

(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2019-99548
(P2019-99548A)

(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)
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26 ZNA	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 F	4H045
C12Q 1/6806 (2018.01)	C12Q 1/6806 Z	

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2018-76204 (P2018-76204)
 (22) 出願日 平成30年4月11日 (2018.4.11)
 (31) 優先権主張番号 10-2017-0165450
 (32) 優先日 平成29年12月4日 (2017.12.4)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

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

(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

(74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス

(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

(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

(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

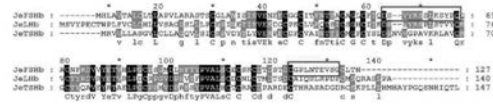
(54) 【発明の名称】 ウナギの濾胞刺激ホルモンに特異的な抗体およびその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ウナギの濾胞刺激ホルモン(FSH)を特異的に認識する抗体及びウナギのFSHを特異的に探知する方法の提供。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を含むウナギの濾胞刺激ホルモンの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FSHと特異的に結合する抗体、該抗体を含む生物学的試料内のウナギのFSHの特異的探知用組成物及び探知方法、並びに特定のアミノ酸配列からなるペプチド又は該配列をコードするポリヌクレオチドを含むウナギのFSH探知用マーカ。

【選択図】図6



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 および配列番号 2 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*) の濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone、FSH) の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 FSH と特異的に結合する抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、ウナギの甲状腺刺激ホルモン (Thyroid-stimulating hormone; thyrotropin; TSH)、黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone; lutropin; LH)、および性腺刺激ホルモン (gonadotropin、GTH) には結合せず、ウナギの FSH 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 のいず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、生物学的試料内のウナギ (*Anguilla japonica*) の濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone、FSH) 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 TSH、LH 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*) の濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone、FSH) 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 および配列番号 2 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および配列番号 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*) の濾胞刺激ホルモン (follicle

50

e stimulating hormone、FSH) 探知用マーカ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウナギの濾胞刺激ホルモンを特異的に認識する抗体およびこれを用いたウナギの濾胞刺激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 blood stock) 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。

【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。

【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. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish Sci., 64 77-82.)

【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 (synergis

10

20

30

40

50

m) 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与える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。

10

【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)、性腺刺激ホルモン (gonadotropin, GTH)、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 (α) とベータ (β) 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。

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与える濾胞刺激ホルモン (FSH) 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 FSH と結合することによって他の性ホルモンと異なり FSH にのみ特異的に結合して、ウナギ生物学的試料内の FSH を探知可能であり、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

40

【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】

【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、ウナギの濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH) を特異的に探知することができる抗体を提供する。

【0011】

50

本発明の一例は、配列番号1および配列番号2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FSH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FSH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FSHホルモンの特異的探知用組成物を提供し、

【0012】

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

【0013】

また、本発明の一例は、配列番号1および配列番号2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および配列番号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FSH探知用マーカを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、ウナギの類似ホルモンは除いてウナギの濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone、FSH)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。

【0015】

本発明は、下記表1の配列番号1 (DSVYKSSLKSY PQ、Asp-Ser-Val-Tyr-Lys-Ser-Ser-Leu-Lys-Ser-Tyr-Pro-Gln)および配列番号2 (CGPLNTEVSG、Cys-Gly-Pro-Leu-Asp-Thr-Glu-Val-Ser-Gly)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FSH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FSHと特異的に結合する抗体を提供する。

【0016】

10

20

30

【表 1】

区分	配列	配列番号
JeFSH β N' 56-68 番目 アミノ酸配列	DSVYKSSLKSYPQ	1
JeFSH β N' 114-123 番目 アミノ酸配列	CGPLNTEVSG	2
JeFSH- β /JeFSH- α 単一鎖抗原 アミノ酸配列	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECEGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGPCSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTHSYPNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYVHK F	3
JeFSH- β /JeFSH- α 単一鎖抗原 塩基配列	ATGCATCTGGCTGTCACAGCGCTGTGCTTGACATTGGCTCCCGTCTGGCA AGAGCTTCCACCAGTTGTGGTCTCGCCAACATCTCCATCTCCGTGGAGAAT GAAGAATGCGGTGGCTGCATCACCTTCAACACCACCGCCTGTGCTGGCCTG TGCTTACCCAGGATTCTGTATACAAGAGCTCCCTGAAATCATACCCCCAA CAGGCCTGCAACTTCAGGGATGTAGTCTATGAGACTGTGCACTTGCCTGGG TGTCCCAGTGAATGGACTCCACTTCACCTACCCTGTGGCTCTGAGCTGT GAGTGCAGCAAGTGGACACGGACAGCACCGACTGTGGCCCACTTAACACA GAAGTGTGAGGCTGTCTGACCCACTCTTATCCCAACAACGAAATGGCACGA GGTGGCTGCGATGAATGTGCGACTCCAGGAGAATAAGATCTTCTCCAAGCCC AGCGCTCCAATCTTCCAGTGCCTGGTTGCTGTTTCTCCAGGGCGTACCCA ACACCACTGCGGTCCAAGAAGACCATGCTGGTGCCAAAGAACATTACATCT GAGGCAACGTGCTGCGTGGCCAGGGAGGTGACAAGGCTGGATAACATGAAA CTGGAGAACCACACAGACTGCCACTGCAGCACCTGCTACTACCACAAATTT	4
JeFSH- β /mGTH- α キメラ抗原 アミノ酸配列	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECEGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGPCSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTHGGGSLPDGDFITQ GCPECKLKENKYFSKLGAPI YQCMGCCFSRAYPTPARSKK TMLVPKNITSEATCCVAKAF TKATVMGNARVENHTECHS TCYVHKS	5

10

20

30

40

JeFSH- β /mGTH- α キメラ抗原 塩基配列	ATGCATCTGGCTGTACAGCGCTGTGCTTGACATTGGCTCCCGTCTGGCAAG AGCTTCCACCAGTTGTGGTCTCGCCAACATCTCCATCTCCGTGGAGAATGAAG AATGCGGTGGCTGCATCACCTTCAACACCACCGCCTGTGCTGGCCTGTGCTTC ACCCAGGATTCTGTATAACAAGAGCTCCCTGAAATCATACCCCCAACAGGCCTG CAACTTCAGGGATGTAGTCTATGAGACTGTGCACTTGCTGGGTGTCCAGTG GAATGGACCTCCACTTACCTACCCTGTGGCTCTGAGCTGTGAGTGCAGCAAG TGCGACACGGACAGCACCGACTGTGGCCCACTTAACACAGAAGTGTGAGGCTG TCTGACCACggtggtggtteaCTTCTGATGGAGACTTTATTATTCAGGGTT GCCCAGAATGTAAACTAAAGGAAAATAAATACTTCTCCAAGCTAGGAGCCCC ATCTACCAGTGTATGGGCTGTTGCTTCTCCAGGGCATATCCCACTCCCGCCAG GTCCAAGAAGACAATGCTGGTTCCAAAGAATATTACCTCGGAGGCCACATGCT GTGTGGCCAAAGCATTACTAAGGCCACAGTAATGGGAAATGCCAGAGTGGAG AATCATACGGAGTGCCACTGTAGCACTTGTACTACCACAAGTCG	6	10
JeFSH β Full アミノ酸配列	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECEGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPPQACNFRDVVYET VHLPGCPSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTH	7	20
JeFSH- β 分泌信号配列	MHLAVTALCLTLAPVLARAST	8	
JeFSH- β 親水性部分	LCFTQDSVYK SSLKSYPPQA CNFRDVVYET	9	
JeFSH- β 疎水性部分	SCECSKCDTD STDCGPLNTE VSGCLTH	10	30

10

20

30

40

50

【0017】

前記“ウナギFSH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(LH、TSH、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FSH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。

【0018】

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FSH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)、黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone; lutropin; LH)、性腺刺激ホルモン(gonadotropin、GTH)には結合せず、ウナギのFSHに特異的に結合する、抗体であってもよい。

【0019】

本発明の一例によれば、前記FSH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、例えば配列番号1のアミノ酸配列からなるマーカの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。

【0020】

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 (D S V Y K S S L K S Y P Q、A s p - S e r - V a l - T y r - L y s - S e r - S e r - L e u - L y s - S e r - T y r - P r o - G l n) および配列番号2 (C G P L N T E V S G、C y s - G l y - P r o - L e u - A s p - T h r - G l u - V a l - S e r - G l y) 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 (A n g u i l l a j a p o n i c a) の F S H 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) と配列番号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) の二つのマーカの両方に特異的に結合する抗体であってもよい。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 (I m m u n o g l o b u l i n、I g) 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 I g G、I g M、I g A、I g D、I g E 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 I g の 75% を占める I g G 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。

10

20

【0021】

また、本発明で、抗体は前記 F S H - アミノ酸配列の一部の第1マーカまたは第2マーカまたはこの二つのマーカの両方に特異的に結合する抗体、抗原結合断片またはアプターであってもよい。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 F S 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るのが好ましい。

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

30

【0022】

前記生物学的試料は T S H、L H および G T H 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 F S H ホルモン探知用組成物は、生物学的試料に含まれている T S H、L H または G T H とは結合せず、F S H に特異的に結合する。生物学的試料に F S H 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。

【0023】

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 F S H 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。

【0024】

本発明のキットは、F S H 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 (p e r o x i d a s e)、アルカリホスファターゼ (A l k a l i n e P h o s p h a t a s e) が用いられてもよく、蛍光物質は F I T C、R I T C などが用いられてもよく、発色基質液は A B T S (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 O P D (o-フェニレンジアミン)、T M B (テトラメチルベンジジン) が用いられてもよい。

40

50

【0025】

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FSHホルモンを特異的に探知する方法を提供する。

【0026】

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 (Immunofluorescent Antibody test、IFA)、ウェスタンブロット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、FSH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FSHの存在有無と含量を測定することができる。

10

【0027】

本願で“抗原 - 抗体複合体”とはFSH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。

20

【0028】

一具体例として、FSH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、FSH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。

【0029】

また、本発明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。

30

【0030】

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FSH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。

【0031】

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。

40

【0032】

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。

【0033】

50

本願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 F S 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。

【 0 0 3 4 】

本発明の一例は、配列番号 1 および配列番号 2 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および配列番号 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 F S H 探知用マーカを提供する。

10

【 0 0 3 5 】

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）は F S H - サブユニット（配列番号 7）の一部であり、下記の実施例 1 で確認したように、前記二つのマーカは F S H の遺伝子配列とウナギの他のホルモン（L H、T S H など）との類似性を考慮して F S H 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 マーカおよび第 2 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 マーカおよび第 2 マーカを全て含むことが適切である。

20

【 0 0 3 6 】

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 F S H - / J e F S H - 単一鎖ポリペプチド抗原に対するモノクローナル抗体および J e F S H - / m G T H - （mouse gonadotropin hormone）キメラ抗原に対するポリクローナル抗体は、J e F S H だけでなくその他の性成熟ホルモン（J e L H、J e T S H、G T H など）とも抗原 - 抗体結合反応を起こすため F S 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。

30

【 0 0 3 7 】

これとは異なり、本発明の第 1 マーカおよび第 2 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 J e F S H のみを特異的に検出することができ、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 F S H のみに特異的に抗原 - 抗体反応が起こるので、J e F S H 特異検出抗体として使用するのに適切である。

【 0 0 3 8 】

また、本発明は、前記ウナギの J e F S H 探知用ペプチドマーカ（第 1 マーカ、第 2 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 F S 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第 1 マーカおよび / または第 2 マーカ、または前記マーカをコードするポリヌクレオチドまたは J e F S H 蛋白質を検出する方法を提供する。

40

【 0 0 3 9 】

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および配列番号 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 F S 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および配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を全て含む F S H 探知用マ

50

一カを提供することができる。

【0040】

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FSH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マーカをコードするポリヌクレオチドに相補的なプライマー (primer)、プローブ (probe)、アンチセンス核酸 (antisense oligonucleotids) などであってもよい。

【0041】

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 (annealing) 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 (substantially complementary) および完全に相補的 (perfectly complementary) 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。

【0042】

本発明で“蛋白質を検出できる製剤”は、試料内でFSH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FSH蛋白質をターゲット (target) 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FSH - アミノ酸配列の一部の第1マーカまたは第2マーカまたはこの二つのマーカの両方に特異的な抗体、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FSH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。

【発明の効果】

【0043】

本発明は、ウナギの濾胞刺激ホルモン (FSH) 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濾胞刺激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濾胞刺激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】

【0044】

【図1】実施例1-1によって、ウナギFSH - 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。

【図2】実施例1-1によって、ウナギFSH - 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FSH - 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FSH - サブユニットの疎水性分析 (hydrophobicity 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JeFSH - サブユニットの疎水性分析 (hydrophobicity 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。

【図6】実施例1-2によって、ウナギJeFSH、JeLH、JeTSH - 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JeFSH - 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。

【図7】比較例1によって、E. coli システムで生産した遺伝子組換えJeFSH抗

10

20

30

40

50

原を SDS 電気泳動で確認した結果を示す。

【図 8】比較例 2 によって、ウナギ J e F S 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 J e F S H 抗原を SDS 電気泳動で確認したものである。

【図 9】三つのタイプ (A) 実施例 2 のウナギ J e F S 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 F S H - サブユニットに対するモノクローナル抗体、(C) 比較例 2 のウナギ J e F S H - サブユニットとマウスの G T H - サブユニットの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 10】実施例 2 によって、J e F S H - の N - 末端から 56 - 68 番目の 14 個のアミノ酸から構成されたペプチド抗原 (配列番号 1) およびウナギの J e F S H - の N - 末端から 114 - 123 番目の 10 個のアミノ酸から構成されたペプチド抗原 (配列番号 2) 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 E L I S A 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。

【図 11】比較例 1 によって、J e F S H 単鎖抗原 (配列番号 3) をマウスに免疫した後に血液を採取して抗体価を E L I S A 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】比較例 2 によって、ウナギ J e F S 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 F S 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 E L I S A 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 13】実施例 2 によって、F S H - の N - 末端から 56 - 68 番目の 14 個のアミノ酸から構成されたペプチド抗原 (配列番号 1) およびウナギの J e F S H - の N - 末端から 114 - 123 番目の 10 個のアミノ酸から構成されたペプチド抗原 (配列番号 2) 混合物をウサギに免疫化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 J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E して C B B 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 J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E した後、ニトロセルロースメンブレンに移して、H i s 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 J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E 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 で製造した J e F S H 単鎖抗原に対するモノ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 J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E した後、ニトロセルロースメンブレンに移した後に比較例 2 で製造した J e F S H - サブユニットとマウスの G T H - 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 18】実験例 1 - 5 によって、蚕蛹から生産した J e F S H 、 J e F S H 、 J e G T H 、 J e L H 、 J e L H 、 J e G T H 、 J e T S H 、 J e T S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E した後、ニトロセルロースメンブレンに移した後に実施例 2 で製造したウナギ F S H - 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 2 によって、蚕蛹から生産した J e F S H 、 J e G T H を対象にして SDS - P A G E してニトロセルロースメンブレンに移した後、1 : 5 , 0 0 0 、 1 : 1 0 , 0 0 0 、 1 : 2 0 , 0 0 0 の比率で希釈した実施例 2 で製造したウナギ F S H - ペ

10

20

30

40

50

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20】実験例3によって、蚕蛹から生産したJeFSH、JeLH、JeTSH1.6 μg混合後、JeFSHの含量を1.4、1.2、1.0、0.8、0.4、0.2、0 μg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JeFSH-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】

【0045】

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。

10

【実施例】

【0046】

実施例1：ウナギのFSHに特異的なマーカ選定

1-1：FSH-サブユニットの分析

ウナギFSH-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FSH-サブユニット(配列番号7)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4に示した。トランスメンブレン領域は図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に示した。

20

【0047】

図1乃至図4から分かるように、ウナギFSH-サブユニットの構造においてトランスメンブレン(TM)領域は存在せず(図1)、サブユニットのN-末端領域の21個のアミノ酸配列(MHLAVTALCLTLAPVLARAST-配列番号8)が分泌信号配列として存在するのを確認し(図2)、N-末端から27番目および44番目アミノ酸のN(N-X-T、アスパラギン酸(N)-任意のアミノ酸(X)-セリンまたはトレオニン(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)、51番目~80番目まで総30個のアミノ酸配列(LCFTQDSVYK SSLKSYPPQA CNFRDVVYET-配列番号9)が親水性の高い部分であり(図4)、101~127番目まで総27個のアミノ酸配列(SCECSKCDTD STDCGPLNTE VSGCLTH-配列番号10)領域が疎水性の高い部分(図5)であるのを確認した。

30

【0048】

1-2：FSH-サブユニットをLHおよびTSH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FSH-サブユニット、LH-サブユニット、およびTSH-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>で多重配列アラインメント(Multiple Sequence alignment、MSA)方法を用いて比較分析した。

40

【0049】

FSHとLHのホモロジースコア(homology score)は39、FSHとTSHは29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6に示した。図6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

50

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F S Hベータサブユニットの配列のうちF S 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。

【0050】

1 - 3 : F S 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L Hおよび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F S H - サブユニットのN末端から56 - 68番目のアミノ酸配列部分(D S V Y K S S L K S Y P Q - 配列番号1)と114 - 123番目アミノ酸配列部分(C G P L N T E V S G - 配列番号2)をF S 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。

10

【0051】

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で選定した配列番号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)および配列番号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)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。

【0052】

より具体的に、前記第1マーカおよび第2マーカを混合してウサギの腹腔内に総3回注射してポリクローナル抗体を製造した。まず、200 μ gの精製されたマーカ抗原混合物に2 μ Lの10% S D Sを添加した後に2分間加熱し、200 μ Lのコンプ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T B S T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F S H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、T B S Tで洗浄し、T M B基質を用いて450 nm波長で(Perkinelmer victor X3)で測定して直接E L I S A (direct E L I S A)分析を行った(図10)。

20

30

【0053】

E L I S A分析結果、血液とT B S Tバッファを1 : 50,000の比率で混合したウナギF S H探知用組成物を処理した時にO D値が1.0と測定され、以後免疫反応活性が高いことを確認した。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。

【0054】

追加的に、前記で生産したF S 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I g Gを精製した後にS D S電気泳動し、その結果を図13に示した。図13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B G G (bovine gamma globulin) 1、2 μ g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。

40

【0055】

比較例1 : J e F S H単一鎖抗原を用いたマウスモノクローナル抗体生産

韓国登録特許10 - 1531286号公報に開示された方法と実質的に同様な方法を用いてウナギF S Hのサブユニットとサブユニットを融合したJ e F S H単一鎖抗原(配列番号3)を製造した後、前記抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を製造した(図9の(B))。

【0056】

より具体的に、E . c o l iシステムで韓国登録特許10 - 1531286号公報に開

50

示された方法を用いて J e F S H 単一鎖抗原を製造し、製造した J e F S H 単一鎖抗原を S D S 電気泳動で確認した (図 7) 。

【 0 0 5 7 】

その次に、モノクローナル抗体を製造するために、製造した J e F S H 単一鎖抗原 5 0 μ g を B a l b / c マウス (6 - 8 週齢) 3 匹に 2 週ごとに 3 回免疫を実施した。最後の免疫後、1 週後に血液を採取して E L I S A で抗体の力価を分析し、骨髄細胞と融合させる 3 日前に J e F S H 2 0 μ g を尾血管 (i n t r a v e n o u s) に投与し、最も高い抗体力価を示すマウスの脾臓を粉砕した。その次に、前記脾臓粉砕物をマウス骨髄細胞と 5 0 % ポリエチレングリコール (P E G) 1 , 5 0 0 (S i g m a - A l d r i c h , G e r m a n y) を用いて融合し、エイチエーティー (H A T) 培養液 (S i g m a - A l d r i c h , G e r m a n y) を用いてハイブリッド細胞 (h y b r i d o m a c e l l s) を選別し、選別された培養上層を希釈して E L I S A 方法を用いてクローンを分離した後、H i - T r a p p r o t e i n G c o l u m n (G E H e a l t h c a r e , U p p s a l a , S w e d e n) を用いて精製した。具体的に、培養上層を 0 . 4 5 μ m フィルタリングをした後、pH を 7 . 5 に固定し、溶出は G l y c i n e H C I (0 . 1 M , p H = 2 . 7) を用いて行った。溶出された抗体は P B S (p H = 7 . 5) で透析した。

10

【 0 0 5 8 】

その次に、J e F S H 単一鎖抗原をマウスに 3 次ブースティング (b o o s t i n g) して 1 0 週後に血液を採取し、採取した血液をそれぞれ 1 μ g / m l 、 5 0 0 、 2 5 0 、 1 2 5 、 6 2 、 3 1 、 1 5 n g / m l の比率で T B S T バッファーと混合して抗原との反応をテストした。抗体価を E L I S A を用いて二回反復して分析測定し、その結果を図 1 1 に示した。

20

E L I S A 分析結果、3 1 n g / m l で O D 値が 1 . 0 と測定され、前記値が以後免疫反応実験において反応最小濃度であるのが分かった (図 1 1) 。

【 0 0 5 9 】

比較例 2 : J e F S H / m C G キメラ抗原を用いたポリクローナル抗体生産
ウナギ F S H の サブユニットは維持し、サブユニットをマウスの m C G - サブユニット (m o u s e c h o r i o n i c g o n a d o t r o p i n , m C G , m G T H) で置換した配列番号 5 のアミノ酸からなるキメラ形態 (J e F S H / m C G) の F S H 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 9 の (C)) 。

30

【 0 0 6 0 】

より具体的に、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を用いて配列番号 5 のアミノ酸からなるキメラ形態の F S H 抗原を製造し、S D S 電気泳動を通じて確認した (図 8 参照) 。

前記で製造したキメラ形態の F S H 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。

【 0 0 6 1 】

その次に、J e F S H / m C G キメラ抗原をウサギに 3 次ブースティング (b o o s t i n g) し、9 週後に血液を採取し、これを 1 : 1 0 0 、 1 : 1 , 0 0 0 、 1 : 5 , 0 0 0 、 1 : 1 0 , 0 0 0 、 1 : 5 0 , 0 0 0 、 1 : 1 0 0 , 0 0 0 の比率で T B S T バッファーと混合して抗原との反応をテストした。抗体価を E L I S A を用いて二回反復して分析し、その結果を図 1 2 に示した。

40

【 0 0 6 2 】

E L I S A 分析結果、1 : 5 0 , 0 0 0 で O D 値が 1 . 0 と測定され、前記値が以後免疫反応実験において反応最小反応比率であるのが分かった。二匹のウサギに免疫したサンプルは同一な傾向を示すのを確認した。

【 0 0 6 3 】

実験例 1 : 抗体の F S H 特異性評価

50

1 - 1 . C B B 染色結果

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と実質的に同様な方法を用いて製造し分離した J e F S H、J e F S H、J e G T H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S H を 12% SDS - 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 i a i a n t B l u e、C B B) 染色を行い、その結果を図 14 に示した。

【 0 0 6 4 】

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 F S H : 配列番号 11、J e F S H : 配列番号 7、J e G T H : 配列番号 12、J e L H : 配列番号 13、J e L H : 配列番号 14、J e T S H : 配列番号 15、J e T S H : 配列番号 16) 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 10 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 F S H、J e F S H、J e G T H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S 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。

10

20

【 0 0 6 5 】

図 14 から分かるように、J e F S H、J e F S H、J e G T H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S H はそれぞれ約 33、19、18、33、18、33、18 k D a で蛋白質のバンドが現れ、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 高い数値であって、糖鎖修飾による結果である。

【 0 0 6 6 】

【表 2】

区分	塩基配列	配列番号
JeFSH	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECEGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYQQACNFRDVVYET VHLPGCPGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTHSYPNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHK F	11
JeGTH α	MMVCPGKPGASLLMLSMLFH IIDSYPNNEMARGGCDECRL QENNIIFSKPSAPIFQCVGCC FSRAYPTPLRSKKTMLVPKN ITSEATCCVAREVTRLDNMK LENHTDCHCSTCYHK	12
JeLH	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPDFCMSQRASLPA SYPNNEMARGGCDECRLQEN KIFSRPSAPIFQCVGCCFSR AYPTPLRSKKTMLVPKNITS EATCCVAREVTRLDNMKLEN HTDCHCSTCYHKF	13
JeLH β	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPDFCMSQRASLPA	14
JeTSH	MRVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTYLYVEKPECFV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRCSKPLLLHMAYPGQ SNHIQTL SYPNNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHK F	15
JeTSH β	MRVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTYLYVEKPECFV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRCSKPLLLHMAYPGQ SNHIQTL	16

10

20

30

【0067】

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 JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeLH、JeLH、JeTSH、JeTSH 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。

【0068】

図 15 から分かるように、CBB と同様なサイズの JeFSH、JeLH、JeTSH は約 33 kDa で、JeFSH、JeGTH、JeLH、JeTSH は約 18 kDa でバンドが現れ、His 抗体は全てのホルモン蛋白質と結合するのを確認した。

40

【0069】

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 JeFSH、JeFSH、JeGTH、JeLH、JeLH、JeTSH、JeTSH 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 JeFSH モノ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。

【0070】

図 16 から分かるように、比較例 1 の抗体は JeFSH、JeFSH 以外にも共通配列の GTH α を非特異的に認識して 4、7、10 レーンでバンドが現れ、また 2、5、8

50

番レーンで二つのバンドを形成してアルファサブユニットとも結合することを確認した。したがって、比較例 1 抗体は非特異的な反応をるところ、J e F S Hのみを特異的に検出するには不適切であることを確認した。

【 0 0 7 1 】

1 - 4 . 比較例 2 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 F S H、J e F S H、J e G T H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S 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比較例 2 で製造したウナギ F S H - とマウスの m C G - 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 1 7 に示した。

10

【 0 0 7 2 】

図 1 7 から分かるように、比較例 2 の抗体は J e F S H、J e F S 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 L H (5 レーン)、L 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 2 抗体は J e F S Hのみを特異的に検出するに不適切であるのが分かった。

【 0 0 7 3 】

1 - 5 . 本発明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 F S H、J e F S H、J e G T H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S 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有効配列 1 のポリペプチドと有効配列 2 の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 8 に示した。

20

【 0 0 7 4 】

図 1 8 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 F S H、J e F S 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)、L H と 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 L H、J e L H、J e T S H、J e T S H とは結合せず、J e F S 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。

30

【 0 0 7 5 】

本発明のポリクローナル抗体は比較例 1 の J e F S H モノクローナル抗体と比較例 2 の J e F S H / m C G 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 F S H 以外の他の G T H とともに非特異的に結合する問題点を解決したものであって、F S 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 6 】

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 F S H、J e F S H、J e G T 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有効配列 1 のポリペプチドと有効配列 2 の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を 1 : 5、0 0 0、1 : 1 0、0 0 0 または 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 9 に示した。

40

【 0 0 7 7 】

図 1 9 に示されているように、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バンドが明確に現れ、本発明ポリクローナル抗体の F S H 特異性を確認することができた。

【 0 0 7 8 】

50

実験例 3：抗体を用いた試料中の J e F S H 検出

ウナギの血液には G T H 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 F S 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、その結果を図 2 0 に示した。

10

【 0 0 7 9 】

図 2 0 に示されているように、J e L H と J e T S H 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 J e F S H 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 (c o m p e t i t i o n i m m u n o b l o t t i n g) 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 J e F S H 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 】

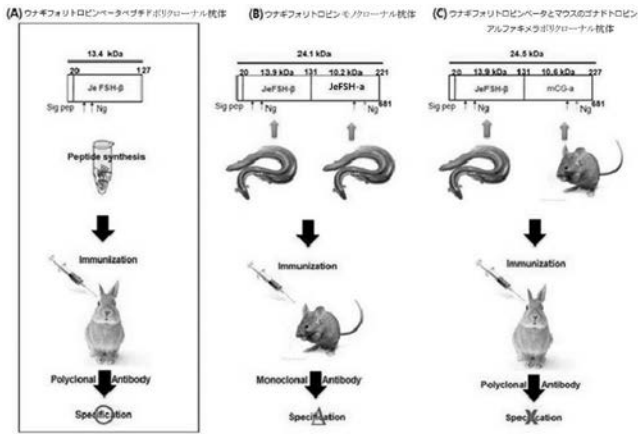
【 0 0 8 0 】

- 配列番号 1 : JeFSH N'56-68番目アミノ酸配列
- 配列番号 2 : JeFSH N'114-123番目アミノ酸配列
- 配列番号 3 : JeFSH- /JeFSH- 単一鎖抗原アミノ酸配列
- 配列番号 4 : JeFSH- /JeFSH- 単一鎖抗原塩基配列
- 配列番号 5 : JeFSH- /mGTH- キメラ抗原アミノ酸配列
- 配列番号 6 : JeFSH- /mGTH- キメラ抗原塩基配列
- 配列番号 7 : JeFSH Fullアミノ酸配列
- 配列番号 8 : JeFSH- 分泌信号配列
- 配列番号 9 : JeFSH- 親水性部分
- 配列番号 1 0 : JeFSH- 疎水性部分
- 配列番号 1 1 : JeFSH のポリペプチド配列
- 配列番号 1 2 : JeGTH のポリペプチド配列
- 配列番号 1 3 : JeLH のポリペプチド配列
- 配列番号 1 4 : JeLH のポリペプチド配列
- 配列番号 1 5 : JeTSH のポリペプチド配列
- 配列番号 1 6 : JeTSH のポリペプチド配列

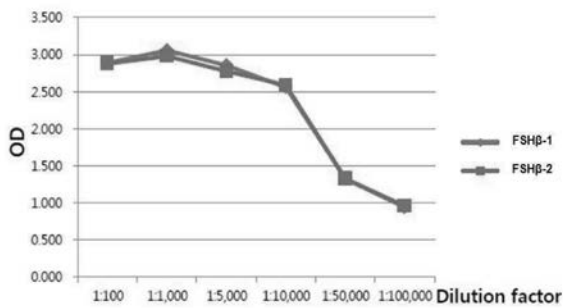
20

30

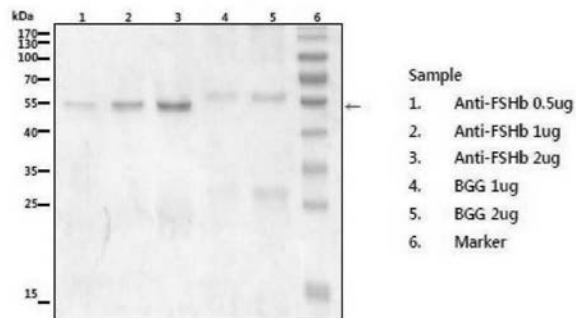
【 図 9 】



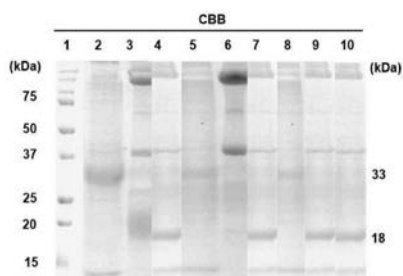
【 図 10 】



【 図 13 】

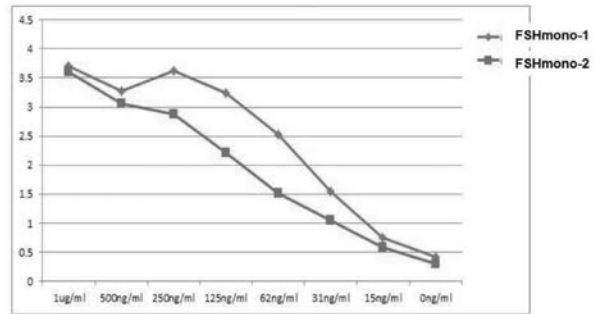


【 図 14 】

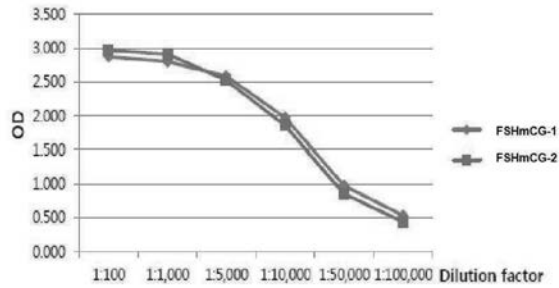


1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, GTHα; 5, LH; 6, LHβ; 7, GTHα; 8, TSH; 9, TSHβ; 10, GTHα

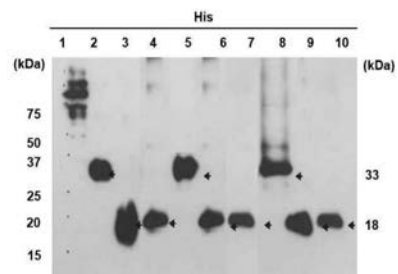
【 図 11 】



【 図 12 】

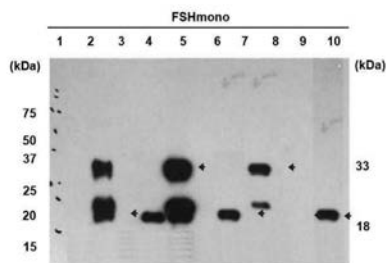


【 図 15 】



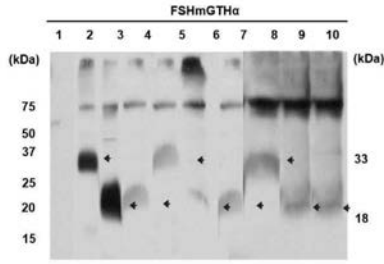
1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, GTHα; 5, LH; 6, LHβ; 7, GTHα; 8, TSH; 9, TSHβ; 10, GTHα

【 図 16 】



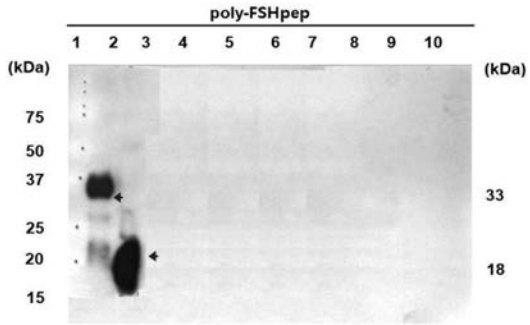
1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, GTHα; 5, LH; 6, LHβ; 7, GTHα; 8, TSH; 9, TSHβ; 10, GTHα

【 図 1 7 】



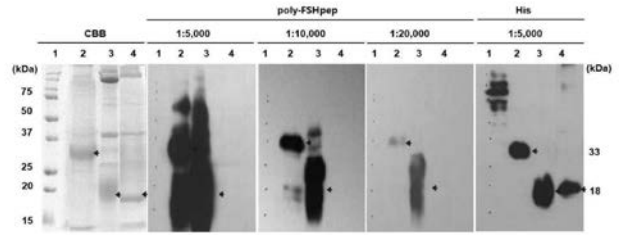
1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, GTHα; 5, LH; 6, LHβ; 7, GTHα; 8, TSH; 9, TSHβ; 10, GTHα

【 図 1 8 】

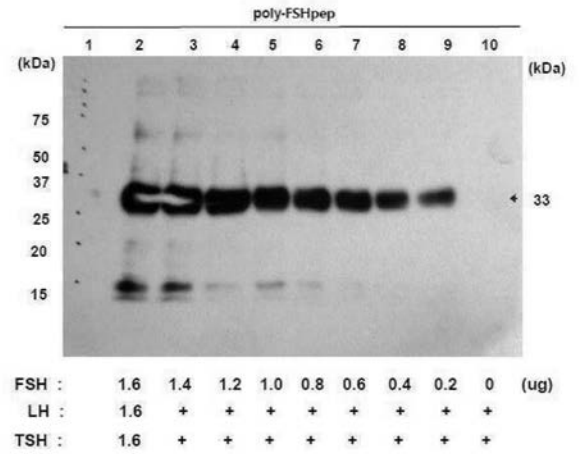


1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, GTHα; 5, LH; 6, LHβ; 7, GTHα; 8, TSH; 9, TSHβ; 10, GTHα

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 配 列 表 】

[2019099548000001.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) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ45 QQ53 QQ94 QR31 QS34

4H045 AA11 AA30 BA09 BA10 CA42 DA75 EA50

