

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-97550
(P2019-97550A)

(43) 公開日 令和1年6月24日(2019.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/16 (2006.01)	C12N 15/16	ZNA 4H045
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26	
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	F

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2018-76205 (P2018-76205)	(71) 出願人 518126616 財団法人慶北海洋バイオ産業研究院 大韓民国慶尚北道蔚珍郡竹邊面海洋科学ギ ル22
(22) 出願日 平成30年4月11日(2018.4.11)	
(31) 優先権主張番号 10-2017-0165451	(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日 平成29年12月4日(2017.12.4)	(72) 発明者 ホン ソン ミ 大韓民国慶尚北道蔚珍郡北面徳邱温泉路2 8-1102号
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)	(72) 発明者 チェ ジ ヒョン 大韓民国大田市大徳区鶏足路690番ギル 21-110棟202号
特許法第30条第2項適用申請有り 平成29(2017)年10月11日 2017KSBB (韓国生物工学会) 秋季大会及び国際シンポジウムにてポスター・口頭発表	(72) 発明者 ジョ ソン ジョン 大韓民国京畿道城南市中院区慈恵路48

最終頁に続く

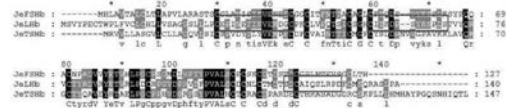
(54) 【発明の名称】 ウナギの黄体形成ホルモンに特異的な抗体およびその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ウナギ性成熟度を測定することができる抗体及び性成熟を探知する方法の提供。

【解決手段】特定の配列からなる3種のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上を含むウナギ(Anguilla japonica)の黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone、LH)探知用ペプチドマーカを抗原として製造され、ウナギのLHを特異的に結合するポリクローナル抗体およびこれを用いたLHを特異的に探知する方法。

【選択図】図8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 3 のアミノ酸配列からなる群より選択された 1 種以上を含むウナギ (*Anguilla japonica*) の黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone、LH) 探知用ペプチドマーカを抗原として使用して製造され、ウナギの LH と特異的に結合する抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、ウナギの濾胞刺激ホルモン (Follicle-stimulating hormone; FSH)、甲状腺刺激ホルモン (Thyroid Stimulating hormone; TSH)、および性腺刺激ホルモン (gonadotropin、GTH) には結合せず、ウナギの LH に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3】

前記抗体は、ポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗原は、キャリア蛋白質を追加的に含むことを特徴とする、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記キャリア蛋白質は、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)、BSA (Bovine Serum Albumin)、OVA (Ovalbumin)、Tg (thyroglobulin)、TT (tetanus toxoid)、ジフテリアトキソイド (diphtheria toxoid、Td)、および PPD (tuberculin purified protein) からなる群より選択された 1 種以上である、請求項 4 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項の抗体を含む、生物学的試料内ウナギ (*Anguilla japonica*) の黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone、LH) の特異的探知用組成物。

【請求項 7】

前記生物学的試料は、ウナギの TSH、FSH および GTH からなる群より選択された 1 種以上をさらに含む、請求項 6 に記載の組成物。

30

【請求項 8】

請求項 1 から 5 のいずれか一項の抗体を生物学的試料と接触させる工程、および前記試料内で抗原 - 抗体複合体の形成有無を探知する工程を含む、

生物学的試料内ウナギ (*Anguilla japonica*) の黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone、LH) を特異的に探知する方法。

【請求項 9】

前記抗原 - 抗体複合体の形成有無を探知する工程は、酵素免疫吸着法 (ELISA)、放射能免疫分析法 (RIA)、免疫蛍光法 (IFA)、ウェスタンブロッティング (WB) およびフローサイトメトリー分析法 (FCA) のうちの少なくとも一つの方法によって行う、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 3 のアミノ酸配列からなる群より選択された 1 種以上のペプチド、または

配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、および配列番号 3 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列からなる群より選択された 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、

ウナギ (*Anguilla japonica*) の黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone、LH) 探知用マーカ。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウナギの黄体形成ホルモンを特異的に認識する抗体およびこれを用いた黄体形成ホルモンを特異的に検出する方法、並びに検出用キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

魚類の養殖において、魚類種苗 (fish seeding) の安定的な生産、供給と純血種 (bloodstock) の性成熟調節と評価は重要である。ウナギを含む一部魚種は不適切な養殖環境では性成熟 (gonadal maturation)、排卵 (ovulation)、精子遊離 (spermiation) などが発生しないので、養殖魚類の生殖活性を人工的に調節するためには光周期 (photoperiod)、水温 (water temperature)、ホルモン処理 (hormone treatment) のような環境要素を複合的でありながらも細心に調節する必要がある。

10

【0003】

ウナギ (Japanese eel) は、脊索動物門、硬骨魚類綱、ウナギ目、ウナギ科に属し、海と淡水習性を有する複雑な生活史を有する降河性魚類 (catadromous fish) である。ウナギは稚魚の時、海から河に移動し、移動する間に黄色 (yellow) から銀色 (silver) ウナギへと形態的、生理的な変化を経て、河で6~20年間成長し、成長が終わったウナギは性成熟過程を経た後、海に再び移住し、移住する間に配偶子形成 (gametogenesis) を完全になす。ウナギは極東産ウナギ、ニホンウナギ (Japanese eel, *Anguilla japonica*) と呼ばれ、日本と中国に広く生息している。ウナギは北方限界線として北海道、渤海湾沿岸 (the gulf of Pohai) と遼河 (Liao river) まで分布生息しており、南方限界線として中国の海南島 (Hainan island) と中国とベトナムの間にあるトンキン湾 (the gulf of Tonkin) まで生息し、その他にも台湾、フィリピン、ヨーロッパなどに生息する。ウナギ成体は主に甲殻類、魚類、昆虫類を捕食し、回遊様相によって川ウナギ (river eels)、河口ウナギ (estuarine eels)、海ウナギ (sea eels) に大きく3部類に分けられる。

20

【0004】

ウナギを人工飼育する場合、性的に未熟な状態で産卵を行う場合が多い。未だに自然系の未成熟なウナギの産卵行動が十分に研究されておらず、繁殖生理学分野でウナギの繁殖産卵行動に関しては知られていることが多くない。現在までの研究結果によれば、自然状態の雌ウナギは10月~12月に性成熟を始めるが、卵母細胞は卵黄形成初期までのみならず、雄の場合は精子形成が開始されないまま河下流に移動して産卵場所に移住すると推測され、未成熟状態の養殖ウナギを海水養殖する場合、天然雌ウナギのような卵黄形成初期に至ると知られている (Kagawa H., Iinuma N., Tanaka H., Ohta H., and Okuzawa K., 1998. Effect of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish Sci., 64 77-82.)。

30

40

【0005】

従来はウナギ飼育において天然または養殖雌ウナギの性成熟を進行させることが非常に難しかった。最近になってサケ脳下垂体抽出物 (salmon pituitary extract, SPE) で性成熟誘導を成功した事例が報告されたことがあるが、まだその成功頻度が低く、サケ脳下垂体抽出物、組換え蛋白質などを反復投与する場合、他の性成熟誘導ホルモンとの拮抗作用 (antagonism)、上昇作用 (synergism) または速い活性喪失などによって卵母細胞と排卵された卵子内の染色体異常を誘発することがあり、卵質に影響を与えて受精率 (fertility) が低くなり、奇形魚発生率が高くなる危険がある。また、サケ脳下垂体抽出物と組換え蛋白質の需給が難しいた

50

め、人工養殖場でウナギ種苗生産が依然として難しいという問題点がある。

【0006】

一方、現在まで人工種苗養殖においてホルモンの反復投与または環境調節などで行われる性成熟度を判定する基準は大部分肉眼に依存してきたところ、人ごとに差があるため正確度が非常に落ちた。したがって、ウナギの性成熟程度に直接的な影響を及ぼす各ホルモンのマーカ (marker) または基準因子 (standard factor) 開発が要求されているのが実情である。

【0007】

一般的な脊椎動物の性成熟度を判断できる糖蛋白質ホルモン (Glycoprotein hormones; GPH) には甲状腺刺激ホルモン (Thyroid-stimulating hormone; thyrotropin; TSH)、濾胞刺激ホルモン (Follicle-stimulating hormone; follicitropin; FSH)、黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone; lutropin; LH)、絨毛性性腺刺激ホルモン (chorionic gonadotropin; CG) などがある。前記ホルモンは共通的に二つの互いに異なるサブユニット (subunit) アルファ (-) とベータ (-) から構成され、同一種 (species) は同一のアルファサブユニットアミノ酸配列を有しているが、ベータサブユニットは各種別およびホルモン別に特異的なアミノ酸配列を有している。よって、ベータサブユニットは各ホルモンの特異的な活性および種特異性 (species specificity) を示す。したがって、全ての脊椎動物の各種 (species) において互いに異なる性ホルモンのベータサブユニットをコードするために少なくとも3つの遺伝子 (FSH、LH、TSH) が存在する。アルファとベータサブユニットは互いに異なる遺伝子によって蛋白質で形成され、生物学的活性を有するホルモン分子を形成するために前記アルファサブユニットとベータサブユニットは非共有結合 (non-covalent bonding) によって連結される。

10

20

【0008】

従って、本発明は前記問題点を解決し、ウナギの性成熟度を正確に測定するために、性成熟度に直接的な影響を及ぼす黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) 特異的なペプチドマーカ (marker)、およびこれに結合するポリクローナル抗体を開発し、前記抗体はウナギの JeLH- と結合することによって他の性ホルモンと異なり JeLH のみに特異的に結合して、ウナギ生物学的試料内の JeLH を特異的に探知可能であり、これを用いてウナギの性成熟度を測定することができる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】韓国登録特許第10-15311286号公報

【特許文献2】韓国登録特許第10-1493957号公報

【特許文献3】韓国登録特許第10-0742115号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0010】

本発明は前述の従来技術の問題点を解決するために提案されたものであって、ウナギの性成熟の変化を探知するために、ウナギの黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone, LH) を特異的に探知することができる抗体を提供する。

【0011】

本発明の一例は、配列番号1、配列番号2、および配列番号3のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上を含むLH探知用ペプチドマーカを抗原として使用して製造され、ウナギのLHと特異的に結合する抗体を提供する。

また、本発明は、前記抗体を含む、生物学的試料内ウナギLHホルモンの特異的探知用組成物を提供し、また、本発明は、前記抗体を生物学的試料と接触させて、抗原-抗体複

50

合体形成を探知する工程を含む、生物学的試料内ウナギLHホルモンを特異的に探知する方法を提供する。

【0012】

また、本発明の一例は、配列番号1、配列番号2、および配列番号3のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上のペプチド、または配列番号1のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、および配列番号3のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列からなる群より選択された1種以上のポリヌクレオチドを含む、ウナギのLH探知用マーカを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、ウナギの類似ホルモンは除いてウナギの黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone、LH)のみを特異的に認識、判別することができるマーカ抗原およびこれと結合する抗体に関するものであって、前記抗体を用いてウナギの性成熟度を測定することができ、ウナギ完全養殖の実現に役立つ。

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

【0014】

本発明は、下記表1の配列番号1(EPINETNSVEKDGC)、配列番号2(CITKDPSYKGPLS)、および配列番号3(SDCAIQSLRPD)のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上を含むウナギ(Anguilla japonica)のLH探知用ペプチドマーカを抗原として使用して製造され、ウナギのLHと特異的に結合する抗体を提供する。

【0015】

10

20

【表 1】

区分	配列	配列番号
JeLH β N' 31-44 番目 アミノ酸配列	EPINETNSVEKDGC	1
JeLH β N' 59-71 番目 アミノ酸配列	CITKDPSYKGPLS	2
JeLH β N' 119-129 番目 アミノ酸配列	SDCAIQSLRPD	3
JeLH- β /mGTH- α キメラ抗原 アミノ酸配列	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPDFCMSQRASLPA SSSSKDPGGSLPDGDFIIQ GCPECKLKENKYFSKLGAPI YQCMGCCFSRAYPTPARSKK TMLVPKNITSEATCCVAKAF TKATVMGNARVENHTECHCS TCYYHKS	4
JeLH- β /mGTH- α キメラ抗原 塩基配列	ATGTCAGTCTACCCAGAATGCACCTGGCCCTCTTTGTATGCTTGTGTACCTCCT TGTTTCTGCTGGAGGCTCTTTACTGCTGCCTTGTGAACCAATCAATGAAACTATTT CTGTGGAGAAAGATGGATGTCCAAAATGTCTGGTGTCCAAACATCCATCTGCAGT GGTCACTGCATCACCAAGGACCCAAGCTACAAGAGCCCGCTGTCCACGGTGTACCA GCGCGTGTGCACGTACCGGGACGTCCGCTACGAGACGGTGC GGCTGCCAGACTGCC GCCCCGGCGTGGATCCCCATGTGACTTTCCCGTGGCTCTGAGCTGCGACTGTAAC CTGTGCACCATGGACACGTCTGACTGCGCCATCCAGAGTCTGAGGCCGACTTCTG CATGAGCCAGCGGGCCAGCCTCCCCGCGTCTCTTCTCTAAGGATCCAggtggtg gttcaCTTCTGATGGAGACTTTATTATTCAGGGTTGCCAGAATGTAACTAAAG GAAAATAAATACTTCTCCAAGCTAGGAGCCCCATCTACCAGTGTATGGGCTGTTG CTTCTCCAGGGCATATCCCACTCCCGCCAGGTCCAAGAAGACAATGCTGGTTCCAA AGAATATTACCTCGGAGGCCACATGCTGTGTGGCCAAAGCATTACTAAGGCCACA GTAATGGGAAATGCCAGAGTGGAGAATCATACGGAGTGCCACTGTAGCACTTGCTA CTACCACAAGTCG	5
JeLH β Full アミノ酸配列	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPDFCMSQRASLPA	6
JeLH- β 分泌信号配列 N' 1-24 番目 アミノ酸配列	MSVYPECTWPLFVCLCHLLVSAG	7
JeLH- β 親水性部分 1	SAGGSLLLPC EPINETNSVE KDGCPKCLVF	8
JeLH- β 親水性部分 2	QTSICSGHCI TKDPSYKGPL STVYQRVCTY	9
JeLH- β 親水性部分 3	CNLCTMDTSD CAIQSLRPDF CMSQRASLPA	10

10

20

30

40

前記“ウナギLH探知用ペプチドマーカ”とは、ウナギの他の性成熟ホルモン(FSH、TSH、GTH、CGなど)および他魚種由来の性成熟ホルモンから、ウナギのLHのみを特異的に探知することができるマーカを意味する。

【0017】

前記“ペプチドマーカを抗原として使用して製造され、ウナギのLHを特異的に認識する抗体”とは、甲状腺刺激ホルモン(Thyroid-stimulating hormone; thyrotropin; TSH)、濾胞刺激ホルモン(Follicle-stimulating hormone、FSH)、性腺刺激ホルモン(gonadotropin、GTH)には結合せず、ウナギのLHに特異的に結合する抗体であってもよい。

10

【0018】

本発明の一例によれば、前記ウナギLH探知用ペプチドマーカ抗原はキャリア蛋白質を追加的に含んでもよく、前記キャリア蛋白質はKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)、BSA(Bovine Serum Albumin)、OVA(Ovalbumin)、Tg(thyroglobulin)、TT(tetanus toxoid)、ジフテリアトキソイド(diphtheria toxoid、Td)、およびPPD(tuberculin purified protein)などからなる群より選択された1種以上であってもよく、例えばマーカのN-末端にシステイン(Cys)を導入し、システインの-SH官能基とN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリニル)マレイミドを結合させ、キャリア蛋白質を結合させて製作した架橋ペプチドを免疫感作(immune sensitizing)に用いることも可能である。

20

【0019】

本発明の前記“抗体”とは、当該分野で公知された用語であって抗原性部位に対して指示される特異的な蛋白質分子を意味する。本発明の目的上、抗体は本発明の配列番号1(EPINETSVEKDG C)、配列番号2(CITKDPSYKGPLS)、および配列番号3(SDCAIQSLRPD)のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上を含むウナギ(Anguilla japonica)のLH探知用ペプチドマーカに特異的に結合する抗体を意味し、好ましくは配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドマーカ(以下、第1マーカ)、配列番号2のアミノ酸配列からなるペプチドマーカ(以下、第2マーカ)、および配列番号3のアミノ酸配列からなるペプチドマーカ(以下、第3マーカ)の三つのマーカ全部に特異的に結合する抗体であってもよい。

30

【0020】

本発明の抗体の形態は特に制限されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または抗原結合性を有するものであればその一部も本発明の抗体に含まれ、全ての免疫グロブリン(Immunoglobulin、Ig)抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体にはヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。前記免疫グロブリン抗体はIgG、IgM、IgA、IgD、IgEのクラスの中の最も普遍的な抗体であり、大部分血液や体液の全体Igの75%を占めるIgGであるのが好ましい。また、本発明の抗体の由来は特に制限しないが、マウス、ラット、ウサギ、鶏、昆虫細胞などを用いることができ、製作の便宜、大量生産を考慮してウサギ由来ポリクローナル抗体であるのが好ましい。

40

【0021】

また、本発明で抗体は、前記LH-アミノ酸配列の一部の第1マーカ、第2マーカ、および第3マーカからなる群より選択されるいずれか一つ以上のマーカ全部に特異的に結合する抗体、抗原結合断片またはアプタマーであってもよい。好ましくは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、さらに好ましくは体液の中で複雑且つ微細なホルモンの変化を感作することができ、正確にJeLHのみを検出することができるポリクローナル抗体であるのが好ましい。

【0022】

本発明の一例は前記抗体を含む、生物学的試料内ウナギJeLHホルモン特異的探知用組成物を提供する。

50

【0023】

前記生物学的試料はウナギTSH、FSHおよびGTHからなる群より選択された1種以上を含むことができ、本発明の抗体を含む、生物学的試料内ウナギLHホルモン探知用組成物は、生物学的試料に含まれているウナギTSH、FSHまたはGTHとは結合せず、LHに特異的に結合する。生物学的試料にLHが含まれていない場合、結合反応が起こらないことがある。

【0024】

本発明の抗体の特徴は前述のとおりであり、前記抗体を含むウナギのLHホルモン探知用組成物の活用形態を特に限定しないが、キットの形態に実現されて提供されてもよい。

【0025】

本発明のキットは、JeLHホルモンを検出するためのものであって、抗体の免疫学的検出のために基質、適当な緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体、発色基質などを含んでもよい。前記基質はニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂で合成された96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂で合成された96ウェルプレートおよびガラスからなるスライドガラスなどが用いられてもよく、発色酵素はペルオキシダーゼ(peroxidase)、アルカリホスファターゼ(Alkaline Phosphatase)が用いられてもよく、蛍光物質はFITC、RITCなどが用いられてもよく、発色基質液はABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))またはOPD(o-フェニレンジアミン)、TMB(テトラメチルベンジジン)が用いられてもよい。

【0026】

本発明の一例は、前記抗体を生物学的試料と接触させ、前記試料内で抗原-抗体複合体の形成有無を探知する工程を含む、生物学的試料内ウナギJeLHホルモンを特異的に探知する方法を提供する。

【0027】

前記生物学的試料の特徴は前述のとおりであり、前記抗原-抗体複合体の形成は酵素免疫吸着法(enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA)、例えば、直接ELISA(Direct ELISA)、間接ELISA(indirect ELISA)、競合ELISA(competitive ELISA)、サンドウィッチELISA(sandwich ELISA)、放射能免疫分析法(Radioimmunoassay、RIA)、免疫蛍光法(Immuno-fluorescent Antibody test、IFA)、ウェスタンブロッティングおよびフローサイトメトリー分析法のうち少なくとも一つ以上の方法で検出することができ、検出方法をこれに制限するのではない。前記分析方法を通じて、LHホルモン蛋白質とこれに対する抗体の間の“抗原-抗体複合体”形成有無を判断して、試料内LHの存在有無と含量を測定することができる。

【0028】

本願で“抗原-抗体複合体”とはJeLHホルモン蛋白質とこれに特異的な抗体の結合物を意味し、抗原-抗体複合体の形成有無は検出ラベル(detection label)のシグナルを通じて測定可能である。このような検出ラベルは酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子(microparticle)、レドックス(redox)分子および放射線同位元素からなる群より選択することができ、必ずしもこれに制限されるのではない。

【0029】

一具体例として、JeLHホルモン蛋白質とこれに対する抗体の間の抗原-抗体複合体測定は、酵素免疫吸着法(ELISA法)を用いることができる。また、JeLHホルモン蛋白質に対する一つ以上の抗体が基板上の定められた位置に配列され、高密度で固定化されている蛋白質チップを用いることもできる。

【0030】

また、本発明は前記ウナギJeLH特異的な抗体を生物学的試料と接触させ、前記試料

10

20

30

40

50

内で抗原 - 抗体複合体の形成有無を探知してウナギの性成熟度を測定する工程を含む、ウナギの性成熟度測定方法を提供する。

【0031】

現在までウナギの性ホルモンを高い正確度で探知する抗体が開発されていなくてウナギの性成熟機序、ホルモンの作用機序が十分に明らかになっておらず、明確なウナギの性成熟度測定方法が開発されていない状態である。本願発明はウナギの複雑な性ホルモンの生理変化を性ホルモン中のLHを高い正確度で探知して予測可能であり、ウナギの生理変化を明らかにすることができる端緒を提供し、ウナギの性成熟度を簡単に高い効率で測定できる方法を提供することができる。

【0032】

ウナギの成体の性成熟度を判断する既存の方法の一つとして、成体ウナギの血液を採血して血清を分離した後、テストステロンが存在すれば雄、エストロゲン2が存在すれば雌と判断する方法があるが、この方法ではウナギの雄雌区分のみ可能であり、ウナギが性成熟度のどの位置にあるかまでは明確に判断しにくい。

【0033】

また他の方法として、ウナギ稚魚を飼育して4～6週後にウナギの急激な体重増加が起こるかどうかによってウナギの性成熟度を確認する方法があるが、これは正確度が非常に落ちる方法であり、雌の卵母細胞を一部摘出して1次減数分裂によって卵核胞の核膜消失を確認するか、生殖腺重量指数を測定する方法があるが、これは測定方法が複雑であり、費用と時間が多くかかるという短所がある。

【0034】

本発明の前記抗体を用いて生物学的試料内の抗原 - 抗体複合体の形成有無を探知してウナギの性成熟度を測定する方法は、ウナギの既存の方法より遥かに簡単であり、検体内J e L Hの存在を特異的に探知し、定量的に分析可能であって、より正確にウナギの性ホルモン生理変化、それによる性成熟程度を判断可能である。

【0035】

本発明の一例は、配列番号1、配列番号2、および配列番号3のアミノ酸配列からなる群より選択された1種以上のペプチド、または配列番号1のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、および配列番号3のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列からなる群より選択された1種以上のポリヌクレオチドを含む、ウナギのJ e L H探知用マーカを提供する。

【0036】

前記配列番号1のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ（以下、第1マーカ）または配列番号2のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ（以下、第2マーカ）または配列番号3のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ（以下、第3マーカ）はJ e L H - サブユニット（配列番号6）の一部であり、下記の実施例1で確認したように、前記三つのマーカはLHの遺伝子配列とウナギの他のホルモン（J e F S H、J e T S Hなど）との類似性を考慮してLHベータで膜蛋白質（transmembrane）サイトがないのを確認し、シグナルペプチド部位除外、N - グリコシル化（N - glycosylation）修飾位置を除外、疎水性（hydrophobic）部分を除いて親水性（hydrophilic）部分を選択すると同時に、ウナギの性成熟ホルモン配列の相同性（homology）を比較して最も有力な候補ペプチドを選抜したものである。本発明のペプチドマーカ抗原は、第1マーカ、第2マーカおよび第3マーカからなる群より選択された1種以上を含んでもよいが、好ましくは第1マーカ、第2マーカ、および第3マーカを全て含むことが適切である。

【0037】

現在、ウナギの性成熟ホルモンを免疫学的に分析するための努力が諸所で起こっており、ウナギ体内の病原菌による内分泌系変化、一般的生理状態のウナギ血液内に含まれている性成熟ホルモンの濃度を測定するためのシステムを構築する試みが起こっている。以前に知られたJ e L H - / m G T H - （mouse gonadotropic ho

10

20

30

40

50

r m o n e) キメラ抗原に対するポリクローナル抗体は、J e L H だけでなくその他の性成熟ホルモン (J e F S H、J e T S H、G T H など) とともに抗原 - 抗体結合反応を起こすため J e L H のみを特異的に検出するための抗体として使用するには不適切であった。

【 0 0 3 8 】

これとは異なり、本発明の第 1 マーカ、第 2 マーカおよび第 3 マーカからなる群より選択された 1 種以上を含むペプチドマーカはウナギの J e L H のみを特異的に検出ことができ、前記ペプチドマーカを抗原として使用して製造された抗体は他のウナギ性成熟ホルモンとは結合せず、ただ J e L H のみに特異的に抗原 - 抗体反応が起こるので、J e L H 特異検出抗体として使用するのに適切である。

10

【 0 0 3 9 】

また、本発明は、前記 J e L H 探知用ペプチドマーカ (第 1 マーカ、第 2 マーカ、第 3 マーカ) および / または前記マーカをコードするポリヌクレオチドを検出できる製剤を含む J e L H 検出用組成物およびキットを提供し、ウナギの性成熟度を判断するために、ウナギの生物学的試料から配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のアミノ酸配列からなる群より選択された 1 種以上のペプチド、または配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、および配列番号 3 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列からなる群より選択された 1 種以上のポリヌクレオチドまたは J e L H 蛋白質を検出する方法を提供する。

20

【 0 0 4 0 】

また、本発明は、前記配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 3 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列からなる群より選択された 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、ウナギの J e L H 探知用マーカを提供することができ、好ましくは、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列、および配列番号 3 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を全て含む J e L H 探知用マーカを提供することができる。

【 0 0 4 1 】

前記 “ ポリヌクレオチドを検出できる製剤 ” は、生物学的試料内で L H をコードするポリヌクレオチドを検出するために用いることができる物質を意味する。具体的な一例として、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する第 1 マーカまたは配列番号 2 のアミノ酸配列を有する第 2 マーカまたは配列番号 3 のアミノ酸配列を有する第 3 マーカをコードするポリヌクレオチドに相補的なプライマー (p r i m e r)、プローブ (p r o b e)、アンチセンス核酸 (a n t i s e n s e o l i g o n u c l e o t i d s) などであってもよい。

30

【 0 0 4 2 】

この時、相補的に結合するということは、所定の混成化またはアニーリング (a n n e a l i n g) 条件、好ましくは生理学的条件下でアンチセンス核酸がターゲットに選択的に混成化できる程度に十分に相補的 (s u b s t a n t i a l l y c o m p l e m e n t a r y) および完全に相補的 (p e r f e c t l y c o m p l e m e n t a r y) なことを全て含む意味を有し、好ましくは完全に相補的なことを意味する。

40

【 0 0 4 3 】

本発明で “ 蛋白質を検出できる製剤 ” は、試料内で L H 蛋白質を検出するために用いることができる物質を意味する。好ましくは、前記 L H 蛋白質をターゲット (t a r g e t) とする特定化合物または合成物質であってもよい。具体的な一例として、前記 L H - アミノ酸配列の一部の第 1 マーカまたは第 2 マーカまたは第 3 マーカまたはこの三つのマーカ全部に特異的な抗体、抗原結合断片またはアプタマーであってもよい。好ましくはモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、さらに好ましくは体液の中で複雑且つ微細なホルモンの変化を感作することができ、正確に L H のみを検出することができるポリクローナル抗体であってもよい。

50

【発明の効果】

【0044】

本発明は、ウナギの黄体形成ホルモン（LH）に特異的に結合する抗体を生物学的試料と接触させ、抗原-抗体複合体が形成されるかを探知して、当該試料内にウナギ黄体形成ホルモンの存在有無を容易に検出することができ、複合体形成程度によってウナギ黄体形成ホルモンを定量的に分析可能であり、ウナギの性成熟程度を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットのトランスメンブレン領域を分析した結果である。

10

【図2】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットの信号配列（signal peptides、成熟蛋白質後に脱落する部分）部分分析結果を示したものである。

【図3】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットの糖鎖修飾（N-glycosylation）部分分析結果を示したものである。

【図4】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットの疎水性分析（hydropathy analysis）後、一番目に予測された親水性（Hydrophilic）配列部分を示したものである。

【図5】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットの疎水性分析（hydropathy analysis）後、二番目に予測された親水性（Hydrophilic）配列部分を示したものである。

20

【図6】実施例1-1によって、ウナギJ e L H - サブユニットの疎水性分析（hydropathy analysis）後、三番目に予測された親水性（Hydrophilic）配列部分を示したものである。

【図7】（A）実施例2のウナギJ e L H - サブユニットに対するポリクローナル抗体、（B）比較例1のウナギJ e L H - サブユニットとマウスのG T H - サブユニットがキメラポリクローナル抗体の抗体生産の全過程の模式図を示す。

【図8】実施例1-2によって、ウナギJ e F S H、J e L H、J e T S Hのサブユニットのアミノ酸配列の相同性を比較したものであって、黒い部分は三種類のホルモンの全てに共通的に存在する配列であり、灰色部分は三種類のホルモンのうちの二種類のホルモンの共通的に存在する配列であり、赤いボックスで表示した部分はウナギJ e L H - アミノ酸配列の中の抗体を生産するために使用した部分を表示したものである。

30

【図9】比較例1によって、ウナギJ e L H - サブユニットのアミノ酸配列とマウスのG T H - アミノ酸配列が連結されたキメラLH抗原をSDS電気泳動で確認したものである。

【図10】実施例2によって、J e L H - のN-末端から31-44番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号1）、ウナギのJ e L H - のN-末端から59-71番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号2）、およびウナギのJ e L H - のN-末端から119-129番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号3）の混合物をウサギに免疫した後に血液を採取して抗体価をELISAを用いて分析したものであって、二回反復した結果を示す。

40

【図11】比較例1によって、ウナギJ e L H - サブユニットとマウスのG T H - サブユニットを組換えしたキメラJ e L H抗原をウサギに免疫した後に血液を採取して抗体価をELISAを用いて分析したものであって、二回反復実験の結果を示したものである。

【図12】実施例2によって、J e L H - のN-末端から31-44番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号1）、ウナギのJ e L H - のN-末端から59-71番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号2）、およびウナギのJ e L H - のN-末端から119-129番目のアミノ酸から構成されたペプチド抗原（配列番号3）の混合物をウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体の中のI g Gを精製し

50

た後、SDS電気泳動した結果を示す。

【図13】比較例1によって、ウナギJeLH - サブユニットとマウスのGTH - サブユニットを組換えしたキメラLH抗原をウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体の中のIgGを精製した後、SDS電気泳動した結果を示す。

【図14】実験例1-1によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLH、JeGTH、JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEしてCBB染色した結果である。

【図15】実験例1-2によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLH、JeGTH、JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEした後、ニトロセルロースメンブレンに移して、His抗体でウェスタンブロッティングした結果である。

【図16】実験例1-3によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLH、JeGTH、JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEした後、ニトロセルロースメンブレンに移した後、比較例1でJeLH - サブユニットとマウスのGTH - サブユニットのキメラ抗原に対するポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングした結果である。

【図17】実験例1-4によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLH、JeGTH、JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEした後、ニトロセルロースメンブレンに移して実施例2で製造したウナギJeLH - ペプチドに対するポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングした結果である。

【図18】実験例2によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLHを対象にしてSDS-PAGEしてニトロセルロースメンブレンに移した後、1:5, 000, 1:10, 000, 1:20, 000の比率で希釈した実施例2で製造したウナギLH - ペプチドに対するポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングした結果である。

【図19】実験例3によって、蚕蛹から生産したJeLH、JeLHを1.6µg混合後、JeLHの含量を1.4、1.2、1.0、0.8、0.4、0.2、0µgの順に減少させ他のホルモンは同量で混合した試料を対象にしてSDS-PAGEした後、ニトロセルロースメンブレンに移して、ウナギJeLHベータペプチドに対するポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングした結果である。

【発明を実施するための形態】

【0046】

以下、実施例を通じて本発明をより詳しく説明する。しかし、これら実施例は本発明を例示するためのものに過ぎず、本発明の範囲がこれら実施例によって限定されるのではない。

【実施例】

【0047】

実施例1：ウナギのJeLHに特異的なマーカ選定

1-1：JeLH - サブユニットの分析

ウナギJeLH - サブユニットの構造確認のために、トランスメンブレンおよび信号配列を検索し、蛋白質の親水性と疎水性をコンピュータプログラムを用いて分析した。具体的に、ウナギLH - サブユニット（配列番号6）においてトランスメンブレン（Transmembrane、TM、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>）領域、分泌信号配列（Signal peptides、SP、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>）、糖鎖修飾（N-glycosylation、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>）と疎水性（Hydrophobic、<http://web.expasy.org/protscale/>）、親水性（hydrophilic <http://web.expasy.org/protscale/>）部位を分析し、分析結果を図1乃至図6に示した。トランスメンブレン

10

20

30

40

50

領域は図 1 に示し、分泌信号配列は図 2 に、糖鎖修飾部分を図 3 に、疎水性および親水性部分分析結果は図 4 乃至 6 に示した。

【 0 0 4 8 】

図 1 乃至図 6 から分かるように、ウナギ LH - サブユニットの構造においてトランスメンブレン (T M) 領域は存在せず (図 1)、分泌信号配列は N - 末端から 1 - 2 4 番目アミノ酸配列部分 (配列番号 7) が存在するのを確認し (図 2)、N - 末端から 3 4 番目アミノ酸の N (N - E - T、N E T 配列において N の位置) 部分が N - 糖鎖修飾されており (図 3)、N - 末端から 2 1 ~ 5 0 番目までアミノ酸配列 (配列番号 8) が親水性の高い部分であって、そのうちの E P I N E T N S V E K D G C (配列番号 1) が親水性領域であり (図 4)、二番目に確認した親水性の高い部分は N - 末端から 5 1 ~ 8 0 番目までアミノ酸配列 (配列番号 9) 領域であり、そのうちの C I T K D P S Y K G P L S (配列番号 2) が親水性領域であるのを確認し (図 5)、三番目に確認した親水性の高い部分は N - 末端から 1 1 1 番目 ~ 1 4 0 番目までアミノ酸配列 (配列番号 1 0) 領域であり、そのうちの S D C A I Q S L R P D (配列番号 3) が親水性領域 (図 6) であるのを確認した。

10

【 0 0 4 9 】

1 - 2 : J e L H - サブユニットを J e F S H および J e T S H の サブユニットと比較分析

ウナギ脳下垂体糖蛋白質ホルモンの J e F S H - サブユニット、J e L H - サブユニット、および J e T S H - サブユニットのアミノ酸配列の相同性を <http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> で多重配列アライメント (Multiple Sequence alignment、MSA) 方法を用いて比較分析した。

20

【 0 0 5 0 】

J e L H と J e F S H の ホモロジースコア (homology score) は 3 9、J e L H と J e T S H は 2 9 と示され、具体的な三種類の糖蛋白質ホルモンのサブユニット配列の相同性分析結果を図 8 に示した。図 8 において黒い色で表示した部分は三種類のホルモン全部に共通的に存在する配列を示し、灰色部分は三種類のホルモンのうちの二種類のホルモンに共通的に存在する配列であり、赤いボックスで表示した部分はウナギ J e L H ベータサブユニットの配列のうち J e F S H と J e T S H には存在せず、L H のみに存在するアミノ酸配列領域であって、本発明のポリクローナル抗体を生産するために用いたポリペプチド部分を表示したものである。

30

【 0 0 5 1 】

1 - 3 : J e L H 抗体製造用抗原ポリペプチドの選定

前記実施例 1 - 1 から得られた分泌信号配列、N - 糖鎖修飾配列および疎水性領域に関する情報と、前記実施例 1 - 2 によって J e F S H および J e T S H の サブユニットのアミノ酸配列相同性分析結果から、アミノ酸配列相同性の低い配列を総合して、最終的に J e L H - サブユニットの N 末端から 3 1 - 4 4 番目のアミノ酸配列部分 (E P I N E T N S V E K D G C - 配列番号 1)、5 9 - 7 1 番目アミノ酸配列部分 (C I T K D P S Y K G P L S - 配列番号 2)、および 1 1 9 - 1 2 9 アミノ酸配列部分 (S D C A I Q S L R P D - 配列番号 3) を J e L H ポリクローナル抗体製造用マーカペプチドに選定した。

40

【 0 0 5 2 】

実施例 2 : マーカペプチドを用いたポリクローナル抗体製作

前記実施例 1 で選抜した配列番号 1 のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ (以下、第 1 マーカ)、配列番号 2 のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ (以下、第 2 マーカ)、および配列番号 3 のアミノ酸から構成されたペプチドマーカ (以下、第 3 マーカ) を混合しウサギに免疫化してウサギポリクローナル抗体を製造した。

【 0 0 5 3 】

より具体的に、前記第 1 マーカ、第 2 マーカ、および第 3 マーカを混合してウサギの腹

50

腔内に総3回注射してポリクローナル抗体を製造した。まず、200 µgの精製されたマーカ抗原混合物に2 µLの10% SDSを添加した後に2分間加熱し、200 µLのコンブリートアジュバント(Freund's Complete adjuvant, Sigma)を添加して超音波処理した。その後、ウサギの腹腔に1次に抗原を注入してから4-5週経過後に採血し、2次の抗原注入を実施した。これから2週経過後に採血し、3次の抗原を注入し、抗原をウサギに3次ブースティング(boosting)し、9週後に血液を採取した後、血液とTBSTバッファを1:100、1:1,000、1:5,000、1:10,000、1:50,000、1:100,000の比率で混合したウナギLH探知用組成物を処理して1時間室温で反応させた。その後、TBSTで洗浄し、TMB基質を用いて450 nm波長で(Perkinelmer victor X3)で測定して直接ELISA(direct ELISA)分析を行った(図10)。

10

【0054】

ELISA分析結果、血液とTBSTバッファを1:50,000~1:100,000の比率で混合したウナギJ e L H探知用組成物を処理した時にOD値が1.0以下と測定され、以後免疫反応活性が高い水準に示されるのを確認した。二匹のウサギに免疫したサンプルは全て同一な傾向を示した。

【0055】

追加的に、前記で生産したJ e L H - サブユニットを特異的に認識するポリクローナル抗体の中のIgGを精製した後にSDS電気泳動し、その結果を図12に示した。図12の1-3番レーンは前記精製したポリクローナル抗体をそれぞれ0.5、1、2 µgローディングしたものであり、4、5番レーンは濃度確認のためにBGG(bovin gamma globulin)1、2 µgをそれぞれローディングしたものであり、6番は蛋白質サイズマーカーである。矢印で提示した部分が本発明抗体の重鎖(Heavy chain)を示す。

20

【0056】

比較例1: J e L H / m G T H キメラ抗原を用いたポリクローナル抗体生産
ウナギLHのサブユニットは維持し、サブユニットをマウスのGTH(Gonadotropin hormone) - サブユニットで置換した配列番号4のアミノ酸からなるキメラ形態(J e L H - / m G T H -)のLH抗原をウサギに注射して、前記キメラ抗原を特異的に認識するポリクローナル抗体を製造した(図7の(B))。

30

【0057】

より具体的に、J e L H - / m G T H - ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(配列番号5)と韓国登録特許10-1493957号公報に開示されたカイコの幼虫および蛹発現システムを用いて配列番号4のアミノ酸からなるキメラ形態のLH抗原を製造し、SDS電気泳動を通じて確認した(図9参照)。図9に示されているように、SDS電気泳動確認結果、キメラ形態のLH抗原は約35 kDa分子量を有し糖鎖付加効果によるスミア(smear)な状態であることを確認することができた。

前記で製造したキメラ形態のLH抗原を実施例2と同様な方法でウサギに注射して、キメラ抗原を特異的に認識するポリクローナル抗体を製造した。

40

【0058】

その次に、J e L H / m G T H キメラ抗原をウサギに3次ブースティング(boosting)し、9週後に血液を採取し、これを1:100、1:1,000、1:5,000、1:10,000、1:50,000、1:100,000の比率でTBSTバッファと混合して抗原との反応をテストした。抗体価をELISAを用いて二回反復して分析し、その結果を図11に示した。

【0059】

ELISA分析結果、1:10,000でOD値が約1.0と測定され、この比率が以後抗原-抗体反応などの実験において最小反応比率であるのが分かった。前記結果は、二匹のウサギに免疫したサンプルで類似な傾向を示した(図11)。

【0060】

50

追加的に、前記で生産したキメラ抗原を特異的に認識するポリクローナル抗体の中の I g G を精製した後に S D S 電気泳動し、その結果を図 1 3 に示した。図 1 の 1 - 3 番レーンは前記精製したポリクローナル抗体をそれぞれ 0 . 5 、 1 、 2 μ g ロードしたものであり、4、5 番レーンは濃度確認のために B G G (b o v i n γ g l o b u l i n) 1、2 μ g をそれぞれロードしたものであり、6 番は蛋白質サイズマーカーである。矢印で提示した部分が本発明抗体の重鎖 (H e a v y c h a i n) を示す。

【 0 0 6 1 】

実験例 1 : 抗体の J e L H 特異性評価

1 - 1 . C B B 染色結果

韓国登録特許 1 0 - 1 4 9 3 9 5 7 号公報に開示されたカイコの幼虫および蛹発現システムと実質的に同様な方法を用いて製造し分離した J e L H 、 J e L H 、 J e F S H 、 J e F S H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を 1 2 % S D S - P A G E ゲルに電気泳動し、クマシーブリリアントブルー (C o o m a s s i e B r i l l a i a n t B l u e 、 C B B) 染色を行い、その結果を図 1 4 に示した。

10

【 0 0 6 2 】

具体的に、それぞれのポリペプチドホルモンを製造するために、ホルモンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列 (J e L H : 配列番号 1 1 、 J e L H : 配列番号 6 、 J e F S H : 配列番号 1 2 、 J e F S H : 配列番号 1 3 、 J e T S H : 配列番号 1 4 、 J e T S H : 配列番号 1 5 、 J e G T H : 配列番号 1 6) を市販されるバキュロウイルス転移ベクター (b a c u l o v i r u s t r a n s f e r v e c t o r) に製造会社から提供されるプロトコルに沿ってクローニングして組換え転移ベクターを製造し、このように製造した組換え転移ベクターを宿主細胞 (B m D H 1 0 B a c コンフィデント細胞) に形質転換させて組換えバクミドを製造する。形成されたバクミドを通常のプラスミド抽出法を用いて細胞から分離する。分離した組換えバクミドをカイコ (B m N) 細胞内に形質感染させ、形質感染された昆虫細胞から組換えバキュロウイルスを分離して、これをカイコの幼虫または蛹生体に注入し形質転換してそれぞれの J e L H 、 J e L H 、 J e F S H 、 J e F S H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H 蛋白質を発現させる。その次に、前記カイコの幼虫または蛹の細胞または体液からそれぞれの発現させた蛋白質を通常の方法を用いて分離、精製した。

20

30

【 0 0 6 3 】

図 1 4 から分かるように、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H はそれぞれ 3 3 、 1 8 、 1 8 、 3 3 、 1 9 、 1 8 、 3 3 、 1 8 、 1 8 k D a の分子量を有するのを確認し、これはそれぞれの塩基配列から予想されたサイズより約 7 - 8 k D a 高い値であって、糖鎖付加による結果である。

【 0 0 6 4 】

【表 2】

区分	塩基配列	配列番号
JeLH	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPI VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPDFCMSQRASLPA SYPNNEMARGGCDECRLEN KIFSRPSAPIFQCVGCCFSR AYPTPLRSKKTMLVPKNITS EATCCVAREVTRLDNMKLEN HTDCHCSTCYHFK	11
JeFSH	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENEECGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGCPSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTSTDGCPNLTE VSGCLTHSYPNNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHFK F	12
JeFSH β	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENEECGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGCPSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTSTDGCPNLTE VSGCLTH	13
JeTSH	MRVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTLTYVEKPECDFCV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRCSPKPLLLMHAYPGQ SNHIQTL SYPNNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHFK F	14
JeTSH β	MRVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTLTYVEKPECDFCV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRCSPKPLLLMHAYPGQ SNHIQTL	15
JeGTH α	MMVCPGKPGASLLMLSMLFH IIDSYPNNEMARGGCDECRLEN QENNIFSKPSAPIFQCVGCC FSRAYPTPLRSKKTMLVPKN ITSEATCCVAREVTRLDNMK LENHTDCHCSTCYHFK	16

10

20

30

【0065】

1-2. His 抗体ウェスタンブロット分析

実験例 1-1 と同様な方法で合成して分離した JeLH、JeLH、JeFSH、JeFSH、JeTSH、JeTSH、JeGTH を SDS-PAGE した後、ニトロセルロースメンブレンに移して His 抗体でウェスタンブロッティングを行い、その結果を図 15 に示した。

【0066】

図 15 から分かるように、JeLH、JeLH、JeGTH、JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeTSH、JeTSH、JeGTH それぞれの分子量が CBB 染色結果と同様に確認され、これは組換えタンパク質の製作時にタグとして使用された His 抗体は全てのウナギの性ホルモン蛋白質と結合を形成するのを確認した。

40

【0067】

1-3. 比較例 1 抗体ウェスタンブロット分析

実験例 1-1 と同様な方法で合成して分離した JeLH、JeLH、JeFSH、JeFSH、JeTSH、JeTSH、JeGTH を SDS-PAGE した後、ニトロセルロースメンブレンに移して、前記比較例 1 で製造したウナギ LH とマウスの GTH のキメラポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行い、その結果を図 16 に示した。

50

【 0 0 6 8 】

図 1 6 から分かるように、比較例 1 の抗体は J e L H、J e L H と結合して 2 番と 3 番レーンでバンドが明確に現れるが、その他の G T H 蛋白質とも弱い結合し、抗体が種間類似性を認識して F S H (5 レーン)、F S H (6 レーン)、G T H (7 レーン) と T S H (8 レーン)、T S H (9 レーン)、G T H (1 0 レーン) とともに弱くても結合を形成するのを確認した。

したがって、比較例 1 抗体は J e L H のみを特異的に検出するに不適切であるのを確認することができた。

【 0 0 6 9 】

1 - 4 . 本発明のポリクローナル抗体ウェスタンブロット分析

実験例 1 - 1 と同様な方法で合成して分離した J e L H、J e L H、J e F S H、J e F S H、J e T S H、J e T S H、J e G T H を S D S - P A G E した後、ニトロセルロースメンブレンに移して前記実施例 2 で製造した本発明の配列番号 1 のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸からなるポリペプチド、および配列番号 3 のアミノ酸からなるポリペプチド混合物をウサギに注射して得られたポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行い、その結果を図 1 7 に示した。

【 0 0 7 0 】

図 1 7 から分かるように、本発明のポリクローナル抗体はただ J e L H、J e L H と特異的に結合し、ウナギの脳下垂体ホルモンの共通配列の G T H はもちろん (4、7、1 0 レーン)、J e F S H と J e T S H の特異配列のベータ (5、6、8、9 レーン) にもバンドが現れず、これから本発明のポリクローナル抗体は G T H、J e G T H、J e F S H、J e F S H、J e T S H、J e T S H とは結合せず、J e L H のみを特異的に認識して選別することができる抗体であることを確認した。

【 0 0 7 1 】

本発明のポリクローナル抗体は比較例 1 の J e L H / m G T H を連結したキメラ抗原から得られたポリクローナル抗体の L H 以外の他のホルモンとも非特異的に結合する問題を解決したものであって、L H 検出特異性において本発明のポリクローナル抗体が優れた効能を有するのが分かった。

【 0 0 7 2 】

実験例 2 : 抗体の検出感度測定

実験例 1 - 1 と同様な方法で合成して分離した J e L H、J e L H を S D S - P A G E し、ニトロセルロースメンブレンに移した後、前記実施例 2 で製造した本発明の配列番号 1 のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸からなるポリペプチド、および配列番号 3 のアミノ酸からなるポリペプチドの混合物をウサギに注射して得られたポリクローナル抗体を 1 : 5, 0 0 0、1 : 1 0, 0 0 0 および 1 : 2 0, 0 0 0 の比率で希釈した後にウェスタンブロッティングを行い、その結果を図 1 8 に示した。

【 0 0 7 3 】

図 1 8 に示されているように、本発明ポリクローナル抗体 L H 結合特異性を確認することができ、ポリクローナル抗体を 1 : 2 0, 0 0 0 の比率で希釈した時も抗原 - 抗体反応が起こり、これは以前の E L I S A 結果とも一致する結果である。

【 0 0 7 4 】

実験例 3 : 抗体を用いた試料中の J e L H 検出

ウナギの血液には多様なホルモンが混合されており、このような血液と類似な環境を形成して本願発明ポリクローナル抗体の J e L H 検出特異性を確認した。ウナギの血液と類似な環境をセッティングするために、実験例 1 - 1 と同様な方法で合成して分離した J e F S H、J e L H および J e T S H をそれぞれ 1 . 6 μ g ずつ混合した試料、その次にそれぞれの混合量を 0 . 2 μ g ずつ減少させて (1 . 6、1 . 4、1 . 2、1 . 0、0 . 8、0 . 6、0 . 4、0 . 2、0) 混合した試料を対象にして、S D S - P A G E を行った。S D S - P A G E を行った後、ニトロセルロースメンブレンに移し、前記実施例 2 で製造した本発明のポリクローナル抗体を処理してウェスタンブロッティングを行い、その結

10

20

30

40

50

果を図19に示した。

【0075】

図19に示されているように、JeFSHとJeTSHが検出されなければならない部分でバンドが現れず、本発明のポリクローナル抗体がJeLHに特異的に結合するのを確認することができた。また、競争法(competition immunoblotting)を通じて本願のポリクローナル抗体を用いる場合、ホルモンが混合された状態の検体でもJeLHのみを特異的に検出することができるのを確認した。

【配列フリーテキスト】

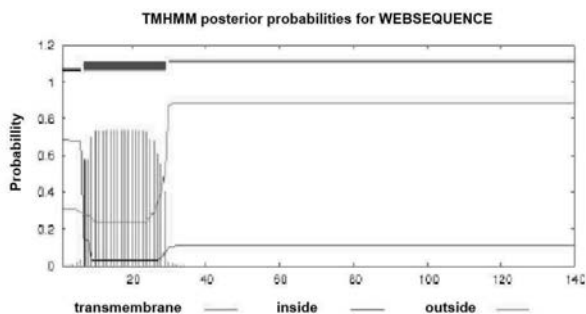
【0076】

- 配列番号1: JeLH N'31-44番目アミノ酸配列
- 配列番号2: JeLH N'59-71番目アミノ酸配列
- 配列番号3: JeLH N'119-129番目アミノ酸配列
- 配列番号4: JeLH- /mGTH- キメラ抗原アミノ酸配列
- 配列番号5: JeLH- /mGTH- キメラ抗原塩基配列
- 配列番号6: JeLH Fullアミノ酸配列
- 配列番号7: JeLH- 分泌信号配列 N'1-24番目アミノ酸配列
- 配列番号8: JeLH- 親水性部分1
- 配列番号9: JeLH- 親水性部分2
- 配列番号10: JeLH- 親水性部分3
- 配列番号11: JeLHのポリペプチド配列
- 配列番号12: JeFSHのポリペプチド配列
- 配列番号13: JeFSH- サブユニットのポリペプチド配列
- 配列番号14: JeTSHのポリペプチド配列
- 配列番号15: JeTSH- サブユニットのポリペプチド配列
- 配列番号16: JeGTH- のポリペプチド配列

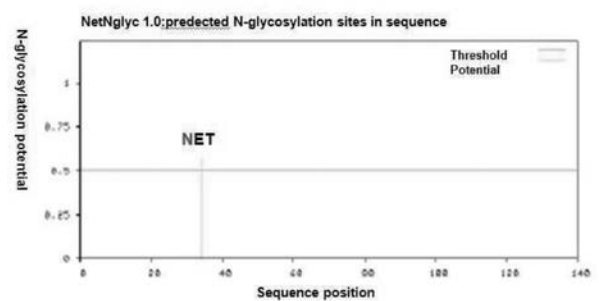
10

20

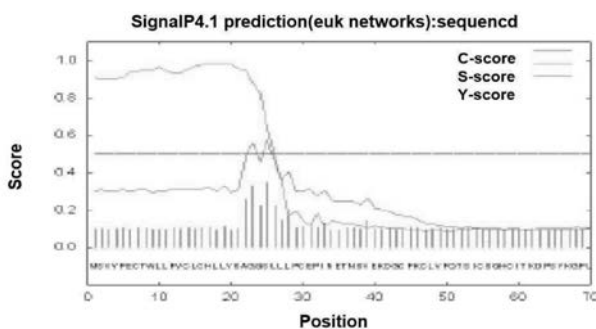
【図1】



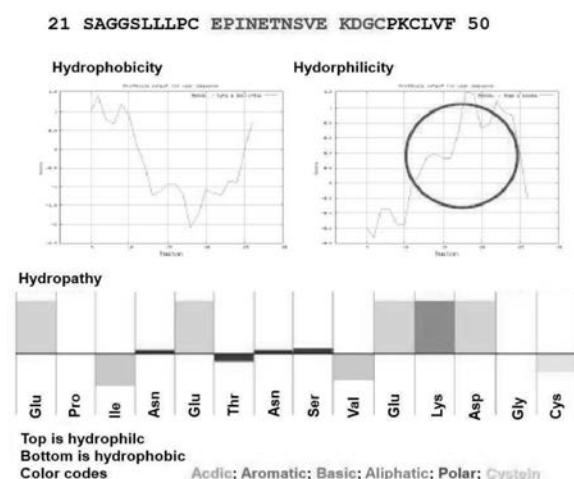
【図3】



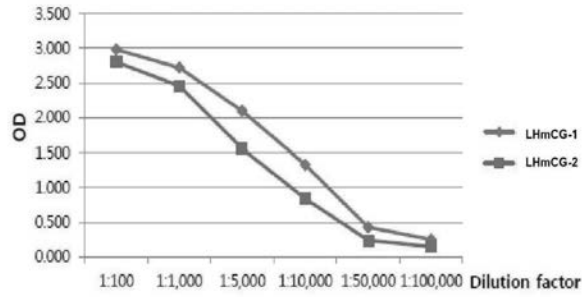
【図2】



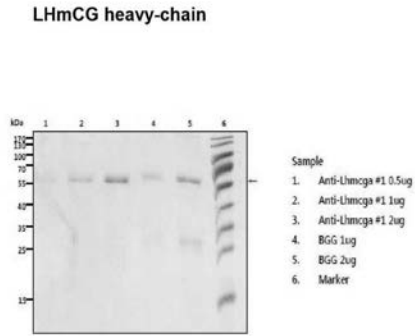
【図4】



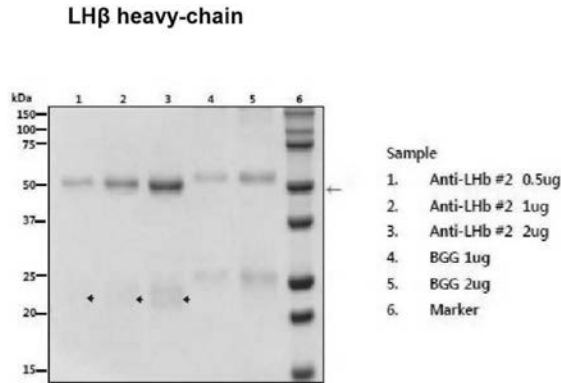
【 図 1 1 】



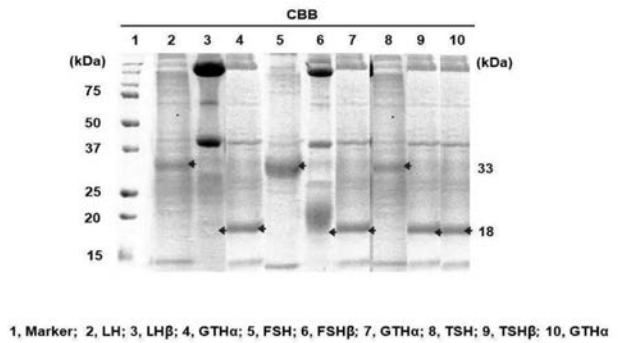
【 図 1 3 】



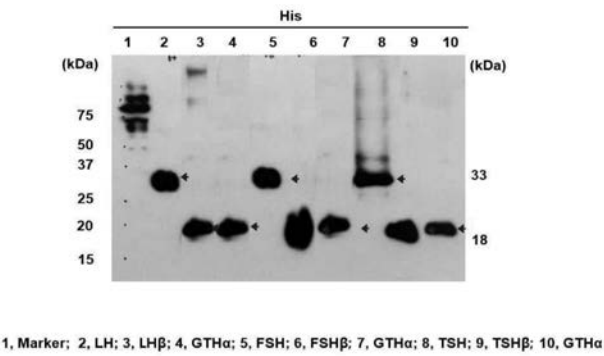
【 図 1 2 】



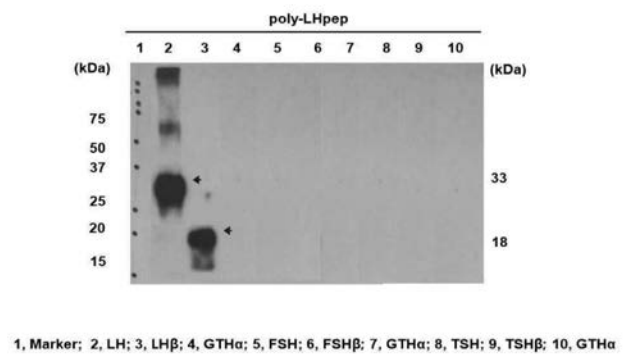
【 図 1 4 】



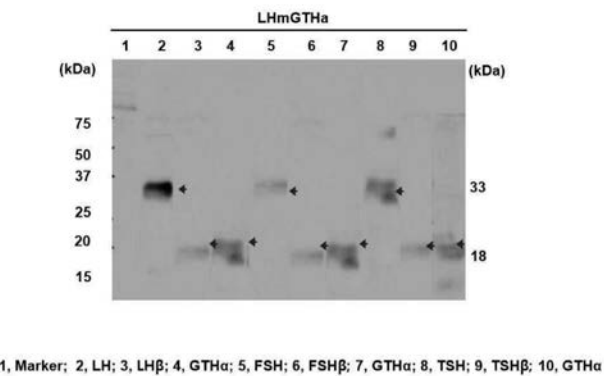
【 図 1 5 】



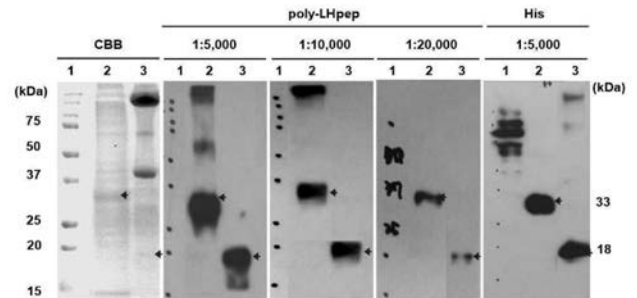
【 図 1 7 】



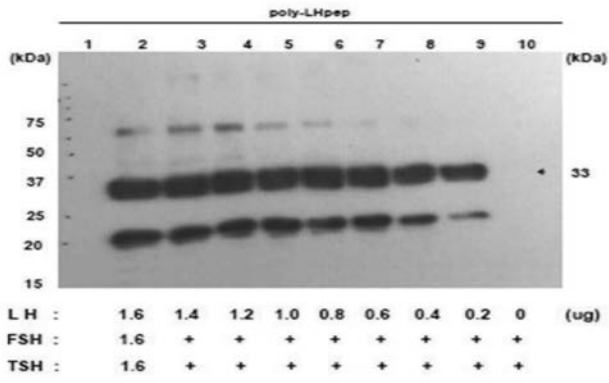
【 図 1 6 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 配 列 表 】

2019097550000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 チェ ソン チャン

大韓民国江原道東海市海岸路635-15 夕棟103号

(72)発明者 バク ニョン ホ

大韓民国慶尚北道蔚珍郡竹邊面海洋科学ギル22 職員宿所201号

(72)発明者 キム デ ジュン

大韓民国釜山市海雲臺区マリンシティ2路38-606号

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA52 DA30 DA75 DA86 EA05
FA74

