(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-503884
(P2020-503884A)
(43)公表日　令和2年2月6日(2020.2.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	ZNAZ	2B030
C12N 15/82	(2006.01)	C12N	15/82	Z	4B064
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 33 頁）　最終頁に続く

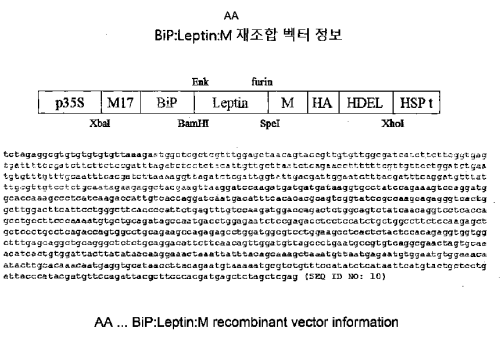
(21)出願番号　特願2019-538440 (P2019-538440)
(86)(22)出願日　平成30年1月17日 (2018.1.17)
(85)翻訳文提出日　令和1年9月11日 (2019.9.11)
(86)国際出願番号　PCT/KR2018/000807
(87)国際公開番号　WO2018/135860
(87)国際公開日　平成30年7月26日 (2018.7.26)
(31)優先権主張番号　10-2017-0008160
(32)優先日　平成29年1月17日 (2017.1.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国 (KR)

(71)出願人　519142114
バイオアプリケーションズ　インコーポレイテッド
ＢＩＯＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ　ＩＮＣ．
大韓民国　３７６６８　キョンサンプク－ド、ポハン－シ、ナム－グ、チコク－ロ、３９４（チコク－トン、ポハン　テクノパーク）
(74)代理人　110000729
特許業務法人　ユニアス国際特許事務所
(72)発明者　ファン、イン　ファン
大韓民国　３７６７３　キョンサンプク－ド、ポハン－シ、ナム－グ、チコク－ロ、１５５、９－１７０２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物細胞における目的タンパク質の発現のための組換えベクター

(57)【要約】
グリコシル化ドメインを用いて、植物細胞において目的タンパク質を高発現させる技術に関し、グリコシル化ドメインと目的タンパク質との融合タンパク質コーディング遺伝子を含む組換えベクター、組換え細胞、形質転換植物、及びこれらを用いた目的タンパク質の生産方法が提供される。
【選択図】図１



AA ... BiP:Leptin:M recombinant vector information

【特許請求の範囲】
【請求項１】
目的タンパク質及び前記目的タンパク質のＣ－末端又はＮ－末端に融合したＮ－グリコシル化ドメインを含む融合タンパク質をコーディングする遺伝子を含む組換えベクターと、
前記組換えベクターを含む組換え細胞と、
前記組換え細胞を含む形質転換有機体と、
からなる群から選ばれた１種以上を含む、目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項２】
前記Ｎ－グリコシル化ドメインは、配列番号２のヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン又は前記Ｍドメインの一部を含む、配列番号１のヒトＣＤ４５タンパク質内の連続する１０～１００個のアミノ酸の長さのポリペプチドであり、
前記Ｍドメインの一部は、配列番号２の２番目の位置のアスパラギン残基、３０番目の位置のアスパラギン残基、４０番目の位置のアスパラギン残基、及び４６番目の位置のアスパラギン残基の中から選ばれる１つ以上のＮ－グリコシル化の位置を含む１０以上のアミノ酸、を含むポリペプチド断片である、請求項１に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項３】
前記Ｍドメインの一部は、ＬＴＥＣＫＮＡＳＶＳ　ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ（配列番号６）又はＮＶＮＥＮＶＥＣＧＮ　ＮＴＣＴＮＮＥＶＨＮ　ＬＴＥＣＫＮＡＳＶＳ　ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ（配列番号７）を含む、配列番号２内の連続する１０以上のアミノ酸長のポリペプチド断片である、請求項２に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項４】
前記Ｍドメインの一部は、ＮＶＮＥＮＶＥＣＧＮ　ＮＴＣＴＮＮＥＶＨＮ　ＬＴＥＣＫＮＡＳＶＳ　ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ（配列番号７）を含む、配列番号２内の連続する２０以上のアミノ酸長のポリペプチド断片である、請求項２に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項５】
前記融合タンパク質は、目的タンパク質とＮ－グリコシル化ドメインの間に、ペプチドリンカーをさらに含むものである、請求項１～４のいずれか一項に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項６】
前記融合タンパク質は、小胞体で標的化されるものである、請求項１～４のいずれか一項に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項７】
前記組換えベクターは、ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）コーディング遺伝子、ＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドコーディング遺伝子、又はその両方をさらに含むものである、請求項１～４のいずれか一項に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項８】
前記細胞は植物細胞であり、前記有機体は植物である、請求項１～４のいずれか一項に記載の目的タンパク質の生産用組成物。
【請求項９】
目的タンパク質及び前記目的タンパク質のＣ－末端又はＮ－末端に融合したＮ－グリコシル化ドメインを含む融合タンパク質をコーディングする遺伝子を含む、目的タンパク質の発現用組換えベクター。
【請求項１０】
前記融合タンパク質は、目的タンパク質とＮ－グリコシル化ドメインの間にペプチドリンカーをさらに含むものである、請求項９に記載の目的タンパク質の発現用組換えベクター。

【請求項１１】
前記融合タンパク質は、小胞体で標的化されるものである、請求項９に記載の目的タンパク質の発現用組換えベクター。
【請求項１２】
ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）コーディング遺伝子、ＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドコーディング遺伝子、又はその両方をさらに含む、請求項９に記載の目的タンパク質の発現用組換えベクター。
【請求項１３】
植物細胞における発現に使用するためのものである、請求項９～１２のいずれか一項に記載の植物細胞発現用組換えベクター。
【請求項１４】
請求項９～１２のいずれか一項に記載の組換えベクターを含む、組換え細胞。
【請求項１５】
請求項１４の組換え細胞を含む形質転換有機体。
【請求項１６】
請求項１４の組換え細胞を培養するステップを含む、目的タンパク質の生産方法。
【請求項１７】
請求項１５の形質転換有機体を成長させるステップを含む、目的タンパク質の生産方法。
【請求項１８】
Ｎ－グリコシル化ドメインをコーディングする遺伝子又は前記遺伝子を含む組換えベクターを含み、
前記Ｎ－グリコシル化ドメインは、配列番号２のヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン又は前記Ｍドメインの一部を含む、配列番号１のヒトＣＤ４５タンパク質内の連続する１０～１００個のアミノ酸の長さのポリペプチドであり、
前記Ｍドメインの一部は、配列番号２の２番目の位置のアスパラギン残基、３０番目の位置のアスパラギン残基、４０番目の位置のアスパラギン残基、及び４６番目の位置のアスパラギン残基の中から選ばれる１つ以上のＮ－グリコシル化の位置を含む１０以上のアミノ酸、を含むポリペプチド断片である、タンパク質の発現用組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、糖化ドメインを用いて植物細胞において目的タンパク質を高発現させる技術に関し、糖化ドメインと目的タンパク質の融合タンパク質コーディング遺伝子を含む組換えベクター、組換え細胞、形質転換植物、及びこれらを用いた目的タンパク質生産方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
分子生物学と遺伝子工学技術の目覚ましい発達は、植物分野にも適用されて、植物体から有用な生理活性物質を生産しようとする努力が着実に続いている。植物から有用な物質を生産する場合、生産単価を大幅に減らすことができ、従来の動物細胞や微生物から合成してタンパク質を分離精製する方法において発生し得るウイルス、癌遺伝子、腸毒素のようないくつかの汚染源を完全に排除することができ、商品化の段階でも、動物細胞や微生物とは異なり、種子で長期保管及び管理が可能であるという利点を有する。また、該当有用物質の需要が急増する場合、大量生産に必要な設備技術やコスト面で、既存の動物細胞のシステムに比べて絶対的に有利であるため、高まった需要に応じた供給が最短期間で可能であるということも長所である。
【０００３】
しかしながら、このような長所にもかかわらず、植物細胞からタンパク質を生産するに当たり、動物細胞を含む他の宿主に比べて相対的に低いタンパク質の発現レベルが最大の

短所となっている。これに多くの研究が進められており、さまざまな方法で植物細胞からタンパク質の発現量を増加させようとする試みがあった。

【０００４】

以前まで植物細胞から目的タンパク質の発現量を増加させるための研究は、殆どタンパク質の発現過程の中でｍＲＮＡからタンパク質が作製される翻訳ステップ以前の転写ステップに集中していて、ｍＲＮＡからタンパク質が翻訳されるとき、タンパク質の発現量を増加させうる方法に関する研究は、多く行われていなかった。

【０００５】

一方、従来のＮ－グリコシル化（Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）がタンパク質の安定性に影響を及ぼすということはよく知られている。この場合には、Ｎ－グリカンがプロテアーゼからタンパク質を保護するため、安定性を高めると考えられた。また、他の機序でタンパク質の３次元構造に追加的な結合力を提供して安定性を提供することが知られている。

【０００６】

本発明者らは、植物細胞から目的タンパク質を生産するに当たり、翻訳ステップで目的タンパク質の発現レベルを高めるため、鋭意努力した結果、糖化を起こす小さいドメインを目的タンパク質に融合したとき、タンパク質の発現レベルが高くなることを確認した。これを用いて形質転換植物体から目的タンパク質の生産効率を画期的に向上させることができるという点を立証することにより、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明は、Ｎ－グリコシル化ドメインの目的タンパク質の発現に使用する用途に関する。

【０００８】

一例では、Ｎ－グリコシル化ドメインをコーディングする遺伝子、前記遺伝子を含む組換えベクター、及び前記組換えベクターを含む組換え細胞からなる群から選ばれた１種以上を含む目的タンパク質の発現用組成物を提供する。

【０００９】

前記目的タンパク質の発現用組成物は、目的タンパク質コーディング遺伝子又は前記遺伝子を含む組換えベクターをさらに含むことができる。このとき、前記目的タンパク質コーディング遺伝子とＮ－グリコシル化ドメインコーディング遺伝子は、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質をコーディングする遺伝子又はこれを含む組換えベクターの形態で含まれることができる。

【００１０】

前記Ｎ－グリコシル化ドメインは、Ｎ－グリコシル化可能な残基（Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ）を１つ以上、又は２つ以上含むＮ－グリコシル化ドメイン（例えば、多重Ｎ－グリコシル化ドメイン）であってもよく、一具体例において、ＣＤ４５由来Ｍドメイン、例えばヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン又はその一部を含むものであってもよい。前記目的タンパク質の発現は、真核細胞（例えば、植物細胞）又は真核有機体（例えば、植物体）内で行われるものであってもよい。

【００１１】

他の例では、Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターを提供する。

【００１２】

他の例では、前記組換えベクターが導入された組換え細胞を提供する。前記細胞は、真核細胞、例えば、植物細胞であってもよい。

【００１３】

前記融合タンパク質コーディング遺伝子を含む組換えベクター及び／又は組換え細胞は、目的タンパク質の生産を増進させる用途として使用されうる。したがって、他の例では

、Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクター及び／又は組換え細胞を含む目的タンパク質の生産用、又は、目的タンパク質の生産増進用組成物を提供する。

【００１４】

他の例では、前記Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターが導入された形質転換有機体を提供する。前記形質転換有機体は、形質転換真核有機体、例えば、形質転換植物体であってもよい。

【００１５】

他の例では、前記目的タンパク質の生産用組成物又は生産増加用組成物を細胞に導入させるステップを含む目的タンパク質の生産方法、又は目的タンパク質の生産増加方法を提供する。前記方法は、目的タンパク質コーディング遺伝子を細胞に単独導入させた場合（すなわち、Ｎ－グリコシル化ドメインを含んでいない組換えベクターを介して導入させた場合）と比較して、目的タンパク質の発現量又は生産量を増加させることができることを特徴とする。

【課題を解決するための手段】

【００１６】

本発明は、上述した問題点を解決するためのもので、Ｎ－グリコシル化ドメインの植物体内の目的タンパク質の発現に使用する用途、より具体的に、目的タンパク質をコーディングする遺伝子、及び前記遺伝子のＣ－末端該当部位（３’末端）、又はＮ－末端該当部位（５’末端）にＮ－グリコシル化ドメインをコーディングする遺伝子を融合して発現させることにより、目的タンパク質の発現レベルを増加させる技術を提案する。

【００１７】

一例では、Ｎ－グリコシル化ドメインをコーディングする遺伝子、前記遺伝子を含む組換えベクター、及び前記組換えベクターを含む組換え細胞からなる群から選ばれた１種以上を含む目的タンパク質の発現用組成物を提供する。

【００１８】

前記目的タンパク質の発現用組成物は、目的タンパク質コーディング遺伝子又は前記遺伝子を含む組換えベクターをさらに含むことができる。このとき、前記目的タンパク質コーディング遺伝子とＮ－グリコシル化ドメインコーディング遺伝子は、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質をコーディングする遺伝子、又はこれを含む組換えベクターの形態で含まれることができる。

【００１９】

前記Ｎ－グリコシル化ドメインはＮ－グリコシル化可能な残基を１つ以上、又は２つ以上を含むＮ－グリコシル化ドメインであってもよく、一具体例において、ＣＤ４５由来Ｍドメイン又はその一部、例えば、ヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン又はその一部を含むことができる。前記目的タンパク質の発現は、真核細胞（例えば、植物細胞）、又は真核有機体（例えば、植物体）内で行われるものであってもよい。

【００２０】

他の例では、Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターを提供する。前記組換えベクターは、真核細胞、例えば、植物細胞で発現するためのものであってもよい。

【００２１】

他の例では、前記Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換え細胞を提供する。前記組換え細胞は、細胞にＮ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターが導入されたものであってもよい。前記細胞は、真核細胞、例えば、植物細胞であってもよい。

【００２２】

他の例では、前記Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む形質転換有機体を提供する。前記形質転換有機体は、有機体

にＮ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターが導入されたものであってもよい。前記形質転換有機体は、形質転換真核有機体、例えば、形質転換植物体であってもよい。前記形質転換有機体は、前述の組換え細胞を含む真核有機体（例えば、植物体）であってもよい。

【００２３】

前記融合タンパク質コーディング遺伝子を含む組換えベクター及び／又は組換え細胞及び／又は形質転換有機体は、目的タンパク質の生産用、又は目的タンパク質の生産を増進させる用途として使用されうる。

【００２４】

したがって、他の例では、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子、前記遺伝子を含む組換えベクター、前記組換えベクターを含む組換え細胞、及び前記組換えベクターを含む形質転換有機体からなる群から選ばれた１種以上を含む目的タンパク質の生産用、又は目的タンパク質の生産増進用組成物を提供する。

【００２５】

他の例では、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換え細胞を培養するステップを含む目的タンパク質の生産方法、又は目的タンパク質の生産増加方法を提供する。前記組換え細胞は、細胞にＮ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターが導入されたものであってもよい。前記細胞は、真核細胞、例えば、植物細胞であってもよい。前記方法は、前記培養するステップの以前に、Ｎ－グリコシル化ドメイン及び目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターを細胞に導入させるステップをさらに含むことができる。前記方法は、前記培養するステップの以後に、前記培養された細胞（細胞、細胞破砕物、又は細胞溶解物）及び／又は培養培地から目的タンパク質を分離（又は抽出）及び／又は精製するステップをさらに含むことができる。

【００２６】

他の例では、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む形質転換有機体を成長させるステップを含む、目的タンパク質の生産方法、又は目的タンパク質の生産増加方法を提供する。前記有機体は、真核有機体、例えば、植物であってもよい。前記方法は、前記成長させるステップの前に、Ｎ－グリコシル化ドメインと目的タンパク質を含む融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターを有機体に導入させるステップをさらに含むことができる。前記方法は、前記成長させるステップの後に、前記真核有機体（例えば、植物）、又は前記真核有機体の細胞（細胞、細胞破砕物、細胞溶解物、又は前記細胞の培養物）から目的タンパク質を分離（又は抽出）及び／又は精製するステップをさらに含むことができる。

【００２７】

前記方法は、目的タンパク質コーディング遺伝子を細胞又は有機体に単独導入させた場合（すなわち、Ｎ－グリコシル化ドメインを含んでいない組換えベクターを介して導入させた場合）、目的タンパク質をＯ－糖化ドメインと融合して使用する場合、及び／又は別個のＮ－グリコシル化ドメインが融合されず、目的タンパク質が内在的にＮ－グリコシル化残基を含む場合と比較して、目的タンパク質の発現量又は生産量を増加させることができることを特徴とする。

【００２８】

一実施例において、前記Ｎ－グリコシル化ドメインは、Ｎ－グリコシル化残基（Ｎ－グリコシル化が起こるアミノ酸；アスパラギン（Ａｓｎ））を１個以上、又は２個以上、例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、又は１０個含み、総アミノ酸数が１０～１００個、又は２０個～８０個のポリペプチドであってもよい。一具体例において、Ｎ－グリコシル化ドメインは、ヒトＣＤ４５内の少なくともヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン（Ｍ　ｄｏｍａｉｎ；４個のＮ－グリコシル化残基を含む）、又はその一部

を含む連続する１０～１００個、又は２０個～８０個のアミノ酸を含むポリペプチドであってもよい。例えば、前記ヒトＣＤ４５タンパク質は、配列番号５（ＵｎｉＰｒｏｔ ｎｏ．Ｐ０８５７５）のアミノ酸配列で表現されるものであってもよい。前記ヒトＣＤ４５由来Ｍドメインは、ヒトＣＤ４５タンパク質（配列番号５）の２３１番目の残基のＡｌａから２９０番目の残基のＡｓｐまでの計６０個のアミノ酸からなるポリペプチド

（６０ａａ；A<u>N</u>ＩＴＶＤＹＬＹＮ ＫＥＴＫＬＦＴＡＫＬ ＮＶＮＥＮＶＥＣＧ<u>N</u>ＮＴＣＴＮＮＥＶＨ<u>N</u> ＬＴＥＣＫ<u>N</u>ＡＳＶＳ ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ；配列番号２；下線と太字は、Ｎ－グリコシル化残基を示す）

であってもよい。一具体例において、前記ヒトＣＤ４５由来Ｍドメインを暗号化する遺伝子は、配列番号１の核酸配列を含むものであってもよい。前記ヒトＣＤ４５由来Ｍドメインの一部は、前記ＣＤ４５由来ＭドメインのうちのＮ－グリコシル化残基（例えば、配列番号２の２番目の位置のN(Ａｓｎ）、３０番目の位置のN(Ａｓｎ）、４０番目の位置のN(Ａｓｎ）、及び４６番目の位置のN(Ａｓｎ）の中から選ばれる）を１個以上、又は２個以上、例えば、１個、２個、３個、又は４個を含む連続する１０個以上、１５個以上、又は２０個以上のアミノ酸を含むポリペプチド断片であってもよい。前記ポリペプチド断片は、配列番号２のアミノ酸配列において、少なくとも４０番目の位置のＮと４６番目の位置のＮの中から選ばれた１個以上のアミノ酸残基を含む連続する１０個以上、１５個以上、又は２０個以上のアミノ酸を含むポリペプチドであってもよく、例えば、「ＬＴＥＣＫＮＡＳＶＳ ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ（配列番号６）」、又は「ＮＶＮＥＮＶＥＣＧＮ ＮＴＣＴＮＮＥＶＨＮ ＬＴＥＣＫＮＡＳＶＳ ＩＳＨＮＳＣＴＡＰＤ（配列番号７）」）であってもよいが、これに限定されるものではない。一例において、前記Ｎ－グリコシル化ドメインは、ヒトＣＤ４５タンパク質（配列番号５）中のＭドメイン（配列番号２）又は前記Ｍドメイン（配列番号２）中の連続する１０個以上、１５個以上、又は２０個のアミノ酸を含むＭドメインの一部を含む連続する１０～１００個又は２０個～８０個のアミノ酸を含むポリペプチド（例えば、配列番号６、７、又は８）であってもよい。一実施例において、前記Ｍドメインをコーディングする遺伝子は、配列番号１で表される核酸配列を有するものであってもよい。

【００２９】

一実施例において、前記組換えベクターは、転写調節因子、翻訳調節因子、遺伝子発現を確認できるマーカーなどからなる群から選ばれた１種以上をさらに含むことができる。

【００３０】

一実施例において、前記転写調節因子は、細胞、例えば、植物細胞における転写調節のために通常使用されるすべての転写因子の中から選ばれた１種以上であってもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス ３５Ｓ ＲＮＡプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス１９Ｓ ＲＮＡプロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルス（Ｆｉｇｗｏｒｔ Ｍｏｓａｉｃ Ｖｉｒｕｓ）由来の全長転写プロモーター及びタバコモザイクウイルスコートタンパク質プロモーターにからなる群より選ばれる１種以上であってもよいが、これに限定されるものではない。

【００３１】

前記翻訳調節因子は、細胞、例えば、植物細胞において翻訳調節のために通常使用されるすべての翻訳調節因子の中から選ばれた１種以上であってもよく、例えば、Ｍ１７因子であってもよいが、これに限定されるものではない。前記Ｍ１７因子は、配列番号３の核酸配列で表示されるものであってもよい。

【００３２】

さらに他の実施例において、前記組換えベクターは、特定の細胞内小器官へのターゲティング（移動及び／又は滞留（ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ））のためにシグナル配列をさらに含むことができる。一例では、前記組換えベクターは、小胞体（ＥＲ）にターゲティングさ

れるように設計されたものであってもよく、そのために小胞体（例えば、細胞体膜の表面）移動シグナル（例えば、ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）コーディング遺伝子など）及び／又は小胞体滞留シグナル（例えば、ＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドコーディング遺伝子）をさらに含むことができる。前記細胞内小器官（例えば、小胞体）ターゲティングシグナル配列は、融合タンパク質のＮ－末端（融合タンパク質コーディング遺伝子の５’末端）又はＣ－末端（融合タンパク質コーディング遺伝子の３’末端）、例えば、Ｎ－末端（融合タンパク質コーディング遺伝子の５’末端）に連結されたものであってもよい。このように、組換えベクターが細胞内小器官の中で小胞体（例えば、小胞体の内部）にターゲティングされることにより、タンパク質の発現レベルをより増加させることができる（図３参照）。一例では、前記融合タンパク質のＮ－グリコシル化は、小胞体の内で起こることができる。

【００３３】

前記ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）は、配列番号４の核酸配列で表示されるものであってもよい。

【００３４】

一具体例では、目的タンパク質コーディング遺伝子、ヒトＣＤ４５由来Ｍドメインコーディング遺伝子、転写調節因子、前記転写調節因子と作動可能に連結されたＭ１７因子、及びＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）、及び／又はＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドをコーディングする遺伝子を含む目的タンパク質の発現レベルを増加させるための植物形質転換用組換えベクターを提供する。

【００３５】

一実施例において、前記組換えベクターは、遺伝子の発現を確認できるマーカーをさらに含むことができる。本発明の一実施例では、ウェスタンブロットで発現するかどうかを確認するため、ＨＡエピトープ配列を使用したが、これに限定されるものではない。

【００３６】

本明細書に記載された真核細胞は、真菌、動物細胞、及び植物細胞からなる群より選ばれる１種以上であってもよく、例えば、植物細胞であってもよい。真核有機体は、すべての真核単細胞生物及び真核多細胞生物（植物又は動物）からなる群より選ばれる１種以上であってもよく、例えば、植物であってもよい。本明細書に記載された植物は、すべての藻類、単子葉植物及び双子葉植物の中から選ばれた１種以上の植物、又はこれらの細胞であってもよく、例えば、シロイヌナズナ、大豆、タバコ、ナス、唐辛子、ジャガイモ、トマト、白菜、大根、キャベツ、レタス、桃、梨、イチゴ、スイカ、マクワウリ、キュウリ、ニンジン、及びセロリからなる群から選ばれる双子葉植物；又は稲、大麦、小麦、ライ麦、トウモロコシ、サトウキビ、エンバク、及びタマネギからなる群から選ばれる単子葉植物、又はこれらの細胞であってもよいが、これに限定されるものではない。

【００３７】

前記組換えベクターを真核有機体（例えば、植物体）又は真核細胞（例えば、植物細胞）に導入させるステップは、通常の形質導入方法によって行うことができ、例えば、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ.）媒介による方法、粒子銃衝撃法（ｐａｒｔｉｃｌｅ ｇｕｎ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、炭化けい素ウィスカー法（ｓｉｌｉｃｏｎ ｃａｒｂｉｄｅ ｗｈｉｓｋｅｒｓ）、超音波処理法（ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ）、電気穿孔法（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）、及びＰＥＧ（ポリエチレングリコール）媒介性形質転換方法からなる群から選ばれる１つ以上を用いることができるが、これに限定されるものではない。

【００３８】

上述したように、本明細書で用いられたものであって、「Ｎ－グリコシル化」（Ｎ－Ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）は、タンパク質のアミノ酸の窒素原子に糖分子オリゴ糖のグリカンを結合させる一連の過程を意味するもので、タンパク質のアミノ酸残基の酸素原子に糖分子を結合させるＯ－グリコシル化（Ｏ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）と区別される。本明細書において、Ｎ－グリコシル化は、小胞体（例えば、小胞体の内部）で起こる

ものであってもよい。

【００３９】

前記「Ｎ－グリコシル化ドメイン」は、Ｎ－グリコシル化される位置（Ｎ－Ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ；アミノ酸残基）を含むポリペプチドであって、人為的に化学的又は組換え的に合成されるか、天然由来のものであってもよい。

【００４０】

一実施例では、ヒトＣＤ４５のＭドメインを目的タンパク質のカルボキシル末端（Ｃ－ｔｅｒｍｉｎａｌ）に融合させた融合タンパク質を暗号化する遺伝子を含む組換えベクターを製造して実験したが、これに限定されず、目的タンパク質のアミノ末端（Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌ）に融合されることもできる。

【００４１】

前記目的タンパク質とＮ－グリコシル化ドメインを含む融合タンパク質は、前記目的タンパク質とＮ－グリコシル化ドメインとの間に適切なリンカー（例えば、１－５０ａａ、１－３０ａａ、１－２０ａａ、２－５０ａａ、２－３０ａａ、又は２－２０ａａのペプチドリンカー）を含むことができる。前記ペプチドリンカーは、グリシン－セリンが繰り返される配列であってもよいが、これに限定されるものではない。

【００４２】

本明細書に記載されたアミノ酸配列と核酸配列は、提供された配列と７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の相同性を有する配列まで拡張されて解釈されうる。

【００４３】

前記「配列相同性の％」は、２つの最適に配列された配列と比較領域を比較することにより確認することができ、比較領域におけるポリヌクレオチド配列の一部は、２つの配列の最適配列に対する参考配列（挿入又は欠失を含んでいない）に比べて挿入又は欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。

【００４４】

本明細書で使用されるものであって、「組換えベクター又は組換え細胞」は、細胞が異種の核酸（ポリヌクレオチド）を複製するか、前記核酸を発現するか、又はペプチド、異種のペプチド又は異種の核酸によって暗号化されたタンパク質を発現するベクター又は細胞を意味するものであってもよい。組換え細胞は、前記細胞の天然形態では、発見されない遺伝子又は遺伝子切片をセンス及び／又はアンチセンスの形態のいずれかで発現することができる。また、組換え細胞は、天然の状態の細胞で発見される遺伝子を発現することができる。しかし、前記遺伝子は、改変されたものであって、人為的な手段によって細胞内に再導入されたものである。

【００４５】

前記「組換えベクター」は、遺伝子配列又は塩基配列が挿入又は導入されることができる当分野に公知されたすべてのプラスミド、ファージ、酵母プラスミド、植物細胞ウイルス、哺乳動物細胞ウイルス、及びその他の媒介体からなる群から選ばれた１種以上であってもよく、概して、任意のプラスミド及びベクターは、植物細胞又は植物体宿主内で複製及び安定化が可能であれば、特別な制限なしに使用することができる。一例では、前記組換えベクターは、植物体又は植物細胞の形質転換に使用するためのものであってもよい。本発明による前記遺伝子配列又は塩基配列は、発現調節因子に動作可能に連結されることができ、前記作動可能に連結された（ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）遺伝子配列と発現調節因子は、選択マーカー、及び複製開始点（ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｏｒｉｇｉｎ）をすべて含んでいる１つの発現ベクター内に含まれることができる。

【００４６】

公知のベクターの例では、ｐＢＩ１２１、ｐＨｅｌｌｓｇａｔｅ８、ｐＲＯＫII、ｐＢＩ７６、ｐＥＴ２１、ｐＳＫ（＋）、ｐＬＳＡＧＰＴ、ｐＵＣ、及びｐＧＥＭを含む。また、ＣＭＶ３５ｓプロモーターを含む、植物体で発現されるベクターは、例えば、ｐＣＡ

ＭＢＩＡシリーズ（ｐＣＡＭＢＩＡ１２００、１２０１、１２８１、１２９１、１３００、１３０１、１３０２、１３０３、１３０４、１３８０、１３８１、２２００、２２０１、２３００、２３０１、３２００、３２０１、３３００）、ｐＭＤＣ３２、及びｐＣ－ＴＡＰａｐＹＬ４３６のようなものが使用されうる。しかし、これに限定されるものではない。

【００４７】

本発明の用語の「作動可能に連結」されるということは、適切な分子が発現調節因子に結合されるとき、遺伝子の発現を可能にする方式で連結された遺伝子と発現調節因子であってもよい。

【００４８】

本発明の前記用語の「発現調節因子」は、特定の宿主細胞で作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を調節するＤＮＡ配列を意味する。そのような調節因子は、転写を行うためのプロモーター及び任意のオペレーター配列を含む転写調節因子、適合なｍＲＮＡリボソーム結合部位をコーディングする配列及びタンパク質合成を調節する配列を含む翻訳調節因子、転写及び翻訳の終結を調節する配列を含む。

【００４９】

本発明では、前記転写調節因子は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓ　ＲＮＡプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス１９Ｓ　ＲＮＡプロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルス（Ｆｉｇｗｏｒｔ　Ｍｏｓａｉｃ　Ｖｉｒｕｓ）由来の全長転写プロモーター及びタバコモザイクウイルスコートタンパク質プロモーターからなる群より選ばれるものであってもよいが、これに限定されるものではない。

【００５０】

本発明では、前記翻訳調節因子は、Ｍ１７配列であってもよく、これは植物体内で目的タンパク質の合成量を増加させる役割をする。本発明で好ましい前記Ｍ１７配列は、配列番号３で表示されるものであってもよい。

【００５１】

本発明の組換えベクターは、ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、又はＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドをコーディングする核酸をさらに含むことができ、これは前記転写調節因子と作動可能に連結されうる。

【００５２】

前記ＢｉＰは、ルミナル結合タンパク質（ｌｕｍｉｎａｌ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）であって、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質とグルコース調節タンパク質（ｇｌｕｃｏｓｅ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）と同定され、小胞体に位置しているＨＳＰ７０シャペロンファミリーの一種として小胞体で新たに合成されたタンパク質に一時的に結合する。また、ＢｉＰタンパク質のＮ－末端には、小胞体へのターゲティングを決定するシグナル配列を含有していて、目的タンパク質を小胞体へターゲティングさせる役割をする。例えば、前記ＢｉＰコーディング核酸は、配列番号４で表示される核酸配列を有するものであってもよい。

【００５３】

また、前記植物形質転換用組換えベクターは、ＨＤＥＬのような小胞体保持シグナルペプチド（ＥＲ　ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ　ｓｉｇｎａｌ　ｐｅｐｔｉｄｅ）をコーディングする塩基配列を含むことができる。ＨＤＥＬシグナルペプチドの場合、目的タンパク質を小胞体内に滞在するようにすることによって、分子シャペロンによるフォールディング（ｆｏｌｄｉｎｇ）とアセンブリー（ａｓｓｅｍｂｌｙ）が増加して、結果的に、タンパク質の分解をさらに最小化する。これらの例としては、目的タンパク質を分泌経路へ送る時よりも、小胞体内に保持させた場合、目的タンパク質の収率が１０～１００倍程度に増加することが知られている。

【００５４】

また、一具体例では、目的タンパク質、ヒトＣＤ４５由来Ｍドメイン又はその一部をコーディングする遺伝子、転写調節因子、前記転写調節因子と作動可能に連結されたＭ１７

、ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）及びＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）ペプチドをコーディングする核酸を含む目的タンパク質の発現レベルを増加させるための植物形質転換用組換えベクターを提供する。

【００５５】

本明細書に記載された組換えベクターは、遺伝子の発現を確認できるマーカーをさらに含むことができる。一具体例では、ウェスタンブロットで発現するかどうかを確認するため、ＨＡエピトープ配列を使用するが、これに限定されるものではない。

【００５６】

用語の「目的タンパク質」は、生産しようとするタンパク質又はその断片を意味するものであって、特定のタンパク質に限定されるものではない。具体的に、目的タンパク質は、抗原、抗体、抗体断片、構造タンパク質、調節タンパク質、転写因子、毒素タンパク質、ホルモン、ホルモン類似体、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、輸送タンパク質、レセプター（例えば、チロシンキナーゼ受容体など）、レセプターの断片、生体防御誘導物質、貯蔵タンパク質、移動タンパク質（ｍｏｖｅｍｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ）、エクスプロイティブプロテイン（ｅｘｐｌｏｉｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎ）、レポータータンパク質などから構成される群から選ばれるいずれか１つ以上であってもよい。

【００５７】

一実施例では、前記目的タンパク質としてレプチン（ｌｅｐｔｉｎ）、ＧＬＰ－１、Ｅｘｅｎｄｉｎ－４、アプロチニン（ａｐｒｏｔｉｎｉｎ）、ＧＦＰ（ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ）などを例示的に使用したが、これは本明細書で提供されるタンパク質の生産増加効果を例示的に示すためのものだけで、目的タンパク質が前記タンパク質に制限されるものではない。

【００５８】

本発明は、また、前記組換えベクターで形質転換された植物を提供する。前記形質転換植物は、Ｍドメイン配列を含み、これは転写及び翻訳調節因子と作動可能に連結され、これによって制御されるように工夫されている。本発明で説明された形質転換植物は、植物全体、植物細胞（例えば、葉、茎、根などの細胞）、又は植物組織（例えば、葉、茎、根など）であってもよい。植物組織は、植物の種子を含むことができる。前記植物は、草本又は木本植物であってもよく、双子葉植物又は単子葉植物であってもよく、具体的には、前記双子葉植物としては、シロイヌナズナ、大豆、タバコ、ナス、唐辛子、ジャガイモ、トマト、白菜、大根、キャベツ、レタス、桃、梨、イチゴ、スイカ、マクワウリ、キュウリ、ニンジン、及びセロリからなる群から選ばれることができ、前記単子葉植物としては、稲、大麦、小麦、ライ麦、トウモロコシ、サトウキビ、エンバク、及びタマネギからなる群から選ばれることができるが、これに限定されるものではない。

【００５９】

本発明の組換えベクターを植物体に導入する方法は、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ.）媒介による方法、粒子銃衝撃法（ｐａｒｔｉｃｌｅ ｇｕｎ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、炭化ケイ素ウィスカー法（Ｓｉｌｉｃｏｎ ｃａｒｂｉｄｅ ｗｈｉｓｋｅｒｓ）、超音波処理法（ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ）、電気穿孔法（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）又はＰＥＧ（ポリエチレングリコール）媒介性形質転換方法の中から選ぶことができるが、これに限定されるものではない。

【００６０】

前記形質転換された植物は、当業界の通常の方法の有性繁殖方法又は無性繁殖方法などを介して得ることができる。より具体的には、本発明の植物は、花の受粉過程を介して種子を生産し、前記種子から繁殖する過程の有性繁殖を介して得ることができる。また、本発明に係る組換えベクターで植物体を形質転換した後、通常の方法によってカルスの誘導、発根及び土壌浄化の過程の無性繁殖方法を介して得ることができる。すなわち、本発明に係る組換えベクターで形質転換された植物の切片体を当業界に公知された適切な培地に置床した後、適正条件で培養してカルスの形成を誘導し、新梢が形成されると、ホルモン無添加培地に移して培養する。約２週間後、前記新梢を発根用培地に移して根を誘導する

。根が誘導された後、これを土壌に移植して浄化させることにより、本発明に係る植物を得られることができる。本発明で形質転換された植物体は、それから得ることができる組織、細胞、又は種子を含みうる。

【００６１】

また、本発明は、前記植物形質転換用組換えベクターを製造するステップと、前記組換えベクターを植物体に導入して形質転換植物体を製造するステップと、前記形質転換された植物体を培養するステップと、前記形質転換された植物体又は培養液から目的タンパク質を分離精製するステップと、を含む目的タンパク質の製造方法を提供する。

【００６２】

前記植物発現ベクターの植物細胞又は植物体への導入は、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ.）媒介による方法、粒子銃衝撃法（ｐａｒｔｉｃｌｅ　ｇｕｎ　ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、炭化ケイ素ウィスカー法（ｓｉｌｉｃｏｎ　ｃａｒｂｉｄｅ　ｗｈｉｓｋｅｒｓ）、超音波処理法（ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ）、電気穿孔法（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）、及びＰＥＧ（ポリエチレングリコール）媒介性形質転換方法からなる群から１つ以上を選択して使用することができる。本発明の一実施例では、ＰＥＧ媒介性形質転換方法を用いた。

【発明の効果】

【００６３】

本発明に係る植物形質転換用組換えベクターは、植物細胞内で目的タンパク質の発現レベルを向上させることにより、既存の植物形質転換を用いたタンパク質の生産において最大の問題であった高発現形質転換体の取得の困難性を克服し、これを介して植物を用いた有用タンパク質の生産に大きく役立つものと期待される。

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【図１】図１は、一実施例によって作製した植物形質転換用組換えベクターにおいて、ｐ３５Ｓ－Ｍ１７：ＢｉＰ：レプチン：Ｍ：ＨＡ：ＨＤＥＬの部分を含む連結形態を示す模式図である。

【図２ａ】図２ａは、一実施例によって作製した植物形質転換用組換えベクターにおいて、ｐ３５Ｓ－Ｍ１７：Ｂｉｐ：レプチン：ＨＡ：ＨＤＥＬ、ｐ３５Ｓ－Ｍ１７：Ｂｉｐ：レプチン：Ｍ：ＨＡ：ＨＤＥＬ、及びｐ３５Ｓ－Ｍ１７：Ｂｉｐ：レプチン：Ｍ１２３４：ＨＡ：ＨＤＥＬの部分を含む連結形態を示す模式図である（Ｍ１２３４：Ｍドメインの Ｎ－グリコシル化部位　Ｎ１、Ｎ２、Ｎ３、及びＮ４が変形（Ａｓｎ→Ｇｌｎ）されたＭドメイン変異体）。

【図２ｂ】図２ｂは、ＭドメインのＮ－グリコシル化の有無によるタンパク質の発現量をウェスタンブロット方法で確認した電気泳動の結果（上段）及びその定量結果（下段）を示す。

【図３】図３は、ターゲティングされる植物細胞小器官によるタンパク質の発現量の差をテストするための組換えベクターの模式図（上段）、及びタンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで確認した電気泳動の結果（中段）、及びその定量結果（下段）を示す。

【図４】図４は、Ｍドメインと融合した融合タンパク質の時間による発現態様をウェスタンブロットで確認した電気泳動の結果（上段）、及びその定量結果（下段）を示す。

【図５】図５は、ＭドメインがＥｘｅｎｄｉｎ４又はＧＬＰ－１とそれぞれ融合した融合タンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで確認した結果である。

【図６ａ】図６ａは、一実施例に係るＭドメインと様々な目的タンパク質が様々な順序で融合された融合タンパク質の発現のための組換えベクターの模式図である。

【図６ｂ】図６ｂは、ＭドメインがレプチンＬｅｐ）、アプロチニンＡｐｒ）、又はＧＦＰ（Ｇｆｐ）と様々な順序で融合した融合タンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで確認した結果である。

【図７】図７a-７cは、ＭドメインのＮ－グリコシル化位置が様々な組み合わせにより変異された変異Ｍドメインとレプチンが融合した融合タンパク質の発現レベルを示すグラフ

である。
【図８】図８は、ＥＲ関連分解抑制の有無による野生型Ｍドメイン又は変異型Ｍドメインが融合した融合タンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで確認した結果である。
【図９】図９は、内在的にＮ－グリコシル化の位置を有する目的タンパク質のＭドメインと融合の有無によるタンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで確認した結果である。
【図１０】図１０は、様々なＭドメインの一部又は延長部と目的タンパク質が融合した融合タンパク質のタンパク質発現レベルをウェスタンブロットで確認した結果である。
【図１１】図１１は、Ｍドメイン又は様々なＭドメイン変異体の融合による転写レベルを定量的ＲＴ－ＰＣＲで確認した結果を示すグラフである。
【実施例】
【００６５】
以下、実施例を介して本発明をさらに詳細に説明する。
【００６６】
これらの実施例は、単に本発明を例示するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例により限定されるものと解釈されないのは、当業界において通常の知識を有する者にとって自明であろう。
【００６７】
（参考例１：植物材料の準備）
シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ ｅｃｏｔｙｐｅ、Ｃｏｌ－０）植物を１６時間／８時間の明暗周期及び２０℃～２２℃の温度条件における成長チャンバーのＢ５プレート上で成長させた。２週間成長させた植物の葉組織をプロトプラストの分離に用いた。
【００６８】
（参考例２：プラスミド構築）
マウスレプチンｃＤＮＡ（ＮＭ＿００８４９３．３）の成熟ペプチド領域を用いた。ＭドメインをコーディングするｄｓＤＮＡ断片（配列番号１）を反復的なＰＣＲ遂行によって合成し、Ｎ－グリコシル化部位の突然変異（Ａｓｎ－Ｇｌｎ置換）は、ＰＣＲベースの部位特異的突然変異導入によって生成した。化学合成によってアプロチニンを暗号化するＤＮＡ断片（配列番号１１）を作製した（Ｂｉｏｎｅｅｒ、大田、韓国）。エンテロキナーゼとフーリン（ｆｕｒｉｎ）の切断部位をレプチンの増幅に用いられたプライマーに含ませた（５’－ＧＧＡＴＣＣＡＡＧＡＴＧＡＴＧＡＴＧＡＴＡＡＧＧＴＧＣＣＴＡＴＣＣＡＧＡＡＧＴＣＣＡＧＧＡＴ－３’（配列番号１８）。ＨＡエピトープ及びＥＲ保持シグナルであるＨＤＥＬは、前記Ｍドメインの増幅に用いられたプライマーを用いて導入した。ＰＣＲ条件は、次の通りである：９４℃５分、（９４℃３０秒、５２℃１分、７２℃３０秒）を３０回繰り返し、７２℃７分。用いられたプライマーの配列を下記の表１にまとめた：
【００６９】

【表１】

プライマー名	配列（5’－3’）	配列番号
BamHI-Ek-leptin-F	GGATCCAAGATGATGATGATAAGGTGCCTATCCAGAAAGTCCAGGAT	18
leptin-furin-SpeI-R	ACTAGTTCGCCTGACACGGCATTCAGGGCTAACATCCAACTG	19
hspt-R	GAATTCCTTATCTTTAATCATATT	20
M-3-HA-HDEL-F	TCATAATTCATGTACTGCTCCTGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCCCACGATGAGCTCTAGCTCGAGATATGAAGATGAAGATGAAATATT	21
M-2-F	AATGTGGAAACAATACTTGCACAAACAATGAGGTGCATAACCTTACAGAATGTAAAAATGCGTCTGTTTCCATATCTCATAATTCATGTACTGCTCCTGA	22
SpeI-M-1-F	ACTAGTGCAAACATCACTGTGGATTACTTATATAACAAGGAAACTAAATTATTTACAGCAAAGCTAAATGTTAATGAGAATGTGGAATGTGGAAACAATACTTGCACAA	23
SpeI-HA-F	ACTAGTTACCCATACGATGTTCCAGATTAC	24
XbaI-Cab-F	TCTAGAATGGCGTCGAACTCGCTTATGAGC	25
Cab-BamHI-R	GGATCCTCTCTGACTCTTTGTA	26
XbaI-F1-F	TCTAGAATGGCAATGGCTGTTTTCCGTCGC	27
F1-BamHI-R	GGATCCTCTGAACTGCTCTAAGCTTGGAAG	28
SpeI-M-F	ACTAGTGCAAACATCACTGTGGAT	29
SpeI-M-N2Q-F	ACTAGTGCACAAATCACTGTGGAT	30
M-N30Q-F	GTGGAATGTGGACAAAATACTTGCACA	31
M-N30Q-R	TGTGCAAGTATTTTGTCCACATTCCAC	32
M-N40Q-F	AATGAGGTGCATCAACTTACAGAATGT	33
M-N40Q-R	ACATTCTGTAAGTTGATGCACCTCATT	34
M-N46Q-F	ACAGAATGTAAACAAGCGTCTGTTTCC	35
M-N46Q-R	GGAAACAGACGCTTGTTTACATTCTGT	36
M-N40,46Q-F	AACAATGAGGTGCATCAACTTACAGAATGTAAACAAGCGTCTGTTTCCATA	37
M-N40,46Q-R	TATGGAAACAGACGCTTGTTTACATTCTGTAAGTTGATGCACCTCATTGTT	38
BamHI-M-F	GGATCCCGATGGCAAACATCACTGTGGATTACTTA	39
M-GS2-SpeI-R	ACTAGTTGATCCACCACCAGACCCACCTCCACCATCAGGAGCAGTACATGAATTAT	40
BamHI-Ek-Apr	GGATCCCGGATGACGACGATAAGCGACCGGAC	41
BamHI-ek-Apr-F	GGATCCAAGATGATGATGATAAGCGACCGGAC	42
Apr-fu-SpeI-R	ACTAGTTCGCCTGACACGGGCACCGCCGCAGGTTCTCATACA	43
GFP-HDEL-stop-XhoI-R	CTCGAGCTAGAGCTCATCGTGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	44
GFP-fu-SpeI-R	ACTAGTTCGCCTGACACGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	45
SpeI-ek-GFP-F	ACTAGTGATGACGACGATAGGTGAGCAAG	46
AtACT2-5’	TATGAATTACCCGATGGGCAAG	47
AtACT2-3’	TGGAACAAGACTTCTGGGCAT	48
leptin- F-qRT1-F	TCGGTATCCGCCAAGCAGTGCCTATCCAGAAAGTCCA	49
leptin- R-qRT1-R	GGTGAAGCCCAGGAATGAAGGCATTCAGGGCTAACATCCA	50

【００７０】

レプチンの成熟領域と、Ｍドメイン又はＡｓｎ－ｔｏ－Ｇｌｎ置換突然変異Ｍドメイン

をベクターＢｉＰ：ＨＡ：ＣＢＤ：ＨＤＥＬに連続的に連結させた。

【００７１】

葉緑体及びミトコンドリアで融合タンパク質を蓄積させるため、Ｃａｂ移行ペプチド又はＦ１－ＡＴＰａｓｅ　ｇａｍｍａサブユニットプレ配列をＰＣＲで増幅し、ＥｅＬｅｐｆ及びＥｅＬｅｐｆＭベクター内のＢｉＰに置換させた（Lee,D.W.et al., Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs.Plant Cell 20,1603-1622(2008); Lee,S.et al., Mitochondrial targeting of the Arabidopsis F1-ATPase gamma-subunit via multiple compensatory and synergistic presequence motifs.PlantCell 24,5037-5057(2012)参照）。

【００７２】

前記構造体は、すべて同じベクターから作製された。したがって、同じ５’－ＵＴＲｓを持つ。すべてのＰＣＲ産物の核酸配列は、ヌクレオチドシーケンシングによって確認した。

【００７３】

（参考例３：発現、化合物処理、及びウェスタンブロット分析）

前記参考例２で作製されたプラスミドは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）媒介形質転換によって、参考例１で用意された植物細胞のプロトプラスト内に導入させた。形質転換後、２４時間又は所定の時点でタンパク質を抽出し、タンパク質抽出物を調製した。形質転換直後に、プロトプラストにツニカマイシン（ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ，１０μｇ／ｍＬ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を処理し、形質転換１２時間後にシクロヘキシミド（５０μｇ／ｍＬ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を処理した。タンパク質の抽出物に対して抗ＨＡ抗体（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）、抗アクチン抗体（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｓｏｌｏｎ，ＯＨ）、抗ＧＦＰ抗体（ＢｉＯ－Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、浦項、大韓民国）、又は抗ＢｉＰ抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。タンパク質ブロットをＥＣＬキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）で展開し、ＬＡＳ４０００　ｉｍａｇｅ　ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）を用いてイメージを得た。

【００７４】

（参考例４：全ＲＮＡの分離及び転写レベルの定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析）

ＰＥＧ媒介形質転換後の植物細胞のプロトプラストから、Ａｍｂｉｏｎ　Ｐｈｅｎｏｌ－ｆｒｅｅ　ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔを用いて全ＲＮＡを抽出し、ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（Ａｍｂｉｏｎ）で処理した。ｈｉｇｈ－ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　ｒｅｖｅｒｓｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、前記抽出された全ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。Ｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて転写レベルを検出した。ＡＣＴＩＮ２は、内在性コントロールとして用いた。ＰＣＲ混合物（２０μｌ）は、鋳型５０ｎｇ、フォワード及びリバースプライマー０．５ｍＭ、及び１×ＳＹＢＲ　Ｍｉｘを含んだ。

【００７５】

ＰＣＲ条件は、次の通りである：初期変性９５℃１０分、その後９５℃１５秒と６０℃１分を４０サイクル行った。

【００７６】

特異的な増幅を確認するため、９５℃で１５秒間加熱した後、６０℃で１分間加熱した後、９５℃まで１５秒ごとに０．３℃ずつ温度を上昇させつつ融解曲線を得た。

【００７７】

（実施例１．Ｍドメイン融合用組換えベクターの作製）

植物体から目的タンパク質を高発現させることができるように、目的タンパク質にヒトＣＤ４５のＭドメインが融合した融合タンパク質をコーディングする遺伝子を含む植物形

質転換用組換えベクターを作製した。目的タンパク質としてエンテロキナーゼ切断部位とフーリン切断部位がそれぞれアミノ末端とカルボキシル末端に融合されたレプチン（Ｌｅｐｔｉｎ）（以下、「ｅＬｅｐｆ」という）を用いた。前記組換えベクターは、通常使用されるベクターであるｐＣＡＭＢＩＡ１３００ベクターにＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターを用いた。タンパク質合成量の増加のためにＭ１７配列（配列番号３）を追加し、ＢｉＰ（ｃｈａｐｅｒｏｎｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）タンパク質のシグナルペプチドに該当するゲノムＤＮＡ配列（配列番号４）を用いて、目的タンパク質を小胞体に移動させることができるようし、最終的な目的タンパク質が小胞体に蓄積されうるようにカルボキシル末端にＨＤＥＬ（Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）を付与して小胞体に保持させた。また、ウェスタンブロットを介して融合タンパク質の発現可否を確認するため、ＨＡエピトープを用いた。本実施例で作製した組換えベクターの模式図を図１に示した（Ｍ：Ｍドメイン）。

【００７８】

図１に示されている組換えベクターの核酸配列（配列番号１０）を次の表２にまとめた。

【００７９】

【表２】

レプチンーＭドメイン融合タンパク質発現用組換えベクターの核酸配列(配列番号１０)

	核酸配列（5’→3’）
XbaI（制限酵素サイト）	tctaga
M17	ggcgtgtgtgtgtgttaaaga（配列番号３）
BiP	atggctcgctcgtttggagctaacagtaccgttgtgttggcgatcatcttcttcg gtgagtgattttccgatcttcttctccgatttagatctcctctacattgttgctt aatctcagaacctttttttcgttgttcctggatctgaatgtgtttgtttgcaattt cacgatcttaaaaggttagatctcgattggtattgacgattggaatctttacgat ttcaggatgtttatttgcgttgtcctctgcaatagaagaggctacgaagttaa(配列番号４）
Enk（エンテロキナーゼ切断部位）	ggatccaagatgatgatgataag
レプチン	Gtgcctatccagaaagtccaggatggcaccaaagccctcatcaagaccattgtca ccaggatcaatgacatttcacacacgcagtcggtatccgccaagcagagggtcac tggcttggacttcattcctgggcttcaccccattctgagtttgtccaagatggac cagactctggcagtctatcaacaggtcctcaccagcctgccttcccaaaatgtgc tgcagatagccaatgacctggagaatctccgagacctcctccatctgctggcctt ctccaagagctgctccctgcctcagaccagtggcctgcagaagccagagagcctg gatggcgtcctggaagcctcactctactccacagaggtggtggctttgagcaggc tgcagggctctctgcaggacattcttcaacagttggatgttagccctgaatgc(配列番号５３）
furin 切断部位	cgtgtcaggcgaactagt
M	gcaaacatcactgtggattacttatatatagcaaactctaaatgttaatgagaat gtggaatgtggaaacaatacttgcacaaacaatgaggtgcataaccttacagaat gtaaaaatgcgtctgtttccatatctcataattcatgtactgctcctgat （配列番号１）
HA	tacccatacgatgttccagattacgct
リンカー	tcc
HDEL	cacgatgagctc（配列番号９）
終止コドン-XhoI	tagctcgag

【００８０】

配列番号２のＭドメインのＮ－グリコシル化残基は、次の通りである：

1 30
ANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENVECGN
N1 N2
31 60
NTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPD
N3 N4

【００８１】
（実施例２．ＭドメインのＮ－グリコシル化によるタンパク質発現の増加を確認）
前記実施例１で作製したＭドメインが含まれた組換えベクターによって作製された融合タンパク質ｅＬｅｐｆＭの発現量を比較するため、下記のように組換えベクターを作製した。
【００８２】
前記実施例１で製造した組換えベクター（ＥｅＬｅｐｆＭ；図１）からＭドメインを除去したベクター（ＥｅＬｅｐｆ）及びＭドメインのうちの４個（実施例１の図を参照）のＮ－グリコシル化部位（Ａｓｎ）に突然変異（ｍｕｔａｔｉｏｎ；ＡｓｎをＧｌｎに置換）を導入されたベクター（ＥｅＬｅｐｆＭ１２３４）を作製した（参考例１参照）。この３つのベクター（図２ａ参照）をシロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）の葉から分離した植物細胞（参考例１参照）にポリエチレングリコール（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ；ＰＥＧ）を介して形質転換させ、Ｎ－グリコシル化の効果を確認するために形質転換した後、Ｎ－グリコシル化を阻害するツニカマイシン（ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ）を処理した。２４時間後、ウェスタンブロットを介してタンパク質の発現量を確認した。前記得られたタンパク質の発現量の結果を図２ｂに示した（上段：ウェスタンブロットの結果；下段：ウェスタンブロットの結果、得られたタンパク質の発現量をＬＡＳ４０００ ｉｍａｇｅ ａｎａｌｙｚｅｒで定量して表したグラフ（エラーバーは標準偏差（ｎ＝３）；＊、ｐ＜０．０５（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ ｔ－ｔｅｓｔ））））。
【００８３】
図２ｂに示すように、Ｎ－グリコシル化が起こらなくてもＭドメインが融合されたときにタンパク質の発現量が増加するが（ＥｅＬｅｐｆＭ＋ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ）、Ｍドメインのある組換えベクターでツニカマイシンを添加しなかったとき（ＥｅＬｅｐｆＭ－ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ）、Ｎ－グリコシル化が起こって目的タンパク質の発現量が最大に増加した。
【００８４】
Ｍドメインの融合によってタンパク質の発現量が増加されることがＮ－グリコシル化によるものかをより明確にするため、Ｍドメインのない目的タンパク質（ｅＬｅｐｆ）及びＭドメインが融合したタンパク質（ｅＬｅｐｆＭ）がそれぞれ小胞体、葉緑体、ミトコンドリアでターゲティングされるように組換えベクターを作製した。融合タンパク質を小胞体、葉緑体、ミトコンドリアでターゲティングさせるため、それぞれ、ＢｉＰ（配列番号４）、Ｃａｂ ｔｒａｎｓｉｔ ｐｅｐｔｉｄｅ（配列番号１２）、又はＦ１－ＡＴＰａｓｅ ｇａｍｍａ ｓｕｂｕｎｉｔ ｐｒｅｓｅｑｕｅｎｃｅ（配列番号１３）を目的タンパク質のアミノ末端に融合し、Ｍドメインコーディング核酸配列（配列番号１）を目的タンパク質のカルボキシル末端に融合して組換えベクターを作製した。それぞれの組換えベクターを、前記のような方法で植物細胞に導入した後、培養して融合タンパク質を発現させた。ウェスタンブロットを介してタンパク質の発現量を確認した。
【００８５】
前記得られたタンパク質の発現量の結果を図３に示した（上段：発現ベクターの模式図；中段：ウェスタンブロットの結果；下部：ウェスタンブロットの結果、得られたタンパク質の発現量をＬＡＳ４０００ ｉｍａｇｅ ａｎａｌｙｚｅｒで定量して表したグラフ（エラーバーは標準偏差（ｎ＝３）；＊，ｐ＜０．０５（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ ｔ－ｔ

ｅｓｔ））））。
【００８６】
図３に示すように、ＭドメインのないｅＬｅｐｆは、細胞内小器官別のタンパク質の量に差がないのに対し、Ｍドメインが融合したｅＬｅｐｆＭの場合、Ｎ－グリコシル化が起こる小胞体（ＥＲ）でターゲティングさせたＥｅＬｅｐｆＭだけがタンパク質の発現量が増加したことが確認できた。
【００８７】
図２ｂと図３の結果を総合したとき、Ｍドメイン融合による目的タンパク質の発現増加は、Ｎ－グリコシル化によるものであることが分かる。
【００８８】
（実施例３．Ｍドメイン融合タンパク質の発現速度）
前記実施例２で確認したように、Ｎ－グリコシル化によるタンパク質の発現の増加の機序を理解するために、Ｍドメイン融合タンパク質の発現速度を確認した。前記Ｍドメインが融合された組換えベクターＥｅＬｅｐｆＭとＭドメインのＮ－グリコシル化部位が変異したＥｅＬｅｐｆＭ１２３４をそれぞれ植物細胞に形質転換させ、１２時間後に、タンパク質の合成を防ぐシクロヘキシミド又はＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）を処理した後、１２時間の間隔でタンパク質を抽出して、ウェスタンブロットで確認した。
【００８９】
前記得られた結果を図４に示した（上段：ウェスタンブロットの結果；下段：ウェスタンブロットの結果、得られたタンパク質の発現量をＬＡＳ４０００　ｉｍａｇｅ　ａｎａｌｙｚｅｒで定量して表したグラフ（ｘ軸、時間；エラーバーはＳＤ（ｎ＝３）；＊，ｐ＜０．０５；＊＊＊，ｐ＜０．００１））））。
【００９０】
その結果、図４に示すように、初期（１２時間）には、ＥｅＬｅｐｆＭとＥｅＬｅｐｆＭ１２３４の発現量の差がほとんどないが、時間が経つにつれて、その差がますます大きくなることが分かり、このことからＥｅＬｅｐｆＭの発現速度がＥｅＬｅｐｆＭ１２３４に比べてはるかに速いことが分かった。しかし、シクロヘキシミドを処理してタンパク質の合成を防いだとき、植物細胞内でＥｅＬｅｐｆＭは少しずつ消えるが、ＥｅＬｅｐｆＭ１２３４は、４８時間までそのまま保持されたことを確認することにより、作製されたタンパク質の小胞体内安定性は、ＥｅＬｅｐｆＭ１２３４がより高いことが分かった。この結果は、Ｎ－グリコシル化が起こるタンパク質の翻訳速度がＮ－グリコシル化が起こらないタンパク質に比べて速いことを意味する。
【００９１】
（実施例４．様々なタンパク質とＭドメインの融合）
Ｍドメインによる発現増加の効果が、前記実施例で使用した目的タンパク質（ｅＬｅｐｆ）以外のタンパク質にも適用されるかを確認するため、さらに他の目的タンパク質としてＥｘｅｎｄｉｎ４（配列番号５１）コーディング遺伝子又はＧＬＰ－１（配列番号５２）のコーディング遺伝子にＭドメインコーディング遺伝子（配列番号１）を融合し、翻訳エンハンサードメイン（ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ　ｅｎｈａｎｃｅｒ　ｄｏｍａｉｎ）としてＧドメインを融合して組換えベクターを製造し（図１参照）、それぞれの組換えベクターを植物細胞（参考例１）に形質転換させた後、タンパク質の発現量をウェスタンブロットで確認した。前記結果を図５に示した。図６に示すように、Ｎ－グリコシル化を防ぐツニカマイシン（ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ）を処理したときよりもツニカマイシンを処理せずにＮ－グリコシル化が起こった時のタンパク質の発現の程度がはるかに増加することを確認した。
【００９２】
（実施例５．様々なタンパク質とＭドメインの様々な順序における融合）
また、図６ａに模式的に示した組換えベクターのＸｘｘ位置にレプチン（Ｌｅｐ）、アプロチニン（Ａｐｒ；配列番号１１）、又はＧＦＰ（Ｇｆｐ；配列番号１５）を含む組換えベクターを準備して（「（Ｇ４Ｓ）２」：リンカー（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ））、これ

を植物細胞に形質転換した後、タンパク質の発現量をウェスタンブロットで確認した。

【００９３】

前記得られた結果を図６ｂに示した。図６ｂに示すように、目的タンパク質とＭドメインの融合タンパク質をコーディングする遺伝子を発現させた場合、目的タンパク質の種類、Ｍドメインとの連結手順、及びリンカーの有無とは関係なしに、Ｍドメインと融合されない場合と比較して、目的タンパク質の発現量が顕著に増加することを確認できる。

【００９４】

（実施例６．ＭドメインのＮ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅの組み合わせによる目的タンパク質の発現試験）

Ｍドメインの４個のＮ－グリコシル化部位（実施例１の図を参照）の様々な組み合わせにＡｓｎ－Ｇｌｎ置換突然変異を導入した突然変異体（４個のＮ－グリコシル化部位のうちの１個が変異、２個が変異、３個が変異、及び４個がすべて変異）を暗号化する遺伝子を含む組換えベクターを用いて、目的タンパク質（レプチン）の発現レベルを測定した（図７ａ－７ｃ）。前記組換えベクターを植物細胞プロトプラストに形質転換させた後、タンパク質を抽出し、前記得られたタンパク質抽出物を抗－ＨＡ抗体を用いたウェスタンブロッティングで分析した。前記ウェスタンブロッティングの結果、得られたバンドのシグナル強度をＬＡＳ４０００画像分析機とともに提供されたソフトウェアを用いて定量化して、その結果を図７ａ－７ｃに示した（ｘ軸のＥｅＬｅｐｆＭの後ろに記載された数字は、Ａｓｎ－ｔｏ－Ｇｌｎ変異されたＮ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅを意味する）。図７ａ－７ｃにおいて、各突然変異体を使用した場合の目的タンパク質の発現レベルをＥＲ標的化された野生型タンパク質（野生型Ｍドメインと目的タンパク質の融合）であるＥｅＬｅｐｆＭの発現レベル（１）に対する相対値で示した。図７ａ－７ｃにおいて、図７ａは、単一のＡｓｎ－Ｇｌｎ突然変異体を使用した場合の目的タンパク質が相対的発現レベルを、図７ｂは、二重Ａｓｎ－Ｇｌｎ突然変異体を使用する場合の目的タンパク質が相対的発現レベルを、図７ｃは、トリプルＡｓｎ－Ｇｌｎ突然変異体を使用した場合の目的タンパク質が比較的発現レベルを、それぞれ示す（エラーバーはＳＤ（ｎ＝４））。

【００９５】

図７ａ－７ｃに示すように、ＭドメインのＮ－グリコシル化部位のうちの１－３個の位置に突然変異が発生した場合に、野生型よりも目的タンパク質の発現レベルが低くなるが、Ｎ－グリコシル化部位の４個がすべて突然変異された場合に比べて、全て高レベルの目的タンパク質の発現を示した。Ｍドメインの４個のＮ－グリコシル化部位がすべて突然変異された突然変異体を使用した場合であっても、目的タンパク質を単独発現させる場合と比較して、目的タンパク質の発現レベルが増加することを考慮したとき（図２ｂ参照）、野生型Ｍドメインだけではなく、４個のＮ－グリコシル化部位のうちの１－４個の位置に突然変異が発生した変異Ｍドメインを使用した場合であっても、融合発現された目的タンパク質の発現レベルの増加に寄与すると言える。

【００９６】

（実施例７．非グリコシル化タンパク質の低発現レベルとＥＲ関連分解との関連性試験）

非グリコシル化タンパク質の発現レベルが低いことがＥＲ関連分解と関連があるかどうかを試験した。結論として、非糖化タンパク質の低い発現レベルは、ＥＲ関連分解に起因するものではないことを確認した。

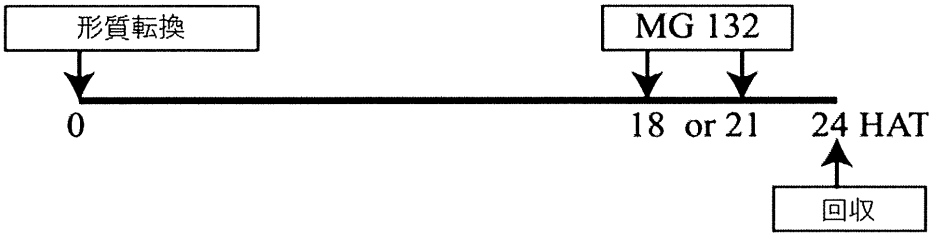
【００９７】

より具体的に、ＥｅＬｅｐｆＭベクター（Ｌｅｐｔｉｎと野生型Ｍドメインの融合タンパク質の発現）及びＥｅＬｅｐｆＭ１２３４ベクター（Ｌｅｐｔｉｎと４個の糖化位置がすべて変異（Ｇｌｎに置換）された変異Ｍドメインの融合タンパク質の発現）をそれぞれ植物プロトプラストに形質転換後、１８時間又は２１時間に２６Ｓプロテアソーム依存性分解の阻害剤であるＭＧ１３２（ＩＵＰＡＣ名：Benzyl N-[(2S)-4-methyl-1-[[(2S)-4-methyl-1-[[(2S)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopen

tan-2-yl]carbamate）２０μＭを原形質培養培地に添加し、プロトプラストをそれぞれ６又は３時間をさらに培養した。

【００９８】

［試験デザインの概略図］



（ＨＡＴ：形質転換後時間数）

【００９９】

比較のために（陽性対照群）、プロトプラストをＲｂｃｓ[Ｔ４,７Ａ]：ＧＦＰで形質転換させた後、１８時間にＭＧ１３２で処理し、さらに６時間培養した。Ｒｂｃｓ[Ｔ４,７Ａ]：ＧＦＰは、ＧＦＰ融合体として、葉緑体へのタンパク質の導入に欠陥のあるＲｂｃｓ伝達ペプチドの突然変異の形態を発現し、細胞質内の２６Ｓプロテアソームによってユビキチン化されて分解される。

【０１００】

形質転換後、２４時間目に形質転換されたプロトプラストからタンパク質を抽出し、抗－ＨＡ抗体又は抗－ＧＦＰ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行って、前記タンパク質抽出物を分析した。

【０１０１】

前記得られたウェスタンブロットの結果を図８に示した。図８に示すように、Ｒｂｃｓ[Ｔ４,７Ａ]：ＧＦＰの発現レベルは、ＭＧ１３２の未処理時と比較して、処理時により高く、これらの結果は、本実施例の試験条件の下でＭＧ１３２が２６Ｓプロテアソーム依存性タンパク質分解を阻害することを示す。しかし、ＥｅＬｅｐｆＭとＥｅＬｅｐｆＭ１２３４タンパク質の発現レベルは、ＭＧ１３２処理に関係なしに差がなく、これは、ＥＲ関連分解がＮ－グリコシル化ＥｅＬｅｐｆＭと非グリコシル化ＥｅＬｅｐｆＭ１２３４のタンパク質の発現には役割を果たしていないことを示す。

【０１０２】

（実施例８．目的タンパク質自体のＮ－グリコシル化とＭドメインのＮ－グリコシル化が目的タンパク質の発現に及ぼす効果試験）

目的タンパク質がＮ－グリコシル化部位を内在的に含み、それ自体でＮ－グリコシル化しうる場合、Ｍドメインと融合されずに目的タンパク質自体がＮ－グリコシル化される場合にも、目的タンパク質の発現レベルが増加するかを確認した。

【０１０３】

このために、前述の実施例を参照して、レプチンタンパク質の代わりにＬＩＦ（Ｌｅｕｋｅｍｉａ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ；配列番号１７；コーディング核酸配列：配列番号１６；ＥｅＬｉｆｆ；内在的に６個のＮ－グリコシル化部位がある）を用いて、Ｍドメインが融合されたり、また融合されないＬＩＦ（ＥｅＬｉｆｆ）を発現する組換えベクターを構築し、植物のプロトプラストに形質転換させ、２４時間後にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを行ってタンパク質の発現レベルを測定した。

【０１０４】

前記得られたタンパク質の発現レベルを図９に示した。図９に示すように、Ｍドメインが融合しないＥｅＬｉｆｆと比較して、Ｍドメインが融合したＥｅＬｉｆｆＭの発現レベルがはるかに高いことが分かる（ＲｂｃＬ：ローディングコントロール）。これらの結果は、目的タンパク質に内在するＮ－グリコシル化の位置におけるＮ－グリコシル化は、目的タンパク質の発現レベルに影響を及ぼさないのに対し、目的タンパク質と融合される融合パートナーであるＭドメインのＮ－グリコシル化が目的タンパク質の発現レベルに重要

な役割を果たすこと示す。

【０１０５】

（実施例９．Ｍドメインの一部又はＭドメインの延長部と融合した融合タンパク質の発現レベル）

目的タンパク質（レプチン）がＭドメインの一部又は延長部と融合した融合タンパク質の発現レベルを試験した。このために、実施例２の方法を参照して、目的タンパク質とＭドメイン（配列番号２；総６０ａａ）の４１－６０位置の２０個のアミノ酸の長さの断片（配列番号６）が融合した融合タンパク質（ＥｅＬｅｐｆＭ２０；Ｎ－グリコシル化位置の１個（Ｎ４：４６番目の位置のＡｓｎ）を含む）、２１－６０位置の４０個のアミノ酸の長さの断片（配列番号７）が融合した融合タンパク質（ＥｅＬｅｐｆＭ４０；ＭドメインのＮ－グリコシル化位置の３個（Ｎ２：３０番目の位置のＡｓｎ；Ｎ３：４０番目の位置のＡｓｎ；及びＮ４：４６番目の位置のＡｓｎ）を含む）、Ｍドメイン（配列番号２）と融合された融合タンパク質（ＥｅＬｅｐｆＭ６０）、及びＣＤ４５（配列番号５）において、配列番号２のＭドメインのＮ末端側及びＣ末端側にそれぞれ１０個のアミノ酸だけ延長された計８０個のアミノ酸の長さの断片（配列番号８）が融合した融合タンパク質（ＥｅＬｅｐｆＭ８０）を、植物細胞のプロトプラストに導入してそれぞれ発現させた後、タンパク質を抽出してウェスタンブロッティングで発現量を測定した。比較のために、Ｍドメインが融合されていないＥｅＬｅｐｆの発現レベルもともに測定した。

【０１０６】

前記得られたタンパク質の発現レベルを図１０に示した。図１０に示すように、ＥｅＬｅｐｆＭ２０、ＥｅＬｅｐｆＭ４０、ＥｅＬｅｐｆＭ６０、及びＥｅＬｅｐｆＭ８０は、すべてＥｅＬｅｐｆより高発現レベルを示した（ＥｅＬｅｐｆ＜＜ＥｅＬｅｐｆＭ２０＜ＥｅＬｅｐｆＭ４０　ＥｅＬｅｐｆＭ　ＥｅＬｅｐｆＭ８０）。

【０１０７】

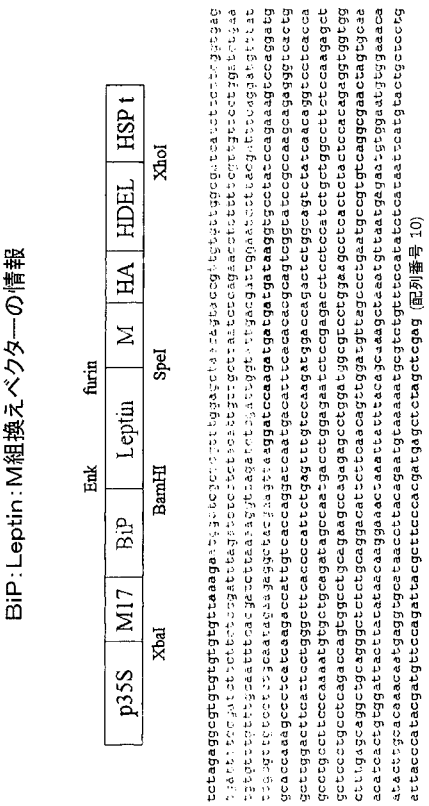
（実施例１０．Ｍドメイン又は様々なＭドメイン変異体の融合による転写レベル試験）

植物細胞（参照例１）を野生型（変異されていない）Ｍドメイン又はＮ－グリコシル化部位がそれぞれ変異された様々なＭドメイン変異体とレプチンがそれぞれ融合された融合タンパク質のコーディング遺伝子を含む組換えベクターでそれぞれ形質転換させ、１日後に全ＲＮＡを抽出して、定量的ＲＴ－ＰＣＲを行った。具体的な方法は、参考例４に記載した。

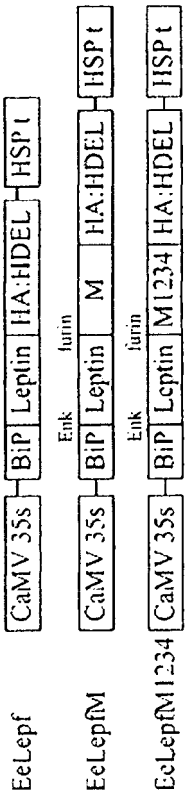
【０１０８】

前記のように得られたＲＮＡレベルを図１１に示した。図１１は、野生型（変異されていない）Ｍドメイン（即ち、十分にグリコシル化されている）とレプチンが融合された場合のｍＲＮＡ量（＝１）に対して、それぞれのＭドメイン変異体が融合した場合のｍＲＮＡ量の相対値の平均を示したものである（エラーバーはＳＤ（ｎ＝３　ｆｏｒ　Ｍ　ｔｏ　１４；ｎ＝２　ｆｏｒ　２３　ｔｏ　１２３４））。Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｐ値が０．０５以上でＭドメイン融合されたレプチンと変異されたＭドメインが融合されたレプチンとの間のｍＲＮＡ量の差はなかった。この結果は、Ｍドメインの融合による発現増加が転写の増加によるｍＲＮＡ量の増加に起因するものではないことを意味し、ｍＲＮＡからタンパク質への翻訳の促進に起因するものであることを示唆する。

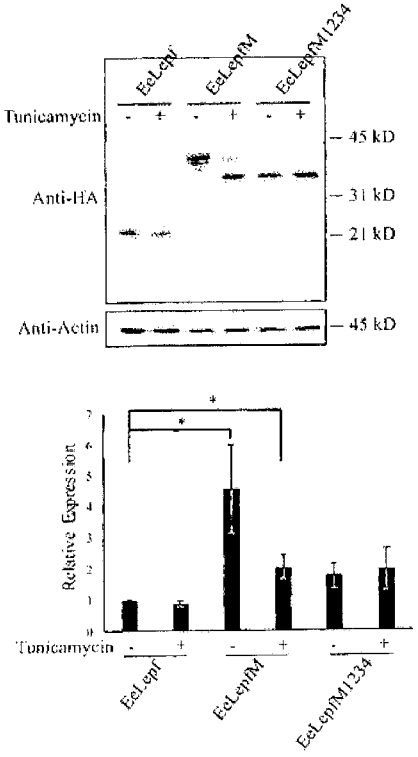
【図１】


BiP:Leptin:M組換えベクターの情報
p35S
M17
BiP
Leptin
M
HA
HDEL
HSP t
Enk
furin
XbaI
BamHI
SpeI
XhoI

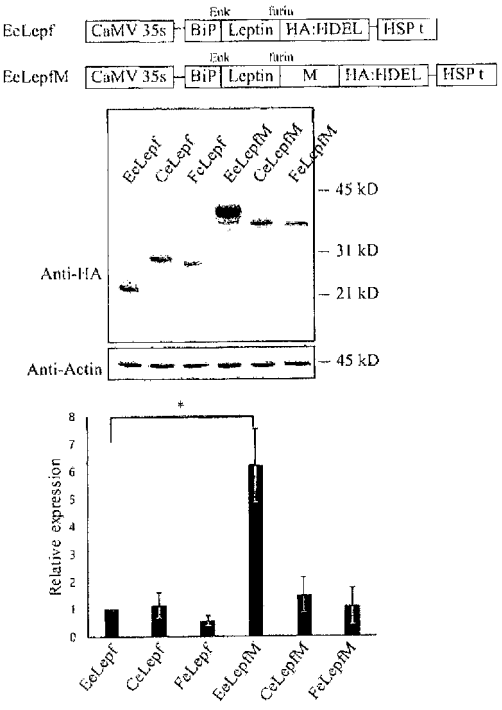
【図２ａ】


EeLepf
EeLepfM
EeLepfM1234
CaMV 35s
BiP
Enk
Leptin
furin
HA:HDEL
M
M1234
HSP t

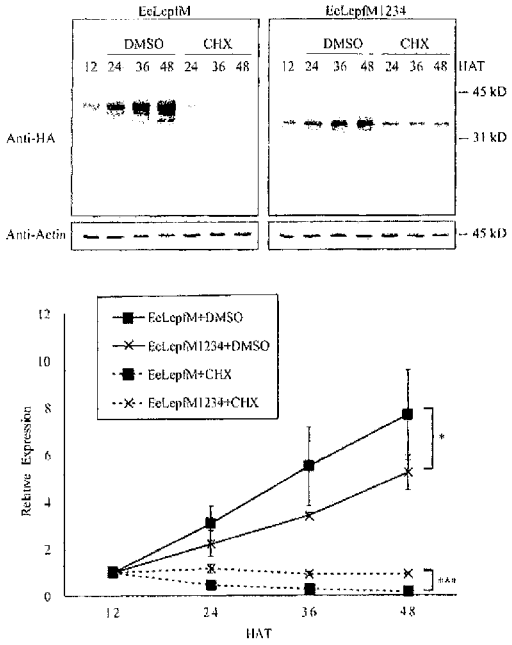
【図２ｂ】


EeLepf
EeLepfM
EeLepfM1234
Tunicamycin
Anti-HA
Anti-Actin
45 kD
31 kD
21 kD
Relative Expression

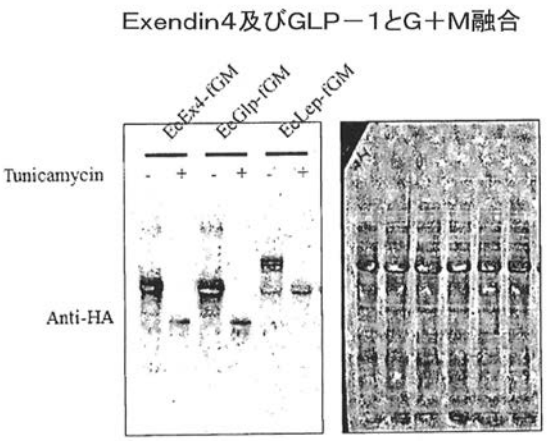
【図３】


EeLepf
EeLepfM
CaMV 35s
BiP
Enk
Leptin
furin
HA:HDEL
M
HSP t
CeLepf
FeLepf
CeLepfM
FeLepfM
Anti-HA
Anti-Actin
45 kD
31 kD
21 kD
Relative expression

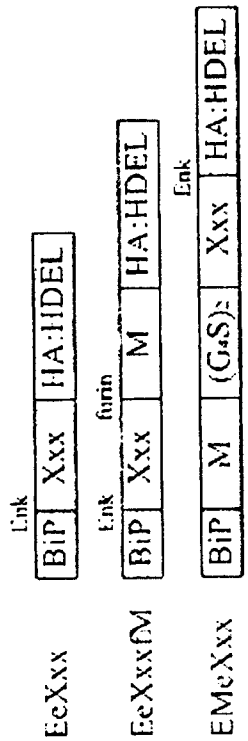
【図４】


EcLepfM
EcLepfM1234
DMSO
CHX
12 24 36 48 24 36 48
HAT
Anti-HA
Anti-Actin
45 kD
31 kD
EcLepfM+DMSO
EcLepfM1234+DMSO
EcLepfM+CHX
EcLepfM1234+CHX
Relative Expression
HAT

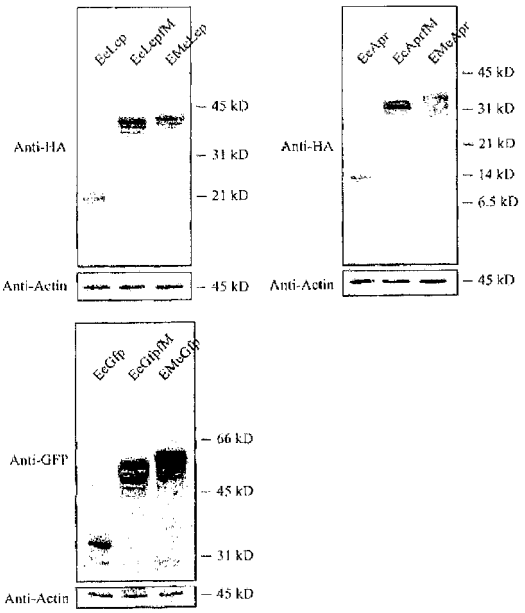
【図５】


Exendin4及びGLP－1とG＋M融合
EcEx4-fGM
EcGlp-fGM
EcLep-fGM
Tunicamycin
Anti-HA

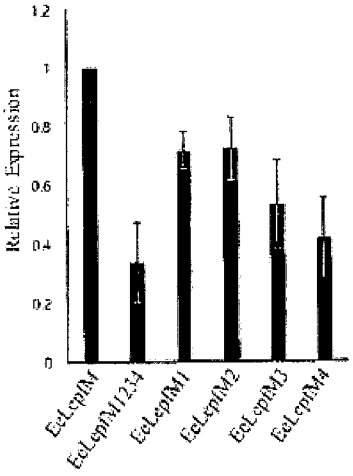
【図６ａ】


Link
BiP
Xxx
HA:HDEL
furin
M
(G4S)3
EcXxx
EcXxxfM
EMcXxx

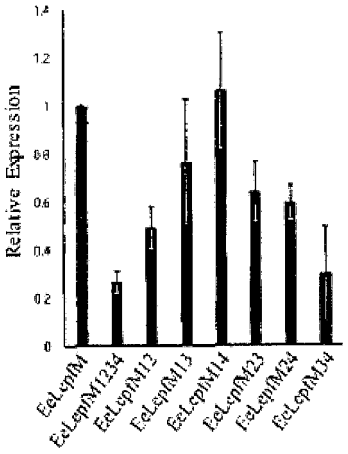
【図６ｂ】


EcLep
EcLepfM
EMcLep
EcApr
EcAprfM
EMcApr
EcGfp
EcGlpfM
EMcGlp
Anti-HA
Anti-Actin
Anti-GFP
45 kD
31 kD
21 kD
14 kD
6.5 kD
66 kD

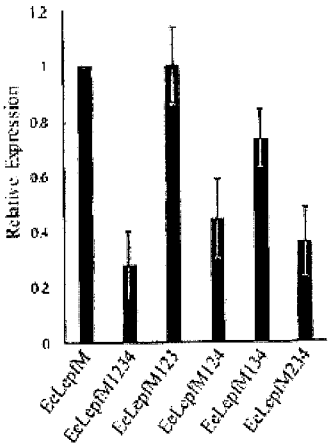
【図７ａ】



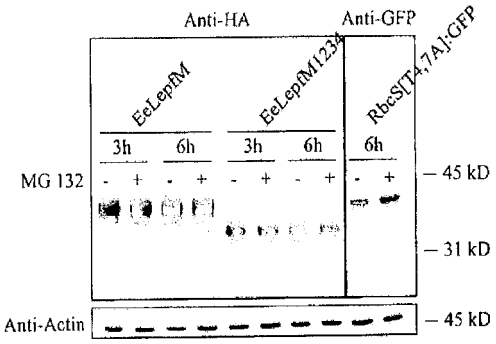
【図７ｂ】



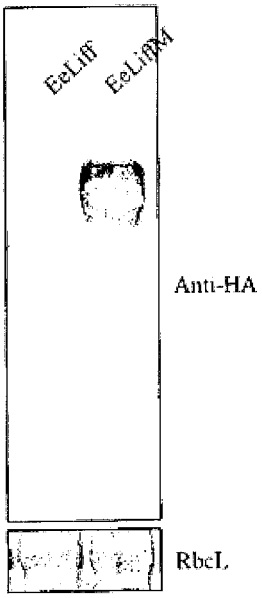
【図７ｃ】



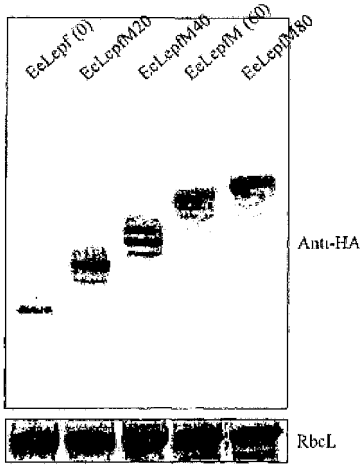
【図８】



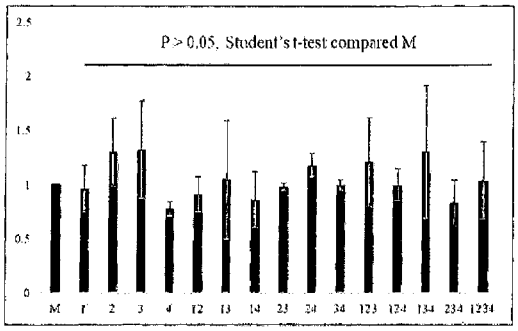
【図９】


EeLifF
EeLifM
Anti-HA
RbcL

【図１０】


EeLepf (0)
EeLepfM20
EeLepfM40
EeLepfM (60)
EeLepfM80
Anti-HA
RbcL

【図１１】


P > 0.05, Student's t-test compared M
2.5
2
1.5
1
0.5
0
M
F
2
3
4
12
13
14
23
24
34
123
124
134
234
1234

【配列表】
2020503884000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/000807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; C12N 15/29; A01H 5/00; C07K 14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: N-saccharification, recombination vector, CD45-derived M domain, target protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CASTILHO, A. et al., "N-glycosylation Engineering of Plants for the Biosynthesis of Glycoproteins with Bisected and Branched Complex N-glycans", Glycobiology, 2011, vol. 21, no. 6, pages 813-823 See abstract; page 814; page 820, right column, fifth paragraph-page 821, second paragraph; figure 2.	1,8-9,13-17
Y		5-7,10-12
A		2-4,18
Y	KR 10-1449155 B1 (BIOAPPLICATIONS INC.) 13 October 2014 See claims 1-4; figure 3.	5-7,10-12
X	OKAMOTO, M. et al., "Enhanced Expression of an Antimicrobial Peptide Sarcotoxin IA by GUS Fusion in Transgenic Tobacco Plants", Plant and Cell Physiology, 1998, vol. 39, no. 1, pages 57-63 See abstract; page 61, right column, first paragraph; figure 1.	1,8-9,13-17
A	LEE, G. et al., "Oral Immunization of Haemagglutinin H5 Expressed in Plant Endoplasmic Reticulum with Adjuvant Saponin Protects Mice against Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus Infection", Plant Biotechnology Journal, 2015, vol. 13, pages 62-72 See the entire document.	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 MAY 2018 (30.05.2018)	**31 MAY 2018 (31.05.2018)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/000807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAGT, C. M. J. et al., "Introduction of an N-glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeasts", Applied and Environmental Microbiology, 2000, vol. 66, no. 11, pages 4940-4944 See the entire document.	1-18
A	SYMONS, A. et al., "Domain Organization of the Extracellular Region of CD45", Protein Engineering, 1999, vol. 12, no. 10, pages 885-892 See the entire document.	1-18
A	NCBI, GenBank accession no. AAS46946.1 (26 July 2016) See all sequences.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/000807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1449155 B1	13/10/2014	KR 10-2014-0073710 A	17/06/2014
		WO 2014-088255 A1	12/06/2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/000807

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/82; C12N 15/29; A01H 5/00; C07K 14/705

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:N-당화, 재조합 벡터, CD45 유래 M 도메인, 목적 단백질

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CASTILHO, A. 등, 'N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans, Glycobiology, 2011, 제21권, 제6호, 813-823 페이지 초록; 페이지 814; 페이지 820, 우컬럼, 다섯번째 단락-페이지 821, 두번째 단락; 도면 2 참조.	1,8-9,13-17
Y		5-7,10-12
A		2-4,18
Y	KR 10-1449155 B1 (주식회사 바이오앱) 2014.10.13 청구항 1-4; 도면 3 참조.	5-7,10-12
X	OKAMOTO, M. 등, 'Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants', Plant and Cell Physiology, 1998, 제39권, 제1호, 57-63 페이지 초록; 페이지 61, 우컬럼, 첫번째 단락; 도면 1 참조.	1,8-9,13-17
A	LEE, G. 등, 'Oral immunization of haemaggulutinin H5 expressed in plant endoplasmic reticulum with adjuvant saponin protects mice against highly pathogenic avian influenza A virus infection', Plant Biotechnology Journal, 2015, 제13권, 62-72 페이지 전체 문헌 참조.	1-18

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 05월 30일 (30.05.2018)	2018년 05월 31일 (31.05.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/000807

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SAGT, C. M. J. 등, 'Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts', Applied and Environmental Microbiology, 2000, 제66권, 제11호, 4940-4944 페이지 전체 문헌 참조.	1-18
A	SYMONS, A. 등, 'Domain organization of the extracellular region of CD45', Protein Engineering, 1999, 제12권, 제10호, 885-892 페이지 전체 문헌 참조.	1-18
A	NCBI, GenBank accession no. AAS46946.1 (2016.07.26) 전체 서열 참조.	1-18

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/000807

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1449155 B1	2014/10/13	KR 10-2014-0073710 A WO 2014-088255 A1	2014/06/17 2014/06/12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/10		
A01H	***5/00***	***(2018.01)***	A01H	5/00	A	
C12P	***21/00***	***(2006.01)***	C12P	21/00	C	
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	C07K	14/47		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		

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

(72)発明者　カン、ヒャン　チュ
大韓民国　３７６５５　キョンサンプクード、ポハンーシ、ナムーグ、ヨンイルーウプ、ユカンーギル　１０ボンーギル、１３－１、５０２

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 CA11 CA14 CA17
4B064 AG01 AG31 BJ12 CA11 CA19 CC24
4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA87Y AA88X AB01 AC14 BA01
BA02 CA24 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 FA74