

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年10月11日(11.10.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/186487 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7076 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
A01K 83/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A01K 85/00 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A23K 20/153 (2016.01) C12N 1/19 (2006.01)
A23K 50/80 (2016.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

(71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所
(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広
沢 2 番 1 号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 吉原 良浩 (YOSHIHARA Yoshihiro);
〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研
究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 脇阪
紀子(WAKISAKA Noriko); 〒3510198 埼玉県和
光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学
研究所内 Saitama (JP). 宮坂 信彦(MIYASAKA
Nobuhiko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1
号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama
(JP). 小出 哲也(KOIDE Tetsuya); 〒3510198 埼
玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法
人理化学研究所内 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/014712

(22) 国際出願日: 2018年4月6日(06.04.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

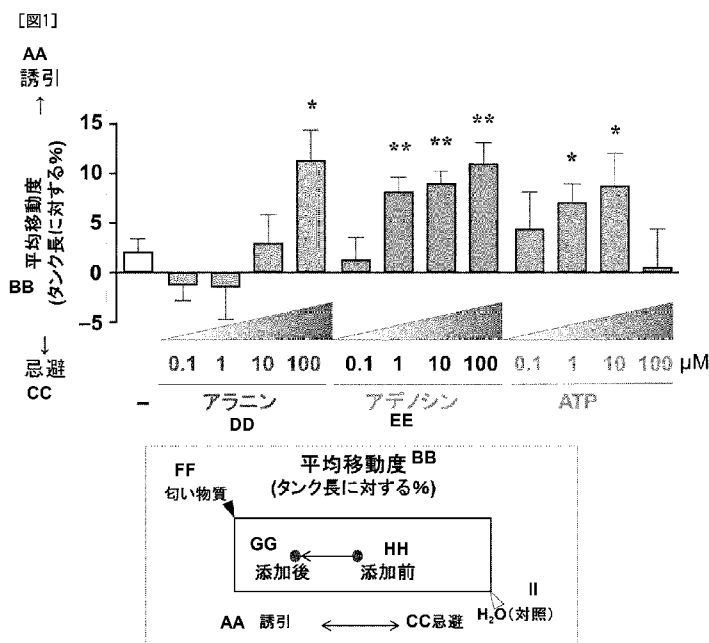
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-075796 2017年4月6日(06.04.2017) JP

(74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.);
〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目

(54) Title: TECHNIQUE FOR CONTROLLING FISH BEHAVIORS

(54) 発明の名称: 魚類の行動制御技術



(57) Abstract: Provided is adenosine as a substance that induces attracting behavior and food searching behavior of fish. Also provided is a novel adenosine receptor as a receptor for adenosine.

(57) 要約: 本発明は、魚の誘引行動および策餌行動を誘発する物質としてアデノシンを、およびアデノシンの受容体として新規アデノシン受容体を提供する。

[続葉有]



6 番 5 号 丸の内北口ビル 2 1 階 大野
総合法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 魚類の行動制御技術

技術分野

[0001] 本発明は、魚類の行動制御技術、特に魚の誘引行動および策餌行動を誘発する物質並びにこれに関与するアデノシン受容体に関する。

背景技術

[0002] 魚において嗅覚は、重要な感覚器官であり、策餌行動、求愛行動、危険回避行動など様々な重要な行動制御に関与している。これまでに食料源から放出されるヌクレオチドが様々な種の魚に感知されることが明らかにされている（非特許文献1）。

[0003] アデノシンは、神経伝達物質として神経細胞に発現するアデノシン受容体に結合し、神経細胞の信号伝達を制御する。アデノシン受容体としては、これまでのところP1受容体としてA1受容体、A2a受容体、A2b受容体およびA3受容体が発見されている。また、ヌクレオチドの受容体としては、P2受容体として、P2X受容体ファミリーとP2Y受容体ファミリーとが発見されている。しかし、いずれの受容体がヌクレオチドの検知に関与しているのかは不明であった。

[0004] 魚の餌に関して、養魚用飼料の主原料は魚粉である。近年では、世界的な養殖漁業の増加と、魚粉の減産の影響から、魚粉の供給が追いつかず、魚粉の国際的な取引価格は高値で推移し、この状況は当面変わらないと予想されている。一方で、飼料への魚粉の配合比率を減少させると養魚の飼育成績は低下する。このような状況で、魚粉を代替できる、あるいは魚粉の使用量を減らした飼料の開発が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Carr, W. E. S. (1988). The Molecular Nature of Chemical Stimuli in the Aquatic Environment. (New York: Springer), pp. 3-27.

発明の概要

[0006] 本発明は、魚の誘引行動および策餌行動を誘発する物質としてアデノシンを提供し、およびアデノシンの受容体として新規アデノシン受容体を提供する。

[0007] 本発明者らは、アデノシンが魚の誘引行動および策餌行動を誘発することを見出した。本発明者らはまた、上記誘引行動および策餌行動の誘発には、新規のアデノシン受容体が関与していることを見出し、A2c受容体と命名した。本発明者らはさらに、A2c受容体は、魚類に広く保存され、両生類もA2c受容体遺伝子を有することが確認できること、および、A2c受容体のアデノシンの推定結合部位は種間で広く保存されていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づく発明である。

[0008] すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) アデノシンを含む、A2c受容体を活性化させることに用いるための組成物。

(2) 水中に添加して魚の行動を制御するための組成物であって、アデノシンを含む、組成物。

(3) 魚の行動制御が、食欲を増進すること、魚を誘引すること、及び／又は、策餌行動を活発化させることである、上記(2)に記載の組成物。

(4) アデノシンまたは上記(1)～(3)に記載の組成物を含む、魚の飼料。

(5) 無魚粉化飼料である、上記(4)記載の飼料。

(6) アデノシンまたは上記(1)～(3)に記載の組成物を含む、釣り針または疑似餌のコーティング剤。

(7) A2c受容体タンパク質。

(8) 上記(7)に記載のタンパク質をコードする核酸。

(9) 上記(7)に記載のタンパク質を発現する細胞。

(10) 上記(7)に記載のタンパク質を認識する抗体。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、魚の誘引行動の評価系と魚がアデノシンに誘引することを示す。

[図2]図2は、魚がアデノシンに誘引することを示す。

[図3]図3は、新規アデノシン受容体として発見しA2cと命名した受容体の発現細胞がATP刺激によりc-Fosを発現する細胞と一致することを示す。

[図4A]図4Aは、A2c受容体の特性解析のスキームを示す。

[図4B]図4Bは、A2c受容体がアデノシン特異的に活性化し、cAMP産生を誘導することを示す。

[図4C]図4Cは、A2c受容体活性化によるcAMP産生に対するアデノシンの効果とATPの効果との比較結果を示す。

[図5]図5は、A2c受容体遺伝子が存在する周辺のゲノム構造が種間で保存されていることを示す。

[図6]図6は、魚類28種および両生類2種のA2c受容体遺伝子の近隣接合法による系統樹を示す。

発明の具体的な説明

[0010] 本明細書では、「魚類」には、いわゆる魚であり、特に軟骨魚類、および硬骨魚類（条鰭魚類）が含まれる。本明細書では、「ほ乳類」には、マウスやラットなどの齧歯類、サルやヒトなどの霊長類が含まれる。

[0011] 本明細書では、アデノシンとは、アデニンとリボースとからなるヌクレオシドである。

[0012] 本明細書では、アデノシン受容体とは、アデノシンに対するGタンパク質共役型の受容体分子を意味する。アデノシン受容体は、P1受容体ともよばれ、ヒトではA1、A2A、A2BおよびA3の4種類のサブタイプが知られている。なお、P2受容体は、細胞外ヌクレオチド（ATP、ADP、UTP、UDPなど）をリガンドとする受容体であり、P2X受容体およびP2Y受容体の2つのファミリーに大別され、上記アデノシン受容体とは異なる。

- [0013] 本明細書では、「有効量」とは、指定された用途に用いるために適した量を意味し、有効量の有効成分は、指定された用途で達成すべき目的を達成することができる。
- [0014] 本明細書では、「A2c受容体」とは、水生脊椎動物（魚類及び両生類）において広く発見されるアデノシン受容体のサブタイプであり、*parp1*遺伝子の第4エキソンと第5エキソンとの間に存在するイントロンに*parp1*遺伝子の転写方向とは逆向きに存在する遺伝子である。ヤツメウナギ、サメおよび魚、さらには両生類にわたってA2c受容体が見出されることから、魚類や両生類で共有されるアデノシン受容体であると考えられる。ゼブラフィッシュのA2c受容体のcDNAの塩基配列は配列番号1に示され、アミノ酸配列は配列番号2に示されている。
- [0015] A2c受容体は、配列番号1の塩基配列または配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質、およびそのオーソログを含む。本明細書では、A2c受容体のオーソログとは、ゼブラフィッシュの配列番号1の塩基配列によりコードされる配列番号2のアミノ酸配列を有するA2c受容体に対応する他の種のA2c受容体を意味する。A2c受容体は、アデノシンとの結合に重要と考えられるY82からI350の領域（この領域はヒトA1受容体のY12からI274に対応する：配列番号3に示されるアミノ酸配列部分）において種を超えて広くアミノ酸配列が保存されている。従って、A2c受容体は、ゼブラフィッシュのA2c受容体の塩基配列またはアミノ酸配列との相同性を元に特定することができる。また、A2c受容体は、*parp1*遺伝子の第4エキソンと第5エキソンとの間に存在するイントロンに*parp1*遺伝子の転写方向とは逆向きに存在し、このシンテニーは種を超えて保存されていた。従って、A2c受容体は、*parp1*遺伝子の第4エキソンと第5エキソンとの間に存在するイントロンを他のA2c受容体との相同性に基づいて検索することで特定され得る。例えば、*parp1*遺伝子の第4エキソンと第5エキソンとの間に存在するイントロンについて、例えば、配列番号3に示されるアミノ酸配列と、例えば80%以上、例えば90%以上、

または例えば95%以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を有するペプチドをコードする遺伝子を検索することで特定され得る。類似性は、比較する2つの配列をアラインメントして決定される。アラインメントは、当業者に周知の方法、例えばC l a s t a l Wを用いて行うことができる。C l a s t a l Wでは、アライメントした2つの配列の類似性も決定することができる。

[0016] 本発明によれば、A2c受容体タンパク質が提供される。A2c受容体タンパク質は水生脊椎動物において共通して見出される受容体である。また、A2c受容体は、アデノシンとの結合に重要と考えられるY82からI350の領域（この領域はヒトA1受容体のY12からI274に対応する）において種を超えて広くアミノ酸配列が保存されていることから、いずれの種のA2c受容体もアデノシンと結合し、当該生物種の誘引行動を惹起するものと考えられる。本発明では、A2c受容体タンパク質の断片（例えば、細胞外領域）が提供される。A2c受容体タンパク質の細胞外領域は、膜貫通領域を有しないため、分泌型タンパク質であり得る。このようなA2c受容体タンパク質の細胞外ドメインは、例えば、動物への免疫等に用いることができる。

[0017] 本発明によれば、A2c受容体タンパク質またはその断片をコードする核酸が提供される。核酸としては、DNAおよびRNAが挙げられ、DNAとしてはゲノムDNAおよびcDNAが挙げられる。RNAとしては、メッセンジャーRNAが挙げられる。

[0018] 本発明によれば、A2c受容体タンパク質をコードする外来核酸が導入された脊椎動物細胞、特に魚類細胞、鳥類細胞、またはほ乳類細胞が提供される。細胞は、嗅覚神経細胞であってもよいし、非嗅覚神経細胞であってもよい。

[0019] 本発明によれば、A2c受容体タンパク質を発現した細胞が提供される。A2c受容体タンパク質を発現した細胞は、嗅覚上皮組織からタンパク質分解酵素処理および／またはキレート剤処理により細胞を単離し、細胞表面に

発現した A2c 受容体に対する抗体を用いて、例えばセルソーターを用いて単離することができる。A2c 受容体タンパク質を発現した細胞としては、その他には、A2c 受容体タンパク質を発現した同種細胞、異種脊椎動物細胞、異種魚類細胞、鳥類細胞、またはほ乳類細胞が挙げられる。ここで、「異種」とは、A2c 受容体と細胞の種が異なることを意味する。また、「同種」とは、A2c 受容体と細胞の種が一致することを意味する。細胞は、嗅覚神経細胞であってもよいし、非嗅覚神経細胞であってもよい。これらの細胞は、例えば、A2c 受容体の機能を調べるために、または、A2c 受容体に対する抗体の免疫原として用いることができる。

[0020] 本発明によれば、A2c 受容体タンパク質に結合する抗体が提供される。A2c 受容体タンパク質に結合する抗体は、例えば、A2c 受容体タンパク質を可溶化して動物に免疫することにより得ることができる。あるいは、A2c 受容体タンパク質に結合する抗体は、A2c 受容体タンパク質を強制発現させた細胞を動物に免疫して得てもよい。A2c 受容体で免疫された動物からは、脾臓細胞を入手して、A2c 受容体タンパク質に結合する抗体を産生するハイブリドーマや、A2c 受容体タンパク質に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。従って、本発明では、A2c 受容体タンパク質に結合するポリクローナル抗体、A2c 受容体タンパク質に結合するモノクローナル抗体、A2c 受容体タンパク質に結合する抗体を産生するハイブリドーマ、および A2c 受容体タンパク質で免疫した哺乳動物または鳥類（例えば、ニワトリ）が提供される。抗体は、常法により、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体として得てもよい。

[0021] A2c 受容体タンパク質に結合する抗体は、ある態様では、他のアデノシン受容体に対するよりも強い親和性（例えば、10 倍以上、100 倍以上、1000 倍以上）で A2c 受容体タンパク質に結合する。A2c 受容体タンパク質に結合する抗体は、ある態様では、他のアデノシン受容体には実質的に結合しない。このような A2c 受容体タンパク質に結合する抗体は、A2c 受容体と他のアデノシン受容体との親和性に基づいて、当業者に周知の技

術を用いて容易に得ることができる。A2c受容体タンパク質に結合する抗体は、ある態様では、A2c受容体の細胞外領域に結合する。これらの抗体は、例えば、A2c受容体のアフィニティー精製、A2c受容体の発現解析、A2c受容体の染色、A2c受容体のウェスタンブロット等の様々な用途に用いることができる。

[0022] 本発明によれば、アデノシンを含む、A2c受容体を活性化させることに用いるための組成物が提供される。

[0023] A2c受容体を活性化させるとは、A2c受容体と反応して、A2c受容体シグナルを活性化することを意味する。A2c受容体シグナルの活性化は、A2c受容体発現細胞においてc-fosの発現の増加またはcAMPの産生の増加により確認することができる。

[0024] 本発明によれば、アデノシンを含む、魚の食欲を増進すること、魚を誘引すること、及び／又は、魚の策餌行動を活性化させることに用いるための組成物が提供される。アデノシンは、魚を誘引するだけでなく、泡のような餌としての機能を果たし得ないものへの求餌行動を誘発した。従って、アデノシンは、魚の食欲増進や策餌行動の活性化（活発化）に用いることができる。

[0025] また、このアデノシンの特性を利用して、アデノシンを魚のための飼料に混ぜることにより、魚が好む飼料となる。従って、本発明では、アデノシンを含む、魚の飼料、特には無魚粉化飼料（すなわち、魚粉を含まない飼料）が提供される。本発明ではまた、アデノシンを含む、釣り針または疑似餌のコーティング剤が提供される。上述の通り、アデノシンは、魚の食欲増進や策餌行動の活性化（活発化）に用いることができるが、水中では早くに拡散される特徴を有することから、当該コーティング剤としては、アデノシンを徐放する組成物を含むコーティング剤が好ましい。アデノシンを徐放する組成物としては、例えば、製剤として利用される徐放性材料にアデノシンを含有した組成物が挙げられる。当該徐放性材料としては、一般に徐放性製剤に用いられる製剤材料を利用することができる。本発明ではさらに、アデノシ

ンを塗布した釣り針または疑似餌が提供される。本発明ではさらにまた、アデノシンを含むコーティングを有する釣り針または疑似餌が提供される。

[0026] 本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類）においてアデノシン受容体を活性化させる方法であって、前記水生脊椎動物とアデノシンとを接触させることを含む、方法が提供される。本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類）の行動を制御する方法であって、前記水生脊椎動物とアデノシンとを接触させることを含む、方法が提供される。本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類）の食欲を増進する、魚を誘引する、及び／又は、策餌行動を活発化させる方法であって、前記水生脊椎動物とアデノシンとを接触させることを含む、方法が提供される。

[0027] 本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類）を誘引する方法であって、水中に存在する水生脊椎動物に対して、誘引したい方向からアデノシンまたはアデノシンを含有する組成物を接触させることを含む方法が提供される。本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類および両生類）の策餌行動を活発化させる方法であって、水中に存在する水生脊椎動物にアデノシンまたはアデノシンを含有する組成物を与えることを含む方法が提供される。

[0028] 本発明によれば、水生脊椎動物（例えば、魚類）の捕獲方法または漁業方法であって、水生脊椎動物を集めたい箇所にアデノシンまたはアデノシンを含有する組成物を添加することと、その後、当該箇所に集まった水生脊椎動物を捕獲することとを含む、方法が提供される。

[0029] 本発明によれば、害魚（例えば、サメ、特定外来種など）を駆除または忌避する方法であって、対象とする害魚を目的の箇所に移動させるために、少なくとも当該目的の箇所にアデノシンまたはアデノシンを含有する組成物を放出することを含む方法が提供される。

実施例

[0030] 実施例 1：アデノシンによる魚の誘引行動

本実施例では、誘引物質として知られるアラニンを比較対象として、アデノシン、およびアデノシン三リン酸（ATP）の誘引物質としての性質を検

証した。

[0031] 5～15ヶ月齢の雄のゼブラフィッシュ1匹ずつを、0.03%の合成海塩（TetraMarin Salt Pro, Tetra）を添加した600mLの逆浸透水中で少なくとも1時間以上順応させた。順応後、ATPアデノシンまたはアラニンを様々な濃度（ 10^{-7} ～ 10^{-4} M）で含む600 μ Lの水を水槽に添加して、ゼブラフィッシュの行動を観察した。

[0032] まず、試験毎に9～11回の反復実験を行い、平均移動度を求めた。平均移動度は、タンクの全長に対する添加前と添加後のゼブラフィッシュの移動距離の割合（%）として求めた。結果は図1に示される通りであった。

[0033] 図1に示されるように、統計学的に有意なゼブラフィッシュの誘引行動を引き起こすアラニン濃度は100 μ Mであったのに対して、アデノシンでは1 μ Mで十分であった。ATPでは、高濃度（100 μ M）で誘引行動が消失したのに対して、アデノシンではこの濃度でも誘引行動が維持された。

[0034] 次に、以下の誘引指数を指標としてゼブラフィッシュの誘引行動を観察した。

誘引指数 = {（匂い物質側での滞在時間 t_1 ）－（対照側での滞在時間 t_2 ）}
} / 観察時間 {ここで、観察時間は、 $t_1 + t_2$ である。}

[0035] 結果は、図2に示される通りであった。図2に示されるように、統計学的に有意なゼブラフィッシュの誘引行動を引き起こすアラニン濃度は100 μ Mであったのに対して、アデノシンでは1 μ Mで十分であった。ATPでは、高濃度（100 μ M）で誘引行動が消失したのに対して、アデノシンではこの濃度でも誘引行動が維持された。

[0036] このことから、アデノシンに対してゼブラフィッシュは誘引行動を示すことが明らかとなった。

[0037] また、ゼブラフィッシュの行動をより詳細に観察すると、アデノシンを添加した水槽ではゼブラフィッシュは水中の泡を食べようとして、泡を追いかけては口に入れようとする様子が観察された。このことから、アデノシンは、ゼブラフィッシュの誘引行動を引き起こすと共に、策餌行動を誘発するこ

とが明らかとなった。

[0038] 実施例 2 : アデノシン受容体の同定

上記誘引行動は、ゼブラフィッシュの嗅覚に基づくものであると考え、本実施例では、いずれのアデノシン受容体の活性化がアデノシンの上記誘引行動と関係するかを調べた。

[0039] 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色のために嗅覚上皮 (OE) の薄層切片を作製した。嗅覚上皮を常法によりパラホルムアルデヒドと 15% 飽和ピクリン酸水溶液を含むリン酸緩衝液で 4℃ で一晩固定し、30% スクロースを含むリン酸緩衝液で凍結保護して、O. C. T. 化合物 (Sakura, 4583) に包埋した。10 μm 厚の切片を HistoVT One (Nacalai Tesque, 06380-05) で処理し、0.01% Triton X-100 と 5~10% のヤギ血清を含むリン酸緩衝生理食塩水でブロッキングした。その後、ウサギ抗 pERK1/2 モノクローナル抗体 (1:500, Cell Signaling Technology, 4370)、およびラット抗 GFP モノクローナル抗体 (1:1000, Nacalai Tesque, 04404) で一晩インキュベートした。洗浄後、Cy3-標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300, Jackson ImmunoResearch, 711-165-152) および Alexa488-標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300, Molecular Probes, A11006) で 2~4 時間インキュベートした。その後、正立共焦点レーザー走査顕微鏡 (FV1000, Olympus) で切片を観察した。

[0040] In situ ハイブリダイゼーション

138 種の OR (Niimura, Y., and Nei, M. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 6039-6044)、6 種の V1R (Saraiva, L. R., and Korsching, S. I. (2007) Genome Res. 17, 1448-1457)、1 種の V2R (Alioto, T. S., and Ngai, J. (2006) BMC Genomics. 7, 309)、85 種の TAAR (Hussain, A., Saraiva, L. R., and Korsching, S. I. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 4313-4318)、9 種の P2X (Appelbaum, L. et al. (2007) Brain Res. 1174, 66-75)、15 種の P2Y (下記登録番号)、9 種の

アデノシン受容体 (Boehmler, W. et al. (2009) Gene Expr. Patterns 9, 144-151)、29種のエクトヌクレオチダーゼ (Rosemberg, D. B. et al. (2010) Mol. Biol. 155, 230-240およびYang, Y. et al. (2012) Front. Immunol. 3, 314)、Golf (Gnal) およびAC111 (Adcy3b) のコード領域 (それぞれ0.5~1.5 kb) について、ゼブラフィッシュのゲノムDNA、嗅覚上皮cDNA、または脳cDNAを鋳型としてPCRを行い、ベクターにクローニングした。cRNAプローブは、Yabuki, Y. et al. (2016) Nat. Neurosci. 19, 897-904に記載の通り調製した。また、アンチセンスcRNAプローブは、ジゴキシゲニン標識UTPまたはフルオレセイン標識UTPを用いてT7またはSP6ポリメラーゼを用いて合成した。なお、遺伝子とそのGenbank登録番号との関係は以下の通りであった: p2ry1 (XM_001343319)、p2ry1-like (XM_692784)、p2ry2.1 (XM_695238)、p2ry2.2 (XM_001340029)、p2ry2.3 (XM_017352075)、p2ry4 (XM_005173268)、p2ry5.1 (BC056587)、p2ry5.2 (BC162776)、p2ry6 (ENSDARG00000042595)、p2ry8 (ENSDARG00000055560)、p2ry10 (NM_001089527)、p2ry11 (NM_001204454)、p2ry12 (NM_001308557)、pp2ry13 (XM_002664517)、p2ry14 (ENSDARG00000078833)、enpp1 (NM_001030168)、enpp2 (NM_200603)、enpp4 (NM_001017887)、enpp5 (NM_001030176)、enpp6 (NM_001013527)、enpp7.1 (NM_001256805)、enpp7.2 (NM_001328040)、zgc:153896-001 (NM_001045194)、CD73 (NM_200932)、acp1 (NM_001014302)、acp2 (NM_001013337)、acp5a (NM_214773)、acp5b (NM_001002452)、acp6 (NM_001110380)、pap1 (NM_001099250)。

[0041] 二重蛍光in situハイブリダイゼーション

アデノシンに応答したゼブラフィッシュの嗅覚上皮の10 μ m厚の組織切片を作製し、ジゴキシゲニン標識またはフルオレセイン標識cRNAプローブとハイブリダイゼーションさせた。フルオレセインは、ビオチン化抗フルオレセイン抗体 (1:500, Vector, BA-0601) とAlexa488標識ストレプトアビジン (1:300, Molecular Probes, S11223) で検出し、ジゴキシゲニンは、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1:500, Roche,

11093274910) と反応させた後にHNPP/Fast Red substrate (HNPP Fluorescent Detection Set, Roche, 11758888001)で染色して検出した。

[0042] その結果、いずれの既知の嗅覚受容体シグナルも、アデノシンで活性化されたc-fos陽性細胞と共染色されることは無かった。また、8種のアデノシン受容体全てを同様に観察したところ、いずれもc-fos陽性細胞と共染色されることは無かった。このことから、アデノシンは、確認した全ての嗅覚受容体およびアデノシン受容体を活性化するものではないことが明らかになった。

[0043] 実施例3：新規アデノシン受容体のクローニング

次に、ゼブラフィッシュゲノム上で既知のアデノシン受容体と一定の類似性を有する配列を調べていたところ、A2a a、A2a bおよびA2bと類似性を有する、新しい遺伝子を発見した。発見された遺伝子は、データベース上ではアノテーションされていない未知の遺伝子であり、本発明者らはこの新規遺伝子を「A2c」と命名した。ゼブラフィッシュのA2c遺伝子のcDNA配列は、配列番号1に示される。

[0044] A2cの発現を調べたところ、ゼブラフィッシュの嗅覚上皮で発現が観察された。特にA2cのmRNAは、嗅覚上皮の正中縫線の周辺の最表層の嗅覚神経の一部に発現を認め、この発現は、図3に示されるように、ATP刺激により誘導されたc-fosシグナルと顕著に共局在を示した。また、A2cの発現細胞は、Gol fおよびアデニルシクラーゼIII (ACIII) 陽性であった。

[0045] これらの結果から、新規アデノシン受容体として発見され、命名されたA2c受容体がアデノシンに対するゼブラフィッシュの誘引行動の媒介する受容体であると考えられた。

[0046] A2c受容体遺伝子をゼブラフィッシュ以外の魚類、両生類、は虫類、鳥類およびほ乳類で検索した。A2c受容体遺伝子は、図5に示されるように、ゼブラフィッシュでは、他の遺伝子parp1遺伝子のイントロン中(第4エクソンと第5エクソンとの間)に逆向きに存在していた。そこで、メダ

カその他の魚類のゲノムを検索したところ、他の魚類および両生類においても、p a r p 1 遺伝子のイントロン中にゼブラフィッシュのA 2 c 受容体遺伝子と相同性の高い配列が見出され、シンテニーが共通していることが明らかになった。このことから、p a r p 1 遺伝子のイントロン中（第4エキソンと第5エキソンとの間）に存在し、ゼブラフィッシュのA 2 c 受容体遺伝子と相同性を有する、逆向きに配置された遺伝子がA 2 c 遺伝子であることが明らかとなった。

[0047] また、A 2 c 受容体遺伝子は、魚類および両生類には存在する一方で、は虫類、鳥類およびほ乳類のいずれの種にも存在しなかった。このことから、A 2 c 受容体は、水生脊椎動物特有の受容体であり、生物が陸に上がる過程で消失したものと考えられた。

[0048] なお、アデノシン受容体に関しては、アデノシンA 1 受容体とアデノシンとの複合体の構造が明らかとなっている（Gluknhova A. et al. (2017) Cell 168: 657-877）。この構造解析結果によると、A 1 受容体のY 1 2、L 8 8、F 1 7 1、M 1 7 7、W 2 4 7、L 2 5 0、L 2 5 3、N 2 5 4、Y 2 7 1、およびI 2 7 4 がアデノシンとの結合に関与していることが明らかとなっており、A 2 A 受容体でもこれらのアミノ酸は保存されていることが示されている。これらの保存されているアミノ酸について、ゼブラフィッシュA 2 c 受容体を確認したところ、高度に保存されていた。また、他の魚類および両生類においてもこれらのアミノ酸配列は高度に保存されていた。これらのことから、新しく発見されたA 2 c 受容体は、種を超えて保存され、アデノシンに応答する受容体であると考えられた。

[0049] 実施例4：A 2 c 受容体の特性解析

本実施例では、新しく発見されたA 2 c 受容体の特性解析を行った。

[0050] 図4 Aに示されるように、ゼブラフィッシュのA 2 c 受容体のc D N A をクローニングし、C H O - K 1 細胞に強制発現させ、2 4 時間後にアデノシン、A M P、A D PまたはA T Pにより刺激し、3 0 分後に細胞を回収した。細胞を超音波破碎して遠心分離した上清を回収し、精製されたc A M P 濃

度をELISA法により測定した。陰性対照としては、溶媒、リボース、アデニン、グアノシン、シチジン、ウリジンまたはチミジンで刺激した細胞を用いた。結果は図4Bに示される通りであった。

[0051] 図4Bに示されるように、アデノシンで刺激した場合のみcAMPの産生が生じ、AMP、ADPおよびATPでは全くcAMP産生が見られなかった。

[0052] また、図4Cでは、アデノシンとATPとを濃度をそれぞれ変えてより詳細に解析した結果を示す。図4Cに示されるように、アデノシンは、 $3.15 \times 10^{-5} \text{ M}$ の EC_{50} を有していたが、ATPは測定した濃度域では受容体を活性化することがなかった。

[0053] このことから、A_{2c}受容体は、アデノシンに選択的に反応して下流シグナルを活性化させる受容体であることが明らかとなった。

[0054] 図1および2によれば、ゼブラフィッシュは、ATPに対しても誘引行動を示す。ATPそのものはA_{2c}受容体を活性化しないため、ATPが分解されて生じるアデノシンが誘引行動の原因になっていると考えられた。

[0055] 上記実施例から魚および両生類がA_{2c}受容体を共通して有することが明らかになり、また、A_{2c}受容体は、アデノシンによる魚の誘引行動の原因となっていることが明らかとなった。このことから魚および両生類では広くA_{2c}受容体を介してアデノシンへの誘引行動が生じることが明らかになった。

[0056] 実施例5：アデノシンによる魚の誘引行動

本実施例では、魚としてブリを用いてアデノシンへの誘引行動が生じることを確認した。

[0057] 生後5ヶ月程度、体長20cm程度のぶりを直径1.5mの水槽で飼育した。水槽には、排泄物等が溜まらないように、一方向に流れる水流を設けた。ブリが水流の方向に沿って遊泳している際に、約1gのアデノシンを水槽に添加した。その結果、ブリは水流に逆らってアデノシン添加箇所に集まった。このように、アデノシンは魚に誘引行動を引き起こすことが確認された。

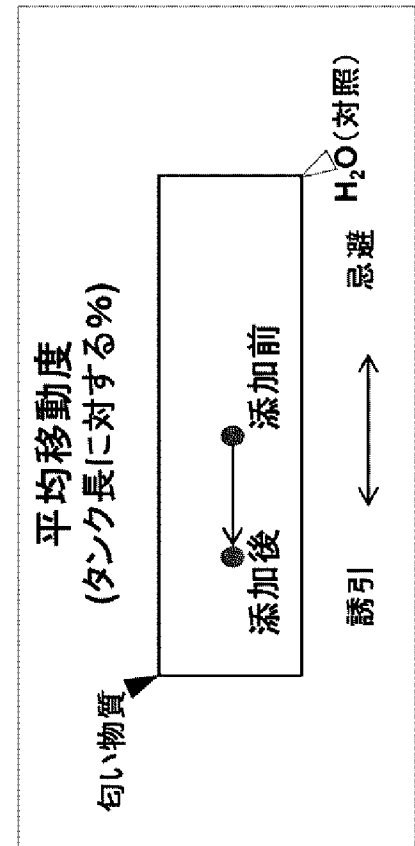
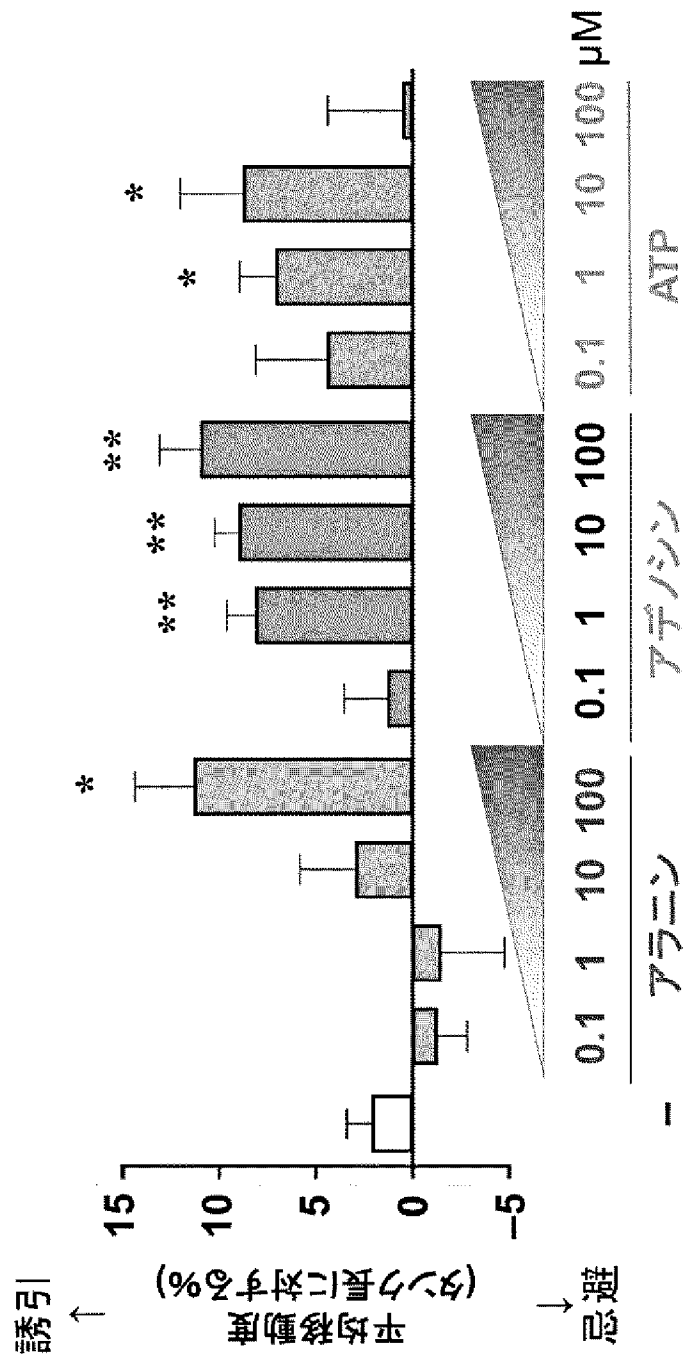
。

なお、実施例 3 で明らかとなった魚類および両生類の A 2 c 受容体の一部についての近隣接合法による系統樹を図 6 に示す。A 2 c 受容体のアミノ酸配列は種を超えて高度に保存されている。

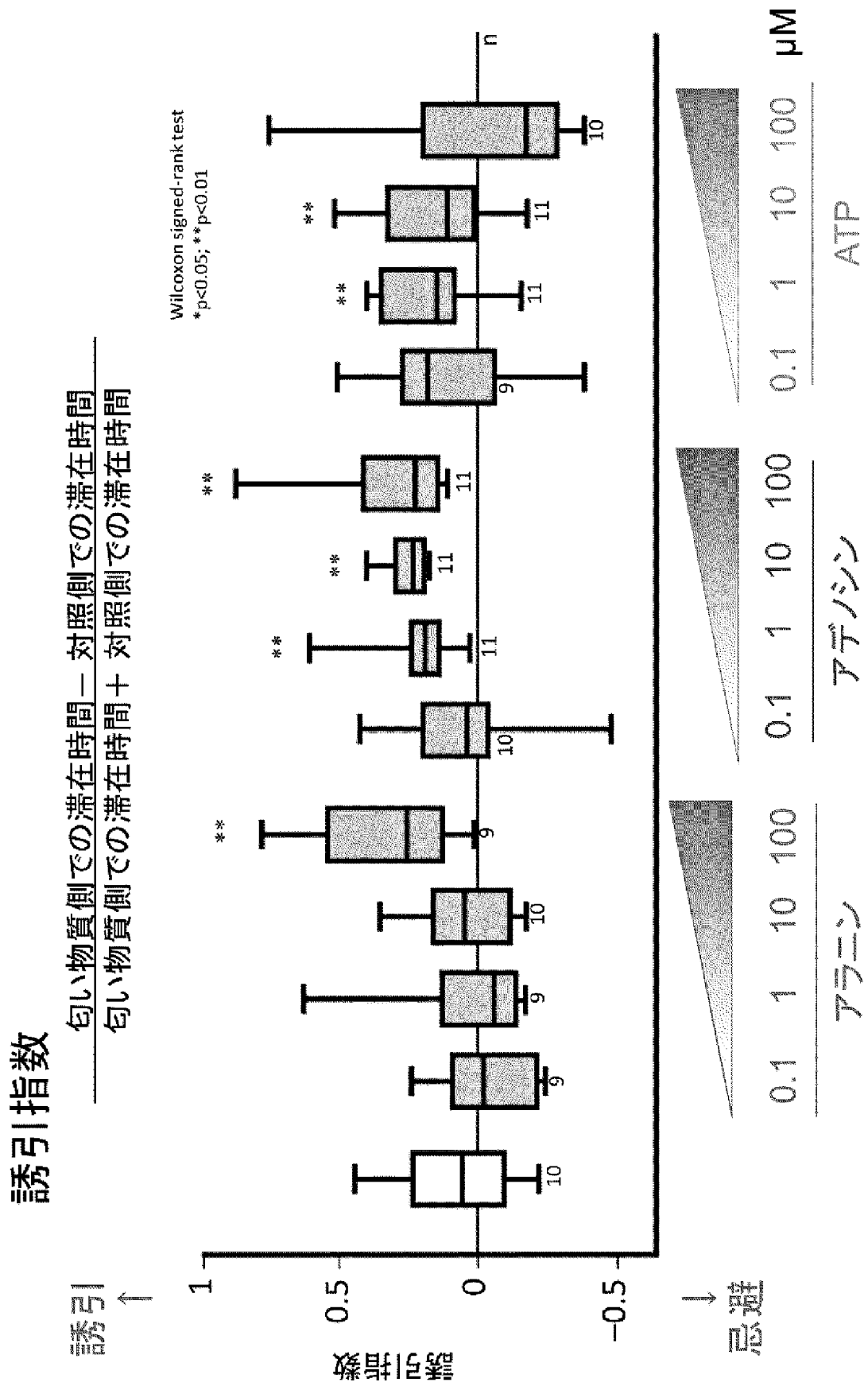
請求の範囲

- [請求項1] アデノシンを含む、A2c受容体を活性化させることに用いるための組成物。
- [請求項2] 水中に添加して魚の行動を制御することに用いるための組成物であって、アデノシンを含む、組成物。
- [請求項3] 魚の行動制御が、食欲を増進すること、魚を誘引すること、及び／又は、策餌行動を活性化させることである、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] アデノシンまたは請求項1～3に記載の組成物を含む、魚の飼料。
- [請求項5] 無魚粉化飼料である、請求項4に記載の飼料。
- [請求項6] アデノシンまたは請求項1～3に記載の組成物を含む、釣り針または疑似餌のコーティング剤。
- [請求項7] A2c受容体タンパク質。
- [請求項8] 請求項7に記載のタンパク質をコードする核酸。
- [請求項9] 請求項7に記載のタンパク質を発現する細胞。
- [請求項10] 請求項7に記載のタンパク質を認識する抗体。

[図1]

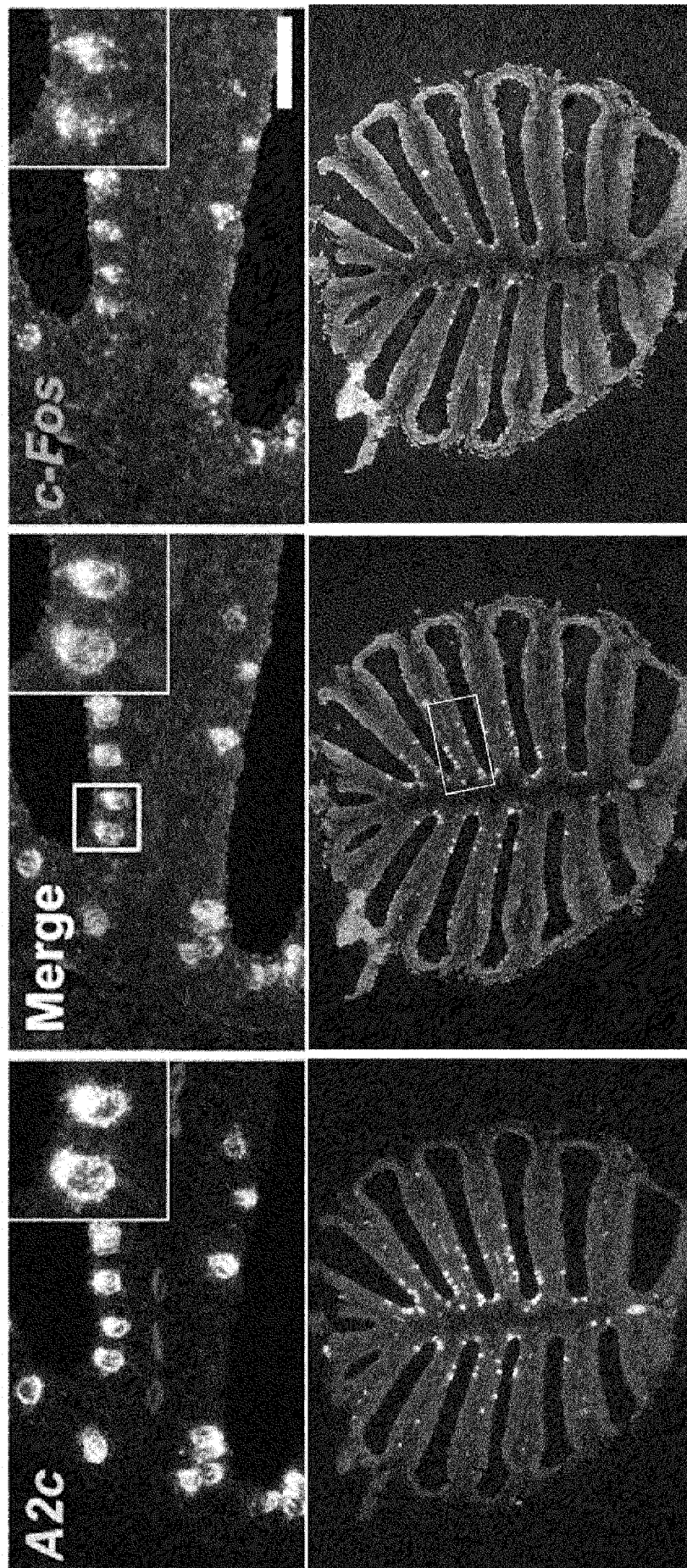


[図2]

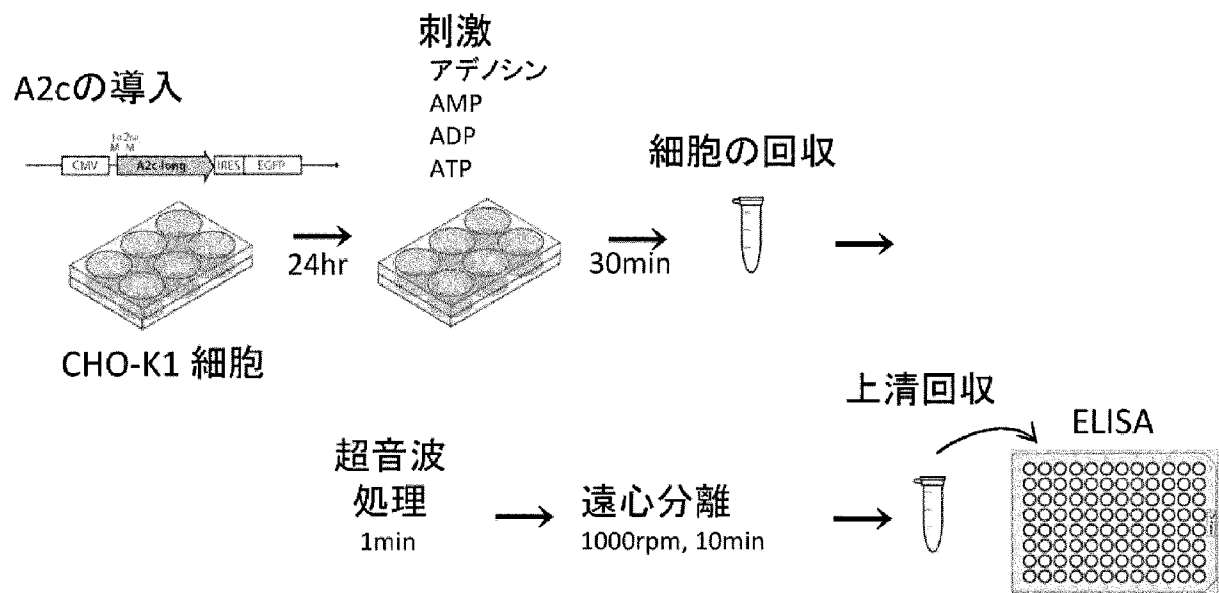


[図3]

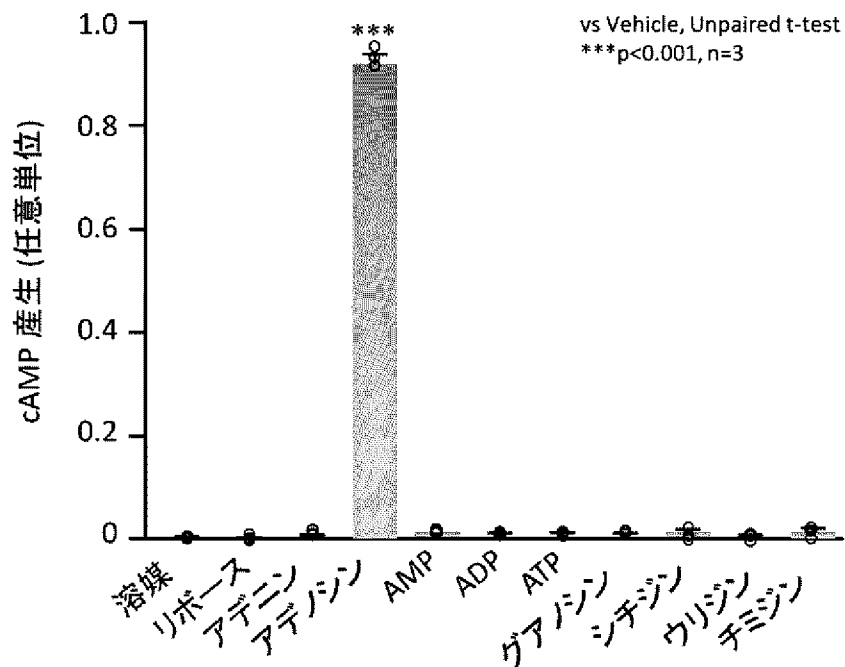
— A2c and *c-Fos* double ISH / ATP-stimulated adult zebrafish OE —



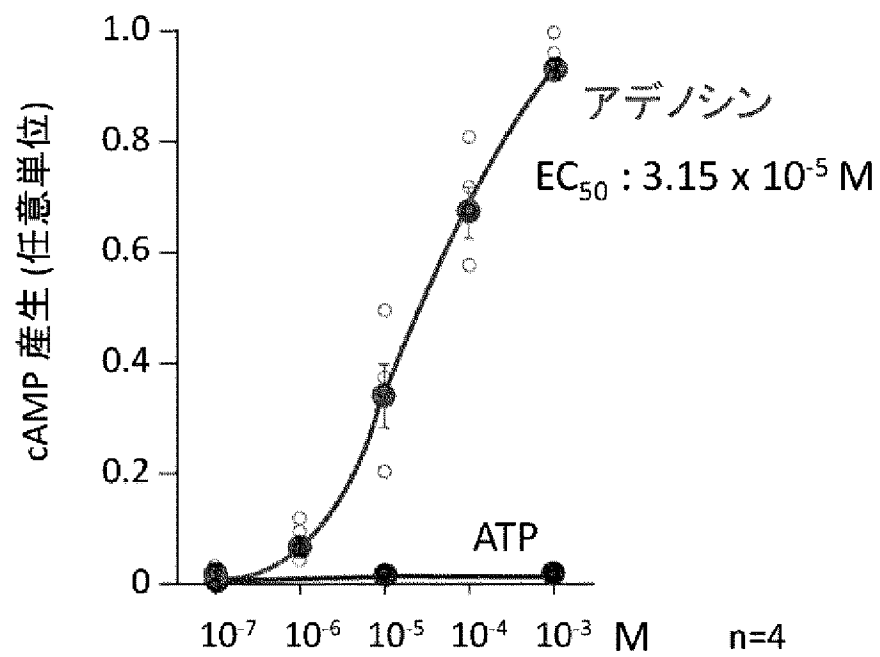
[図4A]



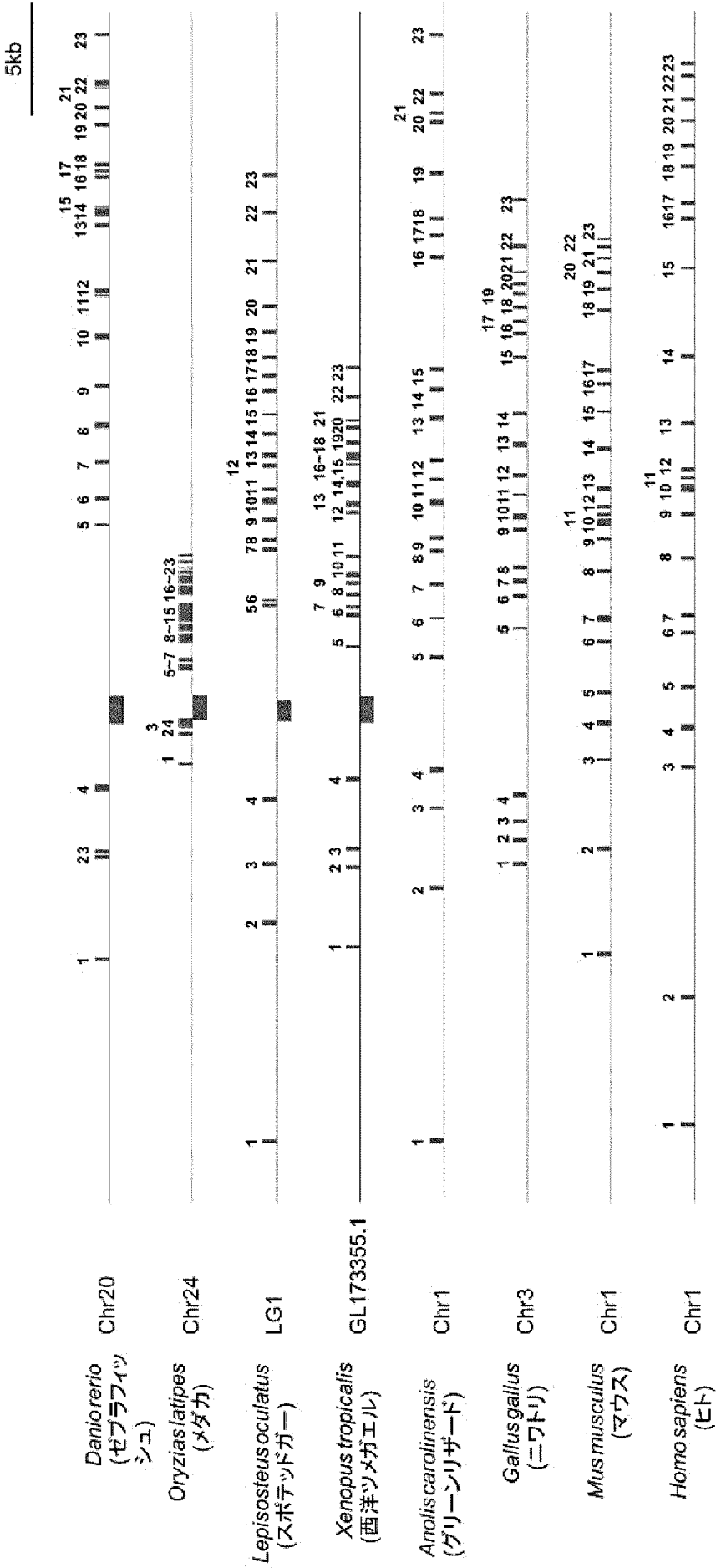
[図4B]



[図4C]

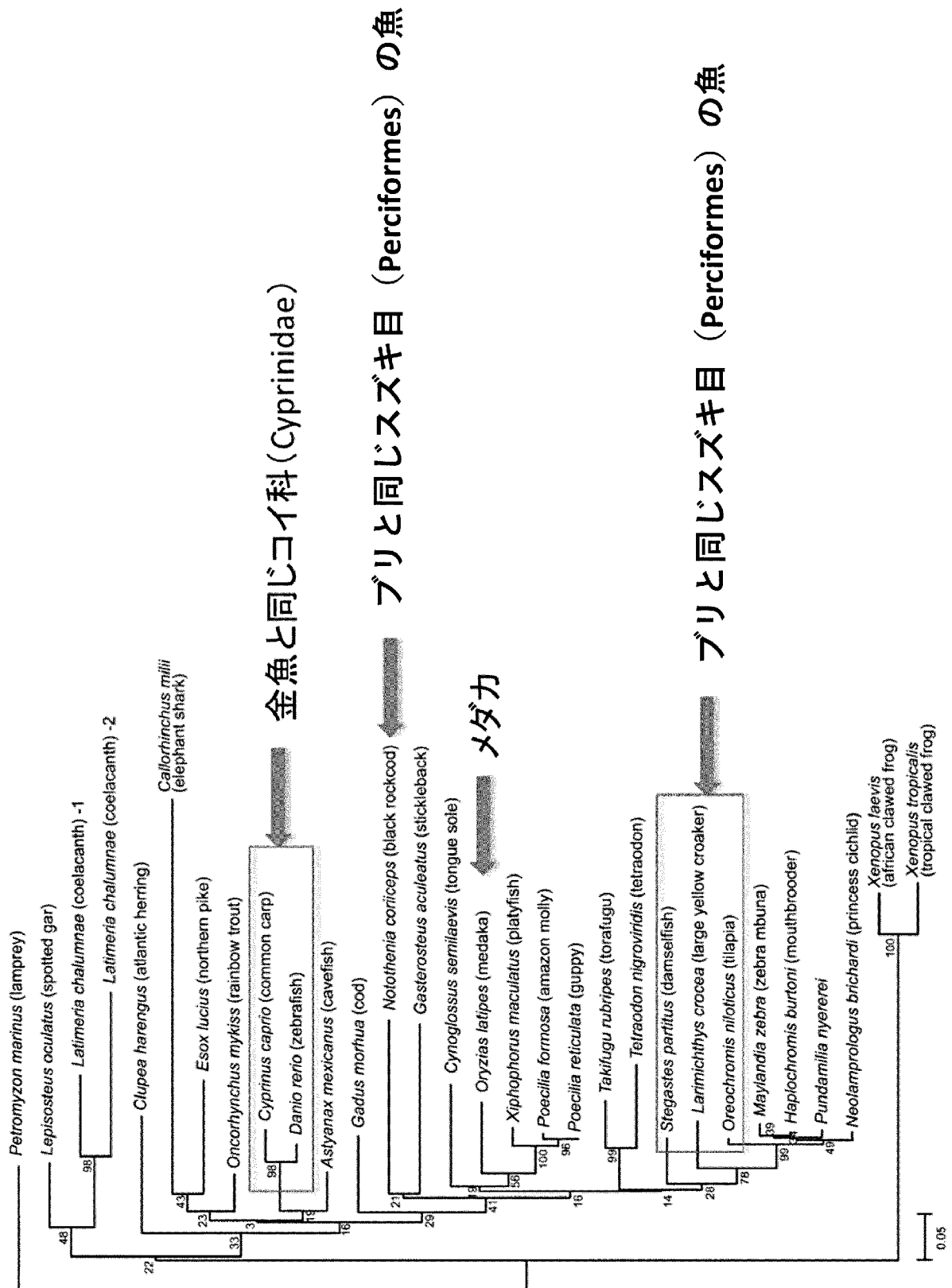


[図5]



※図中、数字はparp1遺伝子のエクソン番号を示す

[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A01K83/00-95/02, A23K10/00-50/90, A61K31/33-31/44, A61P1/00-43/00, C07K1/00-19/00, C12N1/00-7/0815, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HARADA, Katsuhiko, "Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1986, 52(11), pp. 1961-1968, ISSN: 0021-5392, in particular, abstract, page 1962, right column, paragraph [0003]	1-5 4-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2018 (21.06.2018)

Date of mailing of the international search report

03 July 2018 (03.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014712

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	原田勝彦ほか, ロジスティック曲線あてはめによる飼料のドジョウに対する誘引性判定, 日本水産学会誌, 1982, 48(1), pp. 21-29, ISSN 0021-5392, in particular, experimental procedure, (HARADA, Katsuhiko et al., "Application of Logistic Curve as an Index of the Attractive Effect of Food for Oriental Weatherfish", NIPPON SUISAN GAKKAISHI)	4-5 1-6
Y A	HARADA, Katsuhiko, "The Attractive Effect of Seaweeds Based on the Behavioral Responses of Young Herbivorous Abalone Haliotis discus", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(5), pp. 617-621, ISSN 0021-5392, in particular, Materials and Methods	4-5 1-6
Y A	HARADA, Katsuhiko, "The Attractive Effect of Food Based on the Behavioral Responses of Juvenile Yellowtail Seriola quinqueradiata", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(8), pp. 1047-1054, ISSN 0021-5392, in particular, materials and Methods	4-5 1-6
X Y	JP 3-297340 A (NIPPON SHOKUBAI KAGAKU KOGYO CO., LTD.) 27 December 1991, claim 1, page 4, lower left column, line 8 to lower right column, line 1, page 5, upper right column, lines 16-20 & US 5374600 A, claim 1, column 16, lines 22-25, column 28, lines 29-43 & US 5641847 A	1-3, 6 4-6
X	HENDERSON, C., Novel protein similar to vertebrate adenosine A3 receptor (ADORA3), DATABASE NCBI Protein, accession no. Q5RHQ9, [online], 31 October 2006, [retrieved on 21 June 2018], retrieved from the internet: <URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/82232665>	7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014712

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014712

This international application includes the 3 inventions as shown in below.

(Invention 1) Claims 1, and 4-6

Document 1 discloses luring fish with a composition containing adenosine, and fish-free feed containing adenosine (see document 1: Abstract, p. 1962, right column, paragraph 3 (including technical matters of documents 2-4 referenced therein)). Claims 1, and 4-5 lack novelty in light of document 1, and do not have a special technical feature.

However, claim 6 dependent on claim 1 has the special technical feature in which an agent containing "adenosine or the composition set forth in claim 1 ... is used as a coating agent of a "fishing hook or lure".

Thus, claims 1, and 4-6 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 2-3

Claims 2-3 cannot be said to have identical or corresponding technical features to claims 1, and 3-5 (parts not having a special technical feature), and claim 6 (part having the special technical feature) classified as invention 1.

In addition, claims 2-3 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Thus, claims 2-3 cannot be classified as invention 1, and thus are classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 7-10

Claims 7-10 cannot be said to have identical or corresponding technical features to claims 1, and 3-6 classified as invention 1, or claim 2 classified as invention 2.

In addition, claims 7-10 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Thus, claims 7-10 cannot be classified as invention 1 or 2.

In addition, claims 7-10 have a special technical feature pertaining to an A2c receptor protein, and thus are classified as invention 3.

Document 1: HARADA Katsuhiko, "Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1986, 52(11), p. 1961-1968, ISSN: 0021-5392, in particular, Abstract, p. 1962 right column, paragraph [0003]

Document 2: 原田勝彦ほか, ロジスティック曲線あてはめによる飼料のドジョウに対する誘引性判定, 日本水産学会誌, 1982, 48(1), pp. 21-29, ISSN 0021-5392, in particular, experimental procedure, (HARADA, Katsuhiko et al., "Application of Logistic Curve as an Index of the Attractive Effect of Food for Oriental Weatherfish", NIPPON SUISAN GAKKAISHI)

Document 3: HARADA Katsuhiko, "The Attractive Effect of Seaweeds Based on the Behavioral Responses of Young Herbivorous Abalone Haliotis discus", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(5), pp. 617-621, ISSN 0021-5392, in particular, Materials and Methods

Document 4: HARADA Katsuhiko, "The Attractive Effect of Food Based on the Behavioral Responses of Juvenile Yellowtail Seriola quinqueradiata", NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(8), pp. 1047-1054, ISSN 0021-5392, in particular, Materials and Methods

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014712

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7076 (2006.01) i,	A01K83/00 (2006.01) i,	A01K85/00 (2006.01) i,
A23K20/153 (2016.01) i,	A23K50/80 (2016.01) i,	A61P1/14 (2006.01) i,
A61P43/00 (2006.01) i,	C07K14/705 (2006.01) i,	C07K16/28 (2006.01) i,
C12N1/15 (2006.01) i,	C12N1/19 (2006.01) i,	C12N1/21 (2006.01) i,
C12N5/10 (2006.01) i,	C12N15/12 (2006.01) i	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01K83/00-95/02, A23K10/00-50/90, A61K31/33-31/44, A61P1/00-43/00, C07K1/00-19/00, C12N1/00-7/0815, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	HARADA Katsuhiko, Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1986, 52(11), p. 1961-1968, ISSN: 0021-5392, 特に Abstract, p. 1962 右欄第3段落	1-5 4-6

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.2018

国際調査報告の発送日

03.07.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

澤田 浩平

4 C

3338

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	原田 勝彦ほか, ロジスティック曲線あてはめによる飼料のドジョウに対する誘引性 判定, 日本水産学会誌, 1982, 48(1), p. 21-29, ISSN 0021-5392, 特に実験方法欄	4-5 1-6
Y A	HARADA Katsuhiko, The Attractive Effect of Seaweeds Based on the Behavioral Responses of Young Herbivorous Abalone Haliotis discus, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(5), p. 617-621, ISSN 0021-5392, 特に Materials and Methods 欄	4-5 1-6
Y A	HARADA Katsuhiko, The Attractive Effect of Food Based on the Behavioral Responses of Juvenile Yellowtail Seriola quinqueradiata, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(8), p. 1047-1054, ISSN 0021-5392, 特に Materials and Methods 欄	4-5 1-6
X Y	JP 3-297340 A (日本触媒化学工業株式会社) 1991. 12. 27, 特許請求の範囲第 1 項、第 4 頁左下欄第 8 行ー右下欄第 1 行、第 5 頁右上欄第 1 6 行ー第 2 0 行 & US 5374600 A, Claim 1, col. 16 line 22-25, col. 28 l. 29-43 & US 5641847 A	1-3, 6 4-6
X	HENDERSON C, Novel protein similar to vertebrate adenosine A3 receptor (ADORA3), DATABASE NCBI Protein, accession No. Q5RHQ9, [online], 2006. 10. 31, [retrieved on 2018. 06. 21], Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/82232665>	7-10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

この国際出願は、以下に示すとおり、3つの発明を含むものである。

(発明1) 請求項1、4-6

文献1には、アデノシンを含む組成物によって魚を誘引すること、及びアデノシンを含む無魚粉化飼料が記載されているため（文献1：Abstract、p.1962 右欄第3段落（そこに参照される文献2-4の技術事項を含む。）参照）、請求項1、4-5は、文献1により新規性が欠如しており、特別な技術的特徴を有しない。

しかしながら、請求項1の従属請求項である請求項6は、「アデノシンまたは請求項1…に記載の組成物」を含む剤を、「釣り針または疑似餌のコーティング剤」とするという特別な技術的特徴を有している。

したがって、請求項1、4-6を発明1に区分する。

(発明2) 請求項2-3

請求項2-3は、発明1に区分された請求項1、3-5（特別な技術的特徴を有しないもの）及び請求項6（上記特別な技術的特徴を有するもの）と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。

さらに、請求項2-3は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項2-3は発明1に区分できないから、発明2に区分する。

(発明3) 請求項7-10

請求項7-10は、発明1に区分された請求項1、3-6、又は発明2に区分された請求項2と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。

さらに、請求項7-10は、発明1又は発明2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項7-10は、発明1及び発明2のいずれにも区分できない。

そして、請求項7-10は、A2c受容体タンパク質に関して特別な技術的特徴を有しているので、発明3に区分する。

文献1：HARADA Katsuhiko,

Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1986, 52(11), p.1961-1968, ISSN: 0021-5392, 特に Abstract、p.1962 右欄第3段落

文献2：原田 勝彦ほか,

ロジスティック曲線あてはめによる飼料のドジョウに対する誘引性判定, 日本水産学会誌, 1982, 48(1), p.21-29, ISSN 0021-5392, 特に実験方法欄

文献3：HARADA Katsuhiko,

The Attractive Effect of Seaweeds Based on the Behavioral Responses of Young Herbivorous Abalone Haliotis discus, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(5), p.617-621, ISSN 0021-5392, 特に Materials and Methods 欄

文献4：HARADA Katsuhiko,

The Attractive Effect of Food Based on the Behavioral Responses of Juvenile Yellowtail *Seriola quinqueradiata*, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982, 48(8), p.1047-1054, ISSN 0021-5392, 特に Materials and Methods 欄

発明の属する分野の分類

A61K31/7076(2006.01)i, A01K83/00(2006.01)i, A01K85/00(2006.01)i,
A23K20/153(2016.01)i, A23K50/80(2016.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C07K14/705(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/12(2006.01)i