



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0046260
(43) 공개일자 2025년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/78 (2024.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8257 (2013.01)
C07K 14/78 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001578
(22) 출원일자(국제) 2023년08월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월16일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/028120
(87) 국제공개번호 WO 2024/029529
국제공개일자 2024년02월08일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-123600 2022년08월02일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시키가이샤 유니바이오
일본국 니이가타켄 니이가타시 니시칸쿠 니이다가
타 88반치
(72) 발명자
요시나카 교지
일본국 959-0597 니이가타켄 니이가타시 니시칸쿠
니이다가타 88반치 가부시키가이샤 유니바이오 나
이
나카바야시 오사무
일본국 959-0597 니이가타켄 니이가타시 니시칸쿠
니이다가타 88반치 가부시키가이샤 유니바이오 나
이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성호

전체 청구항 수 : 총 11 항

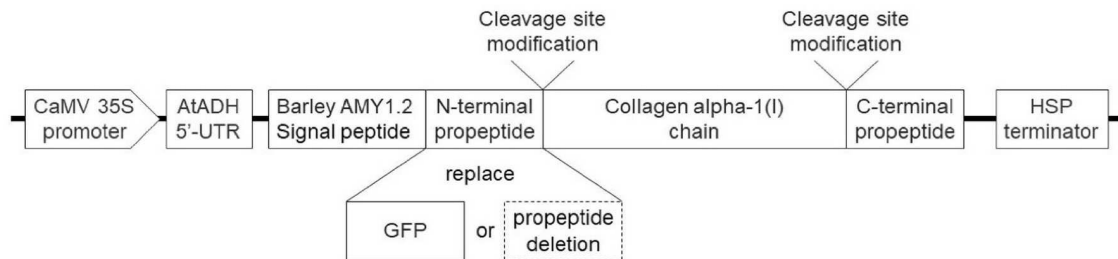
(54) 발명의 명칭 콜라겐 산생 방법

(57) 요약

본 개시는, 콜라겐을 제조하는 식물 또는 단리(單離)된 식물 세포의 제조 방법 및 이것에 사용하는 핵산 구축물, 및, 당해 식물 또는 단리된 식물 세포를 이용한 콜라겐 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a

I 형 콜라겐 α1 발현 카세트



(52) CPC특허분류

C07K 2319/60 (2013.01)

(72) 발명자

오카와 쇼이치로

일본국 959-0597 니이가타켄 니이가타시 니시칸쿠
니이다가타 88만치 가부시키키가이샤 유니바이오 나
이

유키 마사유키

일본국 959-0597 니이가타켄 니이가타시 니시칸쿠
니이다가타 88만치 가부시키키가이샤 유니바이오 나
이

명세서

청구범위

청구항 1

- A) 프로콜라겐을 코딩하는 핵산 구축물을 포함하는 식물체 또는 단리(單離)된 식물 세포를 준비하는 공정;
 B) 식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서, 프로콜라겐을 일과성으로 발현시키는 공정;
 C) 공정 B에 의하여 세포 외에 분비된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 분리하는 공정;
 을 포함하는, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 프로콜라겐 또는 콜라겐을 산생(產生)하는 방법.

청구항 2

공정 B 후에, 세포 외에 분비된 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단을 절단하는 공정을 포함하는, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 프로콜라겐 또는 콜라겐을 산생하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 구축물이, 천연형의 프로콜라겐에 대하여 80% 이상의 아미노산 배열 동일성을 가지는 프로콜라겐을 코딩하는 핵산 배열을 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 구축물이, 프로콜라겐 전체 길이를 코딩하는 핵산 배열을 포함하고, 프로콜라겐의 N 말단이 식물 세포 내에서 절단되지 않도록 하는 변이를 가지고 있는, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의하여 산생된, 프로콜라겐 또는 콜라겐.

청구항 6

제1항에 기재된 방법에 있어서 이용되는, 프로콜라겐 또는 콜라겐을 발현하는 핵산 구축물.

청구항 7

제6항에 기재된 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제6항에 기재된 핵산 구축물 또는 제7항에 기재된 발현 벡터를 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포.

청구항 9

제6항에 기재된 핵산 구축물이 코딩하는 프로콜라겐 또는 콜라겐이고, 비천연형 아미노산 배열을 가지는 프로콜라겐 또는 콜라겐.

청구항 10

제9항에 있어서,

N 말단 프로 영역에, 이종 펩티드가 융합되어 있는, 프로콜라겐 또는 콜라겐.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의하여 생성된, 프로콜라겐 또는 콜라겐, 또는 제9항 혹은 제10항에 기재된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는, 의약 조성물, 화장품 조성물, 또는 식품 조성물인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는, 콜라겐을 제조하는 식물 또는 단리(單離)된 식물 세포의 제조 방법 및 이것에 사용하는 핵산 구축물, 및, 당해 식물 또는 단리된 식물 세포를 이용한 콜라겐 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라겐은 모든 포유류 동물 결합 조직에 보이는 세포 외 매트릭스 단백질 패밀리를 이루고 있고, 콜라겐 분자는 α 사슬로 불리는 폴리펩티드의 3개가 삼중 나선 영역을 형성하는 구조를 포함하고 있다. I형 콜라겐 등의 콜라겐은, 동물의 초기 발생, 기관 형성, 세포 접착, 세포 증식, 조혈, 창상 치유, 조직 재구축 등의 다양한 생체 반응에 관여하고 있다. 그 구조적 특성, 면역원성이 낮은 것 등에 착목하여, 콜라겐은, 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에서 폭넓게 이용되고 있다(비특허문헌 1: Ruggiero et al., 2000, FEBS Letter, 2000, Vol.469, pp.132-136. 비특허문헌 2: Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol.515, pp.114-118).

[0003] 그렇지만, 일반적으로 이것들의 용도로 이용되는 콜라겐은 동물 조직으로부터 추출된 것이 사용되고 있고, 바이러스나 그 외의 감염성 물질에 의하여 오염되어 있을 가능성이 있다. 그 때문에, 상기 각 분야의 산업계에서는, 동물 조직 이외로부터 콜라겐을 얻는 방법을 확보하는 것이 기대되고 있다. 동물성 단백질을 안전하게 대량 생산하기 위한 비용 대 효과에 뛰어난 대량 생산 방법으로서, 유전자 개변 식물을 이용한 발현 시스템이 이용되고 있고, 유전자 개변 담배 등의 식물체로 콜라겐을 산생(產生)하는 것이 시도되고 있다(비특허문헌 2: Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol.515, pp.114-118, 특허문헌 1: WIPO국제공개공보 제2006/035442호).

[0004] 그렇지만, 콜라겐은 3개의 펩티드 사슬이 형성하는 삼중 나선 구조를 가지는 복잡한 구조를 가지는 단백질이고, 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에 있어서 이용할 수 있는 콜라겐을 식물체로 제조하기 위하여는, 가일층의 기술 개선이 요구되고 있었다. 예를 들어, 담배 식물과 같은 단백질 산생에 이용되는 식물 세포는, 인간 본래의 프로 영역의 절단 부위로부터 어긋난 개소를 절단하는 효소를 가지고 있고, 단순히 식물 세포 내에서 발현시켜도, 완전히 인간 콜라겐과 구조를 일치시킨 고품질인 콜라겐의 제조가 곤란하였다. 따라서, 단순히 식물 세포 내에서 콜라겐을 발현시켜도, 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에 있어서 이용할 수 있는 품질의 콜라겐을 제조하는 것은 곤란하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) WIPO국제공개공보 제2006/035442호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Ruggiero et al., 2000, FEBS Letter, 2000, Vol.469, pp.132-136.

(비특허문헌 0002) Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol.515, pp.114-118.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시의 목적은, 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에 있어서 이용할 수 있는 콜라겐을 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 제조하기 위한 가일층의 개선된 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 개시의 발명자들은, 상기 콜라겐을 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 제조하기 위한 방법에 관하여, 예의(銳意) 시험, 검토한 결과, 식물 세포 내에서 프로콜라겐을 일과성으로 발현하는 것에 의하여, 식물 체내에서의 프로콜라겐의 N 말단 절단이 억제되는 것 등을 찾아내는 것에 의하여, 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 콜라겐을 효율 좋게 산생시키는 것에 성공하고, 본원 발명을 완성하였다.
- [0009] 본 개시는 일 태양(態樣)에 있어서, 식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서, 프로콜라겐을 일과성으로 발현시키는 공정을 포함하는, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 프로콜라겐 또는 콜라겐을 산생하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 개시는 일 태양에 있어서, 식물체 또는 단리된 식물 세포로 산생된 콜라겐 또는 프로콜라겐을 제공한다.
- [0011] 본 개시는 일 태양에 있어서, 식물체 또는 단리된 식물 세포로 콜라겐 또는 프로콜라겐을 산생하기 위한 핵산 구축물을 제공한다.
- [0012] 본 개시는 일 태양에 있어서, 식물체 또는 단리된 식물 세포로 콜라겐 또는 프로콜라겐을 산생하기 위한 핵산 구축물을 함유하는 벡터, 및 당해 벡터를 함유하는 식물체 또는 단리된 식물 세포를 제공한다.
- [0013] 본 개시는 일 태양에 있어서, 식물체 또는 단리된 식물 세포로 콜라겐 혹은 프로콜라겐을 산생하기 위한 핵산 구축물이 코드하는, 비천연 배열을 가지는 프로콜라겐 또는 콜라겐을 제공한다.
- [0014] 본 개시는 일 태양에 있어서, 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0015] 보다 구체적으로는, 본 개시는 이하를 제공한다.
- [0016] [항목 1]
- [0017] A) 프로콜라겐을 코드하는 핵산 구축물을 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포를 준비하는 공정;
- [0018] B) 식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서, 프로콜라겐을 일과성으로 발현시키는 공정;
- [0019] C) 공정 B에 의하여 세포 외에 분비된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 분리하는 공정;
- [0020] 을 포함하는, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 프로콜라겐 또는 콜라겐을 산생하는 방법.
- [0021] [항목 2]
- [0022] 공정 B 후에, 세포 외에 분비된 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단을 절단하는 공정을 포함하는, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 프로콜라겐 또는 콜라겐을 산생하는 방법.
- [0023] [항목 3]
- [0024] 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 핵산 구축물이, 천연형의 프로콜라겐에 대하여 80% 이상의 아미노산 배열 동일성을 가지는 프로콜라겐을 코드하는 핵산 배열을 포함하는, 방법.
- [0025] [항목 4]
- [0026] 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 핵산 구축물이, 프로콜라겐 전체 길이를 코드하는 핵산 배열을 포함하고, 프로콜라겐의 N 말단이 식물 세포 내에서 절단되지 않도록 하는 변이를 가지고 있는, 방법.
- [0027] [항목 5]
- [0028] 항목 1 내지 4 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의하여 산생된, 프로콜라겐 또는 콜라겐.
- [0029] [항목 6]
- [0030] 항목 1 내지 4 중 어느 한 항에 기재된 방법에 있어서 이용되는, 콜라겐을 발현하는 핵산 구축물.
- [0031] [항목 7]
- [0032] 항목 6에 기재된 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터.
- [0033] [항목 8]
- [0034] 항목 5에 기재된 핵산 구축물 또는 항목 7에 기재된 발현 벡터를 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포.

- [0035] [항목 9]
- [0036] 항목 6에 기재된 핵산 구축물이 코드하는 프로콜라겐 또는 콜라겐이고, 비천연형 아미노산 배열을 가지는 프로콜라겐 또는 콜라겐.
- [0037] [항목 10]
- [0038] 항목 9에 있어서, N 말단 프로 영역에, 이중 펩티드가 융합되어 있는, 프로콜라겐 또는 콜라겐.
- [0039] [항목 11]
- [0040] 항목 1 내지 4 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의하여 생성된, 프로콜라겐 또는 콜라겐, 또는 항목 9 혹은 10에 기재된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는, 의약 조성물, 화장품 조성물, 또는 식품 조성물인 조성물.

발명의 효과

- [0041] 본 개시는, 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에 있어서 이용할 수 있는 콜라겐을 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 제조하기 위한 가일층의 개선된 방법을 제공한다고 하는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1a는, I형 콜라겐 $\alpha 1$ 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 1b는, I형 콜라겐 $\alpha 2$ 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 1c는, prolyl 4-hydroxylase α 사브유닛(P4H α), prolyl 4-hydroxylase β 사브유닛(P4H β) 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 1d는, 리실 히드록실라제 3(LH3) 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 1e는, 골형성 단백질 1(BMP1) 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 1f는, Tomato bushy stunt virus 유래 RNA silencing suppressor p19 발현 카세트의 구성을 도시하는 모식도이다.
- 도 2는, I형 콜라겐 $\alpha 1$ 발현 카세트를 니코티아나·벤타미아나 식물 발현계에서 일과성으로 발현시키는 것으로, 식물 체내에 N 말단 프로 영역 및 C 말단 프로 영역을 가지는 전체 길이 콜라겐 단백질이 축적되어 있는 것이 확인된 것을 도시하는 도면이다. 라인 3은, I형 콜라겐 $\alpha 1$ 발현 카세트로부터 발현된 전체 길이 콜라겐 단백질이 추출된 것을 도시한다. 라인 4 ~ 18은, 각종 프로테아제에 대응한 절단 부위 변이를 가지는 I형 콜라겐 $\alpha 1$ 발현 카세트로부터 발현된 전체 길이 콜라겐 단백질이, 대응하는 프로테아제에 의하여 절단된 것을 도시한다.
- 도 3은, 녹색 형광 단백질(GFP) 융합 콜라겐 $\alpha 1$ 추출액의 추출액에 대하여 여기광을 조사(照射)하는 것에 의하여, 형광이 확인된 것을 도시하는 도면이다.
- 도 4는, I형 콜라겐 $\alpha 1$ 발현 카세트와 I형 콜라겐 $\alpha 2$ 발현 카세트를 식물 발현계에서 공발현(共發現)시키는 것으로, $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ 콜라겐 단백질이 동시에 세포 체내에서 축적하는 것을 확인하는, 웨스턴 블롯 실험의 결과를 도시하는 도면이다.
- 도 5는, 질량 분석기에 의하여 $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ 콜라겐 단백질이 발현되고 있는 것을 확인한 시험의 결과를 도시하는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 콜라겐은 α 사슬로 불리는 3개의 펩티드 사슬로 구성되어 있고, 세포질의 소포체막에 결합한 리보솜에 의하여 mRNA로부터 합성된 각 펩티드는, 합성과 함께 소포체 내로 이행하고, 각각의 C 말단의 S-S 결합 반응 등을 얻어 3개의 펩티드로 이루어지는 삼중쇄 프로콜라겐 분자를 형성한다. 소포체로부터 골지체를 거쳐 세포 외로 분비된 삼중쇄 프로콜라겐 분자는, N 말단 및 C 말단이 절단되는 것으로 성숙 삼중쇄 콜라겐이 된다(Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3(1): a004978).
- [0044] 성숙 삼중쇄 콜라겐은 구성하는 α 사슬의 종류, 조합, 전체의 구조 또는 특성에 의하여 I형 콜라겐, II형 콜라겐, III형 콜라겐 ~ XXVIII형 콜라겐 등 다양하게 분류된다. 예를 들어, I형 콜라겐은 주로 2개의 $\alpha 1$ 펩티드와

1개의 $\alpha 2$ 펩티드로 구성되고, II형 콜라겐은 3개의 $\alpha 1$ 펩티드로 구성된다. 각 α 사슬은 생합성 시의 스플라이싱 태양의 상위(相違)에 의하여 한층 더 베리에이션을 일으키고, III형 콜라겐은 II형 콜라겐과 마찬가지로 3개의 $\alpha 1$ 펩티드로 구성되어 있지만, 각각을 구성하는 α 사슬의 스플라이싱 형태는 다르다(Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3(1): a004978).

[0045] 몇 가지의 종류의 성숙 삼중쇄 콜라겐은 한층 더 서로 가교되는 것으로, 섬유 구조를 형성하고, 몇 가지의 종류의 성숙 삼중쇄 콜라겐은 네트워크 구조를 형성한다. 이것들 각종 콜라겐은 생체 내의 여러 가지 장소에서 생성되고, 다양한 생체 기능을 담당하고 있다(Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3(1): a004978).

[0046] 이와 같은 콜라겐을 대량 생산하여 의약 분야, 치료 분야, 화장품 분야, 식품 분야 등에 있어서 이용하기 위하여, 콜라겐을 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 제조하기 위한 방법에 관하여 본 개시의 발명자들이 예의 시험, 검토한 결과, 프로콜라겐의 식물 세포 내에서의 발현을 일과성의 것으로 하는 것에 의하여, 식물 세포의 내재성 효소에 의한 발현 콜라겐의 분해를 대폭으로 억제할 수 있는 것이 발견되었다. 나아가, 콜라겐 유전자에 변이를 도입하는 것에 의하여, 삼중쇄 프로콜라겐 분자 혹은 성숙 삼중쇄 콜라겐 분자를 식물체로부터 회수할 수 있고, 콜라겐을 효율 좋게 산생할 수 있는 것을 찾아냈다.

[0047] 보다 구체적으로는, 포유류 생체 내에서는 천연의 콜라겐은 N 말단 및 C 말단에 연장 영역을 가지는 프로콜라겐으로서 세포 외에 분비된 후에, N 말단 및 C 말단이 효소에 의하여 절단되어 성숙 콜라겐 분자가 되는 것에 대하여, 식물 세포 내에서 프로콜라겐을 발현하면, 식물 세포 내에서 N 말단 및 C 말단이 절단되어 버리고, 그 결과 수용성이 대폭으로 저하한다. 당해 식물 세포 내에서 절단되는 N 말단 절단 부위는, 본래 프로콜라겐이 콜라겐으로 성숙할 때에 N 말단이 절단되는 부위보다도 C 말단 쪽으로 위치하고 있고, 식물 세포 내에서 발현한 프로콜라겐으로부터 얻어지는 성숙 콜라겐은 천연의 성숙 콜라겐에 비하여 N 말단이 단축되어 있다. 또한, 식물 세포 내에서 절단되는 N 말단 절단 부위는 절단 위치가 불명하다. 이것들 식물 세포 내에서의 비천연 위치의 절단에 의하여, 식물 세포 내에서 산생된 콜라겐은, 천연 콜라겐과 다른 특성을 가질 수 있다.

[0048] 본 개시의 발명자들은, 식물 세포 내에서의 콜라겐 발현을 일과성인 것으로 하는 것에 의하여, 식물 세포 내에서의 프로콜라겐의 N 말단 절단을 억제할 수 있는 것을 발견하였다. 나아가, 식물 세포 내 또는 산생 공정에 있어서의 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단의 절단을 억제할 수 있는 아미노산 변이를 찾아내고, 이것들 변이를 가지는 프로콜라겐을 발현시키는 것으로, 세포 외에 분비되는 프로콜라겐 또는 콜라겐을 효율 좋게 회수하는 것이 가능하게 되었다. 나아가, 프로콜라겐의 N 말단 및 C 말단 연장 영역을, 소망하는 효소에 의하여 절단하고, 또한 절단 후의 성숙 콜라겐 분자의 N 말단 및 C 말단의 아미노산 배열이, 천연 성숙 콜라겐 분자의 아미노산 배열과 같게 되기 위한 효소 인식 배열을 콜라겐 유전자에 도입하는 것으로, 소망하는 공정에서 프로콜라겐을 성숙 콜라겐 분자로 전환하는 것이 가능하게 되었다.

[0049] (정의)

[0050] 그 외에 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용하는 기술 용어 및 과학 용어는, 모두, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의하여 통상적으로 이해되고 있는 것과 같은 의미를 가진다.

[0051] 본 명세서에 있어서, 복수의 수치의 범위가 나타내진 경우, 그것들 복수의 범위의 임의의 하한값 및 상한값의 조합으로 이루어지는 범위도 마찬가지로 의미한다.

[0052] 본 명세서에 있어서 「실질적으로」라는 말은, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의하여 통상적으로 이해되고 있는 것과 같은 의미이지만, 예를 들어, 생물학적 또는 화학적인 현상이 목적의 상태를 완전히 달성하지 않는 경우가 있는 것을 고려하여, 목적의 상태 및, 생물학적 또는 화학적인 특성을 위하여 불가피적으로 달성되지 않는 상태를 포함하는 것을 의도하여 이용된다.

[0053] 본 명세서에 있어서, 수치에 관련하여, 「약」이라는 용어를 이용하는 경우, 당해 값은 예를 들어, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01%의 범위 내에서 변동할 수 있는 것을 의미한다.

[0054] 본 명세서에 있어서, 「포함한다」라는 용어는, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의하여 통상적으로 이해되고 있는 것과 같은 의미이지만, 예를 들어 「포함하는」 것 및 「로 이루어지는」를 내포하고, 구체적으로는, A를 「포함하는」 조성물은, A만을 포함하는 경우에 더하여, 다른 구성 요소, B를 포함하는 일도 있다.

[0055] 본 명세서에 있어서, 조성물에 관하여 사용되는 「로 이루어지는」 또는 「로 구성되는」라는 용어는, 본 개시

가 속하는 기술 분야의 당업자에 의하여 통상적으로 이해되고 있는 것과 같은 의미이지만, 당해 조성물을 오로지 구성하는 구성 요소를 나타내기 위하여 사용된다. 예를 들어, A 「로 이루어지는」 조성물은, 오로지 A만을 포함한다. 그렇지만 일 태양에 있어서, A 「로 이루어지는」 조성물은, 생물학적 및 화학적인 성질에 기초하여 제조상 피할 수 없는 A 이외의 혼입물을 포함하는 태양을 포함한다.

[0056] 본 개시에 있어서, 아미노산 배열 또는 염기 배열의 「동일성」이란, 비교해야 할 2개의 아미노산 배열의 아미노산 또는 염기 배열의 염기가 가능한 한 많이 일치하도록 당해 2개의 배열을 정렬시키고, 일치한 아미노산 수 또는 염기 수를, 전체 아미노산 수 또는 염기 수로 나눈 것을 백분율로 나타낸 것이다. 상기 정렬 시에는, 필요에 따라, 비교하는 2개의 배열의 일방(一方) 또는 쌍방으로 적의(適宜) 갭을 삽입한다. 이와 같은 배열의 정렬화는, 예를 들어 BLAST, FASTA, CLUSTAL W 등의 주지의 프로그램을 이용하여 행할 수 있다. 갭이 삽입되는 경우, 상기 전체 아미노산 수 또는 염기 수는, 1개의 갭을 1개의 아미노산 또는 염기로서 센 수가 된다. 이와 같이 하여 센 전체 아미노산 수 또는 염기 수가, 비교하는 2개의 배열 사이에서 다른 경우에는, 동일성(%)은, 긴 쪽의 배열의 전체 아미노산 수 또는 염기 수로, 일치한 아미노산 수 또는 염기 수를 나누어 산출된다. 다만, 비교해야 할 배열이 다른 임의의 배열과 연결된 상태에 있는 경우에는, 상당하는 영역만을 꺼내어 배열을 대비하고, 동일성을 산출한다.

[0057] 본 개시에 있어서, 프로콜라겐 또는 콜라겐의 발현이 「일과성」이라는 것은, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에 의하여 통상적으로 이해되고 있는 것과 같은 의미이지만, 전형적으로는 프로콜라겐 또는 콜라겐을 코드하는 핵산 배열을 숙주 세포의 계놈에 짜 넣지 않는 상태로, 숙주 세포 내에서 발현시키는 것을 의미한다. 그와 같은 일과성의 발현은, 예를 들어 바이러스 벡터를 이용하는 것으로 실시할 수 있다.

[0058] (식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 콜라겐을 산생하는 방법)

[0059] 일 태양에 있어서, 본 개시는 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 콜라겐을 산생하는 방법을 제공한다.

[0060] 본 개시의 콜라겐 산생 방법으로는, 프로콜라겐을 코드하는 핵산을 포함하는 핵산 구축물을 식물체 또는 단리된 식물 세포 중에서 일과성으로 발현하는 것에 의하여, 세포 외에 분비된 프로콜라겐 또는 콜라겐 분자를 회수하는 공정을 포함하고, 최종적으로 프로콜라겐 또는 콜라겐 분자를 산생한다.

[0061] 전형적으로는, 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐 산생 방법은 이하의 공정을 포함한다.

[0062] A) 프로콜라겐을 코드하는 핵산 구축물을 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포를 준비하는 공정;

[0063] B) 식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서, 프로콜라겐을 일과성으로 발현시키는 공정;

[0064] C) 공정 B에 의하여 세포 외에 분비된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 분리하는 공정.

[0065] 상기 공정 A) 「프로콜라겐을 코드하는 핵산 구축물을 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포를 준비하는 공정」에서 이용되는 핵산 구축물은, 전형적으로는 하기 (식물 또는 단리된 식물 세포 중에 있어서의 콜라겐 산생에 사용하기 위한 핵산 구축물)의 구성을 가지는 핵산 구축물이다.

[0066] 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐의 산생 방법에 있어서 산생되는 콜라겐의 종류는 특별히 한정되지 않고, 적절한 α 사슬을 코드하는 핵산 구축물을 조합하는 것에 의하여, 예를 들어, I형 콜라겐, II형 콜라겐, III형 콜라겐 등, 임의의 콜라겐을 산생할 수 있다. 예를 들어, 하기 (핵산 구축물이 코드하는 프로콜라겐 또는 콜라겐)에 있어서 기재되는, 비천연형의 아미노산 배열을 가지는 콜라겐, 또는 이중 펩티드를 융합하는 콜라겐을 산생할 수 있다.

[0067] 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐 산생 방법에 있어서 이용되는 식물로서, 예를 들어 담배속 식물, 이끼 식물 (피스코미트렐라 파텐스(P. patens) 등), 감자(S. tuberosum 등), 벧과 식물(O. sativa 등), 유채과 식물, 양상추를 들 수 있지만, 담배속 식물이 바람직하다. 담배속 식물로서는, 예를 들어, 벤탐미아나 담배(N. benthamiana), 담배(N. tabacum), 니코티아나·엑셀시어(N. excelsior) 등을 들 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다.

[0068] 상기 공정 B) 「식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서, 프로콜라겐을 일과성으로 발현시키는 공정」에서는, 전형적으로는 프로콜라겐을 코드하는 핵산 배열을 포함하는 바이러스 벡터 등의 발현 벡터를, 숙주 세포의 계놈에 짜 넣지 않는 상태로, 식물체 또는 단리된 식물 세포에 있어서 발현시킨다.

[0069] 프로콜라겐을 일과성으로 발현하는 것으로, 식물 세포 내에서의 N 말단 절단을 억제하는 것이 가능하게 된다. 식물체 또는 단리된 식물 세포 내에서의 프로콜라겐 일과성 발현은, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게

공지의 방법으로 행할 수 있고, 프로콜라겐의 발현량, 발현 기간 등은, 사용하는 벡터, 프로모터, 배지의 구성, 배양 조건 등을 적의 조정하는 것에 의하여, 본 개시의 취지를 잃지 않는 범위에서 당업자가 적의 조정할 수 있다.

[0070] 예를 들어, 본 개시의 핵산 구축물을 재조합 바이러스로서 이용하는 경우, 바이러스를 감염시킨 식물체 또는 단리된 식물 세포 내에서 바이러스가 증식하고, 식물 세포 내에서 대량의 콜라겐이 생산된다. 예를 들어, 식물체를 이용하여 콜라겐을 산생하는 경우, 바이러스 접종 후 3 ~ 15일간 정도 식물을 재배한 후, 잎 등의 식물 조직으로부터 콜라겐 또는 프로콜라겐을 추출 회수할 수 있다.

[0071] 상기 공정 C) 「공정 B에 의하여 세포 외에 분비된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 분리하는 공정」에서는, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게 공지인 임의의 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, C. D. Mount et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 240 33 (1985), U. H. Gregory and I. R. Willshire, Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 356 1765 (1975)에 기재된 방법을 이용할 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로는, 예를 들어, 담배 식물체에 있어서 콜라겐을 발현시켜 콜라겐 또는 프로콜라겐을 산생하는 경우, 동결 보존한 담배 식물의 잎을 적절한 버퍼 중에서 마쇄하고, 버퍼로부터 염석에 의하여 콜라겐 또는 프로콜라겐을 추출, 정제할 수 있다.

[0072] 일 태양에 있어서, 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐의 산생 방법은, 공정 B 후에, 세포 외에 분비된 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단을 절단하는 공정을 포함하여도 무방하다. 당해 절단은, 프로콜라겐을 화학적 처리 또는 효소적 처리 또는 이것들의 조합으로 처리하는 것으로 실시할 수 있다. 당해 화학적 또는 효소적 처리 중 적어도 일부는 식물 세포 내 이외의 장소에서 행하여지고, 배양 공정 중, 추출 정제 공정 중, 추출 정제 공정 후 등의 공정에 있어서 행할 수 있다. 예를 들어, 완전 길이 프로콜라겐을 산성 환경에서 추출 정제하는 것에 의하여, 천연형 프로콜라겐의 C 말단을 절제할 수 있는 것이 알려져 있다. 일 태양에 있어서, 추출 정제 공정 후에 프로테아제(단백질 분해 효소)에 의하여 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단을 절제할 수 있다. 추출 정제 공정 후에 프로테아제에 의하여 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단을 절제하는 것에 의하여, 절제 반응계로의 협잡물의 혼입을 억제하고, 프로테아제에 적당한 반응 조건으로 절제 반응을 행하는 것으로, 절제 반응의 특이성을 향상시키고, 생성물의 높은 안정성을 얻을 수 있다. 이렇게 하여 안정된 콜라겐을 제조하여 최종 판매 형태로 할 수 있는 것 외에, 완전 길이 프로콜라겐을 바이오 3D 프린터의 바이오 잉크의 원료로 하고, 바이오 3D 프린터로 입체 구조를 구축 후에 N 말단 또는 C 말단을 절단하는 효소(예: BMP1)를 추가하는 것에 의하여 삼중 나선 구조를 보다 강고하게 한다고 하는 응용 방법도 가능하다. 이것은 디지털카메라가 보급하기 전의 사진 필름의 「현상」에 상당하는 공정이다.

[0073] 당해 프로콜라겐의 N 말단 또는 C 말단 연장 영역을 절단하는 효소는 특별히 한정되지 않는다. 일 태양에 있어서, 포유류 세포에 있어서의 천연형 프로콜라겐의 N 말단 및 C 말단을 절단하는 효소를 이용하는 것으로, 천연형 프로콜라겐으로부터 천연형 성숙 콜라겐을 생성할 수 있다. 이와 같은 천연형 프로콜라겐의 N 말단 및 C 말단을 절단하는 효소의 비한정적인 예로서, Procollagen N-Endopeptidase, BMP1 등을 사용할 수 있다. 또한, 아미노산 변이를 이용하여, 프로콜라겐의 N 말단 및 C 말단에 소망하는 프로테아제 인식 배열을 도입하는 것으로, 대응하는 프로테아제를 이용하는 것이 가능하게 된다. 이와 같은 효소로서, 예를 들어, HRV3C, Furin, Enterokinase를 사용할 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다. 덧붙여, HRV3C, Furin 및 Enterokinase의 인식 배열 및 절단 부위는 이하대로이다.

프로테아제	인식 배열 및 절단 부위(/로 나타낸다)
HRV3C	Leu Glu Val Leu Phe Gln / Gly Pro
Furin	Arg Xaa Arg Arg /
	Arg Xaa Lys Arg /
Enterokinase	Asp Asp Asp Asp Lys /

[0074]

[0075] 일 태양에 있어서, 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐의 산생 방법은, 프로콜라겐 또는 콜라겐을 번역 후 수식하는 공정을 포함하여도 무방하다. 예를 들어, P4H α , P4H β 또는 LH3 등에 의하여, 프로콜라겐 또는 콜라겐을 번역 후 수식하는 것에 의하여, 프로콜라겐 또는 콜라겐의 안정성을 향상시킬 수 있다. 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐의 산생 방법에 있어서, 번역 후 수식을 행하는 공정은, 프로콜라겐 또는 콜라겐의 번역 후의 임의의 시점에서 행할 수 있고, 식물 세포 내 또는 식물 세포로부터 분리 후의 단계에서 행할 수 있다. 예를 들어, P4H α 및 P4H β 와 프로콜라겐을 동일한 식물 세포로 발현하는 것에 의하여, 식물 세포 내, 예를 들어 소포체 내

에서 번역 후 수식을 행할 수 있다. 바람직하게는, 당해 번역 후 수식의 적어도 일부는 식물 세포의 액포 이외의 장소에서 행하여진다.

[0076] (식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 산생된 콜라겐)

[0077] 일 태양에 있어서, 본 개시는 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 산생된 프로콜라겐 또는 콜라겐을 제공한다. 일반적으로 의약, 화장품 또는 식품 분야 등에서 종래 제공되어 온 콜라겐은, 생체 조직에 존재하는 콜라겐 분자가 한층 더 중합한 콜라겐 섬유 등을 분해하여 제공된 것이 많고, 이와 같은 콜라겐은 분해 처리에 의하여 콜라겐의 구조 및 기능의 일부가 상실되어 있었다. 한편, 본 개시의 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 산생된 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 이와 같은 분해 처리를 거치는 일 없이 산생하는 것이 가능하기 때문에, 콜라겐의 구조 및 기능을 보다 완전한 상태로 보지(保持)하는 것이 가능하게 된다.

[0078] 일 태양에 있어서, 본 개시의 산생 방법으로 산생되는 프로콜라겐은, N 말단 및 C 말단을 구비한 프로콜라겐을 포함한다. 이와 같은 프로콜라겐은, 천연형의 프로콜라겐을 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 구축물을 식물 세포 내에서 일과성으로 발현하고, 세포 외에 분비된 프로콜라겐을 추출, 정제하는 것으로 산생할 수 있다.

[0079] 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 프로콜라겐은, 천연형의 아미노산 배열을 가지는 프로콜라겐을 포함한다. 당해 천연형 배열을 가지는 프로콜라겐은, 아미노산 배열은 천연 프로콜라겐과 동일하지만, 그 산생 공정에 있어서의 여러 가지 조건에 의하여, 번역 후 수식 상태 등의 점에서 다를 수 있다. 상술대로, 본 개시의 식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 콜라겐을 산생하는 방법으로는, 다양한 방법으로 번역 후 수식 상태를 제어하는 것이 가능하고, 이것에 의하여 다양한 생리 활성상의 이점을 구비할 수 있다.

[0080] 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 프로콜라겐은 N 말단 절단 부위 또는 C 말단 절단 부위 혹은 그 양방(兩方)의 부위에, 아미노산 변이를 가지는 비천연형 프로콜라겐을 포함한다. 일 태양에 있어서, 당해 변이는 식물 세포 내 또는 산생 공정 중의 프로콜라겐의 절단을 억제한다. 일 태양에 있어서, 당해 변이는 소망하는 프로테아제에 대응한 인식 배열을 제공한다. 일 태양에 있어서, 당해 변이는 산생 공정의 화학적 처리에 의하여 절단을 유도하는 배열을 제공한다. 비천연형 완전 길이 프로콜라겐의 N 말단 절단 부위 또는 C 말단 절단 부위의 아미노산 변이는, 최종적으로 천연형 성숙 콜라겐을 생성하는 것이어도 무방하고, N 말단 혹은 C 말단 또는 양방의 말단에 비천연형의 배열을 가지는 성숙 콜라겐을 생성하는 것이어도 무방하다.

[0081] 상기 아미노산 변이는, 천연형 아미노산 배열에 대한 아미노산 부가, 삭제, 치환 혹은 이것들의 조합일 수 있다.

[0082] 일 태양에 있어서, 본 개시의 산생 방법으로 산생되는 프로콜라겐은, N 말단 또는 C 말단의 한방만이 절제된, N 말단 결여 프로콜라겐 및 N 말단 결여 프로콜라겐을 포함한다. 당해 N 말단 결여 프로콜라겐은, 식물 세포 내 절제에 의한 것과는 다른 N 말단 결여를 가지고 있다. 일 태양에 있어서, 당해 N 말단 또는 C 말단 결여 프로콜라겐은, 세포 외에 분비된 완전 길이 또는 불완전 길이 프로콜라겐을 화학적 처리 또는 효소적 처리 또는 이것들의 조합으로 처리하는 것으로 생성할 수 있다.

[0083] 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 프로콜라겐은 N 말단 혹은 C 말단 또는 그 양방에 특정의 기능을 가지는 펩티드가 융합되어 있는 것을 포함한다. 융합되는 펩티드는 특별히 한정되지 않고, 이중 단백질 유래의 펩티드나, 신규로 합성되는 비천연 펩티드여도 무방하다. 예를 들어, 세포 외로의 분비를 촉진하는 펩티드, 프로콜라겐의 정제에 이용할 수 있는 친화성 펩티드, 형광을 일으키는 표지(標識) 펩티드 등을 이용할 수 있다. 일 태양에 있어서 당해 융합된 펩티드는, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게 알려져 있는 링커 배열을 이용하여 프로콜라겐에 융합할 수 있다. 일 태양에 있어서 당해 융합된 펩티드의 일부 영역 또는 전(全) 영역은, 화학적 또는 효소적 반응에 의하여, 프로콜라겐으로부터 절제할 수 있다.

[0084] 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 성숙 콜라겐은 N 말단 및 C 말단에 천연형의 아미노산 배열을 가지고 있다. 다른 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 콜라겐은 N 말단 및 C 말단 중 적어도 일방에 비천연형의 아미노산 배열을 가지고 있다. N 말단의 비천연형 아미노산 배열은, 식물 세포 내 절제에 의하여 생성되는 것과는 다르다.

[0085] 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 상기에 서술한 이외의 임의의 아미노산 변이를 가지는 것을 포함한다. 일 태양에 있어서, 본 개시에서 산생되는 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 상기에 서술한 이외의, 프로콜라겐 또는 콜라겐의 전 영역 또는 일부 영역과, 다른 펩티드가 융합한 것을 포함한다.

[0086] (식물 또는 단리된 식물 세포 중에 있어서의 콜라겐 산생에 사용하기 위한 핵산 구축물)

- [0087] 일 태양에 있어서, 본 개시는 식물 또는 단리된 식물 세포 중에 있어서의 콜라겐 산생에 사용하기 위한 핵산 구축물을 제공한다.
- [0088] 본 개시의 핵산 구축물은, 콜라겐을 구성하는 α 사슬의 적어도 1개를 코딩하는 핵산 배열을 가지고 있다. 일 태양에 있어서 본 개시의 핵산 구축물은 프로콜라겐을 발현하는 배열을 가지고 있다. 당해 프로콜라겐은, 상기 (식물 또는 단리된 식물 세포 중에서 산생된 콜라겐)에서 언급한 다양한 변이를 가지는 프로콜라겐 및 다른 펩티드와 융합한 프로콜라겐을 포함한다. 본 개시의 핵산 구축이 코딩하는 α 사슬의 종류는 특별히 한정되지 않고, $\alpha 1$, $\alpha 2$ 및 이것들의 스플라이스 이성체 중 어느 하나를 코딩할 수 있다.
- [0089] 본 개시의 핵산 구축물은 DNA, RNA 또는 본 개시가 속하는 기술 분야에 있어서 당업자에게 알려져 있는 임의의 이것들의 유사체여도 무방하다. 예를 들어, 본 개시의 핵산 구축물은, 비천연 염기를 포함하여도 무방하고, 또한, 그 일부에 탄화수소 사슬, 펩티드 사슬을 포함하여도 무방하다.
- [0090] 본 개시의 핵산 구축물은, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게 알려져 있는 상법(常法)의 화학 합성 방법, 혹은, 유전자 공학적 수법에 의하여 조제할 수 있다. 예를 들어, 천연에 존재하는 배열을 가지는 cDNA를 합성한 후, 이 cDNA를 주형으로서, 적당한 프라이머를 이용하여 적의 변이를 도입하는 것에 의하여 합성할 수도 있다. 혹은, 합성해야 할 핵산 구축물을 몇 가지의 짧은 영역으로 나누어 복수의 DNA 단편을 화학 합성하고, 공지된 fusion PCR법에 의하여 각 단편을 연결시켜 DNA 구축물을 합성할 수 있다. RNA 구축물은, DNA 구축물로부터의 전사 반응에 의하여 조제될 수 있다.
- [0091] 핵산 구축물의 배열에 변이를 도입하는 방법으로서, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게 알려져 있는 임의의 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 당업자는, Kunkel법이나 Gapped duplex법 등의 부위 특이적 돌연 변이 유발법, 오버랩 익스텐션 PCR(overlap extension PCR)법, QuikChange법 등의 방법을 이용할 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다.
- [0092] 일 태양에 있어서, 본 개시의 핵산 구축물은, 식물 체내에서 일과성으로 발현시키기 위한 핵산 단편을 포함하여도 무방하다. 예를 들어, 전사 반응에 의하여 재조합 바이러스 RNA를 합성할 때에 필요하게 되는 적당한 RNA 폴리머라제 프로모터(예를 들어, T7 프로모터 등의 파지 폴리머라제 프로모터), 바이러스의 레플리카제, 이행 단백질, 외피 단백질 등을 코딩하는 핵산 단편을 포함하여도 무방하다.
- [0093] 일 태양에 있어서, 본 개시의 핵산 구축물은, 식물 체내에서 콜라겐을 안정 발현시키기 위하여 유익한 효소 등을 코딩하는 핵산 단편을 포함하여도 무방하다. 예를 들어, 콜라겐의 안정성을 향진하는 P4H α , P4H β 또는 LH3 등을 코딩하는 핵산 단편 혹은 이것들의 조합을 포함할 수 있다. 이것들의 효소로서, 다양한 생물 유래의 효소를 이용할 수 있고, 예를 들어, 선충, 마우스, 인간 등에 유래하는 효소를 이용할 수 있다.
- [0094] 일 태양에 있어서, 이것들의 효소 등을 코딩하는 핵산 단편의 일부 또는 전부는, 프로콜라겐의 α 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 구축물과는 다른 제2 핵산 구축물에 포함되어도 무방하고, 프로콜라겐의 α 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 핵산 구축물은, 당해 제2 핵산 구축물과 조합하여 사용되어도 무방하다.
- [0095] 프로콜라겐의 α 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 핵산 구축물과, 효소 등을 코딩하는 핵산 단편을 포함하는 제2 핵산 구축물을 조합하여 사용하는 경우, 이것들을 동일한 식물체 또는 단리된 식물 세포에 도입하여도 무방하고, 다른 식물체 또는 단리된 식물 세포에 도입하여, 세포 외에 분비된 프로콜라겐과 효소가 반응하도록 하여도 무방하다.
- [0096] (핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터)
- [0097] 일 태양에 있어서 본 개시는, 식물 또는 단리된 식물 세포 중에 있어서의 콜라겐 산생에 사용하기 위한 핵산 구축물을 포함하는 벡터를 제공한다. 당해 벡터는 식물 숙주 내에서 콜라겐을 일과성으로 발현하기 위하여 이용되고, 전형적으로는 식물 바이러스 벡터로서 제공된다. 일 태양에 있어서, 본 개시의 발현 벡터는, 「재조합 바이러스」의 태양으로 제공할 수 있다. 당해 바이러스가 RNA 바이러스이면 본 개시의 핵산 구축물은 RNA이고, 바이러스가 DNA 바이러스이면 당해 핵산 구축물은 DNA이다. 일 태양에 있어서, 벡터 플라스미드를 *Agrobacterium tumefaciens*(아그로박테리움균)로 형질 변환시켜, 그 아그로박테리움균을 식물에 감염시켜 목적 단백질을 일과성 발현시킬 수도 있다.
- [0098] 본 개시의 재조합 바이러스로서 제공되는 발현 벡터는, 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자에게 알려져 있는 임의의 식물 바이러스 벡터(예를 들어, 「단백질 핵산 효소」, vol.45, p.607-613 등 참조)를 상법에 의하여 개변하는 것으로 제작할 수 있다. 일 태양에 있어서, 트마트 부시 스텐트 바이러스를 개변하여 재조합 바이러스로

하는 것이 바람직하다.

[0099] (핵산 구축물 또는 발현 벡터를 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포)

[0100] 본 개시는 일 태양에 있어서, 핵산 구축물 또는 발현 벡터를 포함하는 식물체 또는 단리된 식물 세포를 제공한다. 당해 식물체 또는 단리된 식물 세포는, 핵산 구축물 또는 발현 벡터의 도입 처리를 받은 것 외에, 이것들의 피처리 식물체 또는 식물 세포가 생육 또는 증식하여 얻어진 것이어도 무방하다.

[0101] (핵산 구축물이 코딩하는 프로콜라겐 또는 콜라겐)

[0102] 본 개시는 일 태양에 있어서, 상기 본 개시의 핵산 구축물이 코딩하는 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함한다. 당해 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 식물체 또는 단리된 식물 세포로부터 생성되는 것에 한정되지 않는다. 당해 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 천연적으로는 비천연형의 아미노산 배열을 가지고 있다. 일 태양에 있어서, 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 천연형의 프로콜라겐 또는 콜라겐에 대하여, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상의 아미노산 배열 동일성을 가진다. 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 천연형의 프로콜라겐 또는 콜라겐에 대하여, 1개 이상의 아미노산의 치환, 삽입, 결실(缺失)을 포함하여도 무방하다.

[0103] 일 태양에 있어서, 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐은, N 말단 프로 영역에 대신하여, 이중 단백질을 융합할 수 있고, 이것에 의하여 다양한 기능을 부가할 수 있다. 예를 들어, GFP를 N 말단 프로 영역에 대신하여 융합하는 것에 의하여, 형광 콜라겐을 생성할 수 있다. 당해 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 본 개시가 속하는 기술 분야에서 당업자에게 알려진 임의의 방법으로 발현 및 정제하는 것이 가능하고, 화학적 특성이나 생리 활성을 분석하는 등의 목적에 있어서 이용할 수 있다.

[0104] (프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는 조성물)

[0105] 본 개시는 일 태양에 있어서, 식물체 혹은 단리된 식물 세포로부터 생성되는 프로콜라겐 혹은 콜라겐, 또는 그 외의 방법에 의하여 생성되는 비천연형의 아미노산 배열을 가지는 프로콜라겐 혹은 콜라겐을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0106] 일 태양에 있어서, 본 개시의 조성물의 태양은 한정되지 않고, 예를 들어 의약 조성물, 화장품 조성물, 또는 식품 조성물의 태양으로 제공되고, 프로콜라겐 또는 콜라겐에 더하여, 이것들 각 분야의 조성물에 있어서 허용되는 담체(擔體), 부형제 등을 포함할 수 있다. 본 개시의 조성물에 있어서, 프로콜라겐 또는 콜라겐은, 한층 더 분자 사이의 가교 처리에 의하여, 복수의 프로콜라겐 또는 콜라겐 분자를 포함하는 섬유상(纖維狀) 또는 네트워크 형상의 구조를 가지는 다량체의 상태에도 무방하다. 본 개시의 조성물이 함유하는 콜라겐의 양은 특별히 한정되지 않고, 제형, 목적 등에 따라 적의 조절된다.

[0107] 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는 의약 조성물은, 당해 조성물이 의약품 그 자체인 경우와, 의약품을 제조할 때의 원료 혹은 중간 제품인 조성물을 포함한다. 본 개시의 의약 조성물의 형태는 특별히 한정되지 않고, 고형상(固形狀), 분상(粉狀), 과립상, 액체상(液體狀)이어도 무방하다. 본 개시의 의약 조성물이 대상으로 투여되는 형태인 경우, 그 제형은 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 정제, 세립제, 환제, 트로키제, 캡슐제 혹은 이것들의 원재료 또는 중간 제품으로서 제공될 수 있다.

[0108] 본 개시의 의약 조성물은, 재생 의료용의 의약 혹은 이것을 제조할 때의 원료 혹은 중간 제품인 조성물을 포함한다. 예를 들어, 본 개시의 의약 조성물은, 시트 형상의 조성물로서 제공되고, 대상의 체내 또는 체표에서 조직 재생을 촉진하기 위한 조성물, 또는 시트 형상의 조직을 배양하기 위한 스캐폴드체로서 제공될 수 있다. 일 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 3D 프린팅 기술 등을 이용하여 3차원 구조를 가지는 재생 의료 제품을 구성하기 위한 재료 조성물, 예를 들어 바이오 잉크의 원료로서 제공될 수 있다.

[0109] 일 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 매립 가능한 의료 디바이스 혹은 이것을 제조할 때의 원료 혹은 중간 제품인 조성물을 포함한다. 이것들 조성물은, 질병 또는 장애의 예방 또는 치료, 미용 목적 등으로 사용할 수 있다. 당해 조성물의 비한정적인 예는, 창상 피복제, 인공 피부, 인공 혈관, 유체의 제거 또는 환자로의 유체의 송달을 위한 카테터 및 다른 디바이스, 인공 심장, 인공 신장, 정형외과용의 핀, 플레이트 및 임플란트를 포함한다. 예를 들어 본 개시의 의약 조성물은, 3D 바이오 프린트가 끝난 유방 절제 후 임플란트, 미용성형용 충전제로서 사용할 수 있다.

[0110] 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는 화장품 조성물은, 당해 조성물이 화장품 그 자체인 경우와, 화장료를 제조할 때의 원료 혹은 중간 제품인 조성물을 포함한다. 본 개시의 화장품 조성물의 형태는 특별히 한정되지 않고, 고형상, 분상, 과립상, 액체상이어도 무방하다. 본 개시의 화장품은 국소 적용 또는 경구 투여되는 것

이어도 무방하고, 예를 들어, 연고, 로션, 크림, 마이크로 에멀션, 젤, 기름, 용액 등의 국소 투여제, 정제, 세립제, 환제, 트로키제, 캡슐제 등의 경구 투여제 혹은 이것들의 원재료 또는 중간 제품으로서 제공될 수 있다.

[0111] 본 개시의 프로콜라겐 또는 콜라겐을 포함하는 식품 조성물은, 당해 조성물이 식품 그 자체인 경우와, 식품을 제조할 때의 원료 혹은 중간 제품인 조성물을 포함한다. 당해 식품에는, 건강 식품, 기능성 식품, 특정 보건용 식품, 병자용 식품이 포함되고, 인간 이외의 동물을 대상으로 하여 사용되는 경우에는 사료를 포함한다. 당해 식품의 형태는 특별히 한정되지 않고, 고형상이어도 액상이어도 무방하다. 인간 이외의 동물로서는 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충 등 다양한 동물을 대상으로 하여 사용할 수 있다. 구체적인 식품의 종류로서는, 예를 들어, 청량 음료, 탄산 음료, 영양 음료, 과실 음료, 유음료 등 음료 또는 이것들의 음료의 농축 원액 및 조정용 분말; 아이스크림, 아이스 서벳, 빙수 등의 빙과; 메밀, 우동, 당면, 만두피, 찐만두피, 중화면, 즉석면 등의 면류; 엿, 추잉 껌, 캔디, 구미(gummi), 껌, 캐러멜, 초콜릿, 정과, 스낵 과자, 비스킷 등의 구이 과자, 젤리, 잼, 크림 등의 과자류; 어묵, 햄버그스테이크, 햄, 소시지 등의 수산·축산 가공 식품; 가공유, 발효유, 요구르트, 버터, 치즈 등의 유제품; 섀러드유, 튀김유, 마가린, 마요네즈, 쇼트닝, 휘핑크림, 드레싱 등의 유지 및 유지 가공 식품; 소스, 양념 등의 조미료; 스프, 스투, 카레, 빵, 잼, 섀러드, 반찬, 절임 등을 포함하지만, 이것들에 한정되지 않는다.

[0112] 이하에 실시예를 이용하여 본 개시를 한층 더 상세하게 설명하지만, 이것들의 실시예는 예시이고, 본 개시의 범위를 실시예의 범위로 한정하는 것은 아니다.

[0113] 실시예

[0114] (재료와 방법)

[0115] 본 연구에서 사용한 발현 카세트의 구축을 도 1a ~ f에 도시한다. 본 연구에 있어서의 코드 배열은 필요에 따라 담배 중에서의 발현을 위하여 최적화하고, 바람직한 플랭킹 영역을 가지도록 화학적으로 합성하였다.

[0116] 사용한 배열을 이하에 나타낸다.

표 1

배열 번호	배열명	배열
1	CaMV 35S Promoter (DNA 배열)	TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAAC CTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACT TTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTC CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC ATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCA AAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGA AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAG TGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGA TGACGCACAATCCCACATCCCTTCGCAAGACCCTT CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAG AACA
2	TMV omega (DNA 배열)	ACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATT ACAATTACTATTTACAATTAC
3	AtADH 5'- UTR (DNA 배열)	TACATCACAATCACACAAAATAACAAAAGATCAA AAGCAAGTTCTTCACTGTTGATA
4	HSP- terminator (DNA 배열)	TATGAAGATGAAGATGAAATATTTGGTGTGTCAA ATAAAAAGCTAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTGTT TTTTTCTTGGCTTGTTGTGTTATGAATTTGTGGC TTTTTCTAATATTAAATGAATGTAAGATCTCATTA TAATGAATAAACAAATGTTTCTATAATCCATTGTG AATGTTTTGTGGATCTCTTCGCATATAACTACT GTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAATATGATT AAAGATAAG
5	Barley AMY 1.2 Signal	MANKHLSSLFLVLLGLSASLASG

[0117]

	Peptide (아미노산 배열)	
6	Thiol protease aleurain (Barley) vacuolar signal (아 미노산 배 열)	MAHARVLLLALAVLATAAVAVASSSFADSNPIRPVT DRAASTL
7	Collagen alpha-1 N- terminal propeptide (아미노산 배열)	QEEGQVEGQDEDIPPITCVQNGLRYHDRDVWKPEP CRICVCDNGKVLCDDEVICDETKNCPGAEVPEGECCP VCPDGSESPTDQETTGVGEPKGGDTGPRGPRGPAGP PGRDGIPGQPGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAP
8	Collagen alpha-1 (I) chain (아미 노산 배열)	QEEGQVEGQDEDIPPITCVQNGLRYHDRDVWKPEP CRICVCDNGKVLCDDEVICDETKNCPGAEVPEGECCP VCPDGSESPTDQETTGVGEPKGGDTGPRGPRGPAGP PGRDGIPGQPGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL SYGYDEKSTGGISVPGPMGPSGPRGLPGPPGAPGPQ GFQGPPGEPGEPGASGPMGPRGPPGPPGKNGDDG EAGKPRPGERGPPGPQGARGLPGTAGLPGMKGH RGFSGLDGAKGDAGPAGPKGEPGSPGENGAPGQM GPRGLPGERGRPGAPGPAGARGNDGATGAAGPPGP TGPAGPPGFPGAVGAKGEAGPQGPRGSEGPQGVRG EPGPPGPAGAAGPAGNPGADGQPGAKGANGAPGIA GAPGFPGARGPSGPQGPGGPPGPKGNSGEPGAPGS KGGDTGAKGEPGPVGVQGPMPGAGEEGKRGARGEP GPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGE RGSPGPAGPKGSPGEAGRPEAGLPAGKGLTGSPGS

[0118]

		PGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVM GFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGE AGAQQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAG PPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFPGER GVQGPMPGPAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPG SQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGA DGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKGESGPSG PAGPTGARGAPGDRGEPGPPGPAGFAGPPGADGQP GAKGEPGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGNVGA PGAAGARGSAGPPGATGFPGAAGRVPGPSGNAG PPGPPGPAGKEGGKGPRGETGPAGRPGEVGPMPGP GPAGEKGSAGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRCVVGL PGQRCGERGFPLPGPSGEPGKQGPSGASGERGPPG PMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGSPGAK GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGKSGDRGE TGPAGPTGPVGPVGARGPAGPQGPRGDKGETGEQ GDRGIKGRHGFSLQGPPGPPGSPGEQGPSGASGP AGPRGPPGSAGAPGKDGLNLPGPIGPPGPRGRTG DAGPVGPMPGPPGPPGPPGPPSAGFDFSLPQPPQEK AHDGGRYYRADDANVVRDRDLEVDTTLSLSQQIE NIRSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPN QGCNLDAIKVFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYI SKNPKDKRHHVWFGESMTDGFQFEYGGQGSDPADV AIQLTFLRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNL KKALLLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHTGA WGKTVEYKTTKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFGFD VGPVCFL
9	Collagen alpha-1 C- terminal propeptide (아미노산	DDANVVRDRDLEVDTTLSLSQQIENIRSPEGSRK PARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPNQGCNLDAIKV FCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPKDKRHV WFGESMTDGFQFEYGGQGSDPADVAIQLTFLRLMS TEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLLQGSN

[0119]

	배열)	EIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHITGAWGKTVIEYKT TKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFQFDVGPVCFL
10	Collagen alpha-2 N- terminal propeptide (아미노산 배열)	QSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPGRDGEDG PTGPPGPPGPPGPPGLGGNFAA
11	Collagen alpha-2 (I) chain (아미 노산 배열)	QSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPGRDGEDG PTGPPGPPGPPGPPGLGGNFAAQYDGKGVGLGPGP MGLMGPRGPPGAAGAPGPQGFQGPAGEPGEPGQT GPAGARGPAGPPGKAGEDGHPGKPRPGERGVVG PQGARGFPGTPGLPGFKGIRGHNGLDGLKGQPGAP GVKGEPGAPGENGTPGQTGARGLPGERGRVGAPG PAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPGAPGPKG EIGAVGNAGPAGPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNP GANGLTGAKGAAGLPGVAGAPGLPGRGIPGPVGA AGATGARGLVGEPGPAGSKGESGNKGEPGSAGPQG PPGPSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRGSPGSRG LPGADGRAGVMGPPGSRGASGPAGVRGPNGDAGR PGEPLMGPRGLPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGR PGPIGPAGARGEPPNIGFPGPKGPTGDPGKNNGDKG HAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPPGPQGVQGCKG EQGPPGPPGFQGLPGPSGPAGEVGKPGERGLHGEF GLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRGPPSGPP GPDGNKGEPGVVGAVGTAGPSGPSGLPGERGAAGI PGGKGEKGEPLRGEIGNPGRDGARGAPGAVGAPG PAGATGDRGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPA GPNGFAGPAGAAGQPGAKGERGAKGPKGENGVVG PTGPVGAAGPAGPNGPPGPAGSRGDGGPPGMTGF PGAAGRTGPPGPSGISGPPGPPGPAGKEGLRGPRGD QGPVGRTEVGAVGPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPG

[0120]

		TPGPQGLLGAPGILGLPGSRGERGLPGVAGAVGEPG PLGIAGPPGARGPPGAVGSPGVNGAPGEAGRDGNP GNDGPPGRDGQPGHKGERGYPGNIGPVGAAGAPG PHGPVGPAGKHGNRGETGPSGPVGPAGAVGPRGPS GPQGIRGDKGEPGEKGPRGLPGLKGHNGLQGLPGI AGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDGRT GHPGTVGPAGIRGPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGV SGGGYDFGYDGDYRADQPRSAPSLRPKDYEVDATL KSLNNQIETLLTPEGSRKNPARTCRDLRLSHPEWSSG YYWIDPNQGCTMDAIKVYCDFSTGETCIRAQPENIP AKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNVEGVTS KEMATQLAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEET GNLKKAVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSK KTNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEF FVDIGPVCFK
12	Collagen alpha-2 C- terminal propeptide (아미노산 배열)	DQPRSAPSLRPKDYEVDATLKSLNNQIETLLTPEGSR KNPARTCRDLRLSHPEWSSGYYWIDPNQGCTMDAI KVYCDFSTGETCIRAQPENIPAKNWYRSSKDKKHVW LGETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQLAFMRLLANY ASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGSNDVE LVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTNK PSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDIGPVCFK
13	GFP (아미 노산 배열)	SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRY PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTR AEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNIN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYK
14	GST (아미 노산 배열)	SPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEG DKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYI ADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRAYS

[0121]

		KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDH VTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKR IEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPK
15	MBP (아미노산 배열)	KIEEGKLVINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVT VEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYA QSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPI AVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDV GVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAF NKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKG QPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEG LEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQ KGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEAL KDAQTNSSNNNNNNNNNNLG
16	HN Tag (아미노산 배열)	HNHNHNHNHNHN
17	Human P4H alpha subunit (아미노산 배열)	HPGFFTSIGQMTDLIHTKDLVTSCLKDYIKAEEDKLE QIKKWAEKLDRLTSTATKDPEGFVGHPVNAFKLMK RLNTEWSELENLVLKDMSDGFISNLTIQRQYFPNDE DQVGAAKALLRLQDTYNLDDTISKGNLPGVKHKS FLTAEDCFELGKVAYTEADYYHTELWMEQALRQLD EGEISTIDKVSVDYLSYAVYQQGDLDKALLTKKLL ELDPEHQRANGNLKYFEYIMAKEKDVNKSASDDQS DQKTTTPKKKGVAVDYLPERQKYEMLCRGEIKMTP RRQKKLFCRYHDGNRNPKFILAPAKQEDEWDKPRII RFHDIISDAEIEIVKDLAKPRLRRATISNPITGDLET VH YRISKSAWLSGYENPVVSRINMRIQDLTGLDVSTAEEL LQVANYGVGGQYEPHFDFARKDEPDAFKELGTGNR IATWLFYMSDVSAGGATVFPEVGASVWPCKGTAVF WYNLFASGEGDYSTRHAACPVLVGKWWVSNKWLHE RGQEFRRPCTLSELE

[0122]

18	C. elegans P4H alpha subunit (아미노산 배열)	DLFTSIADMQNLLETERNIPKILDKYIHDEEERLVQL KKLSEEYSKKNEISIENGLKDITNPINAFLLIKRKIFDW KEIESKMNANKAGNVVSSITDDSYGVRYPTADDLSG AAIGLLRLQDITYRLDTKDLADGKIYADQGNYTFSAK DCFEIARAAYNEHDFYHTVMWMEEAQRRLGDEVEP TVEVEDILEYLAFALYKQNNLKHALKLTEELYKMNP THPRAKGNVKWYEDLLEQEGVRRSDMRKNLPPIQN RRPDSVLGNTERTMYEALCRNEVPVSQKDISRLYCYY KRDRPFLVYAPIKVEIKRFNPLAVLFKDVISDDEVA QELAKPKLARATVHDSVTGKLVATYRISKSAWLKE WEGDVVETVKNRIGYMTNLEMETAEEELQIANYGIG GHYDPHFDHAKKEESKSFESLGTGNRIATVLFYMSQ PSHGGGTVFTEAKSTILPTKNDALFWYNLYKQGDG NPDTRHAACPVLVGIKWVSNKWIHEKGNEFRPCG LKSSDYERFVGDLGYGPEPRNAPNVSPNLAKDVWET L
19	Human P4H beta subunit (아미노산 배열)	DAPEEEDHVLVLRKSNFAEALAAHKYLLVEFYAPWC GHCKALAPEYAKAAGKLKAEGSEIRLAKVDATEESDL AQQYGVRGYPTIKFFRNGDTASPKEYTAGREADDIV NWLKKRTGPAATTLPDGAEEAELVESSEVAVIGFFK DVESDSAKQFLQAAEAIDDIPIFGITSNSDVFSKYQLD KDGVVLFKKFDEGRNNFEGEVTKENLLDFIKHNQLP LVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLS NFKTAAESFKGKILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEE CPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEG KIKPHLMSQELPEDWDKQPVKVLVGKNFEDVAFDE KKNVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN IVIAKMDSTANEVEAVKVHSFPTLKFFPASADRTVID YNGERTLDGFKKFLESQGDGAGDDDDLEDLEEAE EPDMEEDDDQKAV
20	Mouse P4H beta	DALEEEDNVVLKKSNEEALAAHKYLLVEFYAPWC GHCKALAPEYAKAAAKLKAEGSEIRLAKVDATEESDL

[0123]

	subunit (아미노산 배열)	AQQYGVRGYPTIKFFKNGDTASPKEYTAGREADDIV NWLKKRTGPAATTLSDTAAAESLVSSEVTVIGFFK DVESDSAKQFLLAEEAIDDIPFGITSNSGVFSKYQLDK DGVVLFKKFDEGRNNFEGETKEKLLDFIKHNQLPL VIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGLSSF KRAAEGFKGKILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEECP AVRLITLEEEMTKYKPESEDELTAEKITEFCHRFLEGKI KPHLMSQEVPEWDWKQPVKVLVGANFEEVAFDEKK NVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHENIII AKMDSTANEVEAVKVHSFPTLKFFPASADRTVIDYN GERTLDGFKKFLESGGQDGAGDDEDLDLEEALPD MEEDDDQKAVKDEL
21	LH3 (아미노산 배열)	SDRPRGRDPVNPEKLLVITVATAETEGYLRFLRSAEF FNYTVRTLGLGEEWRGGDVARTVGGGQKVRWLKK EMEKYADREDMIIMFVDSYDVILAGSPTELLKKFVQS GSRLLSAESFCWPEWGLAEQYPEVGTGKRFLNSGG FIGFATTIHQIVRQWKYKDDDDDQLFYTRLYPDGL REKLSLNLDHKSRIQNLNGALDEVVLKFDRNRVRIR NVAYDTLPIVVHNGPTKLQLNYLGNYVPNGWTPE GGCGFCNQDRRTLPGGQPPPRVFLAVFVEQPTPFL PRFLQRLLLLDYPPDRVTLFLHNNEVFHEPHIADSW PQLQDHFSVAVKLVGPEEALSPGEARDMAMDLCRQD PECEFYFSLDADAVLTNLQTLRILIEENRKVIAPMLSR HGKLWSNFWGALSPDEYYARSEDYVELVQRKRVGV WNVPIYSQAYVIRGDTLRMELPQRDVFSGSDTDPD MAFCKSFRDKGIFLHLSNQHEFGRLATSRDYDTEHL HPDLWQIFDNPVDWKEQYIHENYSRALEGEGIVEQP CPDVYWFPLLSEQMCDELVAEMEHYGQWSGGRHE DSRLAGGYENVPTVDIHMKQVGYEDQWLQLLRTYV GPMTESLFPGYHTKARAVMNFVVRYRPDEQPSLRP HHDSSTFTLNVALNHKGLDYEGGGCRFLRYDCVISS PRKGWALLHPGRLTHYHEGLPTTWGTRYIMVSFVD

[0124]

		P
22	BMP1 (아미노산 배열)	AATSRPERVWPDGVIPFVIGGNFTGSQRAVFRQAMR HWEKHTCVTFLERTDEDSYIVFTYRPGCCSYVGRR GGGPQAISIGKNCDKFGIVVHELGHVVGFWHEHTRP DRDRHVSIVRENIQPGQEYNFLKMEPQEVESLGETY DFDSIMHYARNTFSRGIFLDTIVPKYEVNGVKPPIGQ RTRLKSGDIAQARKLYKCPACGETLQDSTGNFSSPEY PNGYSAHMCVWRISVTPGEKILNFTSLDLYRSRLC WYDYVEVRDGFWRKAPLRGRFCGSKLPEPIVSTDSR LWVEFRSSSNWVGKGFFAVYEACGGDVKKDYGHIQ SPNYPDDYRPSKVCIWRIQVSEGFHVGLTFQSFEIER HDSCAYDYLEVRDGHSESSTLIGRYCGYEKPDDIKST SSRLWLKFVSDGSINKAGFAVNFFKEVDECSRPNRGG CEQRCLNTLGSYKCSCDPGYELAPDKRRCEAACGGF LTKLNGSITSPGWPKEYPPNKNCIWQLVAPTQYRISL QFDFFETEGNDVCKYDFVEVRSGLTADSKLHGKFCG SEKPEVITSQYNNMRVEFKSDNTVSKKGFKAHFFSEK RPALQPPRGRPHQLKFRVQKRNRTPQ
23	RNA silencing suppressor p19 (아미노산 배열)	MERAIQGNDAREQANSERWDGGSGSSTSPFQLPDES PSWTEWRLHNDETNSNQDNPLGFKESWGFQKVV KRYLRYERTETSLHRVLGSGTSDSVNYAASRFFGVN QIGCTYSIRFRGVSVTISGGSRTLQHLCEMAIRSKQEL LQLTPVEVESNVSRCPEGVETFEETEESE

[0125]

[0126]

1. 콜라겐 유전자 발현 카세트의 구축

[0127]

보리 아밀라아제 시그널 펩티드(Barley AMY 1.2 Signal Peptide, 배열 번호 5)에 융합된 Collagen alpha-1 (I) chain (Col1, 배열 번호 8)을 코딩하는 합성 유전자를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3) 및 HSP 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1a). Col1로 변이를 도입하고, N 말단 혹은 C 말단 프로 영역 절단 부위의 개변(HRV3C, Furin 또는 Enterokinase에 의한 절단 부위의 도입), N 말단 프로 영역의 제거, GFP(배열 번호 13)에 의한 N 말단 프로 영역의 치환 등의 개변을 가한 Col1의 발현 카세트를 구축하였다.

[0128]

구체적으로는, N 말단 프로 영역 절단 부위의 개변은, N 말단 프로 영역의 C 말단 영역을 각각, HRV3C, Furin 또는 Enterokinase의 인식 배열로 치환하는 것에 의하여 행하였다. 이 때, Furin 및 Enterokinase는 인식 배열의 C 말단을 절단하기 위하여, 절단 처리 후의 프로콜라겐은 천연의 N 말단 텔로펩티드 배열을 가지는 콜라겐이 된다. 한편, HRV3C는 인식 배열의 내부를 절단하기 위하여, 절단 처리 후의 프로콜라겐은 HRV3C의 인식 배열의 C 말단 측 배열 GlyPro가 부가된 N 말단 텔로펩티드 배열을 가지는 콜라겐이 된다. 식물 세포 내에서는 천연의 N 말단 절단 부위보다 2 아미노산 잔기(GlnLeu) C 말단 측의 위치에서 절단된다. 당해 식물 세포 내에서의 절단을 재현하는 개변으로서, N 말단 프로 영역과 N 말단 텔로펩티드 영역에 걸치는 영역에 Enterokinase의 인식 배열을 도입하는 것으로, N 말단의 2 아미노산 잔기(GlnLeu)가 결실한 N 말단 텔로펩티드 배열을 가지는 콜라겐을 일으키는 Col1의 발현 카세트도 구축하였다.

[0129]

또한, C 말단 프로 영역의 개변은, 식물 세포 내에서 C 말단 프로 영역을 절단하는 미지의 프로테아제의 인식 배열을 제거하기 위하여, C 말단 텔로펩티드 영역으로부터 C 말단 프로 영역에 걸쳐 다른 위치에서 Enterokinase의 인식 배열로의 아미노산 치환을 행한 복수의 발현 카세트를 구축하였다.

[0130]

보리 아밀라아제 시그널 펩티드(배열 번호 5)에 융합된 Collagenalpha-2 (I) chain (Col2, 배열 번호 11)을 코딩하는 합성 유전자를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3) 및 HSP 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1b). Col2로 변이를 도입하고, N 말단

혹은 C 말단 프로 영역 절단 부위의 개변, N 말단 프로 영역의 제거, N 말단으로의 녹색 형광 단백질의 융합, HN 태그(배열 번호 16)나 GST 태그(배열 번호 14), MBP 태그(배열 번호 15)의 부가 등의 개변을 가한 Col2의 발현 카세트를 구축하였다. 각 개변의 내용은, Col1의 발현 카세트 개변과 마찬가지로였다.

[0131] 3. 아그로박테리움의 형질 전환

[0132] 상기 2에서 제작한 pRI 201-AN 식물 형질 전환 벡터 유래의 플라스미드를 이용하고, 동결 용해법에 의하여 아그로박테리움 GV3101주를 형질 전환하였다. 각 플라스미드로 형질 전환된 아그로박테리움을, 단독 혹은 2 균주를 혼합한 조건으로 인필트레이션에 사용하였다.

[0133] 식물 니코티아나·벤타미아나(Nicotiana benthamiana)를, 시판의 야자 껍질 기질을 충족한 플러그 트레이로 종자부터 키웠다. 상기 식물을 명(明) 16시간/암(暗) 8시간의 광주기 및 종일 25℃의 온도 스케줄 하에서 온실에서 생육시켰다. 과종으로부터 4주간 후의 식재(植栽)에 대하여 아그로인필트레이션을 실시하였다. 실시 직전에, 식물로부터 싹을 따는 것에 의하여, 정아(頂芽)를 제거하였다.

[0134] 2. 수식 효소 발현 벡터의 구축

[0135] 액포 시그널(Thiol protease aleurain (Barley) vacuolar signal, 배열 번호 6) 혹은 보리 아밀라아제 시그널 펩티드(배열 번호 5)에 융합된 인간 P4H α (배열 번호 17), 인간 P4H β (배열 번호 19), 선충 P4H α (배열 번호 18), 및 마우스 P4H β (배열 번호 20)를 코딩하는 합성 유전자를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3) 혹은 TMV 오메가 배열(배열 번호 2), HSP 유래 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1c). 소포체에 축적하는 경우를 제외하고, P4H β 유전자의 3' 말단으로부터 KDEL 배열을 제거하였다.

[0136] 액포 시그널(배열 번호 6) 혹은 보리 아밀라아제 시그널 펩티드(배열 번호 5)에 융합된 LH3(배열 번호 21)를 코딩하는 합성 유전자를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3), HSP 유래 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1d).

[0137] 액포 시그널(배열 번호 6) 혹은 보리 아밀라아제 시그널 펩티드(배열 번호 5)에 융합된 HN 태그(배열 번호 16)와 융합한 BMP1(배열 번호 22)을 코딩하는 합성 유전자를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3), HSP 유래 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1f). 소포체에 축적하는 경우에 한하여 BMP1 유전자의 3' 말단에 KDEL 배열을 부가하였다.

[0138] Tomato bushy stunt virus 유래 RNA silencing suppressor p19(UniProtKB - P50628,)를 코딩하는 합성 유전자(배열 번호 23)를, CaMV 35S 프로모터(배열 번호 1) 및 애기장대 ADH 유래 5' -UTR(배열 번호 3), HSP 유래 터미네이터(배열 번호 4)로 이루어지는 발현 카세트 중에 클로닝하였다(도 1d).

[0139] 구축한 각 유전자의 발현 카세트를, 이하의 조합으로 pRI 201-AN 식물 형질 전환 벡터의 멀티 클로닝 사이트에 중에 클로닝하였다.

[0140] (1) Col1+p19

[0141] (2) Col2+p19

[0142] (3) Col1+Col2+P4H α +P4H β +LH3+p19

[0143] (4) Col1+Col2+p19

[0144] (5) P4H α +P4H β +LH3+p19

[0145] (6) Col1+P4H α +P4H β +p19

[0146] (7) Col1+LH3+p19

[0147] (8) Col1+BMP1+p19

[0148] 4. 아그로박테리움으로부터의 콜라겐 취득

[0149] 각 플라스미드로 형질 전환한 아그로박테리움을 50 μ g/ml kanamycin를 포함하는 Select Alternative Protein Source(APS) 배지에서 28℃로 하룻밤 진탕 배양하고, OD₆₀₀이 4.5에서 5.5에 달할 때까지 증식시켰다. 아그로박테리움 배양액을 원심하고, 펠릿을 인필트레이션 버퍼(10mM MgCl₂ 및 10mM MES(pH5.6))에 재현탁하였다. 균액

의 농도는 OD₆₀₀이 0.4(2 균주를 동시에 접종하는 경우는 0.8)가 되도록 조정하여 인필트레이션을 실시하였다. 인필트레이션 후의 식재로서 6일간 인큐베이트하고, 아그로박테리움이 침윤한 잎만을 수확하였다. 수확한 잎을 -80℃로 동결하고, 소편으로 분쇄하였다.

[0150] 전체 가용성 단백질을, 동결 분쇄한 잎 약 0.1g에 대하여, 3체적분의 50mM 트리스(pH7.4), 0.15M NaCl을 가하여 마쇄하고, 4℃에서 5분, 20,000g로 원심하는 것에 의하여 추출되었다. 또한, 다른 추출 조건으로서, 3체적분의 0.5M 초산, 0.2M NaCl를 이용한 추출을 실시하였다.

[0151] 5. 취득된 콜라겐의 분석

[0152] 하기 조건에서 추출한 콜라겐을 처리하고, SDS-PAGE에 의하여 절단의 유무를 확인하였다.

[0153] 콜라겐 추출액의 프로테아제 처리 4℃ 16시간 반응

[0154] HRV3C: 추출액 20 μL+HRV3C (Millipore #71493) 1 μL

[0155] Furin: 추출액 20 μL+6mM CaCl₂ 4 μL +10배 희석 Furin (R&D #1503-SE-010) 2 μL

[0156] Enterokinase: 추출액 20 μL+6mM CaCl₂ 10 μL+10배 희석 Enterokinase (NEB #P8070S) 2 μL

[0157] 6. 질량 분석

[0158] 질량 분석 샘플을, 전체 가용성 단백질을 DTT에 의하여 환원 후, MOPS 완충액을 이용한 SDS-PAGE 전기 영동을 행하는 것에 의하여 분리하였다. 영동 후, CBB 염색에 의하여, 분리 단백질의 검출을 행하였는데, 콜라겐을 발현시킨 전체 가용성 단백질로는 약 130kDa 부근에 콜라겐이라고 예상되는 밴드가 인정되었기 때문에, 이 부분의 겔을 잘라 내고, 포함되는 단백질의 질량 분석을 행하였다. 질량 분석은 (주)니혼 프로테오미쿠스(Japan Proteomics Co., Ltd.)에 해석을 의뢰하였다. 겔 단편을 탈색 후, 트립신 소화를 행하고, nanoLC-MS/MS로 질량의 측정을 행한 후, 그 데이터를 MascotSearch에 걸어 단백질 동정(同定)을 행하였다(<https://www.jproteomics.com/>).

[0159] 7. 웨스턴 블롯법을 이용한 담뱃잎에서의 콜라겐 발현의 확인

[0160] 담뱃잎(니코티아나·벤타미아나)로부터 추출한 전체 가용성 단백질을, 트리스 그리신 완충액을 이용한 SDS-PAGE 전기 영동을 행하는 것에 의하여 분리하였다. 영동 후, PVDF막에 전사(轉寫)하고, 콜라겐 α1 및 태그 배열에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯법을 행하고, 콜라겐 α1 및 콜라겐 α2의 발현을 확인하였다.

[0161] (결과)

[0162] 실시예 1: 식물 발현계에 있어서의 분비형의 I형 콜라겐 α1의 일과성 발현

[0163] 상술의 방법에 의하여, Col1I의 발현 카세트를 니코티아나·벤타미아나 식물 발현계에서 일과성으로 발현시키고, SDS-PAGE에 의하여 절단의 유무를 확인하였다(도 2). 각 레인의 시료를 이하에 나타낸다.

라인	시료
1	마커
2	음성 대조(네거티브 컨트롤) 추출액
3	프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
4	N 말단 프로 영역 제거 콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
5	N 말단 절단 부위 개변(HRV3C) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
6	N 말단 절단 부위 개변(HRV3C) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액 +HRV3C 처리
7	N 말단 절단 부위 개변 (Furin) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
8	N 말단 절단 부위 개변 (Furin) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액 + Furin 처리
9	N 말단 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
10	N 말단 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액 + Enterokinase 처리
11	N 말단 절단 부위 개변 (식물 내 절단 위치) (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
12	N 말단 절단 부위 개변 (식물 내 절단 위치) (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액 + Enterokinase 처리
13	N 말단 GFP 결합 절단 부위 개변 (HRV3C) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
14	N 말단 GFP 결합 절단 부위 개변 (HRV3C) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액+HRV3C 처리
15	N 말단 GFP 결합 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
16	N 말단 GFP 결합 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액+HRV3C 처리
17	C 말단 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액
18	C 말단 절단 부위 개변 (Enterokinase) 프로콜라겐 $\alpha 1$ 추출액 +HRV3C 처리

[0164]

[0165]

그 결과, 식물 체내에 N 말단 프로 영역 및 C 말단 프로 영역을 가지는 전체 길이 콜라겐 단백질이 축적되어 있는 것이 확인되었다(도 2, 라인 3). 당해 결과는, F Ruggiero들의 2000년의 연구에서 나타내진, 식물 안정 발현 계에 있어서 분비형의 I형 콜라겐 $\alpha 1$ 의 N 말단 프로 영역 및 C 말단 프로 영역이 절단되는 것을 나타내는 실험 결과와는 대조적이고, 예상외의 결과였다. 또한, 절단 부위 개변을 가지는 I형 콜라겐 $\alpha 1$ 을 추출액 중에서 절단 부위 개변에 대응하는 효소로 처리하는 것에 의하여, I형 콜라겐 $\alpha 1$ N 말단 및 C 말단의 프로 영역의 절단이 가능한 것이 나타내졌다(도 2, 라인 4 ~ 18).

[0166]

실시예 2: GFP 융합 콜라겐 $\alpha 1$ 의 취득

[0167]

GFP 융합 콜라겐 $\alpha 1$ 추출액의 추출액에 대하여 여기광을 조사하는 것에 의하여, 형광이 확인되었다. N 말단 및 C 말단의 프로 영역 중, C 말단 프로 영역은 콜라겐이 삼중쇄를 형성하는데 필요하다고 되지만, N 말단 프로 영역은 필수가 아니고, 실제로 N 말단 프로 영역을 제거한 배열에서도 발현이 확인되고 있다. 본 실험에 의하여, N 말단 프로 영역에 대신하여, GFP와 같은 이중 펩티드 배열을 융합시키는 것에 의하여, 새로운 기능을 부여한 콜라겐을 산생하는 것이 가능한 것이 나타내졌다(도 3).

[0168]

실시예 3: 콜라겐 $\alpha 1$ 및 콜라겐 $\alpha 2$ 의 동시 발현의 확인

[0169]

상술의 방법에 의하여, Col1의 발현 카세트와 Col2의 발현 카세트를 식물 발현계에서 일과성으로 공발현시켰는

데, α1과 α2 콜라겐 단백질이 동시에 세포 체내에서 축적하는 것을, 웨스턴 블롯에 의하여 확인하였다(도 4). 각 레인의 시료를 이하에 나타낸다.

레인	시료
1	음성 대조(네거티브 컨트롤) 추출액
2	프로콜라겐 α 1 추출액
3	HisTrap 정제액 N 말단 프로 영역 제거 콜라겐 α 1 및 HN 태그 부가 N 말단 프로 영역 제거 콜라겐 α 2
4	HisTrap 정제액 프로콜라겐 α 1 및 HN 태그 부가 프로콜라겐 α 2
5	HisTrap 정제액 N 말단 프로 영역 제거 콜라겐 α 1 및 MBP 태그 부가 N 말단 프로 영역 제거 콜라겐 α 2

[0170]

[0171]

또한, 질량 분석에 의하여도, α1과 α2 콜라겐 단백질이 발현되고 있는 것을 확인하였다(도 5). 각 레인의 시료는 도 4와 같다.

[0172]

이상의 실시예에 의하여, 콜라겐 단백질을 식물 발현계에서 일과성으로 발현시키는 것에 의하여, 분비형의 콜라겐을 안정되게 취득하는 것이 가능한 것이 뜻밖에도 찾아내졌다. 또한, N 말단 프로 영역에 대신하여 다양한 기능을 가지는 펩티드를 융합한 콜라겐을 발현하는 것에 의하여, 고기능형 콜라겐을 취득하는 것도 가능한 것이 확인되었다.

<Seq ID No:1 CaMV 35S Promoter DNA Seq; DNA; Cauliflower mosaic virus>
TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTAC
TTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTCGGATAAGGAAGG
CCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACGAGGAGCATCGT
GGAAAAAGAAGCGTTCCCAACCGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
AGGGATGACGCAACATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATT
TGGAGAGAACA

<Seq ID No:2 TMV omega DNA Seq; DNA; Tobacco mosaic virus>
ACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACAATTACTATTTACAATTAC

<Seq ID No:3 AtADH 5'-UTR DNASeq; DNA; Arabidopsis thaliana>
TACATCACAATCACACAAACTAACAAAAGATCAAAAGCAAGTTCTTCACTGTTGATA

<Seq ID No:4 HSP-terminator DNA Seq; DNA; Arabidopsis thaliana>
TATGAAGATGAAGATGAAATATTGGTGTGTCAAATAAAAGCTACCTTGTGTGCTTAAGTTGTGT
TTTTTCTTGGCTTGTGTGTATGAATTGTGGCTTTTCTAATATTAAATGAATGAAGATCTCA
TTATAATGAATAAACAATGTTTCTATAATCCATTGTGAAGTTTGTGTGATCTCTCGCATATAA
CTACTGTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAATATGAATTAAAGATAAG

<Seq ID No:5 Barley AMY 1,2 Signal Peptide AA Seq; AA; Hordeum vulgare>
MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASG

<Seq ID No:6 Thiol protease aleurain (Barley) vacuolar signal AA Seq; AA; Hordeum vulgare>
MAHARVLLALAVLATAAVAVASSSSSFADSNPIRPVTDRAASTL

<Seq ID No:7 Collagen alpha-1 N-terminal propeptide AA Seq; AA; Homo sapiens>
QEEGQVEQDEIDIPITCVQNGRLRYEDRDVWKPEPCRCVCDNGKVLCDVVICDETKNCPGAEVPEG
ECCPVCPCDSESPTDQETTGVEGPKGDTGPRGPRGPAGPPGRDGIFGQPGLEGPPGPPGPPGLG
GNFAP

<Seq ID No:8 Collagen alpha-1 (I) chain AA Seq; AA; Homo sapiens>

[0173]

<Seq ID No:11 Collagen alpha-2 (I) chain AA seq; AA; Homo sapiens>
QSTQFETVRKGPAGDRGPRGRGERGPPGPPGRDGEDGPTGPPGPPGPPGPGI.GGNFAAQYDGKGVGLG

PGPMGLMCPROCPGAAGAPGPGQGFQGFAGEPGEPQQTCPAGARCPAGP2CKAGEDGHGPKPGRPGER
GVVGPQGARGFPPTGILPGFKGTRGHNGI.DGI.KGQPGAPGVKGFPGAPGFNGTPGQTGARGT,PGFRG
RVGAPGPAGARGSDGSGVGPVGFAGPISSASPPSPTGAPGPKGEIGAVGNAGPAGPAGPRGEVGLPGL
SCPVC2PCNPNCANGLTCAKGAAGLPGVACAPGLPCPRGIFCPVCAACATCARGLVCEPCPACSKGES
GNKGEPSAGPQGPSPGSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRGS PGS RGLPGADGRAGVMGPPGSRG
ASGPAGVRGPNGDAGRPGEPLMGPRGLPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGRPGPIGPAGARGEFGN
IGFPGP2KGPTGDPCKNGDKHAGLAGARGAPGPDGNNAGQPPGPQGVQGGKGEQGPFGPPGFQGLF
GPSGPAGEVGKPGERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESCAAGPTGPISRGSPSGPPGPDGNKGEFG
VVGAVGTAGPSGSPGLPGERGAAGIPGCKGEKGEFGLRGEIGNFGRDARGAPGAVGAPGAGATGD
RGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGFAGFNGFAGPAGAGQPCA KGERCAKGPKEGNGVVGTPGPV
GAAGPAGPNGPPGPAGSRGDGGPPGMTGFPGAAGRTGFPGPSGISGPPGPPGAGKEGLRGRPDQG
PVGRTEGVGAVGPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPPTGPPQGLLAGPILGLPGSRGERGLPGVAGAVGE
PGLPLIAGPPGARGPPGAVGSPGVNAGPGEAGRDGNPGNDGPPGRDGG2GHKGERGYPGNIGFVGAA
GAPCPHGVPVGPAGKHGNGRGETGPSGPVGPAGAVGPRGPSQGTGRDGKGFPGKGPRT.PGT.KGHNG
LQGLPGIAGHHGQDQAPGSVGFAGPRGPAGPSGPAKGDGRTHPPTVG2AGIRGPPQHGGPAGPPGP
PGPPG2PGVSGGGYDFGYDGFYRADQPRSAFSLRPKDYEV DATLKS LNNQIETLLTPEGSRKNPAR
TCRDLRLSHPEWSSGGYWDIPNQGC TMDA K VYCD FSTGETCIRAQPENIPAKNWYRSSKDKKHVWL
GETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQLAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGS
NDVFLVARGNSRFTYCVLVDGCSKKTNFWGKTITIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDITGP
VCFK

<Seq ID No:12 Collagen alpha-2 C-terminal propeptide AA Seq;AA;
synthetic construct>
DQPRSA2SLRPKDYEV DATLKS LNNQIETLLTPEGSRKNPARTCRDLRLSHPEWSSGGYWDIPNQGC
TMDA K VYCD FSTGETCIRAQPENIPAKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQ
LAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGSNDVFLVARGNSRFTYCVLVDGCSK
TNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDITGPVCFK

<Seq ID No:13 GFP AA Seq; AA; synthetic construct>
SKGEELFTGVVPIVLVELDGDVNGEKFSVSGEGEGDATYGKLTILFICTTGKLPVPWPCLVTTFSYGV
QCFSRY2DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN
TIGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGTKVNFKTRHNTEDGSVQIADHYQQNTPTGDGPVILPDNHYLS
TQSALSKDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITHGMDELYK

<Seq ID No:14 GST AA Seq;AA; synthetic construct>
SPILGYWKIKGLVQPCRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQS

[0175]

MAIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDIRYGVSRAYSXKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFED
RLCHKTYLNGSDHVTHTD>>FMLYDALDVLVLYMDPMCLDAFFPKLVCFKKRIEAIPTQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWQATFGGDDHFPK

<Seq ID No:15 MBP AA Seq; AA; Escherichia coli>
KIEGKLVINGCKGYNGLAIEVGGKFEKDCGIRKVEHPCOLEEKFPQVAATGGGPDIIIPWAHDF
GGYAQSGLIAETTPDKAFQCKIYPFTWDVRYNGKIJAYPIAVEALSLIYNKDILPNPPKTWEETPA
LDKELKAKGKSALMNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGXYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVLDLIK
KHMNADTDYSIAEAAFNKSETAMTINGPMAWSNIDTSKVNYGVTVLPCTFKGQPSKPFVGVLSAGIKA
ASPNKELAKEFLENYLLCDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQ
MSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQCNSSNNNNNNNNNNLG

<Seq ID No:16 HN Tag AA Seq; AA; synthetic construct>
HNHNHNHNHNHN

<Seq ID No:17 Human P4H alpha subunit AA Seq; AA; Homo sapiens>
HPGFETSGQMDLIHTEKDLVTSKDYKAEDKLEQIKKWAELDRITSTATKDPESGFVGHVPKA
FKLMKRLNTEWSELENLVKDMSDGFISNLTICRQYFFENDEQVGAAKALLRLQDTYNLDCTDISK
NLPCVKIKSFLTAEDCFELCKVAYTEADYYHTELWMEQALRQLDECEESTIDKVSVIDYLSYAVYQQ
GDLDKALLTKKLELDPHQKANGNLKYPEYIMAKEKDVNKSASDQSDQKTPKKKGVAVDYLPE
RQKYLEMLCRGEGIKMTPRRKKLFCRYHNGNRYPKILAPAKQEDWDKPRIIRFHDILSDAEILV
KDLAKPRLRRATISNPITGDLTVHYRISKSAWLSGYENPVVSRINMRIQDLTGLDVSTAEELQVAN
YGVGGQYEPHFDFAKDEDFAKELGTGNRIATWLFYMSDVSAGGATVFPEVGASVWPKGTAVFWY
NLFASSEGVDYSTRHAACPVLVGNKWSNKNLHERGQEFRRPCTISELE

<Seq ID No:18 C. elegans P4H alpha subunit AA Seq; AA; Caenorhabditis
elegans>
DLFTSADMQLLETERNIPKILDKYIHDEEBRLVQLKLSSEYSSKNEISIENGDKDITNPINAPL
LTKRKTFDWWKTESKFNANKAGNVSSITDDSYGVRYPTADDISGAAIGLIRQDTPYRMDTKDIAOG
KIYADQGNITFSAKDCFEIARAAYNEHDFYHTVMWMEEAQRRLGDEVEFTVEVEDILEYLAFALYKQ
NNLKHALKLITEELYKNPHTPRAKGNVWYEDLLEQEGVRRSDMRKNLPPIQNRPRDSVLGNTERTM
YEALCRNEVPVSQKDISRLCYKYKRDPPFLVYAPIKVEIKRFNPLAVLFKDVISDDEVAATQELAKP
KLARATVHDSVTCGLVTATYRISKSAWLKEWEGDVVETVNRIGYMTNLEMETAEEIQTANYGIGGH
YDPHFDHAKKEESKSFESLGTGNRIATVLFYMSQPSHGGQTVFTEAKSTILPTKNDALFWYNLYKQG
DGNPCTRHAACPVLVGIKWSNKNLHEKGNFRRPCGLKSSDYERFVGDLYGFEPNAPNVSPNLA
KDWMEFI

[0176]

<Seq ID No:19 Human P4H beta subunit AA Seq; AA; Homo sapiens>
 DAPEEEDHVLVLRKSNFAEALAAHKYLLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAGKLKAESEIRLAKVDA
 TEESDLAQYQYGVRYPTTKFFRNGDTASPKYTAGREADDIVNWLKKRTGPAATLPGGAAESLVE
 SSEVAVIGFFKDVESDSAKQFLQAAEAIDIPFGITSNSGVFSKYQLDKDGVVLFKKFDEGRNNFEG
 EVTKENLLDFIKHNQLPLVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLSNFKTAAESFKGK
 ILFIFIDSHTDNQRILEFFGLKKEECPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEGKIK
 PHLMSQELPEDWDKQPVKVLVGNKFEDVAFDEKKNVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN
 IVIAKMDSTANEVEAVKVHSTPLKFFPASADRTVIDYNGERTLDGFKKFLESQGGQDAGDDDDLED
 LEEAEPEDEEDDDQKAV

<Seq ID No:20 Mouse P4H beta subunit AA Seq; AA; Mus musculus>
 DALEEDNVVLKKSNFEEALAAHKYLLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAAKLKAEGSEIRLAKVDA
 TEESDLAQYQYGVRYPTTKFFKNGDTASPKYTAGREADDIVNWLKKRTGPAATLSDTAAESLVD
 SSEVTVIGFFKDVESDSAKQFLAAEAIDIPFGITSNSGVFSKYQLDKDGVVLFKKFDEGRNNFEG
 EITKEKLLDFIKHNQLPLVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLSFKRAEAGFKGK
 ILFIFIDSHTDNQRILEFFGLKKEECPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEGKIK
 PHLMSQVPEWDKQPVKVLVGNFEEVAFDEKKNVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN
 IIIAKMDSTANEVEAVKVHSTPLKFFPASADRTVIDYNGERTLDGFKKFLESQGGQDAGDDDDLED
 EEALEPEDEEDDDQKAVKDEL

<Seq ID No:21 LH3 AA Seq; AA; Homo sapiens>
 SDRPRGRDPVNPCKLLVTVATAETEGYLRPLRSAEFNYTVRTLGLGEWRGGDVARTVGGGQKVR
 WLKKEMEYADREDMIIMFVDSYDVLAGSPTELLKKFVQSGSRLLFSAESFCWPEWGLAQYPEVG
 TGKRFNLSSGGFIGFATTQHIVRWKYKDDDDQLFYTRLYLDPLREKLSLNLDHKSRIQNLNGA
 LDEVVLKFDNRNRVIRNVAYDTLPIVHNGNPTKLQNLGNYPNGWTEPGCGFCNQDRRTLPGG
 QPPPRVFLAVFVEQPTPLPRFLQRLLLDYPPDRVTFLHNNVEVFHEPHIADSWPQLQDHFSAVKL
 VGPEEALSPGEARDMAMDLCRQDPECEFYFSLDADAVLTNLQTLRILILEENRKVIAPMLSRHGKLS
 NFWGALSPDEYYARSEDYVELVQRKRVGMNVPIYSQAYVIRGDTLRMELPQRDVFGSDTDPDMAF
 CKSFRDKGIFLHLSNQHEFGRLLATSRDYTEHLHPDLWQIFDNFVDWKEQYIHENYSRALEGE GIVE
 QPCPQVYWFLLSEQMCDLVAEMEHYQWQSGGRHEDSRLAGGYENVPTVDIHMKGQVYEDQWLQLL
 RTYVGPMTESLFGYHTKARAVMNFVVRYPDEQPSLRPHHDSSTFTLNVALNHKGLDYEGGGCRFL
 RYDCVISSPRKGWALLHPGRLLHYHGLPLTWGTRYIMVSFVDP

<Seq ID No:22 BMP1 AA seq; AA; Homo sapiens>
 AATSRPERVWPDGVIPFVIGNFTGSQRAVFRQAMRHWEKHCTVTFLERTDEDSYIVFTYRPGCCCS

YVGRRCQCPQAISIGKNCKFCGIVVHELGHVVCFWHEHTRPDRDRHVSIVRENIQPCQEQYNFLKMEP
 QVEVSLGTYDFDSIMHYARKTFSRGLFLDTIVPKYEVNGVKPPIGQRTRLSKGDLAQARKLYKCPA
 CGETLQDSTGNFSSPEYPNGYSAHMCVWRISVTPGEKIILNFTSLDLYRSRLCWYDYVEVRDGFWR
 KAPLRGRFCGSKLPEPIVSTDSRLWVEFRSSSNWVGKGFPAVYEAICGGDVKKDYGHIQSPNYPDDY
 RPSKVCIRWQVSEGHVGLTFQSFELERHDSACAYDYLEVRDGHSESSTLIGRYCGYKPPDIKSTS
 SRLWLKFVSDGSINKAGFAVKFEKEDCSRPNRGGCEQRCLNTLSYKCSCDPGYELAPDKRRCEA
 ACGGFLTKLNGSITSPGWPKYPPNKNCIWQLVAPTQYRISLQDFDFETEGNDVCKYDFVEVRSGLT
 ADSKLHGKFCGSEKPEVITSQYNNMRVEFKSDNTVSKKGFKAHFFSEKRPALQPPRGRPHQLKFRVQ
 KRNRTFQ

<Seq ID No:23 RNA silencing suppressor p19 AA Seq; AA; Tomato bushy
 stunt virus>
 MFRATQGNDAREQANSFRWDGGSGSSSTSPFQTIDESPSTWTEWRIHNDETNSNQDNPIGFKFSWGFPGK
 VVFKRYLRERYETETSLHRVLGSWTGDSVNYAASRFFGVNQIGCTYSIRFRGVSVTISGGSRLQHLIC
 EMATRSKQFTIQLTPVEVFSKVSRCCEGVTTFEEFSF

<Seq ID No:24 HRV3C recognition sequence ; AA; synthetic construct>
 LEVLFQGP

<Seq ID No:25 Furin recognition sequence 1; AA; synthetic construct>
 RXRR

<Seq ID No:26 Furin recognition sequence 2; AA; synthetic construct>
 RXRR

<Seq ID No:27 Enterokinase recognition sequence; AA; synthetic
 construct>
 DDDDK

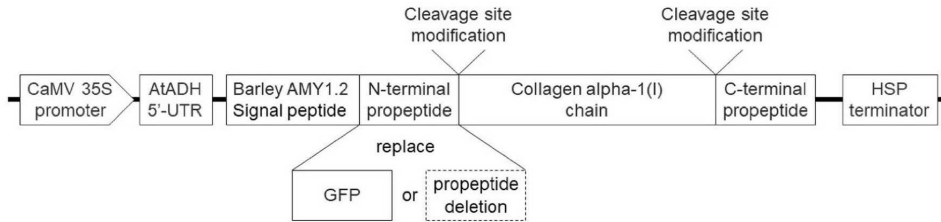
[0177]

[0178]

도면

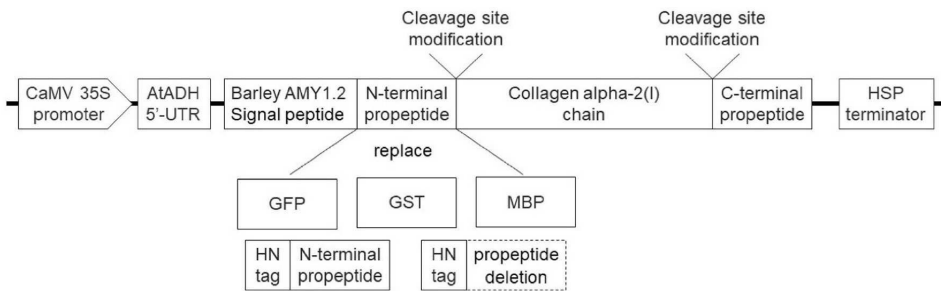
도면1a

I 형 콜라겐 α1 발현 카세트



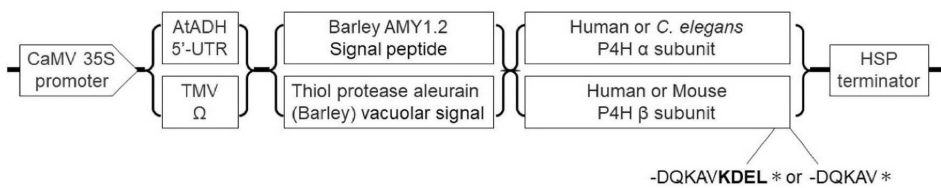
도면1b

I 형 콜라겐 α2 발현 카세트



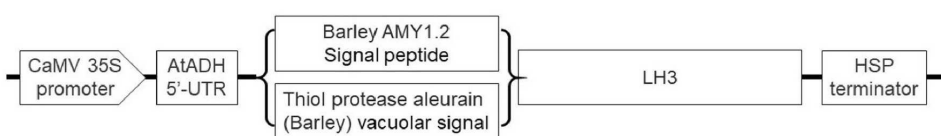
도면1c

P4H 발현 카세트



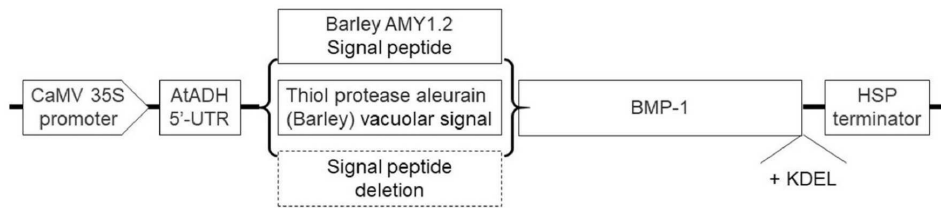
도면1d

LH3 발현 카세트



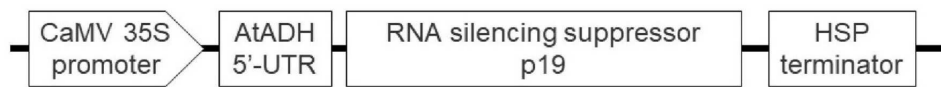
도면1e

BMP-1 발현 카세트

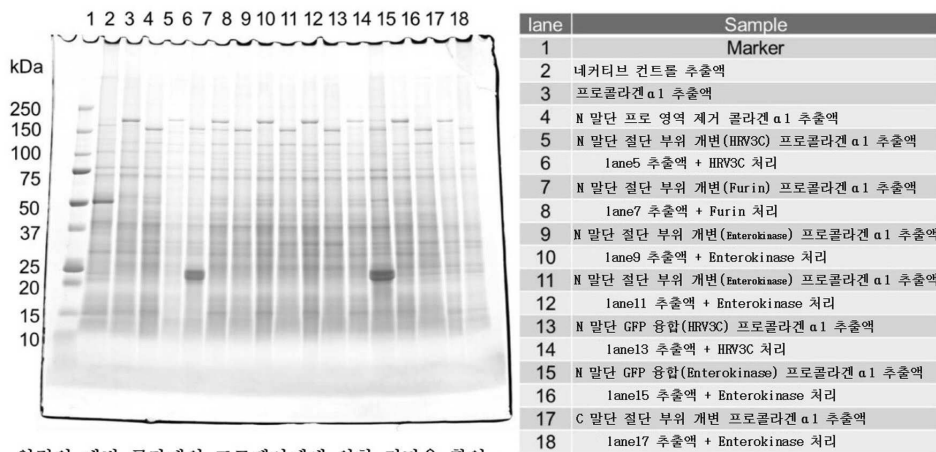


도면1f

p19 발현 카세트

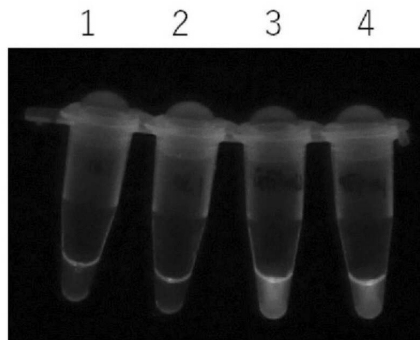


도면2



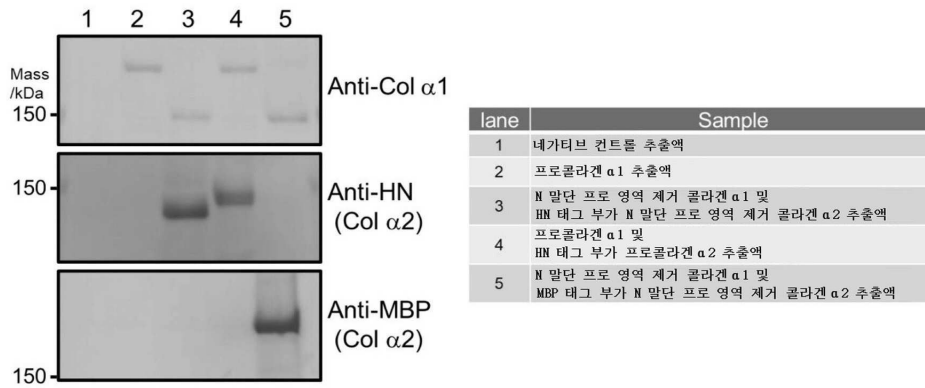
일련의 개변 콜라겐의 프로테아제에 의한 절단을 확인
각 개변 콜라겐의 구조는 도 1a를 참조

도면3



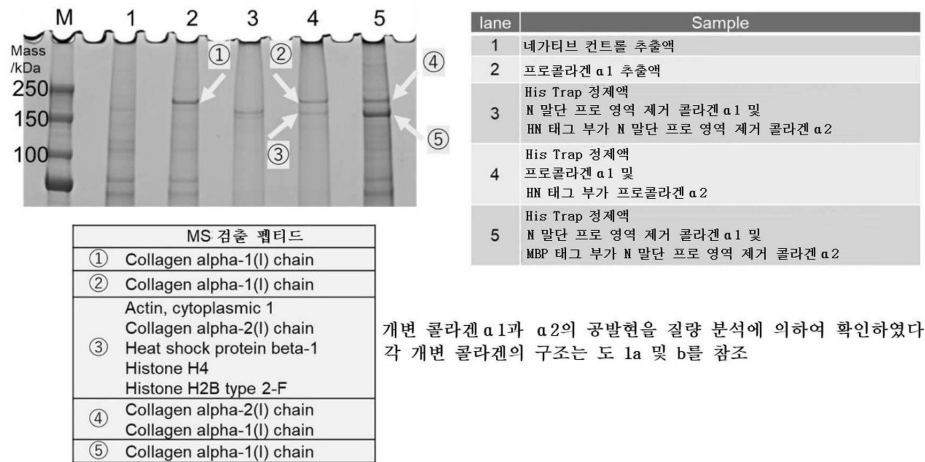
1,2 : 콜라겐 α1 추출액
3,4 : GFP 융합 콜라겐 α1 추출액

도면4



개변 콜라겐 α1과 α2의 공발현을 웨스턴 블롯법에 의하여 확인하였다.
각 개변 콜라겐의 구조는 도 1a 및 b를 참조

도면5



개변 콜라겐 α1과 α2의 공발현을 질량 분석에 의하여 확인하였다.
각 개변 콜라겐의 구조는 도 1a 및 b를 참조

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.