(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4394954号
(P4394954)
(45)発行日　平成22年1月6日(2010.1.6)　(24)登録日　平成21年10月23日(2009.10.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/23	(2006.01)	C07K	7/23	ZNA
A01K 61/00	(2006.01)	A01K	61/00	A
A61K 38/24	(2006.01)	A61K	37/38	
A61P 15/00	(2006.01)	A61P	15/00	171
G01N 30/46	(2006.01)	G01N	30/46	A

請求項の数 6　(全 14 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-564080 (P2003-564080)
(86)(22)出願日　平成15年1月30日 (2003.1.30)
(65)公表番号　特表2005-529070 (P2005-529070A)
(43)公表日　平成17年9月29日 (2005.9.29)
(86)国際出願番号　PCT/IN2003/000015
(87)国際公開番号　WO2003/064460
(87)国際公開日　平成15年8月7日 (2003.8.7)
審査請求日　平成17年12月15日 (2005.12.15)
(31)優先権主張番号　60/353,041
(32)優先日　平成14年1月30日 (2002.1.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　599032822
カウンセル　オブ　サイエンティフィック　アンド　インダストリアル　リサーチ
インド　ニューデリー－１１０　００１
ラフィ　マージ
(73)特許権者　504290701
デパートメント　オブ　バイオテクノロジー
インド国　１１０　００３　ニュー　デリー，　ロドヒ　ロード，　シージーオー　コンプレックス，　デパートメント　オブ　ガバメント　オブ　インディア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】２つの性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよびそれらを単離するための方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
性腺刺激ホルモンの生成を活性化することによる、魚類における誘導性繁殖のための組成物であって、アミノ酸配列ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧ（配列番号１）からなる単離されたｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびＱＨＷＳＷＧＩＬＰＧ（配列番号２）からなる単離されたｍｕＧｎＲＨ　ＩＩを含み、該単離されたｍｕＧｎＲＨ　Ｉ（配列番号１）と該単離されたｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ（配列番号２）とが約１：１の比率で該組成物中に存在し、該組成物は、性腺刺激ホルモンの放出を約５０倍増加させる、組成物。
【請求項２】
請求項１に記載の組成物であって、該単離されたｍｕＧｎＲＨ　Ｉおよび該単離されたｍｕＧｎＲＨ　ＩＩは、インディアンムーレル（Ｉｎｄｉａｎ　Ｍｕｒｒｅｌ）の脳から得られる、組成物。
【請求項３】
請求項１に記載の組成物であって、ｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ（配列番号２）は、ｍｕＧｎＲＨ　Ｉ（配列番号１）よりも活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモンである、組成物。
【請求項４】
請求項１に記載の組成物であって、該単離されたｍｕＧｎＲＨ　Ｉおよび該単離されたｍｕＧｎＲＨ　ＩＩは、魚類の誘導性繁殖において相乗効果を示す、組成物。
【請求項５】
請求項１に記載の組成物であって、該組成物は、哺乳動物ＧｎＲＨ、サケＧｎＲＨ、Ｇｎ

ＲＨスーパー活性アナログ、および市販のＧｎＲＨ　Ｏｖａｐｒｉｍを含む他のＧｎＲＨよりも活性である、組成物。
【請求項６】
請求項１に記載の組成物を使用して魚類において繁殖を誘導する方法であって、該方法は、
　魚類を、該組成物に曝露して、性腺刺激ホルモンを放出するのを補助する工程；および
　該性腺刺激ホルモンを使用して、魚類において繁殖を誘導する工程；
を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
　本発明は、新規な２つの性腺刺激ホルモン放出ホルモンである、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ（それぞれ、アミノ酸配列番号１（ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧ）および配列番号２（ＧＨＷＳＷＧＩＬＰＧ））に関し、これらは、組み合わせおよび単独の両方で、性腺刺激ホルモンの産生を活性化することによって魚類における誘導された繁殖に有用であり、そして、インディアンムーレルの脳からこれらを単離する方法、およびこの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して魚類における繁殖を誘導する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
　性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）は、現在、魚類の誘導された繁殖のための最も利用可能なバイオテクノロジーのツールである。ＧｎＲＨは、全ての脊椎動物における生殖のカスケードの重要な調節因子であり、かつ中心的な開始因子である。
【０００３】
　それは、デカペプチドであり、黄体形成ホルモン（ＬＨ）および卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）の下垂体放出を誘導する能力を有するブタおよびヒツジの海馬から単離される。それ以来、ＧｎＲＨの１つの形態のみが、ＬＨおよびＦＳＨの放出を引き起こす唯一の神経ペプチドとして、胎盤哺乳動物（ヒトを含む）において最も同定されている。
【０００４】
　しかし、非哺乳動物種（モルモットを除く）において、１２のＧｎＲＨ改変体が、現在構造的に明らかにされており、これらのうち、７つの異なる形態は、魚類から単離されている。構造的改変体およびそれらの生物学的活性に依存して、多くの化学的アナログが調製され、それらのうちの１つは、サケ（ｓａｈｎｏｎ）ＧｎＲＨアナログであり、現在、魚類の繁殖によく使用されており、全世界で市販されている。疑問なのは、なぜ魚類は、雄および雌のパートナーから生殖細胞を放出するために、この神経ペプチドホルモンによる誘導を必要とするのか、そしてなぜ、それにより、精子による卵母細胞の受精が水性環境において生じ得るのかということである。
【０００５】
　実際、陸に固定された水における商業用の重要な培養可能な魚類のほとんどは、それらがホルモンによって誘導されるまで繁殖しない。海水または河川の水における魚類は、それらの繁殖のためにホルモンによる誘導を必要としない。しかし、海または河川における産生の収率を増加させるという意図で魚類を培養することは、可能ではない。培養は、制御可能な領域を必要とし、これが、収率を増大させるための水酸養殖が、陸に固定された水性本体（ここで、魚類は、通常、ホルモンの誘導なしに繁殖も産卵もしない）に制限される理由である。
【０００６】
　魚肉は、全ての動物の肉のうちで最も高品質であることが見出されているので、最近、全世界の潮流として、主要な律速因子が繁殖されている漁業産業が非常に増加している。魚類の誘導された繁殖は、現在、ＧｎＲＨ技術の発展によって首尾良く達成される。この概要において、本発明者らの食物供給の非常に重要な領域のバイオテクノロジーを理解す

るための簡単な説明が、与えられる。
【０００７】
ＧｎＲＨの構造 － ＧｎＲＨをデカペプチドとして哺乳動物の海馬から単離した（Ｂｕｒｇｕｓら，１９７２；Ｍａｓｔｕｏら，１９７１）。それ以来、ＧｎＲＨの幾つかの構造的改変体が、図１に見られ得るように記載されている（添付の図面の簡単な説明という表題の下に示される）。
【０００８】
ＧｎＲＨペプチド長における著しい保存が存在し、第１の４つの－ＮＨ２末端および２つの－ＣＯＯＨ末端アミノ酸は、異なる脊椎動物において顕著に保存されている。５アミノ酸残基と８アミノ酸残基との間にいかなる変化が生じようとも、８位は、最も可変的であり、続いて、６位、５位そして７位が可変的である。この非常に可変的な８位は、種間での生物学的活性のバリエーションにおけるその役割および下垂体細胞膜上のＧｎＲＨレセプターを認識する際のその重要な役割を示唆する。その生物学的機能を実行するために、それは、まず、下垂体性腺刺激細胞膜上のそのレセプターを認識し、そして、そのようにしなければならない場合、その線状構造は、ループへと変化する。ＧｎＲＨのＮＨ２－末端およびＣＯＯＨ－末端は、ＧｎＲＨがそのレセプターに結合する場合、近接して対向し、これは、残基５～８を含むＰ－ＩＩ型ｒｕｍからの提案された結果である。このＰターンは、Ｎ末端とＣ末端とを整列させるヘアピンループを生成する（Ｓｅａｌｆｏｎら，１９９７）（図２）。（添付の図面の簡単な説明という表題の下に示される）。
【０００９】
インドの魚類からのＧｎＲＨ － インドは、幾つかの種類の固有の培養可能な硬骨魚を有するが、実際には、それらのＧｎＲＨについて何も知られていない。このことは、実に、非常に不幸なことであり、このために、本発明者らはなお、本発明者らの商業的に重要な培養可能な魚類の生殖の生物学を調査するために、他国からの供給に依存している。なぜなら、ＧｎＲＨは、生殖の制御機構の重要な調節因子であるからである。
【００１０】
数年前に、本発明者らは、この研究を開始し、そして重大な問題に直面した。このペプチドの単離のために、本発明者らは、精製の各工程において所望の分子を同定するためのアッセイシステムを必要とした。単離精製され、構造が決定された第１の魚類のＧｎＲＨは、サケＧｎＲＨであり（Ｓｈｅｒｗｏｏｄおよび協力者、１９８３）、そして最も現在のＧｎＲＨは、２０００年に２つの異なるグループ（ＣａｒｏｌｓｆｅｌｄらおよびＲｏｂｉｎｓｏｎら）によって精製および特徴付けされた。この期間の間、多くのＧｎＲＨ改変体が、この分子の免疫反応性に依存することによって単離されている。サケＧｎＲＨの単離の間、Ｓｈｅｒｗｏｏｄらは、哺乳動物の供給源由来の抗ＧｎＲＨ抗体を利用し、その後、彼女らは、他の供給源由来の異なるＧｎＲＨ形態を単離することを可能にするサケ抗ＧｎＲＨ抗体を発展させた。
【００１１】
本出願人らの研究室において、Ｍｅａｎｗｈｉｌｅ Ｊａｍａｌｕｄｄｉｎら(Ｇｅｎ ｃｏｍｐ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １９８９年5月；７４(２)：１９０－８)は、非常に信頼性の高いＧｎＲＨバイオアッセイを開発した。このバイオアッセイの基本的な原理は、ムーレル（ｍｕｒｒｅｌ）の一次下垂体細胞培養物からＧＴＨを放出させて、ＧＴＨ－ＲＩＡによって放出されるＧＴＨの量を決定することにある。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
（本発明の目的）
本発明の主な目的は、魚類の繁殖を誘導するための新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを単離および同定することにある。
【００１３】
本発明の別の主な目的は、インディアンムーレル（Ｉｎｄｉａｎ Ｍｕｒｒｅｌ）脳か

ら新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを単離および配列決定する方法を開発することにある。

【００１４】

本発明のなお別の目的は、魚類における性腺刺激ホルモンの放出を増強させるための性腺刺激ホルモン放出ホルモンを開発することにある。

【００１５】

本発明のなお別の目的は、相乗効果を示す性腺刺激ホルモン放出ホルモンを開発することにある。

【００１６】

本発明のなお別の目的は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン活性を有する視床下部の種々の画分を開発することにある。

【００１７】

本発明のなお別の目的は、ＧｎＲＨの性腺刺激ホルモン放出ホルモン活性に対するカルシウムの効果を決定することにある。

【００１８】

本発明のなお別の実施形態は、上記新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して、魚類の繁殖を誘導する方法を開発することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

（発明の要旨）

本発明は、性腺刺激ホルモンの産生を活性化することによって、組み合わせておよび単独での両方において、魚類の繁殖を誘導するのに有用な、それぞれアミノ酸配列番号１（ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧ）およびアミノ酸配列番号２(ＱＨＷＳＷＧＩＬＰＧ)の、２つの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモン(ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ)、ならびにインディアンムーレル（Ｉｎｄｉａｎ　Ｍｕｒｒｅｌ）脳からこれらの性腺刺激ホルモン放出ホルモンを単離する方法、ならびにさらに、これらの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して、魚類の繁殖を誘導する方法に関する。

【００２０】

(本発明の詳細な説明)

従って、本発明は、性腺刺激ホルモンの産生を活性化することによって、組み合わせておよび単独での両方において、魚類の繁殖を誘導するのに有用な、それぞれアミノ酸配列番号１（ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧ）およびアミノ酸配列番号２(ＱＨＷＳＷＧＩＬＰＧ)の、２つの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモン(ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ)、ならびにインディアンムーレル（Ｉｎｄｉａｎ　Ｍｕｒｒｅｌ）脳からこれらの性腺刺激ホルモン放出ホルモンを単離する方法、ならびにさらに、これらの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して、魚類の繁殖を誘導する方法に関する。

【００２１】

さらに、本発明は、性腺刺激ホルモンの産生を活性化することによって、組み合わせておよび単独での両方において、魚類の繁殖を誘導するのに有用な、それぞれアミノ酸配列ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧおよびＱＨＷＳＷＧＩＬＰＧの、２つの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモン(ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ)に関する。

【００２２】

本発明の１つの実施形態において、上記ホルモンは、インディアンムーレル（Ｉｎｄｉａｎ　Ｍｕｒｒｅｌ）脳から得られる。

【００２３】

本発明の別の実施形態において、ｍｕＧｎＲＨ　ＩＩは、ｍｕＧｎＲＨ　Ｉよりもさらに活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモンである。

【００２４】

本発明のなお別の実施形態において、ｍｕＧｎＲＨ　Ｉは、性腺刺激ホルモン放出を約３０倍増加させる。

【００２５】
本発明のなお別の実施形態において、ｍｕＧｎＲＨ　ＩＩは、性腺刺激ホルモン放出を約３５倍増加させる。
【００２６】
本発明のなお別の実施形態において、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩの両方を、１：１の割合で組み合わせることによって、性腺刺激ホルモン放出を約５０倍増加させる。
【００２７】
本発明のなお別の実施形態において、上記ホルモンは、誘導された魚類の繁殖において相乗効果を示す。
【００２８】
本発明のなお別の実施形態において、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩの両方を組み合わせることによって、性腺刺激ホルモン放出を約５０倍増加させる。
【００２９】
本発明のなお別の実施形態において、上記ホルモンは、誘導された魚類の繁殖において種障壁を示さず、性腺刺激ホルモン放出は、２０～５０倍の範囲で増加する。
【００３０】
本発明のなお別の実施形態において、上記ホルモンは、組み合わせておよび単独での両方において、他のＧｎＲＨ(哺乳動物ＧｎＲＨ、サケＧｎＲＨ、ＧｎＲＨスーパー活性アナログ、および市販のＧｎＲＨ　Ｏｖａｐｒｉｍが挙げられる)よりもさらに活性である。
【００３１】
本発明の１つの実施形態において、それぞれアミノ酸配列ＱＨＷＳＡＷＲＬＰＧおよびＱＨＷＳＷＧＩＬＰＧの、２つの新規な性腺刺激ホルモン放出ホルモン(ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩ)を単離および配列決定する方法は、性腺刺激ホルモンの産生を活性化することによって、組み合わせておよび単独での両方において、魚類の繁殖を誘導するのに有用である。
【００３２】
本発明の別の実施形態において、酸性条件で視床下部を均質化する。
【００３３】
本発明のなお別の実施形態において、上記ホモジネートを濾過して、脂肪および細胞片を除去する。
【００３４】
本発明のなお別の実施形態において、前記の濾液にアセトンを徐々に添加して、３つの沈殿物（すなわちＡＣ　Ｉ、ＡＣ　ＩＩ、およびＡＣ　ＩＩＩ）を得る。
【００３５】
本発明のなお別の実施形態において、前記沈殿物中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）活性を評価する。
【００３６】
本発明のなお別の実施形態において、分子排除クロマトグラフィーを用いて活性沈殿物ＡＣ　ＩＩのみをさらに分画し、画分ＳＧ　Ｉおよび画分ＳＧ　ＩＩを得る。
【００３７】
本発明のなお別の実施形態において、前記工程の画分中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）活性を評価する。
【００３８】
本発明のなお別の実施形態において、アニオンカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを使用して、活性画分ＳＧ　ＩＩのみをさらに分画し、画分ＭＱ　Ｉ、ＭＱ　ＩＩ、ＭＱ　ＩＩＩ、およびＭＱ　ＩＶを収集する。
【００３９】
本発明のなお別の実施形態において、前記工程の画分中の性腺刺激ホルモン放出ホルモ

ン（ＧｎＲＨ）活性を評価し、画分ＭＱ　Ｉおよび画分ＭＱ　ＩＩのみがこの活性を有する。

【００４０】

本発明のなお別の実施形態において、カチオンカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを使用してＭＱＩをさらに分画し、画分ＭＳ　Ｉ、ＭＳ　ＩＩ、ＭＳ　ＩＩＩ、およびＭＳ　ＩＶを得る。

【００４１】

本発明のなお別の実施形態において、前記工程の画分中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）活性を評価し、画分ＭＳ　ＩＩのみがこの活性を有する。

【００４２】

本発明のなお別の実施形態において、逆相クロマトグラフィーを用いてＭＳ　ＩＩ画分を分画し、画分ＳＲＰ　Ｉ、ＳＲＰ　ＩＩ、およびＳＲＰ　ＩＩＩを得る。

【００４３】

本発明のなお別の実施形態において、前記工程の画分中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）活性を評価し、画分ＳＲＰ　ＩＩのみがこの活性を有する。

【００４４】

本発明のなお別の実施形態において、逆相クロマトグラフィーを用いて、さらにＭＱＩＩを分画し、画分ＱＲＰ　Ｉ、ＱＲＰ　ＩＩ、およびＱＲＰ　ＩＩＩを得る。

【００４５】

本発明のなお別の実施形態において、前記工程の画分中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）活性を計算し、画分ＳＲＰ　ＩＩのみがこの活性を有する。

【００４６】

本発明のなお別の実施形態において、上記工程のＱＲＰ　ＩＩおよびＳＲＰ　ＩＩ画分を配列決定し、それぞれｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩと命名する。

【００４７】

本発明のなお別の実施形態において、画分ＳＧ　ＩＩは、性腺刺激ホルモン放出を約２０倍まで増加する。

【００４８】

本発明のなお別の実施形態において、画分ＳＧ　ＩＩは、性腺刺激ホルモン放出を約２０倍まで増加する。

【００４９】

本発明のなお別の実施形態において、画分ＭＱ　Ｉは、性腺刺激ホルモン放出を約１０倍まで増加する。

【００５０】

本発明のなお別の実施形態において、画分ＭＱ　ＩＩは、性腺刺激ホルモン放出を約４０倍まで増加する。

【００５１】

本発明のなお別の実施形態において、画分ＭＳ　ＩＩは、性腺刺激ホルモン放出を約４５倍まで増加する。

【００５２】

本発明のなお別の実施形態において、カルシウムは、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩの性腺刺激ホルモン放出活性を増加する。

【００５３】

前記新規性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して、魚類の繁殖を誘導する方法（前記方法は、前記性腺刺激ホルモン放出ホルモンに魚類を曝露し、性腺刺激ホルモンの放出を助け、そして前記性腺刺激ホルモンを使用して魚類の繁殖を誘導する工程を包含する）。

【００５４】

（ムーレル　ＧｎＲＨの精製）

（（ｉ）抽出および溶媒分画）

視床下部を、冷やしながら、Ｐｏｔｔｅｒ－Ｅｌｖｅｈｊｅｍホモジナイザーにおいて

、１ｍＭ　ＰＭＳＦを含有する１Ｎ酢酸を用いてホモジナイズした。泡立ちを避けるため、ホモジナイズを、非常に慎重かつゆっくり行った。粗製ホモジネートのｐＨを、ｐＨ３．２に維持した。抽出材料を二重に折り畳んだチーズクロスを介して濾過し、脂肪および細胞片を除去した。

【００５５】

次いでそれを凍結乾燥し、そして－８０℃でさらなる使用まで保存した。乾燥抽出物を、０．１Ｎ酢酸中でもどし、等量の冷却アセトンを添加し、－２０℃で１５分間、維持した。

【００５６】

厚い沈殿物（ＡＣ　Ｉ）が、懸濁液の底に現れるが、透明な上清をデカントし、そして２倍量の冷却アセトンを添加し、そして－２０℃で３０分間維持し、その後、別の薄い沈殿物層（ＡＣ　ＩＩ）が現れた。再度、透明な上清をデカントし、そして２倍量の冷却アセトンをそれに添加し、そして－２０℃で１４時間維持した。

【００５７】

これは、別の薄い沈殿物層（ＡＣ　ＩＩＩ）の出現を生じ、そして透明な上清への冷却アセトンのさらなる添加は、－２０℃で３日間維持した後にさえ、少しの沈殿物の形成も生じなかった。これらの３つのアセトン画分を、石油エーテル（４０～６０℃）で抽出し、アセトン、脂質および他の疎水性物質を除去した。

【００５８】

最終沈殿物を、８，０００ｇ、１５分間、４℃で遠心分離し、そして残渣をさらなる使用まで、－８０℃で保存した。ＧｎＲＨ濃縮画分を、インビトロの下垂体細胞培養物からのＧＴＨ放出の原理に基づいて、ＡＣ　ＩＩとして同定した（図３）。

【００５９】

（分子排除クロマトグラフィー）

ＡＣ　ＩＩをＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ　２５カラム上の分子排除クロマトグラフィーに供することにより、ＧｎＲＨをさらに精製した。０．０５Ｍ　ＰＢＳを用いたカラムの溶出は、２つの異なるピーク（ＳＧ　ＩおよびＳＧ　ＩＩ）を生じた（図４）。従って、哺乳動物ＧｎＲＨを流し、カラム上のパターンを同定した。インビトロにおける下垂体細胞インキュベーションからのＧＴＨ放出の原理に基づいて、ＧｎＲＨが、ＳＧ　ＩＩに局在することを見出した。以下の表１に示される。

【００６０】

（表１）

ムーレル下垂体細胞インキュベーションからのＧｔＨ放出期間における、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５溶出画分の生物活性

【００６１】

【表１】

システム*	放出されたGtH (ng/6x10^4 細胞)
コントロール (C)	2.8±0.18
C+SGI	9.3±0.93
C+SGII	37.9±2.18

（（ｉｉ）イオン交換クロマトグラフィー）

これを、ＦＰＬＣ　Ｍｏｎｏ　Ｑ（アニオン性）およびＭｏｎｏ　Ｓ（カチオン性）イオン交換クロマトグラフィーを用いて、さらに精製した。プールし、透析し、そして凍結乾燥した分子排除クロマトグラフィー工程（ＳＧ　ＩＩ）の活性ピークを、Ｍｏｎｏ　Ｑカラムに負荷し；Ｍｏｎｏ　Ｑカラムを２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ　８．０）で洗浄して、非結合性ピーク（ＭＱ　Ｉ）を生じたが、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ　８．０）含有Ｎ

ａＣｌ（１．０　Ｍ）を用いた勾配溶出においては、３つの結合性ピーク（ＭＱ　ＩＩ、ＭＱ　ＩＩＩおよびＭＱ　ＩＶ）を得た（図５ａ）。

【００６２】

インビトロの下垂体細胞培養物からのＧＴＨ放出の原理に基づいた、ＧｎＲＨ活性のアッセイは、結合性ＭＱ　ＩＩが最大ＧｎＲＨ活性を有することを同定したが、ＭＱ　ＩＩＩおよびＭＱ　ＩＶは、極わずかな活性を示した（以下の表２ａに示される）。

【００６３】

（表２ａ）

ムーレル下垂体細胞インキュベーションからのＧｔＨ放出期間における、ＦＰＬＣ　Ｍｏｎｏ　ＱおよびＭｏｎｏ　Ｓ溶出画分の生物活性

【００６４】

【表２ａ】

システム[a]	放出されたGtH (ng/6x10^{4}細胞)
コントロール(C)	2.5 ± 0.17
C + MQ I	21.6 ± 0.98
C + MQ II	77.5 ± 2.92
C + MQ III	2.7 ± 0.29
C + MQ IV	2.3 ± 0.34

[a]各ピーク由来の２μｇのタンパク質を、インキュベーションシステムに加えた。値は、４つの実験の平均±ＳＥＭである。

【００６５】

驚いたことに、Ｍｏｎｏ　Ｑ溶出の非結合性ピーク（ＭＱ　Ｉ）はまた、有意な量のＧｎＲＨ活性を示し、従って、ＧｎＲＨのカチオン形態の存在を示唆した。

【００６６】

従って、ＭＱ　ＩをＭｏｎｏ　Ｓ（カチオン性）カラムに充填し；５０　ｍＭ酢酸アンモニウム（ｐＨ　４．８）でカラムを洗浄し、単一の非結合性ピーク（ＭＳ　Ｉ）を得たが、０．５Ｍ　ＮａＣｌを用いるその後の勾配溶出においては、３つの結合性ピーク（ＭＳ　ＩＩ、ＭＳ　ＩＩＩおよびＭＳ　ＩＶ）を得た（図５ｂ）。４つ全てのピークにおける、ＧｎＲＨ活性のアッセイは、ＭＳ　ＩＩが、ＧｎＲＨに非常に富むことを同定した（以下の表２ｂに示される）。

【００６７】

【表２ｂ】

表　2b

システム[a]	放出されたGtH (ng/6x10^{4}細胞)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ(C)	2.4 ± 0.16
C + MS I	3.4 ± 0.23
C + MS II	83.1 ± 3.46
C + MS III	3.0 ± 0.18
C + MS IV	2.6 ± 0.09

[a]各ピーク由来の２μｇのタンパク質を、インキュベーションシステムに加えた。値は、４つの実験の平均±ＳＥＭである。

【００６８】

（ｉｉｉ）逆相クロマトグラフィー

本発明者らは、ここで、研究中の２つの形態のＧｎＲＨを有していた－一方は、アニオ

ン性形態（ＭＱ　ＩＩ）であり、他方は、カチオン性形態（ＭＳ　ＩＩ）であった。両方を、Ｐｅｐ－ＲＰＣカラムクロマトグラフィーによってさらに精製した。両方の場合において、ＭＱ　ＩＩまたはＭＳ　ｎのいずれかでカラムを充填した後、未結合のタンパク質を、水中０．１％のトリフルオロ酢酸で溶出し、一方、結合した物質を、アセトニトリル中０．１％のトリフルオロ酢酸の勾配で溶出した。ＭＱ　ＩＩは、１つの未結合ピーク（ＱＲＰ　Ｉ）および２つの結合ピーク（ＱＲＰ　ＨおよびＱＲＰ　ＨＩ）に分離しした（図６ａ）；ＭＳ　Ｈは、１つの未結合ピーク（ＳＲＰ　Ｉ）および２つの結合ピーク（ＳＲＰ　ＩＩおよびＳＲＰ　ＩＤ）になった（図６ｂ）。ＧｎＲＨは、ＱＲＰ　ＨおよびＳＲＰ　Ｈに位置することが見出され（図６の挿入図）、そしてｍｕＧｎＲＨＩ（アニオン性）およびｍｕＧｎＲＨＩＩ（カチオン性）と称した。

【００６９】

（ｉｖ）精製ＧｎＲＨの機能的活性

ｍｕＧｎＲＨ　Ｉおよびｍｕ　ＧｎＲＨ　ＩＩの両方は、ムーレル下垂体細胞からＧＴＨが放出される際に、非常に活性であり、ｍｕＧｎＲＨ　ＩＩの方が、わずかに活性が大きい。さらに、これら２つのＧｎＲＨは、異なる種のコイにおいてほとんど等しく作用し、種の境界を示さない（以下の表３に示される）。

【００７０】

（表３）

ムーレル　ＧｎＲＨ　ＩおよびＩＩに応答する、異なるコイの下垂体からの性腺刺激ホルモン放出の比較

【００７１】

【表３】

コイの種	ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝ (2μg GnRH画分)	放出されたＧｔＨ (ng/6x10^{4}細胞)
Catla catla	ｺﾝﾄﾛｰﾙ（Ｃ）	2.6±0.32
	C＋mGnRH I	74.5±2.32
	C＋mGnRH II	82.6±3.02*
Cirrhinus mrigala	ｺﾝﾄﾛｰﾙ（Ｃ）	2.1±0.24
	C＋mGnRH I	72.0±2.13
	C＋mGnRH II	80.1±2.61*
Cyprinus carpio	ｺﾝﾄﾛｰﾙ（Ｃ）	2.8±0.22
	C＋mGnRH I	73.8±2.51
	C＋mGnRH II	81.7±3.12*

＊ｐ＜０．０１（コントロールと比較した場合）

驚くべきことに、組み合わせて添加した場合、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびＩＩは、組合せの結果として非常に有意なＧＴＨ放出の増加を示す（以下の表４に示される）。

【００７２】

【表４】

表４

インキュベーション (2μg GnRH 画分)	放出されたＧｔＨ (ng/6x10^4 細胞)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ（Ｃ）	2.6±0.18
C＋mGnRH I	73.3±2.2*
C＋mGnRH II	79.2±3.12*
C＋mGnRH I＋mGnRH II	115.0±3.23**
哺乳動物　GnRH	49.9±2.02
サケ GnRH（合成）	56.2±2.15
GnRH 過反応性アナログ　(des-Gly^{10},[D-Ala^6]-LHRH)	68.0±2.32

値は、５つの実験の平均±ＳＥＭである。
＊ｐ＜０．０１（哺乳動物またはサケのＧｎＲＨと比較した場合）
＊＊ｐ＜０．０１（ＧｎＲＨ過活性アナログと比較した場合）。
【００７３】
実際、単独であろうと組合せであろうと、ｍｕＧｎＲＨは、哺乳動物ＧｎＲＨ、サケＧｎＲＨまたはＧｎＲＨ過活性アナログと比較して有意に大きな活性を有していた。
【００７４】
本発明の実施形態において、ＧｎＲＨ　ＩおよびＩＩへのカルシウムの添加は、ＧｎＲＨ　ＩおよびＩＩの性腺刺激ホルモン放出活性を増加させる。
【００７５】
これら両方の合成ＧｎＲＨは、研究室環境および現場環境において、サケＧｎＲＨ、そのアナログおよび他の過活性アナログ、ならびに市販製品の「Ｏｖａｐｒｉｍ」と比較してはるかに大きな活性を示した。これら２つのデカペプチド（ムーレル　ＧｎＲＨＩおよびＩＩ）のアミノ酸配列は、本発明者らが特許を申請したため、本明細書中に示すことが出来なかった。従って、このＩｎｄｉａｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔ（ムーレル　ＧｎＲＨ　Ｉ＋ＩＩ）は、国内市場および国際市場のための大きな期待が持たれる。
【００７６】
上記の結果は、インディアンムーレル　ＧｎＲＨ（Ｉ＋ＩＩ）を、非常に有望な世界的競合相手として位置付ける。なぜなら、Ｓｙｎｄｅｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃａｎａｄａによって調製されるサケＧｎＲＨアナログ（Ｏｖａｐｒｉｍ）は、市場を支配しており、養殖魚を繁殖するために世界中で大規模に販売されているからである。
【００７７】
ムーレル　ＧｎＲＨ（ＧｎＲＨ　ＩおよびＩＩ）の両方は、新規であり、現在までに発見された天然に存在するＧｎＲＨは、このような配列を有さない（図７）。合成ＧｎＲＨの活性は、コイを繁殖させるための研究室（下垂体細胞培養物）および現場で試験されている。
【００７８】
上記の新規の性腺刺激ホルモン放出ホルモンを使用して、魚の繁殖を誘導する方法は、魚をこの性腺刺激ホルモン放出ホルモンに曝露して、性腺刺激ホルモンの放出を助ける工程、およびこの性腺刺激ホルモンを使用して魚類の繁殖を誘導する工程を包含する。
【図面の簡単な説明】
【００７９】
【図１】図１は、天然に存在する脊椎動物および原索動物ＧｎＲＨの主なアミノ酸配列の比較を示す。下線を引いたアミノ酸は、哺乳動物ＧｎＲＨと比較して、異なる形態を表す。
【図２】図２は、ＧｎＲＨのヘアピンループを示す。
【図３】図３は、アセトン画分から得られた異なる画分のムーレル　ＧｎＲＨ活性の試験を示す。３つの異なる画分の調製の後、１００マイクログラムのタンパク質を、インビトロで下垂体細胞培養物に添加し、そしてＧｔＨの放出をＲＩＡによって測定した。
【図４】図４は、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５カラムからの哺乳動物ＧｎＲＨの溶出プロファイルを示す。ＡＣ　ＩＩ画分を、１Ｎの酢酸に溶解し、そして２４ｍｌ／時間の流速でＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５カラム（５８×１．５ｃｍ）から溶出した。
【図５ａ】図５ａは、ＦＰＬＣ　ＭｏｎｏＱカラムからのムーレルＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５　Ｐ－ＩＩの溶出プロファイルを示す。ＳＧ　ＩＩ画分を、緩衝液Ａ－２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）に溶解し、そしてＦＰＬＣアニオン交換カラム（Ｍｏｎｏ　Ｑ）へと注入した。まず、カラムを緩衝液Ａで洗浄し、次いで、緩衝液Ｂ－２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）（１ＭのＮａＣｌを含む）で溶出した。
【図５ｂ】図５ｂは、ＦＰＬＣ　Ｍｏｎｏ　Ｓカラムからのムーレルモノ　Ｑ未結合ピーク（ＭＱ　Ｉ）の溶出プロファイルを示す。ＭＱ　Ｉを、緩衝液Ａ－５０ｍＭ　酢酸アンモニウム（ｐＨ４．８）に溶解し、そしてＦＰＬＣカチオン交換カラム（Ｍｏｎｏ

Ｓ）に注入した。まず、カラムを、緩衝液Ａで洗浄し、次いで、緩衝液Ｂ－５０ｍＭ　酢酸アンモニウム（ｐＨ４．８）（０．５Ｍ　ＮａＣｌを含む）で溶出した。

【図６】図６は、ＦＰＬＣ　Ｐｅｐ－ＲＰＣカラムからのＭｏｎｏ　ＱＰ－ＩＩ（ａ）およびＭｏｎｏ　ＳＰ－ＩＩ（ｂ）の溶出プロファイルを示す。ＧｎＲＨに富んだ画分（Ｍｏｎｏ　ＱＰ－ＩＩ）および（Ｍｏｎｏ　ＳＰ－ＩＩ）を、個々に水中の溶媒Ａ－０．１％　ＴＦＡに溶解し、そしてＦＰＬＣペプチド逆相クロマトグラフィー（Ｐｅｐ－ＲＰＣ）に個々に注入した。始めに、カラムを溶媒Ａで洗浄し、次いでアセトニトリル中の溶媒Ｂ－０．１％　ＴＦＡで溶出した。

【図７】図７は、ｍｕＧｎＲＨ　ＩおよびｍｕＧｎＲＨ　ＩＩのアミノ酸配列を示す。

【図１】

GnRH	1 2 3 4	5 6 7 8	9 10
哺乳動物	pGlu-His-Trp-Ser-	Tyr-Gly-Leu-Arg-	Pro-Gly-NH_2
モルモット	pGlu-Tyr-Trp-Ser-	Tyr-Gly-Val-Arg-	Pro-Gly-NH_2
ニワトリ　Ｉ	pGlu-His-Trp-Ser-	Tyr-Gly-Leu-Gln-	Pro-Gly-NH_2
ニワトリ　ＩＩ	pGlu-His-Trp-Ser-	His-Gly-Trp-Tyr-	Pro-Gly-NH_2
サケ	pGlu-His-Trp-Ser-	Tyr-Gly-Trp-Leu-	Pro-Gly-NH_2
ヤツメウナギ　Ｉ	pGlu-His-Tyr-Ser-	Leu-Glu-Trp-Lys-	Pro-Gly-NH_2
ヤツメウナギ　ＩＩＩ	pGlu-His-Trp-Ser-	His-Asp-Trp-Lys-	Pro-Gly-NH_2
尾索類の動物　Ｉ	pGlu-His-Trp-Ser-	Asp-Tyr-Phe-Lys-	Pro-Gly-NH_2
尾索類の動物　ＩＩ	pGlu-His-Trp-Ser-	Leu-Cys-His-Ala-	Pro-Gly-NH_2
ナマズ	pGlu-His-Trp-Ser-	His-Gly-Leu-Asn-	Pro-Gly-NH_2
ホシザメ	pGlu-His-Trp-Ser-	His-Gly-Trp-Leu-	Pro-Gly-NH_2
タイ	pGlu-His-Trp-Ser-	Tyr-Gly-Leu-Ser-	Pro-Gly-NH_2
ニシン	pGlu-His-Trp-Ser-	His-Gly-Leu-Ser-	Pro-Gly-NH_2

Fig. 1 天然に存在する脊椎動物および原索動物GnRHの主なアミノ酸配列の比較を示す。下線を引いたアミノ酸は、哺乳動物GnRHと比較して、異なる形態を表す。

【図２】

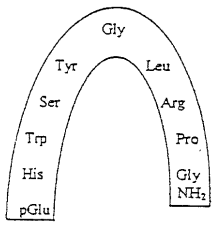


Fig. 2. GnRHのヘアピンループ

【図３】

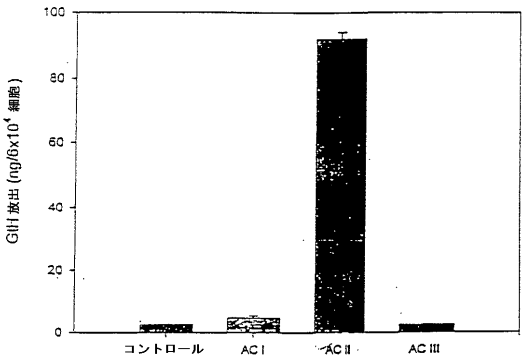


Fig. 3 アセトン画分から得られた異なる画分のmurrel GnRH活性の試験を示す。3つの異なる画分の調製の後、100マイクログラムのタンパク質を、インビトロで下垂体細胞培養物に添加し、そしてGtHの放出をRIAによって測定した。

【図４】

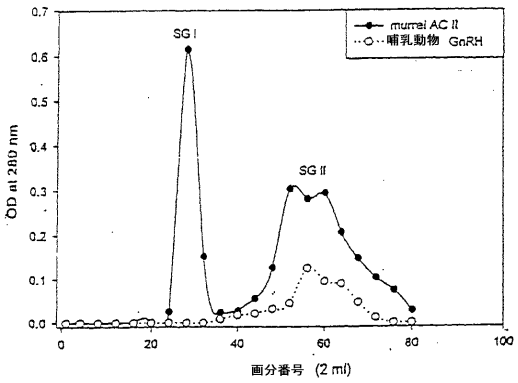


Fig 4. Sephadex G－25カラムからの哺乳動物GnRHの溶出プロファイルを示す。AC II画分を、1Nの酢酸に溶解し、そして24mL／時間の流速でSephadex G－25カラム(58×1．5cm)から溶出した。

【図５ａ】

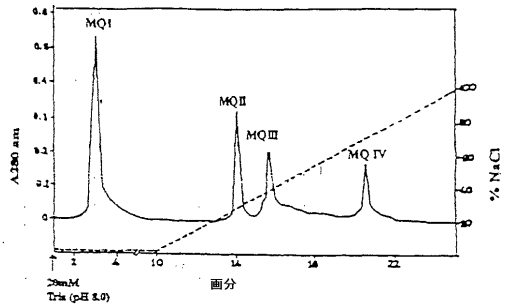


Fig. 5a. FPLC MonoQカラムからのmurrel Sephadex G－25 P－IIの溶出プロファイルを示す。SG II画分を、緩衝液A－20mM Tris(pH8．0)に溶解し、そしてFPLCアニオン交換カラム(Mono Q)へと注入した。まず、カラムを緩衝液Aで洗浄し、次いで、緩衝液B－20mM Tris(pH8．0)(1MのNaClを含む)で溶出した。

【図５ｂ】

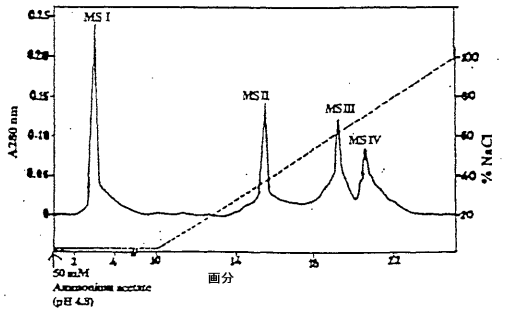
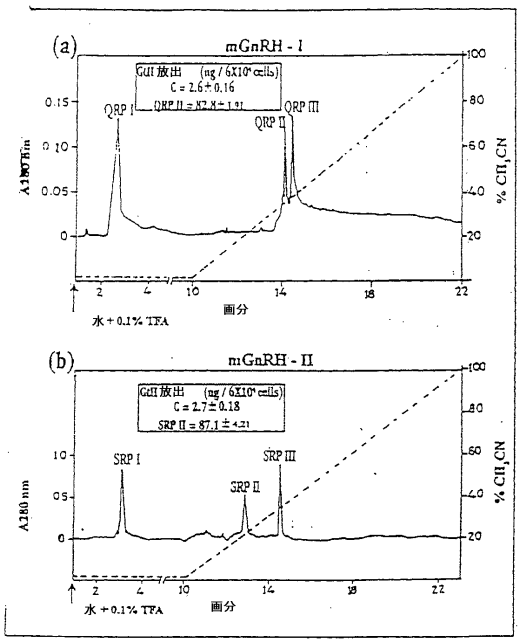


Fig. 5b. FPLC Mono Sカラムからのmurrel Mono Q未結合ピーク(MQ I)の溶出プロファイルを示す。MQ Iを、緩衝液A－50mM酢酸アンモニウム(pH4．8)に溶解し、そしてFPLCカチオン交換カラム(Mono S)に注入した。まず、カラムを、緩衝液Aで洗浄し、次いで、緩衝液B－50mM 酢酸アンモニウム(pH4．8)(0．5 M NaClを含む)で溶出した。

【図６】



6.FPLC Pep－RPCカラムからのMono QP－II(a)およびMono SP－II(b)の溶出プロファイルを示す。GnRHに富んだ画分(Mono QP－II)および(Mono SP－II)を、個々に水中の溶媒A－0．1% TFAに溶解し、そしてFPLCペプチド逆相クロマトグラフィー(Pep－RPC)に個々に注入した。始めに、カラムを溶媒Aで洗浄し、次いでアセトニトリル中の溶媒B－0．1% TFAで溶出した。

【図７】

Murrel GnRH I : pGlu-His-Trp-Ser-Ala-Tyr-Arg-Leu-Pro-Gly-NH_2

Murrel GnRH II: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Ile-Lys-Pro-Gly-NH_2

Fig. 7. muGnRH IおよびmuGnRH IIのアミノ酸配列を示す。

【配列表】
0004394954000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
G01N	*30/88*	*(2006.01)*	G01N	30/88	J
G01N	*33/48*	*(2006.01)*	G01N	33/48	A
G01N	*33/68*	*(2006.01)*	G01N	33/68	

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 チャッタージー, アブヒジト
インド国 ７３１ ２３５ ウエスト ベンガル, サンティニケタム, ビスバーバラティ ユニバーシティー
(72)発明者 レイ, パーサ
インド国 ７３１ ２３５ ウエスト ベンガル, サンティニケタム, ビスバーバラティ ユニバーシティー
(72)発明者 ダスガプタ, スブラタ
インド国 ７３１ ２３５ ウエスト ベンガル, サンティニケタム, ビスバーバラティ ユニバーシティー
(72)発明者 バハッタチャラヤ, サミア
インド国 ７００ ０３２ コルカタ, ラジャ エス. シー. ムリック ロード, ４, インディアン インスティテュート オブ ケミカル バイオロジー
(72)発明者 パシャ, サントシュ
インド国 １１０ ００９ デリー, モール ロード, セントラル フォー バイオケミカル テクノロジー

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 Aquaculture, 1991, Vol.97, pp.373-382
Endocrine Reviews, 1997, Vol.18, No.2, pp.180-205

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 1/00-19/00
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)
REGISTRY(STN)