

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月8日(08.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/029529 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/028120

(22) 国際出願日: 2023年8月1日(01.08.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2022-123600 2022年8月2日(02.08.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社 U n i B i o (UNIBIO CORPORATION) [JP/JP]; 〒9590597 新潟県新潟市西蒲区新飯田潟 8 8 番地 Niigata (JP).

(72) 発明者: 吉 中 喬 慈 (YOSHINAKA Kyoji); 〒9590597 新潟県新潟市西蒲区新飯田潟 8 8 番地 株式会社 U n i B i o 内 Niigata (JP). 中林 修(NAKABAYASHI Osamu); 〒9590597 新潟県新潟市西蒲区新飯田潟 8 8 番地 株式会社 U n i B i o 内 Niigata (JP). 大川 昭一郎 (OKAWA Shouichirou); 〒9590597 新潟県新潟市西蒲区新飯田潟 8 8 番地 株式会社 U n i B i o 内 Niigata (JP). 結城 雅之(YUKI Masayuki); 〒9590597 新潟県新潟市西蒲区新飯田潟 8 8 番地 株式会社 U n i B i o 内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 小 野 誠, 外 (ONO Makoto et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目 1 番 1 号 大手町パークビルディング ア

ンダーソン・毛利・友常法律事務所 外国法共同事業 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

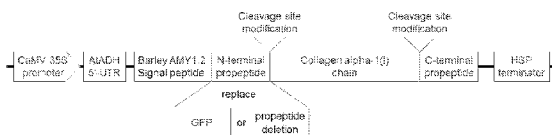
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: COLLAGEN PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: コラーゲン産生方法

【図1a】 AA

(1) コラーゲンα1発現カセット



AA Type I collagen α1 expression cassette

(57) Abstract: The present disclosure relates to: a method for producing a plant or an isolated plant cell that produces collagen; a nucleic acid construct to be used for the method; and a method for producing collagen protein using the aforesaid plant or isolated plant cell.

(57) 要約: 本開示は、コラーゲンを製造する植物又は単離された植物細胞の製造方法およびこれに使用する核酸構築物、並びに、当該植物又は単離された植物細胞を用いたコラーゲンタンパク質の製造方法に関する。

[続葉有]

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 補正された請求の範囲及び説明書（条約第19条(1)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称： コラーゲン産生方法

技術分野

[0001] 本開示は、コラーゲンを製造する植物又は単離された植物細胞の製造方法およびこれに使用する核酸構築物、並びに、当該植物又は単離された植物細胞を用いたコラーゲンタンパク質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] コラーゲンはすべての哺乳類動物結合組織にみられる細胞外マトリックスタンパク質ファミリーを成しており、コラーゲン分子は α 鎖と呼ばれるポリペプチドの3つが3重らせん領域を形成する構造を含んでいる。I型コラーゲンなどのコラーゲンは、動物の初期発生、器官形成、細胞接着、細胞増殖、造血、創傷治癒、組織再構築などの様々な生体反応に関与している。その構造的特性、免疫原性の低さなどに着目して、コラーゲンは、医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等で幅広く利用されている（非特許文献1：Ruggiero et al., 2000, FEBS Letter, 2000, Vol. 469, pp. 132-136. 非特許文献2：Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol. 515, pp. 114-118）。

しかしながら、一般的にこれらの用途で利用されるコラーゲンは動物組織から抽出されたものが使用されており、ウイルスやその他の感染性物質によって汚染されている可能性がある。そのため、上記各分野の産業界では、動物組織以外からコラーゲンを得る方法を確保することが期待されている。動物性タンパク質を安全に大量生産するための費用対効果に優れた大量生産方法として、遺伝子改変植物を用いた発現システムが利用されており、遺伝子改変タバコなどの植物体でコラーゲンを産生することが試みられている（非特許文献2：Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol. 515, pp. 114-118、特許文献1：国際公開200

6／035442号)。

[0003] しかしながら、コラーゲンは3つのペプチド鎖が形成する3重らせん構造を有する複雑な構造を有するタンパク質であり、医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等において利用できるコラーゲンを植物体で製造するためには、さらなる技術改善が求められていた。例えば、タバコ植物のようなタンパク質産生に利用される植物細胞は、ヒト本来のプロ領域の切断部位からずれた個所を切断する酵素を有しており、単純に植物細胞内で発現させても、完全にヒトコラーゲンと構造を一致させた高品質なコラーゲンの製造が困難であった。したがって、単純に植物細胞内でコラーゲンを発現させても、医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等において利用できる品質のコラーゲンを製造することは困難であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開2006／035442号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ruggiero et al., 2000, FEBS Letter, 2000, Vol. 469, pp. 132-136.

非特許文献2：Merle et al., FEBS Letter, 2002, Vol. 515, pp. 114-118.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示の目的は、医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等において利用できるコラーゲンを植物又は単離された植物細胞中で製造するための更なる改善された方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本開示の発明者らは、上記コラーゲンを植物又は単離された植物細胞中で製造するための方法について、鋭意試験、検討した結果、植物細胞内でプロ

コラーゲンを一過性に発現することにより、植物体内でのプロコラーゲンのN末端切断が抑制されること等を見出すことにより、植物又は単離された植物細胞中でコラーゲンを効率よく産生させることに成功し、本願発明を完成した。

[0008] 本開示は一態様において、植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法を提供する。

[0009] 本開示は一態様において、植物体または単離された植物細胞で産生されたコラーゲンまたはプロコラーゲンを提供する。

[0010] 本開示は一態様において、植物体または単離された植物細胞でコラーゲンまたはプロコラーゲンを産生するための核酸構築物を提供する。

[0011] 本開示は一態様において、植物体または単離された植物細胞でコラーゲンまたはプロコラーゲンを産生するための核酸構築物を含有するベクター、および当該ベクターを含有する植物体または単離された植物細胞を提供する。

[0012] 本開示は一態様において、植物体または単離された植物細胞でコラーゲンもしくはプロコラーゲンを産生するための核酸構築物がコードする、非天然配列を有するプロコラーゲンまたはコラーゲンを提供する。

[0013] 本開示は一態様において、プロコラーゲンまたはコラーゲンを含む組成物を提供する。

[0014] より具体的には、本開示は以下を提供する。

[項目 1]

A) プロコラーゲンをコードする核酸構築物を含む植物体または単離された植物細胞を準備する工程；

B) 植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程；

C) 工程Bにより細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを分離する工程；

を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラ

ーゲンを産生する方法。

[項目 2]

工程Bの後に、細胞外に分泌されたプロコラーゲンのN末端またはC末端を切断する工程を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法。

[項目 3]

前記核酸構築物が、天然型のプロコラーゲンに対して80%以上のアミノ酸配列同一性を有するプロコラーゲンをコードする核酸配列を含む、項目1または2に記載の方法。

[項目 4]

前記核酸構築物が、プロコラーゲン全長をコードする核酸配列を含み、プロコラーゲンのN末端が植物細胞内で切断されないような変異を有している、項目1または2に記載の方法。

[項目 5]

項目1～4のいずれか一項に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン。

[項目 6]

項目1～4のいずれか一項に記載の方法において用いられる、コラーゲンを発現する核酸構築物。

[項目 7]

項目6に記載の核酸構築物を含む発現ベクター。

[項目 8]

項目5に記載の核酸構築物または項目7記載の発現ベクターを含む植物体または単離された植物細胞。

[項目 9]

項目6に記載の核酸構築物のコードするプロコラーゲンまたはコラーゲンであって、非天然型アミノ酸配列を有するプロコラーゲンまたはコラーゲン。

[項目 10]

N末プロ領域に、異種ペプチドが融合されている、項目9に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲン。

[項目 11]

項目1～4のいずれか一項に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン、または項目9もしくは10に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む、医薬組成物、化粧品組成物、または食品組成物である組成物。

発明の効果

[0015] 本開示は、医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等において利用できるコラーゲンを植物又は単離された植物細胞中で製造するための更なる改善された方法を提供するという効果を有する。

図面の簡単な説明

[0016] [図1a]図1aは、I型コラーゲン α 1発現カセットの構成を示す模式図である。

[図1b]図1bは、I型コラーゲン α 2発現カセットの構成を示す模式図である。

[図1c]図1cは、prolyl 4-hydroxylase α サブユニット(P4H α)、prolyl 4-hydroxylase β サブユニット(P4H β)発現カセットの構成を示す模式図である。

[図1d]図1dは、リジルヒドロキシラーゼ3(LH3)発現カセットの構成を示す模式図である。

[図1e]図1eは、骨形成タンパク質1(BMP1)発現カセットの構成を示す模式図である。

[図1f]図1fは、Tomato bushy stunt virus由来RNA silencing suppressor p19発現カセットの構成を示す模式図である。

[図2]図2は、I型コラーゲン α 1発現カセットをニコチアナ・ベンサミアナ

植物発現系にて一過性に発現させることで、植物体内にN末プロ領域及びC末プロ領域を有する全長コラーゲタンパク質が蓄積されていることが確認されたことを示す図である。レーン3は、Ⅰ型コラーゲン α 1発現カセットから発現された全長コラーゲタンパク質が抽出されたことを示す。レーン4～18は、各種プロテアーゼに対応した切断部位変異を有するⅠ型コラーゲン α 1発現カセットから発現された全長コラーゲタンパク質が、対応するプロテアーゼによって切断されたことを示す。

[図3]図3は、緑色蛍光タンパク質（GFP）融合コラーゲン α 1抽出液の抽出液に対し励起光を照射することにより、蛍光が確認されたことを示す図である。

[図4]図4は、Ⅰ型コラーゲン α 1発現カセットとⅠ型コラーゲン α 2発現カセットを植物発現系にて共発現させることで、 α 1と α 2コラーゲタンパク質が同時に細胞体内で蓄積することを確認する、ウェスタンブロット実験の結果を示す図である。

[図5]図5は、質量分析器によって α 1と α 2コラーゲタンパク質が発現されていることを確認した試験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] コラーゲンは α 鎖と呼ばれる3つのペプチド鎖から構成されており、細胞質の小胞体膜に結合したリボソームによりmRNAから合成された各ペプチドは、合成とともに小胞体内に移行し、それぞれのC末端のS-S結合反応などを得て3つのペプチドからなる3重鎖プロコラーゲン分子を形成する。小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌された3重鎖プロコラーゲン分子は、N末端およびC末端を切断されることで成熟3重鎖コラーゲンとなる（Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3(1): a004978）。

[0018] 成熟3重鎖コラーゲンは構成する α 鎖の種類、組み合わせ、全体の構造または特性によってⅠ型コラーゲン、Ⅱ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲン

～XXV I I I型コラーゲン等様々に分類される。例えば、I型コラーゲンは主に2本の $\alpha 1$ ペプチドと1本の $\alpha 2$ ペプチドから構成され、II型コラーゲンは3本の $\alpha 1$ ペプチドから構成される。各 α 鎖は生合成時のスプライシング態様の相違によってさらにバリエーションを生じ、III型コラーゲンはII型コラーゲンと同様に3本の $\alpha 1$ ペプチドから構成されているが、それぞれを構成する α 鎖のスプライシング形態は異なっている (Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3 (1) : a004978)。

[0019] いくつかの種類の成熟3重鎖コラーゲンはさらに互いに架橋されることで、繊維構造を形成し、いくつかの種類の成熟3重鎖コラーゲンはネットワーク構造を形成する。これら各種コラーゲンは生体内の様々な場所で生成され、様々な生体機能を担っている (Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3 (1) : a004978)。

[0020] このようなコラーゲンを大量生産して医薬分野、治療分野、化粧品分野、食品分野等において利用するために、コラーゲンを植物又は単離された植物細胞中で製造するための方法について本開示の発明者らが鋭意試験、検討した結果、プロコラーゲンの植物細胞内での発現を一過性のものとするにより、植物細胞の内在性酵素による発現コラーゲンの分解を大幅に抑制し得ることが発見された。さらに、コラーゲン遺伝子に変異を導入することにより、3重鎖プロコラーゲン分子あるいは成熟3重鎖コラーゲン分子を植物体から回収することができ、コラーゲンを効率よく産生し得ることを見出した。

[0021] より具体的には、哺乳類生体内では天然のコラーゲンはN末端およびC末端に延長領域を有するプロコラーゲンとして細胞外に分泌されたのちに、N末端およびC末端が酵素により切断されて成熟コラーゲン分子となるのに対して、植物細胞内でプロコラーゲンを発現すると、植物細胞内でN末端およびC末端が切断されてしまい、その結果水溶性が大幅に低下する。当該植物

細胞内で切断されるN末端切断部位は、本来プロコラーゲンがコラーゲンに成熟する際にN末端が切断される部位よりもC末端よりに位置しており、植物細胞内で発現したプロコラーゲンから得られる成熟コラーゲンは天然の成熟コラーゲンに比してN末端が短縮されている。また、植物細胞内で切断されるN末端切断部位は切断位置が不明である。これら植物細胞内での非天然位置の切断により、植物細胞内で産生されたコラーゲンは、天然コラーゲンと異なる特性を有し得る。

[0022] 本開示の発明者らは、植物細胞内でのコラーゲン発現を一過性なものとするることにより、植物細胞内でのプロコラーゲンのN末端切断が抑制できることを発見した。さらに、植物細胞内または産生工程におけるプロコラーゲンのN末端またはC末端の切断を抑制し得るアミノ酸変異を見出し、これら変異を有するプロコラーゲンを発現させることで、細胞外に分泌されるプロコラーゲンまたはコラーゲンを効率よく回収することが可能となった。さらに、プロコラーゲンのN末端およびC末端延長領域を、所望の酵素によって切断し、かつ切断後の成熟コラーゲン分子のN末端およびC末端のアミノ酸配列が、天然成熟コラーゲン分子のアミノ酸配列と同じとなるための酵素認識配列をコラーゲン遺伝子に導入することで、所望の工程でプロコラーゲンを成熟コラーゲン分子に転換することが可能となった。

[0023] (定義)

[0024] 他に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は、全て、本開示が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味を有する。

[0025] 本明細書において、複数の数値の範囲が示された場合、それら複数の範囲の任意の下限值および上限値の組み合わせからなる範囲も同様に意味する。

[0026] 本明細書において「実質的に」という語は、本開示が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味であるが、例えば、生物学的または化学的な現象が目的の状態を完全に達成しない場合があることを考慮して、目的の状態および、生物学的または化学的な特性のために不可避免的

に達成されない状態を包含することを意図して用いられる。

[0027] 本明細書において、数値に関連して、「約」という用語を用いる場合、当該値は例えば、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%または0.01%の範囲内で変動し得ることを意味する。

[0028] 本明細書において、「含む」という用語は、本開示が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味であるが、例えば「含む」ことおよび「からなる」を内包し、具体的には、Aを「含む」組成物は、Aのみを含む場合に加えて、他の構成要素、Bを含むこともある。

[0029] 本明細書において、組成物について使用される「からなる」または「から構成される」という用語は、本開示が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味であるが、当該組成物を専ら構成する構成要素を示すために使用される。例えば、A「からなる」組成物は、専らAのみを含む。しかしながら一態様において、A「からなる」組成物は、生物学および化学的な性質に基づいて製造上避けることのできないA以外の混入物を含む態様を包含する。

[0030] 本開示において、アミノ酸配列または塩基配列の「同一性」とは、比較すべき2つのアミノ酸配列のアミノ酸または塩基配列の塩基ができるだけ多く一致するように該2つの配列を整列させ、一致したアミノ酸数または塩基数を、全アミノ酸数または塩基数で除したものを百分率で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて行なうことができる。ギャップが挿入される場合、上記全アミノ酸数または塩基数は、1つのギャップを1つのアミノ酸または塩基として数えた数となる。このようにして数えた全アミノ酸数または塩基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、同一性(%)は、長い方の配列の全アミノ酸数または塩基数で、一致したアミノ酸数または塩基数を除して算出される。ただし、比較すべき配

列が他の任意の配列と連結された状態にある場合には、相当する領域のみを取り出して配列を対比し、同一性を算出する。

[0031] 本開示において、プロコラーゲンまたはコラーゲンの発現が「一過性」であるとは、本開示が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味であるが、典型的にはプロコラーゲンまたはコラーゲンをコードする核酸配列を宿主細胞のゲノムに組み込まない状態で、宿主細胞内で発現させることを意味する。そのような一過性の発現は、例えばウイルスベクターを用いることで実施できる。

[0032] (植物又は単離された植物細胞中でコラーゲンを産生する方法)

一態様において、本開示は植物又は単離された植物細胞中でコラーゲンを産生する方法を提供する。

本開示のコラーゲン産生方法では、プロコラーゲンをコードする核酸を含む核酸構築物を植物体又は単離された植物細胞中で一過性に発現することにより、細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲン分子を回収する工程を含み、最終的にプロコラーゲンまたはコラーゲン分子を産生する。

典型的には、本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲン産生方法は以下の工程を含む。

A) プロコラーゲンをコードする核酸構築物を含む植物体または単離された植物細胞を準備する工程；

B) 植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程；

C) 工程Bにより細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを分離する工程。

[0033] 上記工程A)「プロコラーゲンをコードする核酸構築物を含む植物体または単離された植物細胞を準備する工程」で用いられる核酸構築物は、典型的には下記(植物又は単離された植物細胞中におけるコラーゲン産生に使用するための核酸構築物)の構成を有する核酸構築物である。

[0034] 本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンの産生方法において産生される

コラーゲンの種類は特に限定されず、適切な α 鎖コードする核酸構築物を組み合わせることにより、例えば、Ⅰ型コラーゲン、ⅠⅠ型コラーゲン、ⅠⅠⅠ型コラーゲンなど、任意のコラーゲンを産生することができる。例えば、下記（核酸構築物がコードするプロコラーゲンまたはコラーゲン）において記載される、非天然型のアミノ酸配列を有するコラーゲン、または異種ペプチドを融合するコラーゲンを産生することができる。

[0035] 本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲン産生方法において用いられる植物として、例えばタバコ属植物、コケ植物（ヒメツリガネゴケ（*P. patens*）等）、ジャガイモ（*S. tuberosum*等）、イネ科植物（*O. sativa*等）、アブラナ科植物、レタスが挙げられるが、タバコ属植物が好ましい。タバコ属植物としては、例えば、ベンサミアナタバコ（*N. benthamiana*）、タバコ（*N. tabacum*）、ニコチアナ・エクセルシオ（*N. excelsior*）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0036] 上記工程B）「植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程」では、典型的にはプロコラーゲンをコードする核酸配列を含むウイルスベクター等の発現ベクターを、宿主細胞のゲノムに組み込まない状態で、植物体または単離された植物細胞において発現させる。

[0037] プロコラーゲンを一過性に発現することで、植物細胞内でのN末端切断を抑制することが可能となる。植物体または単離された植物細胞内でのプロコラーゲン一過性発現は、本開示が属する技術分野の当業者に公知の方法で行うことができ、プロコラーゲンの発現量、発現期間などは、使用するベクター、プロモーター、培地の構成、培養条件などを適宜調整することにより、本開示の趣旨を失わない範囲で当業者が適宜調整することができる。

[0038] 例えば、本開示の核酸構築物を組換えウイルスとして用いる場合、ウイルスを感染させた植物体または単離された植物細胞内でウイルスが増殖し、植物細胞内で大量のコラーゲンが生産される。例えば、植物体を用いてコラー

ゲンを産生する場合、ウイルス接種後3～15日間程度植物を栽培した後、葉などの植物組織からコラーゲンまたはプロコラーゲンを抽出回収することができる。

[0039] 上記工程C)「工程Bにより細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを分離する工程」では、本開示が属する技術分野の当業者に公知である任意の方法を利用することができる。例えば、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)に記載された方法を用いることができるが、これらに限定されない。より具体的には、例えば、タバコ植物体においてコラーゲンを発現させてコラーゲンまたはプロコラーゲンを産生する場合、凍結保存したタバコ植物の葉を適切なバッファー中で摩砕し、バッファーから塩析によってコラーゲンまたはプロコラーゲンを抽出、精製することができる。

[0040] 一態様において、本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンの産生方法は、工程Bの後に、細胞外に分泌されたプロコラーゲンのN末端またはC末端を切断する工程を含んでもよい。当該切断は、プロコラーゲンを化学的処理または酵素的処理またはこれらの組み合わせで処理することで実施することができる。当該化学的または酵素的処理の少なくとも一部は植物細胞内以外の場所で行われ、培養工程中、抽出精製工程中、抽出精製工程後等の工程において行うことができる。例えば、完全長プロコラーゲンを酸性環境で抽出精製することにより、天然型プロコラーゲンのC末端を切除できることが知られている。一態様において、抽出精製工程後にプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）によってプロコラーゲンのN末端またはC末端を切除することができる。抽出精製工程後にプロテアーゼによってプロコラーゲンのN末端またはC末端を切除することにより、切除反応系への夾雑物の混入を抑制し、プロテアーゼに適当な反応条件で切除反応を行うことで、切除反応の特異性

を向上させ、生成物の高い安定性を得ることができる。こうして安定したコラーゲンを製造して最終販売形態に出来る他、完全長プロコラーゲンをバイオ3Dプリンターのバイオインクの原料とし、バイオ3Dプリンターで立体構造を構築後にN末端又はC末端を切断する酵素（例：BMP1）を追加することによって三重らせん構造をより強固にするといった応用方法も可能である。これはデジタルカメラが普及する前の写真フィルムの「現像」に相当する工程である。

[0041] 当該プロコラーゲンのN末端またはC末端延長領域を切断する酵素は特に限定されない。一態様において、哺乳類細胞における天然型プロコラーゲンのN末端およびC末端を切断する酵素を用いることで、天然型プロコラーゲンから天然型成熟コラーゲンを生成することができる。このような天然型プロコラーゲンのN末端およびC末端を切断する酵素の非限定的な例として、Procollagen N-Endopeptidase、BMP1等を使用することができる。また、アミノ酸変異を利用して、プロコラーゲンのN末端およびC末端に所望のプロテアーゼ認識配列を導入することで、対応するプロテアーゼを利用することが可能となる。このような酵素として、例えば、HRV3C、Furin、Enterokinaseを使用することができるが、これらに限定されない。なお、HRV3C、FurinおよびEnterokinaseの認識配列および切断部位は以下のとおりである。

プロテアーゼ	認識配列及び切断部位（／で示す）
HRV3C	Leu Glu Val Leu Phe Gln / Gly Pro
Furin	Arg Xaa Arg Arg /
	Arg Xaa Lys Arg /
Enterokinase	Asp Asp Asp Asp Lys /

[0042] 一態様において、本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンの産生方法は、プロコラーゲンまたはコラーゲンを翻訳後修飾する工程を含んでもよい。例えば、P4H α 、P4H β またはLH3などによって、プロコラーゲンま

たはコラーゲンを翻訳後修飾することにより、プロコラーゲンまたはコラーゲンの安定性を向上させることができる。本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンの産生方法において、翻訳後修飾を行う工程は、プロコラーゲンまたはコラーゲンの翻訳後の任意の時点で行うことができ、植物細胞内または植物細胞から分泌後の段階で行うことができる。たとえば、P4H α およびP4H β とプロコラーゲンを同一の植物細胞で発現することにより、植物細胞内、例えば小胞体内で翻訳後修飾を行うことができる。好ましくは、当該翻訳後修飾の少なくとも一部は植物細胞の液胞以外の場所で行われる。

[0043] (植物又は単離された植物細胞中で産生されたコラーゲン)

一態様において、本開示は植物又は単離された植物細胞中で産生されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを提供する。一般に医薬、化粧品または食品分野などで従来提供されてきたコラーゲンは、生体組織に存在するコラーゲン分子がさらに重合したコラーゲン繊維などを分解して提供されたものが多く、このようなコラーゲンは分解処理によりコラーゲンの構造および機能の一部が失われていた。一方、本開示の植物又は単離された植物細胞中で産生されたプロコラーゲンまたはコラーゲンは、このような分解処理を経ることなく産生することが可能であるため、コラーゲンの構造および機能をより完全な状態で保持することが可能となる。

[0044] 一態様において、本開示の産生方法で産生されるプロコラーゲンは、N末端およびC末端を備えたプロコラーゲンを含む。このようなプロコラーゲンは、天然型のプロコラーゲンをコードする核酸を含む核酸構築物を植物細胞内で一過性に発現し、細胞外に分泌されたプロコラーゲンを抽出、精製することで産生することができる。

[0045] 一態様において、本開示で産生されるプロコラーゲンは、天然型のアミノ酸配列を有するプロコラーゲンを含む。当該天然型配列を有するプロコラーゲンは、アミノ酸配列は天然プロコラーゲンと同一であるものの、その産生工程における様々な条件によって、翻訳後修飾状態などの点で異なり得る。上述のとおり、本開示の植物又は単離された植物細胞中でコラーゲンを産生

する方法では、様々な方法で翻訳後修飾状態を制御することが可能であり、これにより様々な生理活性上の利点を備え得る。

[0046] 一態様において、本開示で産生されるプロコラーゲンはN末端切断部位またはC末端切断部位あるいはその両方の部位に、アミノ酸変異を有する非天然型プロコラーゲンを含む。一態様において、当該変異は植物細胞内または産生工程中のプロコラーゲンの切断を抑制する。一態様において、当該変異は所望のプロテアーゼに対応した認識配列を提供する。一態様において、当該変異は産生工程の化学的処理により切断を誘導する配列を提供する。非天然型完全長プロコラーゲンのN末端切断部位またはC末端切断部位のアミノ酸変異は、最終的に天然型成熟コラーゲンを生成するものであってもよく、N末端もしくはC末端または両方の末端に非天然型の配列を有する成熟コラーゲンを生成するものでもあってもよい。

上記アミノ酸変異は、天然型アミノ酸配列に対するアミノ酸付加、削除、置換あるいはこれらの組み合わせであり得る。

[0047] 一態様において、本開示の産生方法で産生されるプロコラーゲンは、N末端またはC末端の一方のみが切除された、N末端欠如プロコラーゲンおよびN末端欠如プロコラーゲンを含む。当該N末端欠如プロコラーゲンは、植物細胞内切除によってものとは異なるN末端欠如を有している。一態様において、当該N末端またはC末端欠如プロコラーゲンは、細胞外に分泌された完全長または不完全長プロコラーゲンを化学的処理または酵素的処理またはこれらの組み合わせで処理することで生成することができる。

[0048] 一態様において、本開示で産生されるプロコラーゲンはN末端もしくはC末端またはその両方に特定の機能を有するペプチドを融合されているものを含む。融合されるペプチドは特に限定されず、異種タンパク質由来のペプチドや、新規に合成される非天然ペプチドでもよい。例えば、細胞外への分泌を促進するペプチド、プロコラーゲンの精製に利用し得る親和性ペプチド、蛍光を生じる標識ペプチドなどを利用することができる。一態様において当該融合されたペプチドは、本開示の属する技術分野の当業者に知られている

リンカー配列を用いてプロコラーゲンに融合することができる。一態様において当該融合されたペプチドの一部領域または全領域は、化学的または酵素的反応によって、プロコラーゲンから切除することができる。

[0049] 一態様において、本開示で産生される成熟コラーゲンはN末端およびC末端に天然型のアミノ酸配列を有している。別の態様において、本開示で産生されるコラーゲンはN末端およびC末端の少なくとも一方に非天然型のアミノ酸配列を有している。N末端の非天然型アミノ酸配列は、植物細胞内切除によって生成されるものとは異なる。

[0050] 一態様において、本開示で産生されるプロコラーゲンまたはコラーゲンは、上記に述べた以外の任意のアミノ酸変異を有するものを含む。一態様において、本開示で産生されるプロコラーゲンまたはコラーゲンは、上記に述べた以外の、プロコラーゲンまたはコラーゲンの全領域または一部領域と、他のペプチドが融合したものを含む。

[0051] (植物又は単離された植物細胞中におけるコラーゲン産生に使用するための核酸構築物)

一態様において、本開示は植物又は単離された植物細胞中におけるコラーゲン産生に使用するための核酸構築物を提供する。

本開示の核酸構築物は、コラーゲンを構成する α 鎖の少なくとも1つをコードする核酸配列を有している。一態様において本開示の核酸構築物はプロコラーゲンを発現する配列を有している。当該プロコラーゲンは、上記(植物又は単離された植物細胞中で産生されたコラーゲン)で言及した様々な変異を有するプロコラーゲンおよび他のペプチドと融合したプロコラーゲンを包含する。本開示の核酸構築物がコードする α 鎖の種類は特に限定されず、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ およびこれらのスプライス異性体のいずれかをコードすることができる。

[0052] 本開示の核酸構築物はDNA、RNAまたは本開示の属する技術分野において当業者に知られている任意のこれらの類似体であってもよい。例えば、本開示の核酸構築物は、非天然塩基を含んでもよく、また、その一部に炭化

水素鎖、ペプチド鎖を含んでもよい。

[0053] 本開示の核酸構築物は、本開示の属する技術分野の当業者に知られている常法の化学合成方法、あるいは、遺伝子工学的手法により調製することができる。例えば、天然に存在する配列を有するcDNAを合成した後、このcDNAを鋳型として、適当なプライマーを用いて適宜変異を導入することにより合成することもできる。あるいは、合成すべき核酸構築物をいくつかの短い領域に分けて複数のDNA断片を化学合成し、公知のfusion PCR法により各断片を連結させてDNA構築物を合成することができる。RNA構築物は、DNA構築物からの転写反応により調製され得る。

[0054] 核酸構築物の配列に変異を導入する方法としては、本開示の属する技術分野の当業者に知られている任意の方法を利用することができる。例えば、当業者は、Kunkel法やGapped duplex法等の部位特異的突然変異誘発法、オーバーラップエクステンションPCR (overlap extension PCR) 法、QuikChange法などの方法を用いることができるが、これらに限定されない。

[0055] 一態様において、本開示の核酸構築物は、植物体内で一過性に発現させるための核酸断片を含んでもよい。例えば、転写反応により組換えウイルスRNAを合成する際に必要となる適当なRNAポリメラーゼプロモーター（例えば、T7プロモーター等のファージポリメラーゼプロモーター）、ウイルスのレプリカーゼ、移行タンパク質、外被タンパク質等をコードする核酸断片を含んでもよい。

[0056] 一態様において、本開示の核酸構築物は、植物体内でコラーゲンを安定発現させるために有益な酵素などをコードする核酸断片を含んでもよい。例えば、コラーゲンの安定性を亢進するP4H α 、P4H β またはLH3等をコードする核酸断片あるいはこれらの組み合わせを含むことができる。これらの酵素として、様々な生物由来の酵素を利用することができ、例えば、線虫、マウス、ヒト等に由来する酵素を用いることができる。

[0057] 一態様において、これらの酵素などをコードする核酸断片の一部または全

部は、プロコラーゲンの α 鎖をコードする核酸を含む核酸構築物とは別の第2の核酸構築物に含まれてもよく、プロコラーゲンの α 鎖をコードする核酸を含む第1の核酸構築物は、当該第2の核酸構築物と組み合わせて使用されてもよい。

[0058] プロコラーゲンの α 鎖をコードする核酸を含む第1の核酸構築物と、酵素などをコードする核酸断片を含む第2の核酸構築物を組み合わせて使用する場合、これらを同一の植物体または単離された植物細胞に導入してもよく、異なる植物体または単離された植物細胞に導入して、細胞外に分泌されたプロコラーゲンと酵素が反応するようにしてもよい。

[0059] (核酸構築物を含む発現ベクター)

一態様において本開示は、植物又は単離された植物細胞中におけるコラーゲン産生に使用するための核酸構築物を含むベクターを提供する。当該ベクターは植物宿主内でコラーゲンを一過性に発現するために用いられ、典型的には植物ウイルスベクターとして提供される。一態様において、本開示の発現ベクターは、「組換えウイルス」の態様で提供することができる。当該ウイルスがRNAウイルスであれば本開示の核酸構築物はRNAであり、ウイルスがDNAウイルスであれば該核酸構築物はDNAである。一態様において、ベクタープラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* (アグロバクテリウム菌) に形質変換させて、そのアグロバクテリウム菌を植物に感染させて目的タンパク質を一過性発現させることもできる。

[0060] 本開示の組換えウイルスとして提供される発現ベクターは、本開示の属する技術分野の当業者に知られている任意の植物ウイルスベクター (例えば、「蛋白質 核酸 酵素」、vol. 45、p. 607-613など参照) を常法により改変することで作製することができる。一態様において、トマトブッシースタントウイルスを改変して組換えウイルスとすることが好ましい。

[0061] (核酸構築物または発現ベクターを含む植物体または単離された植物細胞)

本開示は一態様において、核酸構築物または発現ベクターを含む植物体または単離された植物細胞を提供する。当該植物体または単離された植物細胞は、核酸構築物または発現ベクターの導入処理を受けたものの他、これらの被処理植物体または植物細胞が生育または増殖して得られたものであってもよい。

[0062] (核酸構築物がコードするプロコラーゲンまたはコラーゲン)

本開示は一態様において、上記本開示の核酸構築物がコードするプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む。当該プロコラーゲンまたはコラーゲンは、植物体または単離された植物細胞から産生されるものに限定されない。当該プロコラーゲンまたはコラーゲンは、典型的には非天然型のアミノ酸配列を有している。一態様において、本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンは、天然型のプロコラーゲンまたはコラーゲンに対して、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上のアミノ酸配列同一性を有する。本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンは、天然型のプロコラーゲンまたはコラーゲンに対して、1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失を含んでもよい。

[0063] 一態様において、本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンは、N末端プロ領域に替えて、異種タンパク質を融合することができ、これにより様々な機能を付加することができる。例えば、GFPをN末端プロ領域に替えて融合することにより、蛍光コラーゲンを産生することができる。当該プロコラーゲンまたはコラーゲンは、本開示の属する技術分野で当業者に知られる任意の方法で発現および精製することが可能であり、化学的特性や生理活性を分析するなどの目的において利用することができる。

[0064] (プロコラーゲンまたはコラーゲンを含む組成物)

本開示は一態様において、植物体もしくは単離された植物細胞から産生されるプロコラーゲンもしくはコラーゲン、またはその他の方法によって産生される非天然型のアミノ酸配列を有するプロコラーゲンもしくはコラーゲンを含む組成物を提供する。

- [0065] 一態様において、本開示の組成物の態様は限定されず、例えば医薬組成物、化粧料組成物、または食品組成物の態様で提供され、プロコラーゲンまたはコラーゲンに加えて、これら各分野の組成物において許容される担体、賦形剤などを含むことができる。本開示の組成物において、プロコラーゲンまたはコラーゲンは、さらに分子間の架橋処理によって、複数のプロコラーゲンまたはコラーゲン分子を含む繊維状またはネットワーク状の構造を有する多量体の状態であってもよい。本開示の組成物が含有するコラーゲンの量は特に限定されず、剤型、目的等に応じて適宜調節される。
- [0066] 本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む医薬組成物は、当該組成物が医薬品そのものである場合と、医薬品を製造する際の原料あるいは中間製品である組成物を含む。本開示の医薬組成物の形態は特に限定されず、固形状、粉状、顆粒状、液体状であってもよい。本開示の医薬組成物が対象に投与される形態である場合、その剤型は特に限定されず、例えば、錠剤、細粒剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤あるいはこれらの原材料または中間製品として提供され得る。
- [0067] 本開示の医薬組成物は、再生医療用の医薬あるいはこれを製造する際の原料あるいは中間製品である組成物を含む。例えば、本開示の医薬組成物は、シート状の組成物として提供され、対象の体内または体表で組織再生を促進するための組成物、またはシート状の組織を培養するための足場材として提供され得る。一態様において、本開示の医薬組成物は、3Dプリンティング技術などを用いて3次元構造を有する再生医療製品を構成するための材料組成物、例えばバイオインクの原料として提供され得る。
- [0068] 一態様において、本開示の医薬組成物は、埋め込み可能な医療デバイスあるいはこれを製造する際の原料あるいは中間製品である組成物を含む。これら組成物は、疾病または障害の予防または治療、美容目的などで使用することができる。当該組成物の非限定的な例は、創傷被覆材、人工皮膚、人工血管、流体の除去または患者への流体の送達のためのカテーテルおよび他のデバイス、人工心臓、人工腎臓、整形外科用のピン、プレートおよびインプラ

ントを含む。例えば本開示の医薬組成物は、3Dバイオプリント済み乳房切除後インプラント、美容整形用充填剤として使用することができる。

[0069] 本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む化粧料組成物は、当該組成物が化粧料そのものである場合と、化粧料を製造する際の原料あるいは中間製品である組成物を含む。本開示の化粧料組成物の形態は特に限定されず、固形状、粉状、顆粒状、液体状であってもよい。本開示の化粧料は局所適用または経口投与されるものであってよく、例えば、軟膏、ローション、クリーム、マイクロエマルジョン、ゲル、油、溶液等の局所投与剤、錠剤、細粒剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤などの経口投与剤あるいはこれらの原材料または中間製品として提供され得る。

[0070] 本開示のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む食品組成物は、当該組成物が食品そのものである場合と、食品を製造する際の原料あるいは中間製品である組成物を含む。当該食品には、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品が含まれ、ヒト以外の動物を対象として使用される場合には飼料を含む。当該食品の形態は特に限定されず、固形状であっても液状であってもよい。ヒト以外の動物としては特に限定されず、例えば哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫等様々な動物を対象として使用することができる。具体的な食品の種類としては、例えば、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳飲料など飲料またはこれらの飲料の濃縮原液及び調整用粉末；アイスクリーム、アイスシャーベット、かき氷等の冷菓；そば、うどん、はるさめ、ぎょうざの皮、しゅうまいの皮、中華麺、即席麺等の麺類；飴、チューインガム、キャンディー、グミ、ガム、キャラメル、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット等の焼き菓子、ゼリー、ジャム、クリーム等の菓子類；かまぼこ、ハンバーグ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品；加工乳、発酵乳、ヨーグルト、バター、チーズ等の乳製品；サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂及び油脂加工食品；ソース、たれ等の調味料；スープ、シチュー、カレー、パン、ジャム、サラダ、惣菜、漬物などを含む

が、これらに限定されない。

[0071] 以下に実施例を用いて本開示をさらに詳細に説明するが、これらの実施例は例示であって、本開示の範囲を実施例の範囲に限定するものではない。

実施例

[0072] (材料と方法)

本研究で使用した発現カセットの構築を図 1 a～f に示す。本研究におけるコード配列は必要に応じタバコ中での発現のために最適化し、望ましいフラッキング領域を有するように化学的に合成した。

使用した配列を以下に示す。

[表 1]

配列 番号	配列名	配列
1	CaMV 35S Promoter (DNA 配 列)	TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAAC CTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACT TTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTC CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC ATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCA AAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGA AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAG TGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGA TGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTT CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAG AACA
2	TMV omega (DNA 配 列)	ACAATTACCAACAACAACAACAACAACATT ACAATTACTATTTACAATTAC
3	AtADH 5'- UTR (DNA 配 列)	TACATCACAATCACACAAAATAACAAAAGATCAA AAGCAAGTTCTTCACTGTTGATA
4	HSP- terminator (DNA 配 列)	TATGAAGATGAAGATGAAATATTTGGTGTGTCAA ATAAAAAGCTAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTGTT TTTTTCTTGGCTTGTTGTGTTATGAATTTGTGGC TTTTTCTAATATTAAATGAATGTAAGATCTCATT TAATGAATAAACAAATGTTTCTATAATCCATTGTG AATGTTTTGTTGGATCTCTTCGCATATACTACT GTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAATATGATT AAAGATAAG
5	Barley AMY 1.2 Signal	MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASG

	Peptide (アミノ酸配列)	
6	Thiol protease aleurain (Barley) vacuolar signal (アミノ酸配列)	MAHARVLLLALAVLATAAVAVASSSSFADSNPIRPVT DRAASTL
7	Collagen alpha-1 N- terminal propeptide (アミノ酸配列)	QEEGQVEGQDE DIP PIT CV QNGLRYH DRD VWK PEP CRICVCDNGKVL CDD VIC DET KNC PGA EVPEGECCP VCPDGSESPTDQETTGV EGP KGDTGPRGPRGPAGP PGRDGIPGQPGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAP
8	Collagen alpha-1 (I) chain (アミノ酸配列)	QEEGQVEGQDE DIP PIT CV QNGLRYH DRD VWK PEP CRICVCDNGKVL CDD VIC DET KNC PGA EVPEGECCP VCPDGSESPTDQETTGV EGP KGDTGPRGPRGPAGP PGRDGIPGQPGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQL SYGYDEKSTGGISVPGPMGPSGPRGLPGPPGAPGPQ GFQGPPGEPGEPGASGPMGPRGPPGPPGKNGDDG EAGKPGRPGERGPPGPQGARGLPGTAGLPGMKGH RGFSGLDGAKGDAGPAGPKGEPGSPGENGAPGQM GPRGLPGERGRPGAPGPAGARGNDGATGAAGPPGP TGPAGPPGFPGAVGAKGEAGPQGPRGSEGPQGV RG EPGPPGPAGAAGPAGNPGADGQPGAKGANGAPGIA GAPGFPGARGPSGPQGPGGPPGPKGNSGEPGAPGS KGDTGAKGEPGPVG VQGPPGPAGEEGKRGARGEP GPTGLPGPPGERGGPGSRGFP GADGVAGPKGPAGE RGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLP GAKGLTGSPGS

		PGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVM GFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGE AGAQQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAG PPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFGER GVQGPPGPAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPG SQGAPGLQGMPPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGA DGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKGESGPSG PAGPTGARGAPGDRGEPGPPGPAGFAGPPGADGQP GAKGEPGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGNVGA PGA KGARG SAGPPGATGFPGAAGR VGPPGPSGNAG PPGPPGPAGKEGGKGPRGETGPAGRPGEVGPPGPP GPAGEKGS PGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGVVGL PGQRGERGFPLPGPSGEPGKQGPSGASGERGPPG PMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGSPGAK GDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGKSGDRGE TGPAGPTGPVGPVGARGPAGPQGPRGDKGETGEQ GDRGIKGHRGFSGLQGPPGPPGSPGEQGPSGASGP AGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTG DAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAGFDFSFLPQPPQEK AHDGGRYRADDANVVRDRDLEVDTTLSLSQQIE NIRSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPN QGCNLDAIKVFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYI SKNPKDKRHVWFGESMTDGFQFEYGGQGSDPADV AIQLTFLRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNL KKALLLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHTGA WGKTVIEYKTTKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFGFD VG PVCFL
9	Collagen alpha-1 C- terminal propeptide (アミノ酸	DDANVVRDRDLEVDTTLSLSQQIENIRSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPNQGCNLDAIKVFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPKDKRHVWFGESMTDGFQFEYGGQGSDPADVAIQLTFLRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLLQGSN

	配列)	EIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHTGAWGKTVIEYKT TKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFGFDVGPVCFL
10	Collagen alpha-2 N- terminal propeptide (アミノ酸 配列)	QSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPGRDGEDG PTGPPGPPGPPGPPGLGGNFAA
11	Collagen alpha-2 (I) chain (アミ ノ酸配列)	QSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPGRDGEDG PTGPPGPPGPPGPPGLGGNFAAQYDGKGVGLGPGP MGLMGPRGPPGAAGAPGPQGFQGPAGEPGEPGQT GPAGARGPAGPPGKAGEDGHPGKPGRPGERGVVG PQGARGFPGTPGLPGFKGIRGHNGLDGLKGQPGAP GVKGEPGAPGENGTPGQTGARGLPGERGRVGAPG PAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPGAPGPKG EIGAVGNAGPAGPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNP GANGLTGAAGAAGLPVAGAPGLPGPRGIPGPVGA AGATGARGLVGEPGPAGSKGESGNKGEPGSAGPQG PPGPSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRGSPGSRG LPGADGRAGVMGPPGSRGASGPAGVRGPNGDAGR PGEPGLMGPRGLPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGR PGPIGPAGARGEPPGNIGFPGPKGPTGDPGKNGDKG HAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPPGPQGVQGGKG EQGPPGPPGFQGLPGPSGPAGEVGKPGERGLHGEF GLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRGPSGPP GPDGNKGEPGVVGAVGTAGPSGPSGLPGERGAAGI PGGKGEKGEPLRGEIGNPGRDGARGAPGAVGAPG PAGATGDRGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPA GPNGFAGPAGAAGQPGAKGERGAKGPKGENG VVG PTGPVGAAGPAGPNGPPGPAGSRGDGGPPGMTGF PGAAGRTGPPGPSGISGPPGPPGPAGKEGLRGPRGD QGPVGRTGEVGAVGPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPG

		TPGPQGLLGAPGILGLPGSRGERGLPGVAGAVGEPG PLGIAGPPGARGPPGAVGSPGVNGAPGEAGRDNP GNDGPPGRDGQPGHKGERGYPGNIGPVGAAGAPG PHGPVGPAGKHGNRGETGPSGPVGPAGAVGPRGPGS GPQGIRGDKGEPGEKGPRLPGLKGHNGLQGLPGI AGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDGRT GHPGTVPAGIRGPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGV SGGGYDFGYDGDYFADQPRSAPSLRPKDYEVDATL KSLNNQIETLLTPEGSRKNPARTCRDLRLSHPEWSSG YYWIDPNQGCTMDAIKVYCDFSTGETCIRAQPENIP AKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNVEGVTS KEMATQLAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEET GNLKKAVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSK KTNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEF FVDIGPVCFK
12	Collagen alpha-2 C- terminal propeptide (アミノ酸 配列)	DQPRSAPSLRPKDYEVDATLKSLNNQIETLLTPEGSR KNPARTCRDLRLSHPEWSSGYYWIDPNQGCTMDAI KVYCDFSTGETCIRAQPENIPAKNWYRSSKDKKHVW LGETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQLAFMRLLANY ASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGSNDVE LVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTNK PSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDIGPVCFK
13	GFP (アミ ノ酸配列)	SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRY PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTR AEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYK
14	GST (アミ ノ酸配列)	SPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEG DKWRNKKFELGLEFPNLPPYIDGDVKLQTQSMAIIRYI ADKHNMMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRAYS

		KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDH VTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKR IEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPPK
15	MBP (アミノ酸配列)	KIEEGKLVINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVT VEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDREFGGYA QSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPI AVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDV GVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAF NKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKG QPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEG LEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQ KGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEAL KDAQTNSSSSNNNNNNNNNNNLG
16	HN Tag (アミノ酸配列)	HNHNHNHNHNHN
17	Human P4H alpha subunit (アミノ酸配列)	HPGFFTSIGQMTDLIHTEKDLVTSLKDYIKAEEDKLE QIKKWAELDRLTSTATKDPEGFVGHPVNAFKLMK RLNTEWSELENLVLDMSDGFISNLTIQRQYFPNDE DQVGAAKALLRLQDTYNLDTDTISKGNLPGVKHKS FLTAEDCFELGKVAYTEADYYHTELWMEQALRQLD EGEISTIDKVSVDLYLSYAVYQQGDLDKALLLTKKLL ELDPEHQRANGNLKYFEYIMAKEKDVNKSASDDQS DQKTTPKKKGVAVDYLPERQKYEMLCRGEGIKMTP RRQKKLFCRYHDGNRNPKFILAPAKQEDEWDKPRII RFHDIISDAEIEIVKDLAKPRLRRATISNPITGDLET VH YRISKSAWLSGYENPVVSRINMRIQDLTGLDVSTAE LQVANYGVGGQYEPHFDFARKDEPDFAFKELGTG NR IATWLFYMSDVSAGGATVFPEVGASVWPKKGTAVF WYNLFASGEGDYSTRHAACPVLVGNKWVSNKWLHE RGQEFRRPCTLSELE

18	C. elegans P4H alpha subunit (ア ミノ酸配 列)	DLFTSIADMQNLLETERNIPKILDKYIHDEEERLVQL KKLSEEYSKKNEISIENGLKDITNPINAFLLIKRKIFDW KEIESKMNANKAGNVVSSITDDSYGVRYPTADDLSG AAIGLLRLQDTYRLDTKDLADGKIYADQGNYTFSAK DCFEIARAAYNEHDFYHTVMWMEEAQRRLGDEVEP TVEVEDILEYLAFALYKQNNLKHALKLTEELYKMNP THPRAKGNVKWYEDLLEQEGVRRSDMRKNLPPIQN RRPDSVLGNTERTMYEALCRNEVPVSQKDISRLCYCY KRDRPFLVYAPIKVEIKRFNPLAVLFKDVISDDDEVA AIQELAKPKLARATVHDSVTGKLVATYRISKSAWLKE WEGDVVETVKNKRIGYMTNLEMETAEELQIANYGIG GHYDPHFDHAKKEESKSFESLGTGNRIATVLFYMSQ PSHGGGTVFTEAKSTILPTKNDALFWYNLYKQGDG NPDTRHAACPVLVGKWWVSNKWIHEKGNEFRRPCG LKSSDYERFVGDLGYGPEPRNAPNVSPNLAKD VWET L
19	Human P4H beta subunit (ア ミノ酸配 列)	DAPEEEDHVLVLRKSNFAEALAAHKYLLVEFYAPWC GHCKALAPEYAKAAGKLKAEGSEIRLAKVDATEESDL AQQYGVRGYPTIKFFRNGDTASPKEYTAGREADDIV NWLKKRTGPAATTLPGAAAESLVESSEVAVIGFFK DVEDSAKQFLQAAEAIDDIPFGITSNSDVFSKYQLD KDG VVL FKKFDEGRNNFEGEVTKENLLDFIKHNQLP LVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLS NFKTAAESFKGKILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEE CPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEG KIKPHLMSQELPEDWDKQPVKVLVGKNFEDVAFDE KKNVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN IVIAKMDSTANEVEAVKVHSFPTLKFFPASADRTVID YNGERTLDGFKKFLES GGQDGAGDDDDLEDLEEAE EPDMEEDDDQKAV
20	Mouse P4H beta	DALEEEDNVVLKKS NFEEALAAHKYLLVEFYAPWC GHCKALAPEYAKAAA KLKAEGSEIRLAKVDATEESDL

	subunit (アミノ酸配列)	AQQYGVRGYPTIKFFKNGDTASPKKEYTAGREADDIV NWLKKRTGPAATTLSDTAAAESLVDSSSEVTVIGFFK DVESDSAKQFLLAEEAIDDIPFGITSNSGVFSKYQLDK DGVVLFKKFDEGRNNFEGEITKEKLLDFIKHNQLPL VIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLSSF KRAAEGFKGKILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEECP AVRLITTLEEMTKYKPESDELTAEKITEFCHRFLEGKI KPHLMSQEVPEWDWKQPVKVLVGANFEEVAFDEKK NVFVEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHENIII AKMDSTANEVEAVKVHSFPTLKFFPASADRTVIDYN GERTLDGFKKFLESQGDGAGDDEDLDLEEALPD MEEDDDQKAVKDEL
21	LH3 (アミノ酸配列)	SDRPRGRDPVNPEKLLVITVATAETEGYLRFLRSAEF FNYTVRTLGLGEEWRGGDVARTVGGGQKVRWLKK EMEKYADREDMIIMFVDSYDVILAGSPTELLKKFVQS GSRLLSAESFCWPEWGLAEQYPEVGTGKRFLNSGG FIGFATTIHQIVRQWKYKDDDDDDQLFYTRLYLDPGL REKLSLNDHKSRIQNLNGALDEVVLKFDRNRVRIR NVAYDTLPVVHGNPPTKLQLNYLGNYVPNGWTPE GGCGFCNQDRRTLPGGQPPPRVFLAVFVEQPTPFL PRFLQRLLLLDYPPDRVTLFLHNNEVFHEPHIADSW PQLQDHFSAVKLVGPPEALSPGEARDMAMDLCRQD PECEFYFSLDADAVLTNLQTLRILIEENRKVIAPMLSR HGKLWSNFWGALSPDEYYARSEDYVELVQRKRVGV WNVPIYSQAYVIRGDTLRMELPQRDVFSGSDTDPD MAFCKSFRDKGIFLHLSNQHEFGRLATSRDYDTEHL HPDLWQIFDNPVDWKEQYIHENYSRALEGE GIVEQP CPDVYWFPLLSEQMCDELVAEMEHYGQWSGGRHE DSRLAGGYENVPTVDIHMKQVGYEDQWLQLLRTYV GPMTESLFPGYHTKARAVMNFVVRYRPDEQPSLRP HHDSSTFTLNVALNHKGLDYEGGGCRFLRYDCVISS PRKGWALLHPGRLTHYHEGLPTTWGTRYIMVSFVD

		P
22	BMP1 (アミノ酸配列)	AATSRPERVWPDGVIPFVIGGNFTGSQRAVFRQAMR HWEKHTCVTFLERTDEDSYIVFTYRPGCCSYVGRR GGGPQAISIGKNCDKFGIVVHELGHVVGFWHEHTRP DRDRHVSIVRENIQPGQEYNFLKMEPQEVESSLGETY DFDSIMHYARNTFSRGIFLDTIVPKYEVNGVKPPIGQ RTRL SKGDIAQARKLYKCPACGETLQDSTGNFSSPEY PNGYSAHMHCVWRISVTPGEKIILNFTSLDLYRSRLC WYDYVEVRDGFWRKAPLRGRFCGSKLPEPIVSTDSR LWVEFRSSSNWVGKGFFAVYEACGGDVKKDYGHIQ SPNYPDDYRPSKVCIWRIQVSEGFHVGLTFQSFEIER HDSCAYDYLEVRDGHSESSTLIGRYCGYEKPDDIKST SSRLWLKFVSDGSINKAGFAVNFFKEVDECSRPNRGG CEQRCLNTLGSYKCSCDPGYELAPDKRRCEAACGGF LTKLNGSITSPGWPKEYPPNKNCIWQLVAPTQYRISL QFDFFETEGNDVCKYDFVEVRSGLTADSKLHGKFCG SEKPEVITSQYNNMRVEFKSDNTVSKKGFKAHFFSEK RPALQPPRGRPHQLKFRVQKRNRTPO
23	RNA silencing suppressor p19 (アミノ酸配列)	MERAIQGNDAREQANSERWDGGSGSSTSPFQLPDES PSWTEWRLHNDETNSNQDNPLGFKESWGFGKVVVF KRYLRYERTETSLHRVLGSGWTGDSVNAAASRFFGVN QIGCTYSIRFRGVSVTISGGSR TLQHLCEMAIRSKQEL LQLTPVEVESNVSRGCPEGVETFEETEESE

[0073] 1. コラーゲン遺伝子発現カセットの構築

大麦アミラーゼシグナルペプチド (Barley AMY 1.2 Signal Peptide、配列番号5) に融合された Collagen alpha-1 (I) chain (Col1、配列番号8) をコードする合成遺伝子を、CaMV 35Sプロモーター (配列番号1) 及びシロイヌナズナADH由来5'-UTR (配列番号3) 並びにHSPターミネーター (配列番号4) からなる発現カセット中にクローニングした (図1a)。Col1に変異を導入し、N末もしくはC末プロ領域切断部位の改変 (H

R V 3 C、F u r i nまたはE n t e r o k i n a s eによる切断部位の導入)、N末プロ領域の除去、GFP(配列番号13)によるN末端プロ領域の置換などの改変を加えたC o l 1の発現カセットを構築した。

具体的には、N末端プロ領域切断部位の改変は、N末端プロ領域のC末端領域をそれぞれ、H R V 3 C、F u r i nまたはE n t e r o k i n a s eの認識配列に置換することにより行った。この際、F u r i nおよびE n t e r o k i n a s eは認識配列のC末端を切断するため、切断処理後のプロコラーゲン天然のN末端テロペプチド配列を有するコラーゲンとなる。一方、H R V 3 Cは認識配列の内部を切断するため、切断処理後のプロコラーゲンはH R V 3 Cの認識配列のC末端側配列G l y P r oが付加されたN末端テロペプチド配列を有するコラーゲンとなる。植物細胞内では天然のN末端切断部位より2アミノ酸残基(G l n L e u)C末端側の位置で切断される。当該植物細胞内での切断を再現する改変として、N末端プロ領域とN末端テロペプチド領域にまたがる領域にE n t e r o k i n a s eの認識配列を導入することで、N末端の2アミノ酸残基(G l n L e u)が欠失したN末端テロペプチド配列を有するコラーゲンを生じるC o l 1の発現カセットも構築した。

また、C末端プロ領域の改変は、植物細胞内でC末端プロ領域を切断する未知のプロテアーゼの認識配列を除去するため、C末端テロペプチド領域からC末端プロ領域にかけて異なる位置でE n t e r o k i n a s eの認識配列へのアミノ酸置換を行った複数の発現カセットを構築した。

[0074] 大麦アミラーゼシグナルペプチド(配列番号5)に融合されたC o l 1 a g e n a l p h a - 2 (1) c h a i n (C o l 2、配列番号11)をコードする合成遺伝子を、C a M V 3 5 Sプロモーター(配列番号1)及びシロイヌナズナA D H由来5' - U T R (配列番号3)並びにH S Pターミネーター(配列番号4)からなる発現カセット中にクローニングした(図1b)。C o l 2に変異を導入し、N末もしくはC末プロ領域切断部位の改変、N末プロ領域の除去、N末端への緑色蛍光タンパク質の融合、H N

タグ（配列番号16）やGSTタグ（配列番号14）、MBPタグ（配列番号15）の付加などの改変を加えたCol2の発現カセットを構築した。各改変の内容は、Col1の発現カセット改変と同様であった。

[0075] 3. アグロバクテリウムの形質転換

上記2で作製したpRI 201-AN植物形質転換ベクター由来のプラスミドを用い、凍結融解法によりアグロバクテリウムGV3101株を形質転換した。各プラスミドで形質転換されたアグロバクテリウムを、単独あるいは2菌株を混合した条件でインフィルトレーションに使用した。

[0076] 植物ニコチアナ・ベンサミアナ（*Nicotiana benthamiana*）を、市販のヤシ殻基質を満たしたプラグトレイで種子から育てた。前記植物を明16時間／暗8時間の光周期及び終日25℃の温度スケジュールの下で温室にて生育させた。播種から4週間後の植栽に対しアグロインフィルトレーションを実施した。実施直前に、植物から芽を摘み取ることによって、頂芽を除去した。

[0077] 2. 修飾酵素発現ベクターの構築

液胞シグナル（Thiol protease aleurain（Barley）vacuolar signal、配列番号6）もしくは大麦アミラーゼシグナルペプチド（配列番号5）に融合されたヒトP4H α （配列番号17）、ヒトP4H β （配列番号19）、線虫P4H α （配列番号18）、及びマウスP4H β （配列番号20）をコードする合成遺伝子を、CaMV 35Sプロモーター（配列番号1）並びにシロイヌナズナADH由来5'-UTR（配列番号3）もしくはTMVオメガ配列（配列番号2）、HSP由来ターミネーター（配列番号4）からなる発現カセット中にクローニングした（図1c）。小胞体に蓄積する場合を除き、P4H β 遺伝子の3'末端からKDEL配列を除去した。

[0078] 液胞シグナル（配列番号6）もしくは大麦アミラーゼシグナルペプチド（配列番号5）に融合されたLH3（配列番号21）をコードする合成遺伝子を、CaMV 35Sプロモーター（配列番号1）並びにシロイヌナズナA

DH由来5' - UTR (配列番号3)、HSP由来ターミネーター (配列番号4) からなる発現カセット中にクローニングした (図1d)。

[0079] 液胞シグナル (配列番号6) もしくは大麦アミラーゼシグナルペプチド (配列番号5) に融合されたHNタグ (配列番号16) と融合したBMP1 (配列番号22) をコードする合成遺伝子を、CaMV 35Sプロモーター (配列番号1) 並びにシロイヌナズナADH由来5' - UTR (配列番号3)、HSP由来ターミネーター (配列番号4) からなる発現カセット中にクローニングした (図1f)。小胞体に蓄積する場合に限りBMP1遺伝子の3'末端にKDEL配列を付加した。

[0080] Tomato bushy stunt virus由来RNA silencing suppressor p19 (UniProtKB - P50628、) をコードする合成遺伝子 (配列番号23) を、CaMV 35Sプロモーター (配列番号1) 並びにシロイヌナズナADH由来5' - UTR (配列番号3)、HSP由来ターミネーター (配列番号4) からなる発現カセット中にクローニングした (図1d)。

[0081] 構築した各遺伝子の発現カセットを、以下の組み合わせでpRI 201 - AN植物形質転換ベクターのマルチクローニングサイト中にクローニングした。

(1) Col1 + p19

(2) Col2 + p19

(3) Col1 + Col2 + P4H α + P4H β + LH3 + p19

(4) Col1 + Col2 + p19

(5) P4H α + P4H β + LH3 + p19

(6) Col1 + P4H α + P4H β + p19

(7) Col1 + LH3 + p19

(8) Col1 + BMP1 + p19

[0082] 4. アグロバクテリウムからのコラーゲン取得

各プラスミドで形質転換したアグロバクテリウムを50 μ g/ml k

anamycinを含むSelect Alternative Protein Source (APS) 培地にて28℃で一晩振盪培養し、OD₆₀₀が4.5から5.5に達するまで増殖させた。アグロバクテリウム培養液を遠心し、ペレットをインフィルトレーションバッファー(10mM MgCl₂及び10mM MES (pH 5.6))に再懸濁した。菌液の濃度はOD₆₀₀が0.4(2菌株を同時に接種する場合は0.8)になるよう調整してインフィルトレーションを実施した。インフィルトレーション後の植栽として6日間インキュベートし、アグロバクテリウムが浸潤した葉のみを収穫した。収穫した葉を-80℃で凍結し、小片に粉砕した。

[0083] 全可溶性タンパク質は、凍結粉砕した葉約0.1 gに対し、3体積分の50 mM トリス (pH 7.4)、0.15 M NaClを加え摩砕し、4℃で5分、20,000 gで遠心することにより抽出された。また、別の抽出条件として、3体積分の0.5 M 酢酸, 0.2 M NaClを用いた抽出を実施した。

[0084] 5. 取得されたコラーゲンの分析

下記条件で抽出したコラーゲンを処理し、SDS-PAGEにより切断の有無を確認した。

コラーゲン抽出液のプロテアーゼ処理 4℃16時間反応

HRV3C: 抽出液20 μL + HRV3C (Millipore #71493) 1 μL

Furin: 抽出液20 μL + 6mM CaCl₂ 4 μL + 10倍希釈Furin (R&D #1503-SE-010) 2 μL

Enterokinase: 抽出液20 μL + 6mM CaCl₂ 10 μL + 10倍希釈Enterokinase (NEB #P8070S) 2 μL

[0085] 6. 質量分析

質量分析サンプルを、全可溶性タンパク質をDTTにより還元後、MOPS緩衝液を用いたSDS-PAGE電気泳動を行うことにより分離した。泳

動後、C B B 染色により、分離タンパク質の検出を行ったところ、コラーゲンを発現させた全可溶性タンパク質では約 130 kDa 付近にコラーゲンと予想されるバンドが認められたので、この部分のゲルを切り出し、含まれるタンパク質の質量分析を行った。質量分析は（株）日本プロテオミクスに解析を依頼した。ゲル断片を脱色後、トリプシン消化を行い、nano LC-MS/MS で質量の測定を行った後、そのデータを Mascot Search にかけてタンパク質同定を行った (<https://www.jproteomics.com/>)。

[0086] 7. ウエスタンブロット法を用いたタバコ葉でのコラーゲン発現の確認

タバコ葉（ニコチアナ・ベンサミアナ）より抽出した全可溶性タンパク質を、トリスグリシン緩衝液を用いた SDS-PAGE 電気泳動を行うことにより分離した。泳動後、PVDF 膜に転写し、コラーゲン α 1 およびタグ配列に対する抗体を用いてウエスタンブロット法を行い、コラーゲン α 1 およびコラーゲン α 2 の発現を確認した。

[0087] （結果）

実施例 1：植物発現系における分泌型の I 型コラーゲン α 1 の一過性発現

上述の方法により、Col1 の発現カセットをニコチアナ・ベンサミアナ植物発現系にて一過性に発現させ、SDS-PAGE により切断の有無を確認した（図 2）。各レーンの試料を以下に示す。

レーン	試料
1	マーカー
2	陰性対照（ネガコン）抽出液
3	プロコラーゲン α 1 抽出液
4	N 末端プロ領域除去コラーゲン α 1 抽出液
5	N 末端切断部位改変（HRV3C）プロコラーゲン α 1 抽出液
6	N 末端切断部位改変（HRV3C）プロコラーゲン α 1 抽出液 +HRV3C 処理
7	N 末端切断部位改変（Furin）プロコラーゲン α 1 抽出液
8	N 末端切断部位改変（Furin）プロコラーゲン α 1 抽出液 + Furin 処理
9	N 末端切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液
10	N 末端切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液 + Enterokinase 処理
11	N 末端切断部位改変（植物内切断位置）（Enterokinase）プロコラー ゲン α 1 抽出液
12	N 末端切断部位改変（植物内切断位置）（Enterokinase）プロコラー ゲン α 1 抽出液 + Enterokinase 処理
13	N 末端 GFP 結合切断部位改変（HRV3C）プロコラーゲン α 1 抽出 液
14	N 末端 GFP 結合切断部位改変（HRV3C）プロコラーゲン α 1 抽出 液+HRV3C 処理
15	N 末端 GFP 結合切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液
16	N 末端 GFP 結合切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液+HRV3C 処理
17	C 末端切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液
18	C 末端切断部位改変（Enterokinase）プロコラーゲン α 1 抽出液 +HRV3C 処理

その結果、植物体内にN末プロ領域及びC末プロ領域を有する全長コラーゲンタンパク質が蓄積されていることが確認された（図2、レーン3）。当

該結果は、F R u g g i e r oらの2000年の研究で示された、植物安定発現系において分泌型のⅠ型コラーゲン $\alpha 1$ のN末プロ領域及びC末プロ領域が切断されることを示す実験結果とは対照的であり、予想外の結果であった。また、切断部位改変を有するⅠ型コラーゲン $\alpha 1$ を抽出液中で切断部位改変に対応する酵素で処理することにより、Ⅰ型コラーゲン $\alpha 1$ N末及びC末のプロ領域の切断が可能であることが示された（図2、レーン4～18）。

[0088] 実施例2：GFP融合コラーゲン $\alpha 1$ の取得

GFP融合コラーゲン $\alpha 1$ 抽出液の抽出液に対し励起光を照射することにより、蛍光が確認された。N末及びC末のプロ領域のうち、C末プロ領域はコラーゲンが三重鎖を形成するのに必要であるとされるが、N末プロ領域は必須ではなく、実際にN末プロ領域を除去した配列でも発現が確認されている。本実験により、N末プロ領域に替えて、GFPのような異種ペプチド配列を融合させることにより、新しい機能を付与したコラーゲンを産生することが可能であることが示された（図3）。

[0089] 実施例3：コラーゲン $\alpha 1$ およびコラーゲン $\alpha 2$ の同時発現の確認

上述の方法により、C o l 1の発現カセットとC o l 2の発現カセットを植物発現系にて一過性に共発現させたところ、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ コラーゲンタンパク質が同時に細胞体内で蓄積することを、ウエスタンブロットにより確認した（図4）。各レーンの試料を以下に示す。

レーン	試料
1	陰性対照（ネガコン）抽出液
2	プロコラーゲン α 1 抽出液
3	HisTrap 精製液 N 末端プロ領域除去コラーゲン α 1 および HN タグ付加 N 末端プロ領域除去コラーゲン α 2
4	HisTrap 精製液 プロコラーゲン α 1 および HN タグ付加プロコラーゲン α 2
5	HisTrap 精製液 N 末端プロ領域除去コラーゲン α 1 および MBP タグ付加 N 末端プロ領域除去コラーゲン α 2

また、質量分析によっても、 α 1 と α 2 コラーゲンタンパク質が発現されていることを確認した（図 5）。各レーンの試料は図 4 と同じ。

[0090] 以上の実施例により、コラーゲンタンパク質を植物発現系にて一過性に発現させることにより、分泌型のコラーゲンを安定に取得することが可能であることが意外にも見出された。また、N 末プロ領域に替えて様々な機能を有するペプチドを融合したコラーゲンを発現することにより、高機能型コラーゲンを取得することも可能であることが確認された。

[0091]

<Seq ID No:1 CaMV 35S Promoter DNA Seq; DNA; Cauliflower mosaic virus>

TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCAC
TTTATTGTGAAGATAGTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTCGGATAAAGGAAAGG
CCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGT
GGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
AGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATT
TGGAGAGACA

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

ACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACAATTACTATTTACAATTAC

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

TACATCACAATCACACAAAATAACAAAAGATCAAAAGCAAGTTCTTCACTGTTGATA

<Seq ID No:4 HSP-terminator DNA Seq; DNA; Arabidopsis thaliana>

TATGAAGATGAAGATGAAATATTGGTGTGTCAAATAAAAAGCTAGCTTGTGTGCTTAAGTTGTGT
TTTTTCTTGGCTTGTGTGTATGAATTTGTGGCTTCTTCTAATATTAATGAATGAAGATCTCA
TTATAATGAATAAACAATGTTTCTATAATCCATTGTGAAIGTTTTGTTGGATCTCTCGCATATAA
CTACTGTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAATATGATTAAAGATAAG

<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>

MAHARVLLALLAVLATAAVAVASSSSSFADSNPIRPVTDRAASTL

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

QEEGQVEGQDEDIPTTCVQNGRLRYHEDRDVWKPEPCRCVCDNGKVLCDDEVICDETKNCPGAEVPEG
ECCPVC PDGESPTDQETTGVGPKGDTGPRGPRGPAGPGRDGI PGQPLPGPPGPPGPPGLG
GNFAP

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

QEEGQVEGQDEDI PPITCVQNGRLRYHRRDVWKPEPCRICVCDNGKVLCDDEVICDETKNCPGAEVPEG
ECCFVCPDQSESPIDQETTCVECPKGDTCPRCPRCPPGPRDGLPCQPLPCPPCPPCPGPPCLC
GNFAPQLSYGYDEKSTGGISVPGPMGPSGPRGLPGPPGAPGPQGFGQPPGEPGEFGASGPMGPRGPP
GPPGKNGDDGEAGKPCRPERGPPGPQGARGLPGTAGLPKMKCHRGFSGLDGAAGDAGPAGPKGEPC
SPGENCAPGQMGPRGLPGERGRPGAPGPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFPAGVAGAKEAGP
QGPARGSEGPQGVRFEPGPPGAGAAAGPAGNPGADGQPGAKGANGAPGIAGAPGFFGARGPSGPQGPG
GPPGPKGNSGEPGAPGSKGDTGAKGEPGPVGVQPPGPAGEEGKRGARGEPGPTGLPGPPGERGGPG
SRGPGADGVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAKGLTGSPPGSPGPDGKTGPZGP
AGQDGRPGPPPGARGQAGVMCFPGPKGAAGEPGKAGERGVPPGPAVGPAKDGCEAGAQQPPGPA
GPAGERGEQQPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFPGERGVQGP
PAGFRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGSQGAPGLQGMFGERGAAGLPKPKGDRGDAGPKGADGSPGK
DGVRGLTGPIGPPGAPGAPGDKGESGPSGPAGPTGARGAPGDRGEPGPPGAPGAGPPGADGQPGAK
GEPGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPPIGNVGAAPGAKGARGSGAGPPGATGFPGAAGRVGPPGPSGNAG
PPGPPGPAGKEGKGPGETGPAGRPGEVGPMPGPPGPAGEKSGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGV
VGLPGQRGERGFPGLPGPSGEPKQGPSGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRD
GSPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGVPVGPAGKSGDRGETGPAGPTGPVGPVARGPAGPQGPRG
DKGETGEQGDGRGIKCHRGFSGLQGGPPGSPGEGQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGP
IGPPGPRGRTGDAGPVGPMPGPPGPPGPPSAGFDFSELPQPPQEKAGHDGGRYYRADDANVVRDRD
LEVDTTLKSLSQIENIRSPGSRKNPARTCRDLKMHSDWKSGEYWIDPNQGCNLD
AIKVFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPDKRHHVWFGESEMTDGFQFEYGGQGSDDPADVAIQ
LTFRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHT
GAWGKTVIEYKTTKTSRIPIIDVAPLDVGAPDQEFQFDVGPVCFI

<Seq ID No:9 Collagen alpha-1 C-terminal propeptide AA Seq; AA;
synthetic construct>

DDANVVRDRDLEVDTTLKSLSQIENIRSPGSRKNPARTCRDLKMHSDWKSGEYWIDPNQGCNLD
AIKVFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPDKRHHVWFGESEMTDGFQFEYGGQGSDDPADVAIQ
LTFRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHT
GAWGKTVIEYKTTKTSRIPIIDVAPLDVGAPDQEFQFDVGPVCFI

<Seq ID No:10 Collagen alpha-2 N-terminal propeptide AA Seq; AA;
synthetic construct>

QSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPCRDGEDGPTGPPGPPGPPGPPGLGNFAA

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

QSIQEFFTVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPCRDGEDGPTGPPGPPGPPGPPGLGNFAAQYDGKGVGLG

PGPMGLMCPRCPPGAACAPCPQGFQGFAGEFGEPCQTGFAGARCPAGPPCKAGEDCHPGKPCRPGER
 GVVCPPQARGFPPTPGLPGFKTRGHNGLDGLKGQPGAPGVKGFPGAPGRNGTPGQTGARGT.PGEFG
 RVGAPGPAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFTPGAPGPKGEIGAVGNAGPAGTAPGRGEVGLPGL
 SCPVGP2PCNPGANCLTCAKGAAGLPCVAGAPGLPGFRCIPCPVCAACATCARGLVCEPCPACSKGES
 GNKCEPGSAGPQGP2PGSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPCLRGS2PGSRGLPGADGRAGVMGPPGSRG
 ASGPAGVRGPNGDAGRPGEPGLMGPRGLPGSPGNIGPACKEGVPGLPGIDGRPGPIGPAGARGEPPGN
 IGFPGPKGPTGDPGKNGDKGHAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPFGPQGVQGGKGEQGP2PGFPFGQLP
 G2PGSPAGEVGP2PGERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRG2PG2PGPDGNKGEFG
 VVGAVGTAG2PG2PSGLPGERGAAGIPGKKEKGE2PGLRGEIGNPGRDGARGAPGAVGAPG2PAGATGD
 RGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGN2PAGPAGAAQPCAKGERGAKGPKGENGVVGT2PGPV
 GAACPAGP2NGP2PAGSRGDG2PPG2MTG2PGAAGRTG2PPG2SGISG2PPG2PPG2PAGKEGLR2PGRDQ2
 PVGRTGEV2GAVG2PPG2FAGEK2PGSGEAGT2G2P2T2PG2Q2LLG2P2GIL2GL2PG2SRGERGL2PGVAGAVGE
 PG2PLGIAG2PPGARG2PPGAVG2SPGVNGAPG2AGRDGN2PGNDG2PPGRDQ2P2GHKGERGY2PGNIG2PVGAA
 GAPGPHG2PVG2PAGKHG2NRGET2PGSPG2PAGAVG2PRG2SGP2Q2TRGD2KGF2PGRK2GPRGT.PGT.KGHNG
 LQGLPGIAGH2HDQ2CAPG2SVGP2APRG2PAG2SGP2AGKDGR2TGH2P2GT2VGP2AGIR2GP2QH2G2PAG2PPGP
 PG2PG2P2PGVSG2GY2DFGY2DGFY2RADQ2PR2SAP2SLRP2KDY2EVDATL2KSLNNQIETLLT2PEGSRKNP2ARTCDRLRLSHPEWSSGY2WIDPNQGC
 TCDRLRLSHPEWSSGY2WIDPNQGC2TMDA2KVY2CDFSTGETCIRAQ2PENI2PAKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQ
 LAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDIGPVCFK

<Seq ID No:12 Collagen alpha-2 C-terminal propeptide AA Seq;AA; synthetic construct>

DQPRSA2SLRPKDY2EVDATL2KSLNNQIETLLT2PEGSRKNP2ARTCDRLRLSHPEWSSGY2WIDPNQGC
 TMDA2KVY2CDFSTGETCIRAQ2PENI2PAKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNVEGVTSKEMATQ
 LAFMRLLANYASQNITYHCKNSIAYMDEETGNLKKAVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDIGPVCFK

<Seq ID No:13 GFP AA Seq; AA; synthetic construct>

SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGGDATYGKLTILKFICTTGKLPVPWP2TLVTTF2SYGV
 QCFSRY2PDHMK2QHDF2K2SAM2PEG2YVQ2ERTI2FFK2DDG2NYK2TRAEVK2FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN
 TI.GHKLEFYNYN2SHNVYT2MADK2QKNGT2KVNFKTRHNT2EDGSVQIADHY2QNTPTIGDGPVILPDNHYLS
 TQSALS2KDPNEKRDH2MVLL2EFVTAAGITHGM2DELYK

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

SPILGYW2KIKGLVQPT2RL2LLEY2EEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLETF2PNLPYYIDGDV2KLTQS

MAIRYIADKHNMLGCCPKERAETSMLEGAVLDIRYGVSRAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFED
RLCHKTYLNGDHVTHPDDFKLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWQATFGGGDHPK

<Seq ID No:15 MBP AA Seq; AA; Escherichia coli>

KIEGKLVIVINGDKGYNGLAEVGKKFEKDCGIKVTVEHPDKLEEFPPQVAATGDGPDIIFWAHDRE
GGYAQSGLIAETTPDKAFQDKLYPFTWDVRYNGKLTAYPIAVEATSLIYNKDLIPNPPKTFWEIPA
LDKELKAKGKSALMFINLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFVLVDLIK
KHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWWSNIDTSKVNYGVTVLPFFKGQPSKPFVGVLSAGINA
ASPNKELAKEFLENVLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIATMENAQGEIMPNI PQ
MSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNLG

<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>

HPGFFTSIGQMTDLIHTEKDLVTSCLKDYIKAEEDKLEQIKKWAELDRITSTATKDPEGFVGHVPNA
FKLMKRLNTEWSELENLVLKDMSDGFISKLTIQRQYFPNDEQVGAAKALLRLQDTYNLDTDTISKG
NLPCVKIKSFLTAEDCFELCKVAYTEADYHTELWMEQALRQLDECEISTIDKVSVDLYLSYAVYQQ
GDLDKALLLTKKLLELDPEHQRRANGNLKYFEYIMAKEKDVNKSASDDQSDQKTTPKKKGVAVDYLP
RQKYLEMLCRGEGIKMTPRRQKKLFCRYHDGNNRPKFIAPAKQDEWDKPRIIRTFDIIISDAEILEV
KDLAKPRLRRATISNPIFGDLETVHYRISKSAWLSGYENPVVSRINMRIQLTGLDVSTAEELQVAN
YGVGGQYEPHFDFARKDEPDAPKELGTGNRIATWLFYMSDVSAGGATVPPEVGASVWPKKGTAVFWY
NLFASGEGDYSTRHAACPVLVGNKWVSNKNLHERGQEFRRPCTISELE

<Seq ID No:18 C. elegans P4H alpha subunit AA Seq; AA; Caenorhabditis elegans>

DLFTSADMQNLLETERNIPKILDKYIHDEERLVQLKKLSEFYSKXNEISIENGLKIDITNPINAF
LTKRKTFDWKHEESKENANKAGNVVSSITDDSYGVRYPTADDISGAATGILRLQDTYRLDTKDLADG
KIYADQGNITFSAKDCFEIARAAYNEHDFYHTVMWMEEAQRRLGDEVEPTVEVEDILEYLAFALYKQ
NNLKHALKLTEELYKMNPTHPRAKGNVKWYEDLLEQEGVRRSDMRKNLPPIQNRPRDSVLGNTERCM
YEALCRNEVPVSQKDISRLCYCYKRDRPFLVYA?IKVEIKRFNPLAVLFKDVISDDEVAATQELAKP
KLARATVHDSVTGKLVATYRISKSAWLKEWEGDVVETVNXRIGYMTNLEMETAEELQIANYGIGGH
YDPHFDEAKKEESKSFESLGTGNRIATVLFYMSQPSHGGGTVEAKSTILPTKNDALFWYNLYKQG
DGNPDTRHAACPVLVGIKWVSNKWIHEKSGNEFRRPCGLKSSDYERFVGDLYGPEPRNAPNVSPNLA
KDVWFPI.

<Seq ID No:19 Human P4H beta subunit AA Seq; AA; Homo sapiens>

DAPEEEDHVLVLRKSNFAEALAAHKYLLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAGKKAEGSEIRLAKVDA
TEESD LAQQYGVRGYPTIKFFRNGDTASPKEYTAGREADDIVNWLKKRTGPAATTLPDGAAAE SLVE
SSEVAVIGFFKDVEDSAKQFLQAAEAIDDPFGITSNSDVFSKYQLDKDGVVLFKKFDEGRNNFEG
EVTKENLLDFIKHNQLPLVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLSNFKTAAESFKGK
ILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEECPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEGKIK
PHLMSQELPEDWDKQPVKVLVGKNFEDVAFDEKKNVFEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN
IVIAKMDSTANEVEAVKVHSPPTLKFFPASADRTVIDYNGERTLDGFKKFLES GGQDGAGDDDDLED
LEEAEPPDMEEDDDQKAV

<Seq ID No:20 Mouse P4H beta subunit AA Seq; AA; Mus musculus>

DALEEDNVVLKKS NFEEALAAHKYLLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAAKKAEGSEIRLAKVDA
TEESD LAQQYGVRGYPTIKFFKNGDTASPKEYTAGREADDIVNWLKKRTGPAATTLSDTAAAE SLVD
SSEVTVIGFFKDVEDSAKQFLAAEAIDDPFGITSNSGVFSKYQLDKDGVVLFKKFDEGRNNFEG
EITKEKLLDFIKHNQLPLVIEFTEQTAPKIFGGEIKTHILLFLPKSVSDYDGKLS SFFKRAAE GFKGK
ILFIFIDSDHTDNQRILEFFGLKKEECPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITEFCHRFLEGKIK
PHLMSQEVPEWDKQPVKVLVGANFEEVAFDEKKNVFEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKDHEN
IIIAKMDSTANEVEAVKVHSPPTLKFFPASADRTVIDYNGERTLDGFKKFLES GGQDGAGDDDDLDL
EEALEPDMEEEDDDQKAVKDEL

<Seq ID No:21 LH3 AA Seq; AA; Homo sapiens>

SDRPRGRDPVNPEKLLVITVATAETEGYLRFLRSAEFFNYTVRTLGLGEEWRGGDVARTVGGGQKVR
WLKKEMEKYADREDMIIMFVDSYDVILAGSPTELLKKFVQSGSRLLLSAESFCWPEWGLAEQYPEVG
TGKRFLNSGGFIGFATTIHQIVRQWKYKDDDDQLFYTRLYLDPGLREKLSLNL DHKSRIFQNLNGA
LDEVVLKFDNRNVRIRNVAYDTLPVIVHNGGPTKLQLNVLGNYPNGWTPEGGCGFCNQDRRTLPGG
QPPPRVFLAVFEQQPTPFLPRFLQRLLLLDYPPDRVTFLHNNEVFHEPHIADSWPQLQDHFS AVKL
VGPEEALSPGEARDMAMDLCRQDPECEFYFSLDADAVLTNLQTLRLILEENRKVIAPMLSRGKLWS
NFWGALSPDEYYARSEDYVELVQRKRVGVWVVPYISQAYVIRGDTLRMELPQRDV FSGSDTDPDMAF
CKSFRDKGIFLHLSNQHEFGRLLATRYDTEHLHPDLWQIFDNFVDWKEQYIHENYSRALEGEGIVE
QPCPDVYWFLLSEQMCDELVAEMEHCQWSGGRHEDSRLAGGYENVPTVDIHMKQVGYEDQWLQLL
RTYVGPMTESLFPGYHTKARAVMNFVVRYPDEQPSLRPHHDSSTFTLNVALNHKGLDYEGGGCRFL
RYDCVITSSPRKGWALLHPGRLTHYHEGLPTTWGTRYLMVSFVDP

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

AATSRPERVWPDGVIPFVIGNFTGSQRAVERQAMRHWEKHTCVTFLERTDEDSYIVFTYRPGCCGS

YVCRRCQCPQAISICKNCDKFCIVVHELCHVVGFWHEHTRPDRDRHVSIVRENIQPCQEQYNFLKMEP
QEVESSLGETYDFDSIMHYARNTFSRGLFLDTIVPKYEVNGVKPPIGQRTRLSKGDLAQARKLYKCPA
CGETLQDSTGNFSSPEYFNGYSAHMCVWRISVTPGEKIIILNFTSLDIYRSRLCWYDYVEVRDGFWR
KAPLRGRFCGSKLPEPIVSTDSRLWVEFRSSSNWVGKGFFAVYEALCGGDVKKDYGHIQSPNYPDLY
RPSKVCIWRIQVSEGFHVGLTFQSFELERHDS CAYDYLEVRDGHSESSTLIGRYCGYEKPDDIKSTS
SRLWLKFVSDGSINKAGFAVNFFKEVDECSRPNRGGCEQRCLNTLGSYKCS CDPGYELAPDKRRCEA
ACGGFLTKLNGSITSPGWPKEYPPNKNCIWQLVAPTQYRISLQDFDFETEGNDVCKYDFVEVRSGLT
ADSKLHGKFCGSEKPEVITSQYNNMRVEFKSDNTVSKKGFKAHFFSEKRPALQPPRGRPHQLKFRVQ
KRNRT PQ

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

MRRATQGNDAREQANSERWDGGSGSSTSPFQI,PDFSPSWTFWRTHNDETNSNQDNPIGFKESWGFGK
VVFKRYLRVYERTETSLHRVLGSGWTGDSVNAAASRFFGVNQIGCTYSIRFRGVSVTISGGSRLQLQLC
EMAIRSKQFTLQLT>VEVEFSKVSRCPEGVETFEFESE

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

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

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

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

請求の範囲

- [請求項1] A) プロコラーゲンをコードする核酸構築物を含む植物体または単離された植物細胞を準備する工程；
- B) 植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程；
- C) 工程Bにより細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを分離する工程；
- を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法。
- [請求項2] 工程Bの後に、細胞外に分泌されたプロコラーゲンのN末端またはC末端を切断する工程を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法。
- [請求項3] 前記核酸構築物が、天然型のプロコラーゲンに対して80%以上のアミノ酸配列同一性を有するプロコラーゲンをコードする核酸配列を含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記核酸構築物が、プロコラーゲン全長をコードする核酸配列を含み、プロコラーゲンのN末端が植物細胞内で切断されないような変異を有している、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項5] 請求項1または2に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン。
- [請求項6] 請求項1に記載の方法において用いられる、プロコラーゲンまたはコラーゲンを発現する核酸構築物。
- [請求項7] 請求項6に記載の核酸構築物を含む発現ベクター。
- [請求項8] 請求項6に記載の核酸構築物または請求項7記載の発現ベクターを含む植物体または単離された植物細胞。
- [請求項9] 請求項6に記載の核酸構築物のコードするプロコラーゲンまたはコラーゲンであって、非天然型アミノ酸配列を有するプロコラーゲンまたはコラーゲン。

- [請求項10] N末プロ領域に、異種ペプチドが融合されている、請求項9に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲン。
- [請求項11] 請求項1または2に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン、または請求項9もしくは10に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む、医薬組成物、化粧品組成物、または食品組成物である組成物。

補正された請求の範囲
[2023年12月1日(01.12.2023) 国際事務局受理]

[請求項 1]

A) プロコラーゲンをコードする核酸構築物を含む植物体または単離された植物細胞を準備する工程；

B) 植物体または単離された植物細胞において、プロコラーゲンを一過性に発現させる工程；

C) 工程 B により細胞外に分泌されたプロコラーゲンまたはコラーゲンを分離する工程；

を含む、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法。

[請求項 2] (補正後)

工程 B の後に、細胞外に分泌されたプロコラーゲンの N 末端または C 末端を切断する工程を含む、請求項 1 に記載の植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法。

[請求項 3]

前記核酸構築物が、天然型のプロコラーゲンに対して 80% 以上のアミノ酸配列同一性を有するプロコラーゲンをコードする核酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項 4]

前記核酸構築物が、プロコラーゲン全長をコードする核酸配列を含み、プロコラーゲンの N 末端が植物細胞内で切断されないような変異を有している、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項 5]

請求項 1 または 2 に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン。

[請求項 6]

請求項 1 に記載の方法において用いられる、プロコラーゲンまたはコラーゲンを発現する核酸構築物。

[請求項 7]

請求項 6 に記載の核酸構築物を含む発現ベクター。

[請求項 8]

請求項 6 に記載の核酸構築物または請求項 7 に記載の発現ベクターを含む植物体または単離された植物細胞。

[請求項 9]

請求項 6 に記載の核酸構築物のコードするプロコラーゲンまたはコラーゲンであって、非天然型アミノ酸配列を有するプロコラーゲンまたはコラーゲン。

[請求項 10]

N末プロ領域に、異種ペプチドが融合されている、請求項9に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲン。

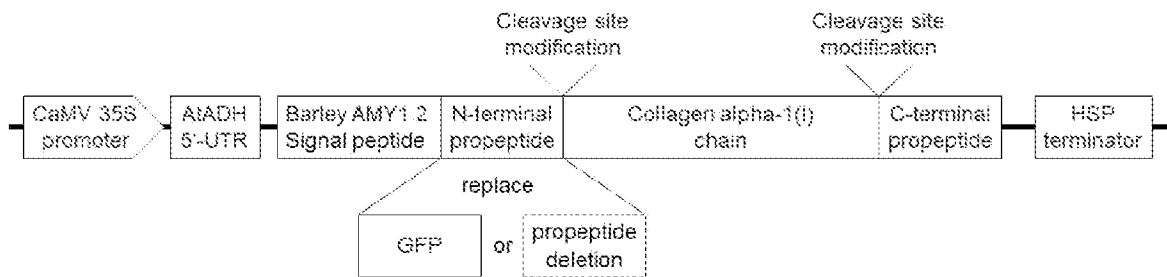
[請求項 11]

請求項1または2に記載の方法により産生された、プロコラーゲンまたはコラーゲン、または請求項9もしくは10に記載のプロコラーゲンまたはコラーゲンを含む、医薬組成物、化粧品組成物、または食品組成物である組成物。

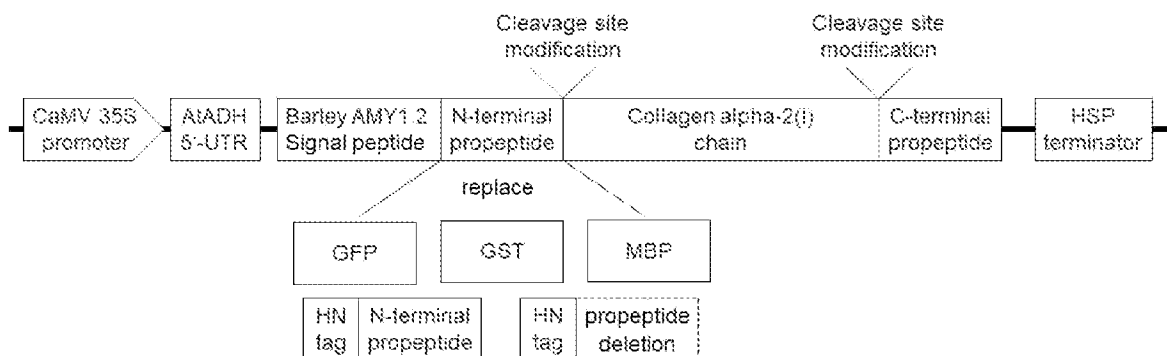
条約第19条(1)に基づく説明書

請求の範囲第2項において、植物体または単離された植物細胞からプロコラーゲンまたはコラーゲンを産生する方法が、請求の範囲第1項に記載されるものである旨特定した。本補正は出願時の明細書の段落[0039]等に記載された事項に基づいて、請求の範囲第2項に係る発明をより明確とするものであり、新たな技術的事項を導入するものではない。

[図1a]

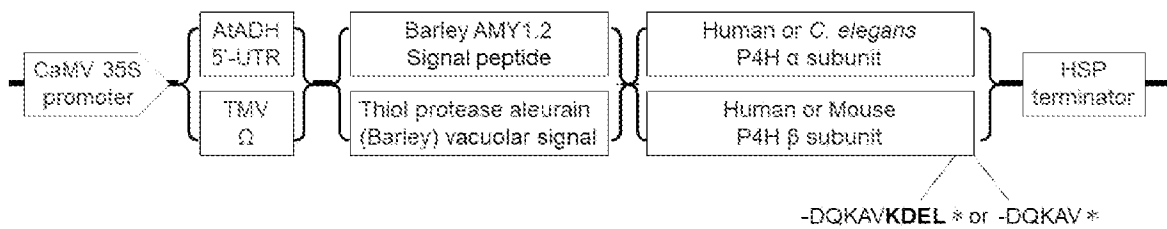
I型コラーゲン α 1発現カセット

[図1b]

I型コラーゲン α 2発現カセット

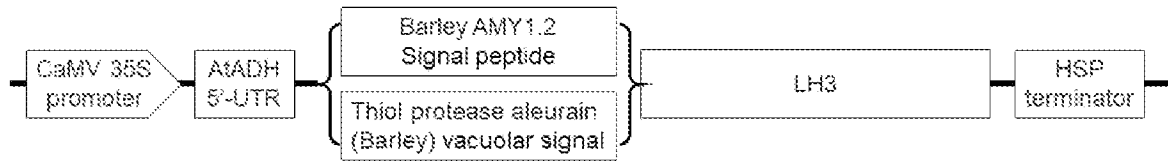
[図1c]

P4H発現カセット



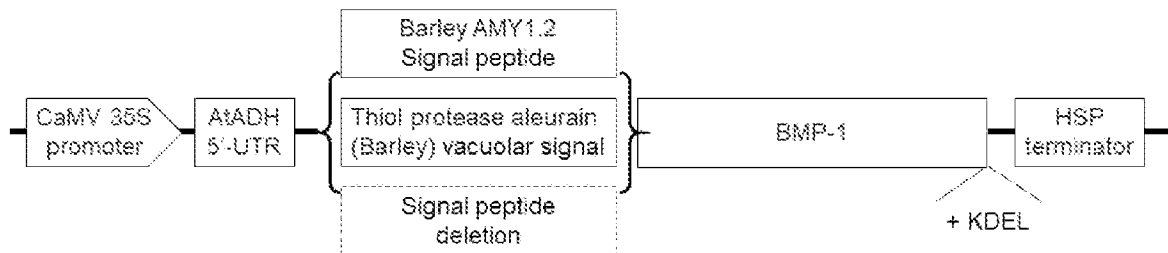
[図1d]

LH3発現カセット



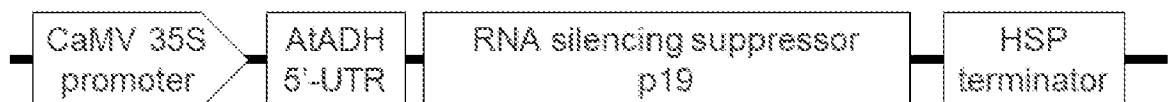
[図1e]

BMP-1発現カセット

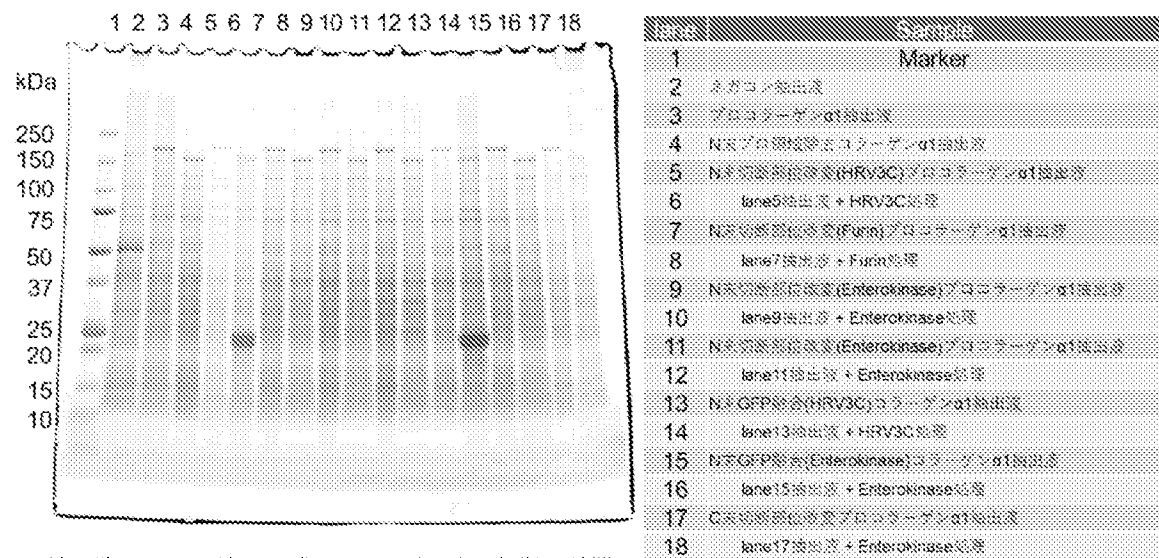


[図1f]

p19発現カセット

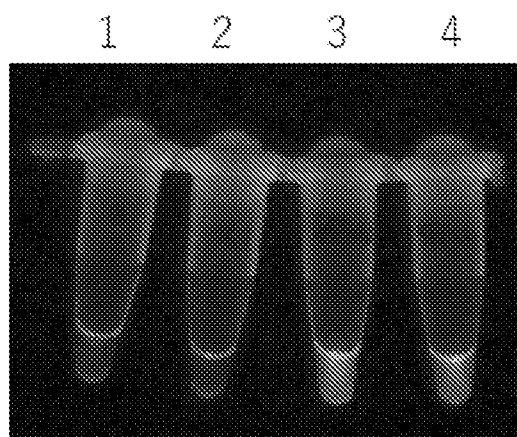


[図2]



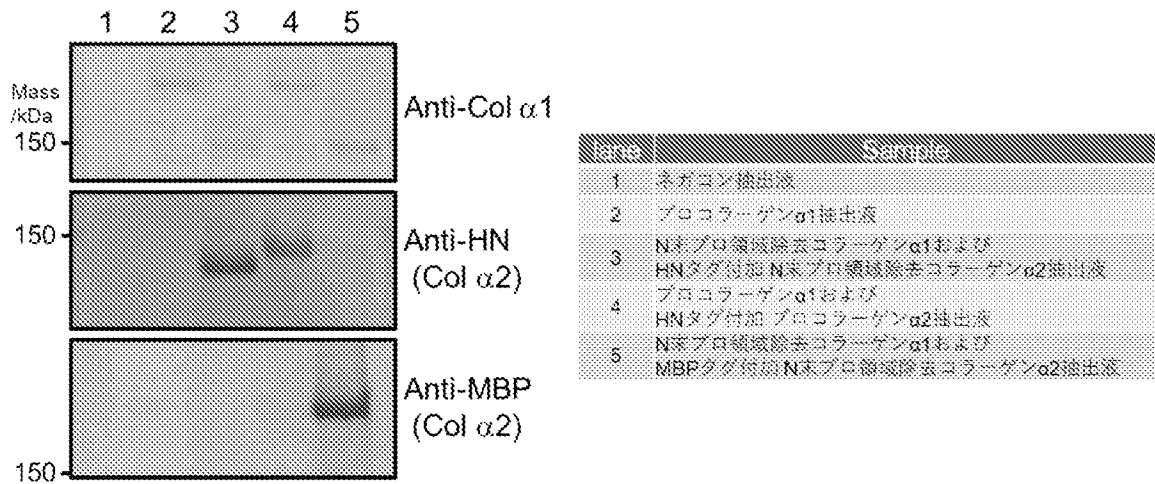
一連の改変コラーゲンのプロテアーゼによる切断を確認
各改変コラーゲンの構造は図1 aを参照

[図3]



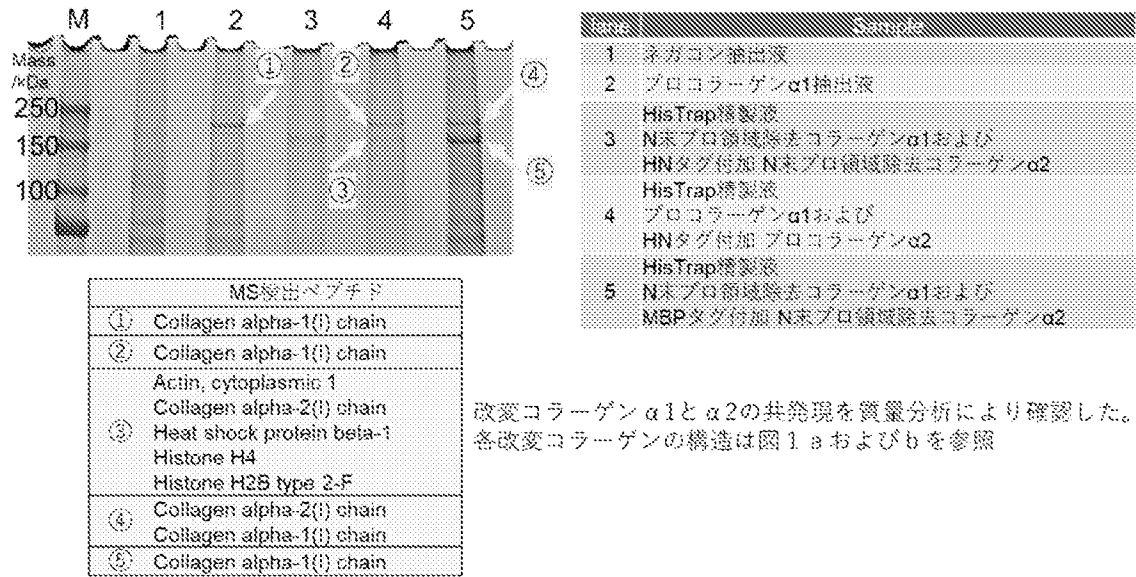
1,2: コラーゲン $\alpha 1$ 抽出液
3,4: GFP融合コラーゲン $\alpha 1$ 抽出液

[図4]



改変コラーゲン α1と α2の共発現をウエスタンブロット法により確認した。
各改変コラーゲンの構造は図1 aおよび bを参照

[図5]



改変コラーゲン α1と α2の共発現を質量分析により確認した。
各改変コラーゲンの構造は図1 aおよび bを参照

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/028120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 15/12*(2006.01)i; *C12N 5/14*(2006.01)i; *C12N 15/82*(2006.01)i; *C12P 21/02*(2006.01)i

FI: C12N15/12 ZNA; C12N15/82 Z; C12N5/14; C12P21/02 C

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)

C12N15/12; C12N5/14; C12N15/82; C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUGGIERO, F. et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants, FEBS Letters, 2000, 469, 132-136 abstract, fig. 1, 2, columns 2.1, 2.2.2, 3.1, p. 132, right column, 1st paragraph	5-11
A		1-4
A	MIURA, Kenji. Efficient transient protein expression in plants, 'Tsukuba system', Regulation of Plant Growth & Development, 2019, 54(1), 77-81 p. 77, paragraph on left column to right column, same page	1-11
X	JP 2020-522357 A (COLLPLANT LTD.) 30 July 2020 (2020-07-30) claims, examples, paragraphs [0172]-[0174], [0176], [0181], [0182], [0193], [0194], [0197]-[0200]	5-11
A		1-4
X	JP 2008-514225 A (COLLPLANT LTD.) 08 May 2008 (2008-05-08) claims, examples, paragraphs [0075]-[0078], [0090], [0115], [0116], [0134]	5-11
A		1-4

☒ 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

08 September 2023

Date of mailing of the international search report

26 September 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/028120**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEIN, Hanan et al. Production of Bioactive, Post-Translationally Modified, Heterotrimeric, Human Recombinant Type-I Collagen in Transgenic Tobacco, Biomacromolecules, 2009, 10, 2640-2645	5-11
A	abstract, experimental section, fig. 1, 2	1-4
A	US 2005/0192428 A1 (BERG, Richard A.) 01 September 2005 (2005-09-01) claims, examples	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/028120

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“Annex C/ST.25 text file format” should be read as ‘ST.26 format’

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/028120

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-522357	A	30 July 2020	US 2020/0179562 A1 claims, examples, paragraphs [0204]-[0206], [0208], [0213], [0214], [0225], [0226], [023]- [0233]	
JP	2008-514225	A	08 May 2008	US 2007/0186312 A1 claims, examples, paragraphs [0086]-[0089], [0101], [0126], [0127], [0145] KR 10-2007-0083870 A CN 101065491 A	
US	2005/0192428	A1	01 September 2005	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/12(2006.01)i; C12N 5/14(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: C12N15/12 ZNA; C12N15/82 Z; C12N5/14; C12P21/02 C										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/12; C12N5/14; C12N15/82; C12P21/02										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの										
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	RUGGIERO F. et al., Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants, FEBS Letters, 2000, 469, 132-136 要約、図1、2、2. 1の欄、2. 2. 2の欄、3. 1の欄、132ページ右欄 第1段落	5-11								
A		1-4								
A	MIURA Kenji, Efficient transient protein expression in plants, 'Tsukuba system', Regulation of Plant Growth & Development, 2019, 54(1), 77-81 77ページ左欄－同右欄にかけての段落	1-11								
X	JP 2020-522357 A (コルプラント リミテッド) 30.07.2020 (2020 - 07 - 30) 特許請求の範囲、実施例、[0172] - [0174]、[0176]、[0181]、[0182]、[0193]、[0194]、[0197] - [0200]	5-11								
A		1-4								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 </td> <td> “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 08.09.2023		国際調査報告の発送日 26.09.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 北田 祐介 4B 4868 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2008-514225 A (コルプラント リミテッド) 08.05.2008 (2008 - 05 - 08) 特許請求の範囲、実施例、[0075] - [0078]、[0090]、[0115]、[0116]、[0134]	5-11 1-4
X A	STEIN Hanan et al., Production of Bioactive, Post-Translationally Modified, Heterotrimeric, Human Recombinant Type-I Collagen in Transgenic Tobacco, Biomacromolecules, 2009, 10, 2640-2645 要約、Experimental Section、図1、2	5-11 1-4
A	US 2005/0192428 A1 (BERG Richard A.) 01.09.2005 (2005 - 09 - 01) 請求の範囲、実施例	1-11

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/028120

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2020-522357	A	30.07.2020	US 2020/0179562 A1 請求の範囲、実施例、[0204] - [0206]、 [0208]、[0213]、[0214]、[0225]、[0226]、 [0230] - [0233]	
JP	2008-514225	A	08.05.2008	US 2007/0186312 A1 請求の範囲、実施例、[0086] - [0089]、 [0101]、[0126]、[0127]、[0145] KR 10-2007-0083870 A CN 101065491 A	
US	2005/0192428	A1	01.09.2005	(ファミリーなし)	