



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년04월05일
 (11) 등록번호 10-1132185
 (24) 등록일자 2012년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/575 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7014946
 (22) 출원일자(국제) 2006년11월20일
 심사청구일자 2009년05월19일
 (85) 번역문제출일자 2008년06월20일
 (65) 공개번호 10-2008-0080566
 (43) 공개일자 2008년09월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/CU2006/000013
 (87) 국제공개번호 WO 2007/059714
 국제공개일자 2007년05월31일
 (30) 우선권주장
 2005-0231 2005년11월22일 쿠바(CU)
 (56) 선행기술조사문헌
 EP1477181 A
 WO199426897 A1

(73) 특허권자
**센트로 데 인제니에리아 제네티카 와이 바이오테
 크놀로지아**
 쿠바, 씨. 하마나 10600, 플라야, 쿠바나칸,
 아베. 31 엔트레 158와이 190
 (72) 발명자
루고 곤잘레스, 후아나, 마리아
 쿠바, 라 하마나 33 600, 엔트레 84 와이 86 구이
 라 데 멜레나, 넘버, 8403, 아베니다 75에이
에스트라다 갈시아, 마리오, 파블로
 쿠바, 씨우다드 데 라 하마나 플라야 10600, 플라
 야, 쿠바나칸, 압토.10, #3112, 186 엔트레 31 와
 이 33, 칼레:
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김태규, 김성규

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **수생 유기물 배영용 뉴로펩티드**

(57) 요약

본 발명은 수생 유기물의 성장을 자극하고 면역계를 개선하기 위한 뇌하수체 아데닐산 고리화효소-활성화 폴리펩티드(PACAP)의 변형체의 사용에 관련된다. 펩티드의 변형체는 함침, 주사 또는 사료 첨가물에 의해 공급되어 진다.

(72) 발명자

로드리구에스 말론, 알리나

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 11600, 플라야, 압토 12비쿠바나칸, 넘버. 3115 엔트레 31 와이 33, 칼레 186

칼피오 곤잘레스, 야밀라

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 10400, 베다도 플라자 데 라레블루씨온, 압토 1, 엔트레 27 와이 사파타 넘버, 666 칼레 8

모라레스 로하스, 안토니오

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 10600, 플라야 엔트레 46 와이 48, 넘버. 4617, 칼레 7마 씨

로드리고 곤잘레스 데 소사, 오스마니

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 17100, 리사, 알로요 아레나, 엔트레 340 와이 342, 넘버. 34008, 칼레 69

모라레스 페르난데즈, 레이놀드

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 11600, 플라야, 쿠바나칸, 압토 12, 이디에프 씨-15, 아베니다 33 엔트레 186 와이 188

엘레라 미야레스, 피델, 프란씨스코

쿠바, 씨우다드 데 라 하바나 11600, 플라야, 쿠바나칸, 압토 36, 엔트레 182 와이 184, 넘버. 18207, 아베니다 31

특허청구의 범위

청구항 1

물고기 또는 갑각류 배양에 있어서, 이의 성장을 자극하기 위해 또는 질병에 대한 그의 저항성을 증가하기 위해 또는 양자를 위해 유효한 양으로 양식중인 물고기 또는 갑각류에 시퀀스 SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 및 SEQ ID No 14 중의 어느 하나에 따른, 뉴로펩티드 PACAP를 공급하거나 또는 투여하는 것을 포함하는 물고기 또는 갑각류 양식의 생산성을 증가하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 프로락틴 분비를 증가하고 그리고 물고기 삼투조절을 개선하기 위해 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 수생 유기체에 있어서 식욕을 조절하기 위해 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 관상용 물고기 및 갑각류에서 채색의 전개를 개선하기 위해 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 화학적 합성에 의하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 재조합 기술에 의하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에 함유된 상태로 정제없이 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 피 파스토리스(*P. pastoris*) 배양 상등액에 함유된 상태로 정제없이 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 재조합 생산 시스템으로부터 출발하여 정제되어 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 동물 체중의 그램 당 0.1 μg 의 농도로 매 3일 주기적인 주입에 의해 물고기 또는 갑각류에 적용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 물의 리터 당 100 내지 200 μg 사이의 PACAP 농도로 담수 또는 해수에 1 내지 4일의 간격으로 함침 욕에 의해 물고기 또는 갑각류에 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 공급사료의 Kg 당 5 mg의 PACAP 농도로 제제화된 공급사료로 물고기 또는 갑각류에 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 오레크로미스 종(*Oreochromis sp*) 틸라피아로 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 클라리아 종(*Claria sp*) 메기로 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 새먼 종(*Salmon sp*) 연어로 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 페나우스 종(*Penaeus sp*) 새우로 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서, PACAP 뉴로펩티드는 병원성 제제에 의해 야기된 감염을 예방하거나 치료하기 위해 물고기 또는 갑각류에 공급됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 특정하게는 수생 유기물의 배양에 있어서 뇌하수체 아데닐산 고리화효소-활성화 폴리펩티드의 사용과 관련한 양식 생명공학의 분야에 관련된다. 합침, 주사 또는 사료 첨가물로서 수생 유기체에 펩티드의 적용은 이들 유기체의 식욕에서의 증가, 높은 비율의 성장 및 생존율, 우수한 면역 활성 및 프로락틴 유리의 증가를 제공한다.

배경기술

[0001]

- [0002] 뇌하수체 아데닐산 고리화효소-활성화 폴리펩티드(Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide; PACAP)는 소 과(科)의 시상하부로부터 1989년에 처음으로 분리되었으며 그리고 성장 호르몬 분비를 자극하는 그 능력이 아데닐산 고리화효소 활성화를 통한 것이다 라는 것이 입증되었다 (Miyata and col. (1989) Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:567-574). PACAP는 세크레틴, 글루칸 및 장내의 혈관에 작용하는 펩티드를 포함하는 펩티드 과에 속한다 (Arimura and Shioda (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 16:53-88). 포유동물에 있어서, PACAP 및 성장 호르몬 방출 호르몬(Growth Hormone Releasing Hormone; GHRH)의 전구체들은 두 개의 다른 유전자에 의해 코딩된다 (Hosoya and col. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1129:199-206). 오늘날까지 연구된 모든 아류 포유동물 중(새, 파충류 및 물고기)에서, GHRH 및 PACAP 펩티드가 동일한 유전자에 의해 코딩되고 그리고 동일한 전구체에 포함되어 진다 (Montero and col. (2000) Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *Journal of Molec. Endocrinol.* 25:157-168). PACAP 유전자는 근본적으로는: 중추 및 말초 신경계, 눈의 신경 감응 섬유, 기도, 타액선, 위장관, 생식계 기관, 췌장 및 요로에서 발견되어 진다. 또한, 이것은 부신분비선, 생식선 및 면역 세포에서 합성되어 진다 (Sherwood and col. (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21:619-670). PACAP는 다른 조직에 그의 다양한 분포와 그리고 그의 시상하부, 뉴로트랜스미터, 신경조정 및 혈관조절 활성과 일치하여 다른 생물학적 기능을 나타낸다 (Chatterjee and col. (1997) Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 59-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 272:12122-12131).
- [0003] 이것은 세포의 분주, 분화 및 세포 사의 조절에 포함되어 진다 (Sherwood and col. (2000) The origin y function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21:619-670).
- [0004] PACAP는 성장 호르몬 (GH) 유리를 자극한다. GH 유리에서의 펩티드 효과는 몇몇 종의 포유동물, 새, 양서류에서 (Hu and col. (2000) Characterization and messenger ribonucleic acid distribution of a cloned pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor in the frog *Xenopus laevis* brain. *Endocrinol.* 141:657-665) 그리고 물고기에서 (Anderson L. L. and col. (2004) Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches. *Society for Experim. Biol. and Med.* 229:291-302) 생체 외에서 입증되어 졌다. GH 분비와 유리에 있어서 PACAP의 효과에 대해 생체 내에서의 연구는 거의 없었다. 오늘날까지 이 펩티드는 랫트 플라즈마에서 (Jarr and col. (1992) Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on *in vivo* and *in vitro* prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci.* 51:823-830) 그리고 보빈 플라즈마에서 (Radcliff and col. (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. *Domestic. Animal. Endocrinol.* 21:187-196) GH의 준위를 생체 내에서 증가하는 것이 알려져 있다. 반면 암양에서 (Sawangjaroen and Curlewis (1994) Effects of pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6:549-555) 그리고 인간에서는 (Chiodera and col. (1996) Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on adenohipophyseal hormone secretion innormal men. *Clin. Neuroendocrinol.* 64:242-246) 이것은 이 효과를 생성하지 않는다.
- [0005] 이들의 발견은 포유동물에서, GH 분비에 대한 펩티드 효과가 종 대 종에 따라 다양하게 변한다는 것을 제시한다 (Anderson and col. (2004) Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches. *Society for Experim. Biol. and Med.* 229:291-302).
- [0006] 지금까지, 물고기에 있어서는 생체 내에서 GH 조절에 있어서 PACAP 작용을 보여주는 연구가 존재하지 않았고, 부가하여 수생 유기체에 식욕 자극으로 이 펩티드를 사용한 선례가 없었다. 갑각류에 있어서, 지금까지 이 펩티드의 존재의 아무런 증거가 없었고 그리고 이들 유기체에서 성장을 제어하는 신호의 케이스케이드가 공지되어지 지 않았다.
- [0007] PACAP는 포유동물에서 뇌하수체 세포에 의해 프로락틴 유리를 자극한다 (Ortmann and col. (1999)

Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* 140:207-214). 이것은 뇌하수체의 멜라노트로픽 세포에 의해 멜라노트로핀 α -멜라노사이트-자극 호르몬(MSH)을 촉진한다 (Vaudry and col. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52:269-364).

- [0008] 물고기에 있어서는, 프로락틴 유리에 있어서 이 펩티드의 활성을 보여주는 아무런 생체 내 연구가 없다. 또한 물고기 색깔의 전개에 있어서 그 효과에 대해서도 아무런 발견이 없다.
- [0009] 포유동물에 있어서, PACAP 면역계 작용은 매우 잘 특징되어 지고 그리고 인간에 있어서 면역학적 반응 조절자로서 이들의 용도를 기술하는 몇몇 특허가 있다. 지금까지 수생 유기체에서 PACAP 면역계 작용을 설명하는 문헌에서의 선례는 없다.
- [0010] PACAP 유전자는 몇몇 척추동물의 종과 원색동물(피막이 있는 것)로부터 클로닝되어 왔다. 물고기에 있어서는 몇 종의 연어와 메기류 (Sherwood and col. (2000) The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily *Endocrine Reviews* 21(6):619-670), 금붕어 (Leung y col. (1999) Molecular cloning and tissue distribution of in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) the goldfish. *Rec. Progr. Mol. Comp. Endocrinol.* 338-388), 제브라피쉬 (Fradinger and Sherwood (2000) Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 165:211-219), truncha (Krueckl and Sherwood. (2001)) 및 송어 (Krueckl and Sherwood. (2001) Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in raibow trout. *Molec. and Cell. Endocrinol.* 182:99-108)의 하나로부터 분리되었다. 특허 US 5695954호는 물고기에 GHRH-PACAP 폴리펩티드를 토드하는 유전자 뉴클레오티드 시퀀스 뿐 아니라, 유전자 이식을 통해 물고기에 성장을 증진하기 위해 사용되고 수정된 물고기 알에 언급된 유전적 컨스트럭션을 도입할 목적으로 이들 시퀀스를 발현하는 벡터 및 숙주의 분리 및 정제를 보호한다. 이것은 또한 물고기가 이들 시퀀스를 포함하는 형질전환 물고기를 검지하는 방법을 보호한다.
- [0011] 이 특허에서는 온코힌커스 네르카(*Oncorhynchus Nerka*), 클라리아스 매크로세팔러스(*Clarias macrocephalus*) 및 아시스펜서 트랜스몬타너스(*Acispenser transmontanus*) 종의 GHRH-PACAP 폴리펩티드를 코드하는 유전자 시퀀스가 명확하게 보고되었다.
- [0012] 이 특허 발명에서는 클라리아스 가리에피너스(*Clarias gariepinus*) 및 오레오크로미스 니로티커스(*Oreochromis niloticus*) 종에 대해 우리 실험실에서 얻은, N-말단 변이된 PACAP 아미노산 시퀀스의 다른 변이체가 사용되었다. 이들 변이체들은 수생 유기체에서, 대장균(*E. coli*) 및 피 파스토리스(*P. pastoris*) 상등 배양액에서 발현된 합침 배쓰에 의해 미리 이를 정제하지 않고 이들의 투여에 의해 비 형질전환을 통해 성장 자극제로 사용되었다. 예기치 않게, 우리는 이들 변이체들이, 이들 조건에서, 이들 유기체에서 면역학적 활성의 유의성 있는 증진을 조장할 수 있고 그리고 혈청에서 프로락틴 농도를 높일 수 있다는 것을 발견하였다. 이들 펩티드 특성들은 수생 유기체에 대해서는 기술되어 있지 않다.
- [0013] 몇몇 저자들은 합침 배쓰에 의한 재조합 성장 호르몬 투여에 의해 물고기에서 성장 자극제 효과를 보고하였다. 그럼에도 불구하고, 성장 호르몬의 직접적인 사용은 성장 호르몬이나 또는 성장 호르몬 유리 인자를 발현하는 형질 전환 물고기의 사용에 대해 발생하는 것과 같은, 많은 조절적인 필요조건에 대한 것이다.
- [0014] 본 발명에서, 비 형질전환 방법론은 성장을 증가하는 것이 기술되고 그리고 무척추동물을 포함하는 수생 유기체의 면역계를 개선하는 것이 기술된다.
- [0015] 오늘날, 수생 유기체들은 중요한 단백질원이지만, 자연환경에 의존한 포획은 완전히 개척되어 진다. 이런 이유로, 생산성을 높이기 위해 이들 수생 유기체 종들의 양식이 필요하다 (Pullin y col.: Conference Proceeding 7, 432 p. International Center for living Aquatic Resources Monagement. Manila, Philippines. 1982, ISSN 0115-4389).
- [0016] 수생 양식의 효율성을 증진하기 위해, 성장 자극을 통한, 유기체의 생존율의 증가 및 유태동물의 질의 개선이 수산업에서 해결하기 위한 주요한 문제로 지속되고 있다.

발명의 상세한 설명

- [0017] 본 발명은 수생 양식에 매우 중요하며, 이들 펩티드가 합침 배쓰에 의해 또는 사료 부가제로 적용되어 질 때 상업적 대상의 갑각류 및 물고기 유대동물의 생존율을 단시간의 기간 동안에 증가하는, 무척추 유기체를 포함하여 수생 유기체의 성장 비율을 증가하는 SEQ ID No 12, 13 및 14로 동정된 아미노산 시퀀스를 갖는 뇌하수체 아데닐산 고리화효소-활성화 폴리펩티드의 변형체를 제공하여 상기한 문제점에 대한 해결책을 제공한다. 이들은 이들 유기체에서 면역 활성화뿐 아니라 식욕, 물고기 색상의 전개 및 프로락틴 유리를 자극한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 실시형태에서는, PACAP 변형체는 동물 체중당 0.1 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 3일 간격으로 주기적인 주사에 의해, 물의 리터 당 100 내지 200 μg 사이의 펩티드 농도로 신선한 물이나 해수에 매 4일 간격으로 합침 배쓰에 의해 그리고 제제화된 사료의 5mg/Kg의 농도로 사료 부가물로 물고기나 갑각류에 적용된다. 성장의 유의 있는 증가와 월등한 면역 활성화가 얻어진다.
- [0019] PACAP 변형체 적용은 그의 적은 사이즈 (5 KDa) 때문에, 이것이 합침 배쓰에 의해 적용될 때 이 유기체의 피부 및 점막을 통한 양호하게 흡수되는 것을 가능하게 하고, 수생 배양에 대한 비용 및 조작 이점이 존재하는 투여를 낮은 오염 지수로 가능하게 하고, 부가하여 PACAP 신호 형질도입 메카니즘이 호르몬의 활성화를 통해서가 아닌 아데닐 고리화효소 활성화로 시작되고 그리고 인간을 포함하는 포유동물에서는 이의 성장 호르몬 유리 활성화도가 약하게 되는데, 이는 이의 사용이 보다 우수한 공공적 개념을 나타내고 그리고 규제 필요조건이 덜하기 때문이다.
- [0020] 다른 PACAP 이점은 물고기에서 선천적 및 후천적 면역 활성을 자극하고 병원성 제제의 감염에 대한 저항성을 증진하는 그 능력이다.
- [0021] 본 발명의 실현에 있어서, PACAP 변형체는 틸라피아 오레크로미스 종(*Oreochromis sp*), 연어 새먼 종(*Salmon sp*) 및 새우 페나우스 종(*Penaeus sp*)과 같은 수생 유기체에 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는, PACAP의 변형체는 병원성 제제에 의한 감염을 예방하거나 또는 치료하기 위해 물고기 또는 갑각류에 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 실현은 그 성장을 자극하기 위해, 그리고 질병에 대한 그의 저항성을 증가할 뿐 아니라, 병원성 제제에 의한 감염의 예방적 또는 치료적 처리를 위해 양식 중에 있는 물고기 또는 갑각류를 치료하기 위한 조성물 제제를 기술하며, 이 모든 것은 생산성 개선을 목적으로 한다.

실시예

- [0032] 실시예 1: 이 콜리(*E. coli*)에서의 그의 세포의 발현 및 피 파스토리스(*P. pastoris*)의 상등 배양액 내에서 그의 세포의 생산을 위한 PACAP를 코딩하는 시퀀스를 함유하는 발현 벡터의 컨스트럭션.
- [0033] 클라리아 가리에피누스(*Claria gariepinus*) PACAP 유전자는 T 벡터 내에 미리 클론된 템플레이트로서 GHRH-PACAP cDNA를 사용한 증합효소 연쇄 반응법(Polymerase Chain Reaction; PCR)에 의해 분리되었다. GHRH-PACAP 킴플릿 시퀀스 합입 시그널 펩티드 시퀀스를 얻기 위해서 시퀀스 SEQ ID No 1 및 SEQ ID No 2에 상응하는 특정 올리고뉴클레오티드가 사용되었고 그리고 이 콜리 발현 벡터에 이의 클론을 위해 필요한 제한 부위를 갖는 PACAP 유전자 만을 증폭하기 위해 특정 올리고뉴클레오티드 SEQ ID No 3 및 SEQ ID No 4가 사용되었다.
- [0034] 틸라피아 PACAP 유전자는 특정 올리고뉴클레오티드 SEQ ID No 3 및 SEQ ID No 4를 사용하여 상술한 바와 같이 유사하게 분리되었다. 본 발명은 틸라피아에서 이 유전자 분리의 최초 보고를 구성한다.
- [0035] PACAP를 코딩하는 시퀀스는 제한 부위 NdeI 및 BamHI를 사용하여 이 콜리 발현 벡터 pAR 3040 내에 클론되었다 (도 1A). 이 콜리 BL21D3 박테리아를 변형하고 그리고 유도자로서 0.5 mM IPTG를 사용하여 T7 프로모터의 조절 하에서 PACAP 발현을 유도하는 재조합 플라스미드를 선택하였다.
- [0036] 유전자 발현은 28°C에서 5시간 동안 수행되었다. 재조합 PACAP의 발현 및 그의 완전성은 질량분석법에 의해 확증되었다.
- [0037] 피 파스토리스에서 PACAP 발현을 위해 이스트 발현 벡터 pPS9 및 pPS10이 사용되었다. pPS9 유전자 클로닝을 위

해 특정 올리고뉴클레오티드 SEQ ID No 7 및 SEQ ID No 6이 사용되었고 그리고 pPS10 클로닝을 위해 올리고뉴클레오티드 SEQ ID No 5 및 SEQ ID No 6이 사용되었다. 우리는 pPS7 클로닝을 위해 제한 부위 NcoI 및 SpeI를 사용하였으며, 이 클로닝 어프로치는 N-말단에 메티오닌 및 글리신을 흥미 단백질로 부가한다. pPS10 클로닝을 위해 우리는 제한 부위 NaeI 및 SpeI를 사용하였으며, 이 클로닝 방법은 흥미 단백질로 아무런 아미노산도 부가하지 않는다(도 1 B).

[0038] 형질전환에 앞서, 플라스미드는 효소 *Sph* I으로 계대된다. 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) MP36 주는 전기천공법에 의해 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 이 주는 형질전환 후 His⁺ 표현형을 획득한 영양요구성의 돌연변이체 his3이다.

[0039] 도트 블릿에 의해 동정된 형질변이체는 또한 서던 블릿에 의해 분석되어 재조합 플라스미드의 발현 카세트에 대한 피 파스토리스의 유전자 *AOX1*의 대체에 의해 발생된 일 융합으로 한정되었다. 이 융합은 Mut^s (낮은 준위의 메탄올 이용성) 및 His⁺ 표현형을 생산한다. *AOX1*의 유전적 대체는 벡터 및 지놈 내에서 프로모터 영역인 *AOX1*과 3'*AOX1* 사이의 재조합에 의해 발생한다. 재조합의 결과로, *AOX1*에 대한 코딩 영역에서의 결손이 발생한다. Mut^s 표현형을 갖는 재조합 주는 *AOX2* 유전자에서 알코올 산화제 생산을 지지하고 그리고 이들은 메탄올에서 낮은 성장율을 갖는다.

[0040] 흥미있는 폴리펩티드 및 티라피아 성장 호르몬을 코딩하는 유전자는 메탄올에 의해 유도될 수 있는 *AOX1* 프로모터의 조절하에 있고, 그리고 이들은 시그널 펩티드를 갖는다. 피키아 파스토리스는 낮은 준위의 자가 단백질을 분비하고, 그리고 그 배양 배지는 보충물로서 단백질을 필요로 하지 않는다. 따라서, 분비된 이종형 단백질은 배지 내에 전체 단백질 중 높은 백분율을 가질 것으로 기대된다 (80% 이상) (Tschopp y col.; Bio/Technology 1987, 5: 1305-1308; Barr et al.; Pharm. Eng. 1992, 12: 48-51). 본 발명에서 설명된 재조합 단백질의 생산은 5L의 생물 반응조에서 배양액에 메탄올을 부가하여 수행되었다.

[0041] **실시예 2. 어린 클라리아 가리에피너스(*Claria gariepinus*)에서 성장 자극 실험, 간중량 지수 및 물고기 근육 건조 중량의 결정**

[0042] 성별의 구별 없이 대략적으로 동일한 연령의 평균 30 내지 40그램의 체중을 갖는 클라리아 가리에피너스(*Claria gariepinus*) 종의 18마리 메기를 사용하였다.

[0043] 각각 하나가 9마리의 두 개의 실험 군이 형성되었다. 각 군은 안정한 물 순환이 되는 분리된 탱크에서 28°C의 온도에 그리고 14시간 명기 및 10시간 암기의 광 주기에 순응되었다. 동물은 각 탱크에 전체 체중의 5%의 동등한 비율로 1일 당 2회 사료가 공급되었다. 동물은 실험 전에 동정되었다. A 그룹은 반 정제된 PACAP (70% 순도) SEQ ID No. 13으로 처리되고, 반면 대조군으로 사용된 다른 하나는 PBS 1X에 함유된 이 콜리 단백질로 처리되었다 (이 콜리 단백질은 대상 펩티드와 동일한 정제 과정으로 얻어져, 정제된 PACAP 샘플에 잔존하는 동일한 양의 오염물질을 갖는다). PACAP 처리된 물고기는 동물 체중의 그램당 0.1 mg의 펩티드 복용량으로, 주 당 이회 복막 내로 주사되어 졌다. 대조군은 상술한 바와 유사하게 주입되었다. 실험 시작 22일 후, 복강 내에 PACAP 주입된 동물은 음성 대조군에 비교하여 체중의 유의성 있는 증가(p<0.05)를 나타냈다 (도 2).

[0044] 간중량 지수 및 근육 건조 중량이 결정되어 그 물고기 체중에서의 증가는 조직 사이즈의 증가 또는 근육 내의 함유량의 증가에 기인하는 것이 아니라는 것을 입증한다.

[0045] 실험 군의 간중량 지수 및 근육 건조 중량 사이의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다 (도 3).

[0046] 시퀀스 SEQ ID No. 12의 재조합 PACAP가 적용되어 질 때도 유사한 결과가 얻어졌다.

[0047] **실시예 3. 재조합 PACAP를 포함하는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액으로 함침 욕에 의해 티라피아 유태동물에서의, 병원성 제제에의 저항성 및 프로락틴 유리의 성장 자극의 실험.**

[0048] 우리는 티라피아 유태동물 성장에 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에 내재하는 클라리아 가리에피너스(*Claria gariepinus*) 재조합 PACAP의 작용을 평가하는 실험을 하였다.

[0049] 각각 하나의 군에 60마리인 두 개의 실험 군이 형성되고, 한 그룹은 PACAP 뉴로펩티드 (SEQ ID No. 13)로 처리

되고 그리고 다른 그룹은 대조군으로 사용되었다. 유태동물 군은 안정한 물 순환이 되는 분리된 탱크에서 28℃의 온도에 그리고 14시간 명기 및 10시간 암기의 광 주기에 순응되었고, 그리고 동물은 다음의 방정식으로부터 얻어진 양으로 사료가 공급되었다: 사료의 양 = 동물의 # X 평균 체중 (g) X 40% /100. 처리는 2L의 물에 함침 욕, 20일 동안 60분 동안 주당 3회로 구성되고, 복용량은 물의 리터 당 200 mg의 표적 단백질이다.

[0050] 우리는 실험 시작 10일에 PACAP 처리 군은 대조군에 비하여 유의성 있는 체중 및 길이 증가를 보였고(p<0.01), 실험 시작 15일에 각 군 사이의 차이가 아주 유의성 있었다(p<0.001)는 것을 결과로 얻었다 (표 1 및 도 4A와 4B). 함침 욕의 시작 20일에 PACAP 처리 군과 대조군 사이의 차이는 통계학적으로 유의성이 있었다 (p<0.001) (도 5).

표 1

[0051] 실험 시작의 10일 및 15일에 틸라피아 유태동물의 평균 체중 및 길이.

처리	체중 (g)		길이 (cm)	
	10 일	15 일	10 일	15 일
PACAP	0.3536±0.0879	0.6458±0.2399	2.41±0.2726	2.84±0.3627
대조군	0.2221±0.0565	0.2785±0.1438	1.98±0.1687	2.01±0.5174

[0052] 체중 및 길이는 평균±S.D로 나타냄.

[0053] 마지막 함침 욕 30일 후 실험 군 동물의 체중 및 길이에 있어서의 차이는 아주 유의성이 있었기 때문에(p<0.01) 성장에서의 PACAP의 효과는 시간에 의존하는 것으로 관찰되었다 (도 6).

[0054] 부가하여, PACAP 처리 물고기는 음성 대조군에 비하여 초기 전개 단계에서 피부 착색화를 보였다 (도 7).

[0055] 이 실험에서, 우리는 또한 피부 기생 원생동물 트리콘드리아 종(*Trichodina sp*)의 존재를 연구하였는데, 10 동물이 각 실험 그룹으로 랜덤하게 선택되고 그리고 이 병원성 제체에 의한 전이 농도가 결정되었다. 전이 농도의 값은 다음 방정식에 따라 결정되었다:

[0056] (I: # 전체 물고기 기생충) $I = \frac{\sum N}{n - F_0}$ y E = n-F₀ x 100/ n

[0057] I: (평균 전이 농도) E: (# 전체로부터 기생 물고기)

[0058] $\sum N$: (전체 발견된 기생충) F₀: (비 기생충 물고기의 수)

[0059] n: (분석된 물고기의 수)

[0060] PACAP 처리 물고기는 대조군(I의 평균 = 5.56)에 비해 유의적으로 열등한 (p< 0.01) 원생동물 트리콘드리아 종에 의한 전이 농도(I의 평균 = 2.20)를 나타냈다.

[0061] 물고기는 이미 기술한 것과 동일한 조건에서 실험의 시작 45일에 함침 욕으로 처리되고 그리고 웨스턴 블롯 및 ELISA에 의해 혈청에서 프로락틴을 측정하기 위해 처리 24 시간 후 그룹 당 10 동물에 대해 혈액이 추출되었다. 폴리클로날 항체 항 틸라피아 프로락틴이 이들 분석을 위해 사용되었다. 우리는 대조군에 비하여 PACAP 처리된 군 사이에서 통계적으로 유의성 있는 차이 p<0.01을 관찰하였다 (표 2). 이것은 담수 및 해수에서 그 생활사를 가지고 그리고 프로락틴이 삼투조절에 아주 중요한 기능을 수행하는 연어의 경우이기 때문에, 이것은 상업적인 수생 유기체에 있어서 아주 매력적인 결과이다.

표 2

[0062] 실험 시작 45일에 틸라피아 혈청에서의 프로락틴의 농도(ng/mL)

프로락틴의 농도	PACAP 처리 군	대조군
ng/ml	36.860±2.695*	15.745±1.362

[0063] 농도는 평균±S.D로 나타냄.

[0064] *는 유의성 있는 차이 P<0.01을 나타냄.

[0065] **실시예 4. 어린 틸라피아 오레크로미스 니로티쿠스(Oreochromis niloticus) 식욕에 대한 재조합 PACAP의 효과를 측정하기 위한 실험.**

[0066] 지금까지, 물고기에서 식욕에 있어서 PACAP의 생물학적인 효과는 연구되어 지지 않았다. 포유동물 아류 척추동물 생물체에서, 식욕에 있어서의 이 펩티드의 활성이 거의 특징되어 지지 않았다 (Jensen, 2001, Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. And Physiol. Part A* 128:471-479).

[0067] 물고기 식욕에 있어서 PACAP의 효과를 분석하기 위하여, 우리는 성의 구별 없이 대략적으로 동일한 평균 체중을 가지는 오레크로미스 니로티쿠스 종의 틸라피아를 사용하였다. 각각 3 마리의 실험 그룹이 형성되었고 그리고 각 그룹 당 3번 반복되었다. 각 그룹은 안정한 물 순환이 되는 분리된 탱크에서 28℃의 온도에 그리고 14시간 명기 및 10시간 암기의 광 주기에 순응되었다.

[0068] 일 그룹은 동물의 체중 그램 당 0.5 µg의 반-정제 PACAP (순도 87%) SEQ ID No. 13으로 복막 내 주입으로 처리되었다. 제이 그룹은 동물의 체중 그램 당 0.1 mg의 펩티드의 복용량으로 동일한 투여경로를 통해 GHRP-6 (Lipotec, S.A, Spain)으로 처리되었다. 대조군은 PBS 1X에 함유된 이 콜리 단백질로 처리되었다 (이 콜리 단백질은 대상 펩티드와 동일한 정제 과정으로 얻어져, 정제된 PACAP에 잔존하는 동일한 양의 오염물질을 갖는다).

[0069] 처리 후, 동일한 양의 사료가 세 실험군에 부가되어, 6시간에 비 섭취된 사료가 모아지고 그리고 사료가 다시 부가되었다. 식욕은 실험 시작 22시간에 다시 측정되었다.

[0070] 각 탱크에서 섭취되지 않은 사료가 스토브에서 건조되고(100℃에서 24시간 동안) 그리고 화학천칭에서 계량되었다. 섭취된 사료는 탱크에 부가된 사료(10 그램, 20%의 습도를 가짐)와 물고기에 의해 섭취되지 않은 사료 간의 차이를 결정하여 계산되었다.

[0071] PACAP 및 GHRP-6 처리 틸라피아는 대조군과 비교하여 유의성 있는(p<0.05) 식욕 증가를 보였다 (도 8)

[0072] **실시예 5. 메기 클라리아 가리에피너스(Claria gariepinus) 면역계에서 재조합 PACAP의 평가**

[0073] 어린 클라리아 가리에피너스가 채용되었다. 두 그룹은 각 그룹당 10 마리로 한정되었다. 각 그룹은 안정한 물 순환이 되는 분리된 탱크에서 28℃의 온도에 그리고 14시간 명기 및 10시간 암기의 광 주기에 순응되었다. 동물은 각 탱크에서 전체 동물의 체중의 5%에 해당하는 동등한 비율로 일일당 2번 급식되었다. 동물은 실험 전에 동정되었다. PACAP (SEQ ID No. 13) 처리된 물고기는 주당 2회, 물고기의 체중 그램 당 0.1 mg의 펩티드 복용량으로 복막 내로 주입되었다.

[0074] 실험 시작 12일에 물고기 혈액이 추출되어 혈청 내의 라이소자임과 렉틴 준위가 측정되었다. 혈청 내에서 라이소자임 활성은 세균 마이크로코커스 라이소데익티쿠스(*Micrococcus lysodeikticus*)를 용해하는 라이소자임의 능력에 기초한 방법을 사용하여 측정되었다. 96-웰 마이크로트레이에서, 인산염 완충액(0.05 M, pH 6.2)에 4개의 두 배 일련의 희석으로 된 100 mL의 샘플이 100 mL의 마이크로코커스 라이소데익티쿠스(시그마 사 제품) 3 mg/ml 현탁액과 혼합되었다. 마이크로트레이는 22℃에서 배양되고 그리고 O.D.가 450 nm에서 0, 2, 3, 5, 10, 15, 25, 35 및 45분에 판독되었다. 양성 대조군에 대해서 물고기 혈청은 헨(hen) 난백 라이소자임으로 대체되고 (8 µg/mL에서 시작된 일련의 희석) 그리고 음성 대조군에 대해서 완충액이 물고기 혈청으로 대체되었다. 라이소자임 활성의 단위는 0.001 min⁻¹의 O.D. 판독에서 감소를 야기하는 미숙한 균질 현탁액의 양으로 정의된다. 우리는 대조군과 비교된 PACAP 처리 군들 사이의 통계적으로 유의성 있는 차이(p<0.01)를 관찰하였다 (표 3).

표 3

[0075] 실험 시작 20일 후 물고기 혈청에서 라이소자임 농도 (µg/mL)

라이소자임 농도	PACAP 처리 군	대조군
µg/ml	21.765±5.438*	7.828±8.393

[0076] 농도는 평균±S.D로 나타냄.

[0077] *는 유의성 있는 차이 P<0.01을 나타냄.

[0078] 피 혈청 내의 락틴의 존재를 결정하기 위해, 우리는 적혈구응집 분석을 하였다. 혈청의 일련의 두 배 희석물이, 동일한 부피의 신선하게 제조된 2% 적혈구 현탁액(PBS 내 래빗)이 부가된 U-형 바닥 (96 웰, Greiner, Microlon) 마이크로타이터 웰 내에 pH 7.2의 PBS를 사용하여 수행되었다. 웰은 실온에서 1시간 동안 배양되고 그리고 역가는 시각으로 판독되었고 그리고 (전체 웰 바닥을 덮는 세포의 균일하게 분산된 층으로 명백한 바와 같이) 응집반응을 보이는 마지막 웰에서의 희석에 동일하다. 샘플의 적혈구응집 활성이 시험되어 각 역가 값이 얻어졌다. 활성은 역가, 즉 완전한 응집반응을 보이는 최고의 희석에 상응하는 것으로 표현되었다.

[0079] PACAP 처리 물고기는 대조군에 비교하여 혈청에서 락틴 준위의 유의성 있는 증가(p<0.05)를 보였다(표 4).

표 4

[0080] 실험 시작으로부터 45일에 물고기 혈청에서 적혈구응집 활성의 역가(완전한 응집반응을 보이는 최고의 희석에 상응하는 것).

	PACAP 처리군	대조군
역가	4*	1

[0081] 스튜던트 테스트. *는 유의성 있는 차이 P<0.05를 나타냄.

[0082] **실시예 6. 재조합 PACAP를 포함하는 피 파스토리스(*P. pastoris*) 배양 상등액으로 함침에 의한 틸라피아 유태동물에서 성장 자극의 실험.**

[0083] 우리는 틸라피아 유태동물의 성장에 있어서 피 파스토리스 배양 상등액에 함유된 클라리아스 가리에피너스 (*Clarias gariepinus*) PACAP (SEQ ID No 14)의 기능을 평가하기 위한 실험을 하였다.

[0084] 세 개의 실험군이 각 하나에 50 유태동물로 형성되었다. 일 그룹은 피 파스토리스 배양 상등액에 함유된 재조합 PACAP (SEQ ID No. 14)로 처리되었다. 제이 그룹은 피 파스토리스 배양 상등액에 함유된 재조합 틸라피아 성장 호르몬(GH)으로 처리되었다. 대조군은 비-형질전환된 피 파스토리스 배양 상등액으로 처리되었다. 유태동물은 일일에 두 번 다음의 방정식으로부터 얻어진 양으로 사료가 공급되었다: 사료의 양 = 동물의 # X 평균 체중 (g) X 40% /100. 처리는 90분 동안 주당 3회 30L의 부피에 함침에 의해 수행되었다. 복용량은 물의 리터 당 100 mg의 표적 단백질이다.

[0085] 우리는 실험 시작 5주(35일)에 PACAP 처리 군은 대조군에 비하여 유의성 있는 체중 증가를 보였다(p<0.01)는 것을 결과로 얻었다. 성장 호르몬 처리 군은 대조군에 비하여 유의성 있는 체중 증가를 보였다 (p<0.05) (표 5).

표 5

[0086] 그램으로 틸라피아 유태동물의 체중.

시간 (일수)	PACAP 처리군	GH 처리군	대조군
0	0.1013±0.0625	0.1140±0.0457	0.1040±0.0535
35	0.9870±0.0525	0.7875±0.0422	0.4566±0.0363

[0087] 체중은 평균±S.D로 나타냄.

[0088] **실시예 7. 재조합 PACAP를 포함하는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 배양 상등액으로 처리된 새우 리토펬 내우스 슈미띠(*Litopenaeus schmitti*)에서 유태동물 질의 개선 및 성장 자극의 실험.**

[0089] 우리는 리토펬내우스 슈미띠 종의 새우 유태동물을 사용하였다. 두 개의 실험군이 각 하나에 100 유태동물로 형

성되었다. 일 그룹은 피 파스토리스 배양 상등액에 함유된 재조합 PACAP (SEQ ID No. 14)로 처리되었고 대조군으로 사용된 다른 군은 비-형질전환된 피 파스토리스 배양 상등액으로 처리되었다.

[0090] 유태동물은 100 L 용량의 화이버 글라스 탱크에서 배양되었다. 사료공급은 다이어토미스(*Chaetoceros gracilis*), 편모충(*Tetraselmis suecica*) 및 알테미아 노플리우스(Aquatic Eco-Systems Inc.)를 기본으로 공급되었다.

[0091] 무생물적인 성장 인자는 다음과 같다:

[0092] · 조사(24:00 L/D)

[0093] · 안정된 통기

[0094] · 34 ppm의 염도

[0095] · 용존 산소 5.2 ± 0.5

[0096] · 80%의 재순환 변경 PZ_{III}

[0097] 네 번의 함침 욕이 각 실험군에 매 3일에 한번 씩 1시간의 기간 동안 적용되었다.

[0098] 우리는 PACAP 처리 군은 대조군에 비하여 유의성 있는 체중 증가를 보였다($p < 0.01$)는 것을 결과로 얻었다 (표 6).

표 6

[0099] 밀리그램으로서의 새우 유태동물 체중

시간 (일수)	PACAP 처리군	대조군
0	0.3045 ± 0.0425	0.3273 ± 0.0420
30	12.5034 ± 0.0455	6.5325 ± 0.0438

[0100] 체중은 평균 ± S.D로 나타냄.

[0101] 우리는 PACAP 처리 군에서 새우 양식에 아주 중요한 보다 높은 균질성과 보다 양질의 유태동물(보다 아가미가 세분되고 부리가 변이됨)을 관찰하였다. PL9 단계 생존율의 차이는 PACAP 처리 군에서 40% 보다 크다.

[0102] **실시예 8. 물고기 다이어트 제제에서 재조합 PACAP를 포함함에 의한 어린 클라리아스 가리에피너스(*Clarias gariepinus*)에서의 성장 자극.**

[0103] 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 배양 상등액에 포함되는 재조합 PACAP (SEQ ID No. 14)가 농축되고 그리고 대략 5 mg/Kg의 공급사료의 농도로 영양 물고기 상용사료로 제형화되었다.

[0104] 두 개의 실험군이 각 하나에 평균 체중 0.1 g의 100 마리 유태동물로 형성되었다. 일 그룹은 피 파스토리스 배양 상등액에 함유된 재조합 PACAP (SEQ ID No. 14)로 처리되었고 대조군으로 사용된 다른 군은 비-형질전환된 피 파스토리스 배양 상등액으로 처리되었다. 실험은 30일 동안 수행되었다.

[0105] 5 mg/Kg의 공급사료의 복용량으로 상용사료에 포함된 재조합 PACAP (SEQ ID No. 14)는 아주 유의성 있는 통계학적 차이($p < 0.01$)로 대조군에 비하여 성장에서 30% 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 박테리아 발현 벡터(도 1a) 및 이스트 발현 벡터(도 1b)에서의 PACAP 클로닝 방책이다.

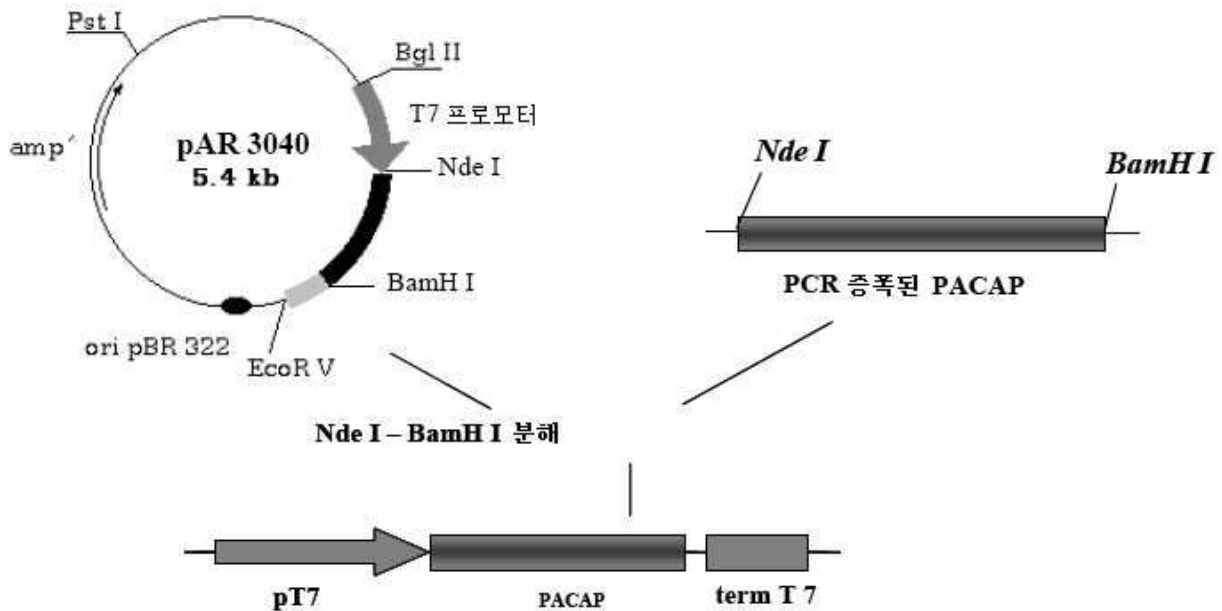
[0025] 도 2는 어피너티 크로마토그래피에 의해 정제된 재조합 PACAP를 동물 체중의 g 당 0.1µg의 복용량으로 복강 내로의 주입에 의해 초생의 클라리아 가리에피너스(*Claria gariepinus*)에서의 성장 자극 실험이다. 그래프는 대조

군과 비교하여 PACAP 처리된 군의 평균 체중을 나타낸다.

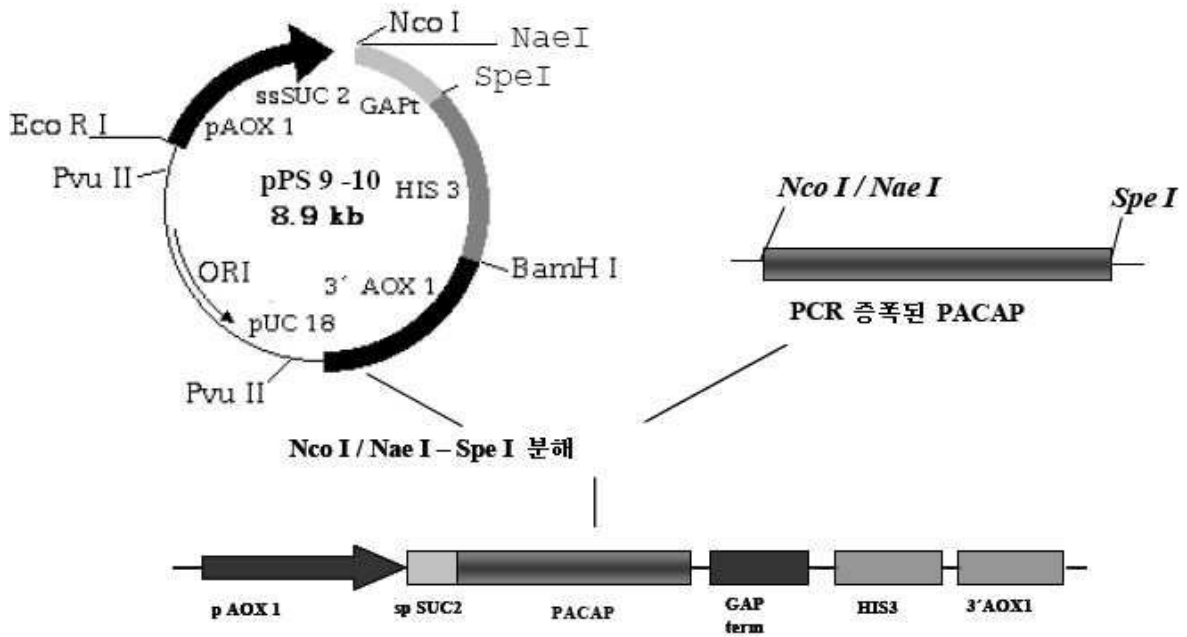
- [0026] 도 3은 어피니티 크로마토그래피에 의해 정제된 재조합 PACAP를 동물 체중의 g 당 0.1 μ g의 복용량으로 복강 내로의 주입에 의한 초생의 클라리아 가리에피너스(*Claria gariepinus*)에서의 성장 자극 실험이다. 그래프는 대조군과 비교하여 PACAP 처리된 군의 평균 간중량 지수 및 근육 건조 중량을 나타낸다.
- [0027] 도 4a 및 도 4b는 물 1L 당 100 mg의 복용량으로 재조합 PACAP를 함유하는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에서의 함침에 의한 틸라피아 유태동물에서의 성장 자극 실험이다. 그래프 4a 및 4b는 음성 대조군에 비교한 처리된 군의 평균 체중 및 길이를 나타낸다.
- [0028] 도 5는 물 1L 당 100 mg의 복용량으로 재조합 PACAP를 함유하는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에서의 함침에 의한 틸라피아 유태동물에서의 성장 자극 실험이다. 그래프는 처리 시작 22일 후 음성 대조군에 비교한 처리된 군의 평균 체중을 나타낸다.
- [0029] 도 6은 물 1L 당 100 mg의 복용량으로 재조합 PACAP를 함유하는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에서의 함침에 의한 틸라피아 유태동물에서의 성장 자극 실험이다. 사진은 대조군 (B)에 대하여 PACAP 처리 물고기 (A 및 C)의 마지막 함침 욕 30일 후 길이의 차이를 보여준다.
- [0030] 도 7은 물 1L 당 100 mg의 복용량으로 재조합 PACAP를 함유하는 이 콜리(*E. coli*) 파열 상등액에서의 함침에 의한 틸라피아 유태동물에서의 성장 자극 실험이다. 사진은 대조군 (C)에 대하여 PACAP 처리 물고기 (A 및 B)에서 물고기 색상의 초기 전개를 보여준다.
- [0031] 도 8은 어피니티 크로마토그래피에 의해 정제된 재조합 PACAP의 동물 체중의 g 당 0.5 μ g의 복용시 틸라피아 오레크로미스 니로티쿠스(*Oreochromis niloticus*) 식욕의 평가이다. 사진은 처리 시작 6시간 및 22시간 후에 물고기에 의해 섭취된 음식물의 평균을 보여준다.

도면

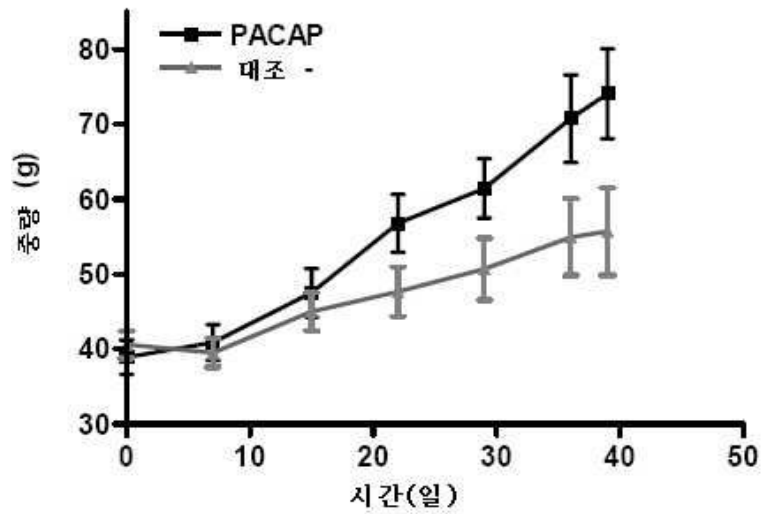
도면1a



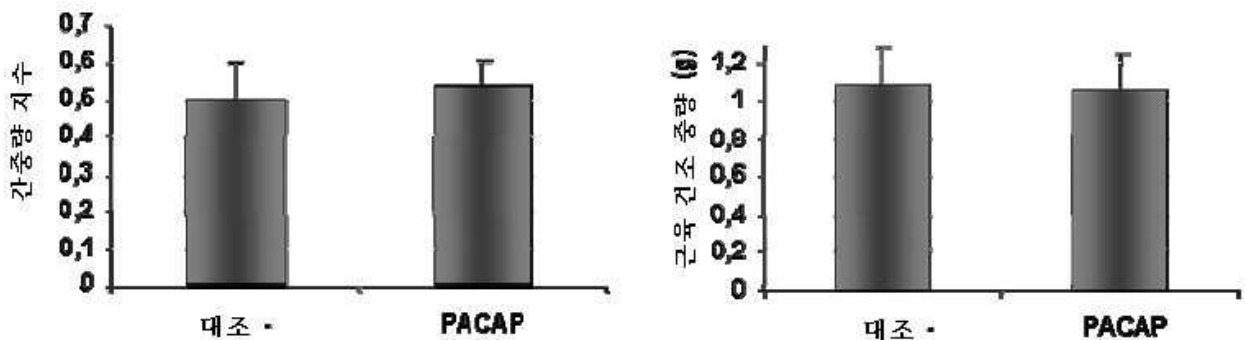
도면1b



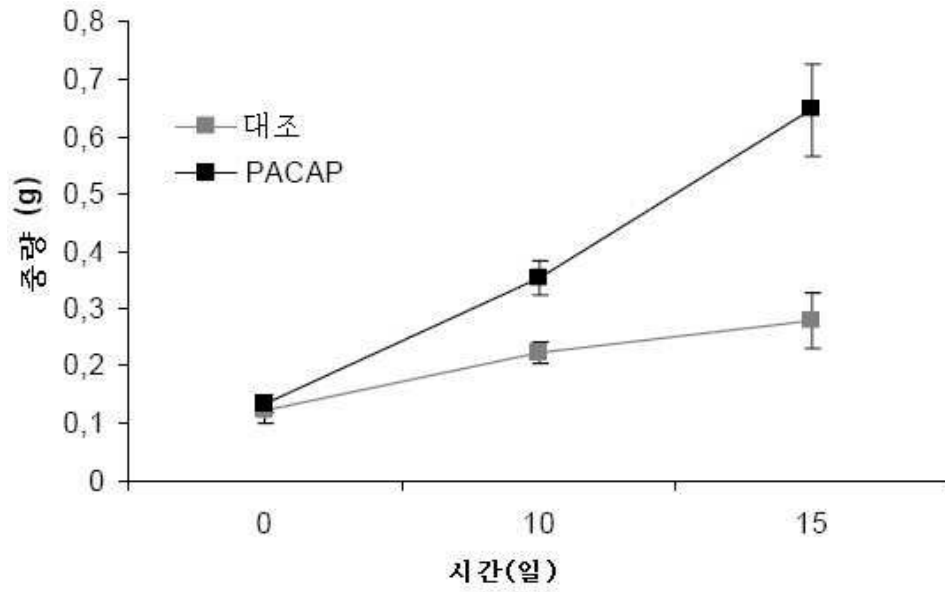
도면2



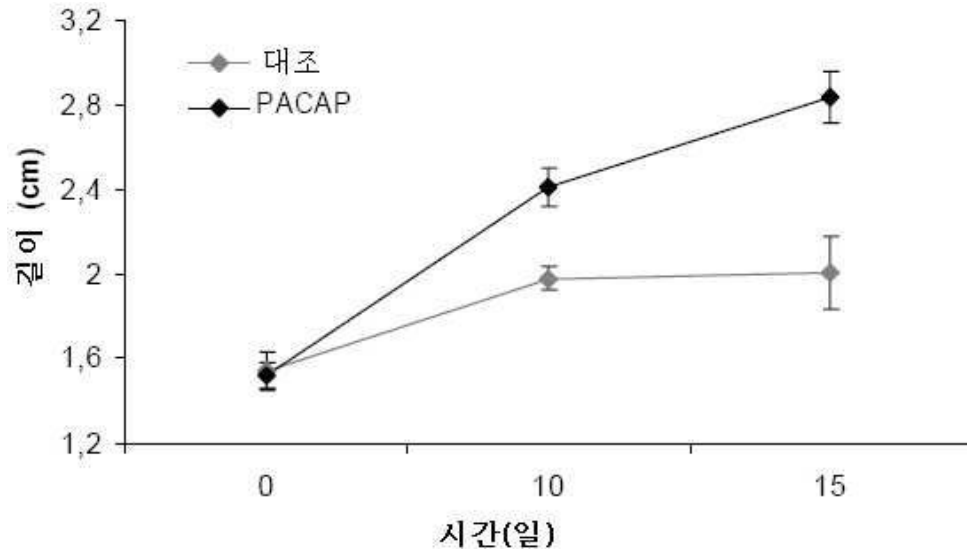
도면3



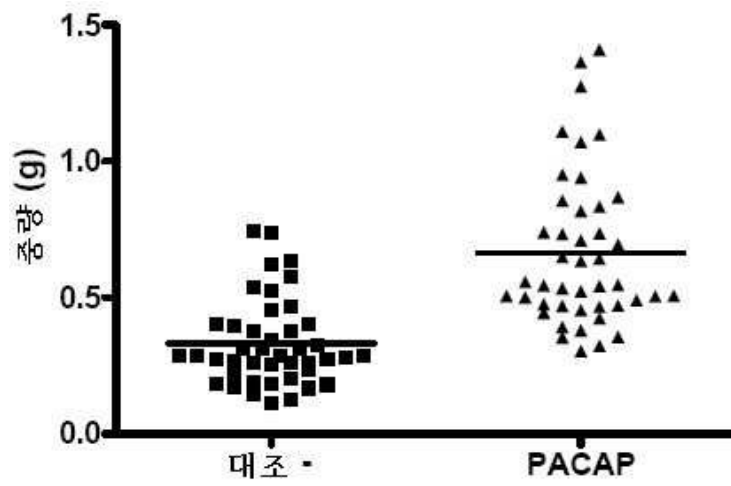
도면4a



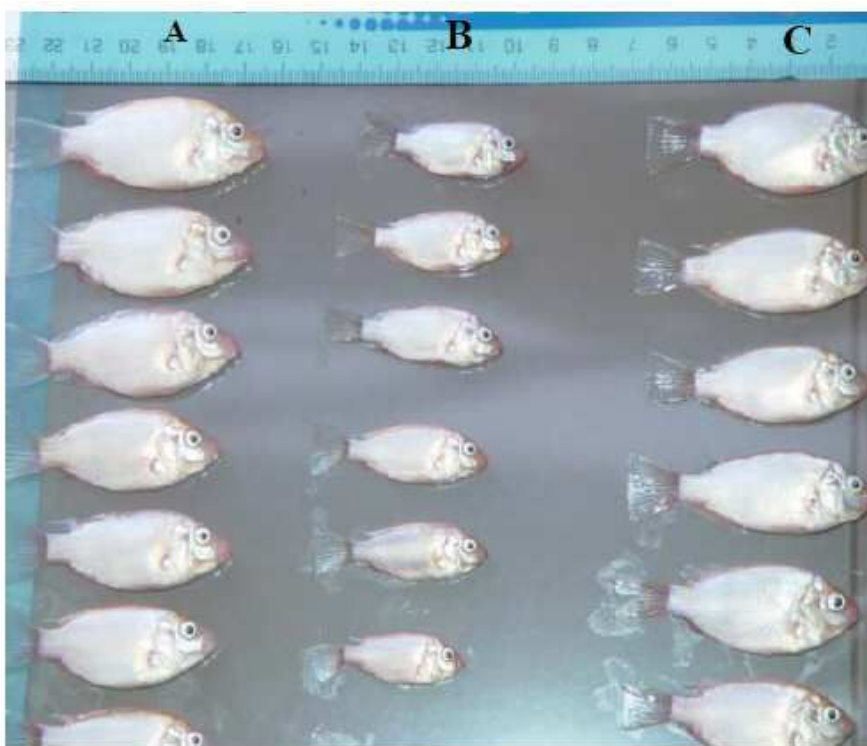
도면4b



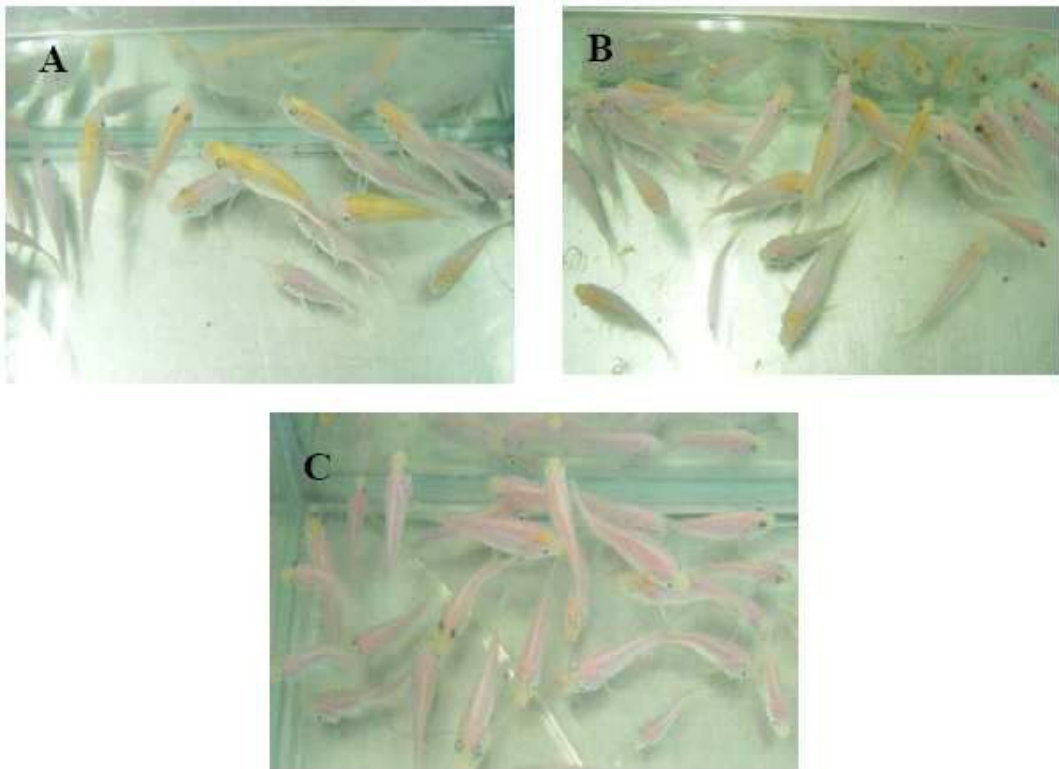
도면5



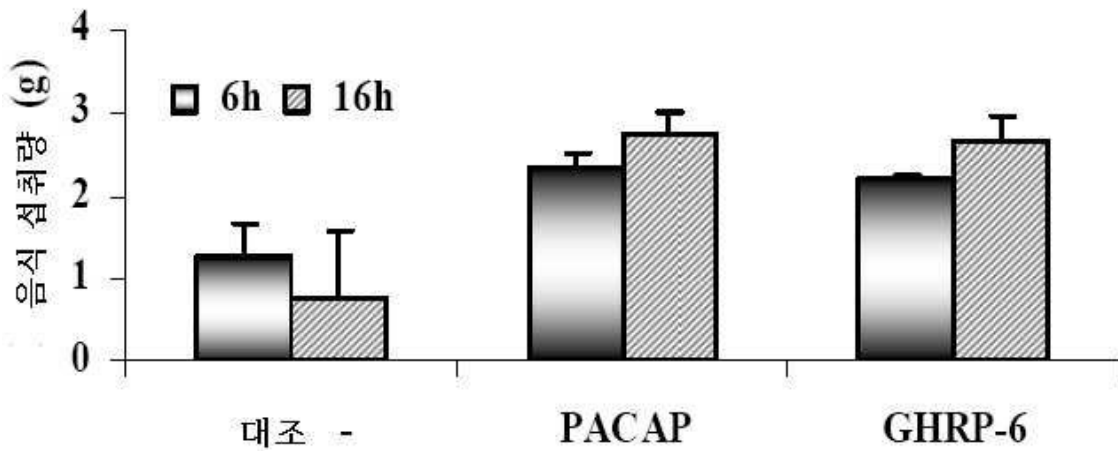
도면6



도면7



도면8



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Center the Genetic Engineering and Biotechnology

<120> NEUROPEPTIDES FOR THE AQUATIC ORGANISMS CULTURE

<130> Juana Maria

<140>

<141>

<150> CU 2005- 0231
 <151> 2005-11-22

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of the Artificial sequence: primer

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (..)
 <223> Primer to amplify the complete nucleotide sequence of the GHRH-PACAP gene.
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(29)
 <400> 1
 gcagccatgg ccaaatctag tagagctac 29

<210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Description of the Artificial sequence: primer

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (..)
 <223> Primer to amplify the complete nucleotide sequence of the GHRH-PACAP gene.

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1)..(31)
 <400> 2
 ggaattcctt taatggcttg acttcgtaca t 31

<210> 3
 <211> 32
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the Artificial sequence: primer

<220>

<221> 5'UTR

<222> ()..)

<223> Primer to amplify the PACAP gene.

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(32)

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(32)

<400> 3

catccatgatg cactcggacg gcattttcac gg

32

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the Artificial sequence: primer

<220>

<221> 3'UTR

<222> ()..)

<223> Primer to amplify the PACAP gene.

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1)..(38)

<400> 4

cgggatcctt attgtttct aaacctctgt ctgtacct

38

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the Artificial sequence: primer

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(22)
 <223> Primer to amplify the PACAP gene for its expression in Pichia pastoris.
 <400> 5
 cactcggacg gcattttcac gg 22

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Description of the Artificial sequence: primer
 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1)..(31)
 <223> Primer to amplify the PACAP gene for its expression in Pichia pastoris.

<400> 6
 actagtttat ttgtttctaa acctctgtct g 31

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Description of the Artificial sequence: primer
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(30)
 <223> Primer to amplify the PACAP gene for its expression in Pichia pastoris.

<400> 7
 ccatgggaca ctcgacggc attttcacgg 30

<210> 8
 <211> 727
 <212> DNA
 <213> Clarias gariepinus
 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(727)
 <223> Nucleotide sequence of the GHRH-PACAP gene
 <400> 8
 atggccaat ctagtagagc tactttggct ctgctcatct acgggatctt aatgcgctac 60
 acgccaatg cacaccatc ggaatgggct tcccaatat gaggctagaa aacgacgtgt 120
 tcggggacga gggaaactcg ttaagtgagc tgcctacga gccggacacg atgagcgcgc 180

gcagtgctcc agccctccct gaagacgcat acacactgta ctaccgccc gagagaagag 240
 ccgaaacgca tgcagacgga ttgttagata gacccttgag ggacatcctg gttcagttat 300
 cagcccgaata atatctgcat tctctgacgg cagttcgcgt aggtgaggaa gaagaggatg 360

aagaggactc ggagccactg tcgaagcgcc actcggacgg cattttcagc gacagctaca 420
 gccgctaccg gaaacaaatg gccgtaaaaa aataccttgc agcagtgctg ggaagaaggt 480
 acagacagag gtttagaaac aaaggacgcc gctttgctta tttgtagcgg ataggaagaa 540
 aaggaaagaa agaaaaaac gcgagagaga gagagagaga gagaataga gcaactgccc 600
 tcccttgtgt ccattcaatc atacagtcag aagtctggta tctaacttaa cactgagcag 660
 tcagtcgggtg gatctcgctt gtgttctttt aaacatgtat tttatgtacg aagtcaagcc 720
 attaaag 727

<210> 9
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Clarias gariepinus*

<220>
 <221> PROPEP
 <222> ()
 <223> GHRH-PACAP aminoacid sequence
 <400> 9
 Met His Ala Asp Gly Leu Leu Asp Arg Ala Leu Arg Asp Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Gln Leu Ser Ala Arg Lys Tyr Leu His Ser Leu Thr Ala Val Arg Val
 20 25 30
 Gly Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Ser Glu Pro Leu Ser Lys Arg
 35 40 45
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 50 55 60
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg
 65 70 75 80
 Gln Arg Phe Arg Asn Lys
 85

<210> 10
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> *Clarias gariepinus*

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(114)
 <223> Nucleotide sequence of the PACAP gene
 <400> 10
 cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc ggaacaaat gcccgtaaaa 60
 aaataccttg cagcagtgct gggaagaagg tacagacaga ggtttagaaa caaa 114

<210> 11
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> *Tilapia nilotica*

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(114)
 <223> Nucleotide sequence of the PACAP gene
 <400> 11
 cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc ggaacaaat ggcagtaaaa 60
 aagtatcttg cagcagtgtc gggaagaagg tacagacaga ggtttagaaa caaa 114

<210> 12
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Clarias gariepinus*

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(40)
 <223> *Pichia pastoris* recombinant PACAP (aminoacid sequence)
 <400> 12
 Met Gly His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg
 1 5 10 15
 Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
 20 25 30
 Tyr Arg Gln Arg Phe Arg Asn Lys
 35 40

<210> 13
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Claria gariepinus*

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(39)
 <223> *E.coli* recombinant PACAP (aminoacid sequence)
 <400> 13
 Met His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Phe Arg Asn Lys
 35

<210> 14

<211> 38
 <212> PRT
 <213> *Clarias gariepinus*

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(38)
 <223> *Pichia pastoris* recombinant PACAP (aminoacid sequence without modifications)
 <400> 14
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg
 20 25 30
 Gln Arg Phe Arg Asn Lys
 35