ターゲットDNA試料と、本明細書に記載のプライマー対とを接触させることと、次いで、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17、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、配列番号25、及び配列番号26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生成するのに十分な核酸増幅反応を行うことと、次いで、アンプリコンの存在及び/または不在を検出すること、を含む方法を用いることになる。このような方法はまた、ターゲットDNA試料中におけるダイズイベントMON87751特異的DNAの存在の決定、即ち診断となると考えられるアンプリコンまたはその断片の配列決定を含んでもよい。他のプライマー対は、当業者が容易に設計することができ、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17、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、配列番号25、及び配列番号26で提供され、但しそれらに限定されない配列の、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、または少なくとも30の連続ヌクレオチドを含むべきものであり、イベントに由来するDNAを同定するために、ダイズイベントMON87751 DNAに十分ユニークであるべきものである。

【0100】

本発明のキット及び検出方法は、とりわけ、ダイズイベントMON87751を同定すること、ダイズイベントMON87751を含む植物の異種またはハイブリッドを選定すること、イベントMON87751を含むトランスジェニックダイズ植物に由来するDNAの存在を試料中に検出すること、及びイベントMON87751を含むダイズ植物またはイベントMON87751を含むダイズ植物に由来する植物部分の存在及び/または不在について試料を調べることに有用である。

【0101】

ダイズイベントMON87751に由来する異種性DNA挿入断片、結合配列、またはランキング配列の配列は、本明細書で提供される配列に由来するプライマーを用いてイベント由来のこのような配列を増幅することと、それに続くアンプリコンまたはクローン化DNAの標準的なDNA配列決定をすることによって検証する（そして必要な場合、修正する）ことができる。

【0102】

本発明の所定の好適な実施形態の例を実証するために、下の実施例が含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施においてよく機能することを発明者らが見出した方法を表し、従って、その実施のための好適な形態の例を構成すると考えることができる、ということが当業者には理解される。しかしながら、当業者は、開示される具体的な実施形態には多くの変更を行うことができ、本発明の精神と範囲から逸脱することなく同様または類似の結果をなお得ることができる、ということの本開示に照らして理解する。

【0103】

寄託情報

イベントMON87751 DNAを含有するダイズ(Glycine max)種子

の代表試料は、ブダペスト条約に従って、2013年2月28日に、米国、郵便番号20110、バージニア州マナッサス、ユニバーシティ・ブールバード10801に住所を有する米国培養細胞系統保存機関(ATCC)に寄託され、ATCC受託番号PTA-120166を割り当てられている。本願の係属中、特許商標庁長官及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のうちいずれか長いほうの期間、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。

【0104】

実施例1

本実施例はダイズイベントMON87751の形質転換と選択について記載する。植物における外来遺伝子の発現は、クロマチン構築物(例えば、異質染色質)または組込み部位(Weising, 1988)に近い転写制御要素の近接(例えば、エンハンサ)によって、それらの染色体位置により影響を受けることで知られる。その為、目的の導入遺伝子の最適な発現により特徴付けられるイベントを識別するために、多数のイベントをスクリーニングする必要がしばしばある。例えば、イベントの間の導入遺伝子の発現のレベルにおいて広範な変動が存在し得ることが、植物及び他の生物において観察された。発現の空間的または時間的なパターンにおける差異、例えば、導入遺伝子構築物に存在する転写制御要素から予想されるパターンに対応しないかもしれない、様々な植物組織における導入遺伝子の相対的発現における差異もまた存在し得る。これらの理由のために、11の異なる発現ベクターをイベントMON87751の選択の間に形質転換されたダイズにおいて生成し、試験した。

【0105】

11の異なる発現構築物を植物において形質転換し、試験した。個々の発現構築物発現要素の使用の組み合わせにより異なっており、すなわち、エンハンサ(E)、プロモータ(P)、リーダー(L)、イントロン(I)、クロロプラストターゲティングペプチド(CTP)、及び3'転写終了及びポリアデニル化シグナル(T)である。また、T-DNAセグメントは両方のCryタンパク質(Cry2Ab及びCry1A.105)をエンコードする2つの発現カセットを含有したが、または単一のCryタンパク質をエンコードする1つの発現カセットをエンコードする1つの発現カセット、すなわち、Cry2AbまたはCry1A.105を含有した。Cry2Ab及びCry1A.105発現カセットの両方を含有するT-DNAセグメントを伴う発現構築物では更に、Cryタンパク質をエンコードする2つのカセットの相対的な配向が異なっていた。具体的に、2つのCryタンパク質発現カセットは、各Cryタンパクの各プロモータからの発現が同じ方向で進むがそれぞれは別々の各プロモータからであるように、転写の相対的縦方向に並んだ配向で配置されていたか(図2を参照されたい)、または2つのCryタンパク質発現カセットは、逆の配向のいずれかであったため、2つのCryタンパク質の各プロモータからの発現が、2つのプロモータ間の中心点から離れるようになる、すなわち、各Cryタンパク質発現カセットの転写は、逆方向で進み、かつ、収束しないようになる(図2を参照されたい)。Cry1A.105をコードするDNA配列は、構築物1及び3と比較して、構築物4、6、7、8、及び9中に多様化される配列であった。さらなるパリエーションでは、転写と逆の配向に指向される、2つのCry発現カセットを有する構築物の2つにおいて、転写エンハンサは、発散プロモータの間に配置された(図2を参照)。

【0106】

11の発現構築物をダイズ分裂組織のアグロバクテリウム媒介形質転換により3回に分けて形質転換した。この方法はU.S. Patent No. 8,030,544に記載されたが、カルスを利用することなく、形質転換植物の生成を可能にする。簡潔に言うと、分裂組織を発芽したA3555ダイズ種子(Asgrow, St Louis, MO)の胚から切り出した。構築物1は2つの別々のT-DNAセグメントを含み、各々が

10

20

30

40

50

アグロバクテリウム境界配列 (T-DNA セグメント) に挟まれている。形質転換構築物の第1のT-DNAセグメントセグメントは *Escherichia coli* (スペクチノマイシン及びストレプトマイシン抵抗性を与える; *aadA-SPR*) からの Tn7 アデニルトランスフェラーゼ遺伝子の領域をエンコードし、選択のために使用した第1発現カセット; 及びアグロバクテリウム・ツメファシエンズ鎖 C58 (スクロース及びフルクトース及びグルコース-1-リン酸への変換を触媒する; *STR+OriRI*) からのスクロースホスホリラーゼ遺伝子の領域の領域をエンコードし、スコア化可能マーカーとして使用した第2発現カセットの2つの発現カセットを含んだ。異なる形質転換構築物の第2T-DNAセグメントは、1つの *Cry2Ab* (構築物2、5、10または11) のみをエンコードする発現カセットもしくは *Cry1A.105* (構築物3または6) のみをエンコードする発現カセットのいずれか; または *Cry1A.105* (構築物1、4、7、8、または9) (図2に示される) をエンコードする *Cry2Ab* 及び1つの発現カセットをエンコードする1つの発現カセットを含む異なる形質転換構築物の第2T-DNAセグメントを含んだ。形質転換構築物の各T-DNAセグメントは別々のアグロバクテリウム境界配列により制限されるので、選択及びスコア化可能マーカーカセットを含むT-DNAセグメントは *Cry2Ab* 及び/または *Cry1A.105* 発現カセットをエンコードするT-DNAセグメントの組み込み部位と異なる部位のダイズ細胞ゲノムに組み込まれ得る。したがって、イベントを分離及び選択の損失及びスコア化可能マーカー配列についてスクリーニングすることができる。全てのイベントをバックボーンの不在及び選択/スコア化可能マーカーカセット配列の不在について選択した。形質転換構築物を運ぶアグロバクテリウムで共培養した後、分裂組織スペクチノマイシン、カルベニシリン2ナトリウム塩、セフォタキシムナトリウム塩、及びチカルシリン2ナトリウム塩/クラブラン酸カリウム混合物を含有する選択培地に置き、非形質転換植物細胞及び過剰なアグロバクテリウムの増殖を阻害した。次いで分裂組織を、発達を放ち定着させるのを促す媒体に置いた。正常表現型特性を伴う根付き植物 (R0) を選択し、成長及びさらなる評価のために土壤に移動した。

【0107】

イベント MON87751 を生成するために使用される発現構築物1は、植物発現要素の5'から3'相対順序において2つの異なる *Cry* タンパク質をエンコードするT-DNAセグメントを含有した (介在配列を有するまたは有さない): プロモータ、リーダー及びシロイヌナズナアクチン2遺伝子 (*P-At.Act2*) 由来の第1イントロン、植物発現のために修飾されたヌクレオチド (*CTP2-Cry2Ab*) を伴う *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) からの *Cry2Ab* をエンコードする遺伝子 (虫害抵抗性を付与するタンパク質をコードする) への構造の中で融合されたシロイヌナズナ5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (*EPSPS*) 遺伝子由来の配列をコードするN-末端葉緑体トランジットペプチドから成るキメラコード配列、イネメタロチオネイン-様タンパク質遺伝子 (*T.OsMth*) 由来の3'転写終了及びポリアデニル化要素 (3'UTR)、第1 *Cry* タンパク質発現カセット及び第2 *Cry* タンパク質発現カセットの間の介在配列; シロイヌナズナリブローズ1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ小サブユニット1A遺伝子 (*P-At.RbcS4*) 由来のプロモータ-リーダー、このプロモータ-リーダーはトランジットペプチド切断部位の反復をエンコードするコード配列及び *Cry1A.105* をエンコードする遺伝子 (虫害抵抗性を付与するタンパク質をコードする) を有する構造中で融合される成熟タンパク質からの3アミノ酸も含むシロイヌナズナリブローズ1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ小サブユニット1Aタンパク質遺伝子 (*CTP1*) 由来の配列をコードする葉緑体トランジットペプチドから成るキメラコード配列に結合し、植物発現について修飾したヌクレオチドを伴う *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) からの *Cry1Ab1* (ドメインI&II)、*Cry1Fa1* (ドメインIII)、及び *Cry1Ac1* (プロトキシンドメイン) をエンコードする遺伝子のセグメントから成り、タルウマゴヤシリン酸輸送体1遺伝子由来の3'UTR (*T-Mt.Pt1*) である。構築物1発現カセット

において、2つの別々のCry2Ab及びCry1A.105発現カセットを含有するT-DNAカセットは、Cry2Abカセットへの5'である任意に表された5'末端上のアグロバクテリウムライトボーダー；Cry1A.105カセットへの3'である任意に表された3'末端上のアグロバクテリウムレフトボーダーを有する。Cry2Abカセット(ターミネータを経たプロモータ)は配列番号：9中の位置123~3785に位置し、Cry1A.105カセット(ターミネータを経たプロモータ)は配列番号：9中の位置3831~9754に位置する。

【0108】

構築物2(Cry2Ab)及び構築物3(Cry1A.105)についてのT-DNAカセットは構築物1で使用された遺伝子をエンコードする、それぞれのCryタンパク質について同じ要素を有するカセットをエンコードする単一Cryタンパク質を含む、図2を参照されたい。

10

【0109】

構築物4、5及び6はそれぞれ、構成する要素の向きにおいて構築物1、2、及び3と同一であったが、Cry2Ab及びCry1A.105カセットの両方について、プロモータ-リーダー-イントロン及び葉緑体トランジットペプチドは異なった。対応するCryタンパク質カセット(T-Os.Mthを伴うCry2Ab、またはT-Mt.Pt1を伴うCry1A.105)についてのターミネータは発現構築物1から11の全てにおいて同一であった(図2を参照されたい)。

【0110】

プロモータリーダー-イントロン及び葉緑体トランジットペプチド、配列をエンコードするCryタンパク質及び構築物7~11のそれぞれにおけるCry2Ab及びCry1A.105カセットの両方に用いたターミネータは、構築物4、5、及び6において用いられたそれらと同一であった。しかしながら、構築物7、8、及び9について、Cry2Abカセット及びCry1A.105カセットの向きを反転または互いに対して逆転させ、転写の向きは各々それぞれのプロモータから反対方向であった、図2を参照されたい。構築物7、8、及び9は2つのカセットの間のエンハンサの不在(構築物7)、またはエンハンサの存在において異なった；エンハンサ1(E1)を有する構築物8、またはエンハンサ2(E2)を有する構築物9、図2を参照されたい。構築物10及び構築物11はE1(構築物10)またはE2(構築物11)のいずれかを有する単一Cry2Abカセットであった。

20

30

【0111】

形質転換及び土壌への(R0)イベントへの転写に続き、大規模な分子、農学的、及び表現型解析をさらなる試験についてイベントを選択するために行った。加えて、イベントは自家受粉であり、選択したイベントから得られた種をフィールド及び分子検査のために使用した。

【0112】

分子検査には以下が含まれる：コピー数を決定するためのアッセイ、両方の発現カセット(構築物1、4、7、8、及び9)を含むCryタンパク質の完全性、Cryタンパク質の存在をエンコードするT-DNAカセット(単一Cryタンパク質発現カセット(構築物2、3、6、10、または11)または2つのCryタンパク質発現カセット(構築物1、4、7、8、または9))の存在を決定するためのアッセイ；ELISAにより測定されるタンパク質発現を決定するためのアッセイ、及びT-DNA発現カセットの分離比(1:2:1または1:3)を決定するためのアッセイ。農学的アッセイは(構築物1、2、及び3から生成されるR0イベントのための、2つの害虫種(Anticarsia gemmatalis (velvetbean caterpillar, VBC)及びChrysodeixis includens (soybean looper, SBL))についてのリーフディスクバイオアッセイによる昆虫有効性)を含む。R0植物は成熟に成長し、イベントは自家受粉であり、各イベントについてセットした種を決定した。

40

50

【 0 1 1 3 】

11の個々の構築物を伴う形質転換により生成され、有効な土壤に移動され、420イベントから5000イベントを超える範囲であった、R0イベントの数(表1を参照されたい)。イベントMON87751が生成された構築物1を伴う形質転換について、土壤に根ざす合計1102のR0植物があり、これらから、281のイベントのみが最初の分子解析を通過した。構築物1を伴う転換により生成されたこれらの281のイベントの追加の分子、農学的、及び表現型解析は、追加の温室解析のために評価された29のR1イベントのみに帰着した。

表1. 土壤に移動されたイベント数を示す11の形質転換構築物から生成されるR0イベント及びコピー数アッセイを通過したイベント数.

【表1】

構築物	# 土壤へのイベント	#コピー数アッセイを通過したイベント
構築物1	1102	281
構築物2	420	150
構築物3	420	107
構築物4	5544	209
構築物5	579	24
構築物6	588	32
構築物7	630	33
構築物8	1260	47
構築物9	1260	51
構築物10	504	12
構築物11	504	18

【 0 1 1 4 】

構築物1を伴う形質転換から生成され、さらなる解析のために評価される29のR1イベントについて、R1種子を、以下のアッセイを伴うR1イベントの解析のために温室に植えた:(a)R1発芽(100%発芽);(b)ホモ接合植物の同定;(c)ホモ接合植物がもはや選択/スコア化可能マーカー配列を含有しないことを確認するPCR解析(それは独立して分離した);(d)C.includens(SBL)についてのリーフディスクバイオアッセイにより決定されるような昆虫有効性;及び(e)Spodoptera frugiperda(ツマジロクサヨトウ、FAW)についてのリーフディスクバイオアッセイにより決定されるような昆虫有効性、(f)、4ppmを超えるCry2Ab及びCry1A.105タンパク質レベルを伴うイベントを前進させる、V7ステージ葉組織におけるELISA解析によるタンパク質発現。分子解析及び昆虫リーフディスクバイオアッセイの結果に加え、4つの選択/イベントからセットされた農学的表現型の観察及びシードを収集した。これらのデータの合計に基づき、構築物1を伴う形質転換により生成された21のR1イベントからのR2種子を農学野外試験及び有効性スクリーンハウス試験において評価した。

【 0 1 1 5 】

実施例2

農学野外試験を対照、A3555(親の背景)と比較されたCry2Ab及びCry1A.105を発現するダイズイベントの表現型特性及び収率を評価するようにデザインした。これらの農学野外試験において、対照及びイベントはダイズ品種A3555のものであり、相対的な成熟群3(RM3)を伴った。試験を四季及び2つの地理的位置で、完全乱塊法(RCBD)下で植えた。第1の地理的位置において、農学野外試験を各季節にお

いて25の現場で行い、第2の地理的位置において農学野外試験を各季節において14の現場で行った。標準的な農業的慣行は、全ての試験のための植栽やデータ収集に続いた。収集されたデータは出現の評価、苗の活力、開花日、花の色の観察、表現型の観察、軟毛の色、成熟、倒伏、植物の高さ、粉碎スコア、収穫日、種子重量/プロット、種子水分/プロット、及びエーカーあたりのブッシェル (b u / a c) で得られる収率を含む。

【0116】

データ解析について、いくつかの位置は収穫前の品質問題 (すなわち、溜り水、不適切な土壌水分、貧弱な出現、降雹による季節の後半のポッド粉碎) のために削除され、またはいくつかの位置は15%を超える変動係数 (C V) 及び/または高い位置品質指標 (L Q I) のために削除された。

10

【0117】

試験した全ての位置にわたり、取られた表現型手段は、イベントについての農学的格付けは対照、A3555の正常な範囲内であったことを示した。全ての観測が全ての位置で取られたわけではなく、いくつかのデータは、例えば出現のために収集された可能性があるが、早期表現型データの収集後に起こった問題のために位置が削除されたので、収率は決定されなかった。

【0118】

農学野外試験について、構築物1、2、3、4、5、または6により生成され、各野外試験で試験されたイベントの数及び試験されたダイズイベント (つまり、R3、R4、R5、R6、またはR7) の生成を表2に示す。

20

表2 . 農学野外試験の2つの季節及び2つの地理的位置の間の構築物について試験したイベント数 (及びダイズイベント生成) (n . t . は試験しなかったことを意味する) 。

【表2】

	季節1/位置 2	季節1/位置 1	季節2/位置 2	季節2/位置 1
構築物1	12 (R3)	10 (R3)	3 (R6)	3 (R7)
構築物2	2 (R3)	2 (R3)	1 (R4)	1 (R5)
構築物3	3 (R3)	3 (R3)	1 (R4)	1 (R5)
構築物4	n . t .	9 (R3)	n . t .	n . t .
構築物5	n . t .	3 (R3)	n . t .	n . t .
構築物6	n . t .	3 (R3)	n . t .	n . t .

30

【0119】

各季節、各地理的位置、及び平均収率 (b u / エーカー) を試験する各野外試験にわたり試験したイベントについての農学野外試験のメタアナリシス試験は、対照A3555 (表2) と比較したイベントMON87751についての収率において統計的に有意な増加があったことを示した。Cry2Abのみを発現するイベントには対照A3555と比較した収率において、有意な差はなかった、表3を参照されたい。Cry1A . 105のみを発現するイベントには対照A3555と比較した収率において、有意な減少があった、表3を参照されたい。

40

表3 . 非トランスジェニックダイズ系統A3555と比較した場合の、各季節、各地理的位置、及び収率を試験する各野外試験にわたり試験したイベントについての農学野外試験のメタアナリシス。

【表 3】

構築物	GOI	イベント	平均収率 (bu/エーカー)	デルタ	PER C	P_値	LSD 05	LSD 10
構築物 1	Cry 2 Ab + Cry 1 A. 10 5	MON 877 51	68.16	1.8 3	2.7 6	0.0 0	1.1 7	0.9 8
		8	64.88	-1. 45	-2. 19	0.0 2	1.1 7	0.9 8
		10	66.59	0.2 6	0.3 9	0.6 6	1.1 7	0.9 8
構築物 2	Cry 2 Ab	20	67.39	1.0 6	1.6 0	0.0 8	1.1 7	0.9 8
構築物 3	Cry 1 A. 10 5	29	64.06	-2. 27	-3. 42	0.0 0	1.1 7	0.9 8
		A35 55	66.33					

10

20

【0120】

実施例 3

2つの発現カセット(すなわち、Cry 2 Ab及びCry 1 A. 105の両方)を伴う単一構築物からのT-DNAセグメントの挿入からの両方のCryタンパク質またはスクリーンハウスエンクロージャに含有される鱗翅目害虫個体群の人工感染に対する単一Cryタンパク質(すなわち、Cry 2 Abのみ、またはCry 1 A. 105のみ)を発現する実験的ダイズイベントの有効性を評価するために、有効性スクリーンハウス試験を行った。単一遺伝子と二重遺伝子イベントとの比較を、二重遺伝子発現構築物イベントにおいて観察される有効性に対する各単一Cryタンパク質の相対的寄与を決定するために用いた。スクリーンハウス試験を2つの地理的位置において複数の季節に行った。第1の地理的位置において、5つの対象害虫種を試験した: *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar, VBC), *Chrysodeixis includens* (soybean looper, SBL), *Spodoptera eridania* (southern armyworm, SAW), *Spodoptera eridania* (fall armyworm, FAW)、及び*Helicoverpa zea* (soybean podworm, SPW)。第2の地理的位置において、3つの対象害虫種を試験した: *Crocidosema aporema* (bean shoot moth, BSM), *Rachiplusia nu* (sunflower looper, SFL)、及び*Spodoptera frugiperda* (fall armyworm, FAW)。

30

40

【0121】

これらのスクリーンハウス試験において試験したイベント(すなわち、エントリー)は、別々の形質転換構築物の各々を伴う形質転換から生成された。構築物1、2、または3から生成される形質転換イベントをスクリーンハウス試験においてR2世代において評価し、両方のタンパク質(構築物1を用いた形質転換から生成されたイベント)を発現する20のイベント、Cry 2 Abのみを発現する6のイベント(構築物2を用いた形質転換から生成されたイベント)、及びCry 1 A. 105のみを発現する6のイベント(構築物3を用いた形質転換から生成されたイベント)を含んでいた。これらのうち、Cry 2

50

Ab及びCry1A.105(構築物1)の両方を伴う12のイベント、Cry2Abのみ(構築物2)を伴う2のイベント、及びCry1A.105のみ(構築物3)を伴う3のイベントをスクリーンハウス試験でR3世代において評価した。Cry2Ab及びCry1A.105(構築物1)の両方を伴う11のイベントをさらにR4世代スクリーンハウス試験で評価した。Cry2Ab及びCry1A.105(構築物1)の両方を伴う3つのイベント、Cry2Abのみ(構築物2)を伴う1つのイベント、及びCry1A.105のみ(構築物3)を伴う1つのイベントをR5、R6、及びR7スクリーンハウス試験で評価した。Cry2Ab及びCry1A.105(構築物4を用いた形質転換から生成されたイベント)を発現する10のイベント、Cry2Ab-のみの3つのイベント(構築物5を用いた形質転換から生成されたイベント)、及びCry1A.105のみの3つのイベント(構築物6を用いた形質転換から生成されたイベント)をスクリーンハウス試験へのR3世代において評価した。Cry2Ab及びCry1A.105の両方を伴う2つのイベント、Cry2Abのみの1つのイベント、及びCry1A.105のみの1つのイベントをR4スクリーンハウス試験で評価し、1イベント毎をR5スクリーンハウス試験で評価した。エンハンサを伴う反対の5'から3'の向きにおけるCry2Ab及びCry1A.105の両方を発現する3つのイベント(構築物8を用いた形質転換から生成されたイベント)、エンハンサを伴わない反対の5'から3'の向きにおけるCry2Ab及びCry1A.105の両方を発現する3つのスタック化イベント(構築物7を用いた形質転換から生成されたイベント)、及び2つのCry2Abのみのイベント(構築物10を用いた形質転換から生成されたイベント)をR2世代において評価し、スクリーンハウス試験で評価した。ポジティブトランスジェニックダイズ対照はMON87701またはイベントGM_A19478(MON87701と同時に生成)、及び両方を発現するCry1Acを含む。非トランスジェニックダイズ系統A3555(イベントについての親の背景、相対的に成熟な3(RM3))及びA5547(MON87701及びGM_A19478についての親の背景、RM5)は、ネガティブ対照として全てのスクリーンハウス及び野外試験に含まれた。非トランスジェニックダイズ系統AG3705はいくつかの試験において、白い花のチェックとして含まれていた。

【0122】

露地有効性試験を設定し実施した後、スクリーンハウス試験を実施した。プロットをネガティブチェックへの最大の損傷時の寄生後に1度評価した(通常、蛹後3~4週間はスクリーンハウス内に置いた)。各評価で、以下の農学的観察を記録した:植物の成長の日付及びステージ。加えて、昆虫を落葉させるために、各プロットにおける落葉推定%を記録した。C.aporemaについて、10の植物を無作為に各プロットに選択し、損傷のある植物の数を記録した。場合によっては生きた幼虫の数も記録した。

【0123】

落葉データを、ANOVAに付し、系統及び複製間の、各位置の各昆虫に関する、0.05の確立水準(P)での変動の有意な源を決定した。チューキー-クレーマー試験(クレーマー1956)をP=0.05で用い、平均間の有意差を決定した。

【0124】

寄生のためのR.nu及びC.aporemaを使用し、1つの季節の間に、3つのモデルプロットスクリーンハウス試験を第2の地理的位置において行った。試験デザインはイベントまたは対照につき、3つの複製を伴う完全乱塊法(RCBD)テストブロックを含み、表4に示す試験したイベントを伴った。ダイズの成長の中期栄養段階、及び再びダイズの成長の初期の生殖段階の間に、1つの試験をC.aporemaに寄生させた。ダイズの成長中期栄養段階の間に、2つの試験をR.nuに寄生させた。

【0125】

C.aporema試験については、非常に重い圧力が達成された。複製は損傷の重要な原因ではなかったが(F=0.8794;df=2,69;P=0.4196)、イベントはきわめて有意であった(F=11.9398;df=23,48;P<0.0001)。損傷を受けた植物の最大パーセント(表4)をネガティブチェックでの83~10

10

20

30

40

50

0%に平均したが、Cry1Acポジティブ対照においては存在しなかった。形質転換構築物1から生成され、Cry2Ab及びCry1A.105を発現するイベントは0~13%を示した一方で、Cry2Abのみを発現したイベント及びCry1A.105のみを発現したイベントは、それぞれ10~17%及び10~13%を示した。重要ではあるが少数であるこの試験において損傷を受けたと記録された植物は、損傷の評価を記録する際に個人によって使用される基準に起因する可能性がある。

【0126】

C.aporema試験については、重い圧力が1つのスクリーンハウス試験で達成された。複製は落葉の変動の重要な原因ではなかったが($F = 0.203$; $df = 2, 69$; $P = 0.8167$)、イベントはきわめて有意であった($F = 20.2461$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$)。ネガティブチェックにおいて最大落葉(表4)は平均して60~63%であったが、Cry1Acポジティブ対照及びCry2Ab+Cry1A.105を発現する形質転換構築物1から生成されるイベントまたはCry2Abのみを発現する形質転換構築物2から生成されるイベントにおいては存在しなかった。Cry1A.105のみを発現する形質転換構築物3から生成されるイベントはわずかに高い落葉(4~10%)を示した。R.nuを評価する第2のスクリーンハウス試験において、適度な重圧を達成した。落葉において、いずれかの試験において複製は変動の重要な原因ではなかったが($F = 0.2542$; $df = 2, 69$; $P = 0.7763$)、イベントはきわめて有意であった($F = 16.1793$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$)。最大落葉(表4)は平均して38~40%であったが、Cry1Acポジティブ対照においてはごくわずか(4%)であり、構築物1で生成されCry2Ab+Cry1A.105を発現するイベントまたは構築物2で生成されCry2Abのみを発現するイベントにおいては存在しなかった。構築物3で生成され、Cry1A.105のみを発現するイベントはわずかに高い落葉(2~7%)を示した。

【0127】

これらのスクリーンハウス試験において、ダイズイベントMON87751は、害虫、C.aporemaまたはR.nuの寄生による損傷を示さず、それは同じ試験における対照の損傷及び/または落葉と比較して有意であった(表4)。

表4. 構築物1、2、または3を使用して生成し、人工的に寄生させたスクリーンハウスにおいて評価したイベントへのC.aporemaによる損傷及びR.nu幼虫による落葉。

【表 4】

構築物	GOI	イベント	損傷を受けた植物 % (季節最大)		落葉の% (季節最大)				
			Crocidos emaapor ema		Rachiplusia nu		スクリーンハウ ス試験1	スクリーンハウス試 験2	
		GM__A 1945							
	Cry1Ac	9	0±0	b	0±0	d	3.7±0 .0		b c
構築物1	Cry2Ab +Cry1A .105	2	6.7±6 .7	b	0±0	d	0±0		c
		3	0±0	b	0±0	d	0±0		c
		4	13.3± 3.3	b	0±0	d	0±0		c
		MON8 7751							
		7	6.7±6 .7	b	0±0	d	0±0		c
		8	13.3± 8.8	b	0±0	d	0±0		c
		9	3.3±3 .3	b	0±0	d	0±0		c
		10	13.3± 6.7	b	0±0	d	0±0		c
		11	3.3±3 .3	b	0±0	d	0±0		c
		14	6.7±6 .7	b	0±0	d	0±0		c
		18	13.3± 8.8	b	0±0	d	0±0		c
		19	13.3± 8.8	b	0±0	d	0±0		c
構築物2	Cry2Ab	20	10.0± 10.0	b	0±0	d	0.3±0 .0		c
		22	16.7± 3.3	b	0±0	d	0±0		c
構築物3	Cry1A. .105	29	10.0± 10.0	b	10.0 ±0.1	c d	5.3±0 .0		b c
		30	13.3± 8.8	b	6.7± 0.0	c d	2.0±0 .0		c
		31	10.0± 5.8	b	3.7± 0.0	d	7.0±0 .0		b c
	ネガティブ	A355 5	83.3± 16.7	a	63.3 ±0.0	a	38.3± 0.1		a
		A554 7	100±0	a	60.0 ±0.0	a	40.0± 0.1		a

同じ文字が続くカラム内の平均は、有意差はない（チューキー-カマー平均法、 $P < 0.05$ ）。

【0128】

第2の地理的位置において行ったスモールプロットスクリーンハウス試験の次の季節において、R.nu、C.aporema及びS.frugiperdaの地元の研究室集団を寄生に使用した。上記のように試験を実施するためのプロトコルは本質的であり、表5に示す試験したイベント及び対照を伴った。

10

20

30

40

50

【0129】

C. aporemaを寄生させた試験について、重圧を達成した。複製は、損傷の変動の重要な原因ではなかったが ($F = 0.2742$; $df = 2, 33$; $P = 0.7619$)、イベントはきわめて有意であった ($F = 8.2313$; $df = 11, 24$; $P < 0.0001$)。最大損傷はネガティブチェックにおける植物あたり平均して4.2~5.5損傷点であり、80~100%の植物が損傷を示したが、ポジティブ対照及び全ての試験イベントにおいてごくわずかであった(表5)。

【0130】

R. nuに寄生させた試験について、適度な重圧を達成した。複製は、損傷の変動の重要な原因ではなかったが ($F = 0.041$; $df = 2, 33$; $P = 0.9599$)、イベントはきわめて有意であった ($F = 143.5526$; $df = 11, 24$; $P < 0.0001$)。最大損傷はネガティブチェックにおいて平均して33.3~40.0%であった(経済的許容限界より更に高い)が、ポジティブ対照及びTIC105のみを発現する構築物6(表5)を伴う形質転換により生成されるイベントを除く全ての試験イベントにおいて存在しなかった、またはごくわずかであった。

10

【0131】

S. frugiperdaに寄生させた試験について、軽圧を達成した。複製は、損傷の変動の重要な原因ではなかったが ($F = 0.1187$; $df = 2, 33$; $P = 0.8884$)、イベントはきわめて有意であった ($F = 12.8602$; $df = 11, 24$; $P < 0.0001$)。最大損傷はネガティブチェックにおいて、平均して7.5~15.0%の落葉であった - 経済的許容限界に丁度到達した。構築物2または構築物5を伴う転換により生成されたCry2Abのみを発現するイベントにおいて、一部の損傷もまた言及されたが、ポジティブ対照及び全ての他の試験イベントにおいて存在しなかったまたはごくわずかであった(表5)。

20

【0132】

ダイズイベントMON87751は、害虫、C. aporema、R. nu、S. frugiperdaの寄生による損傷を示さず、それは同じ試験におけるネガティブ対照の損傷と比較して有意であった(表5)。Cry1A.105のみを発現する構築物6を伴う形質転換により生成されたトランスジェニックダイズイベントと比較した場合に、構築物6を伴う形質転換により生成されたイベントにおいてCry1A.105タンパク質の低い発現があったことが言及されるが、ダイズイベントMON87751はR. nuから有意に少ない損傷を有していた(表5)。これらの結果はまた、害虫S. frugiperdaの対照の拡大したスペクトルを初めて示す。

30

表5. 構築物1、2、3、4、5、または6で生成され、ポジティブ及びネガティブ対照と比較されるイベントを評価する人工的に寄生させたスクリーンハウスにおけるC. aporemaによる最大損傷、及びR. nu及びS. frugiperda幼虫による平均落葉の%

【表5】

	GOI	イベント	最大損傷 ^{1, 2} (平均± S. E.)					
			C. a p o r e m a ¹		R. n u ²		S. f r u g i p e r d a ²	
POS	C r y 1 A c	GM_A 1945 9	0±0	B	0±0	D	0.8± 0.8	B C
構築物1	C r y 2 A b + C r y 1 A . 1 05	MON8 7751	0±0	B	0±0	D	0±0	C
		8	0±0	B	0±0	D	0±0	C
		10	0±0	B	0±0	D	0±0	C
構築物2	C r y 2 A b	20	0.3± 0.3	B	0±0	D	1.7 ± 0. 8	B C
		構築物3	C r y 1 A . 1 05	29	0±0	B	0.8± 0.8	D
構築物4	C r y 2 A b + C r y 1 A . 1 05	32	0±0	B	0±0	D	0±0	C
			40	0.1 ± 0. 1	B	0±0	D	0±0
構築物5	C r y 2 A b	46	0±0	B	2.0± 1.5	D	6.5 ± 2. 2	B C
		構築物6	C r y 1 A . 1 05	42	0±0	B	13.3 ± 1.7	C
NEG	ネガティブ	A355 5	5.5 ± 2. 2	A	33.3 ± 3.3	B	15.0 ± 2. .9	A
		A554 7	4.2 ± 0. 3	A	40.0 ± 0.0	A	7.5 ± 2. 5	B

同じ文字が続くカラム内の平均は、有意差はない(テューキー-カーマー平均法、P<0.05)。¹平均損傷点/植物。²平均落葉の%

10

20

【0133】

H. z e a の研究室の寄生を用い、第1の地理的位置において1つのスモールプロットスクリーンハウス試験を行った。試験デザインはイベントにつき、3つの複製を伴う完全乱塊法(RCBD)テストブロックを含み、表6に示す試験したイベント及び対照を伴った。H. z e a の2つの寄生があり、寄生の19~27日後(ダイズの成長のR2~R3段階)に初めの寄生について、及び寄生の25~28日後(ダイズの成長のR5段階)に第2の寄生について、落葉を評価した。H. z e a を試験するスクリーンハウス試験からの結果は以下の通りであった:適度な重圧を達成した。落葉において、複製は変動の重要な原因ではなかったが(F=0.326; df=2, 105; P=0.7225)、イベントはきわめて有意であった(F=13.8864; df=35, 72; P<0.0001)。ネガティブチェックにおいて、最大落葉(表6)は平均して32~33%であったが、C r y 1 A c ポジティブ対照(1%)及び構築物1で生成され、C r y 2 A b + C r y 1 A . 1 0 5 (2~4%)を発現するイベントにおいてごくわずかであった。C r y 2 A b + C r y 1 A . 1 0 5 (5~12%)を発現する構築物4で生成されるイベント、C r y 2 A b (13~17%)のみを発現する構築物5で生成されるイベントまたはC r y 1 A . 1 0 5 (8~12%)を発現する構築物6で生成するイベントにおいて、やや高い落葉が観察された。

30

40

【0134】

ダイズイベントMON87751はこの試験において、同じ試験におけるネガティブ対象への損傷と比較した場合に、H. z e a による有意に少ない損傷を示した。H. z e a による対照のこのレベルは、このダイズ害虫種の許容可能な商業的水準の範囲内である。

50

加えて、このスクリーンハウス試験において、Cry2Abのみを発現する構築物5で生成されるトランスジェニックダイズイベントと比較した場合に(表6)、ダイズイベントMON87751は有意に少ない損傷を有し、拡大した対照のレベルを示した。しかしながら、Cry2Abの発現は構築物2で生成されるイベントにおいてよりも構築物5で生成されるイベントにおいての方が低く、Cry2Abのみを発現する構築物5で生成されるイベントの有意な落葉は構築物5で生成されるCry2Abによる、H.zeaに対する減少した有効性が有り得ることを示しうる。

表6. ポジティブ及びネガティブ対照と比較した場合の、人工的に寄生させたスクリーンハウス試験においてH.zea幼虫により構築物1、4、5、または6で生成されたイベントへの最大季節落葉。

【表6】

構築物	GOI	イベント	落葉の% (季節最大)	
			H. zea	
	Cry1Ac	GM_A19478	1.0±0.0	e
構築物1	Cry2Ab+Cry1A .105	2	3.0±0.0	cde
		3	2.3±0.7	de
		4	2.7 ± 0.3	cde
		MON87751	4.3±0.7	cde
		8	2.3±0.3	de
		9	2.0±0.0	de
		10	2.3±0.3	de
		11	4.3±1.9	cde
		14	3.3±0.9	cde
		18	3.7 ± 0.7	cde
構築物4	Cry2Ab+Cry1A .105	19	2.3±0.3	de
		32	9.3±0.7	bcde
		33	5.0±0.0	cde
		34	7.0±1.0	bcde
		35	7.7 ± 1.5	bcde
		36	8.7 ± 0.7	bcde
		37	11.7 ± 1.7	bcde
		38	8.7 ± 0.7	bcde
		39	9.3±0.7	bcde
		40	7.7 ± 1.5	bcde
構築物5	Cry1A.105	41	9.3±0.7	bcde
		42	11.0 ± 2.1	bcde
		43	11.7 ± 1.7	bcde
構築物6	Cry2Ab	44	7.7 ± 1.5	bcde
		45	13.3±1.7	bc
		46	16.7 ± 3.3	b
		47	12.7 ± 3.7	bcd
ネガティブ	A3555	33.3 ± 6.7	a	
	A5547	31.7 ± 1.7	a	

同じ文字が続くカラム内の平均は、有意差はない(デューキー-カーマー平均法、P<0.05)。

【0135】

第1の地理的位置において行ったスモールプロットスクリーンハウス試験のもう一方の季節において、害虫S. eridania(第一齢または第三齢)、A. gemmatalis(第一齢)、及びC. includens(第一齢)の研究室集団からの寄生に対する抵抗性を試験した。これらの試験からの結果は以下の通りであった: 極圧を第一齢S. eridaniaで達成し、適度な圧力をA. gemmatalisで達成した。A. gemmatalis(第一齢)及びS. eridania(第一齢)幼虫による最大パーセント落葉(平均±S.E.)を表7に報告する。

表7. 構築物1、2、3、4、5、6、7、8、及び10で生成され、ポジティブ及びネガティブ対照と比較されるイベントを評価する人工的に寄生させたスクリーンハウスに

10

20

30

40

50

おける、*A. gemmatalis* (第一齢) 及び *S. eridania* (第一齢) 幼虫による最大パーセント落葉

【表 7】

	イベント	GOI	最大落葉の% (平均 ± S. E.)			
			<i>A. gemmatalis</i>		<i>S. eridania</i>	
POS	GM_A19 478	Cry1Ac	0 ± 0	B	65.0 ± 6.5	A
構築物 1	MON877 51	Cry2Ab + Cry1A.105	0.5 ± 0.3	B	3.8 ± 2.1	BC
	10		0.3 ± 0.3	B	1.8 ± 0.3	C
構築物 2	20	Cry2Ab	0.3 ± 0.3	B	3.3 ± 1.0	BC
構築物 3	29	Cry1A.105	0.5 ± 0.3	B	52.5 ± 6.3	A
構築物 4	40	Cry2Ab + Cry1A.105	0 ± 0	B	16.3 ± 1.3	BC
構築物 5	46	Cry2Ab	1.5 ± 1.2	B	15.0 ± 2.9	BC
構築物 6	42	Cry1A.105	0.5 ± 0.3	B	50.0 ± 0.0	A
構築物 8	48	eCry2Ab + Cry1A.105	1.8 ± 0.3	B	2.8 ± 0.8	BC
	49		0 ± 0	B	1.8 ± 0.3	C
	50		1.0 ± 0.4	B	2.3 ± 0.9	BC
構築物 7	51	Cry2Ab + Cry1A.105	0.5 ± 0.5	B	52.5 ± 1.8	A
	52		1.0 ± 0.4	B	22.5 ± 2.5	B
	53		0 ± 0	B	13.8 ± 2.4	BC
構築物 10	54	eCry2Ab	0.5 ± 0.5	B	2.5 ± 0.9	BC
	55		0 ± 0	B	3.5 ± 0.9	BC
NEG	A3555	ネガティブ	35.8 ± 8.0	A	58.8 ± 3.0	A
	A5547		35.5 ± 11.4	A	45.0 ± 6.5	A

カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05 でのデューキー-クレーマー平均検定)。

【0136】

C. includens (第一齢) 及び *S. eridania* (第三齢) を試験する試験については、極圧は両方の害虫について達成された。これらの人工的に寄生されたスクリーンハウスにおける *C. includens* (第一齢) 幼虫及び *S. eridania*

10

20

30

40

50

(第三齡)幼虫による最大パーセント落葉(平均±S.E.)を表8に報告する。

表8.構築物1、2、3、4、5、6、7、8、及び10で生成され、ポジティブ及びネガティブ対照と比較されるイベントを評価する、人工的に寄生させたスクリーンハウスにおける*C. in cl u d e n s*(第一齡)及び*S. e r i d a n i a*(第三齡)幼虫による最大パーセント落葉

【表 8】

転換構築物	イベント	GOI	最大落葉の% (平均 ± S. E.)			
			C. incl udens		S. eridan ia	
POS	GM_A19 478	Cry1Ac	1.0±0 .7	C	78.8±1 .3	A
構築物1	MON877 51	Cry2Ab+ Cry1A.105	0.5±0 .3	C	13.8±1 .3	D
	10		0±0	C	11.3±1 .3	D
構築物2	20	Cry2Ab	0.8±0 .5	C	13.8 ± 2.4	D
構築物3	29	Cry1A.105	3.5±1 .6	C	82.5 ± 4.8	A
構築物4	40	Cry2Ab+ Cry1A.105	3.3±1 .0	C	36.3 ± 5.5	B
構築物5	46	Cry2Ab	4.8±1 .0	C	30.0 ± 4.6	BC
構築物6	42	Cry1A.105	9.8±1 .0	C	80.0 ± 4.6	A
構築物8	48	eCry2Ab+ Cry1A.105	0.3±0 .3	C	12.5 ± 2.5	D
	49		0.3±0 .3	C	13.8±1 .3	D
	50		2.0±1 .1	C	14.3±0 .8	D
構築物7	51	Cry2Ab+C ry1A.105	40.0± 6.8	B	73.3 ± 3.3	A
	52		4.0±1 .2	C	35.0 ± 2.9	B
	53		4.8±1 .0	C	38.8 ± 4.3	B
構築物10	54	eCry2Ab	0.8±0 .5	C	15.0 ± 2.0	CD
	55		0.5±0 .3	C	12.5±1 .4	D
NEG	A3555	ネガティブ	76.9± 5.3	A	79.4 ± 2.0	A
	A5547		65.0± 10.4	A	82.5 ± 2.5	A

カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P<0.05でのチューキー-クレーマー平均検定)。

【0137】

これらのスクリーンハウス試験についての結果は、ダイズイベントMON87751が、同じ試験(表7及び表8)におけるネガティブ対照への損傷と比較した場合、S. eridania (第一齢または第三齢)、A. gemmatalis (第一齢)、

10

20

30

40

50

または *C. includens* (第一齢) による有意に少ない損傷を示すことを示した。加えて、これらのスクリーンハウス試験において、ダイズイベント MON 87751 は、*Cry1Ac* を発現するトランスジェニックダイズイベント (表7及び表8) と比較した場合に、*S. eridania* (第一齢及び第三齢) による有意に少ない損傷を有し、鱗翅目害虫防除のために現在使用可能なトランスジェニックダイズイベントへのイベント MON 87751 の拡大された性能を実証した。さらに、これらのスクリーンハウス試験において、ダイズイベント MON 87751 は、[1] 構築物4、5、または6 (第三齢) で生成されるイベント、または *Cry1A.105* イベント (第一齢) のみを発現する構築物6で生成されるイベント、または *Cry1A.105* イベント (第一齢及び第三齢) のみを発現する構築物3で生成されるイベントのいずれかと比較した場合、及び [2] エンハンサなしで *Cry2Ab* 及び *Cry1A.105* を発現する構築物7で生成されるイベントと比較した場合、*S. eridania* 幼虫による有意に少ないダメージを有し、構築物4、5、6、または7で生成されるイベント (表7及び表8) へのイベント MON 87751 の優れた性能を実証した。

【0138】

実施例4

露地有効性試験を、実験的ダイズイベント MON 87751、並びに異なる形質転換構築物1、2、3、4、5、及び6を使用して作製されたイベントの、鱗翅目害虫集団の自然界での寄生に対する有効性を評価するために実施した。構築物2、若しくは5で生成されたイベント (*Cry2Ab* のみの発現)、及び構築物3、若しくは6 (*Cry1A.105* のみの発現) で生成されたイベントと、構築物1、若しくは4 (*Cry1Ab* 及び *Cry1A.105* の両方の発現) で生成されたイベントの比較を、各単一の *Cry* タンパク質 (すなわち、*Cry2Ab* のみ、若しくは *Cry1A.105* のみ) の、単一の構築物からの両方の *Cry* タンパク質 (すなわち、*Cry2Ab* 及び *Cry1A.105*) を発現するイベントにおいて観察される有効性に対する相対的寄与を決定するために使用した。地域性ダイズ害虫の自然集団の有効性野外試験を、複数の季節に亘って、複数の野外試験施設で、3つの地理的位置で実施した。

【0139】

1つの地理的位置で実施した最初の有効性野外試験において、評価されたイベント (すなわち、エントリー) は、構築物1により生成されて、両方の *Cry* タンパク質、*Cry2Ab*、及び *Cry1A.105* を発現する (かつ、イベント MON 87751 を含む) 12のイベント、構築物2より生成されて、*Cry2Ab* のみを発現する2つのイベント、並びに構築物3により生成されて、*Cry1A.105* のみを発現する3つのイベントを含んだ。第2の地理的位置で実施した最初の有効性野外試験において、構築物1、2、及び3により生成されたイベントが評価され、前記イベントは、(構築物1を用いた形質転換から生成され、イベント MON 87751 を含む) 両方の *Cry* タンパク質、*Cry2Ab* 及び *Cry1A.105* を発現する11のイベント、*Cry2Ab* のみを発現する2つのイベント (構築物2を用いた形質転換から生成されたイベント)、並びに *Cry1A.105* のみを発現する3つのイベント (構築物3を用いた形質転換から生成されたイベント) を含んだ。3つの地理的位置で実施した有効性野外試験の第2の季節において、評価されたイベント (すなわち、エントリー) は、両方の *Cry* タンパク質、*Cry2Ab* 及び *Cry1A.105* を発現する3つのイベント (構築物1を用いた形質転換から生成され、イベント MON 87751 を含むイベント)、*Cry2Ab* のみを発現する1つのイベント (構築物2を用いた形質転換から生成されたイベント)、並びに *Cry1A.105* のみを発現する1つのイベント (構築物3を用いた形質転換から生成されたイベント) を含んだ。露地有効性試験で評価したイベントは、R3からR7までの世代を含んだ。

【0140】

各有効性野外試験施設に関して、テストブロックを植え、標的の鱗翅目の昆虫の在来害虫集団による自然寄生が起こるようにした。テストブロックには、標的の害虫 (鱗翅目)

に対する殺虫剤を用いた処置を施さずにおいた。しかしながら、テストブロックは、非標的害虫による重大な被害を防ぐために、噴霧を受けた場合がある。全ての実験的イベントは、ダイズの生殖質の背景 A 3 5 5 5 における、相対的に成熟なグループ 3 (R M 3) についてのものであった。試験でのその他のエンタリーは、(C r y 1 A c を発現する) ポジティブ対照 M O N 8 7 7 0 1、若しくは G M _ A 1 9 4 5 9 (R M 5) ; ネガティブ親チェック A 3 5 5 5 (紫花、R M 3) ; 及びネガティブ市販チェック A 5 5 4 7 (白花、M G 5)、若しくは C M A 5 8 0 5 (白花、R M 5) を含んだ。

【 0 1 4 1 】

露地有効性試験を設定し実施した後、標準的処置を実施した。鱗翅目害虫の幼虫発生率、落葉、及び植物成長ステージを、標的鱗翅目の活動の開始から始め、標的鱗翅目の活動が停止したとき、または植物が成長の R 7 ステージに到達したときに終了させて、定期的 (すなわち、5 ~ 1 4 日おき) に記録した。害虫発生率データを、収量データ用に収穫された、作条 2 及び 3 における植物被害を回避するために、作条 1 及び 4 のみから収集した。害虫発生率データのモニタリング及び記録は、以下のように実施した：食葉鱗翅目 (すなわち、A . g e m m a t a l i s、C . i n c l u d e n s、R . n u、S p o d o p t e r a s p p .) を、ドロップクロス、若しくは垂直ビーティングシート (v e r t i c a l b e a t i n g s h e e t) を使用して、プロット当たり少なくとも 2 つのドロップクロス、若しくは 4 つの垂直ビーティングシートのサンプリングをしてモニタリングした。遭遇した各標的種に関して幼虫の総数、及び各プロット内のサンプリング数を、m 作条当りの幼虫の平均数 (幼虫の総数 ÷ サンプリング数 ÷ クロス / シートの長さ (m)) として記録した。次のサンプリングは、各プロットの同じ領域で繰り返されるサンプリングを回避するような方法で実施した。1 つの地理的位置で実施した有効性野外試験において、データを、2 つの試験施設で、日和見的に、H . z e a による被害に関して、2 0 若しくは 3 3 植物 / 位置をランダムに選択することによっても記録し、幼虫の食害を伴う数を記録した。第 2 の地理的位置で、1 つの試験を、日和見的に、H . z e a に関して、プロット当たり 1 0 植物をランダムに選択することにより評価し、鞘の総数、及び植物当りの被害を受けた鞘の数を記録した。

【 0 1 4 2 】

モロコシマダラメイガ (E l a s m o p a l p u s l i g n o s e l l u s) による寄生に関するデータを、幼虫の摂食に起因する被害 (しおれ、瀕死、枯死) を伴っている各プロットにおける植物の総数を数えることにより記録した。この昆虫に関する被害データを、最大被害を記録した単一時点で採った。

【 0 1 4 3 】

標的害虫に加えて、非標的害虫、特に、経済的許容限界を超える潜在性を有する害虫 (例えば、カメムシ) を、捕虫網、改良された捕虫網、若しくはグラウンドクロスにより、テストブロック中のランダムに選択された位置で、定期的にモニタリングし、経済的被害許容水準に到達したのか、または近づいていたのかを決定するために評価した。

【 0 1 4 4 】

最終試験で、各プロットの作条 2 及び 3 の全長を収穫し、各プロットに関して、全重量及び水分の % を記録した。収穫の間、収穫された作条における著しいギャップ (互いに接触しない植物) に注目し、これらのギャップの全長を記録した。収量を、種子重量を 1 3 % の水分に補正した後に計算した。幼虫発生率、落葉、及び収量データを、A N O V A に付し、系統及び複製間の、各位置に関する、0 . 0 5 の確立水準 (P) での変動の有意な源を決定した。平均間の有意差を、テューキー - クレーマー検定 (K r a m e r 1 9 5 6) を使用して P = 0 . 0 5 で決定した。

【 0 1 4 5 】

野外試験施設 1 で実施した露地試験において、食葉イモムシは、最初に、成長の R 3 ステージで遭遇され、成長の R 6 ステージまでに中等度の被害レベルにまで増殖した。遭遇した種は、A . g e m m a t a l i s (9 8 %)、R . n u (2 %)、及び S p o d o p t e r a s p p . (1 %) を含んだ。複製は、幼虫発生 (F = 0 . 0 4 3 5 ; d f

10

20

30

40

50

= 2, 57; P = 0.9575)、落葉 (F = 0.0807; df = 2, 57; P = 0.9226)、または収量 (F = 0.0213; df = 2, 57; P = 0.979) における変動の有意な源ではなかったが、イベントは、3つ全てに関して非常に有意であった (幼虫発生: F = 69.6956; df = 19, 38; P < 0.0001; 落葉: F = 25.9918; df = 19, 40; P < 0.0001; 収量: F = 3.357; df = 19, 38; P = 0.0007)。累積幼虫発生率 (表9) は、ネガティブ対照において、m作条当り139 ~ 189幼虫に達し、一方で、トランスジェニックエントリーのいずれにおいても、実質的に全く幼虫は遭遇されなかった。最大落葉 (表9) は、ネガティブチェックにおいて、平均21 ~ 27%であり、全てのトランスジェニックエントリーにおいて存在しなかった。収量 (表9) は、全てのトランスジェニックエントリーに比べて、両方のネガティブチェックにおいて減少したが、収量における変動は、これらの減少の有意性を減少させた。

10

【0146】

イベントMON87751は、非トランスジェニック対照と比べた場合、食葉鱗翅目の幼虫の有意に低い発生率 (季節累積)、及び落葉の有意に低いパーセント (季節最大) を有した。

表9. 野外試験施設1で実施され、自然に来襲させた露地有効性試験における、構築物1、2、または3で生成されたイベントの食葉鱗翅目の幼虫発生率 (季節累積)、及び落葉 (季節最大)

【表9】

20

形質転換構築物	GOI	イベント	幼虫/m作条 (季節累積)		落葉の% (季節最大)	収量 (kg/ha)		
	Cry1Ac	GM_A19459	2.2 ± 0.3	c	0 ± 0	B	2194 ± 89 a	
構築物1	Cry2Ab+ Cry1A.1 05	2	0.8 ± 0.2	c	0 ± 0	B	2130 ± 28 a	
		3	0.8 ± 0.2	c	0 ± 0	B	1855 ± 240 abc	
		4	0.3 ± 0.0	c	0 ± 0	B	1643 ± 105 abc	
			MON87751	0.3 ± 0.3	c	0 ± 0	B	1970 ± 126 ab
		7	0.8 ± 0.2	c	0 ± 0	B	1552 ± 218 abc	
		8	2.0 ± 0.3	c	0 ± 0	B	2039 ± 138 ab	
		9	1.7 ± 0.8	c	0 ± 0	B	1628 ± 155 abc	
		10	0.5 ± 0.4	c	0 ± 0	B	1653 ± 247 abc	
		11	0.1 ± 0.1	c	0 ± 0	B	1957 ± 44 ab	
		14	1.6 ± 0.9	c	0 ± 0	B	1990 ± 65 ab	
		18	0.5 ± 0.3	c	0 ± 0	B	1885 ± 91 ab	
		19	1.5 ± 0.9	c	0 ± 0	B	1839 ± 55 abc	
構築物2	Cry2Ab	20	2.0 ± 0.6	c	0 ± 0	B	1993 ± 64 ab	
		22	1.3 ± 0.7	c	0 ± 0	B	1957 ± 31 ab	
構築物3	Cry1A.10 5	29	0.8 ± 0.5	c	0 ± 0	B	1841 ± 124 abc	
		30	0.8 ± 0.4	c	0 ± 0	B	1833 ± 69 abc	
		31	0.4 ± 0.2	c	0 ± 0	B	1439 ± 357 abc	
ネガティブ		A3555	138.6 ± 10 .2	b	27.2 ± 1.7	A	1288 ± 31 bc	
		A5547	188.9 ± 25 .1	a	21.0 ± 6.3	A	731 ± n/a c	

30

カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05でのデュエキーークレーマー平均検定)。

40

【0147】

野外試験施設2で実施された別の露地試験で、食葉イモムシは、最初に、成長の後期増殖ステージで遭遇され、成長のR3ステージまでに、高い被害レベルにまで増殖した。遭遇した種は、A. gemmatalis (53%)、「シャクトリムシ」(おそらく、C. includensであるが、R. nuの可能性もある) (44%)、及びSpodoptera spp. (3%)を含んだ。複製は、幼虫発生率 (F = 0.0085; df = 2, 57; P = 0.9915)、または落葉 (F = 0.0027; df = 2, 5

50

7 ; $P = 0.9973$) における変動の有意な源ではなかったが、イベントは、両方に関して非常に有意であった (幼虫発生率 : $F = 19.644$; $df = 19, 40$; $P < 0.0001$; 落葉 : $F = 671.3147$; $df = 19, 40$; $P < 0.0001$) 。累積幼虫発生率 (表 10) は、ネガティブチェックにおいて、m 作条当り 43 ~ 50 幼虫に達し、一方で、トランスジェニックエントリーにおいて、遭遇されたのは無視できる数であった。最大落葉 (表 10) は、ネガティブチェックにおいて、平均 87 ~ 90 % であり、一方で、全てのトランスジェニックエントリーにおいて、痕跡程度しか観察されなかった。

【 0 1 4 8 】

イベント MON 87751 は、非トランスジェニック対照と比べた場合、食葉鱗翅目の幼虫の有意に低い発生率 (季節累積) 、及び落葉の有意に低いパーセント (季節最大) を有した。

表 10 . 野外試験施設 2 で実施され、自然に寄生させた露地有効性試験における、構築物 1、2、または 3 で生成されたイベントの食葉鱗翅目の幼虫発生率 (季節累積) 、及び落葉 (季節最大)

【 表 10 】

形質転換構築物	GOI	イベント	幼虫 / m 作条 (季節累積)		落葉の % (季節最大)	
	Cry1Ac	GMA19459	1.9 ± 0.4	b	0 ± 0	b
構築物 1	Cry2Ab+Cry1A.105	2	1.3 ± 0.2	b	0 ± 0	b
		3	2.3 ± 0.6	b	0 ± 0	b
		4	3.1 ± 0.4	b	0 ± 0	b
		MON87751	1.6 ± 0.3	b	0 ± 0	b
		7	1.7 ± 0.5	b	0 ± 0	b
		8	2.3 ± 1.6	b	0 ± 0	b
		9	2.0 ± 0.7	b	1.7 ± 1.7	b
		10	2.1 ± 1.0	b	0 ± 0	b
		11	3.3 ± 1.0	b	0 ± 0	b
		14	1.1 ± 0.2	b	0 ± 0	b
		18	2.8 ± 0.6	b	0 ± 0	b
		19	3.1 ± 0.8	b	0 ± 0	b
構築物 1	Cry2Ab	20	2.9 ± 1.3	b	0 ± 0	b
		22	2.4 ± 0.9	b	0 ± 0	b
構築物 3	Cry1A.105	29	1.5 ± 0.1	b	2.0 ± 2.0	b
		30	2.4 ± 0.9	b	2.0 ± 2.0	b
		31	1.8 ± 0.7	b	0 ± 0	b
	ネガティブ	A3555	42.9 ± 10.4	a	86.7 ± 3.3	a
A5547		49.9 ± 8.4	a	90.0 ± 0.0	a	

カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない ($P < 0.05$ でのデュークレーマー平均検定)。

【 0 1 4 9 】

野外試験施設 3 で実施された別の露地試験において、複製は、植物当りの全鞘 ($F = 0.312$; $df = 2, 24$; $P = 0.7349$) 、若しくは被害を受けた鞘 ($F = 0.0438$; $df = 2, 24$; $P = 0.9572$) 、または収量 ($F = 0.2221$; $df = 2, 24$; $P = 0.8025$) における変動の有意な源ではなかった。しかしながら、イ

ベントは、植物当りの全鞘 ($F = 4.3643$; $df = 8, 18$; $P = 0.0045$)、及び被害を受けた鞘 ($F = 34.5288$; $df = 8, 18$; $P < 0.0001$)における変動の有意な源であったが、収量 ($F = 0.6237$, $df = 8, 18$, $P = 0.7475$)における変動の有意な源ではなかった。ネガティブチェックは、植物当り平均 $25.0 \sim 26.0$ の鞘があり、被害を受けた鞘は $30.8 \sim 31.0\%$ であったが、イベント MON87751 を含むテストイベントは、植物当り平均 $28.9 \sim 38.9$ の鞘があり、被害を受けた鞘は $< 2\%$ であった (表 11)。ネガティブチェックにおける植物の下の土の上に、多数の被害を受けた鞘があるのが観察された (テストイベントでは観察されなかった) ので、ネガティブチェックにおける植物当りの鞘の数の減少は、サヤムシガの被害により起こった未熟な鞘の離脱の結果である可能性が高い (表 11)。

表 11. 野外試験施設 3 で実施され、構築物 1、2、または 3 で生成されたイベントを評価するサヤムシガに寄生された露地有効性試験における、植物当りの全鞘及び被害を受けた鞘

【表 11】

形質転換構築物	イベント	GOI	全鞘/植物		被害を受けた鞘/植物	
構築物 1	MON87751	Cry2Ab + Cry1A.105	38.9 ± 2.9	A	1.0 ± 0.4	B
	8		37.4 ± 4.1	A B	1.4 ± 0.4	B
	10		37.2 ± 1.9	A B	0.9 ± 0.5	B
構築物 2	20	Cry2Ab	38.6 ± 1.0	A	0.8 ± 0.5	B
構築物 3	29	Cry1A.105	35.1 ± 2.7	A B	0.6 ± 0.2	B
NEG	40-3-2		25.0 ± 4.0	A B	30.8 ± 1.3	A
	A3555		26.0 ± 0.1	B	31.0 ± 6.5	A
カラム内において、同じ文字が続く平均 ($\pm S. E.$) は、有意差がない ($P < 0.05$ でのチューキークレーマー平均検定)。						

【0150】

野外試験施設 4 で実施された露地試験において、食葉イモムシは、成長の R3 ステージで遭遇され、成長の R6-R7 ステージまでに、高い被害レベルにまで増殖した。遭遇した種は、*A. gemmatalis* (77%)、*Plathypena scabra* (green clover worm) (17%)、及び *C. includens* (6%) を含んだ。複製は、幼虫発生率 ($F = 0.0219$; $df = 2, 69$; $P = 0.9783$)、落葉 ($F = 0.0007$; $df = 2, 69$; $P = 0.9993$)、または収量 ($F = 1.1477$; $df = 2, 69$; $P = 0.3233$) における変動の有意な源ではなかった。イベントは、有意であり、3 つ全てに関して、高度に有意であった (幼虫発生率: $F = 96.9673$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$; 落葉: $F = 363.8854$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$; 収量: $F = 1.7814$; $df = 23, 48$; $P = 0.046$)。累積幼虫発生率 (表 12) は、ネガティブチェックにおいて、m 作条当り $117 \sim 123$ 幼虫に到達したが、一方で、トランスジェニックエントリーのいずれにおいても、実質的に全く幼虫は遭遇されなかった。最大落葉 (表 12) は、ネガティブチェックにおいて、平均 $68 \sim 83\%$ であり、イベント MON87751 を含む全てのトランスジェニックエントリーにおいて存在しなかった。

表 12. 野外試験施設 4 で実施された、自然に寄生させた露地試験における、構築物 1

、 2、または3で生成されたイベントからの食葉鱗翅目の幼虫発生率（季節累積）、及び落葉の%（季節最大）

【表 1 2】

形質転換 構築物	G O I	イベント	幼虫/m作条 (季節累積)		落葉の% (季節最大)	
	Cry1Ac	GMA19478	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
構築物 1	Cry2Ab+Cry1A.1 05	2	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
		3	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		4	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
		MON87751	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		8	1.7 ± 0.9	b	0 ± 0	c
		9	1.3 ± 1.3	b	0 ± 0	c
		10	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		11	1.0 ± 0.0	b	0 ± 0	c
		14	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
		18	0 ± 0	b	0 ± 0	c
構築物 2	Cry2Ab	20	2.0 ± 2.0	b	0 ± 0	c
		22	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
構築物 3	Cry1A.105	31	1.0 ± 0.6	b	0 ± 0	c
		29	0.7 ± 0.7	b	0 ± 0	c
	ネガティブ	A3555	122.7 ± 16 .2	a	83.3 ± 3 .3	a
		A5547	117.0 ± 2. 1	a	68.3 ± 4 .4	b
カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない（ $P < 0.05$ でのデュエキーークレーマー平均検定）。						

【 0 1 5 1 】

野外試験施設5で実施された別の露地試験において、食葉イモムシは、最初に、成長のR2ステージで遭遇され、成長のR5-R6ステージの間、高い被害レベルにまで増殖した。遭遇した種は、*A. gemmatalis* (93%)、*C. includens* (5%)、及び*Spodoptera ornithogalli* (2%)を含んだ。複製は、幼虫発生率（ $F = 0.0206$; $df = 2, 69$; $P = 0.9796$ ）、落葉（ $F = 0.0054$; $df = 2, 69$; $P = 0.9946$ ）、または収量（ $F = 0.2379$; $df = 2, 69$; $P = 0.7889$ ）における変動の有意な源ではなかった。イベントは、3つ全てに関して、高度に有意であった（幼虫発生率： $F = 122.46$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$ ；落葉： $F = 623.0217$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$ ；収量： $F = 2.9366$; $df = 23, 48$; $P = 0.0008$ ）。累積幼虫発生率（表13）は、ネガティブチェックにおいて、m作条当り76~137幼虫に達したが、一方で、トランスジェニックエントリーのいずれにおいても、実質的に全く幼虫は遭遇されなかった。最大落葉（表13）は、ネガティブチェックにおいて、平均82~88%であり、イベントMON87751を含む全てのトランスジェニックエントリーにおいて存在しなかった。

表13. 野外試験施設5で実施された、自然に寄生させた露地試験における、構築物1、2、または3で生成されたイベントからの食葉鱗翅目の幼虫発生率（季節累積）、及び落葉（季節最大）

【表 1 3】

形質転換 構築物	GOI	イベント	幼虫/m作条 (季節累積)		落葉の% (季節最大)		
	Cry1Ac	GMA19478	1.0 ± 0.6	c	0 ± 0	c	
構築物 1	Cry2Ab+Cry1A.1 05	2	1.0 ± 1.0	c	0 ± 0	c	
		3	1.7 ± 0.3	c	0 ± 0	c	
		4	1.0 ± 0.6	c	0 ± 0	c	
			MON87751	1.0 ± 0.6	c	0 ± 0	c
		8	1.0 ± 0.6	c	0 ± 0	c	
		9	1.7 ± 0.3	c	0 ± 0	c	
		10	0.7 ± 0.7	c	0 ± 0	c	
		11	1.3 ± 0.9	c	0 ± 0	c	
		14	2.0 ± 1.2	c	0 ± 0	c	
		18	1.0 ± 1.0	c	0 ± 0	c	
構築物 2	Cry2Ab	20	2.3 ± 1.3	c	0 ± 0	c	
		22	0.3 ± 0.3	c	0 ± 0	c	
構築物 3	Cry1A.105	31	1.3 ± 0.3	c	0 ± 0	c	
		29	1.3 ± 0.3	c	0 ± 0	c	
	ネガティブ	A3555	76.0 ± 7.0	b	81.7 ± 4.4	b	
		A5547	137.0 ± 10.6	a	88.3 ± 1.7	a	
カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05でのデュ ーキーークレーマー平均検定)。							

10

20

【0152】

野外試験施設6で実施された別の露地試験において、食葉イモムシ(主に、*H. zea*及び*C. includens*)は、成長のR6ステージの間に遭遇されたが、非常に有意な数にまでは達しなかった。しかしながら、境界、緩衝、及びネガティブチェックにおける*E. lignosellus*による植物への実質的な被害は、季節の始まりに発生し、成長のR5-R6ステージまでにしおれた、瀕死の、及び枯死した植物を生じさせ、この時点で被害データを記録した。複製は、*E. lignosellus*により被害を受けた植物の有意な源ではなかった($F = 0.3431$; $df = 2, 69$; $P = 0.71$)。イベントは、*E. lignosellus*により被害を受けた植物に関して非常に有意であった: $F = 16.7555$; $df = 23, 48$; $P < 0.0001$)。 *E. lignosellus*により被害を受けた植物のパーセント(表14)は、ネガティブ

30

40

表14. 野外試験施設6で実施され、構築物1、2、または3で生成されたイベントを評価する、LCSBの自然に寄生させた露地有効試験における、*E. lignosellus*による食葉被害の発生率

【表 1 4】

形質転換構築物	GOI	イベント	#E. lignosellusの被害を受けた植物		
			平均	標準偏差	
	Cry1Ac	GMA19478	0 ± 0	c	
構築物 1	Cry2Ab+Cry1A.105	2	0 ± 0	c	
		3	0 ± 0	c	
		4	0 ± 0	c	
			MON87751	0 ± 0	c
		8	0 ± 0	c	
		9	0 ± 0	c	
		10	0 ± 0	c	
		11	0 ± 0	c	
		14	0 ± 0	c	
		18	0 ± 0	c	
構築物 2	Cry2Ab	20	0 ± 0	c	
		22	0 ± 0	c	
構築物 3	Cry1A.105	31	0 ± 0	c	
		29	0 ± 0	c	
	ネガティブ	A3555	10.3 ± 5.9	b	
		A5547	28 ± 4	a	

カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05でのデュキーークレーマー平均検定)。

【0153】

野外試験施設7で実施された別の露地試験において、食葉イモムシは、最初に、成長のR1-R2ステージで遭遇され、成長のR4-R6ステージまでに高い被害レベルにまで増殖した。遭遇した種は、C. includens (54%)、Spodoptera exigua (43%)、及びEstigmene acrea (2%)を含んだ。複製は、幼虫発生率 (F = 0.0866; df = 2, 69; P = 0.9172)、または落葉 (F = 0.1129; df = 2, 69; P = 0.8934)における変動の有意な源ではなかった。イベントは、両方に関して非常に有意であった (幼虫発生率: F = 69.918; df = 23, 48; P < 0.0001; 落葉: F = 21.6603; df = 23, 48; P < 0.0001)。累積幼虫発生率 (表15)は、ネガティブチェックにおいて、m作条当たり152~166に達したが、一方、Cry1Acポジティブ対照、またはCry2Ab及び/またはCry1A.105を発現する構築物1、2、または3で生成されたイベントにおいて、実質的に全く幼虫は遭遇されなかった。最大落葉 (表15)は、ネガティブチェックにおいて、平均24%であったが、イベントMON87751若しくはCry1Acポジティブ対照を含む、Cry2Ab及び/またはCry1A.105を発現する構築物1、2、または3で生成されたイベントにおいて、痕跡レベルを超えなかった。

表15. 野外試験施設7で実施された、自然に寄生させた露地試験における構築物1、2、または3で生成されたイベントからの、食葉鱗翅目の幼虫発生率 (季節累積)、落葉 (季節最大)、及び収量

【表 15】

形質転換構築物	GOI	イベント	幼虫/m作条 (季節累積)		落葉の% (季節最大)	
	Cry1Ac	GMA19478	6.0 ± 1.5	d	0.7 ± 0.7	c
構築物 1	Cry2Ab+Cry1A .105	2	2.5 ± 1.2	d	0 ± 0	c
		3	3.6 ± 1.3	d	0 ± 0	c
		4	3.2 ± 1.3	d	0.3 ± 0.3	c
		MON87751	3.5 ± 1.5	d	0 ± 0	c
		8	3.9 ± 0.8	d	0 ± 0	c
		9	3.0 ± 0.6	d	0 ± 0	c
		10	2.3 ± 0.5	d	0 ± 0	c
		11	3.0 ± 0.4	d	0 ± 0	c
		14	2.7 ± 0.9	d	0 ± 0	c
		18	4.3 ± 0.8	d	0.3 ± 0.3	c
構築物 2	Cry2Ab	20	7.0 ± 1.4	d	0 ± 0	c
		22	4.5 ± 0.7	d	0.3 ± 0.3	c
構築物 3	Cry1A.105	31	3.3 ± 0.9	d	0 ± 0	c
		29	5.0 ± 1.9	d	0 ± 0	c
	ネガティブ	A3555	152.0 ± 1 4.6	a	24.0 ± 1.0	a
		A5547	165.8 ± 1 1.6	a	24.0 ± 1.0	a
カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05でのチューキー-クレーマー平均検定)。						

10

20

【0154】

野外試験施設8で実施された別の露地試験において、食葉イモムシ、*C. includens* (41%)、*A. gemmatalis* (38%)、*S. frugiperda* (13%)、及び*S. ornithogalli* (8%)による中等度の淘汰圧は、成長のR4-R6ステージの間発生した。複製は、幼虫発生率 (F = 0.0924; df = 3, 52; P = 0.9639)、または落葉 (F = 0.372; df = 3, 52; P = 0.7735) における変動の有意な源ではなかった。イベントは、幼虫発生率 (F = 40.008, df = 13, 42, P < 0.0001) 及び落葉 (F = 11.9356, df = 13, 42, P < 0.0001) における変動の有意な源であった。累積幼虫発生率、及び最大落葉は、ネガティブチェックにおいて、それぞれ、m作条当り平均9.1~13.9幼虫、及び平均31~35% (後者は、経済的許容限界よりやや高い) であったが、ポジティブ対照、及びイベントMON87751を含む全てのテストイベントにおいて痕跡を越えなかった (表16)。試験において、非標的害虫の有意な発生は、認められなかった。

30

40

表16. 野外試験施設8で実施された、自然に寄生させた露地有効性試験における、食葉鱗翅目の幼虫累積発生率、落葉の最大パーセント、及び収量

【表 1 6】

形質転換構築物	イベント	GOI	累積 幼虫/m作条		落葉の最大%	
POS	GM_A19478	Cry1Ac	0.5 ± 0.2	C	0 ± 0	B
構築物 1	MON87751	Cry2Ab+Cry1A.105	0.3 ± 0.2	C	0 ± 0	B
	8		0.3 ± 0.2	C	0 ± 0	B
	10		0.7 ± 0.4	C	0.5 ± 0.5	B
構築物 2	20	Cry2Ab	0.7 ± 0.5	C	5.0 ± 5.0	B
構築物 3	29	Cry1A.105	1.3 ± 0.8	C	5.0 ± 5.0	B
構築物 4	32	Cry2Ab+Cry1A.105	1.4 ± 0.7	C	0.3 ± 0.3	B
	40		0.6 ± 0.1	C	0.3 ± 0.3	B
構築物 5	46	Cry2Ab	0.5 ± 0.1	C	0.3 ± 0.3	B
構築物 6	42	Cry1A.105	1.0 ± 0.4	C	0.3 ± 0.3	B
NEG	A3555	ネガティブ	9.1 ± 0.5	B	35.0 ± 9.6	A
	A5547		13.9 ± 1.0	A	31.3 ± 4.3	A
カラム内において、同じ文字が続く平均 (± S. E.) は、有意差がない (P < 0.05 でのデュエキークレーマー平均検定)。						

10

20

【 0 1 5 5】

野外試験施設 6 で実施された露地試験の第 2 季節の間、H. z e a による非常に高い淘汰圧が、成長の R 3 - R 5 ステージの間、発生した。複製は、被害を受けた鞘における変動の有意な源ではなかった (F = 0.0280; df = 3, 52; P = 0.9936)。イベントは、被害を受けた鞘における変動の有意な源であった (F = 15.4758, df = 13, 42, P < 0.0001)。ネガティブチェックは、平均 64 ~ 78% が被害を受けた鞘であったが、一方、イベント MON 8 7 7 5 1 を含むテストイベントのいずれにおいても、実質的な被害は発生しなかった (表 1 7)。

表 1 7 . 第 2 季節の間に野外試験施設 6 で実施された、自然に寄生させた露地有効性試験における、食葉鱗翅目の幼虫累積発生率、落葉の最大パーセント、鞘生産量、タバコガの (h e l i o t h i n e) 幼虫により被害を受けた鞘のパーセント、及び収量

30

【表 1 7】

形質転換構築物	イベント	GOI	被害を受けた鞘の%	
POS	GM_A19478	Cry1Ac	0.1 ± 0.1	C
構築物 1	MON87751	Cry2Ab+Cry1A.105	0.1 ± 0.1	C
	8		0.1 ± 0.1	C
	10		0.7 ± 0.4	C
構築物 2	20	Cry2Ab	0 ± 0	C
構築物 3	29	Cry1A.105	0 ± 0	C
構築物 4	32	Cry2Ab+Cry1A.105	0.1 ± 0.1	C
	40		0.5 ± 0.2	C
構築物 5	46	Cry2Ab	0.6 ± 0.4	C
構築物 6	42	Cry1A.105	0.6 ± 0.5	C
NEG	A3555	ネガティブ	63.8 ± 4.4	B
	A5547		78.0 ± 8.8	A
カラム内において、同じ文字が続く平均は、有意差がない (P < 0.05 でのデュエキークレーマー平均検定)。				

40

【 0 1 5 6】

本実施例において説明されている複数の露地試験の結果は、(実施例 3 で説明されている) 複数のスクリーンハウス (s c r e e n h o u s e) 試験の結果と合わされて、構築物 1、2、または 3 により生成されたトランスジェニックダイズイベントによって、5 つ

50

の植物世代（R2からR7まで）に亘って、遭遇される全ての鱗翅目ダイズ害虫の幼虫集団の有効で、季節の長い抑制をさらに確証し、世代内、及び世代間での安定した導入遺伝子の発現を示唆した。

【0157】

合わされた結果は、4つの主要な標的害虫（1つの地理的位置において、*Anticarsia gemmatalis*及び*Chrysodeixis includens*、並びに第2の地理的位置において、前記と同じ標的害虫に加えて*Rachiplusia nu*及び*Crocidosema aporema*）全てによる閾値を越えた淘汰圧の条件下において、イベントMON87751を含む、構築物1、2、または3で生成されたトランスジェニックイベントによる有効性が、*Cry1Ac*を発現し、鱗翅目昆虫のダイズ害虫を抑制することを事前に証明されているトランスジェニックイベントと等しかったことを示す。構築物2または3で生成され、それぞれ、*Cry2Ab*タンパク質のみ、または*Cry1A.105*タンパク質のみを発現するイベントもまた、*Cry1Ac*タンパク質を発現するトランスジェニックイベントと同等の有効性を示し、イベントMON87751における*Cry2Ab*及び*Cry1A.105*タンパク質の両方の発現が、耐昆虫性管理を改善することを通して、*Cry1Ac*トランスジェニックイベントを超えて耐性を改善させた可能性があることを示唆した。

10

【0158】

イベントMON87751を含む構築物1で生成されたイベント間での同等な有効性は、アワヨトウの3種（*Spodoptera exigua*、*S. frugiperda*、及び*S. eridania*）、2つのタバコガ類の（*Heliothine*）サヤムシガ（*Helicoverpa zea*及び*H. gelotopaeon*）、1つのstalk boring昆虫（*Elasmopalpus lignosellus*）、並びに1つの食葉害虫（*Plathypena scabra*）を含む、多数の第2の標的害虫に対しても示されている。

20

【0159】

実施例5

本実施例は、タンパク質発現、及び広範な分子キャラクタリゼーションを含む、イベントMON87751の分子キャラクタリゼーションを説明する。この分子キャラクタリゼーションを、農学野外試験、有効性スクリーンハウス（*screenhouse*）試験、及び有効性野外試験において試験されていたイベントと同時に完成させた。

30

【0160】

イベントMON87751の分子キャラクタリゼーションに関して、導入遺伝子挿入配列（*Cry2Ab*及び*Cry1A.105*カセットの両方、配列番号：9を含む）のコピー数を、サザン解析、及びエンドポイントTAQMAN（登録商標）アッセイの組み合わせを使用して決定した。分子解析によって、ベクターの主鎖の検出がなく、かつ、選択/スコア化可能マーカ配列を含むT-DNAカセットの検出がなく、単一の挿入（*Cry2Ab*及び*Cry1A.105*タンパク質の両方に関する発現カセットを含み、配列番号：9により表されるT-DNA発現カセット）のみ存在することが確認された。イベントMON87751のゲノミックDNAにおける単一の挿入（配列番号：9）の完全な配列によって、配列が、形質転換構築物の配列と同一であることが確認された。

40

【0161】

タンパク質発現に関して、イベントMON87751アレルに関してホモ接合の植物と、凍結乾燥された試料から調製された抽出物とから葉の試料を採取し、*Cry2Ab*または*Cry1A.105*に特異的な抗体をそれぞれ用いて*Cry2Ab*または*Cry1A.105*のタンパク質レベルを測定する標準的なプロトコルに従って、ELISAを実施し、乾燥重量の百万分率（ppm）として結果を表した。葉の試料を、構築物1、2、または3を用いた形質転換により生成されたイベント、及び非-トランスジェニック対照A3555に関して、植物成長のR1及びR3ステージで採取した。ELISAの結果は、構築物1及び構築物2から生成されたイベントに関する*Cry2Ab*レベルが、イベント8

50

(イベント8は、選択/スコア化可能マーカのT-DNAから、連鎖したウィルス性プロモータを有しているが、他の配列を含まないことが決定され、イベント8をさらに評価はしなかった)を除いて、約20ppmから約50ppmの乾燥重量の範囲に亘ったこと、及び、(Cry1A.105のみを発現する)構築物3から生成されたイベント、または非トランスジェニック対照からCry2Abの発現がなかったことを示した(図3A)。さらに、Cry2Abタンパク質の発現レベルは、R1及びR3成長ステージの両方に関して、ほぼ等しかった。ELISAの結果は、構築物1及び構築物3から生成されたイベントに関するCry1A.105レベルが、約150ppmから約800ppmの乾燥重量の範囲に亘ったこと、及び、(Cry2Abのみを発現する)構築物2で生成されたイベントからも、非トランスジェニック対照からもCry1A.105の発現がなかったことを示した(図3B)。さらに、Cry1A.105タンパク質の発現レベルは、R1成長ステージと比べて、R3成長ステージでの葉のサンプルに関してより高い範囲に亘っていた。

10

【0162】

別のELISAの結果は、構築物1で生成されたイベントからのCry2Abタンパク質のレベルが、構築物5または構築物4のいずれかで生成されたイベントと比べて高かったこと、及び、予想したように、非-トランスジェニック対照、または(Cry1A.105のみを発現する)構築物6で生成されたイベントのどちらに関しても、Cry2Abが全く検出されなかったことを示す(図4A)。葉の試料の同じセットにおいて、ELISAの結果は、構築物6または構築物4のいずれかで生成されたイベントと比べて、構築物1で生成されたイベントに関して、2倍以上高いレベルで、MON87751に関して、約4倍高いレベルで、Cry1A.105の発現があること、及び、予想していたように、非トランスジェニック対照、または(Cry2Abのみを発現する)構築物5で生成されたイベントのいずれに関しても、Cry1A.105の発現が全く検出されなかったことを示す(図4B)。これらのELISAに関して、葉の試料を、有効性スクリーンハウス(screenhouse)試験の2つの隔てられた場所の各々で成長した植物から、成長のR3ステージから採取した。

20

【0163】

さらに、ELISAの結果は、構築物1で生成されたイベント、及び構築物2で生成されたイベントからの抽出物におけるCry2Abタンパク質のレベルが、a)構築物4、構築物5、または構築物7のいずれかで生成されたイベントに比べて高かった；b)構築物9、若しくは構築物11のいずれかで生成されたイベントに比べてほぼ同じ、またはいくらか低かった；及びc)予想したように、(示されていない)非-トランスジェニック対照、または(Cry1A.105のみを発現する)構築物3若しくは構築物6のいずれかで生成されたイベントのどちらに関してもCry2Abが全く検出されなかったことを示す(図5)。これらのELISAに関して、葉の試料が、成長のR3及びR5ステージで採取され、Cry2Abレベルは、構築物1及び構築物2で生成されたイベントに関して、R5成長ステージでより高く、Cry2Abレベルは、構築物9、及び構築物11で生成されたイベントでより高かった(図5)。葉の試料の同じセットにおいて、ELISAの結果は、構築物1及び構築物3で生成されたイベントからの抽出物におけるCry1A.105タンパク質のレベルが、構築物4、構築物6、構築物9、または構築物7で生成されたイベントに比べて、優位に高かったこと、及び、予想したように、(示されていない)非-トランスジェニック対照、または(Cry2Abのみを発現する)構築物2若しくは構築物5のいずれかで生成されたイベントのどちらに関してもCry1A.105が全く検出されなかったことを示す(図6)。これらのELISAに関して、葉の試料が、成長のR3及びR5ステージで採取され、Cry1A.105のレベルは、構築物1及び構築物3で生成されたイベントに関して、構築物4、構築物6、構築物9、または構築物7で生成されたイベントに比べて、R5の成長ステージで数十倍高かった。0~5000ppmの乾燥重量でプロットされた図6AのY-軸、及び0~500ppmの乾燥重量でプロットされた図6BのY-軸を参照されたい。ELISAデータは、2つのCryタ

30

40

50

ンパク質発現カセット-Cry2Abをコードしている1つの発現カセット、及びCry1A.105をコードしている1つの発現カセットを全てが含んでいる、構築物4、構築物7、または構築物9で生成されるイベントに比べて、構築物1で生成されるイベントにおいて、Cry2Ab及びCry1A.105の両方のより高い発現があることを示す。また、(イベントMON87751を含む)構築物1、構築物2、及び構築物3で生成されたイベントにおける相対的に高いタンパク質の発現が、ダイズの少なくとも4世代(R0、R1、R2、及びR3)に亘って安定していたこと、及びCry1A.105タンパク質のレベルが、ホモ接合のイベントから成長のR3からR5ステージで採取された葉組織で増加したことが示された。

【0164】

実施例6

本実施例は、イベントMON87751 DNAの存在をダイズ試料において同定するのに有用な方法について説明する。1対のPCRプライマー、及びプローブは、ゲノミックDNAと、イベントMON87751の挿入されるDNAの任意に割り当てられた3'末端(すなわち、3'ジャンクション)との間に形成されたユニークなジャンクションを同定する目的で設計され、配列番号:10、配列番号:8、配列番号:2、配列番号:4、または配列番号:6を含んだ。

【0165】

オリゴヌクレオチドフォワードプライマーSQ20267の配列(配列番号:11)は、配列番号:10の位置11400~11426、及び配列番号:8の位置212~238、及び配列番号:9の位置10066~10092に対応する塩基配列と同一である。オリゴヌクレオチドリバープライマーSQ25826(配列番号:12)の配列は、配列番号:10の位置11454~11479、及び配列番号:8の位置266~291、及び配列番号:6の位置51~76、及び配列番号:4の位置31~56に対応する塩基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PB10263(配列番号:13)の配列は、配列番号:10の位置11428~11446、及び配列番号:9の位置10094~10112、及び配列番号:8の240~258、及び配列番号:6の位置25~43、及び配列番号:4の位置5~23に対応する塩基配列と同一である。PCRプライマーSQ20267(配列番号:11)及びSQ25826(配列番号:12)は、イベントMON87751の右側ジャンクションでのユニークなゲノミック/挿入DNAの80ヌクレオチドのアンプリコンを増幅する。蛍光標識(例えば、6FAM(商標)蛍光標識)される場合がある、この同じプライマーペアとプローブPB10263(配列番号:13)は、イベントMON87751由来のDNAの試料中での存在を同定するために、エンドポイントTaqMan(登録商標)PCRアッセイにおいて使用され得る。

【0166】

SQ20267(配列番号:11)、SQ25826(配列番号:12)及びPB10263(配列番号:13)に加えて、イベントMON87751由来のDNAの試料中での存在を検出するために、ユニークであり、かつ有用である配列番号:10内の配列を、増幅するため、及び/またはハイブリダイズするためのいずれかのために、他のプライマー及び/またはプローブが設計され得ることが当業者にとって明らかであるべきである。

【0167】

標準的な分子生物学の試験所基準に従い、イベントの同定のためのPCRアッセイを、試料中のイベントMON87751 DNAを検出するために開発した。標準的なPCRアッセイ、またはTaqMan(登録商標)PCRアッセイのいずれかのパラメーターを、イベントMON87751由来のDNAの試料中での存在を検出するために使用される、プライマーペア及びプローブ(すなわち、6FAM(商標)などの蛍光タグで標識されたプローブ)、SQ20267(配列番号:11)、SQ25826(配列番号:12)、及びPB10263(配列番号:13)の各セットと共に最適化した。PCR反応の対照は、ダイズゲノム中の単一コピー遺伝子に特異的な対照プライマー、及び、(例えば

10

20

30

40

50

、VIC (商標) - 標識された) 内部対照プローブを含む。当業者は、ダイズゲノム中の単一コピー遺伝子に特異的なプライマーを設計する方法を知っているだろう。一般的に、試料中のイベントMON87751 DNAの検出に最適化されたパラメーターは、プライマー及びプローブ濃度、鋳型DNA量、並びにPCR増幅サイクルのパラメーターを含んだ。鋳型DNA試料及び対照は、以下のものであった：[1] 分析するために、葉試料、または単一種子試料のいずれかから抽出したDNA；[2] ネガティブ対照DNA (非-トランスジェニックダイズDNA)；[3] ネガティブ水対照 (鋳型なし)；及び[4] ポジティブ対照MON87751 DNA。試料中のイベントMON87751 DNAを同定するアンプリコンを作製する、当業者に既知の他の方法が、当技術分野の技術に含まれる。

10

【0168】

接合状態アッセイは、イベントを含む植物が、イベントDNAに関してホモ接合であるかどうか、；染色体ペアの各染色体上の同じ位置に外来性DNAを含んでいる；または、イベントDNAに関してヘテロ接合であり、染色体ペアのうち1つの染色体上のみ外来性DNAを含んでいる；または、イベントDNAに関してヌルであり、野生型である、を決定するのに有用である。エンドポイントTAQMAN (登録商標) 熱増幅方法を、イベントMON87751に関する接合状態アッセイを開発するために使用した。このアッセイに関して、3つのプライマー、及び2つのプローブを、アッセイのために試料と共に混合した。3つのプライマーは、挿入された外来性DNAの3'領域から特異的に、ハイブリダイズし伸張するSQ20267 (配列番号：11)；挿入された外来性DNAの3'側に隣接するダイズゲノミックDNAから特異的に、ハイブリダイズし伸張するプライマーSQ27115 (配列番号：14)；及び、挿入された外来性DNAの5'側に隣接するダイズゲノミックDNAから特異的に、ハイブリダイズし伸張するプライマーSQ26901 (配列番号：15)であった。プライマー、SQ20267及びSQ27115、並びに、(6-FAM (商標) - 標識された) プローブ、PB10263 (配列番号：13)は、鋳型DNAに存在する挿入された外来性DNAのコピーがあるときに、すなわち、イベントMON87751の診断となる。プライマー、SQ26901及びSQ27115、並びに(VIC (商標) - 標識された) プローブ、PB11254 (配列番号：16)は、ゲノミックDNAに存在する挿入された外来性DNAのコピーがないとき、すなわち、野生型であるときに、診断となる。3つのプライマー、及び2つのプローブが、PCR反応で、イベントMON87751に関してホモ接合である植物から抽出されたDNAと共に混合されるとき、イベントMON87751に関してホモ接合の植物の指標、及び診断となる6-FAM (商標) - 標識されたプローブ、PB10263のみからの蛍光シグナルがある。3つのプライマー、及び2つのプローブが、PCR反応で、イベントMON87751に関してヘテロ接合である植物から抽出されたDNAと共に混合されるとき、イベントMON87751に関してヘテロ接合の植物の指標、及び診断となる6-FAM (商標) - 標識されたプローブ、PB10263、及びVIC (商標) - 標識されたプローブ、PB11254の両方からの蛍光シグナルがある。3つのプライマー、及び2つのプローブが、PCR反応で、イベントMON87751に関してヌルである (すなわち、野生型) 植物から抽出されたDNAと共に混合されるとき、イベントMON87751に関してヌルである (すなわち、野生型) 植物の指標、及び診断となるVIC (商標) - 標識されたプローブ、PB11254のみからの蛍光シグナルがある。鋳型DNA試料、及び対照は、以下のものであった：[1] 分析するために、葉試料、または単一種子試料のいずれかから抽出したDNA；[2] ネガティブ対照DNA (非-トランスジェニックDNA)；[3] ネガティブ水対照 (鋳型なし)；及び[4] 既知のヘテロ接合試料からのポジティブ対照MON87751ゲノミックDNA、及び；[5] 既知のホモ接合試料からのポジティブ対照MON87751ゲノミックDNA。

20

30

40

【0169】

実施例7

以下の実施例は、ダイズイベントMON87751を使用する任意の繁殖活動の子孫に

50

含まれるMON87751イベントを同定する方法がある方法を説明する。

【0170】

DNAイベントプライマーペアを、ダイズイベントMON87751の診断となるPCRアンプリコンを作製するために使用した。MON87751の診断となるアンプリコンは、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として与えられる、少なくとも1つのジャンクション配列を含む。MON87751の診断となるアンプリコンを作製し得るプライマーペアは、隣接配列、及び挿入された発現カセット（配列番号：9）に基づくプライマーペアを含む。配列番号：1、または配列番号：3、または配列番号：5がその中に見られる、診断となるアンプリコンを得るために、配列番号：7の塩基1～1334に基づくフォワードプライマー分子、及び挿入された発現カセットDNA配列（配列番号：9の位置1～10119）に基づくリバースプライマー分子が設計されるであろう。これらのプライマー分子は、配列番号：7及び配列番号：9に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの隣接するヌクレオチドである。配列番号：2、または配列番号：4、または配列番号：6がその中に見られる、診断となるアンプリコンを得るために、挿入された発現カセットDNA配列（配列番号：9の位置1～10119）に基づくフォワードプライマー分子、及び3'隣接配列（配列番号：8の位置266～1452）に基づくリバースプライマー分子が設計されるであろう。これらのプライマー分子は、配列番号：8及び配列番号：9に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの隣接するヌクレオチドである。

10

20

【0171】

本分析のための増幅条件の実施例が、実施例4で示される。しかしながら、これらの方法、または、配列番号：7若しくは配列番号：8と相同な、若しくは相補的なDNAプライマー、若しくは、MON87751の診断となるアンプリコンを作製する、MON87751の導入遺伝子挿入（配列番号：9）に含まれる遺伝子のDNA配列の使用に対するあらゆる変更は、当技術分野内に含まれる。診断となるアンプリコンは、少なくとも1つの導入遺伝子/ゲノミックジャンクションDNA（配列番号：1、若しくは配列番号：2、若しくは配列番号：3、若しくは配列番号：4、若しくは配列番号：5、若しくは配列番号：6）と相同な、若しくは相補的なDNA分子、または前記DNA分子のかなりの部分を含む。あるいは、診断となるアンプリコンは、少なくとも1つのユニークな導入遺伝子配列（配列番号：17、若しくは配列番号：18、若しくは配列番号：19、若しくは配列番号：20、若しくは配列番号：21、若しくは配列番号：22、若しくは配列番号：23）と相同な、または相補的なDNA分子を含む。

30

【0172】

イベントMON87751の植物組織試料に関する分析は、イベントMON87751からのポジティブ組織対照、イベントMON87751ではないダイズ植物からのネガティブ対照（例えば、A3555であるが、これに限定はされない）、及びダイズゲノミックDNAを含まないネガティブ対照を含む。外来性ダイズDNA分子を増幅し得るプライマーペアは、DNA増幅条件に関して内部対照として機能するであろう。別のプライマー配列は、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9から、DNA増幅法の技術分野における当業者によって選択され得る。実施例4で示される方法によるアンプリコンの作製のために選択される条件は、異なってもよいが、結果として、イベントMON87751 DNAの診断となるアンプリコンをもたらす。実施例4の方法に修正を加えた、これらのDNAプライマー配列の使用は、本発明の範囲内にある。MON87751の診断となる、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9由来の少なくとも1つのDNAプライマー配列により作製されるアンプリコンは、本発明の1つの態様である。

40

【0173】

DNA検出キットは、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9由来の十分な長さの隣接ヌクレオチドから成る少なくとも1つのDNAプライマーを含み、前記DNAプライマーは、DNA増幅法において使用される場合、本発明の1つの態様である、MO

50

N 8 7 7 5 1、またはその子孫の診断となるアンプリコンを作製する。DNA増幅法で試験された場合に、MON 8 7 7 5 1の診断となるアンプリコンを作製し得るMON 8 7 7 5 1ダイズ植物、植物部位、植物細胞、種子、または商品生産物は、本発明の1つの態様である。MON 8 7 7 5 1アンプリコンに関するアッセイは、Applied Biosystems GeneAmp (登録商標) PCRシステム9700 (最大速度で作動)、またはMJ Research DNA Engine PTC-225サーマルサイクラー、または実施例4に示されているようにMON 8 7 7 5 1の診断となるアンプリコンを作製するために使用し得る、任意の他の増幅システムを使用することによって実施され得る。

【0174】

実施例8

増強された農業特性、殺虫特性、若しくは除草特性を有するダイズ植物、またはその植物部位を作製するために、イベントMON 8 7 7 5 1を含むダイズ植物を、任意の他のダイズイベント、またはそれらの組み合わせを潜在的に含むダイズ植物と交配し、子孫植物の得られた特性を決定するために、表現型を評価した。このような植物繁殖から得られる子孫植物に与えられた特性は、イベントMON 8 7 7 5 1の鱗翅目抵抗性を超えて拡張することができ、地上部の害虫防除、除草剤耐性、殺線虫作用、耐乾燥性、ウイルス抵抗性、抗真菌防除、細菌抵抗性、雄性不稔性、耐寒性、耐塩性、収量増大、油成分の増強、油分の増加、養分利用効率の増強、またはアミノ酸含有量の変化を含むが、これらに限定はされない。改良された農業形質を伴うトランスジェニックイベントの実施例は、当技術分野においてよく知られている。以下は、ダイズ植物、植物部位、種子、または商品生産物において増強された特性を与えるために、イベントMON 8 7 7 5 1との繁殖で使用され得る、可能なトランスジェニックダイズ系統の非限定的なリストである。繁殖は、以下のうちの任意の、及び全ての組み合わせを含んでもよい：除草剤耐性：ダイズGTS 40 - 3 - 2、MON 8 7 7 0 8、MON 8 9 7 8 8、A 2 7 0 4 - 1 2、A 2 7 0 4 - 2 1、A 5 5 4 7 - 3 5、A 5 5 4 7 - 1 2 7、BPS - CV 1 2 7 - 9、DP 3 5 6 0 4 3、GU 2 6 2、W 6 2、W 9 8、DAS - 4 4 4 0 6 - 6、DAS - 6 8 4 1 6 - 4、FG 7 2、BPS - CV 1 2 7 - 9、SYHT 0 4 R、SYHT 0 H 2、3 5 6 0 . 4 . 3 . 5、EE - GM 3、pDAB 4 4 7 2 - 1 6 0 6、pDAB 4 4 6 8 - 0 4 1 6、pDAB 8 2 9 1 . 4 5 . 3 6 .、1 2 7、AAD - 1 2；虫害抵抗性：MON 8 7 7 0 1、DAS - 8 1 4 1 9 - 2；油成分の増強：DP - 3 0 5 4 2 3、G 9 4 - 1、G 9 4 - 1 9、G 1 6 8、OT 9 6 - 1 5、MON 8 7 7 0 5、MON 8 7 7 6 9；収量増大：MON 8 7 7 1 2。

【0175】

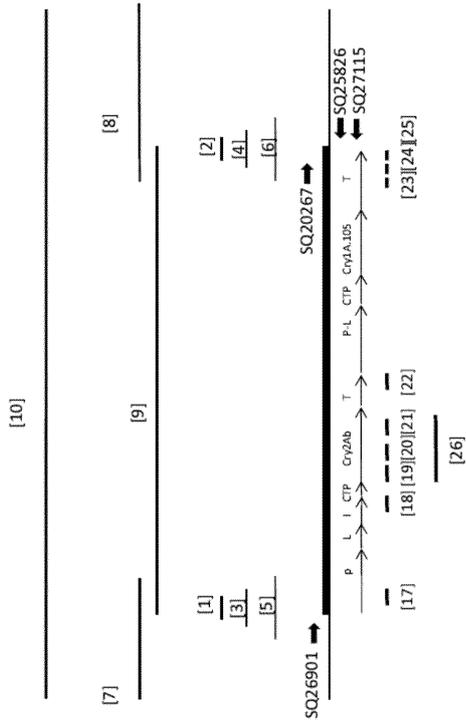
本明細書で引用され、本発明の資料である、全ての文献、及び公開された特許資料は、個々の文献または特許出願が参照により取り込まれることが、具体的かつ個々に示される場合と同程度に本明細書に参照により組み込まれる。

10

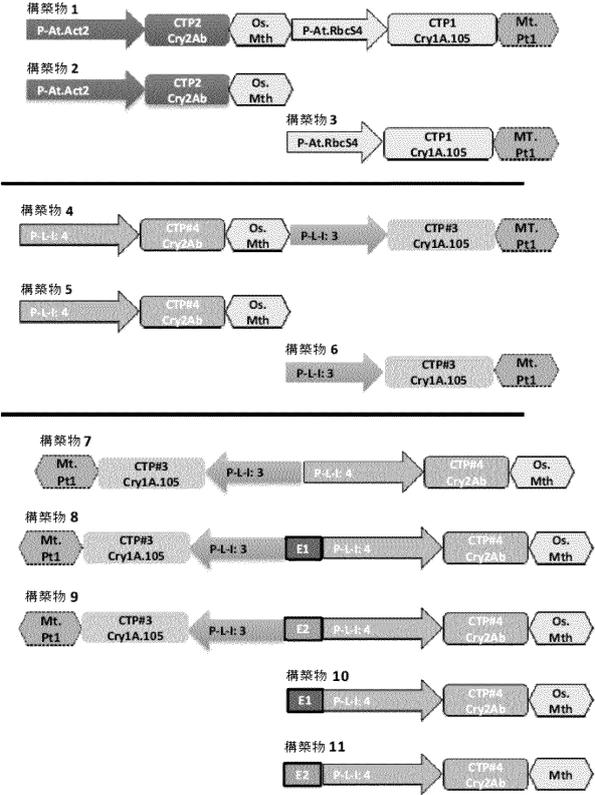
20

30

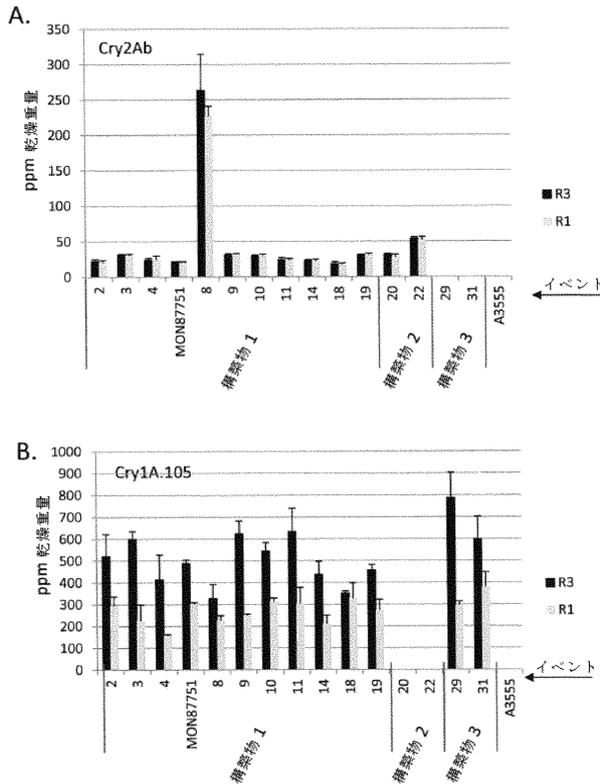
【 図 1 】



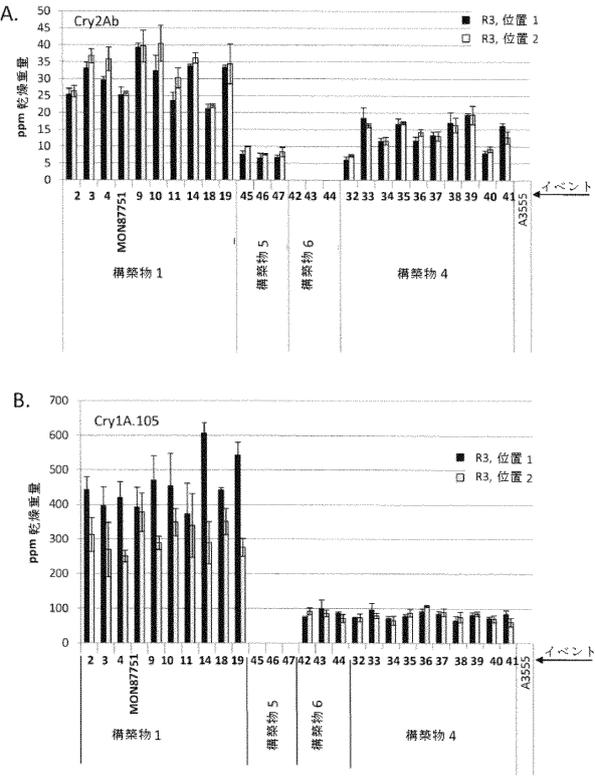
【 図 2 】



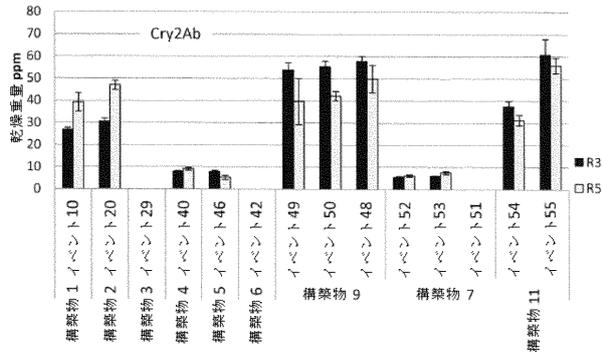
【 図 3 】



【 図 4 】

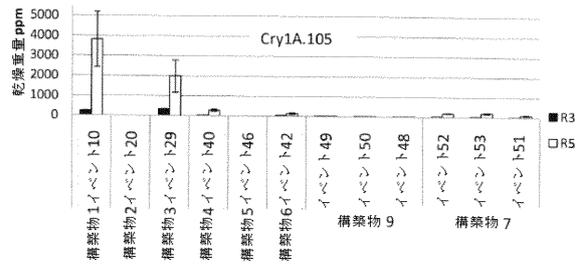


【図5】

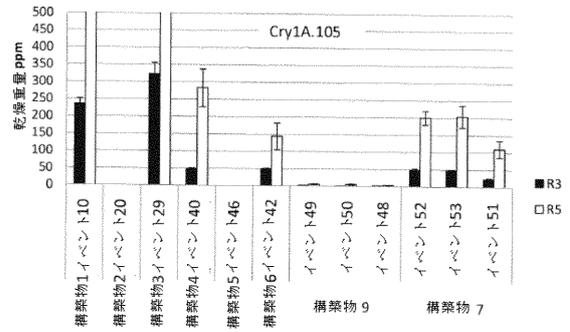


【図6】

A.



B.



【配列表】

0006635916000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 キム・エイ・ビーズリー
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・ブールバード800番
- (72)発明者 ウェン・シー・バーンズ
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・ブールバード800番
- (72)発明者 ロバート・エイチ・コール・ザ・セカンド
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・ブールバード800番
- (72)発明者 テッド・シー・マクレイ
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・ブールバード800番
- (72)発明者 ジョン・エイ・ミクロス
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・ブールバード800番
- (72)発明者 リサ・ジー・ラシュク
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・ブールバード800番
- (72)発明者 カイロン・ティアン
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・ブールバード800番
- (72)発明者 リーピン・ウェイ
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・ブールバード800番
- (72)発明者 クンシェン・ウ
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・ブールバード800番

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 特表2009-505679(JP,A)
国際公開第00/026371(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
A01H 5/00 - 5/28
C12N 5/00 - 5/28
C12Q 1/00 - 1/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)