

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4098080号
(P4098080)

(45) 発行日 平成20年6月11日(2008.6.11)

(24) 登録日 平成20年3月21日(2008.3.21)

(51) Int.Cl.

F I

A O 1 K 61/00 (2006.01)

A O 1 K 61/00

Z

請求項の数 2 (全 90 頁)

(21) 出願番号	特願2002-533635 (P2002-533635)	(73) 特許権者	598162562
(86) (22) 出願日	平成13年10月11日(2001.10.11)		株式会社白寿生科学研究所
(65) 公表番号	特表2004-510443 (P2004-510443A)		東京都渋谷区富ヶ谷1丁目37番5号
(43) 公表日	平成16年4月8日(2004.4.8)	(74) 代理人	100104581
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/031562		弁理士 宮崎 伊章
(87) 国際公開番号	W02002/030182	(74) 代理人	100136412
(87) 国際公開日	平成14年4月18日(2002.4.18)		弁理士 的場 照久
審査請求日	平成16年9月24日(2004.9.24)	(72) 発明者	ハリス, ウィリアム, エイチ., ジュニア
(31) 優先権主張番号	09/687, 477		アメリカ合衆国 メイン 04102 ポートランド, アパートメント 6ビー, ブラムホール ストリート 79
(32) 優先日	平成12年10月12日(2000.10.12)	(72) 発明者	ラッセル, デービッド, アール.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 メイン 04002 アルフレッド, ジョーダン スプリングス
(31) 優先権主張番号	09/687, 476		ロード 375
(32) 優先日	平成12年10月12日(2000.10.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 成魚前溯上性魚を飼育するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 少なくとも1つの多価カチオン感受レセプター(PVCR)の発現および/または感受性を調節するのに十分な量で少なくとも1つのPVCR調節因子を淡水へ添加する工程; ならびに

b) 成魚前溯上性魚の血清中の該PVCR調節因子の有意に増加したレベルを与える薬剤を含む魚消費用の飼料を淡水へ添加する工程を含む、

海水移行前に淡水で管理される成魚前溯上性魚の飼育を改善するための方法であって、
成魚前溯上性魚がサケであり

薬剤がNaClを含み、

飼料が少なくとも7重量%のNaClを含んでなり、

少なくとも1つのPVCR調節因子を淡水に添加する工程が、2.0mM~10.0mMの量までのカルシウム濃度をもたらしのに十分なカルシウムを淡水へ、および0.5mM~10.0mMの量までのマグネシウム濃度をもたらしのに十分なマグネシウムを淡水へ添加する工程をさらに含む、方法。

【請求項 2】

a) 少なくとも1つのPVCRの発現および/または感受性を調節するのに十分な量でマグネシウムおよびカルシウムを淡水へ添加する工程; ならびに

b) 成魚前溯上性魚の血清中のカルシウムおよび/またはマグネシウムの有意に増加

したレベルを与えるのに十分な量のNaClを含む魚消費用の飼料を淡水へ添加する工程を含む、

海水移行前に淡水で管理される成魚前溯上性魚の飼育を改善するための方法であって、
2.0 mM ~ 10.0 mMの量までのカルシウム濃度をもたらすのに十分なカルシウムが淡水へ添加され、

0.5 mM ~ 10.0 mMの量までのマグネシウム濃度をもたらすのに十分なマグネシウムが淡水へ添加され、

飼料が少なくとも7重量%のNaClを含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

関連出願

本願は、H. William Harris, Jr.らによる「成魚前の溯上性魚の養殖方法」と題された2000年10月12日出願の一部継続出願第09/687,477号；H. William Harris, Jr.らによる「成魚前の溯上性魚の養殖方法」と題された2000年10月12日出願の出願第09/687,476号；およびH. William Harris, Jr.らによる「成魚前の溯上性魚の養殖方法」と題された2000年10月12日出願の出願第09/687,372号である。前記出願の全教示は参照により本明細書に取り込まれる。

【0002】

発明の背景

自然界では、多くの溯上性魚は海水でそれらの成体期のほとんどを過ごす。産卵の目的のために淡水へと上流へ泳ぐ。その結果、溯上性魚は淡水中でそれらの卵から孵化し、生まれる。これらの魚は成長するとともに、下流へ泳ぎ、しだいに海水に適応する。

20

【0003】

魚の孵化場は、これらのタイプの魚の養殖の際、困難性を伴う。というのは、成魚前の魚が海水に適応する（例えば、スモルト化（smoltification）を経る）時間のウィンドウ（window）は短く、正確に指摘するのが困難でありうるためである。その結果、これらの孵化場は、溯上性魚を淡水から海水に移す際に有意な罹患率や死亡率を経験する。さらに、淡水から海水への移行で生存した魚の多くはストレスを受け、その結果、摂餌の減少、疾患に対する感受性の増加を経験する。それゆえ、これらの溯上性魚はしばしば海水に移行後、十分に成長しない。

30

【0004】

水産養殖産業は、成魚前の溯上性魚を淡水から海水に移す際に遭遇する問題により、毎年、何百万ドルを失う。それゆえ、成魚前の溯上性魚の海水への移行に関する方法の改善が求められている。さらには、海水へ移された成魚前の溯上性魚の生存および成長の増加、ストレスの減少が求められている。

【0005】

発明の要約

本発明は、成魚前の溯上性魚の養殖の改善方法、または多価カチオン感受レセプター（PVCR）と呼ぶレセプターの発現を調節（例えば、増加および/または減少）することによる海水への移行のためのこれらの魚の調整方法に関する。PVCRの調節には、成魚前の溯上性魚をPVCRの少なくとも1つの調節因子（modulator）に供することによる、PVCRタンパク質およびmRNA発現の変化並びにPVCR感受性に対する変化を含む。成魚前の溯上性魚は、調節因子が、それらの淡水環境に添加される場合に、および任意に飼料に添加される場合に、調節因子に供される。本発明は、少なくとも1つのPVCR調節因子の淡水への添加、および魚の血清中でのPVCR調節因子レベルの有意な増加への寄与に十分な薬剤を含む、魚が消費する飼料の淡水への添加を包含する。1つの態様では、該薬剤は塩化ナトリウム（NaCl）である。それゆえ、飼料はNaClを含み、任意に、成魚前の溯上性魚の血清中でのPVCR調節因子レベルの有意な増加に寄与する量で少なくとも1つのPVCR調節因子を含む。PVCRの調節された発現および/または感受性は魚が海水への移行の準備が整うまで維持される。成魚前の溯上性魚は、それらの海水への移行の準備が整うまで、少なくとも1つのPVCRア

40

50

ゴニストを含む淡水中に維持されうる。本発明はまた、溯上性魚の海水への移行前および移行後直ぐの両方において、成長および／またはスモルト化の増加に十分な光周期に成魚前の溯上性魚を曝露することを任意に含む。好ましくは、光周期は連続的である。光周期は、24時間の期間中、約12時間から約24時間の間の範囲でありうる。また、本発明はさらに、連続的な光周期への曝露を維持したまま魚を海水へ移行することを含む。1つの例では、本発明は、少なくとも約15グラムまたは多くとも約120グラムの体重の成魚前の溯上性魚の海水への移行を可能にする。

【0006】

本発明の1つの態様では、成魚前の溯上性魚〔例えば、サケ、マスおよびアルプスイワナ（arctic char）〕は、淡水へのカルシウムおよびマグネシウム等のPVCRAゴニストの添加、および淡水への、約1重量％～約10重量％（例えば、約10,000mg/kg～100,000mg/kg）のNaClを含む、魚が消費する飼料の添加により、淡水から海水への移行に対し調整される。淡水に添加されるカルシウムの量は約2.0mM～約10.0mMの間までの濃度に達するのに十分な量であり、添加されるマグネシウムの量は約0.5mM～約10.0mMの間までの濃度に達するのに十分な量である。飼料は任意にアミノ酸等のPVCRAゴニストを含みうる。添加されうる特定のアミノ酸は、約1gm/kg～約10gm/kgの間の量のトリプトファンである。本発明はまた、成長および／またはスモルト化の増加に十分な量の時間の光周期に成魚前の溯上性魚を曝露することを任意に含む。好ましくは、光周期は連続的である（例えば、24時間の期間中、約12時間～約24時間の間）。連続的光周期は、本明細書に記載のように、海水への移行前後に、1日から数日間行われうる。

【0007】

本発明のさらなる態様は、海水への移行前および／または後での飼料消費の増加若しくは改善方法、成長の増加方法、生存率の増加および／または死亡率の減少方法、飼料変換率（FCR）の改善方法、特異的成長率（SGR）の増加方法、浸透圧損傷の低減方法、幼魚（例えば、約15から約60グラムの間）の海水への移行方法、並びに約14～約19の高められた温度を有する海水への成魚前の溯上性魚の移行方法を含む。これらの方法は、少なくとも1つのPVCRA調節因子を淡水に添加することにより、成魚前の溯上性魚を少なくとも1つのPVCRA調節因子に供するか若しくは曝露することにより、或いは少なくとも1つのPVCRA調節因子をPVCRAの発現および／または感受性を調節するのに十分な量で含む淡水へ成魚前の溯上性魚を導入することにより行われる。本方法はまた、約1重量％～約10重量％の間のNaClを含む飼料を淡水に添加すること、および成魚前の溯上性魚を海水に移行させることを含む。

【0008】

本発明はまた、成魚前の溯上性魚の組織（例えば、鰓）における塩類細胞（chloride cell）中のナトリウムカリウムATPアーゼ（Na+K+ATPアーゼ）活性の増加方法、または成魚前の溯上性魚の鰓の二次ラメラ（lamellae）における塩類細胞の頻度の低減方法を具体化する。本方法は、少なくとも1つのPVCRAの発現および／または感受性を調節するのに十分な量での淡水へのPVCRA調節因子の添加；および成魚前の溯上性魚の血清中でのPVCRA調節因子レベルの有意な増加に寄与するのに十分な量のNaClを含む、魚が消費する飼料の淡水への添加を含む。淡水に維持され、本発明の工程に供されない同じサイズかつ年の群の魚と比較して、塩類細胞におけるNa+K+ATPアーゼ活性の増加および／または二次ラメラにおける塩類細胞の数の減少が生ずる。二次ラメラ（SL）と一次ラメラ（PL）の間の塩類細胞の分布の比は決定することができる。淡水に維持され、本発明の工程に供されていない魚と比較して、SL/PL比は減少する。本発明の方法は、それで処理された魚は未だ淡水中に維持されているが、既に海水に移された魚が示す比とかなり近くまでSL/PL比を減少させる。SL/PL比は約0.1～約1.0の間の範囲でありうる。

【0009】

他の態様では、本発明は、成魚前の溯上性魚におけるPVCRA発現の量および／または局在を評価することによる、少なくとも1つのPVCRA調節因子に供され、かつ約1重量％～約10重量％の間のNaClを含む飼料を給与された成魚前の溯上性魚が海水への移行の準備が整って

いるか否かを決定する検出アッセイまたは検出方法を包含する。対照（例えば、PVCＲ調節因子に供されていない魚由来のPVCＲ発現）と比較して、発現および／または感度の調節された（例えば、増加または減少した）レベルは、成魚前の溯上性魚が海水への移行の準備が整っていることを示す。好ましい態様では、該アッセイは、抗PVCＲ抗体とPVCＲとの間で複合体を形成するのに十分な条件下に試料（例えば、鰓、皮膚、小腸、嗅覚ラメラ、膀胱、腎臓、脳または筋肉）と抗PVCＲ抗体を接触させること；および該複合体の形成を検出することを含む。他の態様では、該アッセイは、検出可能な標識を有する核酸配列を成魚前の溯上性魚から採取した試料のPVCＲの核酸配列にハイブリダイズさせること、およびハイブリダイゼーションを検出することに関する。さらに他の態様では、組織におけるPVCＲの検出はまた、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により達成されうる。この態様は、少なくとも１つのPVCＲを有する組織由来のmRNAの逆転写；PVCＲ特異的プライマーを用いるPCR 反応によるRT-PCR産物の獲得；およびPVCＲの存在または量の測定を含む。

10

【 0 0 1 0 】

さらに他の態様では、本発明は、種々の組成物および混合物に関する。特に、本発明は、約10,000mg/kg ～ 約100,000mg/kgの間（例えば、約12,000mg/kg ）のNaCl濃度を有する水生飼料組成物に関する。該水生飼料組成物は任意にPVCＲ調節因子（例えば、約1gm/kg ～ 約10gm/kg の間の量のトリプトファン）を含みうる。

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、成魚前の溯上性魚の養殖を改善する環境を提供する水生混合物を具体化する。該混合物は少なくとも１つのPVCＲ調節因子を含む。かかる混合物の例は、淡水に添加された時、約2.0mM ～ 約10.0mMの間の濃度となるカルシウム源、および、淡水に添加された時、約0.5mM ～ 約10.0mMの間の濃度となるマグネシウム源である。

20

【 0 0 1 2 】

さらに他の態様では、本発明はキットに関する。特に、本発明は、本明細書に記載のように、淡水および水生飼料組成物に添加するためのPVCＲ調節因子を含む、成魚前の溯上性魚の養殖を改善するためのキットを具体化する。他の態様では、本発明は、少なくとも１つのPVCＲ調節因子および約１重量％～約10重量％の間のNaClを含む飼料に供された後に、成魚前の溯上性魚が海水への移行の準備が整っているか否かを決定するためのキットを含む。該キットは、抗PVCＲ抗体、および固体支持体；または水生PVCＲの核酸にハイブリダイズしうる、検出可能な標識を有する核酸配列のいずれかを含む。

30

【 0 0 1 3 】

驚くべくことに、PVCＲの発現調節および／または感受性変化は、成魚前の溯上性魚の海水へのより良い適応を可能にすることが発見されている。本発明が発見されるまで、水産養殖産業は、魚にストレス、死および／または疾患をもたらすことなく成魚前の溯上性魚を海水に移行させることはできなかった。この経験と異なり、本発明の工程を実施することにより、PVCＲの発現が調節され、および／またはその感受性が変化し、ストレス、死および／または疾患を最小限でまたはそれらなく、成魚前の溯上性魚を海水へ移行することができ、予想に反して、さらに本明細書に記載するように、成長増加やより高温の水への該魚の移動能力増加等のいくつかの利益が得られる。本発明は、成魚前の溯上性魚の海水への移行の際に１以上の以下の利益を生ずる：死亡率の低下；摂餌の改善；成長増加；罹患魚の量の減少；および／または浸透圧ショックの減少。本発明はまた、魚のより早い収獲を可能にし、年間を通して、魚生産の柔軟性を増加させる。さらに、本発明の方法は、魚孵化場の有意なコスト削減をもたらしうる。

40

【 0 0 1 4 】

発明の詳細な説明

本発明は、成魚前の溯上性魚の飼養改善方法および／または淡水から海水への移行のための成魚前の溯上性魚の調整方法に関する。本方法は、多価カチオン感受レセプター（PVCＲ）（例えば、少なくとも１つのPVCＲ）の発現の調節および／または該レセプターの感度の変更を含む。本発明は、魚の、海水への適応能力、スモルト化を受ける能力、生存する能力、成長増加能力、飼料消費増加能力、および／または疾患に対する低感受性能力に影響

50

するPVCRの発現の調節に関する。

【0015】

特に、本発明の方法は、少なくとも1つのPVCR調節因子の淡水への添加、および魚による消費のための、淡水への特別に作製された若しくは修飾された飼料の添加を含む。該飼料は、血清中のPVCR調節因子のレベルを有意に増加させるのに十分な量の塩化ナトリウム (NaCl) を含む (例えば、約1重量% ~ 約10重量%、または約10,000mg/kg ~ 約100,000mg/kgの間)。飼料中のNaClのこの量は、成魚前の溯上性魚により多くの淡水を飲ませるようにするか、または飲むのを誘導する。淡水はPVCR調節因子を含んでおり、魚は多くの量の水を摂取するので、PVCR調節因子の血清レベルが魚で有意に増加し、PVCR発現の調節 (例えば、増加および/または減少) および/またはPVCR感受性の変化が生ずる。このプロセスは、成魚前の溯上性魚の海水への移行の準備を可能とし、その結果、一旦、該魚を海水へ移したならば、該魚は海水へよりよく適応しうる。

10

【0016】

本発明の方法は、成魚前の溯上性魚を海水に適応させることに関する。溯上性魚とは、産卵するために海水から淡水へと泳ぐ魚である。溯上性魚としては、例えば、サケ [例えば、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、シロザケ (*Oncorhynchus keta*)、マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*)、カラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*)、ベニザケ (*Oncorhynchus nerka*)]、チャー [例えば、アルプスイワナ (*Salveninus alpinus*)] およびマス [例えば、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)] が挙げられる。溯上性魚としては、海水へ泳ぐことができないが (例えば、陸封されたもの)、海水へ適応する生理学的メカニズムを有する魚も含まれる。本明細書で使用する用語「成魚前の溯上性魚」とは、未だ海水に適応していない溯上性魚をいう。これらの魚は、一般に稚魚である。成魚前の溯上性魚としては、限定されるものではないが、小魚 (fingerlings)、幼魚 (parr) またはスモルト (smolts) である魚が挙げられる。本明細書で使用する「スモルト」とは、魚が海水へ適応可能となる、または海水への続く移行の際に生存可能となる生理学的変化を受けた魚である。用語「スモルト」とはまた、海水への移行の際に無傷で生存する、まさに発達段階にあるのではなく、むしろ、統計的サンプリングおよび評価に基づき、海水への移行の準備が整った生理学的段階にあると決定される魚集団の1つである魚をいう。

20

【0017】

本発明は、海水への移行のためのスモルト化のプロセスを受ける成魚前の溯上性魚の調整方法を含む。スモルト化とは、魚が淡水から海水への順化または適応化を受ける段階である。スモルト化はまた、未だ淡水中にいるが、海水への生理学的前適応にある成魚前の溯上性魚に生じるプロセスをいう。スモルト化プロセスは、種ごとに異なる。異なった種の溯上性魚は、魚の一生の内に、異なる大きさ、体重および時間でスモルト化を受けうる。本発明は、広範な多数のまたは全ての成魚前の溯上性魚に、このプロセスを受けさせ、海水への移行の準備をさせる。

30

【0018】

成魚前の溯上性魚は、PVCR調節因子を添加する前に淡水中に維持される。用語「淡水」とは、例えば、小川、川、池、公共の上水道から来る、または、例えば、以下のイオン組成 (約2mM 未満のマグネシウム、カルシウムおよびNaCl) を有する他の非海洋源から来る水を意味する。用語「淡水」はまた、本明細書で記載のように、少なくとも1つのPVCR調節因子が添加された淡水をいう。

40

【0019】

PVCR調節因子は、PVCRの発現を調節するのに、またはPVCRの感度を変化させるのに十分な量で淡水に添加される。PVCRは、実施例9に記載のように、分子生物学的手法を用いて、数種の溯上性魚の様々な組織から単離された。DNA が、タイセイヨウサケ、チャー、シロザケ、ギンザケ、マスノスケ (King or Chinook salmon)、カラフトマス、ベニザケおよびマスを含む様々な種の溯上性魚由来の試料から単離された。PVCRの組織での発現をRT-PCRにより示す実施例20を参照のこと。DNA は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用い

50

て増幅された。実施例 9 に記載のようにして、増幅した DNA を精製し、ベクターにサブクローニングし、それらの配列を決定した。

【 0 0 2 0 】

成魚前の溯上性魚の様々な組織（例えば、鰓、皮膚、嗅覚ラメラ、小腸、腎臓、膀胱、脳または筋肉）にある PVCR は、例えば、周囲の水中で、魚の血清中で、或いは、腎臓、膀胱、または小腸等の体内の細管の管腔内容物（luminal contents）中で、種々のイオン（例えば、二価カチオン）を含む PVCR 調節因子における変化を感受する。これらの調節因子を感受するその能力は PVCR の発現を増加させ、および / または減少させ、それにより、魚が海水へよりよく適応可能となる。PVCR の増加したおよび / または減少した発現は、例えば、1 以上の組織でまたは全組織で生じうる。

10

【 0 0 2 1 】

「PVCR 調節因子」は、PVCR の発現を調節する（例えば、増加させるおよび / または減少させる）か、或いは PVCR の感受性または反応性を変化させる化合物を意味すると本明細書において定義されている。かかる化合物としては、限定されるものではないが、PVCR アゴニスト（例えば、無機ポリカチオン、有機ポリカチオンおよびアミノ酸）、2 型カルシウム受容体作動薬（calcimimetics）、および PVCR 発現を間接的に変化させる化合物（例えば、約 3,000 ~ 10,000 国際単位 / kg 飼料の濃度の 1,25 ジヒドロキシビタミン D）、インターロイキンベータ等のサイトカイン、並びにマクロファージ走化性ペプチド - 1（MCP-1）が挙げられる。PVCR の発現および / または感受性を増加させるおよび / または減少させる 2 型カルシウム受容体作動薬の例は、例えば、NPS ファーマシューティカル インコーポレイテッド（ソルトレイク、ユタ州、特許番号第 5,962,314 号；第 5,763,569 号；第 5,858,684 号；第 5,981,599 号；第 6,001,884 号）製の NPS-R-467 および NPS-R-568 である。それらは、飼料または水中、約 0.1 μM ~ 約 100 μM の間の濃度で投与されうる。ネメス（Nemeth），E. F. ら、PNAS 95: 4040-4045（1998）参照。無機ポリカチオンの例としては、約 20 ~ 約 10.0 mM の間の濃度のカルシウムおよび約 0.5 ~ 約 10.0 mM の間の濃度のマグネシウムを含む二価カチオン；および限定されるものではないが、約 1 ~ 約 500 μM の間の濃度のガドリニウム（gadolinium）（Gd³⁺）を含む三価カチオンである。有機ポリカチオンとしては、限定されるものではないが、約 1 ~ 約 8 gm/kg 飼料の間の濃度のネオマイシンまたはゲンタマイシン等のアミノ糖類、並びにポリアミン類（例えば、飼料中、約 10 μM ~ 10 mM の間の濃度の、ポリアルギニン、ポリリジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、スベルミン、カダベリン、プトレシン、ポリアルギニン / ヒスチジンの共重合体、ポリリジン / アルギニン）を含む有機ポリカチオンが挙げられる。ブラウン（Brown），E. M. ら、Endocrinology 128:3047-3054（1991）；クイン（Quinn），S. J. ら、Am. J. Physiol. 273:C1315-1323（1997）を参照。さらに、PVCR アゴニストとしては、約 1 ~ 約 10 gm/kg 飼料の間の濃度の、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-アラニン、L-セリン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-グリシン、L-リジン、L-メチオニン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-トレオニン、L-バリン、および L-システイン等のアミノ酸が挙げられる。コニグレイブ（Conigrave），A. D. ら、PNAS 97:4814-4819（2000）参照。1 つの態様では、アミノ酸はまた、低レベル（例えば、約 1 mM ~ 約 10 mM の間）の細胞外カルシウムの存在下に少なくとも 1 つの PVCR により感受されうるアミノ酸と定義される。細胞外カルシウムの存在下、小腸、幽門盲腸、または腎臓等の器官または組織での PVCR はよりよくアミノ酸を感受しうる。実施例 2 2 参照。モル濃度とは、淡水中の PVCR 調節因子の遊離のまたはイオン化物の濃度をいい、結合した PVCR 調節因子（例えば、ガラス、タンパク質、またはプラスチック表面等の負に帯電した粒子に結合した PVCR 調節因子）の量は含まない。これらの調節因子の任意の組み合わせが、かかる組み合わせにより PVCR の発現および / または感度を調節する限り、（本明細書に記載のように、NaCl と共に）水にまたは飼料に添加されうる。

20

30

40

【 0 0 2 2 】

PVCR 調節因子は、多くの方法で魚に投与することができる。本発明は、PVCR の発現を調節

50

するのに、および / またはPVCRの感受性を变化させるのに十分なあらゆる方法でのPVCRの投与を包含する。1つの態様では、PVCR調節因子は、本明細書に記載のように、様々な濃度で淡水に単純に添加される。少なくとも1つのPVCR調節因子を含む淡水環境は本明細書において「PVCR調節因子環境」という。水に添加されるPVCR調節因子は、魚の皮膚および鰓上のPVCRの発現を調節および / またはPVCRの感受性を变化させ、特に、魚が約1% ~ 約10%の間のNaCl（例えば、約10,000mg/kg 飼料 ~ 約100,000 mg/kg 飼料の間の濃度）を含む飼料を給与された場合、該魚により摂取されうる。飼料にNaClを添加するのに加え、PVCR調節因子（例えば、トリプトファン等のアミノ酸）も飼料に添加することができる。飼料に添加されるPVCR調節因子の量およびタイプも本明細書に記載されている。他の態様には、魚を調節因子、例えば、有機ポリカチオン類中に「浸漬」することにより、魚をPVCR調節因子に供することが含まれる。有機ポリカチオン類は、PVCRの発現を調節するのに十分な量で魚の皮膚および鰓に接着可能となるような方法で処方されうる。

10

【0023】

1つの好ましい態様では、本発明は、2つのPVCRアゴニストの組み合わせを淡水に添加することにより実施される。特に、カルシウムとマグネシウムを淡水に添加し、各々の濃度を、カルシウム約2.0 mM ~ 約10.0 mMの間およびマグネシウム約0.5 mM ~ 約10.0 mMの間とする。水にカルシウムとマグネシウムを添加することに加え、これらのイオン濃度の範囲は、魚に対し淡海水（例えば、希釈した海水）環境を提供することにより達成されうる。

【0024】

20

カルシウムとマグネシウムは種々の供給源から得られ、水に添加される場合、カルシウムおよび / またはマグネシウムのレベルは、PVCRの発現を調節し、および / または前記範囲内にある。カルシウムとマグネシウムの供給源は種々の化合物の混合物でありえ、または各々は実質的に均一若しくは純粋な化合物に由来しうる。カルシウムの供給源としては、例えば、 $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ 、 CaCl_2 、 CaSO_4 、および $\text{Ca}(\text{OH})_2$ が挙げられ、マグネシウムの供給源としては、例えば、 MgCl_2 、 MgSO_4 、 MgBr_2 、および MgCO_3 が挙げられる。

【0025】

1つの態様では、本発明は、NaCl食の間の、少なくとも1つのPVCR調節因子を含む海水への非連続的（例えば、中断した）並びに連続的（例えば、中断のない）曝露を含む。PVCRへの非連続的曝露は、PVCR発現および / またはPVCRの変化した感受性が調節（例えば、種々の組織における増加および / または減少）されたままである限り、生じうる。少なくとも1つのPVCR調節因子を含む淡水中での連続的維持または該淡水への連続的曝露を実施例2および7に示す。

30

【0026】

本発明のプロセスは、淡水から海水への移行のための魚の準備を整える。成魚前の溯上性魚は、PVCRの発現を調節するのに、および / またはPVCRの感受性を变化させるのに十分に長く、PVCR調節因子を含む淡水環境中に維持される。時間の長さは、魚の生理学的および身体的成熟度に依存する。魚の中には、より容易に環境に適応し、それらのPVCRの発現を調節し、および / またはPVCRの感度を変化させるものがあるであろう一方、そうするのにもっと時間を要するものもあろう。PVCRの発現を調節し、および / またはPVCRの感度を変化させるのに必要な時間の長さに影響を与えうる因子としては、限定されるものではないが、あるとすれば、PVCR調節因子の淡水への添加前における魚の大きさ、PVCR発現または感度のレベル、PVCR調節因子およびイオンを排出する魚の能力、魚の体積に対する表面の比などが挙げられる。それゆえ、魚が維持される時間の長さは、約7日から数カ月の範囲（例えば、7、14、21、30、45、90および120日）でありうる。魚はまた、PVCR調節因子を含む淡水中に維持され、NaCl食が給与される限り、無期限に維持されうる。例えば、10 gm未満の体重のサケ、マスまたはチャーは、海水への移行前に、少なくとも約180日間、PVCR調節因子を含む淡水中に維持され、NaCl食を給与されうる。

40

【0027】

本発明は、さらに飼料を淡水に添加することを含む。魚が給与される飼料の頻度および量

50

は先行技術に教示される。一般に、魚は1日に1～3回、合計で約0.25～50%体重/日が給餌される。飼料は、成魚前の溯上性魚の血清中でのPVCR調節因子のレベルの有意な増加に寄与するのに十分なNaClを含む。より具体的には、NaClは少なくとも2つの効果を有する。最初のもは、十分な量のNaClが飼料中に存在する場合に生ずる。飼料中のNaClの存在は、成魚前の溯上性魚に周囲の環境から多くの水を飲ませるようにする。第2のものは、NaClは直接的な負のPVCR調節因子であり、PVCR感度を減少するように働く。感受性を減少するNaClの効果にもかかわらず、魚がNaCl食を給与され、周囲の淡水環境がその中に少なくとも1つのPVCR調節因子を含む場合、驚くべきことに、特定の組織においてPVCR発現が増加する。PVCR調節因子を含む淡水の摂取の増加は、PVCR調節因子の血清レベルの全体的な増加を引き起こす。

10

【0028】

本発明はまた、水生飼料組成物に関する。1つの態様では、飼料は、溯上性魚の血清中でのPVCR調節因子のレベルを有意に増加させるのに寄与するのに十分な薬剤を含む。かかる薬剤は本明細書に記載の本発明の方法において使用されうる。魚の血清中のPVCR調節因子のレベルを有意に増加させる薬剤の一例はNaClである。飼料は、NaClを約1重量%～10重量%の間で、または約10,000mg NaCl/kg 飼料～約100,000 mgNaCl/kg 飼料（例えば、12,000mg/kg）の間で含む。かかる飼料は、本明細書で「NaCl食」という。NaClを、PVCR発現の増加、PVCR感度の変化および/または魚の飲量の増加誘導の所望の効果が得られるように、他のナトリウム塩と組み合わせるかまたは置換しうる。それゆえ、本明細書で使用される、用語NaClは、実質的に純粋な化合物、NaClとナトリウムの他の供給源との混合物およびナトリウムの他の供給源の混合物を含む。飼料は、さらにPVCR調節因子、特にアミノ酸等のPVCRアゴニストを含みうる。1つの態様では、飼料は約1重量%～約10重量%の間のNaClおよび約1～約10gm/kgの間の量のトリプトファン等のアミノ酸を含む。上記するように、飼料を構成する、本発明の特有の成分に加え、飼料は、さらに、例えば、栄養および/または嗜好性のために伝統的に飼料に添加される成分を含みうる。例えば、飼料は、カレイ若しくはイカ肉、または魚油等の魚成分を含みうる。

20

【0029】

飼料は、適切な濃度のNaClが存在する限り、多くの方法で調製されうる。飼料は、例えば、飼料を再処方することにより、または飼料によるNaClを含む溶液の吸収を可能にし、任意にPVCR調節因子を添加することにより、調製されうる。嗜好性のため追肥を添加することができ。実施例8には飼料を調製する1つの方法が詳細に記載されている。

30

【0030】

本発明の他の態様は、約20～約10.0mMの間のカルシウム、および約0.5mM～約10.0mMの間のマグネシウムを含む淡水環境に成魚前の溯上性魚が維持される際に、該魚に1重量%～10重量%の間のNaClを含む飼料を給与することを含む。本発明のこの態様が実施される場合、約1%～60%、約1%～40%、および約1%～15%の間のそれぞれの淡水中に維持された同様の対の魚と比べて、成魚前の溯上性魚の血清中のカルシウム、マグネシウムおよび/またはナトリウムのレベルが増加する。

【0031】

他の態様では、魚はまた、PVCR調節因子を含む淡水中にいる間、光周期（photoperiod）に曝露される。光周期とは、魚を光（例えば、太陽光、白熱光または蛍光光）に曝露することをいう。好ましくは、光周期は、実質的に連続的であり、成長が増大するのに、スモルト化が誘導されるのに、および/または死亡率が減少するのに十分に長く行われる。魚は、淡水中で、本発明の工程を受けながら（例えば、PVCR調節因子環境中、NaCl食を給与されながら）、並びにこの環境に曝露され、次いで海水に移行された後、連続的な光周期に曝露されうる。光周期は、24時間内で少なくとも約12時間、または約14、16、18、20、22、または好ましくは約24時間等のより長い期間、行われうる。魚が光周期に曝露される日数は約1日～数カ月（例えば、1、3、7、14、21、30、45、90および120日）の範囲でありうる。好ましくは、魚がPVCR調節因子環境に維持され、NaCl食を給与されている間の光周期は、好ましくは約4日～約50日の間である。魚はまた、PVCR調節因子を含む淡

40

50

水中に維持され、NaCl食を給与される限り、無期限に維持されうる。海水へ移行後、光周期曝露は、好ましくは約7日～約45日の間である。PVCＲは、松果体の茎を含む種々の組織で調節されうる。魚を光周期に曝露する方法は当技術分野で公知であり、例えば、ウィロービー (Willoughby), S., Manual of Salmonid Farming, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 106, および152-154 (1999)に記載されている。

【0032】

魚はまた、海水へ移行後、光周期に曝露されうる。光周期への魚の曝露の影響は、実施例10および表13に記載されている。光周期への曝露の利点としては、海水への移行後における魚の死亡率の劇的な減少が挙げられる。従って、1つの態様では、魚を連続的な光周期に維持することは、海水へのそれらの適応の際のそれらの生存率を増加させる。

10

【0033】

本発明の工程に曝露した後、成魚前の溯上性魚は海水へ移行される。用語「海水」とは、海由来の水、または海由来の水の化学組成およびミネラル組成を擬態するように処方された水を意味する。調製された海水の主要な元素組成は、好ましくは、天然の海水（例えば、以下のイオン組成を有する：30mMを超えるマグネシウム、約6mMを超えるカルシウム、および約300mMを超えるNaCl）の主要な元素組成の範囲内に実質的に入る。人工海水の調製方法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,351,651号明細書に記載されている。

【0034】

成魚前の溯上性魚に対し本発明の方法を実施する場合、魚は、本発明に供されていない成魚前の溯上性魚と比べて、成長（例えば、SGR）、消化管の運動性および/または飼料消費の有意な増加を示す。本発明は、海水移行の前、海水移行の際、および海水移行の後における、成長、消化管運動性および/または飼料消費の増大を可能にする。海水への移行の際、本発明の工程に供されていない魚は一般に、浸透圧ストレス、飼料消費の減少若しくは飼料の無消費、および死さえも経験する。浸透圧ストレスは、周囲の環境と魚の体内区画との間の浸透圧の差から生ずる。これは、魚の恒常的平衡を乱し、成長の減少、生殖不良および死への耐性の減少を生ずる。本発明の工程に供された魚は、有意な量の浸透圧ストレスを経験することなく、海水への移行時または移行後直ぐに摂餌を開始する。その結果、魚はまた、より急速に成長し、より早く市場サイズに達する。1つの態様では、APSプロセスIに供された魚は、海水への移行から20日後に摂餌を開始した対照の魚（例えば、APSプロセスIに供されていない魚）と比べて、海水への移行後48時間以内に活発に摂餌を開始した。これらの魚は、APSプロセスIに供されていない魚よりも7ヵ月早く市場サイズに達すると予測される。実施例15を参照のこと。特に、約1%～約10%の間のNaCl、および飼料1kg当たり約1gm～約10gmの間のアミノ酸を含む飼料を摂取した成魚前の溯上性魚は、海水への移行後、成長の実質的な増加を示す。実験において、本発明の工程に供された魚は、本発明の工程を経ることなく、海水へ移行された同様の対の魚と比べて、同じ時間間隔において約65%程度の成長の増加を示した。実施例2の表4参照。他の実験では、APSプロセスIに供された魚は、対照の魚が海水中でさらに64日間維持され、海水移行時に25%大きかったとしても、海水への移行後、対照の魚とおよそ同じ大きさであった。実施例15参照。成長の顕著な増加はAPSプロセスIIでも見られた。1つの特定の实验では、APSプロセスIIで処理された魚では、対照の魚と比べて、ある157日の間隔の間に9倍（15.2gmから142.5gm）を超える急速な体重の増加、成長の有意な増加があった。実施例12参照。さらに、本発明は、種々の大きさの魚の成長の増加を可能にする。成長の増加は、小型の魚（例えば、約15gm）、中型の魚（例えば、40gm）並びに大型の魚（例えば、90～120gm）において見られる。実施例12および14参照。従って、本発明は、約15gm～約120gmの範囲の体重を有する成魚前の溯上性魚の成長の増加方法に関する。PVCＲの発現および/または感度を、例えば、鰓組織の塩類細胞中で、または胃腸管（例えば、胃、幽門盲腸（pyloric caeca）、近位若しくは遠位小腸）、腎臓の管、皮膚または膀胱中の上皮細胞中で調節することができる。

20

30

40

【0035】

50

また、ある群における浸透圧ストレスを受けた魚の低いまたは乏しい摂餌の排除は、全群における全体的な飼料変換率を改善する。処理した魚の群の全メンバーによる海水移行後の最適な摂餌および成長は、より良い飼料の利用を可能とし、魚が市場サイズに達する場合の全体的な生産収量を改善する。

【0036】

従って、本発明は、海水へ移行される成魚前の溯上性魚についてのFCR を改善する方法を含む。飼料変換率、すなわちFCR は、ある群の魚で増加した体重でこれらの群の魚に給与した飼料の量を割ることにより得られる。魚による体重成長への飼料の変換が効率的であればあるほど、FCR は小さくなる（少量の飼料／魚の大きな体重増加）。非常に小さいFCR 数（1未満）は、体重増大への飼料の高効率の変換を包含し、それは、産業が努力していることである。対照的に、大きなFCR は、体重増大への飼料の不十分な変換を意味し、それは一般に望まれていない。大きな若しくは乏しいFCR は、望ましくない。というのは、飼料は通常高価であり、所定の体重まで魚を成長させるのにより多く使用しなければならないためである。本発明の方法に供された魚のFCR 値は一般に、いくつかの例において（例えば、魚が乾燥飼料を給与された場合）、ほとんどの産業が公表している値よりも小さく、望ましい。というのは、本発明は、飼料を食べるが成長しないので、全体的なFCR が増加する傾向にある、浸透圧ダメージを受けた魚の存在を排除するためである。結果として、魚を本発明の方法に供することにより、1つの態様において、FCR は減少し、それによりほとんど全ての魚の最適な摂餌および成長が可能となる。本発明に供された魚のFCR は、大多数の魚の成長および摂餌を維持するのに充分であるか、または、好ましくは、大多数の魚の成長および飼料消費を増加するのに充分である。魚が本発明の方法に供された場合、それらは、例えば、約0.7～約7.0の値を含むであろうFCR の範囲を示す。特に、飼料消費または飼料摂取が改善される。というのは、魚が嗅覚ラメラまたは嗅球の細胞においてPVCRにより飼料の「匂いをかぎ」または該飼料を「感受する」と考えられるからである。

【0037】

同様に、本発明は、成魚前の溯上性魚の世代間の時間の減少または低減を可能にする。これらの魚は、より早く繁殖を開始する。というのは、本発明は、本明細書に記載されるように、それらの成長を増加するためである。性的に成熟した魚を得るために2～3年が必要であるので、特性の選択的な繁殖に取り組もうとする試みには、所定の特性が選択され得、魚がその特性の繁殖を示す前にこの2～3年の間隔を要する。成長、および本発明により生産される成熟体に達する時間の改善は、魚が性的な成熟に達するのに必要な時間間隔を、約6ヵ月～約12ヵ月だけ低減する。繁殖の間隔の低減は、多くの魚の生産を可能とし、海水へのより良い適応が可能である特性以外の特性を有する魚の選抜（例えば、改善された味、増加した肉の厚さ、増加した α 3オメガ脂肪酸含量を有する魚、またはPVCR発現をより容易に調節することができる魚の選抜）を改善可能である。

【0038】

本発明以前、淡水から海水へ移行される溯上性魚は一般に、「臨界サイズ（critical size）」と呼ばれる特定の大きさを移行される。臨界サイズは種ごとに変化するが、一般に、魚が海水へ移行されうる最小の大きさをいう。サケ、マスおよびチャーの臨界サイズは、それぞれ、約50～約100gmの間、約70～約120gmの間、および100gmを超える。ギンザケ、マスノスケおよびベニザケの臨界サイズは、それぞれ、約10～約15gmの間、約20～約40gmの間、および約1～約2gmの間である。シロザケおよびカラフトマスはそれぞれ、約3gm未満の臨界サイズを有する。

【0039】

本発明以前、平均臨界サイズに達した成魚前の溯上性魚の集団が海水へ移行された。生理学的に移動の準備が整った魚がいる一方、準備が整っていない魚もいる。これは、海水への移行の際の死亡率の増加の理由の1つである。本発明の方法は、PVCR発現および／または感度を調節することにより、および／またはスモルト化を誘導することにより、全ての若しくはほとんど全ての、海水へ移行される魚を生理学的に調整する。約80を超える（例

えば、90%、95%、100%）ものがスモルト化を経て、海水への移動の準備を整える。実際、1つの実験では、タイセイヨウサケに対して本発明の工程を実施する場合（例えば、魚をPVCR調節因子環境およびNaCl食に供する）、100%に近いタイセイヨウサケがスモルト化を受けた。実施例2参照。それゆえ、本発明の方法は、海水への移行への成魚前の溯上性魚を調整する方法、並びに成魚前の溯上性魚においてスモルト化を誘導する方法を含む。

【0040】

本発明の方法は、成魚前の溯上性魚におけるPVCRの発現および/または感度を調節するので、魚は、海水へ移行された場合により良く生存する。浸透圧ストレスの低減は、死亡率の低減を生ずる。1つの例では、本発明の方法を経ていない成魚前の溯上性魚の特定の集団は海水への移行後に100%の死亡率を示す（図9、実施例2参照）一方、本発明の方法を経ていない成魚前の溯上性魚の他の集団は約40%~70%の間のみの生存率（例えば、約50%）を有する。表I、実施例2参照。これは、魚が、淡水とは非常に異なるイオン組成を有する海水へ移行された場合に、浸透圧ショックを経験するために生ずる。しかしながら、本発明の方法に供された場合、魚は、未調整の魚の生存率よりも有意に高い生存率を示す（例えば、約80~約100%の間）。実際、本発明をタイセイヨウサケに実施した場合、1つの実験で本発明の工程を経ていない魚では50%が生存したのと比べて、99%の魚が海水への移行から5日後に生存した。実施例2の表I参照。それゆえ、本発明は、成魚前の溯上性魚が海水へ移行された後の死亡率の低減方法を具体化する。

【0041】

本発明は、海水への移行後の死亡率の低減に有効であるだけでなく、本発明は、移行前の淡水における生存率の増加にも使用される。本発明の発見前、「スモルトウインドウ」は、孵化場が海水へ成魚前の溯上性魚を移行させるか、若しくは、魚がスモルト化を経た後に淡水中で維持され続けるならば、魚が死亡したことを表した。本発明のPVCR調節因子環境およびNaCl食は、魚が無期限に成長し続けるのを可能にする。魚は、飼料を消費し、成長し続ける。従って、本発明の方法は、魚が海水へ移行され得る期間またはウインドウを有意に増加させるか、或いはそれを全く排除する。本発明がタイセイヨウサケに実施された場合、99%の魚が生存し、淡水中で少なくとも45日間成長し、それにより、少なくとも約45日まで（例えば、1~45日）スモルトウインドウが増加した。対照的に、本発明の工程を経ていない魚では、ほんの67%が、1つの実験で、淡水中で45日後に生存した。実施例2参照。さらに、これらの魚が海水へ移行された後、それらは、さらに本明細書に記載、特に実施例15に記載するように、APSプロセスIまたはIIのいずれも経ていない魚と比べて、より多く飼料を消費し、より良く成長する。

【0042】

本発明はまた、特定の種の魚について産業で認められる臨界サイズと比べて、より小さな体重を有する成魚前の溯上性魚を海水へ移行させる方法を含む。本明細書に記載されるように、本発明の方法は、通常通りに海水へ移行された魚、またはスモルト化を経た若しくは経ようとしている魚よりも小さな魚においてPVCR発現を調節する。これらの方法は、スモルトになる前の稚魚の段階にある幼魚を海水へ移行する工程を含む。幼魚は、稚魚または卵黄囊稚魚の成熟後に生ずる成魚前の溯上性魚の生活段階である。幼魚または小魚は、それらの脇腹に沿って特徴的なオビッドストライプ（ovid stripes）または幼魚マークを表示し、通常、スモルト化前に淡水中で成長および発達を受ける。用語「幼魚」は当技術分野で公知の語である。卵黄囊稚魚（yolk sac fry）に給餌し続けると、それらはより大きな幼魚に成長する。幼魚は、それらが成長した条件に依存して幅広い体重の範囲を有する。幼魚の体重は、種ごとで変わる。幼魚の体重は約0.5gm~約7.0gmの範囲で有意に変化する。本明細書に記載するように、1つの実験で本発明の実施により、臨界サイズ体重（約70~約100gmの間）の約13%~約18.5%の間、すなわち、約13gm程度の体重を有するタイセイヨウサケ幼魚の移行に至った。NaCl食に加え、PVCR調節因子（例えば、トリプトファン等のアミノ酸）を飼料に添加することで、特に低い体重を有する魚の海水への移行が可能となる。実施例2参照。1つの態様では、APSプロセスIIに供されたサケは

15グラム程度の体重で海水へ移行させられ得た。少なくとも15グラムの体重のサケは、急速な成長を経験し、効率的に飼料を利用し、APS プロセスIIに曝されず、4倍を超える体重のサケよりも少ない死を被った。実施例12参照。従って、本発明は、海水への移行のために、海水への移行時に約15グラム～約120グラムの間の体重の溯上性魚を調製する方法を包含する。

【0043】

本発明は、さらに、過去において魚が移行させられた水温（6°～14°）に比べて、暖かい温度（例えば、14°および19°）を有する海水へ成魚前の溯上性魚を移行する方法を提供する。魚は、本発明の方法を用いて海水へ移行された場合、低減された若しくはほとんどない浸透圧ストレスを経験するので、魚は、死亡率の増加を示すことなく、より高い水温への移行に耐えうる。実施例2参照。

10

【0044】

本発明の方法はまた、スモルトおよび成長したサケの中での疾患の発生を減少させる。本発明の方法により処理されたスモルトは海水への移行の際に少ないストレスを経験するので、それらの免疫機能はより強く、それらは、寄生性、ウイルス性、細菌性および真菌性の疾患に対し感受性が低い。本明細書に記載の方法により処理されていない魚は、かかる疾患に対し感受性がより高く、健常な魚を感染しうる疾患の保有魚として機能しうる。

【0045】

本発明の他の態様は、成魚前の溯上性魚の種々の組織における塩類細胞の分布を修飾することを含む。かかる組織の1例は鰓組織である。しかしながら、魚がAPS プロセスIIに供された多数の実験では、処理された魚が淡水中に維持されているにもかかわらず、海水に移行させた魚が示すパターンに類似する、二次ラメラ中の塩類細胞の数の有意な低減が存在するように、鰓中の塩類細胞の分布がシフトした。淡水中に維持され、本発明の工程に供されていない魚では、塩類細胞は、鰓組織の一次ラメラおよび二次ラメラの両方中でおおよそ等しい数で局在する。対照的に、かかる魚が海水へ移行された場合、分布は、二次ラメラで観察される塩類細胞が有意に少ないように変化する。実施例21参照。従って、本発明の方法は、魚を本明細書に記載の方法に供することにより、一次ラメラ中の塩類細胞の数を増加すること、および二次ラメラ中の塩類細胞の数を低減することを含む。塩類細胞の局在化は、当技術分野で公知の方法を用いて実施可能である。塩類細胞は、免疫細胞化学を用いて局在化されえ、並びに酵素的アッセイを用いて測定されうる、豊富な量のNa⁺K⁺ATPアーゼを含む。塩類細胞を局在化する1つの方法は、鰓の切片（例えば、パラフィン切片）を得て、抗ナトリウムカリウム（Na⁺K⁺）ATPアーゼ抗体（マウスモノクローナルα5抗Na⁺K⁺ATPアーゼ抗体）で切片を染色することである。Na⁺K⁺ATPアーゼ活性は、塩類細胞中に見られ、塩類細胞のマーカーとして使用されうる。抗体は標識されえ、または標識され、抗Na⁺K⁺ATPアーゼ抗体に結合しうる二次抗体を用いて塩類細胞を染色し、観察しうる。セイデルリン（Seidelin）ら、Physiol Biochem Zool. 73(4):446-53 (2000)参照。

20

30

【0046】

一次ラメラ（PL）および二次ラメラ（SL）中の塩類細胞の分布は、比を用いて決定することができる。PL中の塩類細胞の数に対するSL中の塩類細胞の数の比（SL/PL）が決定される。淡水中に維持され、本発明の方法に供されていない成魚前の溯上性魚では、SL/PL比は当技術分野で公知であり、一般に約0.6～約1.8の間である。1つの実験で、本発明の方法に供され、淡水中に維持された魚は、SL/PL比の減少を示す。かかる比は一般に、約0.1～約1.0の間であり、それは、海水へ移行された魚に見られるのに近い比（例えば、約0～約0.18の間の比）である。実施例21参照。それゆえ、本発明の方法は、魚を本明細書に記載の方法（例えば、APS プロセスIまたはII）に供することによる、淡水中に維持された成魚前の溯上性魚のSL/PL比の減少を含む。

40

【0047】

同様に、本発明は、塩類細胞中のNa⁺K⁺ATPアーゼ活性の増加方法に関する。魚の鰓薄膜上に存在する塩類細胞と呼ばれる特定の上皮細胞は、淡水および海水の両方で魚が生存する

50

のに重要であることが一般的に認識されている。淡水に適応した魚では、魚がその正常な体のイオン組成を維持できるように、鰓塩類細胞が、周囲の淡水中で希釈濃度で存在している Na^+ イオンと Cl^- イオンを魚の体液中に供給する。対照的に、同じ魚を海水に移すと、高浸透性の海水を飲んだ結果、魚の体液中に蓄積された過剰な Na^+ および Cl^- を除去できるように、鰓塩類細胞がその構造や機能を改める。塩類細胞は、このように豊富な $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼタンパク質を含み、この酵素の存在および活性の両方が塩類細胞の同定用マーカーおよびその作用の指標として使用され得る。本発明の方法（たとえば、APS プロセス I または II）に供される魚は、 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼタンパク質の発現および / または活性の増大を示す。一つの実施例において、鰓組織に見られる塩類細胞の $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼ活性の有意な増大は、淡水中で維持され、かつ APS プロセス II に供されない魚に比べて APS プロセス II に供された魚に見られた。実施例 21 を参照のこと。

10

【0048】

$\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼ活性は、酵素的方法を用いて測定することができ、このことは本明細書においてさらに記載される。塩類細胞を含有する組織（たとえば、鰓または幽門盲腸（pyloric caeca））のホモジェネートを得、これを ATP 加水分解を測定する酵素的アッセイに供する。 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼ活性は、ウアバインを用いるまたは用いない ATP 加水分解における差から計算することができ、ウェル中のタンパク質含量について正規化され得る。このタンパク質は、たとえば、クーマシー（Coomassie）系バイオ・ラド（Bio-Rad）タンパク質アッセイ（Bio-Rad, Hercules, CA）を用いるプレートリーダーで分析することができる。実施例 21 は、さらに詳細に、 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼ活性を測定するプロトコルを記載する。 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼおよび / または局在化している塩類細胞を定量する方法（これは当該分野で公知であるか将来開発されるものである）が使用され得る。Seidelinら、Physiol Biochem Zool. 73(4):446-53 (2000) および McCormick, Can. J. Fish Aquat. Sci. 50, 656-658 (1993) を参照のこと。

20

【0049】

PVCRの評価方法

本発明は、魚が淡水から海水へ移動する準備があるかどうかを決定するために PVCR のレベルを検出する方法を含む。PVCR レベルの測定方法は、いくつかの適当なアッセイを含む。適当なアッセイは、FACS 分析、放射免疫アッセイ、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）および化学発光アッセイなどの免疫学的方法を含む。現在公知のまたは最近開発された任意の方法は、PVCR 発現を測定するために使用され得る。

30

【0050】

PVCR またはその一部と反応する抗体が使用され得る。好ましい態様において、抗体は、PVCR またはその一部と特異的に結合する。この抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、抗体という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびそれらの機能性断片を包含すると意図される。ポリクローナルおよびモノクローナルという用語は、抗体調製物の均等性の程度をいい、特定の製造方法に限定することを意図しない。

【0051】

いくつかの好ましい態様において、免疫学的方法は、PVCR レベルを、抗 PVCR 抗体（すなわち、1 つ以上の抗体）を使って、検出する。用語「抗 PVCR」抗体は、モノクローナル抗体および / またはポリクローナル抗体、およびそれらの混合物を含む。

40

【0052】

抗 PVCR 抗体は、単離されたおよび / または組み換え PVCR またはそれらの一部（合成ペプチドなどの合成分子を含む）などの適当な免疫原に対して発生される。一つの態様において、抗体は、単離されたおよび / または組み換え PVCR またはそれらの一部（たとえば、ペプチド）に対してあるいは組み換え PVCR を発現する宿主細胞に対して発生される。さらにトランスフェクト細胞などの組み換え PVCR を発現する細胞は、免疫原としてまたはレセプターを結合する抗体のスクリーニングに使用され得る。

50

【 0 0 5 3 】

任意の適当な技術は、免疫抗原を調製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製することができる。当該分野は、種々のこれらの方法を含む（たとえば、Kohlerら、Nature 256:495-497(1975)とEur. J. Immunol. 6:511-519(1976); Milsteins, Nature 266: 550-552(1997); Koprowski ら、米国特許第4,172,124 号; Harlow, E.およびD. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol.2 (補遺27, 1994年夏), Ausubel, F.M.ら, 編, (John Wiley&Sons: New York, NY), 11 章, (1991))。一般に、適当な不死またはミエローマ細胞株 (SP2/0 など) を抗体産生細胞と融合することでハイブリドーマを産生することができる。所望の抗原で免疫された動物は、抗体産生細胞、好ましくは脾臓またはリンパ節由来の細胞を提供する。選択的な培養条件は、抗体産生ハイブリドーマ細胞を分離し、一方、限界希釈技術はそれらを製造する。研究者らは、ELISA などの適当なアッセイを用いて所望の特異性を有する抗体産生細胞を選択することができる。

10

【 0 0 5 4 】

他の適当な方法は、必須の特異性を有する抗体を作製または分離することができる。他の方法の例は、ライブラリーから組み換え抗体を選択することまたはマウスなどのトランスジェニック動物の免疫に依存することを含む。

【 0 0 5 5 】

前記方法によれば、アッセイは、生物学的試料におけるPVCRのレベルを決定できる。PVCRの量を決定する際に、アッセイは、抗体とPVCRとの複合体の形成に適当な条件下で、試験される試料をPVCRに対して特異性を有する抗体と組み合わせ、複合体の形成を検出または測定（直接的にまたは間接的に）することを含む。試料は、直接的または間接的に得ることができ、特定の試料および選択されたアッセイフォーマットに適当な方法により調製され得る。

20

【 0 0 5 6 】

特に、組織試料（たとえば、鰓組織試料）は、魚をMS222 で麻酔したあと、その魚から採取することができる。組織試料は、魚の浸透性に対応した適当なリンガー溶液中 2 %パラホルムアルデヒドへの浸漬で固定化し、リンガー溶液で洗浄し、ついで包埋化合物（たとえば、O.C.T.（登録商標）（Miles, Inc., Elkhart, Indiana, USA）中で、液体窒素で冷却したメチルブタンを用いて凍結させる。クリオスタットで8-10 μ の組織切片を切った後、個々の切片を種々の染色プロトコルに供する。たとえば、切片は、1）ヤギ血清または同じ種の魚から得られる血清でブロックされ、2）ウサギ抗CaR または抗PVCR抗血清とともにインキュベートされ、そして3）ペルオキシダーゼ共役アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ抗血清で洗浄およびインキュベートされる。結合したペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ウサギ抗血清の位置は、ついで、淡紅色のアミノエチルカルバゾール反応生成物の発生で顕在化される。個々の切片は、標準的な光学顕微鏡技術により、検鏡板に固定し、観察し、写真撮影される。魚PVCRタンパク質を検出するのに使用される抗CaR 抗血清は、RaKCaRタンパク質の細胞外ドメインに局在化された214-236 のアミノ酸メンバーに対応する23マーペプチドを用いてウサギで発生させる。23マーペプチドの配列は、ADDDYGRPGIEKFREE AEERDICI（配列番号：19）であり、また、配列DDYGRPGIEKFREEAEERDICI（配列番号：20）またはARSNSADGRSGDDLPC（配列番号：21）を有する小ペプチドは、PVCRに対する抗体を含有する抗血清を作製するのに使用され得る。かかる抗体は、モノクローナル、ポリクローナルまたはキメラであり得る。

30

40

【 0 0 5 7 】

放射性標識、蛍光標識または化学発光標識などの適当な標識を直接的に検出することができる。これらの標識は、酵素標識やピオチンのような他の抗原性または特異的結合パートナーなどの標識を用いて間接的に検出することもできる。かかる標識の例としては、フルオレセイン、ローダミンなどの蛍光標識、ルシフェラーゼなどの化学発光標識、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I などの放射性同位体標識、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素標識、お

50

よびアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ビオチン、アビジン、スピン標識などが含まれる。複合体中における抗体の検出は、次いで検出される（たとえば、標識を用いる）二次抗体を用いて免疫学的にも行われ得る。通常の方法または他の適当な方法は、直接的または間接的に抗体を標識し得る。

【0058】

前記方法を行う際に、種々の組織におけるPVCRのレベルは、対照と比較して変化する。種々の組織中のPVCR発現の調節されたレベルまたは存在は、対照と比較して、その魚または統計的に有意な数の魚が試験された魚の群が淡水に移動する準備があることを示す。対照は、本発明の工程に供されない（たとえば、PVCR調節因子を有する淡水に供されないおよび/またはNaCl食餌を採らない）魚由来のものであるにしても、PVCRのレベルを指示する。たとえば、図13および図18は、本発明に供されない魚が検出可能なPVCRレベルを持たない一方、本発明の工程に供された魚は、容易に検出されるPVCRレベルを有していたことを示す。

10

【0059】

PVCRは、また、組織試料由来のmRNAのノザンプロット分析によりアッセイされ得る。種々のサメ組織由来のノザンプロット分析は、最高度のPVCR発現が鰓組織中にあり、次いで腎臓および直腸腺が続くことを示している。約7kb、4.2kb および2.6kb の少なくとも3つの別々のmRNA種があるようである。

【0060】

PVCRは、ハイブリダイゼーションにより、たとえば、本明細書で提供されるPVCR配列（たとえば、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15）の一つまたは該配列の一つから得られるオリゴヌクレオチドを魚由来のDNA含有組織試料にハイブリダイズすることにより、アッセイされ得る。かかるハイブリダイゼーション配列は、ハイブリダイゼーション産物の検出を可能にするために付着する検出可能な標識、たとえば、放射能、蛍光などを有し得る。ハイブリダイゼーションの方法は周知であり、かかる方法は、Jacobsらによる米国特許第5,837,490号で提供され、そのすべての教示は本明細書に全て参照として取り込まれる。オリゴヌクレオチドプローブの設計は、これらのパラメーターに従うことが好ましいであろう：（a）あるとすれば、最も少数の不明瞭な塩基（「N」のもの）を有する配列の領域に設計され、（b）およそ80のT_m（AまたはT毎に2、GまたはC毎に4と仮定する）を有するように設計されるだろう。

20

30

【0061】

ハイブリダイゼーションに対してストリンジェンシーな条件とは、一番目の核酸配列の2番目の核酸配列へのハイブリダイゼーションを可能にする温度条件および緩衝液組成の条件をいい、該条件は互いにハイブリダイズするそれらの配列間での同一性の程度を決定する。したがって、「高ストリンジェンシーな条件」は、互いに極めて類似している核酸配列のみがハイブリダイズするそれらの条件である。該配列は、中程度のストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズする場合、互いに対する類似性は少なくなりうる。さらに少ない類似性は、低ストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズする2つの配列にとって必要とされる。ハイブリダイゼーションが起こらないストリンジェンシーレベルからハイブリダイゼーションが初めて見られるレベルにハイブリダイゼーション条件を変えることにより、所定の配列がそれに最も類似するそれらの配列にハイブリダイズする条件を測定することができる。特定のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する正確な条件には、イオン強度、温度、およびホルムアミドなどの脱安定化剤の濃度だけでなく、核酸配列の長さ、それらの塩基組成、2つの配列間のミスマッチな塩基対の割合、他の非同一な配列内での配列のサブセット（たとえば、リピートの小ストレッチ）の出現の頻度などのファクターも含む。洗浄は、条件が互いにハイブリダイズする配列間の類似性の最小レベルを決定するために設定された工程である。一般に、相同のハイブリダイゼーションのみが生じる最低温度から、2つの配列間での1%のミスマッチは、任意の選ばれたSSC濃度あたり溶融温度（T_m）が1低減する。一般に、SSCの濃度を2倍にすると、T_mが約17増加する。これらのガイドラインを使用すると、洗浄温度は調べたミ

40

50

スマッチのレベルにより、経験に基づいて決定され得る。ハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. ら, 編, John Wiley & Sons, Inc., 1995, 最新情報を補足した) の2.10.1頁~2.10.16 頁および6.3.1 頁~6.3.6 頁において説明されている。

【0062】

高ストリンジェンシーな条件は、

(1) $1 \times \text{SSC}$ ($10 \times \text{SSC} = 3 \text{ M NaCl}$ 、 0.3 M クエン酸ナトリウム・ $2 \text{ H}_2\text{O}$ (88 g / リットル)、 1 M HCl で $\text{pH } 7.0$ にする)、 $1\% \text{ SDS}$ (ドデシル硫酸ナトリウム)、 $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65

(2) $1 \times \text{SSC}$ 、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42 、

(3) 1% ウシ血清アルブミン (V画分)、 $1 \text{ mM Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 0.5 M NaHPO_4 ($\text{pH } 7.2$) ($1 \text{ M NaHPO}_4 = 1 \text{ リットルあたり } 134 \text{ g Na}_2 \text{ HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 、 $4 \text{ ml } 85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$)、 $7\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65 、

(4) 50% ホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ 、 0.02 M Tris-HCl ($\text{pH } 7.6$)、 $1 \times$ デンハルト溶液 ($100 \times = 10 \text{ g}$ のフィコール 400、 10 g のポリビニルピロリドン、 10 g のウシ血清アルブミン (V画分)、水で 500 mL にする)、 10% 硫酸デキストラン、 $1\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42 、

(5) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 $1\% \text{ SDS}$ $100 \mu\text{g/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65 、または

(6) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{ SDS}$ $100 \mu\text{g/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42 、のいずれかで、

(1) $0.3 \sim 0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 65 、または

(2) $1 \text{ mM Na}_2 \text{ EDTA}$ 、 40 mM NaHPO_4 ($\text{pH } 7.2$)、 $1\% \text{ SDS}$ 、 65 のいずれかの高ストリンジェンシー洗浄を用いて、ハイブリダイゼーションを行うことができる。上記条件は、 50 塩基対以上の DNA - DNA ハイブリッドについて用いられることが意図される。該ハイブリッドは、長さが 18 塩基対よりも少ないと考えられる場合、ハイブリダイゼーション温度および洗浄温度は、ハイブリッドの計算された T_m のものより $5 \sim 10$ 低いだろう。ここで T_m は、 $T_m = (2 \times A \text{ 塩基および T 塩基の数}) + (4 \times G \text{ 塩基および C 塩基の数})$ である。長さが約 $18 \sim 49$ 塩基対であると考えられるハイブリッドについて、 T_m は $T_m = (81.5 + 16.6 (\log_{10} M)) + 0.41 (\% G + C) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 500 / L$ であり、ここで、「 M 」は一価のカチオン (たとえば、 Na^+) の重量モル濃度であり、「 L 」は塩基対でのハイブリッドの長さである。

【0063】

中程度ストリンジェンシーな条件は、

(1) $4 \times \text{SSC}$ 、($10 \times \text{SSC} = 3 \text{ M NaCl}$ 、 0.3 M クエン酸ナトリウム・ $2 \text{ H}_2\text{O}$ (88 g / リットル)、 1 M HCl で $\text{pH } 7.0$ にする)、 $1\% \text{ SDS}$ (ドデシル硫酸ナトリウム)、 $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65 、

(2) $4 \times \text{SSC}$ 、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42 、

(3) 1% ウシ血清アルブミン (V画分)、 $1 \text{ mM Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 0.5 M NaHPO_4 ($\text{pH } 7.2$) ($1 \text{ M NaHPO}_4 = 1 \text{ リットルあたり } 134 \text{ g Na}_2 \text{ HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 、 $4 \text{ ml } 85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$)、 $7\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65 、

(4) 50% ホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ 、 0.02 M Tris-HCl ($\text{pH } 7.6$)、 $1 \times$ デンハルト溶液 ($100 \times = 10 \text{ g}$ のフィコール 400、 10 g のポリビニルピロリドン、 10 g のウシ血清アルブミン (V画分)、水で 500 mL にする)、 10% 硫酸デキストラン、 $1\% \text{ SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42

(5) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 $1\% \text{SDS}$ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 65°C 、または (6) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{SDS}$ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 42°C 、のいずれかで、 $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 65°C の中程度ストリンジェンシー洗浄を用いて、ハイブリダイゼーションを行うことができる。上記条件は、 50 塩基対以上の DNA - DNA ハイブリッドについて用いられることが意図される。該ハイブリッドが、長さが 18 塩基対よりも少ないと考えられる場合、ハイブリダイゼーション温度および洗浄温度は、ハイブリッドの計算された T_m のものより $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 低いだろう。ここで T_m は、 $T_m = (2 \times A \text{ 塩基および T 塩基の数}) + (4 \times G \text{ 塩基および C 塩基の数})$ である。長さが約 $18 \sim 49$ 塩基対であると考えられるハイブリッドについて、 T_m は $T_m = (81.5 + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G + C) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 500/L)$ であり、ここで、「 M 」は一価のカチオン (たとえば、 Na^+) の重量モル濃度であり、「 L 」は塩基対でのハイブリッドの長さである。

10

【0064】

低ストリンジェンシーな条件は、

(1) $4 \times \text{SSC}$ 、($10 \times \text{SSC} = 3 \text{ M NaCl}$ 、 0.3 M クエン酸ナトリウム塩・ $2 \text{ H}_2\text{O}$ ($88 \text{ g}/\text{リットル}$)、 1 M HCl で $\text{pH } 7.0$ にする)、 $1\% \text{SDS}$ (ドデシル硫酸ナトリウム)、 $0.1 \sim 2 \text{ mg}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 50°C 、

(2) $6 \times \text{SSC}$ 、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 40°C 、

20

(3) 1% ウシ血清アルブミン (V 画分)、 $1 \text{ mM Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 0.5 M NaHPO_4 ($\text{pH } 7.2$) ($1 \text{ M NaHPO}_4 = 1 \text{ リットルあたり } 134 \text{ g Na}_2 \text{ HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 、 $4 \text{ ml } 85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$)、 $7\% \text{SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 50°C 、

(4) 50% ホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ 、 0.02 M Tris-HCl ($\text{pH } 7.6$)、 $1 \times$ デンハルト溶液 ($100 \times = 10 \text{ g}$ のフィコール 400 、 10 g のポリビニルピロリドン、 10 g のウシ血清アルブミン (V 画分)、水で 500 ml にする)、 10% 硫酸デキストラン、 $1\% \text{SDS}$ $0.1 \sim 2 \text{ mg}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 40°C 、

(5) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 $1\% \text{SDS}$ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 50°C 、または

30

(6) $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 50% ホルムアミド、 $1\% \text{SDS}$ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 変性仔ウシ胸腺 DNA、 40°C 、のいずれかで、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 50°C 、または

(2) 0.5% ウシ血清アルブミン (画分 V)、 $1 \text{ mM Na}_2 \text{ EDTA}$ 、 40 mM NaHPO_4 ($\text{pH } 7.2$)、 $5\% \text{SDS}$ のいずれかの低ストリンジェンシー洗浄を用いて、ハイブリダイゼーションを行うことができる。上記条件は、 50 塩基対以上の DNA - DNA ハイブリッドについて用いられることが意図される。該ハイブリッドが、長さが 18 塩基対よりも少ないと考えられる場合、ハイブリダイゼーション温度および洗浄温度は、ハイブリッドの計算された T_m のものより $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 低いだろう。ここで T_m は、 $T_m = (2 \times A \text{ 塩基および T 塩基の数}) + (4 \times G \text{ 塩基および C 塩基の数})$ である。長さが約 $18 \sim 49$ 塩基対であると考えられるハイブリッドについて、 T_m は $T_m = (81.5 + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G + C) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 500/L)$ であり、ここで、「 M 」は一価のカチオン (たとえば、 Na^+) の重量モル濃度であり、「 L 」は塩基対でのハイブリッドの長さである。

40

【0065】

本発明は、本明細書に開示されるプライマーまたは本明細書に記載の配列から得られるプライマーを使用する PCR 方法を用いた PVCR の検出を包含する。たとえば、PVCR は、実施例 9 に記載されているように、配列番号：22 および 23 を用いる PCR により検出することができる。PCR は、配列特異的なプライマーおよび耐熱性ポリメラーゼを利用した核酸複製の繰り返される循環による、標的配列の選択的な増幅である。PCR は、公知の配列の 2 つの

50

末端の間の全配列の回収を可能にする。PCR 法は、本明細書に記載され、当該分野で公知である。

【0066】

特に、水性(aquatic) PVCRのレベルは、水生種由来のポリA+RNA の単離後、リバーストランスクリプターゼ - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により、種々の組織において決定され得る。PCR 法およびRT-PCR法は、当該分野で十分に特徴付けされ得る (一般には、PCR 技術: DNA 増幅に関する原理と応用 (H.A. Erlich 編, Freeman Press, NY, NY, 1992) ; PCR プロトコル: 方法と応用へのガイド (Innis,ら編, Academic Press, San Diego, CA, 1990) ; Mattila ら, Nucleic Acids Res19:4967 (1991) ; Eckertら, PCR 法および応用, 1:17 (1991) ; PCR (McPherson ら編, IRL Press, Oxford) ; Ausebel, F.M. ら, 分子生物学における最新のプロトコル, Greene Publishing Assoc. およびWiley-Interscience 1987, & Supp. 49,2000 ; および米国特許第4,683,202 号を参照)。簡単には、mRNAは所望の組織から抽出され、逆転写される。次いで、PCR 反応を、PVCR特異的プライマーを用いて行い、予想されるPVCR産物の存在を、たとえば、アガロースゲル電気泳動により決定する。PVCR特異的プライマーの例は、配列番号: 22および/または配列番号: 23である。PVCR特異的プライマーで行われるRT-PCR反応産物は、本明細書でRT-PCR産物と呼ばれる。RT-PCR産物は、PVCR配列の一部または全てを有する核酸分子を含みうる。RT-PCR産物は、必要に応じて放射性標識され得、PVCR産物の存在または量は、オートラジオグラフィを用いて決定され得る。かかるアッセイに使用され得る市販の蛍光プローブの2つの例は、モレキュラー・ビーコン (ストラタジーン) およびTaqman (登録商標) (Applied Biosystems) である。RT-PCR産物を標識しかつ定量するかわりの方法は、当業者にとって周知である (Ausebel, F.M. ら, 分子生物学における最新のプロトコル, Greene Publishing Assoc.およびWiley-Interscience 1987, & Supp.49, 2000を参照。ポリ A + R N A は、標準的な方法により、少なくとも1つのPVCRを含む任意の組織から単離され得る。かかる組織には、たとえば、鰓、鼻腔薄膜、膀胱、腎臓、腸、胃、肝臓および脳が含まれる。

【0067】

その上、本発明は、PVCRまたはその一部に対して特異的な抗体、あるいはPVCRの核酸にハイブリダイズし得る核酸配列のいずれかを有するPVCRの検出用キットまたはPVCRの定量用キットを含む。

【0068】

PVCRの発現または感度の変化は、また、適当なトランスジーン(transgene) の導入により達成され得る。適当なトランスジーンはPVCR遺伝子自体またはPVCR遺伝子発現に直接的または間接的に影響を与える修飾遺伝子のいずれかを含まれよう。魚卵母細胞、幼生および成体におけるトランスジーンの成功した導入方法、選択方法および発現方法は、Chen, TT ら、トランスジェニックフィッシュ、Trends in Biotechnology 8:209-215 (1990)に記載されている。

【0069】

本発明は、以下の実施例により、さらにかつより具体的に説明されるが、これはいかなる方法に限定することを意図するものではない。

【0070】

実施例

実施例1. 多価カチオン感受レセプター (PVCR) は、魚において塩分濃度センサーとして役に立つ。

多価カチオン感受レセプター (PVCR) は、魚において塩分濃度センサーとして役に立つ。これらのレセプターは、浸透度調節を担うことが知られている魚の体 (たとえば、鰓、腸、腎臓) 内の種々の細胞の先端の膜に局在されている。ツノザメ科のサメ由来の全長カチオンレセプター (CaR, 「PVCR」とも呼ばれる) は、ヒトHEK細胞において発現されている。このレセプターは、HEK細胞を浸す細胞外体液中のNaCl、Ca²⁺およびMg²⁺のイオン組成の変化に応答することが示された。イオン濃度は、淡水から海水に移すことを含む

範囲を包含するように応答した。PVCＲ mRNAの発現は、淡水から海水への移行後の魚で増加し、PVCＲアゴニストにより調整される。PVCＲの部分的ゲノムクローンは、また、変性プライマーを用いる核酸増幅を使用することにより、冬および夏ヒラメおよびダンゴウオを含む他の魚の種から分離されている。

【 0 0 7 1 】

この方法を、タイセイヨウサケ（図 1）、アルプスイワナ（図 2）およびニジマス（図 3）についてPVCＲの部分的なゲノムクローンを分離するのににも使用した。使用した変性オリゴヌクレオチドプライマーは、5'-TGT CKT GGA CGG AGC CCT TYG GRA TCG C-3'（配列番号：22）および5'-GGC KGG RAT GAA RGA KAT CCA RAC RAT GAA G-3'（配列番号：23）であった。ここでKはTまたはG、YはCまたはT、およびRはAまたはGである。変性オリゴは、標準的な方法論により作製された（Preston, G.M., 1993, 「遺伝子ファミリーメンバーをクローニングするための変性オリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase chain reaction with degenerate oligonucleotide primers to clone gene family members)」、Methods in Mol. Biol., vol. 58, A.Harwood 編、Humana Press, pp.303-312）。これらの3つの種由来のゲノムバンドは増幅され、アガロースゲル電気泳動により精製され、適当なプラスミドベクター（サケおよびアルプスイワナ種 - pT7 ブルー（Novagen, Madison, WI: pGem-Tを使用したマス（Promega Biotech. Madison, WI）内にライゲートされ、およびノバブルー（NovaBlue）を有するサケおよびアルプスイワナ - pT7 ベクター（Novagen, Madison, WI）およびマスpGEM-Tを適当な細菌宿主株に形質転換し、使用したJM-109大腸菌は次いで、液体培地で生育させた。プラスミドおよび挿入物は、宿主細胞から精製され、シーケンスされた。図 4 は、ツノザメ科のサメ（スクアルス・アカンチア（*Squalus acanthias*））の腎臓由来のPVCＲに対して、タイセイヨウサケ、カナダ産イワナおよびニジマス由来のPVCＲについて誘導されたアミノ酸配列およびアライメントを示す。

【 0 0 7 2 】

実施例 2：本発明の方法を用いる成魚前の溯上性の魚の生存と成長

最新のサケ養殖の重要な特徴は、淡水孵化場から海洋網生簀（netpen）へのスモルトの配置である。現時点の方法は、約70～110 グラム体重の臨界サイズを達成したスモルトを使用する。本発明は、標準的な70～110 グラムのスモルトの海洋網生簀輸送を改善するならびにより小さな、たとえば体重が15グラムしかない、スモルトの上手な海洋網生簀輸送を可能にするために使用されうる。標準的な70～110 グラムのスモルトについて、本発明を応用することにより、「スモルトのウィンドウ」として知られる現象が除去され、15 以上の海水中に魚を維持し、移行することができる。15グラムまたはそれより大きなスモルトに本発明を使用することで、淡水孵化場の容量の利用をより大きくすることができ、ついで、海洋網生簀への海水輸送を成功させることができる。両方の場合には、本発明の工程を経た魚は海洋網生簀への移行後、短い間隔で活発に餌を食べ、したがって、海水への移行時に急激な成長速度を示す。

【 0 0 7 3 】

図 5 は、ヨーロッパおよびチリにおける海洋温度でのタイセイヨウサケの最新の水産養殖の重要な特徴をスキームの形で示す。卵は内陸の淡水孵化場において孵化され、得られる稚魚は小魚や幼魚に成長する。より速い成長を遂げた幼魚は、スモルト化を経て、1年目の間でS0スモルト（70グラム）として海洋網生簀に移すことができる。対照的に、ゆっくりと成長する幼魚は、2年目にスモルトとなり、S1スモルト（100 グラム）として網生簀に移される。S0とS1の両方が海水に移行する際に、海洋温度および淡水温度がより冷たければ、新たに移行されたスモルトへの浸透性のショックのストレスを最小限にすることが望ましい。このことが、S1のスモルトについて特に本質的であるのは、淡水孵化場がしばしば海洋網生簀の生育場所と有意に離れた位置にあり、その水温が初夏の間では急激に上昇するためである。したがって、水温の上昇と、淡水中で長い間隔留まっている場合にスモルトが元に戻ったり、死んだりする傾向とを合わせて考えることにより、スモルトはスモルトウィンドウの間に海水へ移行する必要が生じる。

【 0 0 7 4 】

海洋網生簀に新たに入れられた標準的なスマルトが、最初の40～60日の間、海水中で最適に成長することができないのは、これらが餌を食べることを遅延させる浸透性ストレスの存在があるからである。この浸透性適応の間隔は、スマルトが春または秋のいずれかの配置直後に存在するディグリーデー(degree day)の大多数を利用することが妨げられる。スマルトウインドウの存在と、至適なスマルトの成長を達成することの遅延とを組み合わせることにより、生育間隔を引き延ばして市場サイズの魚を得る。これが、S0のものについて特に問題の多い事柄であるのは、それらの収穫の時点が周囲の光周期の減少に曝された魚を成長させる際に本年サケ(grijsing)の出現により時々悪化されるためである。

【 0 0 7 5 】

方法

以下の例は、終始APS プロセスI およびAPS プロセスIIに言及している。APS は「AquaBio ProductSSciences (登録商標), L.L.C.」を表わす。APS プロセスI は、本明細書では、「SUPERSMOLT (登録商標) I プロセス」または「プロセスI」と呼ばれる。「APS プロセスI」の魚またはスマルトは、APS プロセスI の工程を経た魚またはスマルトをいう。APS プロセスI のスマルトはまた、「SUPERSMOLT (登録商標) I または「プロセスI」のスマルトと呼ばれる。同様に、APS プロセスIIは、本明細書では、「SUPERSMOLT (登録商標) II プロセス」または「プロセスII」とも呼ばれる。「APS プロセスII」の魚またはスマルトは、APS プロセスIIの工程を経た魚またはスマルトをいう。APS プロセスIIのスマルトはまた、「SUPERSMOLT (登録商標) II または「プロセスII」のスマルトと呼ばれる。

【 0 0 7 6 】

A P S プロセス I

：成魚前溯上性魚（これは通常に作製されたS0、S1またはS2のスマルトならびにより小さい幼魚／小魚の両方を含む）を2.0～10.0mMカルシウムおよび0.5～10.0mMマグネシウムイオンを含む淡水中に曝露または維持する。この水は、淡水に炭酸カルシウムおよび／または塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムを添加することにより調製される。魚には7%（重量／重量）NaClを含む食餌ペレットを給餌する。この食餌に関するさらなる詳細については実施例8を参照のこと。魚は、水混合物のこの摂生と、標準的な孵化ケア技術を用いる全部で30～45日間の給餌に曝されまたは維持される。水温は10～16の間で変化する。魚は、A P S プロセスI が継続される間一定の光周期に曝される。蛍光を光周期に用いる。

【 0 0 7 7 】

APS プロセスII：成魚前溯上性魚（これは通常に作製されたS0、S1またはS2のスマルトならびにより小さい幼魚／小魚の両方を含む）を2.0～10.0mMカルシウムおよび0.5～10.0mMマグネシウムイオンを含む淡水中に曝露または維持する。この水は、淡水に炭酸カルシウムおよび／または塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムを添加することにより調製される。魚には7%（重量／重量）NaClおよび食餌1kg あたり2gm または4gm のいずれかのL-トリプトファンを含む食餌ペレットを給餌する。食餌に関するさらなる詳細については実施例8を参照のこと。魚は、水混合物のこの摂生と、標準的な孵化ケア技術を用いる全部で30～45日間の食餌に曝されまたは維持される。水温は10～16の間で変化する。魚は、APS プロセスIIが継続される間一定の光周期に曝される。蛍光を光周期に用いる。

【 0 0 7 8 】

結果と考察

セクションI：タイセイヨウサケ、マスおよびカナダ産イワナに対するAPS プロセスI の利益の証明

タイセイヨウサケに対するAPS プロセスI の利益の証明：

APS プロセスI は、適合する淡水の対照と比較した場合、海水への移行後の小さなタイセイヨウサケS2様スマルトの生存率を増加する。至適生存率は、マグネシウムおよびカルシウム両方の水混合物ならびにNaCl食餌からなる完全なプロセスを用いることにより達成される。対照的に、食餌のみを介するまたはNaCl食餌補給なしのいずれかのカルシウムおよ

10

20

30

40

50

びマグネシウムの投与では、APS プロセスI と等しい結果が生じない。

【 0 0 7 9 】

表 1 は、約25gmの体重の 1 歳未満のタイセイヨウサケS2様スモルトから得られたデータを示す。この単一の魚の群は、以下に示すように、4 つの特定の群に配分し、それぞれを試験した変数を除いて同じ研究室条件下で維持した。すべての魚を水温9 ~ 13 、実験の間は、継続的な光周期に維持した。開始45日間淡水に維持した対照の淡水群は、これらの条件下に33%の死亡率を経験し、67%だけが海水に移行できた。海水への移行後、この群は、またこれらのスモルトの半分だけが生き残るという高い死亡率を経験した。スモルトに与えられた食餌中にカルシウム (10mM) およびマグネシウム (5mM) を包含することで (Ca2+ / Mg2+食餌)、淡水 (51% 対67%) ならびに海水移行後 (1% 対50%) の両方の場合に
10
対照と比較して生存率が減少した。対照的に、淡水 (APS プロセスI 水のみ) 中に10mM Ca2+および5mM Mg2+を包含することで、APS プロセスI 水ならびにスモルトの海水への移行後における生存率が向上した。しかしながら、スモルトをAPS プロセスI 水混合物中に維持し、7%塩化ナトリウムを補足した食餌を与えた場合に、最適の結果が得られた (APS プロセスI 水混合物ならびに海水移行後の両方において99%が生存した)。

【 0 0 8 0 】

【表 1】

表 1. 種々の処理後のタイセイヨウサケS2様スモルトの生存率の比較

20

採取された パラメータ	対照 淡水	Ca2+/Mg2+ 食	APS水のみ	APS水+ NaCl食
魚の開始時の数	66	70	74	130
魚の数	44	36	67	129
淡水または APS混合物中 45日後 生存している 魚の割合	67%	51%	91%	99%
魚の数	22	2	60	128
淡水に移動の 5日後での 生存している 魚の数	50%	6%	90%	99%
¹ 生存率はおおよその総数で示す				

30

40

【 0 0 8 1 】

海水中への70 ~ 100gm のスモルトの配置に対するAPS プロセスI の応用
これらのデータは、APS プロセスI の使用が「スモルトウインドウ」を排除し、急速なスモルトの食餌とスモルトの成長速度に有意な改善を提供することを示す。

【 0 0 8 2 】

50

実験プロトコル：

米国、メイン、チェリーフィールドにあるコーナース・ブラザーズ・デブロイス(Connors Brothers Deblois)孵化場で産生されたタイセイヨウサケのセント・ジョン株由来のスマルトを、この大スケール試験に利用した。スマルトは、この孵化場での標準的なプラクティスを用いて産生され、1999年1月の卵の孵化から得られた。すべてのスマルトは、標準的な市販のスマルトのトラックと輸送人員で移行された。S1のスマルトは、メイン産2000年のスマルトウインドウの間で購入され、スマルトの配達は、2000年4月29日～2000年5月15日の日程の間で行われた。スマルトを、メインのブルー・ヒル湾(Blue Hill Bay)にあるポーラー・サークル(Polar Circle)網生簀(直径24m)に直接移行する(対照)、またはそれらを全部で45日間APS プロセスIで処理する処理施設に輸送した。APS プロセスI処理を受けた後、スマルトを次いで同一のブルー・ヒル湾の網生簀位置に移行し、成長するまで隣接した方形のスチール製ケージ(1.5m×1.5m×5m)に入れた。両方のグループの魚には、湿っぽい(水分38%)および乾燥した(水分10%)サケ科の魚の食餌(コーナース・ブロス(Connors Bros))の同じ混合物を与えた。食餌を視覚化するカメラを用いて1日あたり2回十分満足させるために各網生簀に手でまたは食餌ブローにより給餌した。三歳のサケの潜水は通例の状態で行われ、各網生簀は、このサケ養殖において確立された同じ標準的なケアプラクティスを受けた。成長分析についての魚のサンプリングは、42日(APS プロセスI)または120日以上(対照)の魚のいずれかで行われた。両方の場合、魚を網生簀から取り出し、複数の分析を以下に記載するようにして行った。

【0083】

食餌変換率(FCR)または特異的な成長速度(SGR)および成長因子(GF3)を得るためにすべての計算値を、標準的に認められた式を用いて行い(Willoughby, S. Manual of Salmonid Farming Blackwell Scientific, Oxford UK 1999)、以下の表2に示すようなブルー・ヒル湾地域についてのディグリーデーの測定を設定した。ディグリーデーは、一月の日数を摂氏での日温度の平均に掛けることで計算される。

【0084】**【表2】**

10

20

表2：ブルー・ヒル湾のサケ水産養殖地域についてのディグリーデー

月	ディグリーデー
1月	60
2月	30
3月	15
4月	120
5月	210
6月	300
7月	390
8月	450
9月	420
10月	360
11月	240
12月	180

10

20

【0085】

表3は、対照S1のスモルトの海水移行後に得られたデータを示す。75～125gmの範囲のスモルトを3つの独立した網生簀に入れ、メインでの現在のサケ水産養殖について典型的な性質を示す通常の養殖プラクティスに供した。冷たい（10℃）海水への移行後、有意な死亡率（平均33％）を経験し、完全な食餌は、海洋の網生簀において有意な間隔（～56日）後にのみ達成された。結果として、これらの3つの網生簀の平均SGR値およびGF3値は、測定した105～121日間でそれぞれ1.09および1.76であった。

30

【0086】

前記のように対照S1のスモルトの海洋網生簀への移行直後（表III）とは対照的に、平均サイズが63.6グラムである10,600のS1のスモルトの全部を、2000年5月11日にデブロイス淡水孵化場から研究施設に輸送した。標準的な円形タンクに維持しながら、これらの魚を平均水温11℃で全部で45日間保持し、APSプロセスIに供した。この間隔の間、スモルトの死亡数はわずか64匹であった（0.6％）。APSプロセスIの魚に対応する対照として、対照の魚のより小さな群（n=220）を、同じ条件下で維持したが、APSプロセスI処理を受けていなかった。これらの対照魚の死亡率は、10℃の温度を保持することにより最小限にし、海水への移行の前に処理したスモルトと同じであった。

40

【0087】

【表3】

表3：APS技術のない（対照の魚）淡水孵化場からの輸送後、海洋網生簀に隣接した位置に供されたセント・ジョンS1スモルトの特徴付け

網生簀番号			
	#17	#18	#10
魚の合計	51,363	43,644	55,570
海水移動の 平均日数	5/1/00	5/5/00	5/14/00
移動時の 平均サイズ(グラム)	(117.6) 100-125	75-100	75-100
30日後の死亡率 (数と総数の割合)	1,785; 3.5%	728; 1.7%	2503; 4.5%
移動後の完全な 食餌を達成する までの時間	68日	48日	50日
網生簀配置と 分析との間の 間隔	121	120	105
分析時の 平均サイズ			
体重(グラム)	376.8±74	305.80±64	298.90±37.40
体長(cm)	33.4±1.9	28.30±9.0	30.40±1.17
環境因子 (k)	1.02	1.34	1.06
SGR	0.96	1.10	1.17
開始120日間			

【0088】

S1スモルトがAPS プロセスI を受けている場合、45日間で、魚は平均10グラム成長し、次いで海洋網生簀に移行した場合、平均体重76.6gmを有した。2000年6月26日に行った実際のスモルトの海水への移行は、普通は問題のあるスモルトの異常な活動力について顕著であったのは、この時点がスモルトの海洋の配置についての正常なウィンドウをうまく通過するためである。APS プロセスI のスモルトの網生簀配置の時点での海洋温度は15.1 であった。前記標準的な産業プラクティスに供された対するS1のスモルトとは対照的に、APS プロセスI のスモルトは、海洋配置の48時間以内に活発に食餌し、移行期間直後の食餌の消費が増大し続けた。APS プロセスI のスモルトの死亡率は、海洋網生簀の配置後最初の50日間、夏により早く配置されたスモルトのもの（6.1 %）と比べられ、それらの死亡率の3分の2は、直接的にはスケールロスによるものであり、残りは移行プロセス自体の間に受けた物理的なダメージによるものであった。

【0089】

対照的に、対応する対照の魚（APS プロセスI 処理のない同じ条件下に保持された）は、

網生簀への移行の間うまくいかず（17%の移行死亡率）、海洋網生簀配置後最初の20日間の任意の時点で活発に食餌しなかった。このより小数の対照の魚（176）を、APS プロセスⅠのスモルトを含むより大きな網生簀内に浮遊しているより小さな（1.5m×1.5m×1.5m）網生簀に保持した。海洋網生簀配置後のこれらの死亡率は、51日間で63%と非常に高かった。

【0090】

APS プロセスⅠおよび対照の両方のスモルトに、表3に示す産業標準魚により経験されたものと同じ方法で毎日給餌した。APS プロセスⅠの魚をその海水への配置の51日後にサンプリングし、表3に示す産業標準のスモルトと比較した。表4に示すように、これらの特徴の比較は、産業標準のスモルト対APS プロセスⅠの間の劇的な差を示す。

10

【0091】

【表4】

**表4：APS処理に供し、次いで海洋網生簀に入れたセント・ジョンⅠ
APSプロセスⅠスモルト対対応する産業標準のスモルトの特徴の比較**

	APSプロセスⅠの スモルト	本例における表3からの 平均した産業標準データ
魚の合計	10,600	150,577
海水移動の 平均日数	6/26/00	5/7/00
移動時の 平均サイズ(グラム)	76.6	95.8
30日後の死亡率 (数と総数の割合)	648; 6.1%	5,016; 3.3%
移動後の完全な 食餌を達成する までの時間	2日	56日
網生簀配置と 分析との間の 間隔	51	115
分析時の 平均サイズ		
体重(グラム)	175.48±50	327.2±97
体長(cm)	26.2±32	30.7
環境因子 (k)	0.95±0.9	1.14
SGR	1.80	1.09

20

30

40

【0092】

要約すれば、APS プロセスⅠ、対照スモルトと産業標準のスモルトとの間の顕著な差は次

50

のことを含む：

【 0 0 9 3 】

1 . これらの魚がスモルトウインドウ後1.5 ヶ月で、非常に高い (15.1) 海水温度の海水に移行されているにも係わらず、海洋網生簀配置後に見られる死亡率は、対照 (63%) に対しAPS プロセスI (6.1 %) では低い。APS プロセスI の死亡率は、スモルトウインドウの間により低い (10) 海水に移された、認められた産業標準のスモルトのもの (3 ~ 10%) と比べられた。APS プロセスI のこの特徴は、APS プロセスI のスモルトの移行が産業プラクティスで現在使用されている通常の「スモルトウインドウ」を正確に制限しないため、淡水孵化場での作業においてより大きな融通性を提供する。

【 0 0 9 4 】

2 . APS プロセスI の魚は、海水への移行中および直後にピークの状態になった。完全な食餌を達成するのに56日を必要とした産業標準のスモルトと異なり、APS プロセスI のスモルトは、2日以内に活発に食餌を行なった。さらに、APS プロセスI のスモルトで見られた初期成長速度 (SGR1.8) は、海水配置後の最初の50日間の標準のスモルトの公表データよりも有意に大きい (0.2 ~ 0.8 のSGR 範囲の公表値 (Stradmeyer, L. 見込みのないものへの食餌は時間の無駄か、Fish Farmer 3:12-13, 1991; Usher, ML, C TalbotとFB Eddy. タイセイヨウサケのスモルトでの成長および食餌に対する海水への移行の影響 (Salmo salar L.) Aquaculture 94:309-326, 1991))。事実、APS プロセスI のスモルトの成長速度は、産業標準スモルトが海水配置の時点でより大きく、かつその成長が海水配置後120 日で測定されたものであるにも関わらず、同じ位置で海水中に配置された産業標準のスモルトに比べて有意に大きい。これらのデータは、APS プロセスI のスモルトが、直ぐに食餌することを妨げるであろう有意な浸透度調節ストレスに供されていなかったという証拠を提供する。

【 0 0 9 5 】

3 . 海洋網生簀への配置直後のAPS プロセスI のスモルトの急速な成長は、海水での成長を続行した場合、サケのサイズの増大を倍加させることを提供する。したがって、体重112.5 グラム (gm) の産業標準のスモルトは、APS プロセスI 処理に供され、海洋網生簀に配置され、そして海洋網生簀配置の120 日後に実験された場合、そのサイズは観察時377 グラムではなく平均782 グラムになることが予想される。これは、成長の初期段階での魚のサイズの倍加より大きなサイズを提供する。かかる魚は、産業標準の魚に比べて、より急速に市場サイズに到達するだろう。

【 0 0 9 6 】

標準産業プラクティスに供された対応するS1スモルトと対照的に、APS プロセスI で処理されたスモルトは、海洋配置の48時間以内に活発に食餌し、移行期間直後に食餌の消費を増大し続けた。比較することにより、産業標準のスモルトは移行後第1 週以内はわずかまたは全く食餌しなかった。図6 A は、プロセスI 処理されたスモルトと産業標準のスモルトとの間の魚あたりの1 週間の食餌消費量を比較している。示されるように、プロセスI 処理されたスモルトは、30日後の産業標準のスモルトに比べて、最初の1 週間の魚あたりおよび2 倍の食餌を消費した。プロセスI で処理されたスモルトは、産業標準のスモルトと比べて有意に多く食餌したので、プロセスI 処理されたスモルトは、実施例1 5 に詳しく説明するように、より早く成長した。

【 0 0 9 7 】

図6 B は、海水移行後のAPS プロセスI のスモルトの特徴についてのデータを示す。これらの実験は、185 日にわたって行なわれ、これらのデータは同じ魚についても実施例1 5 において見られうる。

【 0 0 9 8 】

産業標準の「臨界サイズ」のスモルトよりも小さいタイセイヨウサケの成魚前の魚へのAPS プロセスI の応用

【 0 0 9 9 】

平均体重が20.5グラムである合計1,400 のランドキャッチ (Landcatch) / セント・ジョン

10

20

30

40

50

(St John) 株の小魚を、2000年8月1日に米国、メイン、クオシック (Quossic)、クオシック孵化場のメイン社のタイセイヨウサケから購入した。これらの小魚は、2000年1月に孵化している卵から得られ、急速に成長した魚であると考えられた。それらは、標準的な通常のトラック輸送を用いて処理施設に輸送された。その到着後、これらの小魚をまず典型的な淡水の成育条件に14日間おいた。ついで、これらの小魚を合計29日間、継続的な光周期に曝しながらAPS プロセスI に供した。ついで、APS プロセスI をリポーゲン・フォート産物 (Aquahealth社) で予防接種し、通常のトラック輸送により海洋網生簀に輸送し、捕食者用ネットならびにこれらのより小さなAPS プロセスI のスモルトの損失を防ぐのに十分に小さなネット口 (0.25インチ) の両方を有する研究用海洋網生簀中の海水 (15.6) に入れた。かわりに、APS プロセスI のスモルトを研究室内の円形タンクに入れた。海水移行の48時間後、APS プロセスI のスモルトは、通常の産業サケと比較して、より小さなAPS プロセスI のスモルトについてより小さいサイズの食餌を提供する必要性にしたがって再ペレット化された標準の水分 (水分38%) の、スモルトの食餌 (Connors Bros.) を開始した。上記の70グラムのスモルトについて記載されたのと同様の方法で、これらの30グラムのAPS プロセスI のスモルトの死亡率、食餌の消費量、成長および全体的な健康をより詳しくモニターした。

【0100】

図7は、海水に移行する直前の1,209のAPS プロセスI のスモルトのより大きな群の代表的なサンプルの特性を示す。これらのパラメーターは平均体重が 26.6 ± 8.6 グラム、体長 13.1 ± 1.54 cm および条件因子が 1.12 ± 0.06 を包含する。海水移行後、APS プロセスI のスモルトは、それらの平均体重が産業標準の70~100グラムのS0-SLのスモルトの26~38%であるという事実にも係わらず、低い初期死亡率を示した。表5に示すように、海水配置後の最初の72時間以内のAPS プロセスI のスモルトの死亡率は、研究室タンクの1/140 または0.07%であった。APS プロセスI のスモルトの配置後の海洋網生簀の死亡率は、143/1,069 または13.4%であった。図7は、海洋網生簀または対応する研究室海水タンクのいずれかの海水に移行された、ある範囲の体の大きさを有する、代表的なLandcatch/St John 株APS プロセスI のスモルトを示す。APS プロセスI のスモルトは、平均体重が26.6グラムである広い範囲のサイズ (たとえば、約5.6グラムから約46.8グラムの体重) を有する。これらのデータを用いた実験例は、魚の淡水タンクへの輸送後84日間で行われ、かつこれらの実験由来のデータは、実施例16に記載される。

【0101】

【表5】

10

20

30

表5：研究室タンクまたは海洋網生簀のいずれかの海水内への配置後のLandcatch /St John) のAPSプロセスIの魚の特性と生存

	研究室のタンク	海洋網生簀
魚の合計	140	1,069
海水移動日	9/5/00(40); 9/12/00 (100)	9/12/00
移動時の 平均サイズ(グラム)	26.6	26.6
4日後の死亡総数 (数と総数の割合)	1; 0.7%	143; 13.4%
体重25gの魚と 上記のもの の死亡率%	0; 0.0%	4; 0.4%
食餌を達成する までの時間	48時間	72時間

【0102】

図8は、Landcatch/St John) のAPS プロセスI のスマルトの全グループについての体の特徴の分布対海水海洋網生簀配置後72時間の死亡率の比較を示す。1,069 のAPS プロセスI のスマルトの海水配置後に生じた143 の死亡体から得られた体長と体重のデータを、図7に前もって示したように、100 の魚のサンプリングから得られたデータに基づいてプロットした。死亡体は、より大きなAPS プロセスI 網生簀の個体群内のより小さな魚の中でもっぱら分布することに注意せよ。

【0103】

海洋網生簀の底から回収された全死亡体についての体長測定と体重測定を図8に以前示した代表的なサンプルの分析から得られたAPS プロセスI のスマルトの体の特徴の分布と比較した。データは、死亡体が、死亡体の平均体重が全移行個体群の平均体重の54% (14.7/27 グラムまたは54%) であるような体のサイズが小さいAPS プロセスI のスマルトの間で選択的に発生したことを示す。したがって、体重が25~30グラムのAPS プロセスI のスマルトの実際の死亡率は、0.4% (4/1,069) であり、体重が18~30グラムのもものでは2.9% (31/1,069) である。

【0104】

産業標準の「臨界サイズ」のスマルトよりも小さいマスの成魚前の魚へのAPS プロセスI の応用

【0105】

表6は、小さな(3~5グラム)のニジマスについてのAPS プロセスI の使用についてのデータを示す。稚魚マスは、稚魚タイセイヨウサケに比べて淡水から海水への突然の移行に対してあまり耐性がない。結果として、多くの市販の海水マス生産業者は自分達の魚を河口域または淡水のレンズにある淡海水の位置に移行する、あるいは「飲み水」システムを構築して、標準海洋網生簀にある十分な強度の海水のかわりに、マスに淡水を提供する

。浸透性適応期間を延長した後、ついでマスをその成長サイクルを完了するためにより標準的な海洋網生簀の位置に移行する。一般に、マスは約70～90または90～120 グラムの体重まで成長させるためにこれらの海洋の位置に移される。

【 0 1 0 6 】

【表 6】

表 6：種々の処理後の海水中でのニジマス（3～5グラム）の生存の比較

魚の生存率 ¹				
海水移行後の 時間	対照の 淡水	14日の一定の 光周期	14日の一定の 光周期 APSプロセス	23日の一定の 光周期＋ APSプロセス
0	100	100	100	100
24	0	25	80	99
48		0	70	81
72			40	68
96			30	58
120			30	46
実験あたりの 魚の数	10	20	30	80

¹ 生存率はおおよそその総数で示す。

【 0 1 0 7 】

1 歳未満の魚の一つのプールから全部で140 のマスをグループ分けし、以下に記載する実験を継続している間、水温9 ～13 、pH7.8 ～8.3 に保持された。対照の淡水のニジマスは海水中に直接移されると、24時間以内の死亡率が100 %である（対照の淡水）。マスを14日間一定の光周期に曝すと、海水への移行後の生存率がわずかに改善される。これに対して、マスを14日間か23日間のいずれかでAPS プロセスI に曝すと、海水への移行後の死亡率が有意に減少し、それぞれ、30%および46%の魚が海水中での5日間後に生存していた。これらのデータは、APS プロセスI の適用は、現在の産業標準技術により生産された標準的な「臨界サイズ」のマスのサイズの7 %未満である成魚前のマスの生存を増加させることを示す。

【 0 1 0 8 】

産業標準の「臨界サイズ」のスモルトよりも小さいカナダ産イワナの成魚前の魚へのAPS プロセスI の応用

【 0 1 0 9 】

カナダ産イワナは、サケ科の、溯上性の魚であるが、その海水移行への耐性は、サケやマスのいずれかと比べても、はるかに少ない。図9は、より小さなイワナ（3～5グラム）が全部で14日間と30日間APS プロセスI に曝露された結果を示す。図9に示される全ての魚は、連続的な光周期に曝露された。淡水から海水へのイワナの直接の移行により、24時間以内に全ての魚が死んだ。これに対して、14日間および30日間APS プロセスI でイワナ

を処理することにより、生存率の増大を生じ、それぞれ33% (3/9) または73% (22/30) が3日間曝露後まだ生存している。これらのデータは、APS プロセスIへ曝露し、次いで海水へ移行した後の、産業標準法により規定される場合の臨界サイズの10%未満であるカナダ産イワナの生存率の増大を示す。

【0110】

図9は、種々の処理後のカナダ産イワナの生存率の比較を示す。1群のカナダ産イワナ(3~5グラムはピールス(Pierce)孵化場(Buxton, ME)から得られた)は、淡水で維持または海水への移行前にAPS プロセスIで処理された。

【0111】

セクションII: 10~30グラムのスモルトの海水網生簀およびタンクへの移し替え(transfer)を成功させるAPS プロセスIIの利用

APS プロセスIIは、成魚以前の遡河魚を、平均サイズ25~30グラム以下の段階で海水に移すために、処理することに利用される。この方法は、成魚以前の遡河魚を海水に移す前の飼料にL-トリプトファンを含めたことが、APS プロセスIと異なる。APS プロセスIIは、成魚以前の遡河魚の浸透調節能をさらに改善し、タイセイヨウサケのスモルトの移し替えのための「臨界サイズ」をさらに小さくすることができる。要するに、APS プロセスIIは、海水の移し替えの成功のための「臨界サイズ」を現在の工業標準S0スモルトのサイズの1/5未満まで小さくすることができる。

【0112】

APS プロセスIIのタイセイヨウサケ幼魚への適用

2000年1月ふ化した卵から生まれた、平均体重0.8グラムのSt John / St John 系統成魚前幼魚を、2000年4月27日にKennebec MaineのAtlantic Salmon of Maine Inc. Kennebec ふ化場から購入した。これらの魚を標準的な通常のトラック輸送によって処理施設へ輸送した。到着後、これらの稚魚サケは、まず、水温9.6℃、標準淡水稚魚サケ用飼料(Moore Clark Feeds)等の淡水維持条件下で通常の流水中で維持した。2000年7月17日に、幼魚に対して、連続明期に曝露させながら、合計49日間のAPS プロセスIIを開始した。つぎに、APS プロセスIIスモルトを、APS プロセスII処理の第28日(2000年8月14日)に、Lipogen Forte 製品(Aquahealth Ltd.)で予防接種した。APS プロセスIIスモルトは、APS プロセスII開始前と海水への移し替え直前にサイズ分けをした。St John / St John 系統APS プロセスIIスモルトは、通常のトラック輸送で海洋網生簀に輸送し、APS プロセスIスモルトの配置について述べたものと同じ単独の海洋網生簀の中の海水(15.2℃)中へ、または、研究施設内の実験室タンク(15.6℃)の中に配置した。

【0113】

図10は、海洋網生簀または対応する実験室海水タンクへ移し替えた代表的なSt John / St John系統APS プロセスIIスモルトの身体サイズの範囲である。これらのAPS プロセスIIスモルトが、平均体重11.5グラムを含む広範囲の体重(3.95~28グラム)を有することに注目のこと。図10は、St John / St John APS プロセスIIスモルトの特性を示す。これらのSt. John / St. John系統APS プロセスIIスモルトの平均測定値は、体重が11.50 ± 5.6グラム、体長が9.6 ± 1.5cm、条件ファクターは1.19 ± 0.09であった。表8に示したデータは、実験室タンクまたは海洋網生簀に、海水への移し替え後の、単一生産プール由来のAPS プロセスIIスモルトの2群についての成果である。水温や海水への移し替えの場所への移送等の重要な変数は同一であったが、APS プロセスIIスモルトのこれらの2群は、海水への移し替え5日後の死亡率が実験室タンクに移した場合(死亡率10%)と海洋網生簀に移した場合(死亡率37.7%)と異なった。

【0114】

海水実験室タンク(死亡率10%)と海洋網生簀(死亡率37.7%)との間のこの死亡率の違いについての有望な説明は、海水への移し替え後の異なる明期管理への曝露であろう。実施例10に詳述されるように、幼魚タイセイヨウサケを海水への移し替え後、連続明期に曝露すると、海水への移し替え後の死亡率が約34%から6%まで低下した。海洋網生簀に移した魚は連続的でない自然の明期に曝露されたため、死亡率が約4倍となった。表7に示

10

20

30

40

50

されるように、平均体重が21グラムの幼魚St John / St John 系統タイセイヨウサケを別に海水に移したとき、APS プロセスIIと水面下照明とにより6 週間処理後の死亡率は、わずか0.2 %であった。これらの魚は、30日間水面下ハロゲン照明によって連続明期に曝露された。

【 0 1 1 5 】

【表 7】

表 7：水面下照明を含む海洋網生簀での海水への移し替え後の APS St.John/St.John APS プロセス II 魚の特徴づけ及び生存

全魚	15,000
海水への移し替え日	8/9/01
水温(°C)	12.6
移し替え時のサイズ(グラム)	21+/-4.5
30日後の全死亡率(#及び全%)	250 1.7%
15グラム以上の体重の死亡率%	30 0.2%
移し替え後、給餌を行う時間	48 時間

10

20

【 0 1 1 6 】

【表 8】

表 8：研究室タンク又は海洋網生簀のいずれかでの海水への移し替え後の APS St. John/St. John APS プロセス II 魚の特徴づけ及び生存

	実験タンク	海洋網生簀
全魚	100	1,316
海水への移し替え日	8/31/00	9/5/00
水温(°C)	15.6	15.6
移し替え時のサイズ(グラム)	11.5	11.5
5日後の全死亡率(#及び全%)	10; 10%	496; 37.7%
13グラム以上の体重の死亡率%	0; 0%	1; 0.08%
移し替え後、給餌を行う時間	48 時間	48 時間

30

【 0 1 1 7 】

海洋網生簀の範囲内の条件に存在する条件と折り合う、より小型の(10~30グラム)APS プロセスIIスモルトについては明白な問題は観察されなかった。これは、自由に群れを成して泳ぐ能力や、商業用のBlue Hill Bay サケ養殖場に絶えず存在するかなりの海洋水流に通常は対向して泳ぐ能力等の明白な問題がないということも含まれた。これらの観察は、なお進行中であるが、これらのデータは、これらの成魚前の遡河魚が、存在する海洋の水流に対向して泳ぐ能力がなく、したがって適正な摂餌や成長ができないため、海洋網生簀にAPS プロセスIIスモルトを入れその後成長させることを意味しているであろうということをおうとしているわけではない。

40

【 0 1 1 8 】

図 11 は、実験室タンク(図 11A)または海洋網生簀(図 11B)中の海水への移し替え後のAPS プロセスIIスモルトと死亡魚の特徴を比較したものである。図 11Aデータは、海水

50

タンクに移し替え、第5日にすべての魚を殺し、分析した100匹のAPS プロセスIIスマルトの解析から得られたものである。これに対して、図 11Bは、海洋網生簀の死亡率データのみを示す。どちらの場合も、比較的小さなAPS プロセスIIスマルトが死亡した。図 11A-BのY軸目盛りの違いに注目のこと。

【0119】

海水への移し替え後生存したAPS プロセスIIスマルトと死亡したAPS プロセスIIスマルトの平均体サイズを比較すると、不成功であったAPS プロセスIIスマルトは、APS プロセスIIスマルト移し替え群全体の平均体サイズと比べて、体重が有意に小さかった。すなわち、実験室タンクにおける死亡魚の平均体重 (5.10 ± 2.2 グラム) と海洋網生簀における死亡魚の平均体重 (6.46 ± 1.5 グラム) は、移し替えコホート全体の平均体重 (11.5グラム) のそれぞれ44%および56%である。これに対して、体重が13グラムを超えるAPS プロセスIIスマルトの死亡率は、実験室タンクでは0/100、海洋網生簀については1/1316 すなわち0.076%である。これらのデータを総合すると、APSプロセスII処理はタイセイヨウサケスマルトの「臨界サイズ」を70~100 グラムから約13グラムへと定義しなおすことができる。

10

【0120】

ニジマスに対するAPS プロセスIIの適用

いくつかの要因がマスの養殖の発展を妨げている。そのような要因としては、マスの幼魚が、タイセイヨウサケの幼魚に比べて、淡水から海水への突然の移し替えに対する抵抗性をはるかに低いという事実が挙げられる。その結果、多くの商業的海水マス生産者は、維持しているマスを、河口水域にある塩気のある水の養魚場または淡水レンズに移すか、あるいは、標準的な海洋網生簀に存在する全強度海水の代わりに、淡水をマスに提供するような「飲用水」システムを備える。長期の浸透圧適応期間の後、マスをより標準的な海洋網生簀養魚場に移して、その十分な成長のサイクルを完了させる。一般に、マスは、十分成長させるためには、体重が約70~90または90~120 グラムのときこれらの海洋養魚場への移し替えを行う。

20

【0121】

平均体重が18グラムの2000匹のDonaldson 系統マスを地域の商業用ふ化場 (Pine Tree Trout Farm、Sanford、Maine、米国) から入手した。これは1999年12月にふ化したもので、淡水から、連続明期に曝露しつつ11~12 でのAPS プロセスIIへ移した。APS プロセスII処理の合計継続期間は35日 (2000年6月21日~7月26日) であった。Lipogen Forte (Aquahealth社) による予防接種後、マスを、タイセイヨウサケについて上に述べた標準的移し替え法によって、15.6 の全強度海水を含む研究用網生簀に直接移した。マスAPS プロセスII群全体の平均体重は、表9 に示したように、22.7グラムであった。

30

【0122】

タイセイヨウサケについて述べたのと同じ方法で行った死亡魚の計数によると、最初の5日間に合計513/1190匹即ち43.1%の死亡率であった。これらの死亡魚の平均体重は、図 12 に示されるように、 15.5 ± 1.5 グラムであった。タイセイヨウサケAPS プロセスIとプロセスIIスマルトが示したのと同様に、より小型のAPS プロセスIIスマルトが死亡し、より大型の魚はほとんどまたは全く死亡しなかった。このように、死亡魚の平均体重は15.5グラム、即ち海水に移したマス全体の数値の68.3%であった。全強度海水に入れてから48時間目に湿った飼料を与え、マスの摂餌を観察した。

40

【0123】

【表9】

表 9：APS 海洋網生簀での全強度海水への直接移し替え後のドナルドソンニジマス APS
プロセス II 魚の特徴づけ及び生存

全魚	1,190
海水移し替え日	7/25/00
水温(°C)	22.7 グラム
移し替え時のサイズ(グラム)	513; 43.1%
30日後の全死亡率(#及び全%)	15.5±1.52
15グラム以上の体重の死亡率%	29.35±8.3
移し替え後、給餌を行う時間	48 時間

10

【 0 1 2 4 】

図 12 は、海洋網生簀へ移した後の最初の5 日間におけるマスAPS プロセスII スモルトの死亡魚の体重および体長の分布を示す。これらの515 匹の死亡魚の平均体重は 15.5 ± 1.5 グラムであることに注目のこと。

【 0 1 2 5 】

20

まとめると、これらのデータは、本発明の利点はタイセイヨウサケに限定されるのではなく、ニジマスを用いた場合も認められることを証明している。APS プロセスII スモルト工程の適用によって、直接的な海水への移し替えのためのニジマスの「臨界サイズ」が約30 グラムまで有意に低下した。さらに、この適用によって、淡水へニジマスを移すことの必要性をなくしている。このように、APS プロセスII の適用は、ニジマスの全強度の海水への移し替えに利用することができる養魚場の数が大いに増える。

【 0 1 2 6 】

海水への移し替え後のAPS プロセスI およびプロセスII スモルトの摂餌および成長の測定 Landcatch / St John APS プロセスI スモルトに、実験室タンク中または海洋網生簀中の海水への移し替えの48時間後から飼料給餌を開始した。実験室タンクに移したAPS プロセスI スモルトは、48時間後に摂餌を開始したが、海洋網生簀に移した魚は7 日後まで実質的な摂餌は観察されなかった。これらの観察を検証するために、本発明者らは、実験室タンク中、海水への移し替えの4 日後のAPS プロセスI スモルト49匹の代表的な試料から得た腸内容物を直接視覚的に調べた。21 / 49匹、即ち42.9%にその時点でその腸内容物内に飼料の存在が認められた。

30

【 0 1 2 7 】

St John / St John APS プロセスII スモルトは、実験室タンクに収容するか海洋網生簀に収容するかに関係なく、海水への移し替えの48時間後に初めて飼料を給餌したとき活発に摂餌した。上記と同じようにAPS プロセスII スモルト腸内容物の直接分析は、61 / 83匹即ち73.5%の魚が海水への移し替えの4 日後に摂餌したことを示した。海洋網生簀内でも、実験室タンク内と同様に、APS プロセスII スモルトの活発な摂餌行動が認められた。総合的に考えると、これらのデータは、APS プロセスI およびII スモルトが、このプロセスにより処理されてない、よりはるかに大型の工業標準タイセイヨウサケスモルトについて認められるような、海水への移し替え後ほとんど摂餌をしない長い期間(20~40日)はないと考えられる。

40

【 0 1 2 8 】

APS は、実験室海水タンク内でAPS プロセスI またはプロセスII で処理した同一の魚の成長速度を定量した。表10に示されるように、APS プロセスI またはプロセスII で処理した両方のタイセイヨウサケは、海水への移し替え後、最初の期間(21日間)は、急速に成長する。海水への移し替え後、最初の20~30日間は、ほとんど摂餌せず、それゆえ成長しな

50

い体重70～100 グラムの工業標準スマルトに比べて、APS プロセスⅠまたはプロセスⅡ処理をした成魚前のタイセイヨウサケは、工業標準スマルトの臨界サイズのわずか27～38%（APS プロセスⅠ）および12～16%（APS プロセスⅡ）に過ぎないにもかかわらず、どちらも実質的な体重増と成長とを示した。今のところ157 日まで延長している期間中の上記のほか合計4 つの期間について、これらの魚の死亡率、SGR、温度補正SGR（GF3）、FCR、体重、体長、条件ファクターに関するデータを得た。この追加データを実施例12に示す。

【0129】

【表10】

10

表10：APS プロセスⅠ又はAPS プロセスⅡに曝した成魚前タイセイヨウサケと海水への移し替え後最初の期間、研究室タンクにおいた成魚前タイセイヨウサケとの間の成長速度の比較

	APS プロセスⅠ	APS プロセスⅡ
魚数	140	437
海水への移し替えの体重	26.6	11.50
海水における日数	22	21
死亡率に対して補正した移し替え体重	26.6*	13.15*
海水中の期間後の体重	30.3	15.2
海水中での獲得体重	3.75	2.05
SGR(%体重/日)	0.60	0.68
FCR	1.27	2.04

20

*より小さい魚において、選択的な死亡率に対して補正された獲得体重(4/140、すなわち

2.9% APS プロセスⅠ; 103/437、すなわち 23.6% APS プロセスⅡ)

【0130】

実施例3 . Ca²⁺およびMg²⁺へのサケスマルトの曝露は、特定の組織のPVCRの発現を増加する。

30

10mMのCa²⁺および5.2mM のMg²⁺に曝露したスマルトでは、PVCRの発現が、処理せずに直接海水に移し替えたスマルトと同様に、増加することが認められた。

【0131】

MS222 により動物を麻酔後、タイセイヨウサケまたはニジマスから組織を採取した。組織試料は切開によって採取し、3 %パラホルムアルデヒドに浸漬して固定し、リンゲル液で洗浄し、ついで、ドライアイス上、冷却したメチルブタンを用いてO.C.T.TM (Miles Inc.、Elkhardt、Indiana、米国)等の包埋剤中凍結した。クライオスタットで厚さ8 ミクロンの組織切片を作成(cut)後、個々の切片を様々な染色プロトコールに供した。簡単に述べると、ガラススライドにマウントした切片を、1)ヤギ血清または同一種の魚から得た血清でブロックし、2)ウサギ抗CaR 抗血清とともにインキュベートし、3)洗浄し、パーオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ抗血清とともにインキュベートした。結合したパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ抗血清の位置を、バラ色のアミノエチルカルバゾール反応生成物の発生で視覚化した。個々の切片を標準的な光学顕微鏡法によってマウントし、観察し、撮影した。抗PVCR抗血清の作成方法は下記のとおりである。

40

【0132】

その結果を、抗PVCR抗血清を用いたタイセイヨウサケスマルトの近位腸上皮の免疫細胞化学を示す顕微鏡写真7 枚からなる一組であるFig. 13A - 13G 並びにCa²⁺およびMg²⁺処理淡水に曝露後、海水に移したサケスマルトの腸のウエスタンブロットであるFig. 14 に示す。抗血清は、ツノザメPVCRのカルボキシル末端ドメインによってコードされたタンパク質

50

配列を含む16-merペプチド（「SKCaR」）でウサギを免疫処置して作成した（Nearing, Jら、1997、J. Am. Soc. Nephrol. 8:40A）。抗PVCR抗体の特異的結合は、アミノエチルカルバゾール（AEC）反応生成物によって示される。

【0133】

図13A および13B は、淡水で維持し、ついで、海水に移し、3日間経たスモルトの腸上皮を染色したものである。多量のPVCR免疫染色が、腸腔表面の内壁にある細胞にはっきりと認められる。Fig. 13Bに示される高倍率（1440×）写真は、腸上皮細胞の頂端の（腔に面した）膜にPVCRタンパク質が局在していることを示す。PVCR染色パターンは、頂端の上皮細胞膜（小さな矢尻）および球状細胞の膜（矢印）に局在する。図13C は、APS プロセスI 処理し、10mM Ca^{2+} と5.2mM Mg^{2+} とを含有する淡水に50日間入れた代表的な1匹のスモルトから得た腸上皮を染色したものである。前記PVCR染色パターンが、頂端膜染色（小さな矢尻）および球状細胞（矢印）を含む図13Aおよび13Bの上皮細胞のパターンと似ていることに注目すること。図13D は、APS プロセスI 処理し、10mM Ca^{2+} および5.2mM Mg^{2+} を含む淡水中50日間維持し飼料中1%のNaClを与えた別の代表的な魚から得た腸上皮をPVCR染色したものの1900×倍率写真である。やはり小さな矢尻と矢印とはそれぞれ頂端膜と球状細胞のPVCR染色を表す。図13A - D に示される顕著なPVCR染色とは対照的に、図13E（1440×）および13F（1900×）は、 Ca^{2+} および Mg^{2+} または飼料中NaClを補充せずに淡水のみで維持した2匹から得た腸上皮の染色である。13E および13Fの両方が有意なPVCR染色を著しく欠如することを示す。図13G（1440×）は、抗PVCR抗血清がPVCRタンパク質を識別した図13Aに示されるものに対応する切片上に免疫前の血清を置換すると、いかなる明白なPVCR染色をも欠如することを示す。PVCR染色の欠如は、抗PVCR抗血清のこれらの免疫細胞化学条件下の特異性を証明する対照である。

【0134】

淡水スモルトの腸上皮細胞に存在するPVCRタンパク質の相対的量（図13E および13F）は、選ばれた腸上皮細胞のかすかな染色により示されるように、無視できるものであった。これに対して、これらのスモルトを海水に移すと、対応する腸上皮細胞のPVCRタンパク質含量は有意に増加した（図13A および13B）。重要なことに、PVCRタンパク質含量は、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を補充した淡水中で維持したスモルトの腸上皮細胞でも有意に増加した（図13C および13D）。免疫抗血清を免疫前のものに置き換えると、腸上皮細胞切片からすべての反応生成物が消えた（図13G）ため、AEC 染色は抗PVCR抗血清の存在に特異的であった。

【0135】

パラフィン切片を用いたタイセイヨウサケの浸透調節臓器のその他の部分におけるPVCRタンパク質の局在の開示。PVCRタンパク質が腸上皮細胞の頂端膜と側底膜の両者に局在していることの証明。

本明細書に記載される方法を用いて、海水に適応させた幼魚タイセイヨウサケスモルトの様々な浸透調節臓器のパラフィン切片の免疫局在データを得た。PVCRタンパク質は、特異的抗PVCR抗体の結合で測定したところ、次の臓器に存在した。これらの臓器は、様々な浸透調節機能に重要である。これらの臓器としては、尿の処理に応答しうる特別な尿細管および膀胱、一つ一つが魚を取り巻く水に浸っている皮膚、鼻ラメラおよび鰓の選ばれた細胞等である。PVCRは、魚が摂取した海水を処理する胃、幽門盲腸、近位腸、遠位腸等の消化管の様々な部分にも見られた。これらの組織を、APS プロセスによる処理後と、淡水から海水への移し替え後に分析した。さらに、PVCRタンパク質には、胃、近位腸、幽門盲腸に存在すると報告されている様々なアミノ酸に対する栄養素受容体としての働きもあると考えられている。

【0136】

とくに、胃、近位腸および幽門盲腸の選ばれた細胞におけるPVCR免疫局在の高倍率像が得られた。PVCRタンパク質は、胃の陰窩の基底に局在する胃上皮細胞の頂端（腔に面した）膜と基底外側の（血管に面した）膜の両者に存在するだけでなく、胃の粘膜下部分に存在する神経内分泌細胞にも存在する。消化管の神経内分泌細胞上のその位置から、PVCRタン

パク質は、腸上皮細胞にごく近接した局所的環境を感知して、重要な消化管ホルモン（例えば、5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT）、セロトニン、コレシストキニン（CCK））の分泌と合成を調節することができる。重要なことに、APS プロセスIIの成分が少なくとも2つの手段で消化管神経内分泌細胞に影響すると考えられている。APS プロセスIIの成分が消化管内分泌系を改造する1つのやり方は、これらの細胞によって発現されるPVCRの発現および/または感受性の改変を介することである。もう一つのやり方は、例えば、消化管代謝酵素によって5-HTおよびセロトニンに変換されるトリプトファンのような先駆化合物を大量に供給することである。

【0137】

同様に、PVCRタンパク質は、近位腸の内壁の上皮細胞の頂端膜と基底外側の膜の両者に局在している。それぞれの位置から、PVCRタンパク質は、二価陽イオン、NaCl、特異的なアミノ酸の管腔内含量も血液内含量も感知することができ、それにより、腸上皮細胞の多様な栄養素およびイオン吸収・分泌機能を統合することができる。幽門盲腸の上皮細胞も豊富な頂端PVCRタンパク質を持っている。

【0138】

抗CaR 抗血清がサケスモルトPVCRを認識する特異性をさらに示すために、Fig.14は、10mMのCa²⁺、5mMのMg²⁺中で維持し、飼料中1%NaClを与えたサケスモルトから得た腸タンパク質のウエスタンブロットを示す。近位および遠位腸の部分をSDS含有緩衝液中でホモジナイズし溶解し、標準技術を用いてSDS-PAGEに供し、ニトロセルロースに転写し、タンパク質定量法（Pierce Chem.Co.、Rocford、IL）とCoomassie Blue染色との両方で測定した同量のホモジネートタンパク質について、標準ウエスタンブロットング技術によってPVCRの存在を検索した。その結果、「CaR」と表示して左列に示され、約140～160kDaのブロードなバンドといくつかのより高分子量の複合体を示す。このPVCRバンドパターンは、サメ腎臓（Nearing,Jら、1997、J.Am.Soc.Nephrol.8:40A）とラット腎臓内髄集合管（Sands,J.M.ら、1997、J.Clin.Invest.99:1399-1405）について以前報告されたものと類似している。右列はFig. 13Gに使用した免疫前の抗PVCR血清で処理されたものであり、バンドの完全な欠如を示す。図13に示される免疫細胞化学データを考慮すると、この免疫ブロットは使用した抗血清がサケのPVCRタンパク質の検出に特異的であることが証明される。

【0139】

実施例4 . Ca²⁺およびMg²⁺へのマス幼魚の曝露は、PVCRの発現を増加させる。鰓、腎臓、腸組織の上皮細胞における特異的なイオン輸送能の発達は、成魚前の魚にとって海水への移し替え後、生存するために重要である。PVCR発現の変化が海水中のマス幼魚の生存率の増加に関係があるかどうか判定するために、免疫ブロットングおよび免疫細胞化学を、サケスモルト組織に実施した時と同様に、マス幼魚から得た試料について行った。その結果を図15、16および19に示した。

【0140】

図15は、マス幼魚の腸組織の免疫ブロットである。抗CaR 抗血清は、免疫（CaRと表示した列）と免疫前（免疫前と表示した列）との比較から決定されるように、PVCR染色に特異的な多数のバンドを識別する。これらのバンドのうち顕著なものは、120～160kDaのブロードなバンドと、腸および鰓の両者の組織のバンドの上方に認められるより大きな分子量の複合体である。

【0141】

図16A、16B、16C、16D、16E、16F、16Gおよび16Hは、抗PVCR抗血清を用いたニジマス近位腸上皮の免疫細胞化学を示した顕微鏡写真8枚のセットである。図16A、16Cおよび16Eは、淡水のみで維持したマスの試料を示し、図16B、16D、16F、16Gおよび16Hは、10mM Ca²⁺、5.2mM Mg²⁺を補充した淡水中で維持し、1% NaCl 飼料を給餌したマスの試料を示す。近位腸断片は、Fig. 16A - 16D、16G - 16Hに、遠位腸断片をFig. 16E - 16Fに示す。図16A - 16Fは、免疫ウサギ抗CaR 抗血清で処理し、洗浄し、アミノエチルカルバゾール（AEC）反応を用いてセイヨウワサビのパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ

抗血清で発色させたものである。図16A、16C および16E は、PVCR染色がほとんどまたは全く無いが、図16B、16D および16F は、腸管腔内壁の細胞の頂端膜（小さな矢尻）および比較的大きな球状細胞（矢印）に存在する有意なPVCR染色を示す。免疫抗PVCR抗血清に曝露した切片とは対照的に、図16H は、免疫前ウサギ抗CaR 抗血清で処理し、そのため、着色したAEC 反応生成物を含まない。これらのデータは、この方法が抗PVCR抗血清に結合したPVCRタンパク質を特異的に検出することを示す。図16G は、腸内に存在するムチン産生上皮細胞の局在決定を行うために、Alcian blue（Sheehan,D.C.ら、1980、Theory and Practice of Histochemistry（組織化学の理論と実際）、Battelle PreSSColumbus、Ohio、米国）で直接染色したものである。図13D におけるPVCRタンパク質に対する細胞染色（小さな矢印で示した）の外見が、図13G において、Alcian blue で染色した細胞と同様な形態学的外見を示していることに注目のこと。これらのデータは、PVCRシグナル化作用が腸内のムチン産生を調節する場所である腸内のムチン産生細胞によってPVCRが発現され

10

【0142】

腸組織の免疫細胞化学によって、PVCRタンパク質の含量は、Ca²⁺およびMg²⁺を補充した淡水で維持しNaCl補充飼料を与えた場合（図16B、16D および16F）に対して、淡水のみで維持したマス（図16A、16C および16E）では異なることを示す。通常、淡水では、PVCR発現は近位腸切片（図15A および16C）または遠位腸切片（図16E）のいずれでも低い。しかし、10mM Ca²⁺ および5.2mM Mg²⁺を補充した淡水に曝露しNaCl補充飼料を与えると、近位（図16B および15D）および遠位断片（図15F）の両方でPVCR発現は有意に増加する。

20

【0143】

PVCRタンパク質は多数の細胞のいくつかの領域に局在しているが、ときどき球状細胞（大きな矢尻）と同様に、腸上皮細胞（小さな矢尻）の頂端膜上に強い染色が認められることは、ツノザメ（Nearing,J.ら、1997、J.Am.Soc.Nephrol.8:40A）やラット腎臓内髓集合管（IMCD）（Sands,J.M.ら、1997、J.Clin.Invest.99:1399 ~1405）の両方でPVCRタンパク質が局在するデータと同じである。タイセイヨウサケスモルトについて上述したように、マス腸の頂端PVCRは、管腔Ca²⁺およびMg²⁺濃度の増加によって誘導され、これによって腸内容物からのNaCl仲介による水の回収を制御している。この回収は、皮膚と鰓とを介して起こる浸透圧による水損失を元に戻すため、海洋魚の生存に重要である（Evans,D.H.、1993、D.H.Evans 編集The Physiology of Fishes（魚類の生理学）中「Osmotic and Ionic Regulation（浸透圧とイオンの制御）」、CRC Press、BoCaRaton、Florida、米国、第11章、315 ~341 頁）。

30

【0144】

より大きな腸上皮細胞の合間に散在している球状細胞の抗PVCR染色（Fig. 16D）は、Alcian Blue で強く染まることが知られているムチン産生細胞に対応する細胞とも一致する（Sheehan,D.C.ら、1980、Theory and Practice of Histochemistry（組織化学の理論と実際）、Battelle PreSSColumbus、Ohio、米国）（Fig. 16G）。

【0145】

図17 は、図13 - 15に記載したのと同じ抗PVCR抗血清を用いて、マスの鰓組織から調製したタンパク質ホモジネートのPVCR含量の全体レベルを比較する代表的な免疫プロットを示す。鰓組織の切除とホモジネート化前に、淡水、または10mMカルシウムと5.2mM マグネシウムを含む淡水と飼料中NaCl補充、または飼料中NaCl補充のみの淡水の3種類のいずれかでマスを処理した。鰓では、抗PVCR抗血清によって、やはり120 ~140kDaのブロードなバンドと、大きな分子（200kDaを超える）のバンドが識別され、これは図14 および15に示したものと類似している。これらのデータは、ラット（Sands,J.M.ら、1997、J.Clin.Invest.99:1399 ~1405）、カレイ、サメ（Nearing,J.ら、1997、J.Am.Soc.Nephrol.8:40A）等の複数の生物の免疫プロット分析で観察されたものと似た、構造が既知のCaR の分子と一致している。マスを淡水中維持した場合（freshwater）、PVCR反応性バンドで判定した鰓中PVCR発現は中程度であった。マスをAPS プロセスI 処理した場合（Ca、Mg

40

50

+ NaCl supPL.Feed) は、中央列に示したように、PVCRタンパク質量が増加した (Ca、Mg)。これに対して、マスを淡水中カルシウムおよびマグネシウムに曝露することなく淡水中で維持しNaCl飼料を与えた場合は、全体的なPVCR染色強度に変化はないが、むしろPVCR反応性が120kDaから、より大きな200kDaの高分子バンドへシフトする (saltと表示した列)。これらのデータは、マスをAPS プロセスI (10mMカルシウムと5mM マグネシウムとを含有した淡水、飼料中NaCl補充) 処理すると、淡水のみの場合と比べて、鰓におけるPVCR発現が増加することを証明している。マスを淡水中維持しながらNaCl補充飼料を給餌した場合は、PVCRタンパク質の同様な発現増加は見られない。

【0146】

実施例21に示されるデータは、鰓塩類細胞上に存在するPVCRタンパク質がAPS プロセスIIによる魚の処理にตอบสนองし、塩類細胞の分布とNa+K+ATPアーゼ活性の両者を、魚を海水に移した後のプロセスと非常に似た様式で、改造することを示す。APS プロセスIIによる遡河魚のこの処置によって、タイセイヨウサケ幼魚を海水に移した後の適応がより迅速になり、動作や成長が改善される。

【0147】

実施例5 : サケの表皮粘液細胞および脳における多価陽イオン受容体 (PVCR) の免疫学的局在決定

サケ科の魚の皮膚表面は、その魚が淡水にいるか海水にいるかによって水分が増減するのを防ぐためのバリアとして極めて重要である。したがって、魚の表皮層の特別な細胞中のPVCRタンパク質の存在は、それまでに流れた環境水の塩度を「感知」し、サケ科の魚の皮膚をそれが存在する水の組成に基づいて絶えず改造する機会に備えることができるであろう。

【0148】

方法：海水中に12日間以上いたタイセイヨウサケ幼魚から採取した皮膚の試料を、緩衝液 (0.1M NaPO₄、0.1.5m NaCl、0.3Mショ糖、pH7.4) に溶解した3%パラホルムアルデヒド中で固定し、手作業でうろこを取り、緩衝液ですすぎ、凍結切片のために、-80 で凍結した。10ミクロン切片は、抗サメPVCR抗血清を用いるPVCR免疫学的局在決定に使用するか、または粘液の酸性糖タンパク質成分を含有する細胞を局在化するために1% Alcian Blue 色素で直接染色した。

【0149】

結果および考察：図 18Aは、サケ表皮が、様々な皮膚層に存在する多数のAlcian Blue 染色細胞を含むことを示す。一部のより大きな細胞 (酸性ムチンを含む) の一部だけがAlcian Blue で染色されることに注目のこと (白矢尻で表示)。うろこは取り去ってあるので、方向を知る手がかりとして、星印はそれまで海水に浸っていた表面を表していることに注目のこと。図 18Bはこの皮膚の表皮層内の多数の細胞 (矢尻で示される) に局在するサケ皮膚PVCRタンパク質の免疫学的局在決定を示す。抗PVCR染色が、図 18Aに示したように、Alcian Blue で染色される対応の頂端部分よりも大きな細胞体全体を示していることに注目のこと。結合した抗CaR 抗体の存在は、バラ色反応生成物によって示される。これらの切片について正式な定量はまだ行われていないが、PVCR細胞の数は、Alcian Blue 陽性細胞の総数より少ないようである。これらのデータは、Alcian Blue 陽性細胞のサブセットのみが豊富なPVCRタンパク質を含むことを示す。図 18 の図 18Cは、一次抗CaR 抗血清を染色反応から除外した対照免疫前切片を示す。一次抗体がなければバラ色の反応生成物はないことに注目のこと。

【0150】

これらのデータは、タイセイヨウサケ幼魚の表皮に局在する個々別々の上皮細胞 (おそらく粘液細胞) にPVCRタンパク質が存在することを示す。この位置から、PVCRタンパク質は、環境水の塩度を「感知」して、皮膚自体の中での粘液分泌の変化や粘液細胞の増殖を介して粘液産生を調節できると考えられる。環境水中に存在するPVCRアゴニスト (Ca²⁺、Mg²⁺) は、スモルトが本発明のプロセスに曝露されている期間中、これらの表皮PVCRタンパク質を活性化する。本発明のプロセスによるタイセイヨウサケスモルトのこの処理は、ス

モルトを海水に移した後のその生存率増加に重要である。

【 0 1 5 1 】

実施例6：タイセイヨウサケの脳におけるPVCRタンパク質の局在決定：

PVCRタンパク質は、免疫細胞化学と、サメPVCRのカルボキシル末端に見られるペプチド配列に対して作られた抗体を用いて、タイセイヨウサケの脳幹部に特異的に局在決定することができる。これらのデータは、内分泌機能の調節におけるPVCRの役割およびタイセイヨウサケにおける食欲制御と一致する。

【 0 1 5 2 】

カルシウム受容体の発現が哺乳動物の脳の特殊な部分に局在することはすでに判明している。哺乳動物の脳の多くの部分における哺乳動物CaRの正確な機能はまだ不明であるが、いくつかの証拠によると、CaRは、全身のカルシウム、ナトリウム、水の代謝の変化を、視床下部からのアドレノコルチコトロピン（ACTH）等のホルモンの分泌の差や、渇きや摂食の制御等の行動変化等の脳機能の調節と統合することができる。以下に詳述される開示知見で重要なことは、淡水から海水へ移る遡河魚の内分泌機能や飲水、摂食の変化に果たすPVCR（CaR）の役割が重要であることである。

【 0 1 5 3 】

哺乳動物の脳では、脳弓下器官、すなわちSFOに顕著なCaR発現がある。SFOは、中心的な視床下部の渇き感知中枢であり、体内カルシウムおよび水のホメオスタシスを統合するために飲水活動を調節する役割があると考えられている。SFOに存在するCaRの刺激による全身過カルシウム血により飲水行動を刺激すると、腎臓ろ過水の尿細管再吸収を鈍化させる腎臓機能の変化によって起こる脱水を最小限に抑えられると考えられる。魚の脳の同等SFO部分は今のところ見つからない。

【 0 1 5 4 】

哺乳動物の脳では、脳幹の脳橋部分に、とくに第三脳室近くの最後野周囲に、CaR発現が見られる。最後野は、食欲を仲介すると考えられるニューロンの集まりであることが知られており、「吐気中枢」と呼ばれている。哺乳動物の脳のこの部分から出るニューロン経路が、前庭機能（平衡の感知）からの感覚入力や視神経および脳におけるそれぞれの中核からの経路を通る視覚入力の統合に備えている。脳のこの部分は、過カルシウム血やヒトへのアヘン給餌によって起こる吐気に密接に関係していると考えられている。魚の脳の同等の最後野は現在のところ見つからない。

【 0 1 5 5 】

生理学的データと解剖学的データを合わせると、ヒトにおいて血清カルシウム濃度の変化に様々な内分泌機能を統合させるCaRの役割を示す証拠を提供する。血清カルシウム濃度を上昇させるに十分なカルシウムを静注すると、前下垂体によって産生されるACTHと同様に、性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび甲状腺放出ホルモン（TRH）を選択的に増加させる。前下垂体はCaRを発現する視床下部の特異的部分と直接連結していることが知られる。

【 0 1 5 6 】

ヒトの血清中カルシウム濃度の増加は、内分泌機能にも、行動にも、多くの変化を引き起こす。したがって、過カルシウム血は、飲水を増進し、食物消費量を低減させ、特異的な視床下部ホルモンの循環濃度を変化させる。後述するように、類似の行動および循環ホルモン濃度の変化が、スモルト化中や淡水から海水への移し替え中の成魚前の遡河魚に起こる。

【 0 1 5 7 】

方法：

APS プロセスIIに供し海水に移した成魚前タイセイヨウサケ（St. John / St John APS プロセスIIスモルト）から得た脳全体をその周囲組織から切除し、緩衝液〔他の免疫細胞化学の記述と同じもの〕中3 %パラホルムアルデヒド（PFA）で固定した。8 ミクロン切片を作成し、ガラススライドに乗せ、ツノザメの非免疫対照抗血清または抗PVCRを用いて免疫細胞化学のための処理を行った。特異的抗体結合は、セイヨウワサビのパーオキシダー

10

20

30

40

50

ゼ結合ヤギ抗ウサギ二次抗血清の作用で生成したバラ色の反応生成物によって検出した。切片は標準的光学顕微鏡法によって観察し撮影した。

【0158】

結果および考察：

複数の成魚前タイセイヨウサケから得た一連の切片を観察後、サケ脳の少なくとも7つのはっきり区別できる領域に局在する細胞にPVCRタンパク質の局在が一貫して認められた。PVCR局在の最初の領域は、迷走神経葉部分のニューロンの明確な染色である。PVCR染色の第二の部分はCajal 交連核におけるニューロン内である。サケ脳のこれらの領域はどちらも、味覚活動（食物を感知し食する）並びに食道および腸の運動を含む一般的な内臓活動（栄養素および水の再吸収のために食物および腸内容物を処理する）において重要な核であることが知られている。PVCRタンパク質の発現は、血清およびCNSの両者のカルシウム濃度の変化を、遡河魚の海水への適応に重要な摂食と腸内容物の処理の変化に結び付ける。

10

【0159】

サケ脳における三つめのPVCR局在は、PVCRタンパク質が複数の細胞型にわたって分布する血管嚢である。血管嚢はovidであり下葉間の脳の腹側表面上に局在している。この構造物は、高度に血管化されており、髄液と血管空間との間の連結構造を含む。さらに、血管嚢内に存在するニューロンは、視床の上衣下部分に広がる大きな神経突起を持っている。この血管嚢系は、後結節および脳室周囲視床の中樞の機能を調節する。脳のこれらの区域は、下垂体に隣接している。

20

【0160】

成魚前タイセイヨウサケの脳におけるPVCRタンパク質の局在は、哺乳動物の脳について上述したのと同様に、PVCRが遡河魚の中樞神経系における様々な機能に關与するという証拠を提供する。特に、PVCRがタイセイヨウサケの味覚系の一部である核に局在していることは、PVCRタンパク質が、哺乳動物の最後野について述べたのと同様に、食欲を調節するニューロンに発現されることを示す。したがって、本願におけるタイセイヨウサケについて示されたように、血清中のカルシウム、マグネシウム、ナトリウム濃度の変化を介してのPVCRの刺激またはその発現の変化は、食欲と食物消費量とを調節することができるであろう。一方、CSFと血管系との間の交換によるこれらのイオンの髄液中濃度の変化にも關与しうる。現在の工業標準法によって生産されるタイセイヨウサケスマルトは、それを海水に移した後は、深刻な食欲不振の期間を経験するため、このよく知られた食欲抑制は、PVCRシグナル伝達機構によって仲介されうる。

30

【0161】

同様に、PVCRシグナル伝達経路は、飲水行動および下垂体ホルモン分泌のどちらも調節することができる。血管嚢に発現されたPVCRタンパク質は、タイセイヨウサケによる海水の飲水行動の開始に備えることができ、またこれは過カルシウム血によって起こる哺乳動物の飲水行動の増強と全く同じ可能性がある。成魚前の遡河魚を淡水から海水へ移すことによって起こる血清カルシウム、マグネシウムおよびナトリウムの濃度の増加は、ACTHのような視床下部ホルモンの分泌増強にとっても刺激となりうる。ACTHは魚の副腎によるコルチゾル分泌を刺激する。コルチゾルは、イオン輸送活動のモデュレータであることが証明されたホルモンであり、遡河魚における稚魚サケスマルト変成の調節に關与する。血管嚢、視床下部および下垂体間の結合を介する下垂体活動の調節が、これらの内分泌変化を調節しうる。

40

【0162】

松果体の柄、嗅神経、嗅球、下垂体のプロラクチン産生細胞等の幼魚タイセイヨウサケの脳および脳関連構造物のその他の領域において、PVCRタンパク質の局在が認められた。PVCRが局在した脳の上記3部分のほかに、得られた追加データは、遡河魚スマルトの海水中動作の中心的な制御要因であることが知られている少なくとも4つのその他の脳部分または脳関連組織中に、PVCRが発現されることを示した。

【0163】

50

これらの局在から得られたデータは、海水適応した幼魚タイセイヨウサケの大型細胞核、嗅葉および嗅神経に存在するニューロン並びに松果体の柄が大量のPVCRタンパク質を発現することを示す。これに対して、脳のその他の多数の脳核は、検出できるPVCRタンパク質を持っていない。脳の大型細胞核におけるPVCRタンパク質の存在は、おそらく、魚の飲水行動の制御要因としてのこの核の提唱された関与によるのであろう。このように、血清Ca²⁺、Mg²⁺またはNaClの濃度の変化が、PVCRを有するニューロンによって感知され得、海水への移し替え後の生存に必要な飲水行動が開始されるのであろう。同様に、嗅葉および嗅神経の両方にPVCRタンパク質が存在することは、核をもった嗅覚ラメラ (olfactory lamellae) (環境水のイオンおよび栄養素濃度を感知する) から脳の他の部分へのニューロン入力をCa²⁺、Mg²⁺またはNaClの血清中濃度の感知に基づいて調節することができる。カルシウムイオンは、光によって調節されるホルモンであるメラトニンの魚松果体からの発生に中心的役割を果たす。したがって、松果体の柄に存在するPVCRタンパク質発現ニューロンは、血清中Ca²⁺、Mg²⁺またはNaClを感知し、それにより、明期曝露によって発生するシグナル、メラトニン合成、幼魚タイセイヨウサケの体組成の変化の間の統合を行っている。この系は、実施例10に詳述されたように、プロセスII処理魚の海水への移し替え後の明期の影響を促進するのであろう。

10

【0164】

幼魚タイセイヨウサケの下垂体の免疫学的局在研究は、腺下垂体のプロラクチン産生細胞にPVCRタンパク質の顕著な発現を明らかにする。抗PVCR抗血清または抗成長ホルモン抗血清のいずれかによる単一下垂体の一連の切片の染色を得、分析した。得られたデータは、プロラクチン産生細胞のみがPVCRタンパク質を有し、一方、近接する成長ホルモン産生細胞は、検出可能なPVCRタンパク質を持たない。これらのデータは、淡水におけるサケ科の体組成の制御における中心的ホルモンとしてのプロラクチンの顕著な役割と一致する。さらに、プロラクチンは、海水が促進する成長ホルモンの作用の拮抗剤として作用する。これらのデータは、元来、プロラクチンが、海水への移行直前の期間に魚の組織を海水中の生活に向けての改造を促進すると思われる成長ホルモンの作用に対向することによって、幼魚サケを保護することを示す。幼魚タイセイヨウサケの下垂体のプロラクチン産生細胞におけるPVCRタンパク質の存在は、これらの細胞に、実施例7で示されたように、血清中のCa²⁺、Mg²⁺またはNaClの変化を介して、魚が海水に移る正確な時期を感知させることができる。プロラクチンの放出および/または合成の低下は、循環プロラクチン濃度を低下させるため、成長ホルモンのプロラクチン拮抗作用を低下させて幼魚サケを完全に海水に適応させる。魚をAPS プロセスI またはプロセスII処理すると、血清中のCa²⁺、Mg²⁺またはNaClを海水への移行時と同じように変化させ、魚が海水への移し替えに備えられるようにする。

20

30

【0165】

実施例7：APS プロセスI またはAPS プロセスIIに曝した魚の血清中濃度

本明細書に記載されるデータは、遡河魚の体液中のカルシウム、マグネシウムおよびNaClの濃度の変化が海水への移し替え後に起こり、過剰に高い濃度は、遡河魚の海水への移し替え後、死亡を招き、或いは寄与することを示している。APS プロセスIIは、小型の成魚前遡河魚を浸透ストレスにさらすことなく、海水への移動を模倣するものである。したがって、魚のこの処理は、これまでより有意に小型のサイズの段階で、また工業標準実施法では許されていない条件下で、海水に移し替えることができる。

40

【0166】

PVCRは、PVCRが環境海水に曝露される複数の組織(鰓、皮膚)、嗅覚ラメラ、細管の管腔内容物(腎臓、腸)並びに内部体液(脳、内分泌組織、筋肉)に存在している。遡河魚が淡水から海水に移されると、カルシウム、マグネシウムおよびNaClの外部水中濃度が急激に上昇する。飲水行動または浸透圧によって、魚が吸収するカルシウム、マグネシウムおよびNaClの量が増えると、腸および腎臓の上皮細胞の頂端表面上に存在するPVCRが、増加したこれらの二価および一価のイオンに曝露されることになる。二価陽イオンのこれらの増加は、腎臓が二価陽イオンの第一の排泄臓器であり、腸は摂取した海水の処理による遡

50

河魚にとって主要な水回収臓器であるため、生じる。このデータ開示にとって重要なのは、カルシウム、マグネシウムおよびNaClの濃度が魚の血液および細胞外液中で増加すれば、このような体液に浸っているPVCRが刺激され始めるであろう。血清カルシウムおよびマグネシウムの変化は実際のシグナル伝達経路を構成する。これに関して、遡河魚におけるカルシウム、ナトリウム、マグネシウムおよび塩化物の血清中濃度に対し、広い範囲の「正常」値があるということも注目に値する。これらのイオンの定常状態血清中濃度は、塩度の違いによって変化することは認識されているが、本明細書に記載されるようにPVCR「セットポイント」の違いを持った魚を表しているという認識はない。

【0167】

サケ科の魚の現在の生産方法は、スモルトと呼ばれる成魚前の魚が淡水から海水への移し替えに耐える(survive)「臨界サイズ」の達成にかかっている。

【0168】

養殖漁業としてのサケ科の魚の生産は、成魚前の魚が直接淡水から海水への移し替えに耐えることができるかどうかにかかっている。この工程を行うために、現在の工業的方法では、サケ科の各種毎に「臨界サイズ」を同定している。この臨界サイズ以下では、多数の魚が水の浸透圧およびイオン組成の劇的な変化に耐えることはできない。「臨界サイズ」スモルトの能力に寄与する要因は、対容積比表面積と、新たな海水イオン環境に対処するためのイオン輸送およびホルモン機構の成熟度等である。これらの機構は、鰓、消化器官、腎臓、皮膚等のいくつかの臓器からの協調のとれた応答と、海水曝露後の飲行動の開始等の特別な行動変化等が関与する。淡水から海水環境への魚の移し替えは、魚が生存できるように急速に改造されるこれらの浸透調節系にとって、大きな挑戦である。基本的な浸透調節機構と応答を図 19 に簡単に概説する。

【0169】

魚が淡水に棲んでいる場合、イオン含量および浸透圧が体内より有意に低い水環境に囲まれる(表11)。魚の体液と周囲環境との間に存在する浸透勾配のために、魚は、該魚の体液のより高い濃度のイオン含量を希釈することにたえず直面する水を絶えず受け入れている。その結果、淡水魚は飲まずに大量の薄い尿を排泄する。重要な体内塩分を環境中へ失うことを防ぐために、鰓、消化器官および尿細管は、それらの管腔内容物または周囲淡水からイオンを積極的に取込むことに専念する。

【0170】

【表11】

表11：タイセイヨウサケ³の血清(血)に対する海水と淡水とのイオン¹及び浸透圧²

組成の比較

	海水	淡水	タイセイヨウサケ
ナトリウム	450	0.3-5	135-185
カルシウム	10	0.07-2	2.5-3.9
マグネシウム	50	0.04-3	1.0-2.8
塩化物	513	0.23-10	120-138
硫酸塩	26	0.05	<0.02
浸透圧	1050	1-20	330-390
¹ 全値を mMoles/Liter として表示 ² 値を mOsmoles/kg H ₂ O として表示 ³ 値は、魚が、淡水にいるか海水にいるかで変わる。 平均値の範囲を与える。			

10

20

30

40

50

【0171】

これに対して、魚が海水に棲んでいる場合、周囲の水環境のほうが魚自身の体組成に比べてイオン含量および浸透圧が有意に大きい(表11)。図 19 に示されるように、海洋サケ科の魚は絶えず周囲海水中に身体水分を失っている。これに関して、魚の皮膚層の統合性および浸透性のどちらもこれらの経皮損失をできるかぎり低く抑えるうえで重要である。これらの継続する水分損失を補うために、魚は海水を飲み、それを水とその構成イオンのごく一部を保持するように処理する。取り入れた海水は消化器官の内壁の上皮細胞によって処理される。このプロセスで、魚は水と一部のNaClを腸で取込むが、Ca²⁺およびMg²⁺は尿細管によって吸収されないか排泄される。吸収されたNaClは鰓上皮細胞を介して魚体から押出される。

10

【0172】

図 19 は魚に起こる適応変化を淡水中と海水中とで比較したものである。淡水魚に存在する特異的な生理学的適応を左図に模式的に示す。これに対して、魚が海水中にいるときの同じ生理学的応答の変化を右図に示す。

【0173】

成魚前の遡河魚にとって、淡水から海水への移し替え後にすばやくこれらの適応変化のすべてを遂行することが重要である。これらの機構の配備および成熟には、新しいタンパク質の合成と、経上皮輸送に関与する上皮細胞の改造が必要である。これらの変化は、スモルトがその新しい海水環境に耐えることができるような時間内に起こる。魚が小さいほど、その表面積/容積比は大きくなる。したがって、小型の魚ほどその体水分を急速に失い、体内のイオン組成の変化を緩衝するための体水分貯蔵が少ない。その結果、小型の魚は急速に水を失い、イオン除去機構が成熟していないので、この水を海水を飲むことを介しては補うことができない。その結果、より小型のまたは未成熟なスモルトは、海水の新しい浸透圧やイオン環境に適応できないために電解質および水分不均衡で急速に死亡する。これに対して、「臨界サイズ」より大型のスモルトは、表面積対容積比が低く、水分損失は遅く、イオン変化を緩衝する体水分を多く有する。このより大型のサイズは、魚が生き延びることができるような、より成熟したイオン輸送機構を配備するのに必要な期間を与える。

20

【0174】

臨界サイズ未満であるか、未成熟な生理学的イオン輸送機構を持ったスモルトでは、身体からの水の浸透性除去がイオン豊富な海水の摂取と組み合わせると、体液および電解質組成に特異的な変化が起こる。これらの変化としては、総体内水分含量の低下、カルシウム、マグネシウムおよび塩化ナトリウムの濃度の増加等が挙げられる。これらの一価および二価の陽イオンの異常に高い濃度は、臓器および細胞の機能に広範囲な特異的な変化が起こり、例えば、細胞代謝および神経伝達の変化、正常な神経系および筋肉活動の低下、食物の正常な摂取、その消化の停止等が起こる。海水への移し替え後の異常行動および高度なストレスによる瀕死前の魚の出現は、実際、魚の体液内のカルシウム、マグネシウム等のイオン上昇の生理学的影響が原因であるといえる。

30

【0175】

本明細書に述べられるように、血清カルシウム、マグネシウム、ナトリウムの測定値はこれらのデータを確認するとともに、本発明が、生理学的およびイオン輸送機構に変化を起こさせ、現在の工業標準法によって決められている臨界サイズよりも有意に小型の成魚前遡河魚の海水移し替えを成功させることを証明している。

40

【0176】

方法：

尾洞内静脈穿刺によって魚(サケおよびマス)から採血し、ヘパリンリチウムの添加によって凝固を防いだ。血液を4,000rpmで10分間遠心分離し、得られた血清を集め、分析まで保存した。2 マイクロリットルのアリコートの血清試料のカルシウムおよびマグネシウム濃度を、カルシウムおよびマグネシウム定量キット(Kit #595、#587 Sigma Aldrich、St Louis、MO)を用いて定量し、Naを日立747 分析器を用いた商業用検査法(NorDx La

50

boratorieSSCaRborough、ME)によって測定した。

【0177】

結果および考察：

APS プロセスIIは、魚の体液と周囲の高張海水との間の大きな浸透勾配なく海水曝露を模倣する。

【0178】

図 20 は、淡水から直接、またはAPS プロセスIIの様々な成分に曝露後、海水に移した幼魚マス（平均体重約30グラム）における血清中カルシウム濃度の変化を示す。淡水中維持したマスの平均定常状態カルシウム濃度は $2.72 \pm 0.16\text{mM}$ である。これに対して、海水へのマスの移し替えは、海水への移し替え後、最初の24時間以内に血清カルシウムを約 3.80mM まで有意に上昇させる。血清カルシウムのこの増加は、約108 時間（45日間）持続するが、その後、126 時間までにこれよりやや低い平均濃度 $3.20 \pm 0.42\text{mM}$ まで低下する。したがって、体内PVCrは、淡水マスを海水に移し替えと、血清中カルシウム増加に曝露される。水中PVCrは、実際にこの濃度の範囲のカルシウム変化を感知し応答するのであろう。したがって、血清カルシウム（PVCrアゴニスト）の増加は、幼魚マスを海水中で生存させるための様々な臓器における多数のPVCr活性化過程の開始のためのシグナルを構成する。

【0179】

3mM カルシウムと1mM マグネシウムとを含有する本発明の水混合物中にマスを入れ、標準淡水飼料（Moore Clarke Feeds）をこのマスに与えると、体外の水混合物（3mM）から体内体液（ 2.72mM ）へ向かってのカルシウムのかなりの内部方向勾配があるにもかかわらず、淡水で維持したマスの血清カルシウム濃度に比べて、血清カルシウムが有意に増加する。さらに、この水混合物中で維持したマスの血清カルシウム濃度は、環境明期を正常（10時間日光；14時間暗期）から持続的日光曝露へと変化させても、変化しない。

【0180】

図 21 は、水混合物（3mM カルシウム、1mM マグネシウム）中維持したマスに追加の1 % 塩化ナトリウム（w/w）を含有する淡水固形飼料を与えたときに起こる血清カルシウム濃度の増加を示す。NaCl 補充飼料の給餌は、ゼロ時間におけるベースラインの血清カルシウム濃度の測定直後に開始した。血清カルシウム濃度が24時間後に上昇しはじめたことに注目のこと。示されたデータポイントは、1つの代表的な実験についての合計5 回以上の独立した測定を表す。24時間および72時間での数値は、ゼロ時間での数値に比べて、有意に（ $p < 0.05$ ）増加する。

【0181】

これに対して、本発明の水混合物中維持したマスに1 % NaCl（重量 / 重量）追加以外は、同じ標準飼料を給餌することは、血清カルシウム濃度が24時間以内に有意な増加を生じる（図 21）。マスのこの血清カルシウム濃度の増加は、マスを海水に移すことによって起こる上昇を模倣している（図 20 と図21とを比較する）。飼料中NaClが血清カルシウム濃度を上昇させる作用は、おそらく、魚が摂取したこの過剰なNaClを排泄しなければならぬために起こるのであろう。この過剰なNaClの摂取は魚の飲水行動を活発化し、それによって3mM カルシウムを含む水混合物を摂取し、ひいてはカルシウムを腸吸収することによってその体液カルシウム含量を増加させる。1 % NaCl 単独摂取は、血清カルシウム濃度を変化させない。したがって、淡水中維持したマスの血清カルシウム濃度（ 2.72 ± 0.43 、 $n = 6$ ）は、1 % NaCl（w/w）含有飼料消費後30日間も有意に変化しなかった（ 2.37 ± 0.25 、 $n = 5$ ）。これらのデータは、このプロトコルが遡河魚の血清カルシウム濃度を増加させるために必要であることを証明している。

【0182】

淡水で育てた産業標準「臨界サイズ」を有するより大型のタイセイヨウサケスモルトを、血清カルシウム濃度および血清ナトリウム濃度を上昇させる海水に移行する：

図 20 に示したデータは、マスを淡水から海水に移行したとき、平均血清カルシウム濃度が約40%上昇することを示す。この上昇の大きさは、マスの「臨界サイズ」より小さいこれらの魚における浸透圧調節機能不全による有意マス死亡率（約30~40%）に関連する。

対照的に、血清カルシウム濃度における上昇の大きさは、臨界サイズ60～70グラムを有するより大型のタイセイヨウサケスモルトを海水に移行した場合、より小さい（約30%上昇）（図22A～B）。海水に移行した後、この同じ期間中で、これらの同じ魚における血清ナトリウム濃度は約17%上昇する。マス（図21）およびサケ（図22A～B）の両方から誘導されるデータは、この実験中において、ストレスの視覚的徴候を示さなかった魚（すなわち、ストレス魚は、体の退色、奇怪な泳動挙動または活動レベルの顕著な低下を示す）からのみ集めた。

【0183】

図22は、標準的な現在の慣用法により規定される臨界サイズを有するS1タイセイヨウサケスモルトの海水に移行した後の血清カルシウム（図22A）および血清ナトリウム（図22B）における変化を示す。各データ点は、5～10の独立した測定値の平均±S.Dを表す。

10

【0184】

図23A～Bは、APS処理I（水中、3mM Ca²⁺、1mM Mg²⁺）および7%NaCl食物補給物含有食餌で合計45日間処理した後、図22に示したのと同じS1タイセイヨウサケスモルト80匹のコーホートから得た、海水への移行後の血清カルシウム、マグネシウムおよびナトリウムの値を示す。APS処理Iに曝露した魚の初期血清カルシウムは、やや高く（2.5対3.0mM）、カルシウムおよびナトリウムの血清濃度の変化は図22に示したものに類似することに注目されたい。さらに、これらの魚をカルシウム/マグネシウム混合物水から海水に移行したとき、カルシウムおよびマグネシウムは、最初の120時間の期間中、劇的な上昇は受けない。対照的に、血清ナトリウム濃度は、最初の24時間以内に約12%（158.0mM から178.8mM）上昇する。

20

【0185】

図19～23に示すこれらのデータは、総合すると、成魚前遡上性魚を淡水から海水に移行した後、血清カルシウムおよび血清ナトリウムの両方における上昇が生じることを示す。さらに、PVCRタンパク質の全体的な発現は、腸などのこの浸透圧調節応答に関与する特定の細胞において調節される。PVCRは、これらの濃度範囲内においてカルシウムおよびナトリウムの両方の変化に応答しうるため、これらのデータは、魚を海水に移行した後、PVCR活性の新しい「目標値」が確立されることを示す。

【0186】

30

図21～23に示すデータは、APS処理Iでの成魚前遡上性魚の処理が、淡水から海水に移行することにより生じる濃度上昇を擬態する、該魚の血清カルシウム濃度上昇をもたらすこと示す。カルシウムおよびマグネシウムの組み合わせを含有する水およびNaClを含有する飼料に魚を曝露すると、浸透圧ストレスを伴わない高浸透圧海水の摂取を反映するカルシウム摂取の増加が引き起こされる。したがって、APS処理I魚におけるPVCRは、カルシウムおよびマグネシウムに曝露されており、その結果、魚は、後に海水に移行した場合、より容易に海水に適応しうる。

【0187】

海水に移行した後にストレスの視覚的徴候を示す遡上性魚は、カルシウムおよび/またはマグネシウムの上昇した血清値を有する。魚がこれらのイオンを排泄できないことは、海水に移行した後に死亡する主な原因である：

40

淡水から直接、またはAPS処理Iに曝露した後のいずれかで成魚前遡上性魚を海水に移行すると、総数の魚のうち一部は、しばしば、浸透圧の劇的な差、および淡水と海水間のイオン組成の劇的な差に適応できず、結果的に生じる電解質不均衡により死亡する。海水に移行した後の、短期期間（24～120時間）以内に最終的に死ぬ魚の追跡を含む観察は、死ぬ24～72時間前に、正常なうすい銀色の体色の黒っぽい色相への変化および奇怪な泳動挙動または活動レベルの顕著な低下を含む、高度ストレスの視覚的徴候を示し始めることを示す。

【0188】

対照非ストレス魚と高いレベルのストレスの徴候を示す魚との血清カルシウム、マグネシ

50

ウムおよびナトリウム濃度の比較は、ストレス魚における血清イオン濃度は、対照に比べて有意に高いことを示す（表 1 2）。

【 0 1 8 9 】

【表 1 2】

表 1 2：視覚的検査により非ストレス魚またはストレス魚と判定した海水中の稚魚
タイセイヨウサケおよびマスの血清濃度の比較

	血清濃度 mM	
	カルシウム	マグネシウム
業界標準幼魚マス		
非ストレス魚	4.03 ± 0.71 (n=49)	実施せず
ストレス魚	4.58 ± 0.78** (n=63)	実施せず
APS 処理タイセイヨウサケ		
非ストレス魚	3.74 ± 0.52	2.40 ± 0.77 (n=15)
ストレス魚	3.97 ± 0.66	4.07 ± 0.60** (n=16)
** P < 0.01		

【 0 1 9 0 】

これらの高度ストレスの徴候は、魚の体液内のカルシウム、マグネシウムおよびナトリウムイオンの濃度の異常上昇に直接帰することができる。したがって、過剰二価カチオンを排泄することができず、かつ浸透により失われた体内の水と置換するために海水を処理できない成魚前遡上性魚は、電解質不均衡の結果、死亡する。臨界サイズ未満の遡上性魚は、海水の新しい浸透圧環境に速やかに適応することができず、その結果、死亡する。

【 0 1 9 1 】

現在の産業標準法により規定される「臨界サイズ」未満の成魚前タイセイヨウサケ魚のAPS プロセスIIへの曝露は、血清カルシウム、マグネシウムおよびナトリウムの致死的上昇を抑制し、したがって非常に小さな体重を有する魚の良好な海水への移行を可能にする。St John/St John 種の成魚前タイセイヨウサケを、混合物水（3mM Ca²⁺および1mM Mg²⁺）ならびに7%NaClおよび2gm/kg（w/w）L-トリプトファン（APS プロセスII）の組み合わせの飼料を含むAPS プロセスIIで合計49日間で始め、その間、連続光周期に曝露した。これらの小さいが処理された成魚前タイセイヨウサケ（APS プロセスIIスモルトと称する）を、次いで、単一海洋網生簀内または研究施設内の実験槽（15.6）内の海水に入れた。図24は、良好に海水に適応したAPS プロセスIIスモルト対海水に適応できずに死亡した同じ群のAPS プロセスIIスモルトの体格特徴を比較するものである。

【 0 1 9 2 】

図24に示すように、最小の体重を有するAPS プロセスIIで処理したタイセイヨウサケ成魚前魚のみ（約10%）が実験槽内で5日後に海水後死亡を経験した。90%の生き残ったAPS プロセスIIスモルト対死亡した10%のAPS プロセスIIスモルトの平均体重の比較は、完全APS プロセスII移行群の平均体重（11.5±5.65gm）と比べて、不出来なAPS プロセスIIスモルトがより少ない体重（5.10±2.2gm）を有することを示す。したがって、これらのAPS プロセスIIスモルトの臨界サイズは、約13gmである。この臨界体重は、産業標準技術により以前に規定された臨界サイズのわずか13~18.6%（13/70 ~ 100）である。したがって、これらのデータは、プロセスIIの使用はタイセイヨウサケの稚魚/スモルトの「臨界サイズ」が80%を超えて低減したことを示す。

【0193】

カルシウム / マグネシウム混合物水から海水への移行が良好に行われたAPS プロセスII スモルトの血清カルシウム、マグネシウムおよびナトリウム濃度の定量を図25に示す。これらのAPS プロセスII スモルトの平均体重が、現在の産業標準法を用いて生産したタイセイヨウサケスモルトの通常の「臨界サイズ」の20%未満(11.5/60.5gm)であるという事実にもかかわらず、カルシウム、マグネシウムまたはナトリウムの血清濃度が変化しなかったことは注目に値する。図25は、図20および表2に示すデータならびに以前に公表されたデータから予期しうるように、血清カルシウム、マグネシウムまたはナトリウム濃度はいずれも劇的に上昇しないことを示す。産業標準タイセイヨウサケスモルト / 稚魚のAPS プロセスIIでの処理は、大型の産業標準スモルトと比べると、APS プロセスII スモルトの有意に小さい体格にもかかわらず、上述で測定したイオンのいずれの濃度においても劇的な上昇をもたらさない。図22A~B (産業標準S1スモルト)、図23 (APS 処理Iで処理した産業標準S1スモルト) 対図25 (産業標準臨界サイズの20%未満の成魚前サケ) に示すデータの比較はまた、より小型のAPS プロセスII スモルトのこれらの血清濃度が、より大型の産業標準S1スモルトにより示されるものに匹敵することを明らかにする。まとめると、これらのデータは、APS プロセスIIで処理した成魚前タイセイヨウサケは、有意に小型であるにもかかわらず、カルシウム、マグネシウムおよびナトリウムの体内組成における劇的な変化を示さないことを示す。これらのイオンの濃度における変化がないことは、これらの魚におけるストレスを大きく低減し、魚が容易に海水に適応するのを可能にする。

10

20

【0194】

実施例8：飼料

APS 処理IおよびIIの一部としての、魚に消費させる飼料を調製するための一般的な方法が2つある。これらの2つの方法は、飼料の再配合または飼料に吸収させる濃縮溶液の添加、続く嗜好性のための追肥のいずれかを含む。この開示は、これらの2つの方法のそれぞれを用いて飼料を調製するための方法論を記載する。

【0195】

方法：

サケ実験のための飼料製造

飼料を再配合するための成分は、以下の通りである。ベース食餌は以下の成分および手順を用いて作製した：30%イカ(ブレンダーで液状化)、70%Corey Aquafeeds カレイ食餌(ブレンダーで粉末化)。成分を半湿性「生地」ボール内でブレンドした。実験での必要性にしたがって、NaClまたはPVCR活性化化合物を含む他の成分を重量基準でベース食餌にブレンドした。

30

【0196】

Moore Clark 標準淡水サケ科食餌(サイズ1.2、1.5、2.0、2.5 および3.5mm)もまた使用しうる。追肥がベース食餌の重量の4%を構成するようにペレットに追肥を塗布した。追肥は、50%クリル水解物(Specialty Marine ProductSLtd.) および50%ニシン魚油から構成される。追肥は嗜好性のため、および添加した成分の封入のために添加される。

【0197】

他の成分としては、重量基準のベース食餌に重量基準で添加されるNaCl、MgCl₂、CaCl₂ またはL-トリプトファンが挙げられうる。

40

【0198】

7% (重量/重量) NaClを含有する飼料の調製

APS 処理I用：Moore Clark 標準淡水サケ科食餌の重量の7重量%の割合で配分された固体塩化ナトリウムまたはNaClを、NaClの重量の約3~4倍の容量の水道水に添加した。マグネティック・スターラー・バーの使用により混合しながら混合物を60~70℃に加熱して塩を溶解した。次いで、NaCl溶液をハンドヘルド噴霧器に注入し、1.5立方メートル電動セメントミキサーの内部で転動しているMoore Clark 標準淡水サケ科食餌に塗布した。NaCl高含有溶液の吸収の後、湿性Moore Clark 標準淡水サケ科食餌を、ウィンドウスクリ

50

ーニング上に薄く散布し、乾燥プロセスを促進するためのファンと1500ワットヒーターを備えた密閉ラックシステムに配置する。約6時間乾燥させた後、乾燥NaCl高含有ペレットをセメントミキサーに戻し、追肥を塗布する。飼料を使用時まで室温で保存する。

【0199】

APS プロセスIIのための7% (重量/重量) NaCl + PVCR拮抗薬 (トリプトファン) を含有する飼料の調製: Moore Clark 標準淡水サケ科食餌の重量の7重量%の割合で配分された固体塩化ナトリウムまたはNaClを、NaClの重量の約3~4倍の容量の水道水に添加した。マグネティック・スターラー・バーの使用により混合しながら混合物を60~70 に加熱して塩を溶解した。USP グレードL-トリプトファンを、配合の必要条件に応じて、Moore Clark 標準淡水サケ科食餌1kg ごとに2グラムまたは4グラムのいずれかで水に添加した。トリプトファンが溶解し、溶液のpHが約4.0 になるまで、混合しながら希塩酸をこの水に添加した。次いで、NaCl + トリプトファン溶液をハンドヘルド噴霧器に注入した後、セメントミキサーの内部で転動しているMoore Clark 標準淡水サケ科食餌に塗布した。NaCl + トリプトファン溶液の吸収後、湿性Moore Clark 標準淡水サケ科食餌を、次いで、ウィンドウスクリーニング上に薄く散布し、乾燥プロセスを促進するためのファンと1500ワットヒーターを備えた密閉ラックシステムに配置する。約6時間乾燥させた後、乾燥NaCl-トリプトファン高含有ペレットをセメントミキサーに戻し、追肥を塗布する。この飼料は、使用するまで室温で保存した。L-トリプトファンは、本明細書に記載の、PVCR発現をモジュレートする任意のアミノ酸と置き換えることができる。

【0200】

実施例9: 8種の遡上性魚のDNA からPCR により増幅した多価カチオンレセプタータンパク質の部分ゲノムクローン由来DNA 配列および推定タンパク質配列

これらのデータは、8種の遡上性魚のPVCR遺伝子由来の部分ゲノム配列を提供する。完全長のクローンを実施例1に記載のようにして単離した。これらのヌクレオチド配列のそれぞれは特有であり、したがって、各種由来の完全長cDNAを単離するための特有のプロープとして使用しうる。さらに、このDNA フラグメントは、これらの魚の種々の組織におけるPVCR発現の検出のための特異的アッセイキットの基礎を構成しうる。実施例19参照のこと。

【0201】

PVCRは、サケ、イワナおよびマスのいくつかの種において単離されている。標準的な方法論 (GM Preston、クローン遺伝子ファミリーメンバーに対する縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応、Mol. Biol. 第58巻、A. Harwood 編、Humana Press、303 ~ 312 頁、1993の方法を参照のこと) を用い、多価カチオンレセプタータンパク質の貫膜ドメインにおいて高度に保存された領域に対する縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計するため、SKCaR (図28A~E) のヌクレオチド配列とともに哺乳動物CaRの配列を使用した。これらのプライマーを用い、重要な商品我代表する種々の魚種由来のcDNAまたはゲノムDNA を、標準的なPCR 方法論を用いて増幅する。次いで、増幅されたバンドをアガロースゲル電気泳動により精製し、細菌株内で形質転換される適切なプラスミドベクター内にライゲートする。液体培地内で増殖させた後、ベクターおよび挿入物を標準的技術を用いて精製し、制限酵素解析により解析し、適切な場所に配列決定した。この方法論を用い、ヌクレオチド配列を増幅した。

【0202】

図26および27において示されたデータを作成するため、標準的な公表された技術を用いて示した種のそれぞれの筋肉試料からDNA を単離した。次いで、2つの縮重PCR プライマー (DSK-F3およびDSK-R4; 配列番号22および23) を含むポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 方法論を用いてDNA を増幅した。次いで、増幅されたDNA をアガロースゲル電気泳動により精製し、プラスミドベクター内にサブクローニングし、標準法を用いて増幅、精製および配列決定した。

【0203】

図26は、8種の遡上性魚種の整列された594 個のヌクレオチドのゲノムDNA 配列を示し

、それぞれは、PVCRTANパク質の同一の領域をコードする。各特定種由来の各ヌクレオチド配列は特有であることに注目されたい。しかしながら、これらの遺伝子のDNA 配列における改変は、594 個のヌクレオチドの各配列内の共通の特定のヌクレオチドで生じる。

【0204】

図27は、図26に示したゲノムヌクレオチド配列由来の整列された、対応する推定タンパク質配列を示す。図26に示すヌクレオチド配列における改変の結果として、PVCRTANのこの部分のアミノ酸配列においては3つの改変しか起こっていないことに注目されたい。これらの変化のすべて(Ala からVal ; Arg からLys ; およびCys からTyr)は、ペプチド配列の相対的な大きさ、電荷および親水性のいくつかの組合せを保存する点において、アミノ酸の「保存」置換として知られている。

10

【0205】

実施例10: APS プロセスII処理を受けたスモルトの死亡率を低下させるための連続光周期の効果

データは、APS プロセスII魚を明10時間および暗14時間から構成される非連続光周期よりむしろ連続光周期に曝露した場合の、海水移行後死亡率の有意な改善を示す。

【0206】

実験プロトコルの記載: 100 匹の魚の3つの実験群を、7%NaClおよびトリプトファンを補給した食餌を含めた計45日間のAPS プロセスIIに供しておいた単一の群の1200匹のSt. John/St John APS プロセスII魚(平均重量11.5gm)から選んだ。淡水中でのAPS プロセスIIでの処理を伴うこの45日の期間中、これらの魚を光の連続光周期に曝露した。海水移行後にこの定常光周期を継続する効果を試験する実験を開始するため、各群の100 匹の魚を、海水(32ppt)を含む、それぞれにバイオフィルターが設けられ、一定の19 に維持された個々の1メートル円形槽に入れた。最適の水質を維持するため、毎日パラメータをチェックし、パラメータは、任意の3つの実験槽間で変化がなかった。海水を含んだ槽の表面から1メートルに配置した標準的な蛍光灯バルブを用い、第1槽(連続)を連続光周期に曝露した。また、海水が満たされた第2および第3槽(非連続#1および#2)は、1日あたりの間隔が、第1槽と同じ照光条件で10時間の後、軽量重質ポリエチレンプラスチックシートで第2および第3槽を覆うことにより作製した完全暗部で14時間から構成される非連続光周期に曝露した。この明暗摂生は、北半球の夏/初秋に存在する日周(diurnal)条件下で海洋網生簀に入れた場合にAPS プロセスII魚が経験するものと類似する。3つの槽のそれぞれにおいて生じる死亡率を1日3回確認し、死亡した魚はいずれもすぐに取り除いた。魚には、第3日目から始めた標準的湿性食餌を与えた。

20

30

【0207】

結果: 図29および表13は、十分な強度の海水に移行した後、連続光周期対非連続光周期のいずれかにAPS プロセスII魚を曝露した時に生じた死亡率の数値を示す。APS プロセスII魚の死亡率は、これらを連続光周期に曝露した場合、海水移行後の最初の96時間の期間中は低かった(6%)。対照的に、非連続光周期(連続光10時間の後、暗14時間)に曝露した両群のAPS プロセスII魚は、連続光周期に曝露したAPS プロセスII魚に比べ、4.8倍(2.9%)および6.5倍(39%)高い死亡率を経験した。これらのデータは、海水移行後、最初の4日間の連続光周期へのAPS プロセスII魚の曝露が死亡率を有意に低下させることを示す。これらのデータは、これらのAPS プロセスII魚をAPS 研究用海水槽(連続光周期を有する)対海洋網生簀(暗期間を伴う天然光周期を有する)に移行したときにおいて観察される死亡率の差の簡単な説明を提供する。また、表7に含まれるデータは、APS プロセスIIで処理した15gm以上の稚魚サケの曝露は、魚に30日間照光する水中光を含む海洋網生簀に海水移行してから後、低い(0.2%)死亡率を経験したことを示す。

40

【0208】

【表13】

表 1 3 : 移行後の St. John/St. John A P S プロセス II 魚の海水位置
の死亡率の一覧

	連続および非連続光周期での死亡率の数値		
	連続	非連続 # 1	非連続 # 2
第 1 日	0	1 3	5
第 2 日	2	1	3
第 3 日	1	5	9
第 4 日	3	1 0	2 2
合計	6	2 9	3 9

10

【 0 2 0 9 】

20

実施例 1 1 : APS プロセス II での稚魚タイセイヨウサケの成長速度

この実験の研究データは、淡水で管理した稚魚タイセイヨウサケが、海水への移行前に APS プロセス II に曝露した魚と同じ成長速度を有することを示す。

【 0 2 1 0 】

実験プロトコルの記載：この実験は、APS プロセス II を受けた稚魚タイセイヨウサケの成長速度を、淡水 (FW) で管理した対応する対照と比較するために設計した。合計 187 匹の対照および 314 匹の実験 St. John/St. John 稚魚タイセイヨウサケを、単一の孵化群由来の多数の魚の群から無作為に選択した。両群を等カロリー食餌で維持し、同一の水質特性および温度を有する水に曝露した。しかしながら、実験群の魚を合計 6 週間 (45 日間) APS プロセス II に曝露した。次いで、両群の個々の魚の体長および体重を測定し、その分布を

30

【 0 2 1 1 】

結果：この実験において、これらのデータは、両群が同一の成長速度を達成したことを示す。二群間の平均体重 (26 ± 9.5 APS プロセス II 魚対 23 ± 7.7 gm 対照 FW $p=0.30$) または平均体長 (13.2 ± 1.7 APS プロセス II 魚対 13.3 ± 1.5 cm 対照 FW $p=0.43$) において有意差はなかった。実験期間中、いずれの魚の群においても死亡はなかった。したがって、この場合、APS プロセス II は、標準的淡水慣用法と比べ、淡水期間中、稚魚タイセイヨウサケの成長速度の上昇も低下ももたらさない。

【 0 2 1 2 】

実施例 1 2 : 海水研究用槽における APS プロセス II 魚のさらなる成長データ

40

APS プロセス II 魚の成長速度および飼料転換率は、APS プロセス II の有用性を示す。これらのデータは、淡水中で APS プロセス II 処理に曝露し、次いで海水に移行した後の < 5 gm ~ 約 30 gm の範囲の種々の大きさの稚魚タイセイヨウサケの結果に関する具体的な情報を提供する。157 日間の期間にわたって単一の群の APS プロセス II 魚に関して測定を繰り返すことで、この期間中における成長状態、死亡率および飼料利用の包括的な評価が提供される。死亡率データは、海水移行時に 15 gm を超える重量を有する APS プロセス II 魚が、APS プロセス II 魚の 4 倍を超える重量の現在の産業標準タイセイヨウサケスマルト ($60 \sim 120$ gm) と比べ、速やかに成長し、死亡を経験せず、非常に効率的に飼料を利用することを示す。対照的に、海水移行時に 15 gm 未満の体重を有する APS プロセス II 魚は、動作が乏しく、急性浸透圧調節機能不全により死亡するか、または浸透圧障害を被るかのいずれかであ

50

り、現在の産業標準スモルトのずっと大型の亜集団により示されるものに類似する特徴を有する「やせ型または小型」になる。これらの後者の観察は、稚魚タイセイヨウサケに適用される現在のAPS プロセスIIの有効性の下限を規定する。

【0213】

実験プロトコルの記載：この実験の設計は実施例2に記載している。実施例2において、海水移行後21日の期間のデータを得た。この実施例において、これらの同じ魚の死亡率、SGR、温度修正SGR（GF3）、FCR、体重、体長および条件要素を、こんどは157日間に延長した期間中全部でさらに4つの期間に得た。APS プロセスIIに曝露して海水に移行した後、サケの成長を、157日間にわたって体長および体重を繰り返し測定することにより測定した。

10

【0214】

結果：表14は、157日の期間、研究用海水槽に移行して成長させた後のこのAPS プロセスII魚群のデータの一覧を提供する。表14の最初の期間は表10に示したデータに対応し、「APS プロセスII」と記す欄において、2つのデータ値が、一貫性を報告する実験データの調整を必要としたことに注目されたい。第1の調整は、海水進入時の日数の表記載に関するものである。当初の進入時は21と記載したが、表14の新しいデータは20日で示す。この差は、当初の進入が魚を実際に海水に移行した日を含んだことによるものである。この値がわずか12時間の期間を示すものであるため、20日という数値に調整した。この事実の結果、0.68（表10当初）から0.725（表14）への初期SGR値の微調整が必要である。第2の調整は、海水中で最初の20日間の期間中、水分30%の湿性飼料を魚に与えたときの2.04という当初のFCR値に関するものである。APS プロセスII魚は、合計60日間湿性飼料を与えた後、乾燥飼料（9%水分）に変更したため、表14では、修正飼料乾燥重量基準での期間のSGRの修正を反映する、2.04の代わりに143のSGR値を報告している。30%水分のためのこれらのSGRおよびGF3修正は、表14の脚注として提供されている。

20

【0215】

【表14】

表 1 4 : 研究用槽におけるAPSプロセスII魚の計算されたSGRおよびGF3 APS研究用槽内の海水に移送した後のAPSプロセスII魚St. John/St. John種のタイセイ													
ヨウサケのデータの一覧													
期	日時	海水中的の日数	度	GF3	SGR	FCR#	体重増加	累積	平均体重*	死亡率	配置時*	<15 gms	>15 gms
		期	Cum.				期間		累積	%	合計	%	合計
1	9/11-10/3	20	20	324	0.354	0.725	1.43	2.05	2.05	15.2	13.15	103	23.2
2	10/4-11/13	40	60	553	1.029	1.53	1.31	14.38	16.43	31.48	17.1	138	31
3	11/13-12/6	22	82	311	2.328	2.87	0.75	27.76	44.19	59.24	31.48	0	0
4	12/7-1/16	40	122	454	1.559	1.27	0.76	40.1	84.29	100.5	60.4	0	0
5	1/17-2/21	35	157	407	1.362	0.99	0.8	41.6	125.89	142.1	100.5	0	0

* 平均重量および配置時重量はともに死亡率に関して修正

期間 # 1 および 2 中に計算されたFCRは、魚に与えた水分含量30%の塩水性飼料に関して修正

【 0 2 1 6 】

表 1 4 にまとめたデータは、海水配置時に15gmを超える重量のAPS プロセスII魚の全体的な死亡率が157 日の期間全体で1.1 %であったことを示す。この死亡率は非常に低く、細心の世話にもかかわらず通常の魚の管理で予期される範囲内である。対照的に、海水移行時に15gm未満の重量であった亜集団において、海水に移行したAPS プロセスII魚は、合計231 匹、すなわち総数の54.2%が死亡した。これらの死亡のすべては、海水移行後から最初60日以内に2 回の「波」において生じた。第 1 は、海水配置の20日以内に、急性浸透圧機能不全により生じた。これらの魚はすべて、体重が13gm未満であった。第 2 群の138 匹の魚は、続く40日の期間以内に死亡し、総数の31%を占めた。図 3 1 は、これらの138 匹

10

20

30

40

50

の死亡体の体格特徴を、海水移行時のAPS プロセスII魚の体長および体重と比較するものである。これらの魚の有意な数が体重の有意な低下を示し（図3 1に示した黒三角が、海水配置後のそれぞれの値に比べて、右側にシフトしている）、より大型（60～100gm）のタイセイヨウサケスモルトにおいて、規則的に生じる「やせ型または小型」と称する浸透圧障害魚の出現がもたらされたことは注目に値する。したがって、これらのデータは、15 gm以上の体重でAPS プロセスII魚を海水に良好に移行させるための体格の下限を規定する。

【0 2 1 7】

表1 4および図3 2は、合計5つの独立した測定が記録された157日の期間中に生き残ったAPS プロセスII魚のSGR およびGF3 値を示す。この期間中、APS プロセスII魚は、急速に体重が9倍をこえて増加した（15.2gmから142.5gm）。初期には、APS プロセスII魚は、海水移行後、最初の20日の期間で中程度のSGR / GF3 値しか示さなかった。しかしながら、次いでその成長速度は、2つの連続した期間のそれぞれにおいて2倍になり、海水移行後60～82日間の間にピークSGR2.87/GF3 2.33への到達が起こった。この期間中、魚は体重315gm から59.3gmに成長した。続いて、SGR / GF3 値は次いで、最後の2つの期間中に低下し、平均SGR0.99/GF3 1.36の値に達した。

【0 2 1 8】

表1 4および図3 2に示すように、APS プロセスII魚に水分30%を含む湿性飼料を与えた場合、海水移行直後の60日の期間でのFCR 値は平均1.37であった。次いで、FCR 値は、9%未満の水分を含む乾燥飼料を与えると、残りの97日間で平均0.77まで低下した。これらの低FCR 値は、平均0.9～1.4である、より大型のタイセイヨウサケスモルトの現在の産業標準FCR 値と、好ましく比較されるものである。

【0 2 1 9】

図3 3は、最後の3つの測定期間中での体格および体長における進行性の増加を示す。最も大型の魚は約300gmであり、これは、海水移行時の体重の10倍を超える最低の成長を表すことに注目されたい。すべての魚は、直線的成長に正比例する体重増加を有する良好な条件因子（k）を有する。

【0 2 2 0】

実施例1 3：群を淡水中で管理するか、またはAPS プロセスIIで処理した後海水に移行するか、のいずれかの場合、61日の期間中の20gmまたは40gmのいずれかの重量を有する一対の稚魚タイセイヨウサケの比成長速度（SGR）、飼料消費率（FCR）、毎日の飼料消費率および体格特徴の比較

ここに開示する実験では、1) APS プロセスIIで処理し、海水に移行する、または2) 淡水中で管理する、のいずれかである稚魚タイセイヨウサケの成長状態を比較した。また、これらの実験では、海水への移行後の、より小型（20gm）対より大型（40gm）のAPS プロセスII魚の成長状態を比較し、これらのデータを、対応する淡水対照で得られたものと比較した。この61日間の実験での全体的な結論は、20gmおよび40gmの稚魚タイセイヨウサケは、ともに良好に海水に移行されうることである。より小型の20gm未満の魚が、より大型の40gmを超える魚と比べて劣った結果を生じ得、かつ80～100gmの標準の魚と比べて、両者が有意に劣った成長を示し得るという現在の産業標準により予測されうることとは対照的に、以下に記載するこれらのデータは、20gmの魚が両方の40gmの魚と同等に成長することを示す。これらのデータは、20gmおよび40gmの魚の両方が、体格が現在の産業標準法により規定される臨界サイズの約1/5 および2/5 であるという事実にもかかわらず、APS プロセスIIでの処理後に海水に移行することができるという、さらなる証拠を提供する。また、これらのデータは、20gmおよび40gmのAPS プロセスII魚の両方が、海水移行後、従来のより大型の産業標準スモルトと等しいかまたはそれより優れたSGR、FCR および体格特徴の成長を達成することを示す。SGR およびFCR 基準により測定されるように、20gmのAPS プロセスII魚は、より大型の40gm APS プロセスII群より優れていた。しかしながら、20gmおよび40gmのAPS プロセスII魚はともに、初期には、淡水で管理した対応する対照と比べて、劣ったSGR、FCR および体重を示す。この成長における一時的な低下は

、海水への適応の初期の期間中のみである。注目すべきことは、これらのAPS プロセスII 魚は、実施例 1 2 に示すように、海水中での極めて急速な成長を提供するこの61日の期間直後に、SGR、FCR および体重における顕著な改善を達成することである。

【0221】

これらのデータからの具体的な結論としては、次のことがあげられる。

【0222】

1. 20gmおよび40gmのAPS プロセスII 魚を両方とも海水に移行し、湿性飼料（30%水分）を4日間のみ与えた後、実験の残りの期間は乾燥飼料（<9%水分）を与えた。これらのデータは、北米の北東部における通常の現在の産業標準魚が約14~30日間湿性飼料を与えられていることから、APS プロセスIIの有用性をさらに示すものである。

10

【0223】

2. 海水への移行後の20gmおよび40gmのAPS プロセスII 魚での平均61日SGR は、それぞれ、淡水中で管理した対応する対照により達成されたSGR 値の65%および57%であった。海水移行時に20gmの重量であったAPS プロセスII 魚は、より大型の40gmの対のものに比べ、より大きな平均SGR を示した。

【0224】

3. 20gmおよび40gmのAPS プロセスII 魚により達成されたSGR は、新しい海水環境への適応を反映する最初の30日の期間と比べて、第2の30日の期間中にそれぞれ58%および36%増加した。

【0225】

20

4. 低SGR の結果、海水移行後に20gm APSプロセスII 魚により達成された平均最終体重は、対応する淡水対照により達成された値の73.4%であった。同様に、より大型のAPS プロセスII 魚により達成された平均最終体重は、対応する対照の値の710 %であった。これらのデータは、より小型のAPS プロセスII 魚が、より大型の40gmの対のものに比べて類似の成長度を示したことを示す。

【0226】

5. 海水移行後の全60日の期間中では、より小型の20gm APSプロセスII 魚の平均FCR は、より大型の40gm APSプロセスII 魚により示されたものに匹敵した。

【0227】

6. 20gmおよび40gmのAPS プロセスII 魚は両方とも、海水移行から48時間後に飼料を与えると、直ちに飼料を摂取した。しかしながら、両方の大きさのAPS プロセスII 魚は、対応する淡水対照と比べて、海水移行後、約25~30日の期間の摂餌の抑制を示した。このAPS プロセスIIの1日当りの飼料消費の低下は、続いて、試験期間の残りの30~35日間で、淡水対照と同等になった。

30

【0228】

実験プロトコルの記載：これらの一連の実験は、より小型（20gm体重）の稚魚タイセイヨウサケが、淡水（FW）で管理した同一の大きさの対照魚、または淡水中で管理するかもしくは対のより小型の20gmのものと同様にして海水に移行した、より大型の稚魚タイセイヨウサケ（40gm）と比べて、APS プロセスII後の海水（SW）への配置による悪影響を示すか否かを試験するために設計した。成長および飼料利用におけるあらゆる変化を定量するため、成長速度、FCR、1日あたりの食餌消費ならびに体重、体長および条件因子の組み合わせを各群について測定した。調べた4群は、すべてSt. John/St. John 魚の単一の孵化群由来のものであり、以下のようにして処理した。

40

【0229】

1. 中型の40gm対照魚を、103日の期間FW中で管理し、その対のAPS プロセスII 魚に湿性飼料を4日間与える以外は、標準乾燥飼料を与え、同一の飼料調製物を与えた。FW中で最後の61日間について、SGR、FCR および1日当りの食餌消費を測定した（n=84）。

【0230】

2. 小型の20gmの対照魚をFW中に103日の期間、40gmの対のものに関して1.に記載したものと同一のようにして管理した（n=51）。

50

【 0 2 3 1 】

3 . 中型の40gmのAPS プロセスII魚をAPS プロセスIIに42日の期間曝露した後、海水に移行し、4日間湿性飼料を与えた後、乾燥飼料に切りかえて61日間管理した (n=99)。

【 0 2 3 2 】

4 . 小型の20gmのAPS プロセスII魚をAPS プロセスIIに42日の期間曝露した後、海水に移行し、4日間湿性飼料を与えた後、乾燥飼料に切りかえて61日間管理した (n=80)。

【 0 2 3 3 】

水質を同じ高水準に維持し、したがって実験間のばらつきに寄与しないことを確実にするための、対応するバイオフィルターを有する個々の1メートル円形槽に、各群の魚を管理した。全ての魚に同じ分量の食餌を与えたが、例外としてAPS プロセスII魚は、42日のAP S プロセスIIそのものの期間では、食餌は、飼料1kg 当り7%NaClおよび2gm のトリプトファンを含むものとした。4つの群すべてを、実験期間中、連続光周期に曝露した。

10

【 0 2 3 4 】

4つの全ての群の魚の重量を測定し、第3および第4群の海水への移行時およびその後の約30日間の2つの期間に測定した。

【 0 2 3 5 】

結果：

61日の試験期間中、各群により示された比成長速度 (SGR) の比較

図3 4 は、APS プロセスII対照物で処理して海水に移行したか、または淡水中に連続的に管理したかのいずれかの20gmおよび40gmの稚魚タイセイヨウサケの、2つの連続した30日の期間中のSGR を比較するものである。

20

【 0 2 3 6 】

淡水中で連続的に管理した20gmおよび40gmの魚の両方のSGR は、海水中の対のAPS プロセスIIのいずれかよりも大きかった。淡水20gmおよび40gm魚の平均60日SGR は、それぞれ1.51および1.45であった。対照的に、海水への移行後の20gmおよび40gmのAPS プロセスII魚のSGR は、それぞれ、これらの淡水値の65% (0.98) および57% (0.83) であった。20gmおよび40gmのAPS プロセスII魚の両方により示されたより低いSGR 値は、この最初の60日の期間中の海水への適応を反映する。海水への適応の増大は、20gmおよび40gmのAPS プロセスII魚の両方のSGR が、第1と比較して、第2の30日の期間中にそれぞれ58%および36%増加したことにより反映される。実施例1 2に示すように、海水中のAPS プロセスII魚のSGR 値は、次の60日の期間にわたって、ここに示すもののほぼ2倍の値まで有意に増加する。これらのデータは、20gmのAPS プロセスII魚が、同一の海水移行条件下で、対の40gmのものとは比べて、より大きなSGR を示したことを示す。

30

【 0 2 3 7 】

より大きなSGR の結果、淡水稚魚さけの平均の体重および体長は、61日の試験期間中にAP S プロセスII魚により達成された対応する値よりも有意に ($p<0.05$) 大きかった。表1 5ならびに図3 5および3 6に示すように、20gmで海水移行後、より小型のAPS プロセスII魚により達成された平均最終体重は、対応する淡水対照により得られた値の73.4%であった。同様に、40gm体重で移行され、海水中で成長させた、より大型のAPS プロセスII魚では、対応する対照で得られた平均体重のわずか71%しか達成されなかった。総合すると、これらのデータは、より小型の20gmの魚が対のより大型の40gmのものの半分の大きさであるという事実にもかかわらず、より小型およびより大型のAPS プロセスII魚の両方が、海水配置後最初の61日間で類似の成長度を示したことを示す。実施例1 2に記載するように、続く60日の期間中での海水中のAPS プロセスII魚の成長の継続は、図3 4に示すものの1.5 ~ 2.5 倍のSGR をもたらした。

40

【 0 2 3 8 】

【表1 5】

表15：APSプロセスII（APII）への曝露後、淡水または海水のいずれかに
おいて61日間成長させた20gまたは40gのいずれかの初期体重を有する幼
魚タイセイヨウサケの4群の体格特徴の比較

61日間の成長後の最終体格特徴				
初期体重	成長条件	体重（g）	体長（cm）	条件因子
20g	淡水	60.5 ± 13.3	17.1 ± 1.5	1.2 ± 0.1
	APII-海水	44.4 ± 12.5	15.7 ± 1.5	1.1 ± 0.1
40g	淡水	92.3 ± 12.8	19.9 ± 1.0	1.2 ± 0.1
	APII-海水	71 ± 19.5	18.6 ± 1.5	1.1 ± 0.1

10

【0239】

61日試験期間中に各群により示された飼料消費率（FCR）の比較

図37は、2つの連続した30日の期間での、淡水群およびAPS プロセスII海水群の両方のFCR データを示す。最初に、20gおよび40g APS プロセスII魚は両方とも、湿性飼料から乾燥飼料への急激な転換を良好に許容した。100g以上の重量のより大型の現在の産業標準スマルトでさえ、経口水補給におけるこの急激な低下を許容しえないだろう。

20

【0240】

しかしながら、これらのデータは、20gおよび40g APS プロセスII魚は両方とも、淡水中で成長させた対応する対照と比較して、海水移行後の60日の期間中に食物のエネルギーを体重の増加に変換する際に効率が低かったことを示す。APS プロセスII魚によるこの食物のバイオマスへの低効率変換は、第2の30日の期間中に両サイズのAPS プロセスII魚について改善された海水への適応の最初の30日の期間を反映する。それにもかかわらず、海水移行後の全60日の期間中、より小型の20g APS プロセスII魚（FCR（60日）0.97）の平均FCRは、より大型の40g APS プロセスII魚（FCR（60日）1.0）により示されたものに匹敵した。しかしながら、両群のAPS プロセスII魚は、淡水中で成長させ、同一の分量の食餌を与えた対応する対照と比べて、より大きなFCRを示した（20g 淡水 - FCR（60日）0.78；40g 淡水 - FCR（60日）0.71）。これらのデータは、海水移行のわずか60日後にAPS プロセスII魚が非常に望ましい0.8未満のFCRを達成する実施例12に開示したデータに一致する。

30

【0241】

61日試験期間中に各群により示された1日あたりの飼料摂取の比較

図38および39は、稚魚サケの4群のそれぞれにより達成された1日の食餌消費を、1日あたりの体重に対する%で表していることを示す。これらの魚は、海水への移行後48時間まで食餌を与えず、61日の試験期間中、第21、22、31、32、55および56日目には食餌を与えなかった。図38に示すように、移行時重量20gのAPS プロセスII魚は、淡水中での対応する対照と比べて低下した割合であったが、第3日目に食餌を与えると、即座に食餌を摂取し始めた。食餌の摂取は、1日あたりで大きく変動したが（以前に記載されており、水中養殖した魚にとっては正常と広く認められている）、これらのデータは、APS プロセスII魚の食餌消費が、海水移行後約25～30日までは、対応する淡水対照により示されるものと同等のレベルに達しなかったことを示す。

40

【0242】

図39は、海水への移行時40gの重量を有するAPS プロセスII魚対淡水で管理した対応する対照の食餌消費を比較するものである。20g APS プロセスII魚により示されたものと同様に、40g APS プロセスII魚もまた、淡水の対のものと同じの割合で食餌を消費する

50

ために少なくとも25日を必要とした。これらのデータは、海水への移行後20日以上の方食餌摂取を示す、ずっと大型の100gmの現在の産業標準タイセイヨウサケスマルトと比べて、海水移行後のAPS プロセスII魚の抑制された食餌摂取が顕著に短い期間であることのさらなる証拠を提供する。

【0243】

これらのデータは、食物栄養分の感知および利用において重要な役割を果たす種々の器官に存在するPVCRタンパク質の役割と一致する。実施例3～6に示すように、これらの組織としては、嗅覚層板、嗅覚神経および嗅覚葉（塩分および栄養分を感知する）、迷走神経葉およびカハル副核を含む味脳核（腸運動および食欲の調節）ならびに稚魚サケ科魚の胃、幽門盲腸（pyloric caeca）、近位および遠位腸に存在する上皮細胞および神経内分泌細胞（食物栄養分の処理および吸収）が挙げられる。このように、APS プロセスIIは、これらのPVCRの発現および/または感受性をモジュレートし、それにより、淡水から海水への移行後の魚による食餌の摂取および利用の両方を改善する。

10

【0244】

実施例14：APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかで処理した場合の、大型90～100gmの産業標準タイセイヨウサケスマルトの海水移行および成長の比較

これらのデータは、APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかに6週間曝露した、より大型（90～100gm）の高速成長タイセイヨウサケスマルトの海水生存率および初期成長速度を比較するものである。これらのデータは、APS プロセスI またはIIで処理した魚の両方が、海水移行後の37日の期間にわたって同一の速度で成長したことを示す。両群は、同一の低い海水移行後死亡率を有した。データは、より大型（90～100gm）タイセイヨウサケに対するAPS プロセスIIの適用が、同一の魚をAPS プロセスI で処理した場合に示されるものに匹敵する海水後死亡率および成長速度をもたらすことを示す。

20

【0245】

実験プロトコルの記載：約90gmの重量の大型の高速成長する稚魚Landcatch/St John タイセイヨウサケの単一の群を業者から購入し（Maineのタイセイヨウサケ）、体長および体重が対応する等しい大きさの2つの群に分け、それぞれを、別の槽内で、APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかで6週間処理した。次いで、体長および体重を得た後、各群の個々の魚を標識し、次いで、単一の大きな研究用海水槽に移行した。すべての魚に乾燥（<9%水分）海水食餌を与えて海水中で37日間成長させた後、魚を測定し、標準式を用いてSGRを算出した。

30

【0246】

結果：表16は、海水移行の直前対海水で37日間成長させた後の、APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかで処理したスマルトの平均体重、体長および条件因子（k）を比較するものである。これらのデータは、海水移行前で、APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかで処理したスマルト間において体格特徴に有意差がなかったことを示す。APS プロセスI 魚およびAPS プロセスII魚の両方は、37日間の海水での成長後、低死亡率2～3%ならびに体重（約30%）および体長（約9～10%）における有意な増加の組み合わせを示した。しかしながら、37日間の海水での成長後のAPS プロセスI 対APS プロセスII魚の体重を比較すると、有意差はなく、これは、各群の魚が類似する量で成長したことを示す（APS プロセスI のSGR=0.80対APS プロセスIIのSGR=0.86）。

40

【0247】

【表16】

表16：APSプロセスIまたはAPSプロセスIIのいずれかで処理し、37日間海水中で成長させたより大型のタイセイヨウサケスモルトの体格特徴の比較

	APSプロセスI	APSプロセスII	P値*
海水移送	n=50	n=60	
体重	97.2±24.2	94.2±18.1	0.19
体長	22.1±1.67	21.6±1.3	0.5
条件因子	0.89±0.09	0.93±0.065	0.6
37日海水後	n=58	n=59	
体重	130.3±36.5	123.7±35.8	0.16
体長	23.9±1.87	23.7±1.8	0.8
条件因子	0.93±0.12	0.91±0.13	0.4
P値*	<0.01	<0.01	
SGR	0.86	0.80	

P値*：APSプロセスI対APSプロセスIIの体重、体長およびkを比較する

P値*：APSプロセスIまたはAPSプロセスIIに供した単一の種類の魚について、海水移送対37日間海水成長後の体重を比較する

【0248】

図40A～Bは、海水移行前対37日間の海水成長での、APS プロセスI またはAPS プロセスIIのいずれかで処理した魚の体重および体長を比較するものである。

【0249】

これらのデータは、APS プロセスI およびAPS プロセスII群の両方に属する魚が、海水成長のこの37日の期間中に、成長して類似の望ましい条件因子（k - 表I 参照）を維持したことを示す。総合すると、これらのデータは、より大型（90～100gm）タイセイヨウサケに対するAPS プロセスIIの適用が、同一の魚をAPS プロセスI で処理した場合に示されるものに匹敵する、海水移行後最初の37日間での海水後死亡率および成長速度をもたらすことを示す。

【0250】

実施例15：APS プロセスI での処理後の海洋網生簀内または現在の養殖法に供したより大型の産業標準タイセイヨウサケスモルト（100～75gm）の海水移行および成長の比較
APS プロセスI で処理した魚および対の産業標準法で処理した対の対照を、APS 処理魚の海水配置後、合計185日間、研究した。合計3つの主な結論が得られ、それぞれがAPS プロセスI の価値および有用性を示した：

【0251】

1. 従来の「スモルトウィンドウ」の制約の除去：海洋網生簀配置後に観察された死亡率は、APS スモルトにおいて、これらの魚が、スモルトウィンドウ後の1.5ヶ月後に海水に、非常に高い（15.1）海洋水温度内に移行されたという事実にもかかわらず低かった（6.1%）。APS スモルトの死亡率は、64日早いスモルトウィンドウ中に、より低温（10）の海水に移行された産業標準スモルト（33%）のものと類似する。APS 処理スモルトのこの特徴は、APS スモルトの配置は業界慣例法で現在使用されている従来の「スモルトウィンドウ」に厳格に規定されないため、淡水孵化操作においてより大きな融通性を提供する。

【0252】

2. 浸透圧ショックの低減または排除による海水移行後の期間中の高速成長：APS スモルトは、海水移行中およびその直後にピーク状態にあった。完全な食餌摂取に達するのに少なくとも20日を必要とする産業標準スモルトとは異なり、APS スモルトは48時間以

内に激しく食餌を摂取した。さらに、A P S スモルトにより示される初期成長速度は、海水配置後最初の50日中での標準スモルトに関して公表されたデータ、ならびに全185日の試験期間中で産業標準の対のものにより示された任意のSGRの両方より有意に大きかった。その結果、A P S スモルトは、産業標準スモルトがともに海水配置時に25%大きいという事実および海水中での64日のさらなる期間を有したという事実にもかかわらず、産業標準スモルトと同一の平均サイズの達成に近づいた。これらのデータは、A P S スモルトが有意な浸透圧調節ストレスに曝されていないという証拠を提供し、このことが、魚の即時の摂餌を妨げないのであろう。

【0253】

3. 市販サイズのサケに到達するまでの期間の低減：海洋網生簀配置直後の96日の期間中での、APS プロセスIで処理したスモルトの急速成長は、海水成長が進行するにつれて、サケのサイズにおいていっそう大きな増加を提供する。したがって、APS プロセスIで処理されたこれらの魚を普通のスモルトウィンドウ中に配置した場合、その同じ網生簀部で成長させた産業標準魚と比べて7ヶ月も早く市販サイズに達することが予期される。

10

【0254】

実験プロトコルの記載：APS プロセスI 処理群および産業標準対照群の両方の特徴を含む実験設計を実施例2に詳述する。APS プロセスI 処理および対照の海水移行の初期データならびに比成長速度（SGR）を表2～4に提供する。

【0255】

結果：表4は、51日および115日の海水成長後のAPS プロセスI 処理魚および対照魚の両方のSGRに関するデータを提供する。これらの同一の研究を、以下の表17に示すようにして拡張している。

20

【0256】

【表17】

表 17 : 網生簀内での成長後のAPSプロセスI処理に供したSt. John S1
スモルト対対応する業界標準スモルトの特徴の一覧表

	APS	業界標準対照
魚全体	10,600	150,577
海水移送の 平均日時	6/26/00	5/7/00
移送時の平均 サイズ (gm)	76.6	95.8
30日後の死亡率 (数および全体の%)	648; 6.1%	5,016; 3.3%
<u>解析#1データ (8/17/00)</u>		
網生簀配置と 解析#1間の期間	51 日	115 日
平均重量 (gm)	175.48±50	327.2±97
<u>比成長率 (SGR)</u>	<u>1.80</u>	<u>1.09</u>
<u>解析#2データ (10/1/00)</u>		
解析#1と 解析#2間の期間	45 日	45 日
平均重量 (gm)	335.3±42	457.2±62
<u>比成長率 (SGR)</u>	<u>1.44</u>	<u>0.744</u>
<u>解析#3データ (1/2/01)</u>		
解析#2と 解析#3間の期間	90 日	90 日
平均重量 (gm)	618.9±203.8	859.3±231.7
<u>比成長率 (SGR)</u>	<u>0.68</u>	<u>0.70</u>

【0257】

APS プロセスIで処理したスモルトは、最適期間後、すなわち「スモルトウィンドウ」の1.5ヶ月後に海水に、非常に高い(15.1)海洋水温度に移行されたという事実にもかかわらず、死亡率は、スモルトウィンドウ中に、より低温(10)の海水に移行された産業標準スモルト(33%)のものと類似した。このAPS プロセスI処理スモルトの能力は、APS プロセスI処理スモルトの海水移行が、従来の「スモルトウィンドウ」に厳格に規定されないため、サケ養殖操作においてより大きな融通性を提供する。

【0258】

表17ならびに図6Aおよび42に提供されたデータは、APS プロセスIで処理されたスモルトが、特に海水移行後最初の96日の期間中に、産業標準対照と比べて、より大きなSGRおよび増大した食餌消費を示したことを示す。APS プロセスI処理魚および対照魚の両方に関するSGRの全体的な低下傾向は、十分に記載されており、主に、夏から秋にかけてのような第2番目および第3番目の期間中の光周期における季節性低下によるものである。図6Aに示すように、海水配置後の最初の7日間にAPS プロセスI魚によって消費さ

れた食餌は、海水への移行後30日の産業標準スマルトと比べて、魚1匹あたりで約2倍多かった。

【0259】

図41は、APS プロセスI 処理魚対対照のSGR のグラフによる比較を提供するものである。APS プロセスI 処理魚の平均SGR は、海水移行後最初の64日の期間中、産業標準スマルトと比べて80~90%大きかった。このより大きなSGR 値は、APS プロセスI 処理魚が、64日早く海水に移行されたより大型の産業標準スマルトのサイズの約80であったという事実から、さらにより重要である。これらの因子（海水移行時の体格がより小さい、および海水への馴化時間がより少ない）の両方が、顕著にSGR 値を低下させる傾向にあることが一般に認められている。これらのデータは、APS プロセスI で処理したタイセイヨウサケが、海水移行後の対照魚と比べて大きな成長速度を示すことを示す。

10

【0260】

図42は、海水への移行後の、APS プロセスI で処理されたスマルトの体重および体長の両方における増加を示す。APS プロセスI で処理されたこれらの魚は、この185日の期間中に体重において8倍の増加を経験したことに注目されたい。その結果、APS スモルト（図43において白四角）は、産業標準スマルトがともに海水配置時に25%大きいという事実および海水中での64日のさらなる期間を有したという事実にもかかわらず、産業標準スマルト（黒ひし形）と同一の平均サイズの達成に近づいた（図43）。これらのデータは、APS スモルトが有意な浸透圧調節ストレスに曝されていなかったという証拠を提供し、このことが、魚の即時の摂餌および急速な成長を妨げないのであろう。

20

【0261】

図43に示すように、海洋網生簀配置直後の96日の期間中での、APS プロセスI で処理したスマルトの急速な成長は、海水成長が進行するにつれて、サケのサイズにおいていっそう大きな増加を提供する。例えば、これらのAPS プロセスI 魚はともに、これらの産業標準スマルトと同じ平均サイズ（95.8gm）であり、同時に海水に配置されると、現行の試験期間において産業標準魚により達成される859gm のかわりに1620gmの重量となるだろう。したがって、APS プロセスI で処理されたこれらの魚は、その同じ網生簀部で成長させた産業標準魚と比べて7ヶ月も早く市販サイズに達するだろう。

【0262】

実施例16：APS プロセスI で処理し、海水研究室タンクへ移行した後の84日のインターバルの間の26.6gmの平均重量を有する稚魚タイセイヨウサケの育成

30

これらのデータは、産業標準S1スマルトの約30%の平均体長を有する稚魚タイセイヨウサケがAPS プロセスI での6週処理後の淡水から海水への移行を首尾よく成し遂げ得ることを示す。しかし、より大型の産業標準スマルト同様、これらのAPS プロセスI 魚は、飼料転換比またはFCR における減少を伴うSGR における有意な増加の前にほとんど育成しないかまたは育成しない重大な61日インターバルをこうむる。

【0263】

実験用プロトコールの記載：実施例2に記載したように、Landcatch/St.John タイセイヨウサケをAPS プロセスI で処理し、次いでAPS 研究室内の海水を含む循環タンクへ移行した。海水移行48時間後、APS プロセスI 魚に、通常の産業サケと比較してより小型のAPS プロセスI 魚に、より小型のサイズの飼料を提供する必要性に起因して再小粒状にされている標準的な湿った（38%水分）スマルト飼料（Connors Bros.）を与え始めた。26.6gmの重量のあるこれらの108匹のAPS プロセスI の死亡、飼料消費、育成および全体的な健康を、実施例2に示されるように綿密にモニタリングした。

40

【0264】

結果：表5に列挙した140匹のAPS プロセスI 魚のうち合計108匹を、合計84日間綿密にモニタリングした。この群のうち残りの32匹の魚を、本明細書に報告していない他の実験に利用した。

【0265】

表18に示すように、これらのAPS プロセスI 魚の全死亡は、18/108または16.6%であっ

50

た。15gm未満の重量の魚間の死亡の割合は、15gmより重い重量の魚（7/108）と比較していくらか大きかった（11/108）。これらのAPS プロセスⅠ魚についての成長速度は、これらの魚に湿った飼料（38%水分含有量）を給餌する場合、海水後初期61日間は不十分（SGR0.375）であった。しかし、これらの魚についての平均SGRは、APS プロセスⅠ魚に標準的な乾燥飼料（<10%水分含有量）を給餌する場合、最後の23日インターバルの間で改善した。同様に、APS プロセスⅠ魚の飼料変換比（FCR）は、海水移行後のこの初期61日インターバルの間は不十分（FCR(av)=4.19）であったが、最後の23日インターバルの間で有意に改善した（FCR 0.89）。これらのデータは、不十分な給餌および緩慢な成育の長期のインターバルが報告されている今日の従来技術を用いて海水へ移行したより大型の（100gm）スマルトに現れたデータに類似している。

10

【0266】

【表18】

表 18：APS 研究室タンクにおける成育後の APS プロセスⅠ Landcatch/St John スモルトのデータのまとめ

魚数	108	インターバルを通じての死亡率%		合計死亡率%
		15gm 未満	15gm 以上	
海水への配置時の体重	26.6			
<u>分析番号 1 (10/3/00)</u>				
海水における日数	22			
死亡率で補正した配置体重	26.75*			
海水におけるインターバル後の体重	30.31			
海水において増加した体重*	3.56			
SGR（体重%/日数）	0.57			
30%H ₂ O 含有量で補正した FCR	1.20			
*より小さい魚間で選択された死亡率で補正された体重増加		1/108 または 0.9%	1/108 または 0.9%	1.8%
<u>分析番号 2 (11/12/00)</u>				
分析番号 1 からの海水における日数	39			
死亡率で補正した配置体重	31.37*			
海水におけるインターバル後の体重	33.90			
海水において増加した体重*	2.53			
SGR(分析番号 1 から分析番号 2 のインターバル)	0.18			
30%H ₂ O 含有量で補正した FCR				
（分析番号 1 から分析番号 2 のインターバル）	7.18			
*より小さい魚間で選択された死亡率で補正された体重増加		6/106 または 5.6%	5/106 または 4.7%	12.0%
<u>分析番号 3 (12/06/00)</u>				
分析番号 1 からの海水における日数	23			
死亡率で補正した配置体重	35.04*			
海水におけるインターバル後の体重	49.07			
海水において増加した体重*	14.03			
SGR(分析番号 2 から分析番号 3 のインターバル)	1.45			
FCR 乾燥飼料に配置した魚	0.89			
（分析番号 2 から分析番号 3 のインターバル）				
*より小さい魚間で選択された死亡率で補正された体重増加		4/95 または 4.2%	1/95 または 1%	16.7%

20

30

40

【0267】

図 4 4 に示すデータは、海水における成育61日後対海水配置時のAPS プロセスⅠ魚の身体

50

特徴の比較を提供する。これらのデータは、APS プロセスⅠ 魚のこの群が、湿った飼料を給餌している事実にも関わらずその適切な体重/体長比を維持しながら緩慢に育成したことを示す。まとめると、これらのデータは、APS プロセスⅠ 魚が首尾よくより大型の産業標準タイセイヨウサケモルト (100gm) について報告された様式とほぼ同一の様式で海水移行をこうむり得るが、そのより大型の対照物の約1/3 の平均体重を有することを示す。

【 0 2 6 8 】

実施例 17 : 異なるPVCRアゴニストを含有する食餌管理を受けた後の海水移行後初期72時間の稚魚タイセイヨウサケの示差生存

合計 3 つのPVCRアミノ酸アゴニスト (トリプトファン、チロシンおよびヒスチジン) を試験し、海水移行後初期72時間インターバル間の稚魚タイセイヨウサケの生存を高める能力を測定した。本明細書に開示するデータは、稚魚タイセイヨウサケの飼料中のトリプトファンの含有が、チロシンまたはヒスチジンのいずれかと比較して海水移行後の魚の生存増加に有意に有効であることを示す。トリプトファンと別のPVCRアゴニスト ($MgCl_2$) の含有は、トリプトファン単独と比較した場合、海水生存を改善しない。

【 0 2 6 9 】

実験用プロトコルの記載: 単一の孵化由来の約15gmの平均体重 (範囲5.50 ~ 30.5gm) を有する稚魚タイセイヨウサケ (St. John/St. John 株) を、それぞれ45匹の魚の同一の対応群に分け、淡水 (対照) または3mM Ca^{2+} および1mM Mg^{2+} を含有する淡水のいずれかで管理した。魚食糧を、3つのアミノ酸のうちの1つを用いて実施例 8 に記載のように処方して調製し、魚に、14日のインターバルの間一日 2 回給餌した。次いで、魚を、APS 研究室内の海水を入れている循環タンクへ移行した。

【 0 2 7 0 】

死亡を24時間毎に定量し、72時間後、示差死亡率を比較した。全魚を実験の存続の間、連続的な光周期に曝した。

【 0 2 7 1 】

結果: 表 19 は、稚魚サケの海水への移行後に観察された死亡率を示す。72時間実験インターバル間に観察した全死亡の比較を、図 45 に示す。淡水で管理し、標準的な飼料 (44%) のみを与えた対照稚魚サケの海水移行初期の死亡とは対照的に、いずれの 5 PVCR調節因子の添加も、海水移行死亡率を有意に ($p < 0.05$) 減少した。7%NaCl 単独添加の食餌 [#2] (APS プロセスⅠ) は、9%未満まで初期の海水移行死亡率を減少した7%NaCl + トリプトファンの両方の含有 [#3] (APS プロセスⅡ) と比較して死亡において50%の減少を生じた。

【 0 2 7 2 】

【表 19】

10

20

30

表 19：事前に 14 日間の食餌摂生に曝した稚魚タイセイヨウサケの個々の群
 (n=45 平均重量 15gm) における海水移動後の初期 72 時間の間に観察された死亡率

食餌添加+前処理	死亡数				
	24hr	48hr	72hr	合計	%合計
1. 対照食餌+淡水	4	7	9	20	44
2. 7%NaCl 添加	2	4	4	10	22
3. 7%NaCl+トリプトファン 2gm/Kg	0	0	4	4	8.9
4. 7%NaCl+チロシン 2gm/Kg	2	3	4	9	20
5. 7%NaCl+ヒスチジン 2gm/Kg	2	4	8	14	31
6. 7%NaCl+トリプトファン 2gm/Kg +2% MgCl_2	1	1	3	5	11.1

注:群番号 2～6 における全魚を、海水移動の前 2 週インターバルの間 3mM Ca^{2+}
 および 1mM Mg^{2+} を含む水中で管理した。

10

【 0 2 7 3 】

この低い死亡率は、食餌中へのPVCR機能の第 3 の調節因子の含有 (7%NaCl + 2mg/kgトリプトファン + 2%MgCl₂) [# 6] によっては変わらない (p > 0.3)。対照的に、チロシンまたはヒスチジンのいずれかの添加は、トリプトファン (8.9%) と比較して海水移行後の死亡において有意に低い減少 (それぞれ20% および31%) を生じた。

20

【 0 2 7 4 】

実施例 1 8 : 抗PVCRポリクローナル抗血清を用いる個々のタイセイヨウサケの種々の組織におけるPVCRの検出のための固相酵素連結アッセイの説明

魚の種々の組織のPVCR含有量を、ELISA 96ウェルプレートアッセイ系を用いて定量し得る。本明細書に記載するデータは、96ウェルELISA アッセイの有用性を示し、免疫細胞化学およびウエスタンブロットを実施するために利用されるウサギポリクローナル抗PVCR抗体を用いてPVCRタンパク質の組織含有量を定量する。これらのデータは、本明細書に記載するように本発明の処理を受ける稚魚溯上性魚の種々の組織におけるPVCRタンパク質の発現レベルをモニターする商業アッセイキットの開発に対する基礎をなす。このELISA の感受性を、図 4 6 に示すように、単一の稚魚タイセイヨウサケ由来の14個の組織の相対的PVCR含有量の測定によって示す。

30

【 0 2 7 5 】

実験プロトコルの説明：

ホモジネートを稚魚タイセイヨウサケ (St. John/St. John 株 平均重量15～20gm) の種々の組織を緩衝液 (10mM HEPES1.5mM MgCl_2 、10mM KCl、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、0.5 ジチオスレイトール (dithiothreitol) (DTT) および1mM ベンザミジンpH8.8) に置いて、回転乳棒を備える標準的なガラスPotter-Elvehjemホモジナイザーを用いて調製した。より大きな残屑を除去するため 4、2,550 × g で20分間遠心分離後、上清を直接使用するか、またはさらなる使用まで-80 で冷凍するかのをいずれかをした。ホモジネートタンパク質濃度を、BCA アッセイキット (Pierce Chem.Co.) を用いて測定した。個々の組織ホモジネートのアリコート量を、100 μ L の一定のアリコートサイズに希釈し、それぞれを96ウェルプレート (Costar PLastic PLates) へ移行し、15時間、室温空气中で乾燥させた。TBS (25mMのTris137mM の塩化ナトリウム、2.7mM のKCl pH 8.0) 中に5%脱脂粉乳 + 0.5%Tween20 の溶液を用いて非特異的結合のブロック後、一次抗血清 (ウサギ抗PVCR免疫または対応するウサギ免疫前抗血清のいずれか) を1 : 1500で希釈した。1 時間インキュベーション後、個々のウェルを、500 μ L のTBS を用いて3 回リンスし、1 : 3000の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ウサギ (Gibco-BRL) を

40

50

添加し、1時間インキュベートさせた。次いで個々のウェルをリンスして、15分のインキュベーション後Molecular Devices 96ウェルプレートリーダー (Molecular Devices, VMA X) を使用して405nm でSigma A3219 2,2'-アジノ - ビス (3-エチルベンズチアジジン (ethylbenzthiazidine) -6-スルホン酸) 着色試薬を用いて結合した一次 - 二次抗体の複合体を検出した。組織PVCR含有量の相対量を、最小バックグラウンドおよび免疫前抗血清の結合によって測定される非特異的抗体結合について補正した後、測定した。

【0276】

結果およびデータ説明：

図46は、単一の稚魚タイセイヨウサケの14個の組織のPVCRタンパク質含有量の典型的な単一ELISA測定から得られたデータを示す。上で概説したような実験プロトコルに明記する条件下で、一次および二次抗体の両方の非特異的結合を最小化した。これらの定量値を絶対量ではなく互いに比較して測定するが、各組織の広範囲な免疫組織化学試験に対応するデータを生じる。種々の器官のPVCR含有量がタイセイヨウサケの浸透度調節においてその重要性を示すことに注目すること。本明細書に記載される免疫組織化学データは、腸（近位域および遠位域）、鰓、膀胱および腎臓などの組織がPVCRタンパク質を含んでいたことを示す。各場合において、これらの組織の表面をぬらす（bathe）体液に接触する上皮細胞は、PVCRを発現する。対照的に、他の器官（肝臓、心臓および筋肉が挙げられる）は、最小のPVCRタンパク質を含有する。試験した任意の組織の最高のPVCR含有量は、嗅覚ラメラであることに注目すること。この嗅覚ラメラで、サケは水中のカルシウム濃度における変化を「匂う（smell）」能力を有する。嗅覚ラメラを刺激する神経を含む嗅球はまた、豊富なPVCRを有する。まとめると、これらのデータは、PVCRタンパク質の組織含有量を測定し、本発明のプロセスを受けた稚魚溯上性魚の種々の組織におけるPVCRタンパク質の発現レベルをモニターする商業用アッセイキットの開発の基礎をなすためのELISAキットの有用性を示す。次いで、組織PVCR含有量における相対的变化または組織質量あたりのPVCRの絶対量のいずれかにおいて測定されたPVCR組織含有量における変化を、相関性アッセイとして利用して、海水移行または給餌の開始に対する稚魚溯上性魚の準備（readiness）を測定し得た。これらのデータは、本発明の方法での処理後、魚を淡水から海水へ移行するために利用される体長の範囲内の個々の稚魚タイセイヨウサケでこのようなアッセイを実施可能であることを示す。

【0277】

実施例19：タイセイヨウサケPVCRタンパク質のカルボキシル末端部分から作製される抗体は、PVCRタンパク質の存在、非存在または量を測定するための免疫組織化学および免疫プロットアッセイに有効である。

本明細書に記載する縮重プライマー、配列番号22および/または23を、SKCaR DNA 配列から特異的に構築した。これらのプライマーは、ゲノムDNA およびcDNAの両方由来のPVCR配列の一部分の増幅用に有用な試薬であることが証明されている（実施例20を参照のこと）。

【0278】

溯上性魚のPVCRからより多くのcDNA配列、特に、PVCRのカルボキシル末端ドメインの推定アミノ酸配列（特異的ペプチドおよび結果として特異的抗タイセイヨウサケPVCR抗血清の産生に対する標的）を得て、タイセイヨウサケ腸由来の未増幅cDNAライブラリーを構築した。このcDNAライブラリーから生じるファージブランクを、³²P 標識653bp ゲノムタイセイヨウサケPCR 産物（配列番号1）を用いて高ストリンジェンシー下でスクリーニングした。このcDNAライブラリースクリーニング努力から、2,021bp cDNAクローンを単離し、このクローンは、腸PVCRタンパク質由来の完全cDNA配列の約半分に対応する推定アミノ酸配列に対する単一のオープンリーディングフレームを含有していた。この推定アミノ酸配列は、対応ゲノムプローブによってコードされる配列およびPVCRのカルボキシル末端ドメインに対応する推定アミノ酸配列に正確に対応する。

【0279】

この推定アミノ酸配列の知識に基づいて、ペプチド（以下に示す）を合成し、このペプチ

ドは、推定カルボキシル末端PVCRアミノ酸配列の別個の領域に対応した。

【0280】

抗体産生のためのペプチド配列は、以下：

ペプチド#1：Ac-CTNDNDSPSGQQRIHK-アミド（配列番号24）

であり、ウサギ抗血清SAL-1を産生する。

【0281】

このペプチドを、キャリアタンパク質に誘導体化し、ポリクローナル抗体を作製する方法を用いて2羽のウサギにおいてペプチド特異的抗血清を惹起するために利用した。

【0282】

次いで、生じたペプチド特異的抗血清を、免疫ブロット技術および免疫細胞化学技術の両方を用いて試験して、抗体がPVCRタンパク質に対応するタンパク質バンドに結合するか、または他の抗PVCR抗血清を用いて生じた染色パターンと類似の染色パターンを生じるかどうかを測定した。SAL-1（配列番号24）またはSKCaR（配列番号18）のいずれかを含むペプチドに対して惹起した抗血清により認識されるタンパク質バンドを示す免疫ブロットの写真を撮った（図28A～E）。予想したように、ペプチドに対して惹起した抗血清は、SKCaR（配列番号18）に対して惹起した抗血清により認識されるPVCRタンパク質と共に同時電気泳動したタンパク質バンドに一致した。3つの異なる抗PVCR抗血清（抗Sal1、抗4641、および抗SKCaR）を用いる稚魚タイセイヨウサケ腎臓切片の免疫染色は、サケ腎臓の小管中でPVCRタンパク質の類似の局在化を生じる。抗SKCaR抗血清によって生じた染色は、抗4641抗血清（SKCaR（配列番号18）に非常に類似する哺乳動物PVCRの細胞外ドメインに対応する抗ペプチド抗血清）によって生じた染色と同一であった。これらのPVCRタンパク質パターンは、SAL-1抗血清によって生じたパターンと全く同じに染色した。抗Sal-1抗血清はまた、抗SKCaRと比較して腸PVCRタンパク質の分布について類似の染色パターンを示す。従って、この新規な抗血清は、タイセイヨウサケ組織におけるPVCRに特異的である。この抗血清を使用して、本明細書に記載の方法を用いて魚の種々の組織中のPVCRの存在、非存在または量を測定し得る。

【0283】

実施例20：種々の組織におけるPVCRの発現を検出するための逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）の使用

実施例1、2において、縮重プライマー、配列番号22および23を開示する。これらの2つのプライマーを使用して、ゲノムDNAを増幅し、種々の溯上性魚由来のPVCRのゲノムDNA配列の一部分の配列を得た。これらの同じプライマーをまた使用して、種々の組織において対応PVCR mRNA転写物の一部分を増幅し得る。特定のタイセイヨウサケ組織（嗅覚ラメラ、腎臓、膀胱）から増幅されたcDNAのDNA配列解析は、本明細書に記載される特定のゲノムPVCR配列（例えば、配列番号1 - タイセイヨウサケ）と全て同一である。これらのデータは、以下を示す：

【0284】

1. PVCR mRNA転写物は、溯上性魚の特定の組織において実際に発現される。これらのデータは、抗PVCR抗血清によって検出されるようなPVCRタンパク質発現に関するデータを強化する。

【0285】

2. 海水への移動に対する溯上性魚の準備を予測するための手段としてRT-PCR法を使用して、種々の組織におけるPVCR発現の程度を検出および定量し得る。

【0286】

3. 溶液または固相DNA-DNAもしくはDNA-RNA核酸ハイブリダイゼーションを使用してPVCR発現を検出するか、あるいは特異的抗PVCR抗血清の産生に使用される推定PVCRタンパク質配列を得るための特異的cDNAプローブとして使用するためcDNAプローブを、溯上性魚の特定の組織から産生し得る。

【0287】

RT-PCR法：

10

20

30

40

50

総RNA を、Teltest B 試薬 (Friendswood, TX) を用い、かつ標準的プロトコールに付随して選択した組織から精製した。合計 5 μ g の総RNA を、Invitrogen の cDNA Cycle Kit (Invitrogen Inc, Madison, WI) を使用してオリゴdTプライマーを用いて逆転写した。生じたcDNA産物を変性し、第二回の精製を実施した。2 μ L の生じた反応混合物を、縮重プライマー配列番号 22 および 23 を用いてPCR 反応 (1 分@ 94 、 2 分@ 57 、 3 分@ 72 の 30 サイクル) において増幅した。生じた産物を、増幅cDNA産物の検出のために臭化エチジウムを含有するTAE 緩衝液を用いて 2 % (w/v) アガロースゲル上で電気泳動した。ゲルを、標準的研究室方法を使用して、写真に写した。

【 0 2 8 8 】

RT-PCR産物のDNA 配列決定を以下のように実施した：

10

合計15 μ L のタイセイヨウサケ膀胱、腎臓および鼻腔ラメラRT-PCR反応物を、40 μ L の水に希釈し、AmershamのMicroSpin S-400 HRスピンカラム (Amersham Inc, Piscataway, NJ) 上のサイズ排除により精製した。精製DNA を、配列決定プライマーとして縮重PVCRプライマー (配列番号 22 および 23) を用いて配列決定した。自動配列決定をApplied Biosystems Inc. Model 373A Automated DNA Sequencer (University of Maine, Orono, Maine) を用いて実施した。生じたDNA 配列を、Mac Vector (GCG) およびLaserGene (DNA STAR) 配列解析ソフトウェアを用いて整理した。

【 0 2 8 9 】

サザンブロットによる増幅RT-PCR cDNA 産物の検出：

代替的に、増幅PCR 産物の存在を、32P 標識653bp タイセイヨウサケ増幅ゲノムPCR 産物 (配列番号 1) を用いてゲル分画RT-PCR産物のサザンブロット解析によって検出した。合計10 μ L の各PCR 反応物を、TAE 緩衝液を用いて 2 % (w/v) アガロースゲル上で電気泳動し、次いでMagnagraph膜 (Osmonics, Westboro, MA) 上にブロットした。DNA のuv架橋後、ブロットをプレハイブリダイズし、次いで653bp タイセイヨウサケPCR 産物 (RadPrime DNA Labeling System, Gibco Life Sciences で標識化) を用いて一晩プローブした (6 $\times$ SSC 、 5 $\times$ Denhardt試薬、0.5% SDS 100 μ g/ml子ウシ胸腺DNA)。次いで、ブロットを、0.1 $\times$ SSC 、 0.1% SDS @55 で洗浄し、標準的な条件下でオートラジオグラフィに供した。

20

【 0 2 9 0 】

図 4 7 は、稚魚タイセイヨウサケの種々の組織由来の部分的PVCR mRNA 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。RT-PCR反応物を、ゲル電気泳動によって分離し、臭化エチジウム (EtBr) で染色するか、または膜に移動しタイセイヨウサケPVCR遺伝子由来の32P 標識653bp ゲノムDNA フラグメントを用いてサザンブロットするかのいずれかをした。図 4 7 は、本明細書に記載するように、RT-PCR法を用いたタイセイヨウサケのいくつかの組織型におけるPVCRの検出を示す。組織型は、鰓、鼻腔ラメラ、膀胱、腎臓、腸、胃、肝臓、および脳である。

30

【 0 2 9 1 】

実施例 2 1 : APS プロセスIIを用いた稚魚タイセイヨウサケの処理は、海水への移行後の生存に必要なより有効な鰓機能をこれらの魚に準備させる、鰓上皮細胞の構造および機能の両方における変化を生じる

40

本明細書に記載のデータは、稚魚タイセイヨウサケの鰓塩類細胞 (chloride cell) がPVCRタンパク質を有すること、およびAPS プロセスIIでの処理に対応して稚魚タイセイヨウサケは、淡水にとどまったままであることを除いて、海水への移行によって生じる鰓塩類細胞の分布に類似の分布をリモデルすることを示す。さらに、本明細書に記載するデータは、APS プロセスIIでの処理に対応して淡水にとどまったままである稚魚タイセイヨウサケの鰓 (幽門盲腸ではなく) は、そのNa+K+ATPアーゼ活性を海水へ移行した魚の活性に類似の様式で二倍にする。まとめると、これらのデータは、鰓塩類細胞に存在するPVCRタンパク質がAPS プロセスIIでの魚の処理に応答し、魚が海水へ移行された後のプロセスに非常に似ている様式で塩類細胞の分布およびNa+K+ATPアーゼ活性の両方をリモデルすることを示すための強力な証拠を提供する。APS プロセスIIでの溯上性魚のこの処理は、海水へ

50

の稚魚タイセイヨウサケの移行後のより速やかな順応ならびにより良い能力および成長を提供する。

【0292】

以下のパラメーターをAPS プロセスI に順応した溯上性魚の鰓塩類細胞について確立している：

1．抗Na+K+ATPアーゼ抗体を用いて塩類細胞の鰓ラメラのパラフィン切片内の位置を測定し得る。サケ科の鰓の一次および二次ラメラの両方における塩類細胞の分布を指標として使用して、APS プロセスの間に魚を移行した後に鰓をリモデルする方法を突きとめ得る。

2．鰓組織のホモジネートに存在するNa+K+ATPアーゼ活性を本明細書に記載する方法（例えば、酵素アッセイ）を使用して、定量し得る。非常に大多数のNa+K+ATPアーゼ酵素が塩類細胞に含まれるので、Na+K+ATPアーゼ酵素活性量における変化を、鰓塩類細胞活性における変化の指標として使用する。一般的に、Na+K+ATPアーゼ活性は、淡水順応したサケ科が海水へ移行され、この新しい高浸透圧環境に対してその鰓をリモデルする場合に有意に増加する。

【0293】

以下に詳細に示すように、両方の技術を利用して、稚魚タイセイヨウサケの鰓塩類細胞の分布および活性における変化を示した。APS プロセスIIでの魚の処理後に生じるこれらの変化は、海水へ移行されたサケ科に生じる変化に類似している。

【0294】

実験プロトコルの説明：

Na+K+ATPアーゼ活性を、McCormick の方法（McCormick, SD 1993. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na+K+ATP アーゼ activity. Can J. Fish Aquat. Sci. 50, 656-658）によって鰓および幽門盲腸（脂肪を除いた）の粗ホモジネートにおいて測定した。96ウェルプレートリーダーを使用した（VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA）。簡単には、組織を切り裂き、氷冷却SEI 緩衝液（300mM スクロース、20mM EDTA、50mMイミダゾール、pH7.3）のアリコート中で凍結し、-80 で保管した。サンプルを、アッセイ直前に解凍し、SEID（0.5 %デオキシコール酸ナトリウムを含むSEI 緩衝液）のアリコートを添加して、最終濃度0.1 %のデオキシコール酸ナトリウムを達成した。サンプルをKontes Dual Tissue Grinder（テフロン（登録商標）/ガラス）中でホモジナイズし、5000g で2分間遠心分離して、不溶性物質を除去した。活性を、ウアバイン（0.5mM）を含むアッセイ混合物および含まないアッセイ混合物中のホモジネートの10μlアリコートにおいて二回測定した。アッセイ混合物は以下：50mMイミダゾール、pH7.5中に2.1mM PEP、0.53mM ATP、0.29mM NADH、3U/ml LDH、3.75

U/ml PK、47.25mM NaCl、2.63mM MgCl₂、10.5mM KClであった。NADH消滅の線形速度を、340nm で10分間測定した。Na+K+ATPアーゼ活性を、ウアバインを含有するATP 加水分解物またはウアバインを含有しないATP 加水分解物における差異から計算し、ウェル中のタンパク質含有量に対して標準化した。タンパク質を、クマシーベースのBio-Rad Protein Assay（Bio-Rad, Hercules, CA）を用いてプレートリーダーにおいて解析した。

【0295】

結果および考察：

海水における稚魚タイセイヨウサケの塩類細胞を、主に鰓の一次ラメラ上に局在化する：サケ科の鰓は、種々の上皮細胞および毛細血管を含むラメラと呼ばれる構造から構成される。鰓ラメラのパラフィン切片により示されるように、各一次鰓ラメラは、多数の二次ラメラを含む。これらの切片の写真を撮った。海水順応サケ科（例えば、本発明の方法に供していない魚）において、塩類細胞は、Na+K+ATPアーゼ抗血清を用いる顕著な染色により同定される場合、ほとんどもっぱら二次ラメラの基底の両側に位置する一次ラメラへ局在化する。

【0296】

稚魚タイセイヨウサケの塩類細胞は、一次および二次鰓ラメラの両方に位置する。鰓ラメ

10

20

30

40

50

ラの切片を、抗Na+K+ATPアーゼまたは抗PVCR抗血清のいずれかを用いて染色し、これらの切片の写真を撮った。塩類細胞は、有意な量のPVCRタンパク質を含む。淡水順応した対の稚魚タイセイヨウサケ由来の鰓は、海水順応魚に存在する塩類細胞の分布と比較して、異なる分布を含む。しかし、魚をAPS プロセスIIに供した複数の実験において、鰓における塩類細胞の分布は、処理魚が淡水にとどまっているにもかかわらず、海水へ移行された魚が示すパターンに似ている二次ラメラ中の塩類細胞数における有意な減少を示すようにシフトした。淡水で管理されている魚において、塩類細胞は、鰓組織の一次および二次ラメラの両方においてほぼ等しい数で局在化する。対照的に、このような魚を海水へ移す場合、この分布は、二次ラメラにおいて観察される塩類細胞が有意にほとんど存在しないように変化する。粘液細胞は、Na+K+ATPアーゼ抗血清では染色しなかった。

10

【0297】

抗PVCR抗血清を用いる隣接切片の免疫染色は、塩類細胞および粘液細胞の両方が有意な量のPVCRタンパク質を含むことを示す。溯上性魚の鰓におけるPVCRタンパク質の存在をSDS-PAGE分離ゲルタンパク質バンドの免疫プロットにより示した実施例3を参照のこと。これらのデータは、鰓の塩類細胞および粘液細胞の両方がPVCRタンパク質を有し、従って鰓組織にわたって流れる水のイオン組成を感じ得ることを示す。

【0298】

APS プロセスIIに曝された稚魚タイセイヨウサケにおける塩類細胞の分布は、このAPS プロセスII処理魚が淡水にとどまっているが、海水順応魚が表わす分布に類似している。鰓組織の切片は、45日の期間APS プロセスIIで処理した対の魚における鰓塩類細胞の分布を示す。塩類細胞の分布は、これらの魚が淡水にとどまっているが、海水順応魚が示す分布に類似している。二次ラメラ(SL)対一次ラメラ(PL)に存在する塩類細胞の分布は、図48に示すような比で発現され得る。SL/PL比は淡水順応サケに対しては約1、海水順応魚に対しては約0.1であることを注意のこと。対照的に、APS プロセスIIで処理した対の魚は、0.3 ~ 0.4のSL/PL比を示す。この値は、淡水で管理した魚とは有意に異なり、海水順応魚により示される値に近づく。まとめると、これらのデータは、鰓塩類細胞のリモデルの証拠を提供し、海水順応魚でのデータに似ている。鰓塩類細胞におけるPVCRタンパク質の存在は、塩類細胞が塩類細胞を取り巻くイオン環境における変化を感じ取ることを可能にし、結果的にリモデルを可能にする。

20

【0299】

APS プロセスIIへの稚魚タイセイヨウサケの処置は、海水へのサケの移行後に評されるNa+K+ATPアーゼ活性の増加と類似の様式で、鰓のホモジネートにおけるNa+K+ATPアーゼ活性を増加する。図49は、淡水で管理したか、または合計45日間APS プロセスIIで処理したかのいずれかの対の稚魚タイセイヨウサケから単離した鰓または幽門盲腸のいずれかから調製したホモジネート中のNa+K+ATPアーゼ活性の比較を示す。APS プロセスIIで処理した魚の鰓由来のNa+K+ATPアーゼ活性は、対の淡水魚由来の鰓での活性のほぼ二倍である。この有意な差異(8.10+/-3.87 対3.76+/-0.94 p < 0.0008)は、特異的である。なぜならば、これらの同じ魚の幽門盲腸由来のNa+K+ATPアーゼ活性(11.0+/-1.76 対11.1+/-1.71 p < 0.35)は、有意に異ならないからである。

30

【0300】

稚魚サケ科魚の海水への移動は、鰓塩類細胞のリモデルを反映するNa+K+ATPアーゼ活性における有意な増加を生じ、海水の飲用の開始時に魚により摂取および吸収されたNaClを除去することを可能にする。まとめると、本明細書に記載するデータは、稚魚タイセイヨウサケのAPS プロセスII処理が、魚が海水への移行なしに淡水にとどまっている間、鰓Na+K+ATPアーゼ活性を増加することを示す。Na+K+ATPアーゼ活性におけるこの増加は、鰓に特異的に現れる。なぜなら、類似の増加は同じ対の魚におけるNa+K+ATPアーゼ活性の豊富な別の器官において生じないからである。

40

【0301】

本明細書に記載するデータは、APS プロセスIIでの稚魚タイセイヨウサケの処理が魚の浸透調節器官におけるNa+K+ATPアーゼ酵素の活性に選択的变化を生じることを示す。これら

50

のデータは、APS プロセスIIが稚魚タイセイヨウサケの海水への移行前に生じる特異的組織のNa+K+ATPアーゼ活性における特異的増加を引き起こすことを示す。これらのデータは、淡水におけるAPS プロセスIIが海水へ移行された後にのみ産業標準魚において通常生じるNa+K+ATPアーゼ活性の増加によく似るという直接的な分子証拠を提供する。

【0302】

APS プロセスIIでの処理に対応して、淡水にとどまる稚魚タイセイヨウサケの幽門盲腸ではなく鰓のNa+K+ATPアーゼ活性は、海水へ移動した魚の活性の増加に類似の様式でそのNa+K+ATPアーゼ活性を有意に増加する。これらのデータは、APS プロセスIIでの処理が海水への移行後の稚魚タイセイヨウサケの生存を増加する方法に関して、直接証拠を提供する。稚魚の海水への移行後の遅延様式を生じる鰓Na+K+ATPアーゼ活性における増加の代わりに、鰓Na+K+ATPアーゼ活性は、淡水でのAPS プロセスII処理の間、増加し、従って海水移行前に上昇する。プロセスIIでの溯上性魚のこの処理は、稚魚タイセイヨウサケの海水への移行後のより速やかな順応ならびにより良い性能および成長を提供する。

【0303】

膜結合Na+K+ATPアーゼ酵素は、淡水および海水の両方において、体成分を維持する魚の能力の重要な部分である。上記のように、鰓の塩類細胞は、この酵素の豊富な供給源である。本発明の工程に供していない魚についての鰓塩類細胞およびNa+K+ATPアーゼ酵素活性における変化を、図50に示す。Seidelinら、Physiol Biochem Zool. 73(4):446-53(2000)を参照のこと。図50におけるデータは、稚魚サケ科における塩分変化に対する細胞性応答の開始と重大なイオン輸送機構の活性化との間の有意な遅延を示す。図50は、淡水で管理した（白棒）か、または25ppt（3/4 海水）へ移行した後（黒棒）のいずれかの淡水順応稚魚マス（体重51gm平均）由来の鰓組織ホモジネートのNa+K+ATPアーゼ酵素活性における変化を比較する。海水移行後12時間以内に、Na+K+ATPアーゼ酵素に対するmRNAの有意な増加（図50、パネルA）および二次鰓ラメラのNa+K+ATPアーゼ免疫反応性（NKIR）塩類細胞数の50%減少がある。しかし、Na+K+ATPアーゼ酵素の活性における有意な増加は、海水移行5日後までは生じない。この遅延インターバル（3重線で示す）は、稚魚サケ科が非常にストレスを受ける時間インターバルを表す。なぜならば、新しい高浸透性海水環境を真似るため重要な浸透調節組織様鰓を速やかにリモデルしようと試みるからである。魚が鰓Na+K+ATPアーゼ酵素活性における増加を達成することに失敗した場合、電解質不均等により死亡する。本明細書に記載するように、このインターバルを生存する能力は、魚のサイズ（臨界サイズ）に依存する。

【0304】

対照的に、淡水においてAPS プロセスIIで処理した稚魚タイセイヨウサケは、Gill Disclosure のテキストに詳細に示されるように、海水への移行前に、淡水において両方のNKIR（塩類）細胞の分布をリモデルし、その上鰓Na+K+ATPアーゼ酵素活性を増加する。図49に示すように、淡水で管理したか、またはAPS プロセスIIでの処理直後の魚由来の鰓および幽門盲腸におけるNa+K+ATPアーゼ酵素活性の比較は、幽門盲腸ではなく鰓のNa+K+ATPアーゼ酵素において有意な増加を示す。図49は、淡水で管理したか、または淡水においてプロセスIIで45日間処理したかのいずれかの稚魚タイセイヨウサケの鰓および幽門盲腸由来のホモジネートにおけるNa+K+ATPアーゼ活性の比較を示す。スター（*）は、鰓における酵素活性の有意な（ $p<0.05$ ）増加を示す。

【0305】

従って、APS プロセスIIでの処理は、全ての器官においてNa+K+ATPアーゼ酵素活性を単純に変更するわけではなく、これらの増加は、選択的器官に限定される。産業標準魚で実験した図50に示すNa+K+ATPアーゼ酵素活性の増加における96時間遅延の除去は、APS プロセスIIが海水の代わりのAPS プロセスIIの間に淡水で起きるタイセイヨウサケにおける生理的变化を生じるという直接証拠を提供する。APS プロセスII処理魚の海水への移行の際、これらの変化は、すでに明白であり、従ってこれらの魚に、浸透調節ストレスのインターバルまたは死亡なしに即時に新しい海水環境へ順応する能力を与える。

【0306】

実施例 22 : PVCRは、細胞外カルシウムの存在下で特異的アミノ酸を感じ得る
サメ腎臓カルシウムレセプター (SKCaR) は、細胞外カルシウム (1 ~ 10mM) の存在下で特定のアミノ酸を感じ取る能力を有する。本明細書に記載するデータは、アミノ酸のSKCaR の感受が、上皮経路アミノ酸吸収が生じる血清および体腔を含む魚体の種々の区画 (腸、幽門盲腸および腎臓が挙げられる) に存在する細胞外カルシウムの範囲で生じることを示す。

【0307】

実験プロトコルの説明：

全長組換えアミア (Squalus acanthias) サメ腎臓カルシウムレセプター (SKCaR) (配列番号17) を、ヒト胚腎臓細胞において発現させた。SKCaR cDNAを哺乳動物発現ベクター PCDNA IIにライゲーションし、標準的技術を用いてHEK 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト細胞におけるSKCaR タンパク質の存在を、ウェスタンブロットにより検証した。SKCaR の活性化および個々のアミノ酸またはその混合物に応答する能力を、十分に特徴付けられたFURA-2比画像化蛍光アッセイを用いて定量した。ここで、SKCaR 活性化により生じた細胞内Ca²⁺における増加を検出し、レセプター活性化に対する%標準化細胞内カルシウム応答として表す。Bai, M., S.ら, J.Biol.Chem., 32:19537-19545(1996); Conigrave, Aら, Proc.Nat.Acad.Sci. 97:4814-4819(2000)。

【0308】

結果および考察：

図51は、蛍光計へ配置する前に、10mM L- イソロイシン (L-Ile) の存在下または非存在下で生理食塩水 (125mM NaCl, 4mM KCl, 0.5mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂, 20mM HEPES(NaOH), 0.1 %D-グルコースpH7.4) に浴したSKCaR を安定して発現するFURA-2負荷細胞の蛍光トレーシングの比較を示す。ベースライン細胞外Ca²⁺濃度は、0.5mM であった。Ca²⁺のアリコートを追加して、最終細胞外濃度2.5mM、5mM、7.5mM、10mMおよび20mMのCa²⁺を生成し、蛍光の変化を記録した。細胞蛍光における増加は、10mM未満の細胞外Ca²⁺濃度に対して10mMのPhe の存在下でより大きくなることに注意のこと。

【0309】

図52は、10mMフェニルアラニン (Phe)、10mMイソロイシン (Ile) または以下の濃度 (マイクロモル/L) で全てのL-異性体を含むアミノ酸混合物 (AA混合物) の影響を図51に記載するような複数の実験からプロットしたデータを示す、以下：50フェニルアラニン (Phe)、50トリプトファン (Trp)、80ヒスチジン (His)、60チロシン (Tyr)、30シスチン (Cys)、300 アラニン (Ala)、200 スレオニン (Thr)、50アスパラギン (Asn)、600 グルタミン (Gln)、125 セリン (Ser)、30グルタミン酸 (Glu)、250 グリシン (Gly)、180 プロリン (Pro)、250 バリン (Val)、30メチオニン (Met)、10アスパラギン酸 (Asp)、200 リジン (Lys)、100 アルギニン (Arg)、75イソロイシン (Ile)、150 ロイシン (Leu)。10mM Pheおよび10mM Ileの両方ならびにアミノ酸の混合物は、所定のCa²⁺濃度に対するSKCaR の応答を増加することに注意のこと。従って、これらのデータは、単独または組み合わせのいずれかのアミノ酸の存在は生理的濃度のCa²⁺の存在下でSKCaR がアミノ酸を「感じる」ことを可能にするCa²⁺に対する明白な感受性を増加することを示す。

【0310】

水生生物についてのこれらのデータの意義は、ヒトCaR アミノ酸感受能力の役割について発表された報告に言及されるものとは著しく対照的に位置する。図52は、アミノ酸を感じるSKCaR の最大能力が水生外部環境および種々の魚の体液の両方に存在するCa²⁺の範囲に制限されることを示す。魚におけるPVCRについての先の局在化に基づいて、以下が本発明の重要な生理的プロセスおよび適用である：

【0311】

1. 魚の近位腸および幽門盲腸におけるアミノ酸の感受：腸上皮細胞の先端表面上に存在するPVCRは、APS プロセスIIの一部としてトリプトファンなどのアミノ酸に応答し得る。魚の飼料へのトリプトファンの含有は、腸PVCRと相互作用して、稚魚溯上性魚の発育を改

10

20

30

40

50

善し、海水移行に耐性を有する。

【0312】

2. 成魚、稚魚および幼魚の両方において、胃および腸上皮細胞の先端膜に局在化するPVCRは、タンパク質のアミノ酸へのタンパク質分解により作製されたアミノ酸の存在を「感じ」得る。この機構を使用して、腸の上皮細胞および神経内分泌細胞の両方に栄養（タンパク質）の存在を通知し、多数の応答（腸上皮の成長および分化ならびに輸送タンパク質への結合、胃酸などのイオンの分泌または再吸収が挙げられる）を誘発し得た。先端PVCRはまた、腸ホルモン（例えば、コレシストキン（CCK）など）の分泌を調節し得ると考えられる。

【0313】

3. 魚の鼻ラメラの細胞に存在するPVCRを使用して、水塩分（Ca²⁺、Mg²⁺およびNaClを介して）およびアミノ酸の両方を「匂い」得る。アミノ酸、Ca²⁺、Mg²⁺および/またはNaClを誘引物質およびホーミング用の両方として使用し得る。

【0314】

引用される参考文献、特許、および特許出願は全て、その全体が本明細書中に参考として援用される。また、2000年10月12日出願、タイトル「Growing Marine Fish in Fresh Water」、必携特許出願番号第09/687,373号；2001年10月11日出願、タイトル「Growing Marine Fish in Fresh Water」、特許出願番号第：（まだ割り当てられていない；代理人事件番号2213.1003-001）；2000年10月12日出願、タイトル「Methods for Raising Pre-adult Anadromous Fish」、特許出願番号第09/687,476号；2000年10月12日出願、タイトル「Methods for Raising Pre-adult Anadromous Fish」、特許出願番号第09/687,372号；2001年10月11日出願、タイトル「Polyvalent Cation Sensing Receptor Proteins in Aquatic Species」、国際PCT出願番号（まだ割り当てられていない；代理人事件番号2213.1006-001）；2000年10月12日出願、タイトル「Polyvalent Cation Sensing Receptor Proteins in Aquatic Species」、予備特許出願番号第60/240,392号；2000年10月12日出願、タイトル「Polyvalent Cation Sensing Receptor Proteins in Aquatic Species」、予備特許出願番号第60/240,003号；2001年10月11日出願、タイトル「Methods for Growing and Imprinting Fish Using an Odorant」、予備特許出願番号（まだ割り当てられていない；代理人事件番号2213.2004-000）は全て、その全体が本明細書中に参考として援用される。さらに、1998年9月28日出願、出願番号第09/162,021号、1997年3月27日出願、国際PCT出願番号第PCT/US97/05031号、および1996年3月27日出願、出願番号第08/622,738号（タイトルは全て、「Polycation Sensing Receptor in Aquatic Species and Methods of Use Thereof」）は全て、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0315】

本発明は、その好ましい態様を参考として部分的に示され、記載されているが、種々の変更が添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱せずにその中でなされ得ることが当業者によって理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、タイセイヨウサケ（*Salmo salar*）の多価カチオン感受レセプター（PVCR）の部分ヌクレオチド（配列番号：1）配列およびアミノ酸（配列番号：2）配列を示す図である。

【図2】 図2は、アルプスイワナ（*Salvelinus alpinus*）のPVCRの部分ヌクレオチド（配列番号：3）配列およびアミノ酸（配列番号：4）配列を示す図である。

【図3】 図3は、ニジマス（*Onchorhynchus mykiss*）のPVCRの部分ヌクレオチド（配列番号：5）配列およびアミノ酸（配列番号：6）配列を示す図である。

【図4】 図4A - Bは、サメ腎臓カチオンレセプター（「SKCaR」）のアミノ酸配列（配列番号：18）、サケのアミノ酸配列（配列番号：2）、アルプスイワナのアミノ酸配列（配列番号：4）およびニジマスのアミノ酸配列（配列番号：6）のアラインメントを示す図である。

【図5】 図5は、本発明の発見前の、サケ水産養殖生産の産業実施を示す概要図である

10

20

30

40

50

。図は、S0（75グラム）およびS1（100グラム）のスマルトのサケ生産における重要な工程を示す。波状の記号は淡水を示し、一方、泡は海水を示す。

【図6】 図6Aは、プロセスIで処理された、体重約76.6gmのスマルトと産業標準である、体重約95.8gmのスマルトとの間における魚一匹当たりの一週間の飼料消費の比較を示すグラフ図である。これらのデータは、いけす（pen）当たり約10,000～50,000匹の魚を含む、個々の魚の網いけすから得られたものである。示すように、プロセスIで処理された魚は、30日後の大規模産業標準のスマルトの1週間での飼料消費と比べて、海水移動後、最初の1週間に魚一匹当たり約2倍程度の飼料を消費した。

図6Bは、海洋網いけす配置から50日後のAPS プロセスI スマルトの体長（cm）および体重（gm）を示すグラフ図である。APS プロセスI スマルトは、海水に配置し、50日後に採

10

【図7】 図7は、海水に移動する前の代表的なAPS プロセスI スマルトの体長（cm）および体重（gm）を示すグラフ図である。

【図8】 図8は、移動する前のAPS プロセスI スマルトおよび死亡個体の体長（cm）および体重（gm）を示すグラフ図である。

【図9】 図9は、淡水に維持された後、14日間のAPS プロセスI 後、および30日間のAPS プロセスI 後での、海水におけるアルプスイワナの5日間での生存率を示す三次元グラフ図である。

【図10】 図10は、海水に移動する前のセント・ジョン（St. John）/セント・ジョン（St. John）APS プロセスIIスマルトの体長（cm）および体重（gm）を示すグラフ図である。APS プロセスIIは実施例2に規定される。

20

【図11】 図11Aおよび11Bは、海水タンクへの移動から5日後、および海洋網いけすへの移動から96時間後でのAPS プロセスIIスマルト生存個体および死亡個体の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図12】 図12は、海洋網いけすへの移動から5日後でのAPS プロセスIIスマルト死亡個体の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図13】 図13A - Gは、PVC局在および発現を示す、タイセイヨウサケの近位小腸の上皮の免疫細胞化学の写真である。

【図14】 図14は、PVC局在を示す、免疫（CaR とレーンにマーク、例えば、PVC）および免疫前（免疫前とレーンにマーク）についての、APS プロセスI に供され続けたサケ由来の小腸組織のウエスタンブロットの写真である。

30

【図15】 図15は、PVC局在を示す、免疫（CaR とレーンにマーク、例えば、PVC）および免疫前（免疫前とレーンにマーク）についての、マス小魚由来の小腸組織のウエスタンブロットの写真である。

【図16】 図16A - Hは、PVC局在および発現を示す、抗PVC抗血清を使用したニジマスの近位小腸の上皮の免疫細胞化学の写真である。

【図17】 図17は、PVC局在を示す、淡水、カルシウムおよびマグネシウムを含む水、および海水における魚のPVCレベルを比較するウエスタンブロットの写真である。

【図18】 図18A - Cは、PVC局在および発現を示す、サケの上皮におけるPVCの免疫局在の写真である。

40

【図19】 図19は、海水および淡水における魚の適応変化を示す概要図である。

【図20】 図20は、海水または本発明の水混合物のいずれかへの移動に供したニジマスにおける経時的な血清カルシウム濃度（mM）のグラフ図である。全データポイントは、単一の代表的実験から得られた、少なくとも5回の別個の測定での、平均±標準偏差である。

【図21】 図21は、水混合物（3mM カルシウム、1mM マグネシウムおよびさらに1%塩化ナトリウム（w/w）を含む標準淡水ペレット化飼料）中に維持されたマスに給餌することにより誘導された、経時的な血清カルシウム濃度（mM）の増加を示すグラフ図である。

【図22】 図22Aおよび22Bは、S1タイセイヨウサケ（Atlantic salmon）スマルト

50

トの海水移動後での血清カルシウム（図 2 2 A）およびナトリウム（図 2 2 B）の変化のグラフ図である。

【図 2 3】 図 2 3 A および B は、APS プロセス I 処理された S1 魚であるタイセイヨウサケ由来の、経時的な血清カルシウム、マグネシウムおよびナトリウムレベル（mM）のグラフ図である。各値は、この単一の代表的実験由来の最小で 10 回の別個の測定の平均 $\pm$ S.D. を示す。

【図 2 4】 図 2 4 は、海水に移動する前の代表的な APS プロセス II スモルトの体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。APS プロセス II スモルトのこの代表例（ $n=100$ ）は、幅広い体重（3.95-23 グラム）を有し、平均体重は 11.5gm である。移動群では、全ての死亡（ $n=10$ ）は、より小さな魚でのみ生じたことに注意すべきである。

10

【図 2 5】 図 2 5 は、海水への移動後の APS プロセス II に供された成魚前タイセイヨウサケにおけるカルシウム、マグネシウムおよびナトリウムの血清濃度（mM）の値を示すグラフ図である。示される全値は、単一の代表的実験由来の最小で 10 個の別個の試料の平均 $\pm$ S.D. である。

【図 2 6】 図 2 6 A - C は、タイセイヨウサケ（配列番号：1）、チャー（Char）（配列番号：3）、サケ（Chum Salmon）（配列番号：7）、ギンザケ（配列番号：9）、マスノスケ（配列番号：11）、カラフトマス（配列番号：13）、ベニザケ（配列番号：15）およびマス（配列番号：5）の PVCR についての核酸配列を示すアラインメントである。

【図 2 7】 図 2 7 A - B は、タイセイヨウサケ（配列番号：2）、チャー（配列番号：4）、サケ（Chum Salmon）（配列番号：8）、ギンザケ（配列番号：10）、マスノスケ（配列番号：12）、カラフトマス（配列番号：14）、ベニザケ（配列番号：16）およびマス（配列番号：6）の PVCR についてのポリペプチド配列のオープンリーディングフレームを示すアラインメントである。

20

【図 2 8】 図 2 8 A - E は、SKCaR の核酸配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号：17 および 18）を示す図である。

【図 2 9】 図 2 9 は、海水への移動の前後において連続的または非連続的な光周期に曝露された APS プロセス II 魚の海水への移動から 1 ~ 4 日間の死亡数を示すグラフ図である。

【図 3 0】 図 3 0 は、6 週間、淡水（FW）または APS プロセス II に曝露された稚魚タイセイヨウサケの体長（cm）および体重（gm）を示すグラフ図である。

30

【図 3 1】 図 3 1 は、海水への移動から 20 ~ 60 日間での APS プロセス II 魚死亡個体の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図 3 2】 図 3 2 は、海水配置から 1 ~ 5 日間での、魚の GF3（水温の偏差を正規化した SGR）、SGR（特異的成長率）、および FCR（飼料変換率）を示すグラフ図である。

【図 3 3】 図 3 3 は、海水研究タンクへの移動後の APS プロセス II 魚の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図 3 4】 図 3 4 は、淡水中での生育後（FW- 対照）、または APS プロセス II に供し、かつ海水へ移動後の生育後（APII-SW）での、中型（40gm）および小型（20gm）の稚魚サケの 30 日間に渡る SGR を示すグラフ図である。

40

【図 3 5】 図 3 5 は、62 日間の配置およびやつれ（drawn）で両者とも 20gm の体重であった、淡水中で生育したサケ幼魚（黒菱形）と海水中で生育した APS プロセス II 魚（白丸）の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図 3 6】 図 3 6 は、62 日間の配置および成長で両者とも 40gm の体重であった、淡水中で生育したサケ幼魚（黒三角）と海水中で生育した APS プロセス II 魚（白四角）の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図 3 7】 図 3 7 は、淡水（FW- 対照）または APS プロセス II で処理後に海水（APII-SW）のいずれかにおいて生育後の、一対の中型（40gm）および小型（20（gm）の稚魚サケの 30 日間に渡る FCR を示すグラフ図である。

【図 3 8】 図 3 8 は、APS プロセス II で処理後の FW または SW のいずれかにおいて維

50

持された一対の20gmの稚魚サケについての61日間に渡る飼料消費（%bdwt/日）を示すグラフ図である。

【図39】 図39は、APS プロセスIIで処理後のFWまたはSWのいずれかにおいて維持された一対の40gmの稚魚サケニツイテの61日間二渡る飼料消費（%bdwt/日）を示すグラフ図である。

【図40】 図40A - Bは、APS プロセスI（図40A）またはAPS プロセスII（図40B）のいずれかに供されたサケの体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。各群（n=60）の魚は、海水への移動直前（黒菱形）および37日の海水での生育後（白四角）に測定した。

【図41】 図41は、APS プロセスIで処理した、より小さなタイセイヨウサケスマルト（平均体重76.6gm）または海水移動後のより大きな産業標準スマルト（平均体重95.8gm）のSGRを示すグラフ図である。対照魚は64日も早く海水に移動されたという事実にもかかわらず、海水移動の直後の間にAPS プロセスI魚のSGRがより大きいことに注意すべきである。

10

【図42】 図42は、APS プロセスIに供され、かつ海水に移動されたサケの体重（gm）および体長（mm）を示すグラフ図である。

【図43】 図43は、産業標準スマルト（赤菱形で示す）および海洋網いけすで生育後のAPS プロセスIで処理されたスマルト（青白抜き四角で示す）の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。APSスマルトは両方ともより小さな魚として開始され、対応する対照スマルトの64日後に海水に移されたことに注意すべきである。

20

【図44】 図44は、湿った（水分含量38%）飼料で維持された海水での生育から61日後と比較した、海水移動時でのAPS プロセスI魚の体重（gm）および体長（cm）を示すグラフ図である。

【図45】 図45は、海水移動後72時間での、6群の稚魚タイセイヨウサケで観察された百分率（%）死亡率を示すグラフ図である。各群で異なる飼料添加物が給与され、海水移動前の2週間は、淡水（対照）または3mM Ca²⁺および1mM Mg²⁺を含むAPS水混合物中のいずれかに維持された。

【図46】 図46は、単一の魚由来の種々の組織試料（例えば、鰓、肝臓、心臓、筋肉、胃、嗅覚上皮、腎臓、膀胱、脳、下垂体、嗅球、幽門盲腸（ceacae）、近位小腸、および遠位小腸）についての固相酵素免疫測定法（ELISA）でのタンパク質（ng）定量のグラフ図である。

30

【図47】 図47は、タイセイヨウサケの種々の組織（鰓、鼻腔ラメラ、膀胱、腎臓、小腸、胃、肝臓、および脳）由来のPVCRmRNA部分転写物の逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）増幅の写真である。RT-PCR反応物をゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド（EtBr）による染色、またはメンブレンへ写し、タイセイヨウサケPVCR遺伝子由来の、32P 標識した653bp のゲノムDNA フラグメントを用いるサザンブロッティング（SB）のいずれかを行った。

【図48】 図48は、淡水中の魚、淡水中のAPS プロセスIIで処理した魚、および海水中の魚についての、一次ラメラに対する二次ラメラにおける免疫活性細胞（Na⁺K⁺ATPアーゼ）の比のグラフ図である。

40

【図49】 図49は、淡水中に維持されたかまたはAPS プロセスII処理後のいずれかの稚魚サケから調製された鰓または幽門盲腸由来のホモジネートのNa⁺K⁺ATPアーゼ活性のグラフ図である。

【図50】 図50は、淡水または海水中に維持された魚についての、鰓由来のホモジネートのNa⁺K⁺ATPアーゼ活性（μmolADP/mgタンパク質/hまたはβ-アクチンmRNA比）のグラフ図である。

【図51】 図51は、細胞外カルシウム（Ca²⁺）の種々の濃度（0.5、2.5、5.0、7.5、10.0および20.0mM）での10mM L-イソロイシンの存在下または非存在下でのPVCR発現FURA-2細胞から得られた比のグラフ図である。

【図52】 図52は、Ca²⁺のみ、フェニルアラニン、イソロイシン、またはAA混合物〔

50

以下の濃度（マイクロモル／リッター）の L - 異性体：50 フェニルアラニン（Phe）、50 トリプトファン（Trp）、80 ヒスチジン（His）、60 チロシン（Tyr）、30 シスチン（Cys）、300 アラニン（Ala）、200 トレオニン（Thr）、50 アスパラギン（Asn）、600 グルタミン（Gln）、125 セリン（Ser）、30 グルタミン酸（Glu）、250 グリシン（Gly）、180 プロリン（Pro）、250 バリン（Val）、30 メチオニン（Met）、10 アスパラギン酸（Asp）、200 リジン（Lys）、100 アルギニン（Arg）、75 イソロイシン（Ile）、150 ロイシン（Leu）} での PVCR についての、細胞外 Ca^{2+} (mM) と比較した、部分的 Ca^{2+} 応答のグラフ図である。

【図 1】

```

cttggcatta tgcctgtgctc tgggggtatt ctggacaga ttctgtatgc gaattgttat 60
caaatitcgc aacaccccaa ttgttaagcc cacaacaga gagatctctt acctctctct 120
gtttctactc atctgtctgtt tctctagttc cctcatcttc attgttgaac cccaggaactg 180
gaatggccgt ctacgcagag ctgcatttgg gataagtttt gttctctgna tctctctgat 240
ctgggttaaa actaacagag taattctagt gttgaaagc agacaccca cagttctcca 300
tctgaagtgg tgggggctaa acttgcagtt cctgttgatg ttctctgtaa cagttctcca 360
agtgaagata tctgtgtctct ggtttacaa ttctctctgc gctgactaca ggaacacaga 420
cattgatgag ataattttca ttaactgcaa tggaggtctc atgattgggc ttggtctctt 480
aatgggtac acttgctgc tggagagcat atctctcttc ttggttttta aatcagaaa 540
actgcacag agcttaagtt aggttaagtt cactaccttc agctatgcca tctt 594

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1 5 10 15
Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Tyr Cys Arg Leu
50 55 60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130 135 140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145 150 155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Xaa Phe Phe Ala
160 165 170
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
175 180 185 190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

Xaa= 任意のアミノ酸

FIG. 1

【図 2】

```

cttggcatta tgcctgtgctc tgggggtatt ctggacaga ttctgtatgc gaattgttat 60
cagatttctc aacaccccaa ttgttaagcc cacaacaga gagatctctt acctctctct 120
gtttctactc atctgtctgtt tctctagttc cctcatcttc attgttgaac cccaggaactg 180
gaatggccgt ctacgcagag ctgcatttgg gataagtttt gttctctgna tctctctgat 240
ctgggttaaa actaacagag taattctagt gttgaaagc agacaccca cagttctcca 300
tctgaagtgg tgggggctaa acttgcagtt cctgttgatg ttctctgtaa cagttctcca 360
agtgaagata tctgtgtctct ggtttacaa ttctctctgc gctgactaca ggaacacaga 420
cattgatgag ataattttca ttaactgcaa tggaggtctc atgattgggc ttggtctctt 480
aatgggtac acttgctgc tggagagcat atctctcttc ttggttttta aatcagaaa 540
actgcacag agcttaagtt aggttaagtt cactaccttc agctatgcca tctt 594

```

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ala Phe Val Met
1 5 10 15
Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Tyr Cys Arg Leu
50 55 60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130 135 140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145 150 155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Ala
160 165 170
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
175 180 185 190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

Xaa = 任意のアミノ酸

FIG. 2

【図 3】

ttggcattat getctgtgct ggggggtatc ttgacagtat tctgtatggg agtgtttatc 60
agattttgca acaccccaat tggtaagggc aaaaacagag agctatctca cctctctctg 120
ttctactcta tctgtgtttt ctcagctctc ctactctcca ttgtgtawcc caggagctgg 180
acacagagtc taagcagagc tgcattcggg ataatgttbg tictctgcac cctctctctg 240
cgtgacaaa ctaacagagc attctctagt ttcagagcaa agatcccaac cagtctccat 300
cgtataggtt ggggggtaaa cttgcagctc cttgtgtgtg tctctgttcc attctgtcaa 360
gtgtatgatc gtgtgtgcta gcttctacat cctctctcgg caggtatcag gaacacagac 420
attgtgtaga ccatcttcat acatcgcact gaggtgtctt tctgtgtgct tggctctcta 480
attgtgtaga cagctgtgct ggcacgaca tctctctctt tgcatttaa atcacgaaaa 540
ctgcacagaga attttacaga ggcacagctt atcaccttca gcatgctcat ctt 593

Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Val Phe Val Met
1 5 10 15
Gly Val Phe Ile Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn
20 25 30
Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser
35 40 45
Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu
50 55 60
Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro
85 90 95
Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu
100 105 110
Val Phe Leu Phe Thr Phe Val Gln Val Met Ile Cys Val Val Trp Leu
115 120 125
Tyr Asn Ala Pro Pro Ala Ser Tyr Arg Asn His Asp Ile Asp Glu
130 135 140
Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asn Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe
145 150 155
Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala
160 165 170 175
Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Thr Glu Ala Lys Phe Ile
180 185 190
Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe
195

Xaa = 任意のアミノ酸

FIG. 3

【図 4】

	10	20
SKCaR ORF	Leu Thr Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Leu Ile Thr Ser Phe Val Leu Gly Val Phe Ile 50	
サウ ORF	Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ile Phe Val Met Gly Val Phe Ile 50	
アルプスインナ ORF	Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ile Phe Val Met Gly Val Phe Ile 50	
ニワマス ORF	Leu Ala Leu Cys Ser Val Leu Gly Val Phe Leu Thr Ile Phe Val Met Gly Val Phe Ile 50	
	30	40
SKCaR ORF	Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu 110	
サウ ORF	Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu 110	
アルプスインナ ORF	Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu 110	
ニワマス ORF	Arg Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu 110	
	50	60
SKCaR ORF	Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp 170	
サウ ORF	Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp 170	
アルプスインナ ORF	Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp 170	
ニワマス ORF	Phe Ser Leu Ile Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp 170	
	70	80
SKCaR ORF	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile 230	
サウ ORF	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile 230	
アルプスインナ ORF	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile 230	
ニワマス ORF	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile 230	
	90	100
SKCaR ORF	Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Leu His 280	
サウ ORF	Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Leu His 280	
アルプスインナ ORF	Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Leu His 280	
ニワマス ORF	Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Leu His 280	
	110	120
SKCaR ORF	Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Glu 350	
サウ ORF	Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Glu 350	
アルプスインナ ORF	Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Glu 350	
ニワマス ORF	Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Glu 350	
	130	140
SKCaR ORF	Ile Val Thr Cys Ala Ile Thr Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 410	
サウ ORF	Ile Val Thr Cys Ala Ile Thr Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 410	
アルプスインナ ORF	Ile Val Thr Cys Ala Ile Thr Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 410	
ニワマス ORF	Ile Val Thr Cys Ala Ile Thr Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 410	
	150	160
SKCaR ORF	Leu Glu Asp Glu Val Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe 470	
サウ ORF	Ile Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe 470	
アルプスインナ ORF	Ile Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe 470	
ニワマス ORF	Ile Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Met Met Ala Leu Gly Phe 470	

FIG. 4A

【図 6】

	170	180
SKCaR ORF	Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg 330	
サウ ORF	Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg 330	
アルプスインナ ORF	Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg 330	
ニワマス ORF	Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg 330	
	190	
SKCaR ORF	Lys Leu Pro Glu Asn Phe Arg Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe 395	
サウ ORF	Lys Leu Pro Glu Asn Phe Arg Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe 395	
アルプスインナ ORF	Lys Leu Pro Glu Asn Phe Arg Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe 395	
ニワマス ORF	Lys Leu Pro Glu Asn Phe Arg Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe 395	

※ 注：SKCaR ORFにマッチするボックスは余

FIG. 4B

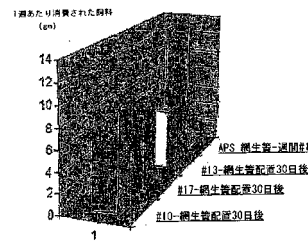


FIG. 6A

【図 5】

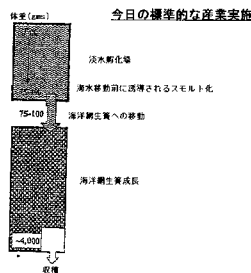


FIG. 5

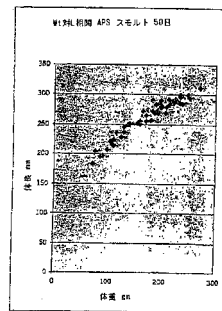


FIG. 6B

【図 7】

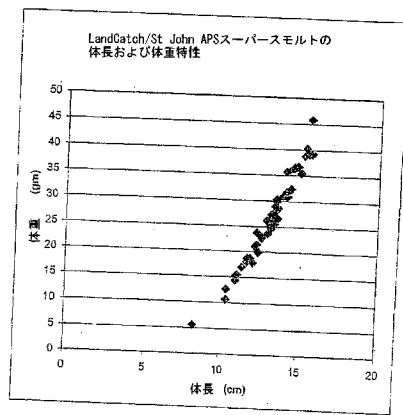


FIG. 7

【図 8】

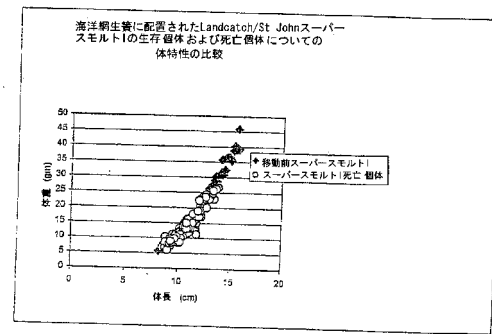


FIG. 8

【図 9】

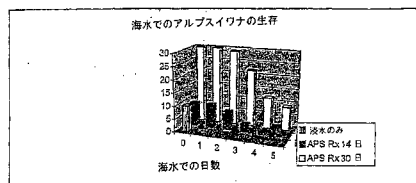


FIG. 9

【図 11】

FIG. 11A

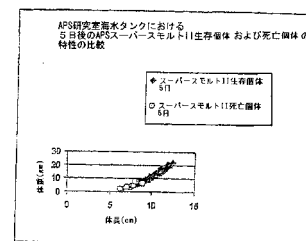
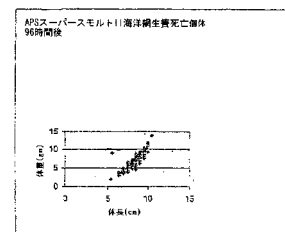


FIG. 11B



【図 10】

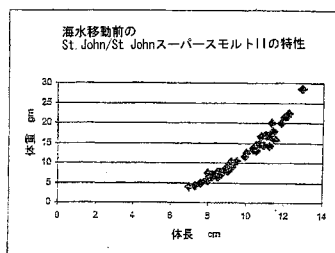


FIG. 10

【図 12】

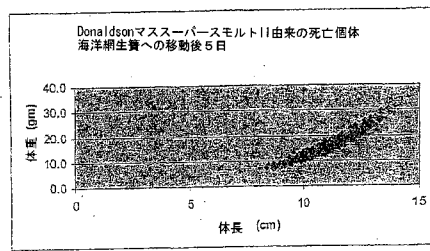
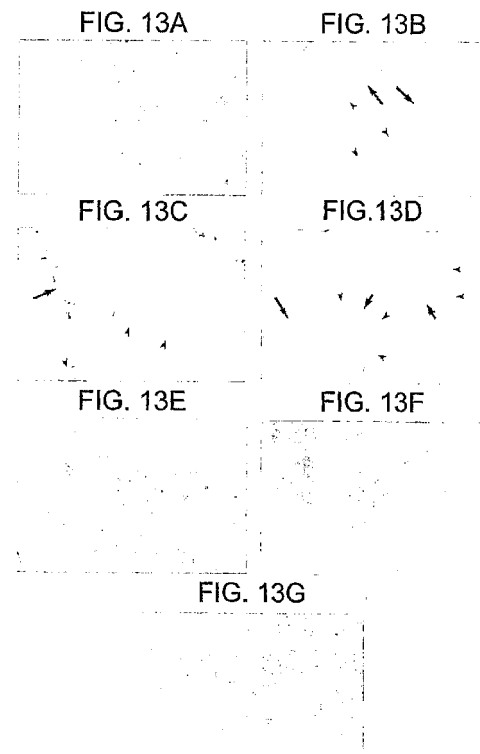


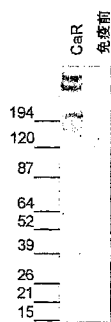
FIG. 12

【図 13】



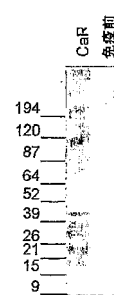
【図 14】

FIG. 14

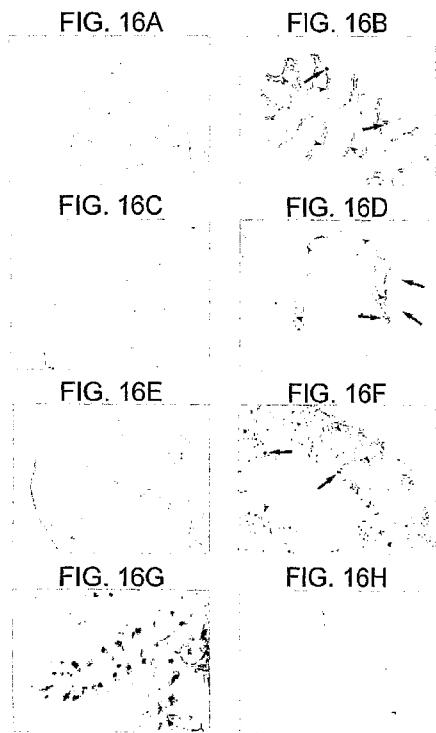


【図 15】

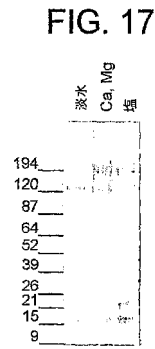
FIG. 15



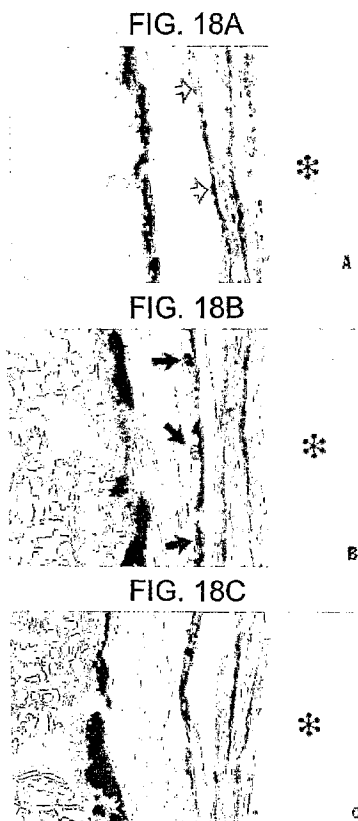
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【図 19】

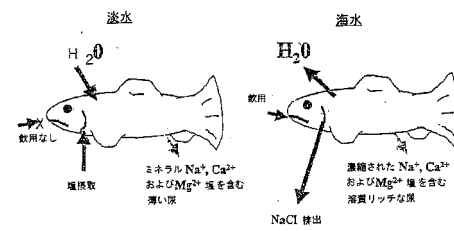


FIG. 19

【図 20】

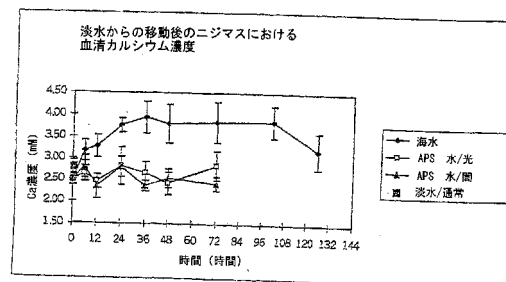


FIG. 20

【図 2 1】

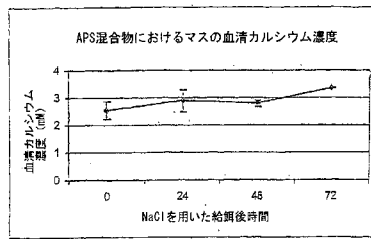


FIG. 21

【図 2 2】

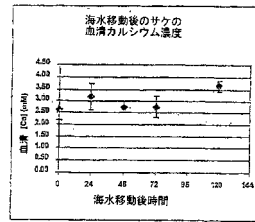


FIG. 22A

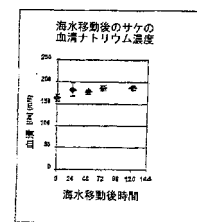


FIG. 22B

【図 2 3】

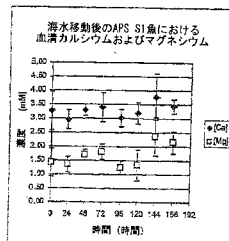


FIG. 23A

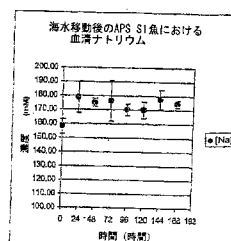


FIG. 23B

【図 2 4】

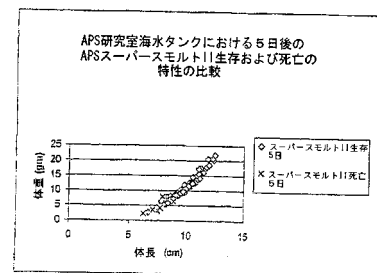


FIG. 24

【 図 2 5 】

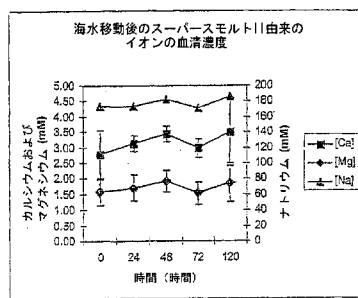


FIG. 25

【 図 2 6 】

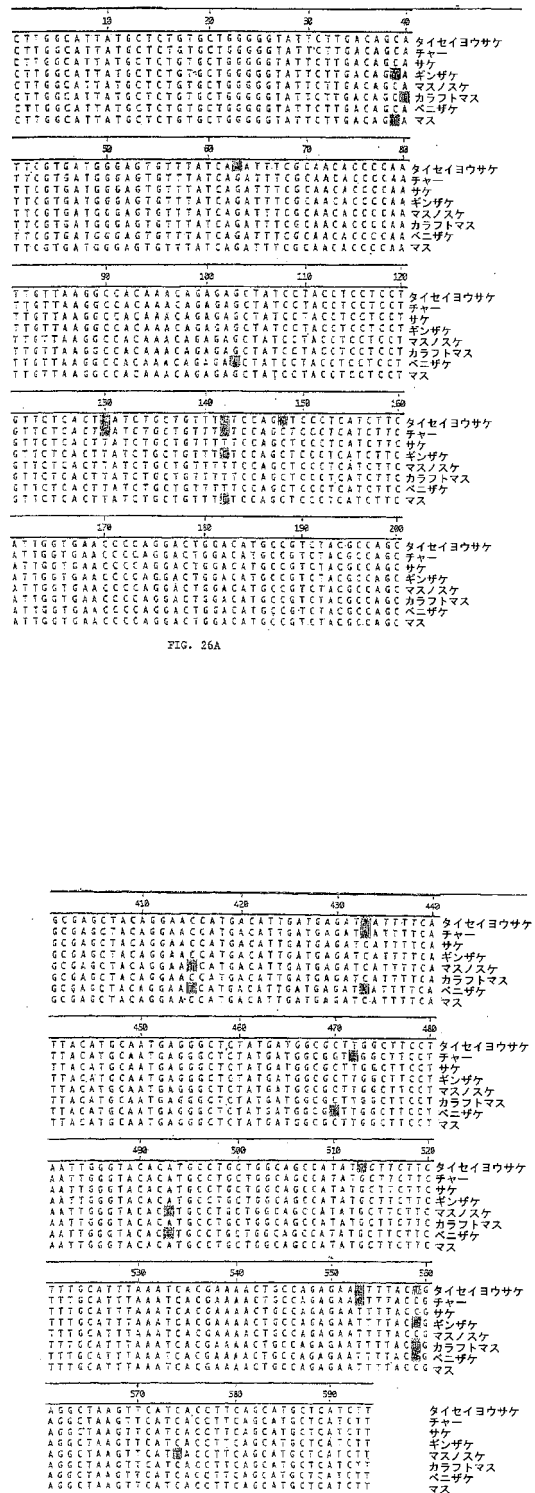


FIG. 26C

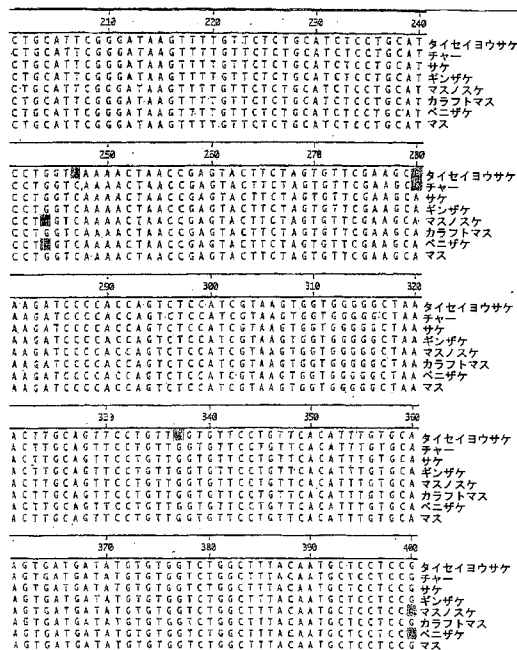


FIG. 26B

219															228														
381	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
381	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
382	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
382	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
383	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
383	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
384	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
384	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
385	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
385	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
386	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
386	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
387	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
387	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
388	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
388	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
389	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
389	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
390	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	チャー	ORF							
390	Arg	Lys	Trp	Trp	Gly	Lys	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Gln	タイセイヨウサケ	ORF							
391	Val	Met	Ile	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Tyr	Arg	Asn	His	Asp	チャー	ORF							
391	Val	Met	Ile	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Tyr	Arg	Asn	His	Asp	チャー	ORF							
392	Val	Met	Ile	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Tyr	Arg	Asn	His	Asp	チャー	ORF							
392	Val	Met	Ile	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Tyr	Arg	Asn	His	Asp	チャー	ORF							
393	Val	Met	Ile	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Tyr	Asn																			

装飾「装飾引」：影（黒で40%塞ぐ）コンセンサスとは異なる残基

FIG. 27B

[illegible]

FIG. 28A

atc atc gag cac ttc cag tgg aac tgg gtg gga acc ctc gca gcc gag	1095
ile ile glu his phe gln trp asn trp val gly gln ala ala asp	205 210 215
gat gac tat ggc cgc oca ggc atc cag aac ttc cgg gag gag gcc gtt	1143
acc asp tyr gly arg pro gly ile asp lys phe arg glu glu ala val	220 225 230 235
aag gag gac atc tgt att gac ttc cgt gag aac atc tct cag tac tac	1191
lys arg asp ile cys ile asp phe ser glu met ile ser gln tyr tyr	240 245 250
acc cag aag cag ttc tgg ggg ttc atc gcc cag gtc atc cag aac tcc tcc	1239
thr gln lys gln leu glu phe ile ala asp val ile gln asn ser ser	255 260 265
gcc aag gtc atc atc gtg gtc ttc tcc aat ggc ccc cag ctg gag ccg ctc	1287
ala lys val ile val val phe ser asn gly pro asp leu glu pro leu	270 275 280 285
atc cag gag ata gtt cgg aga aac atc acc gat cgg att tgg ctg gcc	1335
ile gln glu ile val arg arg asn ile thr asp arg ile trp leu ala	285 290 295
agg gag gct tgg gcc agc tct tcc cto att gcc aag cca gag tac ttc	1383
ser glu ala trp ala ser ser ser leu ile ala lys pro glu tyr phe	300 305 310 315
cac gtg gtc ggc gcc atc ttc ggc tct gct ctc ggc ggg cgt atc	1431
his val val gly gly thr ile gly phe ala leu arg ala gly arg ile	320 325 330
cca ggg ttc aac aag ttc ctg aag gag gtc acc acc agc agg tcc tcc	1479
pro gly phe asn lys phe leu lys glu val ala pro ser arg ser ser	335 340 345
gac aat ggg ttt gtc aag gag ttc tgg gag gac acc ttc aac tgc tac	1527
asp asn gly phe val lys glu phe trp glu glu thr phe asn cys tyr	350 355 360
ttc acc gag gag acc ctc agc agc ctg aat tac aag gtg ccc tcc	1575
phe thr glu lys thr leu thr gln leu lys asn ser lys val pro ser	365 370 375
acc gga cgc gcc gct cac ggg gac gcc tcc aag ggc ggg aac tcc aga	1623
his gly pro ala ala gln gly asp gly ser lys ala gla lys asn arg	380 385 390 395
agg aca gcc ctg cgc acc ccc tgc att ggg gag gag aac atc acc agc	1671
arg thr ala leu arg his pro cys thr gly glu glu asn ile thr ser	400 405 410
gtg gag acc ccc tac ctg gat tat aca cca ctg aag atc tcc tac aat	1719
val glu thr pro tyr leu asp tyr thr his leu arg ile ser tyr asn	415 420 425
tac tac gtc gcc gcc tac tcc att gct cac gcc ctc aag gag atc cac	1767
val ala thr ala val tyr ser ile att ala his ala leu gln asp ile his	430 435 440

5 FTG. 28B

tct tgc aaa ccc ggc arg ggc atc ttc gaa aac gga tcc tgt gaa gat Ser Cys Lys Pro Gly Tyr Trp Glu Ile Phe Ala Asn Gly Ser Cys Ala Asp 445 450 455	1815	aac tgt cgg ctc cgc aca ccc gcc ttt ggc atc agc ttc gtc cgc tgc Thr Cys Arg Leu Arg Glu Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu Cys 685 690 695	2535
atc aaa aaa gtt gag gcc tgg cag gtc atc aac cat atg atg cat atg Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Glu Val Leu Asn His Leu Leu His Leu 460 465 470 475	1865	atc tcc tgc atc atg gtc aag aac aac cgg gtc atg atg ttc ttc gaa Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe Glu 700 705 710 715	2585
aag ttc acc aac agc atg ggt gag cag gtt gac ttt gac gat caa ggc Lys Phe Thr Asn Ser Met Gly Glu Glu Val Asp Phe Asp Asp Glu Gly 480 485 490 495	1915	gac aag atc ccc acc agc ttc cac cgc aag tgg gtc ggc atc aac atg Ala Cys Ile Pro Thr Ser Leu His Arg Lys Trp Val Gly Leu Asn Leu 720 725 730 735	2635
gac ctc aag ggc aac tac atc atc atc aac tgg cag tcc tcc gaa gag Asp Leu Lys Gly Asn Tyr Thr Ile Ile Asn Trp Glu Leu Ser Ala Glu 495 500 505	1965	cag ttc ctc atg gtc ttc ctc tgc atc atg gtc caa atc gtc acc tgc Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Ile Leu Val Glu Ile Val Thr Cys 735 740 745	2685
gat gaa tgg gtc ttc ttc cat gag gtc ggc aac taa aac gcc taa gtc Asp Glu Ser Val Leu Phe His Glu Val Gly Asn Tyr Asn Ala Tyr Ala 510 515 520	2015	atc atc tgg ctc tac aac acc ccc ctc tcc agc tac aag aac cat gaa Ile Ile Trp Leu Cys Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn His Glu 750 755 760 765	2735
aag ccc agt gac cga ctc aac atc aac gaa aag aac atc tgg agt Cys Pro Ser Asp Arg Leu Asn Ile Asn Glu Cys Ile Leu Trp Ser 525 530 535	2065	atg gag gac gag gtc atc ttc atc acc tgc gac gag ggc tgg ctc atg Leu Glu Asp Glu Val Ile Phe Ile Thr Cys Asp Glu Gly Ser Leu Met 765 770 775	2785
ggc ttc tcc aaa gtc gtt ctc ttc tcc aac tgg agt cga gac tgt gtc Gly Phe Ser Lys Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg Asp Cys Val 540 545 550 555	2115	ggc atg ggc ttc ctc atc ggc tac acc tgc ctc ttc ggc acc atc tgc Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile Cys 780 785 790 795	2835
cgc ggc acc agc aag ggc atc aac gag ggc ggc ccc acc tgc tgc ttc Pro Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr Cys Cys Phe 560 565 570	2165	ttc ttc ttc gcc ttc aac tcc agt acc agt cgc cgc gag aac ttc aac ggc Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Cys Leu Pro Glu Asn Phe Asn Glu 800 805 810	2885
gaa tgc atg gaa tgc gaa ggc ggc ggc ttc agt gat gaa aac gat gaa Glu Cys Met Ala Cys Ala Glu Gly Glu Phe Ser Asp Glu Asn Asp Ala 575 580 585 590	2195	gac aag ttc acc acc ttc agt atg atg ttc ttc ttc ttc ggc tgc atc Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile Val Trp Ile 815 820 825 830	2935
agt ggc tgt aca aag tgc cgc atc gat ttc tgc tgc tgc aac cgc Ser Ala Cys Thr Lys Cys Pro Asn Asp Phe Trp Ser Asn Glu Asn His 595 600 605	2245	tcc ttc acc ccc gcc tcc gtc agc acc taa ggc aag ttc gtc tgc ggc Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Val Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Val Ser Ala 835 840 845	2985
acg tgc tgc atc gcc aag gag atc gag tac atg tgc tgc aac ggc ccc Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Pro 605 610 615	2295	gac gag gtc atc gcc atc atg gcc tcc agc ttc ggc atg ggc tgc Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ser Ser Phe Gly Leu Leu Gly Cys 845 850 855	3035
tcc ggc atc gcc atc acc atc ttc gcc gta atg ggc atc atc acc Phe Gly Ile Ala Leu Thr Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Leu Ile Thr 620 625 630 635	2345	att tac ttc aac aag tgc tac atc atc atg ttc aac ggc tgc ggc aac Ile Tyr Phe Asn Lys Cys Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro Cys Arg Asn 860 865 870 875	3085
tcc ttc gtc atg ggc gtc ttc ttc aag ttc agc aac acc acc atc gtc Ser Phe Val Leu Glu Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile Val 640 645 650 655	2395	acc atc gag ggc ggc tgc agc acc ggc ggc ccc acc ttc aag gtc Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala Phe Lys Val 880 885 890 895	3135
aag gcc acc aac ggc gag tgc tcc tac atg atc ttc ttc ttc atc atc Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile 655 660 665	2445	ggc gcc cgc gcc acc ctc cgc cgc agc gcc ggc tcc ctc aag ggc tcc Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Arg Lys Arg Ser 895 900 905	3185
tgc tgc ttc tcc acc tgc atc atc ttc atc ggc gag ccc aag gac tgc Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ile Phe Ile Gly Glu Pro Arg Asp Trp 670 675 680	2495	agc agc atg tgc gcc tcc acc atc ttc tgc ccc ggc tgc tcc acc tgc Ser Ser Leu Cys Gly Ser Thr Ile Ser Ser Pro Ala Ser Ser Thr Cys 910 915 920	3235

FIG. 28c

【図 29】

ggc cgc ggc ctc acc atg gag atg cag cgc tgc agc cgc cag aag gtc Gly Pro Gly Leu Thr Met Glu Met Gln Arg Cys Ser Thr Gln Lys Val 925 930 935	3255
agg ttc ggc agc ggc acc gcc acc atg tgc ctc agc ttc gag gag aca Ser Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Leu Ser Leu Ser Phe Glu Glu Thr 940 945 950 955	3305
ggc cga tac gcc acc ctc agc cgc agc gcc cgc agc agc aac tgc ggc Gly Arg Tyr Ala Thr Leu Ser Arg Thr Ala Arg Ser Arg Asn Ser Ala 960 965 970	3355
gat ggc cgc agc ggc gac gac cgc cca tct aga cnc cnc cag gag ggc Asp Gly Arg Ser Gly Asp Asp Leu Pro Ser Arg His His Asp Gln Gly 975 980 985 990	3405
cgc cct cag aac tgc gag ccc cag ccc gcc aac gat gcc cga tac aag Pro Pro Gln Lys Cys Glu Pro Gln Pro Ala Asn Asp Ala Arg Tyr Lys 990 995 1000	3455
ggc ggc cgc acc aag ggc acc cta gag tgc cgc ggc gcc agc aag gag Ala Ala Pro Thr Lys Gly Thr Leu Glu Ser Pro Gly Gly Ser Lys Glu 1005 1010 1015	3505
cgc ccc aca att atg gag gaa acc taa tccaaacctt cccaaacctt Arg Pro Thr Thr Met Glu Glu Thr 1020 1025	3555

FIG. 28c

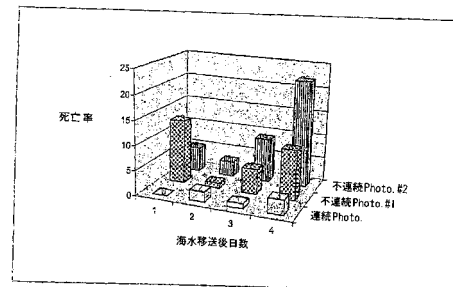


FIG. 29

caagacatc ctcacggc gcaacggc caactgat caactctaa cgggtggc 3502
 cccacacctt ccccttcgg gcaacttgg ttttctgaa gattgcagca tctgcagttc 3503
 cttttatccc tgattttcgg acttggtat ttactgagt gcatggagat atcacaat 3504
 ctgacacctt tctttcttc gacttgat gctcaagt atctgacta tctgaagtt 3505
 atgttttacc atgttcaga taktttgta caacataaa gttacacctt gacgagtt 3506
 ctgagattgc cacttgatg aacgaacctt tctataaac ttatcattga aactcgatt 3507
 gcaacggaa tctacagat gtaacaaaa aactgttat tatctaaaa atgcacatt 3508
 taatcagag tgtaaaattt gtaacttctt ttgtacatt. aatgacatt tcttgataaa 3509
 aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa ggaacggc ggaacggc 3510

【図 30】

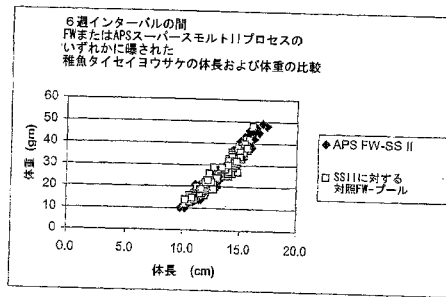


FIG. 30

【図 31】

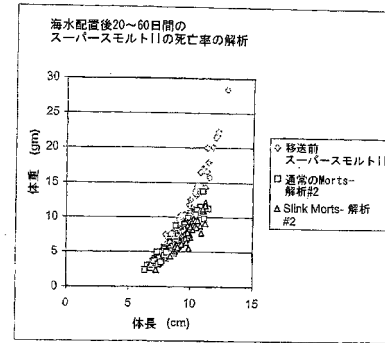


FIG. 31

【図 32】

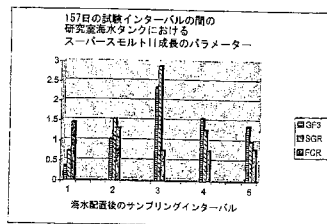


FIG. 32

【図 33】

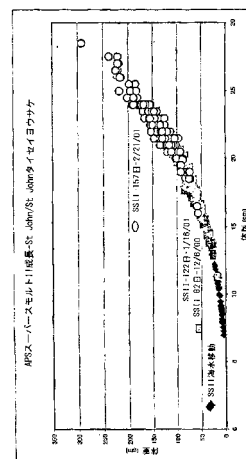


FIG. 33

【図34】

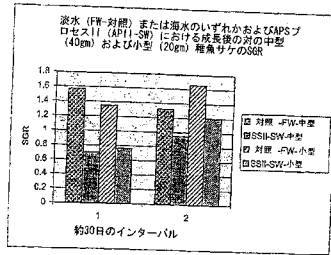


FIG. 34

【図35】

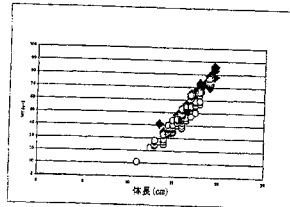


FIG. 35

【図36】

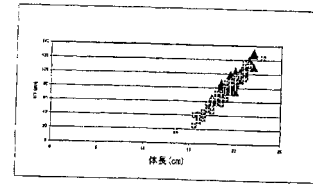


FIG. 36

【図37】

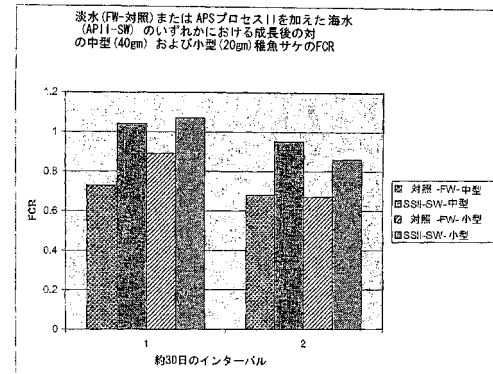


FIG. 37

【図38】

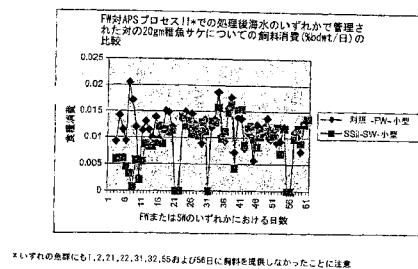


FIG. 38

【図39】

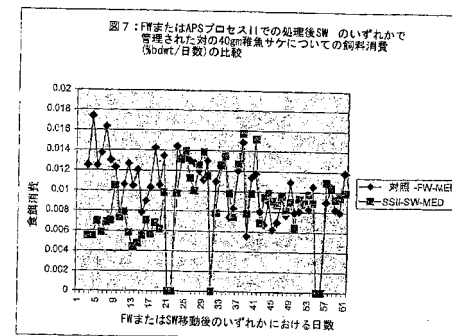


FIG. 39

【図40】

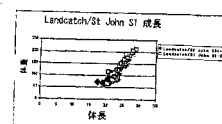


FIG. 40A

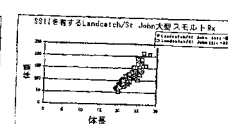


FIG. 40B

【図 4 1】

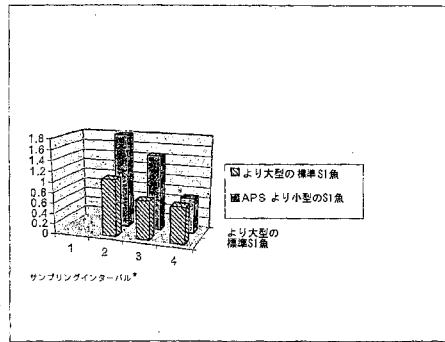


FIG. 41

【図 4 2】

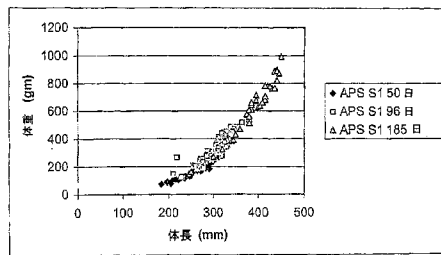


FIG. 42

【図 4 5】

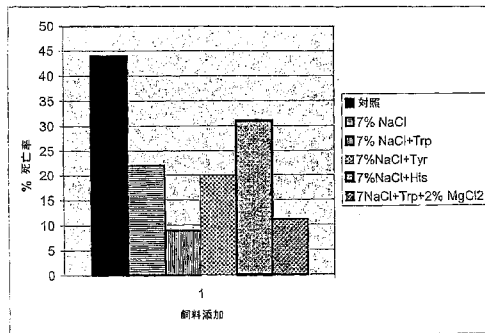


FIG. 45

【図 4 3】

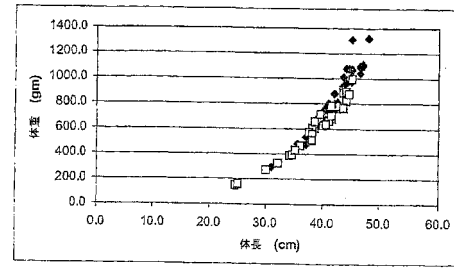


FIG. 43

【図 4 4】

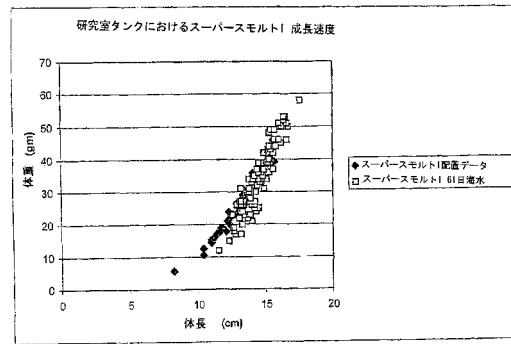


FIG. 44

【図 4 6】

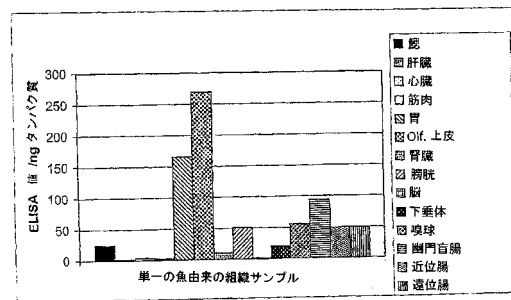
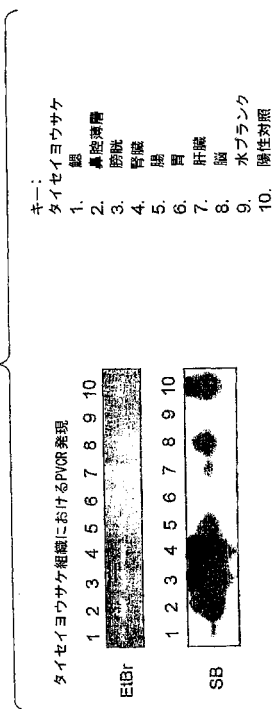


FIG. 46

【図 47】

FIG. 47



【図 48】

合計45日間の淡水、海水またはプロセスIIでの処理のいずれかで管理された
対の稚魚タイセイヨウサケにおける細胞細胞の分布のまとめ

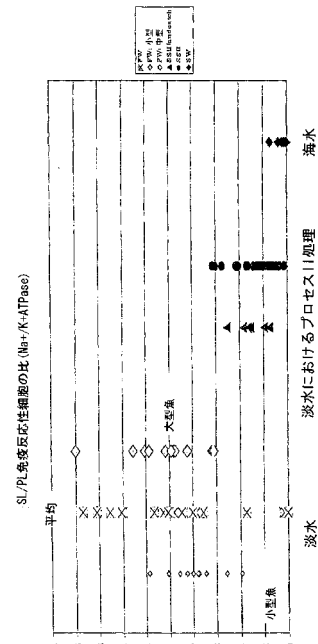
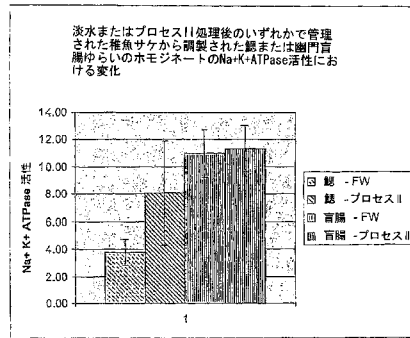


FIG. 48

【図 49】



淡水で管理されたか、または淡水中でプロセスIIで45日間の処理されたか、またはいずれかの稚魚タイセイヨウサケの鰓または鰓門盲腸のいずれかに存在するNa⁺/K⁺-ATPase活性

FIG. 49

【図 50】

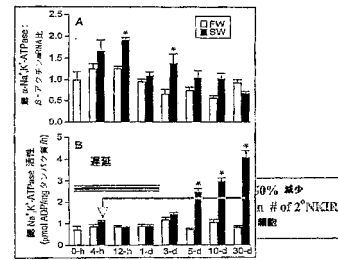
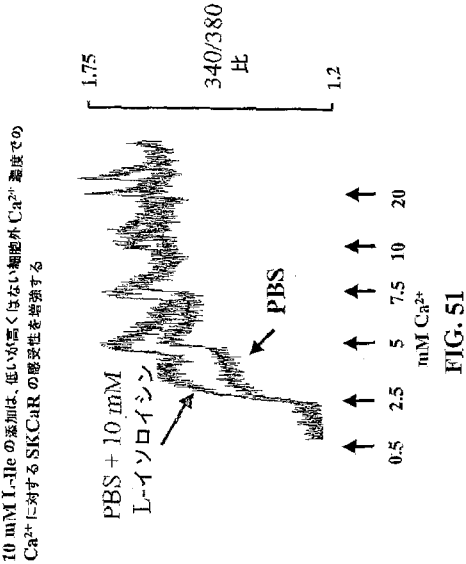
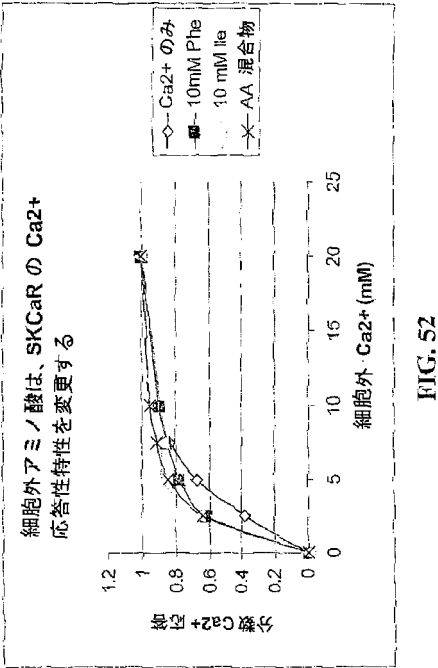


FIG. 50

【図 5 1】



【図 5 2】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/687,372

(32)優先日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ニアリング, ジャクリーン

アメリカ合衆国 メイン 04097 ノース ヤーマス, ミル ロード 346

(72)発明者 ベトカ, マーリーズ

アメリカ合衆国 メイン 04103 ポートランド グレンウッド アベニュー 113

審査官 関根 裕

(56)参考文献 ソ連国特許発明第01784152(SU, A)

特開昭47-018698(JP, A)

国際公開第97/035977(WO, A1)

米国特許第03777709(US, A)

欧州特許出願公開第00801904(EP, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01K 61/00

A23K 1/18