

【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*) の甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone、TSH) 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 TSH 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; follicitropin; FSH)、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 TSH 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、キャリア蛋白質をさら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、生物学的試料内ウナギ (*Anguilla japonica*) の甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone、TSH) 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 FSH、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*) の甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone、TSH) 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*) の甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone、TSH) 探知用マーカ。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウナギの甲状腺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甲状腺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】

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。

10

20

【0003】

一般的な脊椎動物の脳下垂体糖蛋白質ホルモン (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 (-) 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おり、ベータサブユニットの各ホルモン別に相異なる特異的な配列によって各ホルモンの特異的な活性および種特異性 (species specificity) を示す。アルファとベータサブユニットはそれぞれ異なる遺伝子によって形成され、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) で連結される。

30

【0004】

甲状腺刺激ホルモン (Thyroid Stimulating Hormone, TSH) はサイトロロピンとも呼ばれ、TSHの合成と分泌は視床下部 (hypothalamic) サイトロロピン分泌ホルモン (Thyrotropin Releasing Hormone, TRH) と負のフィードバック (negative feedback) でサイトロロピン (TSH)、トリヨードチロニン (Triiodothyronin, T3)、チロキシン (Thyroxine, T4) によって調節され、これは視床下部-脳下垂体-甲状腺 (Hypothalamus-Pituitary-Thyroid, HPT) 軸から構成される。

40

【0005】

TSHはウナギの発達 (development)、成長 (growth)、新陳代謝 (metabolism)、行動 (behavior) と繁殖 (reproductio

50

n)において重要な影響を及ぼす因子であり、遡河魚類(anadromous fish)の移動、移住、脱皮、海適応などに関連があると知られている。特に、TSHは幼い魚類の体にグアニンを沈着させ、体を銀色化(body silverling)させてシルバーウナギに変異させることと関連がある。アナゴ(conger eel)の場合、TSHはレプトセファルス(leptocephalus、葉形幼生)からシラスウナギ(elver、ウナギの幼魚)への脱皮を調節するのに重要な役割を果たすと知らされている。また、ウナギの視床下部-脳下垂体-甲状腺軸(HPT axis)は繁殖とも密接な関連があり、甲状腺(thyroid status)と生殖腺(gonadal status)に一時的、瞬間的に重要な影響を及ぼし、硬骨魚類の場合、TSHの活性は生殖腺の初期発達の間増加、維持され、産卵後には一般に減少すると知られている。

10

【0006】

しかし、現在までウナギの生理内分泌研究、環境汚染などによる内分泌系障害物質による魚類生体内の変化は詳しく知られていない。これはウナギが河と海の両方で棲息する複雑なライフサイクルを有する降河性魚類であり、人工養殖の不完全性によってウナギの生体内内分泌研究が容易ではないためである。特に、ウナギの幼虫脱皮、成長、発達などを調節するTSHのみを特異的に検出するマーカに関しては現在まで知られているところがなく、これによってウナギにおいてHPT軸の機序に関しても明確に明らかになることはなかった。

20

【0007】

一方、ウナギの人工養殖のために性腺刺激ホルモンを探知するマーカに関しては一部研究されたことがあるが、TSHはウナギの生殖機能に直接的な影響を及ぼさないと知られていて、前記性腺刺激ホルモンに比べて関連研究が微少であり、TSHホルモンの生産および確保、TSH探知マーカ、抗体などの開発が不足しているのが実情である。

【0008】

現在まで人工種苗養殖のために他種ホルモンの反復投与または環境調節実験と研究中に発生するウナギの生体内ホルモンの変化を判定する基準は大部分肉眼に依存してきたが、このような基準はウナギ個体および人ごとに異なって正確度が非常に落ちた。したがって、ウナギの生理内分泌の変化を明確に測定することができるマーカ、特にウナギの発達、成長、新陳代謝、行動および繁殖などに重要な影響を及ぼすTSHホルモンを探知することができるマーカの開発が必要である。このようなTSHホルモンマーカは環境汚染がウナギの生体内HPG軸に及ぼす内分泌系障害を測定する生物学的指標として利用可能である。

30

【0009】

従って、本発明は前記問題点を解決し、ウナギの成長、発達、性成熟、ウナギ捕獲後の健康生態確認または外部要因によるウナギの生理状態変化などを測定するために、TSHを特異的に探知することができるマーカを開発し、さらにこれを用いてウナギ試料のTSHを探知し、ウナギの生理状態を測定することができる方法を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0010】

【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】

【0011】

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、ウナギの甲状腺刺激ホルモン(Thyroid stimulating hormone、TSH)を特異的に探知することができる抗体を提供する。

50

【0012】

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TSH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TSH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TSHホルモンの特異的探知用組成物を提供する。

【0013】

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TSHホルモンを特異的に探知する方法を提供する。

10

【0014】

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TSH探知用マーカを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、ウナギの類似ホルモンは除いてウナギの甲状腺刺激ホルモン(Thyroid stimulating hormone、thyrotropin、TSH)のみを特異的に認識、探知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生理状態、内分泌系変化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。

20

【0016】

本発明は、下記表1の配列番号1(CDPARDECTHR)および配列番号2(CTHRASADGDR)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TSH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TSHと特異的に認識する抗体を提供する。

【0017】

【表 1】

区分	配列	配列番号
JeTSH β N' 108-118 番目 アミノ酸配列	CDPARDECTHR	1
JeTSH β N' 115-124 番目 アミノ酸配列	CTHRASADGDR	2
JeTSH β Full アミノ酸配列	MRVVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTLVVEKPECDFCV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRC SKPLLLHMHAYPGQ SNHIQTL	3
JeTSH- β 分泌信号配列 N' 1-21 番目 アミノ酸配列	MRVVLLASGVLCLLAGQVLSI	4
JeTSH- β 親水性部分 1	LHCTCRACDP ARDECTHRAS ADGDRC SKPL	5
JeTSH- β 親水性部分 2	ARDECTHRAS ADGDRC SKPL LLHMHAYPGQ	6

10

20

【0018】

前記“ウナギTSH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、FSH、GTHなど）および他魚種由来の性成熟ホルモンからウナギのTSHのみを特異的に選抜することができるマーカを意味する。

30

【0019】

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TSHを特異的に認識する抗体”とは、濾胞刺激ホルモン（Follicle-stimulating hormone; follicotropin; FSH）、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TSHのみに特異的に結合する抗体であってもよい。

40

【0020】

本発明の一例によれば、前記TSH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または配列番号2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 se

50

nsitizing) に用いることも可能である。

【0021】

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 (CDPARDECTHRA) および配列番号2 (DECTHRASADGDR C) 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TSH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。

10

【0022】

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。

20

【0023】

また、本発明で、抗体は前記TSH - 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TSH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TSHホルモン特異的探知用組成物を提供する。

【0024】

前記生物学的試料はFSH、LH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TSHホルモン探知用組成物は、生物学的試料に含まれているFSH、LHまたはGTHとは結合せず、TSHに特異的に結合する。生物学的試料にTSH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。

30

【0025】

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TSH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。

【0026】

本発明のキットは、TSH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。

40

【0027】

本発明の一例は、前記抗体を生物学的試料と接触させて前記試料内で抗原-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TSHホルモンを探知する方法

50

を提供する。

【0028】

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、TSH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TSHの存在有無と含量を測定することができる。

10

【0029】

本願で“抗原 - 抗体複合体”とはTSH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。

20

【0030】

一具体例として、TSH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、TSH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。

【0031】

また、本発明は、前記TSHを特異的に認識する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生理状態を測定する工程を含む、ウナギの生理状態測定方法を提供することができる。

【0032】

前記ウナギの生理状態とはTSHホルモンによって影響を受ける全てのウナギ生体内機序を意味し、例えば、ウナギの成長程度、発達状態、新陳代謝、行動、繁殖などを含むことができる。TSH抗原 - 抗体複合体の形成有無および定量的にTSHの量を測定することによって、検体のTSH状態を正確に把握することができ、TSHが及ぼす検体ウナギの生理状態を把握可能である。

30

【0033】

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TSH探知用マーカを提供する。

40

【0034】

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および配列番号2のアミノ酸配列からなるペプチドを全て含むウナギのTSH探知用マーカであってもよく、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を全て含むTSH探知用マーカを提供することができる。

【0035】

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TSH -

50

サブユニット（配列番号3）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TSHの遺伝子配列とウナギの他のホルモン（LH、FSHなど）との類似性を考慮してTSHベータにおいて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、ウナギの他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。

【0036】

下記の実験例で確認したように、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多様なホルモンが含まれている検体においてTSH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ホルモンとは結合せず、ただTSHのみに特異的に抗原-抗体反応が起こるので、ウナギのTSH特異検出抗体として使用するのに適切である。

【0037】

また、本発明は、前記ウナギのTSH探知用ペプチドマーカ（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を検出できる製剤を含むウナギのTSH検出用組成物およびキットを提供し、ウナギの生理状態を判断するために、ウナギの生物学的試料から前記ウナギTSH探知用ペプチドマーカとこれをコードする

【0038】

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TSH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TSH探知用マーカを提供することができる。

【0039】

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TSH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。

【0040】

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

【0041】

本発明で“蛋白質を検出できる製剤”は、試料内でTSH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、前記TSH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TSH-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ダ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TSH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。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0042】

本発明は、ウナギの甲状腺刺激ホルモン（TSH）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甲状腺刺激ホルモンの存在有無を容易に探知することができ、複合体形成程度によってウナギ甲状腺刺激ホルモンを定量的に分析可能であり、ウナギ生体内変化を容易に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】実施例1-1によって、ウナギTSH-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TSH-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TSH-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TSH-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TSH-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。 20

【図6】実施例1-2によって、ウナギFSH、LH、TSH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TSH-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】ウナギTSH抗体生産の全過程の模式図を示したものである。

【図8】実施例2によって、TSH-のN-末端から108-118番目の11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TSH-のN-末端から115-124番目の11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。 30

【図9】実施例2によって、TSH-のN-末端から108-118番目の11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TSH-のN-末端から115-124番目の11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10】実験例1-1によって、蚕蛹から生産したJeFSH、JeFSH、JeLH、JeLH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEしてCBB染色した結果である。 40

【図11】実験例1-2によって、蚕蛹から生産したJeFSH、JeFSH、JeLH、JeLH、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12】実験例1-3によって、蚕蛹から生産したJeFSH、JeFSH、JeLH、JeLH、JeTSH、JeTSH、JeGTHを対象にしてSDS-PAGEを行った後、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TSH-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13】実験例2によって、蚕蛹から生産したJeTSH、JeTSH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TSH-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14】実験例3によって、蚕蛹から生産したJeFSH、JeLH、JeTSH 1.6 µg混合後、JeTSH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TSH-ペプチドに対する本発明の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】

10

【0044】

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】

【0045】

実施例1：ウナギのTSHに特異的なマーカ選定

1-1：TSH-サブユニットの分析

ウナギTSH-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TSH-サブユニット(配列番号3)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5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の一番目に予測された親水性(Hydrophilic)配列部分は図4に、二番目に予測された親水性配列部分は図5に示した。

20

30

40

【0046】

図1乃至図5から分かるように、ウナギTSH-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)、分泌信号配列はN-末端から1-21番目アミノ酸配列部分(配列番号4)が存在するのを確認し(図2)、N-末端から43番目アミノ酸のN(N-T-T、アスパラギン酸(N)-トレオニン(T)-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)、N-末端から101番目~130番目まで総30個のアミノ酸配列(配列番号5)が親水性の高い部分(図4)であって、そのうちのCDPARDECTHR(配列番号1)が親水性領域であり、111番目~140番目まで総30個のアミノ酸配列(ARDECTHRAS ADGDRCSKPL LLHMHAYPGQ-配列番号6)領域が二番目に確認した親水性の高い部分であって(図5)、そのうちのCTHRASADGDR(配列番号2)が親水性領域であることを確認した。

【0047】

1-2：TSH-サブユニットをFSH、LH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

50

した。

【0048】

TSHとLHのホモロジースコア(homology score)は29、TSHとFSH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TSHベータサブユニットの配列のうちTSH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配列部分を表示したものである。

【0049】

1-3: TSH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TSHとFSH、LH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TSH-サブユニットのN末端から108-118番目のアミノ酸配列部分(CDPARDEC THR-配列番号1)と115-124番目アミノ酸配列部分(CTHRASADGDR-配列番号2)をTSH-ポリクローナル抗体製造用マーカペプチドに選定した。

【0050】

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)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。

【0051】

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%SDS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次抗原を注入した。これから2週経過後に採血し、3次抗原を注入し、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。その次に、採取した血液と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TSH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450nm波長で(Perkinelmer victor X3)で測定して直接ELISA(direct ELISA)分析を行った(図8)。

【0052】

図8から分かるように、ELISA分析の結果、血液とTBSTバッファを1:100,000の比率以上に混合したウナギJeTSH探知用組成物を処理した時にOD値が2.0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類似の傾向を示した。

【0053】

追加的に、前記で生産したJeTSH-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9に示した。図9の4-6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、1、2番レーンは濃度確認のためにBGG(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、3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。

【0054】

実験例1: 抗体のTSH特異性評価

10

20

30

40

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 L H、J e L H、J e T S H、J e T S H、J e G T H を 12% 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 i a n t B l u e、C B B) 染色を行い、その結果を図 10 に示した。

【 0 0 5 5 】

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 7、J e F S H : 配列番号 8、J e L H : 配列番号 9、J e L H : 配列番号 10、J e T S H : 配列番号 11、J e T S H : 配列番号 3、J e G T H : 配列番号 12) 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した。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した。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た後にそれぞれの J e F S H、J e F S H、J e L H、J e L 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。

10

20

【 0 0 5 6 】

図 10 から分かるように、C B B 染色の結果、J e F S H、J e F S H、J e L H、J e L H、J e T S H、J e T S H、J e G T H はそれぞれ約 33、19、33、18、33、18、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 5 7 】

【表 2】

区分	塩基配列	配列番号
JeFSH	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECCGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGCPSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTHSYNNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHKK F	7
JeFSH β	MHLAVTALCLTLAPVLARAS TSCGLANISISVENECCGGC ITFNTTACAGLCFTQDSVYK SSLKSYPQQACNFRDVVYET VHLPGCPSGMDLHFTYPVAL SCECSKCDTDSTDCGPLNTE VSGCLTH	8
JeLH	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPFDCMSQRASLPA SYNNEMARGGDCDECRLQEN KIFSRPSAPIFQCVGCCFSR AYPTPLRSKKTMLVPKNITS EATCCVAREVTRLDNMKLEN HTDCHCSTCYHKKF	9
JeLH β	MSVYPECTWPLFVCLCHLLV SAGGSLLLPCEPINETISVE KDGCPKCLVFQTSICSGHCI TKDPSYKSPLSTVYQRVCTY RDVRYETVRLPDCRPGVDPH VTFPVALSCDCNLCTMDTSD CAIQSLRPFDCMSQRASLPA	10
JeTSH	MRVVLLASGVLCLLAGQVLS ICSPVDYTYLYVEKPECDFCV AINTTICMGFCYSLDPNVVG PAVKRLAVQRGCTYQAVEYR TAELPGCPPHVDPRFSYPVA LHCTCRACDPARDECTHRAS ADGDRCSPKPLLLMHAYPGQ SNHIQTLSPNNEMARGGCD ECRLQENKIFSKPSAPIFQC VGCCFSRAYPTPLRSKKTML VPKNITSEATCCVAREVTRL DNMKLENHTDCHCSTCYHKK F	11
JeGTH α	MMVCPGKPGASLLMLSMLFH IIDSYPNNEMARGGDCDECRL QENNIFSKPSAPIFQCVGCC FSRAYPTPLRSKKTMLVPKN ITSEATCCVAREVTRLDNMK LENHTDCHCSTCYHKK	12

10

20

30

40

【0058】

1 - 2 . His 抗体の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 β 、JeLH、JeLH β 、JeTSH、JeTSH β 、JeGTH α を SDS - PAGE した後、ニト

50

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を行い、その結果を図11に示した。

【0059】

図11から分かるように、H i s抗体を処理した時、H i s抗体は全てのホルモン蛋白質と結合するのを確認し、さらにC B B染色から確認されたタンパク質バンドと同様に約33、18kDaで確認され、それぞれの組換えタンパク質全部が検出された。

【0060】

1-3. 本発明のポリクローナル抗体の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 L H、J e L 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のポリペプチドと配列番号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12に示した。

10

【0061】

図12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 T S H、J e T 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(8レーン)、J e F S HとJ e L Hの特異配列(2、3、4、5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J e F S H、J e F S H、J e L H、J e L H、J e G T Hとは結合せず、J e T 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。従って、試料内J e T S H検出において本発明のポリクローナル抗体が優れたJ e T S H検出特異性を有するのが分かった。

20

【0062】

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 T S H、J e T S 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のポリペプチドと配列番号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1：5，000、1：10，000または1：20，000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13に示した。

【0063】

図13に示されているように、ポリクローナル抗体を1：20，000の比率で希釈して処理した時にもバンドが現れ、本発明ポリクローナル抗体のT S H 特異性を確認することができた。さらに、H i s抗体を処理した場合と比較してマイナーバンドの認識なくT S Hのみを明確に検出されるのを確認した。

30

【0064】

実験例3：抗体を用いた試料中のJ e T S 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、ウナギの血液と類似な環境で本願発明ポリクローナル抗体のJ e T S Hの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 T S H、J e F S H、およびJ e L Hをそれぞれ1.6μgずつ混合した試料、その次にそれぞれの混合量を0.2μgずつ減少させて(1.6、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0)混合した試料の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14に示した。

40

【0065】

図14に示されているように、J e F S H、J e L Hと混合された状態でJ e F S H、J e L H認識なくJ e T S Hのみが投与量に比例してバンドの強度が減少するのを確認することができ、本発明のポリクローナル抗体がJ e T S Hに特異的に結合するのが分かった。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 T S

50

Hのみを特異的に検出することができるのが分かった。

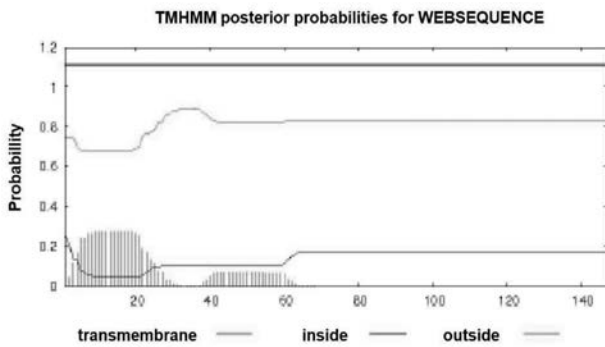
【配列表フリーテキスト】

【0066】

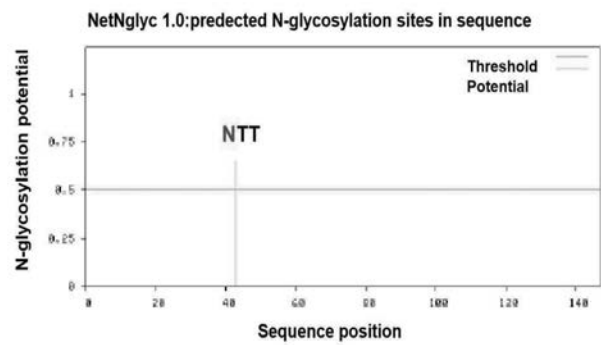
- 配列番号 1 : JeTSH N'108-118番目アミノ酸配列
- 配列番号 2 : JeTSH N'115-124番目アミノ酸配列
- 配列番号 3 : JeTSH Fullアミノ酸配列
- 配列番号 4 : JeTSH- 分泌信号配列
- 配列番号 5 : N'1-21番目アミノ酸配列
- 配列番号 6 : JeTSH- 親水性部分1
- 配列番号 7 : JeTSH- 親水性部分2
- 配列番号 8 : JeFSHのポリペプチド配列
- 配列番号 9 : JeFSH のポリペプチド配列
- 配列番号 10 : JeLHのポリペプチド配列
- 配列番号 11 : JeLH のポリペプチド配列
- 配列番号 12 : JeTSHのポリペプチド配列
- 配列番号 13 : JeGTH のポリペプチド配列

10

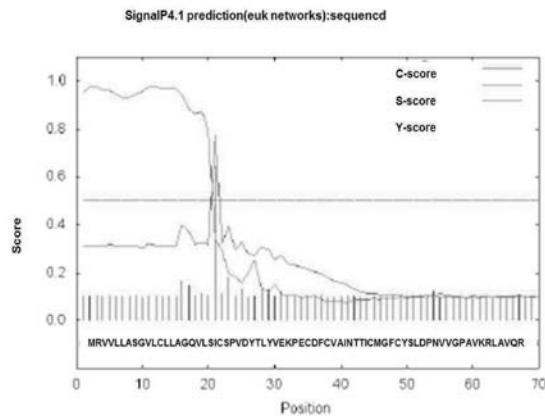
【図1】



【図3】

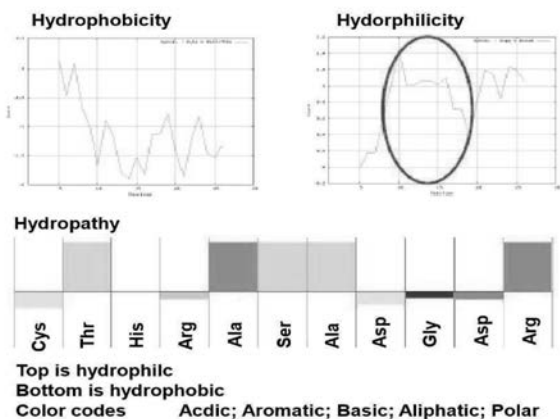


【図2】



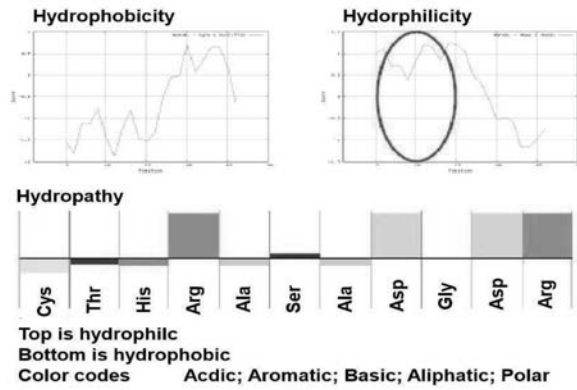
【図4】

101 LHCTCRACDE ARDECTHRAS ADGDRCSKPL 130



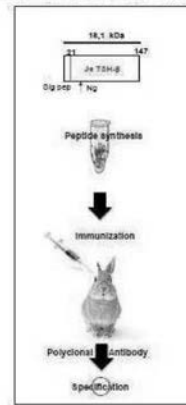
【 図 5 】

111 ARDECTHRAS ADGDRCSKPL LLHMAYPGQ 140

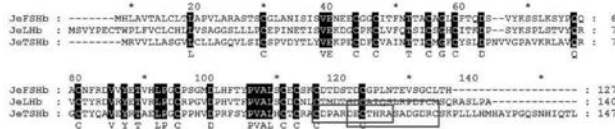


【 図 7 】

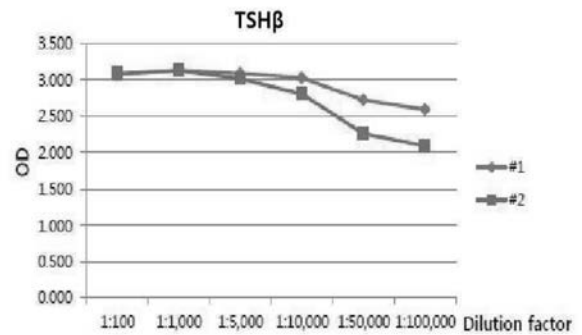
ウナギルテオトロピンβペプチドポリクローナル抗体



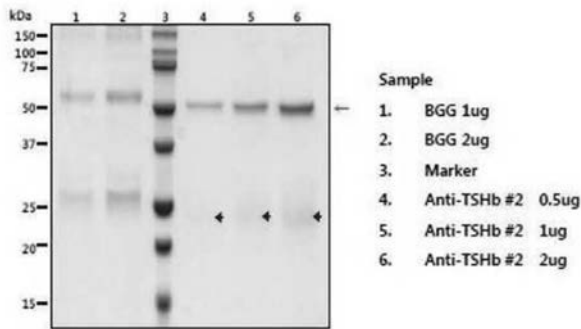
【 図 6 】



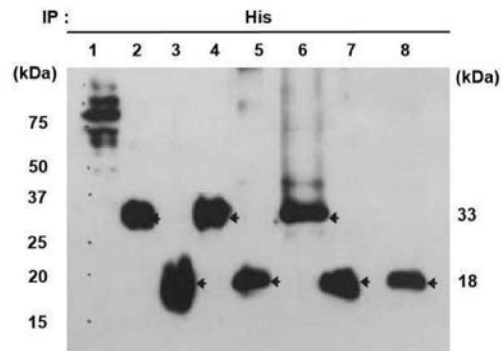
【 図 8 】



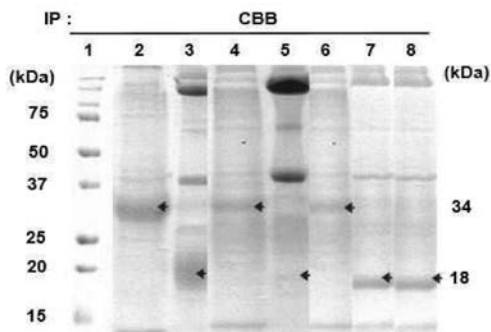
【 図 9 】



【 図 1 1 】



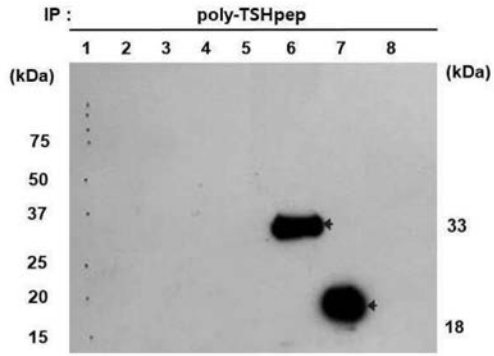
【 図 1 0 】



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

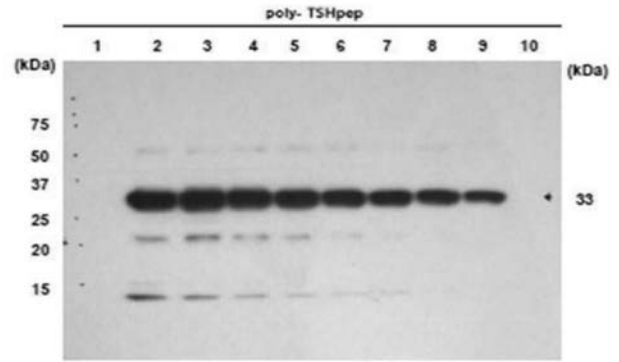
1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, LH; 5, LHβ; 6, TSH ; 7, TSHβ; 8, GTHα

【 図 1 2 】



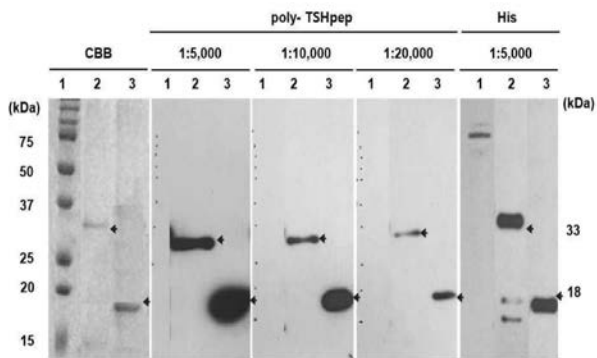
1, Marker; 2, FSH; 3, FSHβ; 4, LH; 5, LHβ; 6, TSH; 7, TSHβ; 8, GTHa

【 図 1 4 】



TSH :	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0	(ug)
FSH :	1.6	+	+	+	+	+	+	+	+	
LH :	1.6	+	+	+	+	+	+	+	+	

【 図 1 3 】



【 配 列 表 】

2019099549000001.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 AA20 AA30 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	鳗鱼促甲状腺激素特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2019099549A	公开(公告)日	2019-06-24
申请号	JP2018082691	申请日	2018-04-24
[标]发明人	ホンソンミ キムデジュン		
发明人	ホン ソン ミ チェ ジ ヒョン ジョ ソン ジョン チェ ソン チャン パク ニョン ホ キム デジュン		
IPC分类号	C07K16/26 C12N15/16 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/26.ZNA C12N15/16 G01N33/53.E		
F-TERM分类号	4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1020170165449 2017-12-04 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题]提供能够特异性检测鳗鱼的促甲状腺激素 (TSH) 的抗体。 种类代码 : A1用于检测含有选自特定氨基酸序列中的一种或多种的鳗 (*Anguilla japonica*) 的甲状腺刺激激素的肽标记物用作抗原, 并且其特异性结合鳗鱼TSH。的抗体。 [选图]图6

