

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-180669

(P2004-180669A)

(43) 公開日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 2 9
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	4 B O 6 4
審査請求 未請求 請求項の数 46 O L (全 134 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-123461 (P2003-123461)	(71) 出願人	000001856
(22) 出願日	平成15年4月28日 (2003.4.28)		三共株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2002-127834 (P2002-127834)		東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(32) 優先日	平成14年4月30日 (2002.4.30)	(74) 代理人	100081400
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 大野 彰夫
(31) 優先権主張番号	特願2002-293225 (P2002-293225)	(74) 代理人	100092716
(32) 優先日	平成14年10月7日 (2002.10.7)		弁理士 中田 ▲やす▼雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100115750
			弁理士 矢口 敏昭
		(74) 代理人	100119622
			弁理士 金原 玲子
		(74) 代理人	100125025
			弁理士 越後 友希

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖代謝および／または脂質代謝に関係する遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規糖代謝及び／または脂質代謝に関連する遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該遺伝子および／またはポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって取得される物質、該スクリーニングに使用するキット、該遺伝子および／またはポリペプチドを利用した糖代謝及び／または脂質代謝異常を改善する物質の試験方法、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチド及び／または該抗体を含有する医薬組成物等を提供すること。

【解決手段】特定の配列で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド等、該ポリヌクレオチドがコードするタンパク質等。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の 1) 乃至 6) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

- 1) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 から 2 9 5 0 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 2) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 7 9 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 3) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 6 3 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 4) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 から 3 3 5 4 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 5) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 5 9 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 6) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 3 7 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

下記の 1) 乃至 4) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

- 1) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 7 9 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 7 9 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- 2) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 5 9 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 5 9 から 1 4 6 2 に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- 3) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 6 3 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 6 3 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- 4) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 3 7 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 3 7 から 1 4 6 2 に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

20

30

40

【請求項 3】

50

下記の 1) 乃至 5) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

- 1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- 2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- 3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- 4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- 5) 上記 1) 乃至 4) から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

10

【請求項 4】

下記の 1) 乃至 4) のいずれか一つに記載のポリペプチド：

- 1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド。

20

【請求項 5】

下記の 1) 乃至 4) のいずれか一つに記載のポリペプチド：

- 1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；
- 2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；
- 3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；
- 4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミ

30

40

50

ノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、２型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【請求項６】

下記の工程１）乃至３）を含む、糖代謝異常および／または脂質代謝異常の検出方法：

１）被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より、全RNAを抽出する工程；

２）上記１）に記載の検体由来の全RNAと正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より抽出した全RNAにおける下記の▲１▼乃至▲５▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程； 10

▲１▼配列表の配列番号４のヌクレオチド番号１から２９５０に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲２▼配列表の配列番号４のヌクレオチド番号７９から１４５５に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲３▼配列表の配列番号８のヌクレオチド番号１から３３５４に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲４▼配列表の配列番号８のヌクレオチド番号５９から１４６２に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、 20

▲５▼上記▲１▼乃至▲４▼に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、２型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド３）上記２）で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記１）における被験者または被験動物の糖代謝異常および／または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

【請求項７】

下記の工程１）および２）を含む、糖代謝異常および／または脂質代謝異常の検出方法： 30

１）被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における、下記の▲１▼乃至▲５▼のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

▲１▼配列表の配列番号５のアミノ酸番号１から４５９に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲２▼配列表の配列番号５のアミノ酸番号２９から４５９に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド

▲３▼配列表の配列番号９のアミノ酸番号１から４６８に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲４▼配列表の配列番号９のアミノ酸番号２７から４６８に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、 40

▲５▼上記▲１▼乃至▲４▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、２型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

２）上記１）で測定されたポリペプチドの発現量と正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、上記

１）における被験者または被験動物の糖代謝異常および／または脂質代謝異常の病態を判 50

定する工程。

【請求項 8】

下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド； 10

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 被験物質と上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを接触する工程； 20

2) 上記工程 1) で選択されたポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質を選択する工程。

【請求項 9】

下記の工程 1) 乃至 5) を含む、下記の a) 乃至 g) の少なくとも一つのポリヌクレオチドの発現を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 から 2 9 5 0 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 7 9 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、 30

c) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 から 3 3 5 4 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

d) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 5 9 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

e) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

f) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

g) 上記 a) 乃至 f) から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド； 40

1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全 RNA を抽出する工程；

2) 被験物質を添加しない培地で培養した細胞より、全 RNA を抽出する工程；

3) 上記 1) により得られた全 RNA における、上記 a) 乃至 g) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

4) 上記 2) により得られた全 RNA における、上記 3) で測定されてポリヌクレオチドの発現量を測定する工程； 50

5) 上記3)で測定されたポリヌクレオチドの発現量と上記4)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析する工程。

【請求項10】

下記の工程1)乃至5)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を改善する物質のスクリーニング方法：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 2) 被験物質を添加しない培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 3) 上記1)により得られた全RNAにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- ▲1▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲2▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲3▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲4▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- 4) 上記2)により得られた全RNAにおける、上記3)の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- 5) 上記3)で測定されたポリヌクレオチドの発現量と上記4)で測定された該ポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、該被験物質の、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程。

【請求項11】

下記の工程1)乃至3)を含む、下記のa)乃至g)の少なくとも一つの発現を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

- a) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- b) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- c) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- d) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- e) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- f) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- g) 上記a)乃至f)から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；

2) 上記1) 由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した細胞由来全RNAにおける、上記a)乃至g)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
3) 上記2)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析する工程。

【請求項12】

下記の工程1)乃至3)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質のスクリーニング方法：

1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
2) 上記1) 由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した細胞由来全RNAにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

▲1▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲2▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲3▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲4▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

3) 上記2)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程。

【請求項13】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはランオン・アッセイであることを特徴とする、請求項6、9、10、11及び12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が動物組織または動物細胞由来の相補的DNA群または該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップまたはアレイを用いることを特徴とする、請求項6、9、10、11及び12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項15】

下記の工程1)乃至3)を含む、下記のa)乃至e)に記載のポリペプチドの少なくともいずれか一つの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン

10

20

30

40

50

抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
- 2) 上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；
- 3) 2)で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した細胞における該ポリペプチドの発現量の差を解析する工程。

10

【請求項16】

下記の工程1)乃至3)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質のスクリーニング方法；

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
- 2) 上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

▲1▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲2▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド 20

▲3▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

▲4▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド； 30

- 3) 2)で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した細胞における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程。

【請求項17】

ポリペプチドの発現量の測定方法が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法または固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、請求項7、8、15及び16のいずれか一つに記載の方法。

【請求項18】

下記の工程1)および2)を含む、下記のa)乃至e)から選択されるポリペプチドの少なくともいずれか一つの機能を促進するか抑制する物質のスクリーニング方法； 40

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは 50

数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 非ヒト哺乳動物に、上記a)乃至e)から選択されるポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程；

2) 上記1)に記載の動物の血中のグルコース濃度および/またはインスリン濃度を測定する工程。

【請求項19】

下記の工程1)乃至2)を含むことを特徴とする、下記のa)乃至e)に記載のポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 上記a)乃至e)から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを発現する細胞と被験物質を脂肪分解促進物質を含む溶液中で接触させる；

2) 1)に記載の溶液中の遊離脂肪酸濃度を測定する。

【請求項20】

下記の工程1)乃至2)を含むことを特徴とする、下記のa)乃至e)に記載のポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 上記a)乃至e)から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

2) 1)に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する。

【請求項21】

下記の 1) 乃至 5) のいずれか一つに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに被験物質を含む試料を接触させ、次いで、該ポリペプチドに結合した物質を分離することの特徴とする糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質の単離方法：

1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド； 10

5) 上記 1) 乃至 4) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【請求項 2 2】

下記の工程 1) および 2) を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の治療および/または予防物質の試験方法： 20

1) 非ヒト哺乳動物に、下記の ▲ 1 ▼ 乃至 ▲ 5 ▼ のいずれか一つに記載のポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程；

▲ 1 ▼ 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲ 2 ▼ 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド

▲ 3 ▼ 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲ 4 ▼ 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、 30

▲ 5 ▼ 上記 ▲ 1 ▼ 乃至 ▲ 4 ▼ に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 上記 1) に記載の動物の血中のグルコース濃度および/または中性脂質濃度を測定する工程。

【請求項 2 3】

下記の工程 1) および 2) を含む、糖代謝異常及び/または脂質代謝異常の治療及び/または予防物質の試験方法： 40

1) 非ヒト哺乳動物に、下記の a) 乃至 e) から選択されるポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むこ 50

とからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 上記 1) に記載の動物の血中のグルコース濃度および/または中性脂質濃度を測定する工程。

【請求項 2 4】

10

下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、糖代謝異常および/脂質代謝異常の治療および/または予防物質の試験方法：

1) 下記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを発現する細胞と被験物質を脂肪分解促進物質を含む溶液中で接触させる；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

20

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 1) に記載の溶液中の遊離脂肪酸濃度を測定する。

【請求項 2 5】

30

下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の治療および/または予防物質の試験方法：

1) 下記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

40

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 1) に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する、

【請求項 2 6】

50

脂肪分解促進物質が T N F - α であることを特徴とする、請求項 19 または 24 に記載の方法。

【請求項 27】

細胞が哺乳動物由来培養細胞であることを特徴とする、請求項 9 乃至 20、及び、請求項 24 乃至 26 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 28】

哺乳動物由来培養細胞が霊長類またはげっ歯類動物由来であることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

哺乳動物由来培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。 10

【請求項 30】

哺乳動物由来培養細胞が、マウス由来の繊維芽細胞、マウス、ラットもしくはヒト由来の脂肪細胞、マウス、ラットもしくはヒト由来の肝細胞であることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 8 乃至 21、及び、請求項 26 乃至 29 のいずれか一つに記載の方法によって取得された物質。

【請求項 32】

下記の 1) 乃至 5) からなる群から選択される少なくとも 1 以上を含むキット： 20

1) 配列表の配列番号 4 または 8 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの一部乃至全部を特異的に増幅するための 15 から 30 塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号 4 または 8 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための 15 ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 上記 1) に記載のオリゴヌクレオチドプライマーまたは上記 2) に記載のポリヌクレオチドプローブのいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料；

4) 下記の ▲ 1 ▼ 乃至 ▲ 5 ▼ から選択されるポリペプチドに特異的に結合し、該タンパク質を検出するための抗体； 30

▲ 1 ▼ 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲ 2 ▼ 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲ 3 ▼ 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲ 4 ▼ 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲ 5 ▼ 上記 ▲ 1 ▼ 乃至 ▲ 4 ▼ に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド； 40

5) 上記 4) に記載の抗体に結合する二次抗体。

【請求項 33】

請求項 1 乃至 3 から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項 34】

下記の a) 乃至 e) から選択される少なくとも一つのポリペプチドをコードするポリヌク 50

レオチドを含有する組換えベクター：

- a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【請求項 3 5】

アデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項 3 3 または 3 4 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 6】

組換えベクター p T A R G E T - R 1 0。

【請求項 3 7】

請求項 3 3 乃至 3 6 から選択される組換えベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の宿主細胞を培養し、組換えタンパク質を生成せしめることを特徴とする、組換えタンパク質の製造方法。

【請求項 3 9】

組換えタンパク質が下記の 1) 乃至 5) から選択されるタンパク質であることを特徴とする、請求項 3 8 に記載の製造方法：

- 1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- 5) 上記 1) 乃至 4) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【請求項 4 0】

下記の 1) 乃至 5) から選択されるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドの少なくともいずれか一つに特異的に結合する抗体；

- 1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- 2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- 3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポ

リペプチド；

４）配列表の配列番号９のアミノ酸番号２７から４６８に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

５）上記１）乃至４）に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、２型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【請求項４１】

10

モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項４０に記載の抗体。

【請求項４２】

ヒト型抗体であることを特徴とする、請求項４０に記載の抗体。

【請求項４３】

下記の１）乃至５）から選択されるポリペプチドのうち少なくとも一つを含有する医薬組成物；

１）配列表の配列番号５のアミノ酸番号１から４５９に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

２）配列表の配列番号５のアミノ酸番号２９から４５９に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

20

３）配列表の配列番号９のアミノ酸番号１から４６８に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

４）配列表の配列番号９のアミノ酸番号２７から４６８に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

５）上記１）乃至４）に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、２型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

30

【請求項４４】

請求項４０乃至４２に記載の抗体の少なくともいずれか一つを含有する医薬組成物。

【請求項４５】

耐糖能異常症及び／または糖尿病治療薬であることを特徴とする、請求項４３に記載の医薬組成物。

【請求項４６】

下記の（ａ）乃至（ｆ）のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子が、ノックアウトされている非ヒト動物；

（ａ）配列表の配列番号４のヌクレオチド番号１から２９５０に示されるヌクレオチド配列；

40

（ｂ）配列表の配列番号４のヌクレオチド番号７９から１４５５に示されるヌクレオチド配列；

（ｃ）配列表の配列番号４のヌクレオチド番号１６３から１４５５に示されるヌクレオチド配列；

（ｄ）配列表の配列番号８のヌクレオチド番号１から３３５４に示されるヌクレオチド配列；

（ｅ）配列表の配列番号８のヌクレオチド番号５９から１４６２に示されるヌクレオチド配列；

（ｆ）配列表の配列番号８のヌクレオチド番号１３７から１４６２に示されるヌクレオチド配列；

50

(g) 上記(a)乃至(f)から選択されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドのヌクレオチド配列；

(h) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(i) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(j) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(k) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(l) 上記(h)乃至(k)に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明はインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する遺伝子として見出された新規糖代謝及び/または脂質代謝に関連する遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該遺伝子および/またはポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって取得される物質、該スクリーニングに使用するキット、該遺伝子および/またはポリペプチドを利用した糖代謝及び/または脂質代謝異常を改善する物質の試験方法、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチド及び/または該抗体を含有する医薬組成物等に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖尿病は近年その患者数が増加しており、成人病のひとつとして注目されている。2型糖尿病(インスリン非依存性糖尿病、NIDDM)は日本人に多い糖尿病のタイプであり、早期発見、早期治療がその予後の点からも重要である。

【0003】

しかし、2型糖尿病はその成因が多様であり、予想されうる原因についての知見は乏しい。2型糖尿病におけるインスリン作用不足の原因として、インスリン感受性機構の異常とインスリン分泌の低下が挙げられる。欧米では多くは前者、すなわちインスリン抵抗性が2型糖尿病の主な原因であるが、日本ではインスリン分泌不全を主な原因とする場合も少なくない。

【0004】

近年、糖尿病治療薬として、インスリン抵抗性改善剤が開発されてきている。「インスリン抵抗性改善剤」は、インスリン受容体のシグナル伝達を増強することにより、インスリン作用の感受性を上げ、不足を補う作用メカニズムによりインスリン抵抗性を改善する薬剤である。そのようなインスリン抵抗性改善剤としては、例えば、トログリタゾン(trogliptazone)(例えば、特許文献1参照。)、ピオグリタゾン(pioglitazone)(例えば、特許文献2参照。)、又はロシグリタゾン(例えば、特許文献3参照。)、GI-262570(例えば、特許文献4参照。)、JTT-501(例えば、特許文献5参照。)、AZ-242(例えば、特許文献6参照。)、MCC-555

10

20

30

40

50

(例えば、特許文献7参照。)、Y M - 4 4 0 (例えば、特許文献8参照。)、K R P - 2 9 7 (例えば、特許文献9参照。)、T - 1 7 4 (例えば、特許文献10参照。)、N C - 2 1 0 0 (例えば、特許文献11参照。)、N N - 6 2 2 (例えば、特許文献12参照。)、B M S - 2 9 8 5 8 5 (例えば、特許文献13参照。)、5 - [4 - (6 - メトキシ - 1 - メチルベンズイミダゾール - 2 - イルメトキシ) ベンジル] チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (例えば、特許文献14参照。) のようなオキサゾール化合物、オキサジアゾリジン化合物、チアゾリジン化合物又はフェノキサジン化合物等を挙げることができる。

【 0 0 0 5 】

これらのインスリン抵抗性改善剤のうち、トログリタゾン、ロジグリタゾン、及びピオグリタゾンのようなチアゾリジン誘導体は臨床の場で用いられている (例えば、非特許文献1、2及び3参照)。これらの薬剤は、基本構造としてチアゾリジン環骨格を有することを特徴としており、核内レセプターである P P A R γ を標的分子とし、肝臓、筋肉、及び脂肪細胞における遺伝子発現を変化させることにより、2型糖尿病患者のインスリン抵抗性を改善すると考えられている。

10

【 0 0 0 6 】

P P A R γ の主要な発現臓器である脂肪組織では、インスリン抵抗性改善剤は P P A R γ に直接作用し脂肪組織のインスリン感受性を亢進する (例えば、非特許文献4参照)。一方、P P A R γ を標的分子とするインスリン抵抗性改善剤の生体内での作用として、筋肉における糖利用の促進および肝臓における糖放出の抑制が挙げられるが、筋肉や肝臓におけるインスリン抵抗性改善が、筋肉や肝臓に発現している P P A R γ に対する直接の作用であるかに関しては今なお不明な点が多い (例えば、非特許文献5参照。)。近年では、チアゾリジン誘導体に代表されるインスリン抵抗性改善剤により、脂肪組織から分泌される因子の産生量が調節されることが、生体のインスリン感受性を調節し2型糖尿病を改善する一因として考えられている。

20

【 0 0 0 7 】

脂肪組織は単なる脂肪の貯蔵器官ではなく、多数の因子を分泌する内分泌器官であり、これら分泌因子の中には、節食およびエネルギー代謝を調節するレプチン (leptin) (例えば、非特許文献6及び7参照。)、インスリン感受性を低下させる作用を持つ腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF - α) (例えば、非特許文献8参照。) やレジスチン (resistin) (例えば、非特許文献9参照。)、インスリン感受性を亢進させるアディポネクチン (adiponectin) (例えば、非特許文献10及び11参照) 等、肥満やインスリン抵抗性、2型糖尿病と関連する多数の因子が含まれる。

30

【 0 0 0 8 】

例えば TNF - α は、肥満・糖尿病を呈するマウスの脂肪組織では発現が上昇しており、TNF - α を中和することによりインスリン抵抗性が改善する (例えば、非特許文献12参照。)。またピオグリタゾン投与によりインスリン抵抗性が改善した状態では、肥満・糖尿病モデルマウスで認められた TNF - α の発現亢進が抑制される (例えば、非特許文献13参照。)。

40

【 0 0 0 9 】

逆にアディポネクチンは、肥満・糖尿病を呈するマウスやヒトでは発現が低下しており (例えば、非特許文献14及び15参照。)、インスリン抵抗性改善剤投与時には、アディポネクチンの発現が上昇する (例えば、非特許文献10及び11参照。)。

【 0 0 1 0 】

心臓血管疾患は、いまだ世界のほとんどの先進諸国における死亡の主原因である。アテローム性動脈硬化症は、急性冠症候群 (不安定狭心症、急性心筋梗塞、虚血性突然死)、脳血栓および脳梗塞の主な病因であり、心臓血管疾患による死亡の大部分は、これらの梗塞により引き起こされる。米国では、毎年、アテローム性動脈硬化症によって引き起こされる心筋梗塞により55万人が死亡していると推定される。1991年の統計では、日本で

50

の死亡原因の第一位がアテローム性動脈硬化症による心臓血管疾患である。疫学研究により、アテローム性動脈硬化症は、高コレステロール血症、高脂血症、高血圧症、喫煙などの多くの危険因子によって生じることが判明している。

【 0 0 1 1 】

血清脂質にはコレステロール（コレステロールエステル、遊離コレステロール）、リン脂質（レシチン、スフィンゴミエリン等）、トリグリセライド（中性脂肪）、遊離脂肪酸、その他のステロール類などがあるが、とくに臨床的に問題となるのは、中性脂肪およびコレステロールの増加である（例えば、非特許文献 1 6 及び 1 7 参照。）。したがって、血中脂質値の適切なコントロールは、虚血性心疾患、脳梗塞などに代表される動脈硬化に関連した諸疾患の予防または治療に極めて重要である（例えば、非特許文献 1 8 参照。）

10

また、近年、中性脂肪が動脈硬化に関連した諸疾患のリスクとして再認識されてきている（例えば、非特許文献 1 9 参照）。血中の中性脂肪を低下せしめる薬剤としては、フィブリン酸系化合物、例えば、クロフィブレート、フェノフィブレート、ベザフィブレート、ゲムフィブロジルなどが医薬として供されており、血漿中の中性脂肪およびコレステロール値を低下させ、コレステロール値の高い個体における虚血性心疾患の予防に有用であることが知られている（例えば、非特許文献 2 0、2 1 及び 2 2 参照。）。

【 0 0 1 2 】

一方、血中コレステロール値を低下させる薬剤としては、コレステラミン、コレステポール等の胆汁酸を捕捉してその吸収を阻害するもの（例えば、特許文献 1 5 参照。）、メリナミド（例えば、特許文献第 1 6 参照。）等のアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素（A C A T）を阻害してコレステロールの腸管吸収を抑制するもの等の他、コレステロールの生合成を抑制する薬剤が注目されている。コレステロール生合成抑制薬剤として、特に 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリルコエンザイム A（H M G - C o A）還元酵素を阻害するロバスタチン（例えば、特許文献 1 7 参照。）、シンバスタチン（例えば、特許文献 1 8 参照。）、プラバスタチン（例えば、特許文献 1 9 参照。）等が医薬として供されている。しかしながら、H M G - C o A 還元酵素を阻害するとコレステロールの生合成以外に、ユビキノン、ドリコールやヘム A の様な、その他の生体に必要な成分の生合成も阻害されるため、それらに起因する副作用が懸念される。また、最近では、糖尿病の前段階として耐糖能異常症（i m p a i r e d g l u c o s e t o l e r a n c e : I G T）が注目され始め（例えば、非特許文献 2 3 参照）、糖代謝異常を初期段階から有効に治療する治療薬の開発が望まれている。

20

30

【 0 0 1 3 】

より安全で、かつより効果的な中性脂肪低下作用を示す脂質低下剤を得ることは、高脂血症の予防または治療あるいは動脈硬化の治療または予防に有用な、従って医薬としてより有用な薬剤を提供することになる。

【 0 0 1 4 】

【特許文献 1】

特開昭 6 0 - 0 5 1 1 8 9 公報

【特許文献 2】

特開昭 6 1 - 2 6 7 5 8 0 号公報

40

【特許文献 3】

国際公開第 9 5 / 2 1 6 0 8 号パンフレット

【特許文献 4】

国際公開第 0 0 / 8 0 0 2 号パンフレット

【特許文献 5】

国際公開第 9 5 / 1 8 1 2 5 号パンフレット

【特許文献 6 参照】

国際公開第 9 9 / 6 2 8 7 2 号パンフレット

【特許文献 7】

欧州特許出願公開第 6 0 4 , 9 8 3 号明細書

50

- 【特許文献 8】
国際公開第 9 4 / 2 5 4 4 8 号パンフレット
- 【特許文献 9】
米国特許第 5 , 9 4 8 , 8 0 3 号明細書
- 【特許文献 1 0】
欧州特許第 2 8 3 0 3 5 号明細書
- 【特許文献 1 1】
欧州特許出願公開第 7 8 7 7 2 5 号明細書
- 【特許文献 1 2】
国際公開第 9 9 / 1 9 3 1 3 号パンフレット 10
- 【特許文献 1 3】
国際公開第 0 1 / 2 1 6 0 2 号パンフレット
- 【特許文献 1 4】
欧州特許出願公開 0 7 4 5 6 0 0 号明細書
- 【特許文献 1 5】
米国特許第 4 0 2 7 0 0 9 号明細書
- 【特許文献 1 6】
仏国特許第 1 4 7 6 5 6 9 号明細書
- 【特許文献 1 7】
米国特許第 4 2 3 1 9 3 8 号明細書 20
- 【特許文献 1 8】
米国特許第 4 4 4 4 7 8 4 号明細書
- 【特許文献 1 9】
米国特許第 4 3 4 6 2 2 7 号明細書
- 【非特許文献 1】
「ライフ・サイエンス (L i f e S c i e n c e) 」、2 0 0 0 年、第 6 7 巻、p . 2 4 0 5 - 2 4 1 6
- 【非特許文献 2】
「日本臨床」、2 0 0 0 年、第 5 8 巻、p . 3 8 9 - 4 0 4
- 【非特許文献 3】
「ファーマコセラピー (P h a r m a c o t h e r a p y) 」、2 0 0 1 年、第 2 1 巻、p . 1 0 8 2 - 1 0 9 9 30
- 【非特許文献 4】
「エンドクラインロジー (E n d o c r i n o l o g y) 」、1 9 9 6 年、第 1 3 7 巻、1 9 8 4 - 1 9 9 0
- 【非特許文献 5】
「エンドクラインロジー (E n d o c r i n o l o g y) 」、1 9 9 8 年、第 1 3 9 巻、p . 5 0 3 4 - 5 0 4 1
- 【非特許文献 6】
「ネイチャー (N a t u r e) 」、1 9 9 4 年、第 3 7 2 巻、p . 4 2 5 - 4 3 2 40
- 【非特許文献 7】
「ネイチャー (N a t u r e) 」、1 9 9 8 年、第 3 9 5 巻、p . 7 6 3 - 7 7 0)
- 【非特許文献 8】
「ネイチャー (N a t u r e) 」、1 9 9 7 年、第 3 8 9 巻、p . 6 1 0 - 6 1 4
- 【非特許文献 9】
「ネイチャー (N a t u r e) 」、2 0 0 1 年、第 4 0 9 巻、p . 3 0 7 - 3 1 2
- 【非特許文献 1 0】
「ネイチャー・メディシン (N a t u r e M e d i c i n e) 」、2 0 0 1 年、第 7 巻、p . 9 4 1 - 9 4 6
- 【非特許文献 1 1】 50

「ネイチャー・メディスン (Nature Medicine)」、2001年、第7巻、p. 947 - 953

【非特許文献12】

「サイエンス (Science)」、1993年、第259巻、p. 87 - 91

【非特許文献13】

「エンドクラインロジー (Endocrinology)」、1994年、第134巻、p. 264 - 70

【非特許文献14】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1996年、第271巻、p. 10697 - 10703 10

【非特許文献15】

「バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス・リサーチ・コミュニケーション (Biochemistry and Biophysics Research Communication)」、1999年、第257巻、p. 79 - 83

【非特許文献16】

中村治雄編集、「コモン・ディズィーズ・シリーズ (COMMON DISEASE SERIES) No. 19 高脂血症」、南江堂、1991年

【非特許文献17】

「サーキュレーション (Circulation)」、2000年、第101巻、p. 2777 - 2782 20

【非特許文献18】

「アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー (American Journal of Cardiology)」、1999年、第83巻、3F - 12F

【非特許文献19】

「ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン (The New England Journal of Medicine)」、1999年、第341巻、p. 410 - 418

【非特許文献20】

「アニュアル・レビュー・オブ・ファーマコロジー (Annual Review of Pharmacology)」、1973年、13巻、p. 287 - 308 30

【非特許文献21】

「サーキュレーション (Circulation)」、2000年、第102巻、p. 21 - 27

【非特許文献22】

「ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディスン (The New England Journal of Medicine)」、1987年、第317巻、p. 1237 - 1245

【非特許文献23】

「ネイチャー (Nature)」、2001年、第414巻、p. 782 - 787 40

【0015】

【発明が解決しようとする課題】肥満・インスリン抵抗性・糖尿病モデル動物で発現が低下しており、PPAR γ を標的分子とするインスリン抵抗性改善剤により発現が誘導されてくる物質は、糖代謝の調節に関与する可能性を有する因子であると考えられる。また、インスリン抵抗性改善剤を投与すると血糖値の低下の他に血中の中性脂質濃度の低下も確認されるので、脂質代謝の調節に関与する可能性を有する因子であるとも考えられる。

【0016】

本発明の目的はインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する遺伝子として見出された新規糖代謝及び/または脂質代謝に関連する遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該遺伝子および/またはポリペプチドの機能を促進する 50

かまたは抑制する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって取得される物質、該スクリーニングに使用するキット、該遺伝子および/またはポリペプチドを利用した糖代謝及び/または脂質代謝異常を改善する物質の試験方法、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチド及び/または該抗体を含有する医薬組成物等を提供することにある。

【0017】

本発明者はPPAR γ を標的分子とするインスリン抵抗性改善剤を投与することによって発現量が顕著に増加するポリヌクレオチドを見出し、該ポリヌクレオチドが糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善剤、例えば、インスリン抵抗性改善剤および/または血中中性脂質濃度低下剤の新規スクリーニング方法に使用でき、また、糖代謝異常改善剤および/または血中中性脂質濃度低下剤、例えば、インスリン抵抗性改善剤、高脂血症治療剤にもなり得ることを見出し、本発明を完成させた。

10

【0018】

【発明を解決するための手段】

本発明は、

(1) 下記の1)乃至6)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

1) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；

2) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；

20

3) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；

4) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；

5) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド。

6) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

(2) 下記の1)乃至4)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

1) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

30

2) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

40

3) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに

50

投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

4) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

10

(3) 下記の1)乃至5)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド：

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

3) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

4) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

20

5) 上記1)乃至4)から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(4) 下記の1)乃至4)のいずれか一つに記載のポリペプチド：

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

30

3) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

4) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

(5) 下記の1)乃至4)のいずれか一つに記載のポリペプチド：

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

40

2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

50

3) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

4) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号5のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

10

(6) 下記の工程1)乃至3)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法:

1) 被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より、全RNAを抽出する工程;

2) 上記1)に記載の検体由来の全RNAと正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より抽出した全RNAにおける下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程;

20

▲1▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲2▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲3▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲4▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド3)上記2)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記1)における被験者または被験動物の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態を判定する工程、

30

(7) 下記の工程1)および2)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法:

1) 被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程;

40

▲1▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲2▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド

▲3▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲4▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

50

▲ 5 ▼ 上記 ▲ 1 ▼ 乃至 ▲ 4 ▼ に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 上記 1) で測定されたポリペプチドの発現量と正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、上記 1) における被験者または被験動物の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態を判定する工程、

10

(8) 下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むこ

20

とからなるポリペプチド；
e) 上記 a) 乃至 d) から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 被験物質と上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを接触する工程；

2) 上記工程 1) で選択されたポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質を選

30

択する工程、
(9) 下記の工程 1) 乃至 5) を含む、下記の a) 乃至 g) の少なくとも一つのポリヌクレオチドの発現を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 1 から 2 9 5 0 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b) 配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 7 9 から 1 4 5 5 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

c) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 1 から 3 3 5 4 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

d) 配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 5 9 から 1 4 6 2 に示されるヌクレオチド配

40

列を含むことからなるポリヌクレオチド、
e) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

f) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

g) 上記 a) 乃至 f) から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有す

50

るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 2) 被験物質を添加しない培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 3) 上記1)により得られた全RNAにおける、上記a)乃至g)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- 4) 上記2)により得られた全RNAにおける、上記3)で測定されてポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- 5) 上記3)で測定されたポリヌクレオチドの発現量と上記4)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析する工程。

(10) 下記の工程1)乃至5)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を改善する物質のスクリーニング方法； 10

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 2) 被験物質を添加しない培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 3) 上記1)により得られた全RNAにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

▲1▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲2▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲3▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、 20

▲4▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

- 4) 上記2)により得られた全RNAにおける、上記3)の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程； 30

- 5) 上記3)で測定されたポリヌクレオチドの発現量と上記4)で測定された該ポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、該被験物質の、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程、

(11) 下記の工程1)乃至3)を含む、下記のa)乃至g)の少なくとも一つの発現を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、 40

c) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

d) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

e) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

f) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

g) 上記a)乃至f)から選択されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリ 50

ン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
 - 2) 上記1)由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した細胞由来全RNAにおける、上記a)乃至g)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
 - 3) 上記2)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析する工程、
- (12) 下記の工程1)乃至3)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質のスクリーニング方法：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞より、全RNAを抽出する工程；
- 2) 上記1)由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した細胞由来全RNAにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- ▲1▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲2▼配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲3▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- ▲4▼配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

- 3) 上記2)で測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程、
- (13) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはランオン・アッセイであることを特徴とする、(6)、(9)、(10)、(11)及び(12)のいずれか一つに記載の方法、

- (14) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が動物組織または動物細胞由来の相補的DNA群または該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップまたはアレイを用いることを特徴とする、(6)、(9)、(10)、(11)及び(12)のいずれか一つに記載の方法、

- (15) 下記の工程1)乃至3)を含む、下記のa)乃至e)に記載のポリペプチドの少なくともいずれか一つの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

- a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
- e) 上記a)乃至d)から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数

10

20

30

40

50

個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
2) 上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

3) 2)で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した細胞における該ポリペプチドの発現量の差を解析する工程、

(16) 下記の工程1)乃至3)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質のスクリーニング方法；

1) 被験物質を添加した培地で培養した細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
2) 上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

▲1▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲2▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド

▲3▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

▲4▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

3) 2)で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した細胞における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善効果を判定する工程、

(17) ポリペプチドの発現量の測定方法が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法または固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、(7)、(8)、(15)及び(16)のいずれか一つに記載の方法。

(18) 下記の工程1)および2)を含む、下記のa)乃至e)から選択されるポリペプチドの少なくともいずれか一つの機能を促進するか抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると

10

20

30

40

50

血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 非ヒト哺乳動物に、上記 a) 乃至 e) から選択されるポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程；

2) 上記 1) に記載の動物の血中のグルコース濃度および/またはインスリン濃度を測定する工程、

(19) 下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) に記載のポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド； 10

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド； 20

1) 上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを発現する細胞と被験物質を脂肪分解促進物質を含む溶液中で接触させる；

2) 1) に記載の溶液中の遊離脂肪酸濃度を測定する、

(20) 下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) に記載のポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド； 30

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド； 40

1) 上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

2) 1) に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する、

(21) 下記の 1) 乃至 5) のいずれか一つに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに被験物質を含む試料を接触させ、次いで、該ポリペプチドに結合した物質を分離することを特徴とする糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善物質の単離方法；

1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド； 50

2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド;

3) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド;

4) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド;

5) 上記1)乃至4)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

(22) 下記の工程1)および2)を含む、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の治療および/または予防物質の試験方法:

1) 非ヒト哺乳動物に、下記の▲1▼乃至▲5▼のいずれか一つに記載のポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程;

▲1▼ 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲2▼ 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド

▲3▼ 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲4▼ 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド、

▲5▼ 上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド;

2) 上記1)に記載の動物の血中のグルコース濃度および/または中性脂質濃度を測定する工程、

(23) 下記の工程1)および2)を含む、糖代謝異常及び/または脂質代謝異常の治療及び/または予防物質の試験方法:

1) 非ヒト哺乳動物に、下記のa)乃至e)から選択されるポリペプチドおよび試験しようとする物質を投与する工程;

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド;

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド;

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド;

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド;

e) 上記a)乃至d)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド;

10

20

30

40

50

2) 上記 1) に記載の動物の血中のグルコース濃度および / または中性脂質濃度を測定する工程、

(24) 下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、糖代謝異常および / 脂質代謝異常の治療および / または予防物質の試験方法：

1) 下記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドを発現する細胞と被験物質を脂肪分解促進物質を含む溶液中で接触させる；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 1) に記載の溶液中の遊離脂肪酸濃度を測定する、

(25) 下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、糖代謝異常および / または脂質代謝異常の治療および / または予防物質の試験方法：

1) 下記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

2) 1) に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する、

(26) 脂肪分解促進物質が TNF- α であることを特徴とする、(19) または (24) に記載の方法、

(27) 細胞が哺乳動物由来培養細胞であることを特徴とする、(9) 乃至 (20)、及び、(24) 乃至 (26) のいずれか一つに記載の方法、

(28) 哺乳動物由来培養細胞が霊長類またはげっ歯類動物由来であることを特徴とする (27) に記載の方法、

(29) 哺乳動物由来培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする (27) に記載の方法、

(30) 哺乳動物由来培養細胞が、マウス由来の繊維芽細胞、マウス、ラットもしくはヒト由来の脂肪細胞、マウス、ラットもしくはヒト由来の肝細胞であることを特徴とする (

10

20

30

40

50

27)に記載の方法。

(31) (8)乃至(21)、及び、(26)乃至(29)のいずれか一つに記載の方法によって取得された物質、

(32)下記の1)乃至5)からなる群から選択される少なくとも1以上を含むキット：

1)配列表の配列番号4または8に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの一部乃至全部を特異的に増幅するための15から30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2)配列表の配列番号4または8に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3)上記1)に記載のオリゴヌクレオチドプライマーまたは上記2)に記載のポリヌクレオチドプローブのいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料；

4)下記の▲1▼乃至▲5▼から選択されるポリペプチドに特異的に結合し、該タンパク質を検出するための抗体；

▲1▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲2▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲3▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲4▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

5)上記4)に記載の抗体に結合する二次抗体、

(33) 1乃至3から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを含む組換えベクター、

(34)下記のa)乃至e)から選択される少なくとも一つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター；

a)配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b)配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c)配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d)配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e)上記a)乃至d)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

(35)アデノウイルスベクターであることを特徴とする、33または34に記載の組換えベクター、

(36)組換えベクター p T A R G E T - R 1 0、

10

20

30

40

50

(3 7) (3 3) 乃至 (3 6) から選択される組換えベクターで形質転換された宿主細胞、

(3 8) (3 7) に記載の宿主細胞を培養し、組換えタンパク質を生成せしめることを特徴とする、組換えタンパク質の製造方法、

(3 9) 組換えタンパク質が下記の 1) 乃至 5) から選択されるタンパク質であることを特徴とする、(3 8) に記載の製造方法：

1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

5) 上記 1) 乃至 4) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

(4 0) 下記の 1) 乃至 5) から選択されるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドの少なくともいずれか一つに特異的に結合する抗体；

1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

5) 上記 1) 乃至 4) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

(4 1) モノクローナル抗体であることを特徴とする、(4 0) に記載の抗体。

(4 2) ヒト型抗体であることを特徴とする、(4 0) に記載の抗体、

(4 3) 下記の 1) 乃至 5) から選択されるポリペプチドのうち少なくとも一つを含有する医薬組成物：

1) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 2 9 から 4 5 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

3) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

4) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 2 7 から 4 6 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

5) 上記 1) 乃至 4) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗

10

20

30

40

50

性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

(44) (40)乃至(42)に記載の抗体の少なくともいずれか一つを含有する医薬組成物、

(45)耐糖能異常症及び/または糖尿病治療薬であることを特徴とする、(43)に記載の医薬組成物、

(46)下記の(a)乃至(1)のいずれか1項に記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子が、ノックアウトされている非ヒト動物：

(a)配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列；

(b)配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列；

(c)配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列；

(d)配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列；

(e)配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列；

(f)配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるヌクレオチド配列；

(g)上記(a)乃至(f)から選択されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドのヌクレオチド配列；

(h)配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(i)配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(j)配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(k)配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(1)上記(h)乃至(k)に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

に関する。

【0019】

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液 ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック (Clontech) 社製) 中、68 でハイブリダイズすること、または、DNAを固定したフィルターを用いて0.7 - 1.0 MのNaCl存在下68 でハイブリダイゼーションを行なった後、0.1 - 2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度SSCとは150 mM NaCl、15 mM クエン酸ナトリウムからなる)を用い、6

10

20

30

40

50

8 で洗浄することにより同定することができる条件またはそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

【0020】

本発明における、糖代謝異常には、耐糖能異常症、糖尿病を初めとする糖代謝の異常によって引き起こされる各種疾患が含まれ、インスリン感受性の異常によって引き起こされる2型糖尿病も糖代謝異常に含まれる。本発明における脂質代謝異常とは、体内での脂質の代謝に異常を来している状態をいい、脂質代謝異常によって引き起こされる疾患としては例えば、高コレステロール血症、高脂血症を挙げることができる。

【0021】

【発明の実施の形態】

10

1. インスリン抵抗性改善剤によって発現が変動するポリヌクレオチド

本発明における「インスリン抵抗性改善剤によって発現が変動するポリヌクレオチド」とは、ヒトおよび/またはヒト以外の哺乳動物の、インスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドを意味する。

【0022】

本発明におけるインスリン抵抗性改善剤とは、糖尿病の治療に使用される薬剤をいい、インスリン抵抗性改善剤としては有効成分としてインスリン抵抗性改善剤を有する医薬組成物を挙げることができる。「インスリン抵抗性改善剤」は、インスリン受容体のシグナル伝達を増強することにより、インスリン作用の感受性を上げ、不足を補う作用メカニズムによりインスリン抵抗性を改善する薬剤であり、糖尿病用剤として使用される。そのようなインスリン抵抗性改善剤としては、例えば、

20

特開昭60-051189公報に記載されたトログリタゾン(5-[4-(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-イルメトキシ)ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン)及び、その薬理上許容される塩(塩酸塩等)、

特開昭61-267580号公報(EP特許第193,256号公報又は米国特許第4,687,777号公報)に記載されたピオグリタゾン(5-[4-[2-(5-エチル-ピリジン-2-イル)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン)及び、その薬理上許容される塩(塩酸塩等)、

特表平9-512249号公報(WO95/21608号公報又は米国特許第5,002,953号公報)に記載されたロシグリタゾン(5-[4-[2-(N-メチル-N-2-ピリジルアミノ)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン)及び、その薬理上許容される塩(マレイン酸塩等)、

30

WO00/8002号公報に記載されたGI-262570(化学名は、2(S)-(2-ベンゾイルフェニルアミノ)-3-[4-[2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ]フェニル]プロピオン酸)及び、その薬理上許容される塩(塩酸塩等)、

WO95/18125号公報(EP公開第684,242号公報又は米国特許第5,728,720号公報)に記載されたJTT-501(4-[4-[2-(5-メチル-2-フェニル-オキサゾール-4-イル)エトキシ]ベンジル]-3,5-イソオキサゾリジンジオン)及び、その薬理上許容される塩(塩酸塩等)、WO99/62872号公報(EP公開第1,084,103号公報又は米国特許第6,258,850号公報)に記載されたAZ-242(2-エトキシ-3-[4-[2-(4-メチルスルホニルオキシフェニル)エトキシ]フェニル]プロパン酸)及び、その薬理上許容される塩(ナトリウム塩等)、

40

特開平6-247945号公報(EP公開第604,983号公報又は米国特許第5,594,016号公報)に記載されたMCC-555(5-[6-(2-フルオロベンジルオキシ)ナフタレン-2-イルメチル]チアゾリジン-2,4-ジオン)及び、その薬理上許容される塩、

WO94/25448号公報(EP特許第696,585号公報又は米国特許第5,643,931号公報)に記載されたYM-440((Z)-1,4-ビス[4-(3,5-

50

ジオキソ - 1 , 2 , 4 - オキサジアゾリジン - 2 - イルメチル] フェノキシ] - 2 - ブテンで) 及び、その薬理上許容される塩、

特開平 10 - 87641 号公報 (米国特許 5 , 948 , 803 号公報) に記載された K R P - 297 (5 - (2 , 4 - ジオキソチアゾリジン - 5 - イルメチル) - 2 - メトキシ - N - (4 - トリフルオロメチルベンジル) ベンズアミド) 及び及びその薬理上許容される塩、

特開昭 64 - 56675 号公報 (E P 特許第 283035 号公報又は米国特許第 4 , 897 , 393 号公報) に記載された T - 174 (5 - [2 - (2 - ナフチルメチル) - 5 - ベンズオキサゾリルメチル] - 2 , 4 - チアゾリジンジオン) 及び薬理上許容される塩 (塩酸塩等) 、

特開平 9 - 100280 号公報 (E P 公開第 787725 号公報又は米国特許第 5 , 693 , 651 号公報) に記載された N C - 2100 (5 - (7 - ベンジルオキシ - 3 - キノイルメチル) - 2 , 4 - チアゾリジンジオン) 及び、その薬理上許容される塩 (塩酸塩等) 、

W O 99 / 19313 号公報 (米国特許 6 , 054 , 453 号公報) に記載された N N - 622 ((S) - 3 - [4 - [2 - (フェノキサジン - 10 - イル) エトキシ] フェニル] - 2 - エトキシプロパン酸) 及び、その薬理上許容される塩 (ナトリウム塩等) 、

W O 01 / 21602 号公報に記載された B M S - 298585 (N - (4 - メトキシフェノキシカルボニル) - N - [4 - [2 - (5 - メチル - 2 - フェニル - 4 - オキサゾリル) エトキシ] ベンジル] グリシン) であり、及びその薬理上許容される塩 (塩酸塩等)

、
E P 公開第 745600 号公報に記載された 5 - [4 - (6 - メトキシ - 1 - メチルベンズイミダゾール - 2 - イルメトキシ) ベンジル] チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン及びその薬理上許容される塩 (塩酸塩等) (ここで、5 - [4 - (6 - メトキシ - 1 - メチルベンズイミダゾール - 2 - イルメトキシ) ベンジル] チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンの塩酸塩を、以下、「化合物 A」という。) 、

のようなオキサゾール化合物、オキサジアゾリジン化合物、チアゾリジン化合物又はフェノキサジン化合物を挙げることができ、好適には、トログリタゾン、ピオグリタゾン、M C C - 555、K R P - 297、T - 174、N C - 2100、化合物 A であり、更に好適には、ピオグリタゾン、ロシグリダゾン又は化合物 A であり、最も好適には、トログリタゾンまたは化合物 A である。

【0023】

本発明のインスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドは具体的には、配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 79 から 1455 に示されるヌクレオチド配列からなるポリペプチドが含まれる。

【0024】

なお、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、天然型の、インスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の一部を他のヌクレオチドへの置換やヌクレオチドの欠失、付加などの改変により、天然型の、インスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドと同等に、インスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドを調製することが可能である。このように天然型のヌクレオチド配列においてヌクレオチドが置換、欠失、もしくは付加したヌクレオチド配列を有し、天然型の、インスリン抵抗性改善剤添加によって発現が変動するポリヌクレオチドと同等のインスリン抵抗性改善剤添加による発現の変動を示すポリヌクレオチドもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ヌクレオチド配列の改変は、例えば、制限酵素あるいは D N A エキソヌクレアーゼによる欠失導入、部位特異的変異誘発法による変異導入、変異プライマーを用いた P C R 法によるヌクレオチド配列の改変、合成変異 D N A の直接導入などの方法により行うことができる。インスリン抵抗性改善剤添加によって発現量が変動するポリヌクレオチドの具体例としては、配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 79 から 1455 で示されるヌクレオチド配列を含むこ

10

20

30

40

50

とからなるポリヌクレオチドまたは、配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチドをその例としてあげることができるが、これらに限定されない。なお、本発明における「ポリヌクレオチド」という用語には、DNA のみならずその mRNA や cDNA も含むものとする。また、全長遺伝子や EST も含むものとする。

【0025】

1.1 インスリン抵抗性改善剤投与によっては発現が変動するポリヌクレオチドの特定方法

本発明の、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が変動するポリヌクレオチドは、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現量が変動するポリヌクレオチドであり、哺乳動物にインスリン抵抗性改善剤を投与することによって、発現の上昇を確認することができる。具体的には糖尿病モデルマウスを用いて、A) インスリン抵抗性改善剤化合物 A を投与する場合、B) インスリン抵抗性改善剤トログリタゾンを投与する場合についてそれぞれ、以下の工程 1) 乃至 2) を順次行なうことによって、特定することができる。

【0026】

A) インスリン抵抗性改善剤化合物 A を投与する場合

1) 化合物 A を投与した KK マウス及び化合物 A を投与しなかった KK マウスの皮下白色脂肪組織から全 RNA を調製する工程；

2) 上記 1) に記載の各 RNA より cRNA または cDNA を調製し、これを利用して化合物 A 投与と非投与で発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを特定する工程。

【0027】

B) インスリン抵抗性改善剤トログリタゾンを投与する場合

1) トログリタゾンを投与した KK マウス及びトログリタゾンを投与しなかった KK マウスの皮下白色脂肪組織から全 RNA を調製する工程；

2) 上記 1) に記載の各 RNA より cRNA または cDNA を調製し、これを利用してトログリタゾン投与と非投与で発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを特定する工程。

【0028】

以下、各工程を順次説明する。

【0029】

工程 1) 全 RNA を調製する工程

本工程で用いられる KK マウスは肥満、高血糖および/または高インスリン血症を示す 2 型糖尿病のモデル動物であり、網膜の肥厚、細動脈瘤、腎糸球体の硬化、脂肪肝、心筋症、石灰沈着、膵島の肥大、膵β細胞の脱顆粒、グリコーゲン沈着、肝と末梢組織でのインスリン感受性の低下などの特長を有し、例えば日本クレアより購入することができる。

【0030】

KK マウスの白色脂肪組織から全 RNA を抽出するに際しては、屠殺、採血後に他の組織が混入しないように注意しながら白色脂肪組織を切り出し、該組織を RNA 抽出用の溶媒（例えばフェノール等、リボヌクレアーゼを不活性化作用を有する成分を含むもの）で直接溶解するのが好ましい。または、該組織の細胞を破壊しないように、スクレーパーで慎重に掻きとるか、もしくはトリプシン等のタンパク質分解酵素を用いて穏やかに組織から細胞を抽出するなどの方法により、細胞を回収した後、速やかに RNA 抽出工程に移行する。

【0031】

RNA の抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159) などを採用しうるが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。また、市販の RNA 抽出用試薬（例えば、ISOGEN (ニッポンジーン (株) 製)、TRIzol 試薬 (ギブコ・ビーアールエル社製)）等を試薬に添付のプロトコールに従っ

10

20

30

40

50

て用いることもできる。

【0032】

得られた全RNAは、必要に応じてさらにmRNAのみに精製して用いるのが好ましい。精製方法は特に限定されないが、真核細胞の細胞質に存在するmRNAの多くは、その3'末端にポリ(A)配列を持つことが知られているので、この特徴を利用して例えばビオチン化したオリゴ(dT)プローブにmRNAを吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ビオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用してmRNAを捕捉し洗浄操作の後、mRNAを溶出することにより、mRNAを精製することができる。また、オリゴ(dT)セルロースカラムにmRNAを吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。さらにショ糖密度勾配遠心法などにより、mRNAをさらに分画することもできる。ただし、本発明の方法のためには、これらmRNAの精製工程は必須ではなく、上記1)に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの発現の検出が可能である限りにおいて、全RNAをその後の工程に用いることもできる。

10

【0033】

対照として用いられる、化合物Aまたはトログリダゾン投与しなかったマウス白色脂肪細胞由来の全RNAは上記と同様に抽出、精製することができる。

【0034】

工程2) インスリン抵抗性改善剤投与と非投与で発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを特定する工程

ポリヌクレオチドの発現量は、工程1で得られた全RNAよりcRNAまたはcDNAを調製し、これを適当な標識でラベルすることにより、そのシグナル強度として検出することができる。

20

【0035】

以下に、ポリヌクレオチド発現量の解析方法として、固相化試料を用いた解析方法と、その他のいくつかの解析方法について説明する。

【0036】

(1) 固相化試料を用いた解析方法

i) 固相化試料

前記固相化試料としては、例えば以下のものが挙げられる。

a) 遺伝子チップ：

30

データベース上のEST(expressed sequence tag)配列またはmRNA配列をもとに合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドが固相化された遺伝子チップを用いることができる。このような遺伝子チップとしてはアフィメトリックス(Affymetrix)社製の遺伝子チップ(Lipshutz、R. J. et al. (1999) Nature genet. 21、supplement、20-24)を用いることができるが、これに限定されず、公知の方法に基づき作製してもよい。遺伝子チップ上に固相化するアンチセンスオリゴヌクレオチドの基となるEST配列またはmRNA配列は、解析対象の動物あるいは動物細胞と、同種の動物由来のものであることが最も好ましい。マウスやマウス由来培養細胞を用いるときはマウス由来のものが望ましく、ヒト検体やヒト由来培養細胞を用いるときはヒト由来のものが望ましい。KKマウス由来のmRNAを解析する場合はマウス由来のものが最も望ましく、例えば、アフィメトリックス社製マウス19Kセット(Murine 19K SET: 19KA、19KB、19KC)やマウス11Kセット(Murine 11K SET: 11KA、11KB)を用いることができる。ヒト白色脂肪細胞由来のmRNAを解析する場合には、ヒト由来のものが好ましく、例えば、アフィメトリックス社製ヒトU95セットまたはU133セットを用いることができる。しかしながら、それらに限定されず、例えば近縁種の動物由来のものも使用可能である。近縁種としては、例えば哺乳類同士を挙げることができ、ヒトとマウス、ヒトとサル等組み合わせを挙げることができるがこれらに限定されない。

40

【0037】

b) マウスまたはヒト、全RNAあるいは特定の組織から得た全RNAより作製されたc

50

DNAまたはRT-PCR産物が固相化された、アレイまたはメンブレンフィルター：
上記cDNAまたはRT-PCR産物は、マウスまたはヒトのESTデータベース等の配
列情報を基に作製されたプライマーで逆転写酵素反応やPCRを実施することによりクロー
ン化されたものである。このcDNAやRT-PCR産物は、あらかじめインスリン抵抗
性改善剤を投与したマウスとインスリン抵抗性改善剤を投与しなかったマウスとの間で
発現量の異なる全RNAを、サブトラクション法(Diatchenki, L, et al, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6
030)、ディファレンシャルディスプレイ法(Liang, P., et al, (1992) Nucleic Acids Res. 23, 3685-3690)等を利用し
て選択されたものであってもよい。また、アレイやフィルターは市販のもの(例えば、イン
テリジーン：タカラバイオ社製等)を使用してもよいし、上記cDNAやRT-PCR
産物を市販のスポッターで(例えば、GMS 417アレイヤー：タカラバイオ社製等)を用
いて固相化することにより作製してもよい。

10

【0038】

i i) プロブの作製と解析

標識プロブは、特定のmRNAクローンではなく、発現している全てのmRNAを標識
したものをを用いる。プロブ作製のための出発材料としては精製していないmRNAを用
いてもよいが、前述の方法で精製したポリ(A)+RNAを用いることが望ましい。以下
に、各種固相化試料を用いた場合の、標識プロブの調製方法と検出、解析方法について
説明する。

20

【0039】

a) アフィメトリックス社製遺伝子チップ：

アフィメトリックス社製遺伝子チップに添付されたプロトコール(アフィメトリックス社発
現解析技術マニュアル)に従ってビオチン標識したcRNAプロブを作製する。次いで
アフィメトリックス社製遺伝子チップに添付のプロトコール(発現解析技術マニュアル)
に従って、アフィメトリックス社製の解析装置(GeneChip Fluidics
Station 400)を用いてハイブリダイゼーションおよび解析を行い、アビジン
による発光を検出、解析を行なう。

【0040】

b) アレイ：

逆転写酵素反応でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、cDNAの検出がで
きるようにcDNAを標識しておくことが必要であり、蛍光色素で標識する場合には、蛍
光色素(例えばCy3、Cy5など)で標識されたd-UTPなどを加えておくことによ
りcDNAを蛍光標識する。このとき、被験物質添加細胞由来のポリ(A)⁺RNAと対
照細胞由来のポリ(A)⁺RNAをそれぞれ異なる色素で標識しておけば、後のハイブリ
ダイゼーション時には両者を混合して用いることができる。アレイとして例えば、タカラ
バイオ(株)社の市販アレイを用いる場合、同社のプロトコールに従いハイブリダイゼー
ションおよび洗浄を行って、蛍光シグナル検出機(例えばGMS 418アレイスキャナー
(タカラバイオ(株)社製)等)で蛍光シグナルを検出後、解析を行う。ただし、使用す
るアレイとしては市販のものに限定されず、自家製のもの、特別に作製したのもでもよい
。

30

40

【0041】

c) メンブレンフィルター：

逆転写酵素でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、放射性同位元素(例えば
、d-CTP等)を加えることにより標識プロブを調製し、常法によりハイブリダイゼー
ションを行ない、例えば、市販のフィルター製マイクロアレーである、アトラスシステム
(クロンテック社製)を用いてハイブリダイゼーションおよび洗浄を行なった後、解析装
置(例えば、アトラスイメージ：クロンテック社製等)を用いて検出、解析を行なう。

【0042】

前記a)乃至c)のいずれに記載の方法も、同一ロットの固相化試料にインスリン抵抗性

50

改善剤を投与したK Kマウス白色脂肪細胞由来のプローブまたはヒトの白色脂肪細胞由来のプローブとインスリン抵抗性改善剤を投与しないK Kマウス白色脂肪細胞由来のプローブまたはヒトの白色脂肪細胞由来のプローブをそれぞれハイブリダイズさせる。このとき、使用するプローブ以外のハイブリダイゼーション以外の条件は同じとする。蛍光標識プローブを用いる場合には、それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識しておけば一つの固相化試料に両プローブの混合物を一度にハイブリダイズさせて蛍光強度を読み取ることができる (Brown、P. O. et al. (1999) Nature genet、21、supplement、33-37)。

【0043】

(2) その他の解析方法

10

上記以外の解析方法として以下の方法等を挙げることができる。

a) サブトラクショナルクロニング法：

目的の細胞で特異的に発現する遺伝子のcDNAを取得する方法である。目的の細胞からmRNAを精製し、対照の細胞からもRNAを抽出する。目的の細胞より精製したmRNAを鋳型とし、逆転写酵素でcDNAを合成する。合成時に $[\alpha - ^{32}P] dNTP$ を加えることでcDNAを標識することができる。標識されたcDNAと鋳型となったmRNAのハイブリッドをアルカリ処理し、mRNAのみを分解し、一本鎖cDNAを精製する。この一本鎖cDNAと対照細胞から抽出したRNAを混合し、DNA-RNAハイブリッドを形成させる。目的とした細胞にのみ発現しているmRNAを鋳型としたcDNAは一本鎖のままである。ハイドロキシアパタイトカラムで二本鎖DNA-RNAハイブリッドと一本鎖cDNAのみを精製する。精製された一本鎖cDNAをプローブとしてライブラリーをスクリーニングし、目的とする細胞で特異的に発現している遺伝子のクローンを取得することができる (実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック、羊土社 (1996) P32-35 参照)。

20

【0044】

具体的にはインスリン抵抗性改善剤を投与したマウスまたはヒト白色脂肪細胞とインスリン抵抗性改善剤を投与しないマウスまたはヒト白色脂肪細胞のそれぞれからmRNA (または全RNA) を精製し、インスリン抵抗性改善剤を添加した培地で培養した細胞から精製したmRNAを鋳型とし、逆転写酵素でcDNAを合成する。合成時に $[\alpha - ^{32}P] dNTP$ を加えることでcDNAを標識する。標識したcDNAと鋳型となったmRNAのDNA-RNAハイブリッドをアルカリ高温処理しmRNAのみを分解し、一本鎖cDNAを精製する。この一本鎖cDNAとインスリン抵抗性改善剤を添加しないで培養した細胞から抽出したRNAを混合し、二本鎖DNA-RNAハイブリッドを形成させる。このときインスリン抵抗性改善剤を投与したマウスまたはヒト由来の細胞で特異的に発現するmRNAを鋳型としたcDNAは一本鎖のままである。ハイドロキシアパタイトカラムで二本鎖DNA-RNAハイブリッドと一本鎖cDNAとを分離し、一本鎖cDNAのみを精製する。このステップを繰り返すことでインスリン抵抗性改善剤を投与したマウスまたはヒト由来の細胞で特異的なcDNAを濃縮することができる。濃縮された特異的cDNAは放射性同位元素で標識されているので、ライブラリーをスクリーニングするプローブとして使用できる。

30

40

【0045】

b) ディファレンシャルディスプレイ法：

複数の細胞間あるいは同一細胞でも特定の誘導処理をしたものとししないものとの間で、特異的に発現している遺伝子を比較して同定する実験法である。例えば、以下のように実施できる。インスリン抵抗性改善剤を投与したK Kマウスと投与しなかったK Kマウスのそれぞれの白色脂肪細胞から全RNAを精製する。オリゴ (dT₁₂) の3'末端に更に2ヌクレオチド付加したプライマー (dT12MN：M=A、GあるいはC、N=A、G、CあるいはT) で逆転写し、新たに合成されたcDNAを基に、任意の配列を持ったプライマー (10量体程度) を使用してPCRを行なう。得られたPCR産物をゲル電気泳動し、ゲル上に展開 (ディスプレイ) される全RNAの発現パターン (フィンガープリント

50

）を比較解析し、インスリン抵抗性改善剤添加細胞で特異的に発現している遺伝子を選択し、そのcDNA断片を単離することができる（基礎生化学実験法4 核酸・遺伝子実験II．応用編、東京化学同人（2001）、p125 - 128）。

c) レポーター遺伝子を使用した方法

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのプロモーター支配下に、該プロモーター活性の検出を可能にする遺伝子（以下「レポーター遺伝子」という。）を利用して、間接的にインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドやインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現を検出することもできる。以下、レポーター遺伝子を利用した検出方法について説明する。

【0046】

c - 1) レポーター遺伝子

レポーター遺伝子は、宿主細胞が本試験方法の一連の過程において産生し得る他のいかなる蛋白質とも特異的に区別可能な、レポーター蛋白質をコードするものであればよい。好ましくは、形質転換前の細胞が該レポーター蛋白質と同一または類似の蛋白質をコードする遺伝子を持たないようなものがよい。例えば、レポーター蛋白質が該細胞に対して毒性を有するようなものや、該細胞が感受性を有する抗生物質の耐性を付与するものであるような場合でも、レポーター遺伝子の発現の有無は細胞の生存率で判定することが可能である。しかしながら、本発明で用いられるレポーター遺伝子としてより好ましいものは、発現量を特異的かつ定量的に検出することができる（例えば、該レポーター遺伝子にコードされる蛋白質に対する特異的抗体が取得されているような）構造遺伝子である。より好ましくは、外来の基質と特異的に反応することにより定量的測定が容易な代謝産物を生じるような酵素等をコードする遺伝子である。そのようなレポーター遺伝子としては、例えば、以下の蛋白質をコードする遺伝子を例示することができるが、本発明はそれらに限定されない。

【0047】

c - 1 - 1) クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ：

クロラムフェニコールにアセチル基を付加する酵素で、いわゆるCATアッセイ等で検出することができる。プロモーターを組み込むだけでレポーターアッセイ用のベクターを調製できるベクターとして、pCAT3 - Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている。

【0048】

c - 1 - 2) ホタルルシフェラーゼ：

ルシフェリンを代謝した際に生じる生物発光を測定することにより定量できる。レポーターアッセイ用のベクターとしては、pGL3 - Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている。

【0049】

c - 1 - 3) β - ガラクトシダーゼ：

呈色反応、蛍光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしては、p β gal - Basic（プロメガ社製）が市販されている。

【0050】

c - 1 - 4) 分泌型アルカリホスファターゼ：

呈色反応、生物発光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしては、pSEAP2 - Basic（クロンテック社製）が市販されている。

c - 1 - 5) 緑色蛍光蛋白質 (green - fluorescent protein)：

酵素ではないが、自らが蛍光を発するので直接定量できる。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpEGFP - 1（クロンテック社製）が市販されている。

【0051】

c - 2) レポーター遺伝子の導入

公知の方法に従い、レポーター遺伝子発現プラスミドと、本発明のTMEFF2遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にした組換えベクターを作製し、これらを細胞に同時トランスフェクションする。ベクターとしては、pCR3.1(インビトロジェン(Invitrogen)社製)、pCMV-Script(ストラタジーン(Stratagene)社製)等を好適に用いることができるが、これらに限定されない。

【0052】

細胞に発現プラスミドを導入する方法としては、DEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acid Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)、電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845)、リポフェクション法(Lopatka et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 5707-5717、Sussman and Milman (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643)等を挙げることができるが、これらに限定されず、本発明の属する技術分野において汎用される任意の方法を採用することができる。ただし、細胞がいわゆる浮遊細胞である場合は、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法以外の方法を用いることが好ましい。いずれの方法においても、用いる細胞に応じて、至適化されたトランスフェクション条件を用いることが必要である。

10

【0053】

20

c-3) 評価

かくして、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現ベクターと、レポーター発現ベクターを同時トランスフェクションした細胞を培養すると、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現依存的にレポーター遺伝子の転写が促進される。したがって、レポーター遺伝子の発現が可能な条件下において、培地中に任意の被検物質を添加した場合と添加しない場合でのレポーター遺伝子の発現量変化をみれば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量が評価できる。ここで、「レポーター遺伝子の発現が可能な条件」とは、レポーター発現ベクターによってトランスフェクトされた細胞が生存して、レポーター遺伝子の転写産物(レポーター蛋白質)の生産が可能な条件であればよい。好ましくは、使用される細胞株に適合した培地(ウシ胎児血清等の血清成分を添加してもよい)で、4から6%(最も好適には5%)の炭酸ガスを含む空気存在下、36から38(最も好適には37)で2から3日間(最も好適には2日間)培養する。

30

【0054】

(3) 評価・判定

上記解析の結果、インスリン抵抗性改善剤を投与したKKマウス由来白色脂肪細胞とインスリン抵抗性改善剤を投与しないKKマウス由来白色脂肪細胞または、インスリン抵抗性改善剤を投与したヒト白色脂肪細胞とインスリン抵抗性改善剤を投与しなかったヒト白色脂肪細胞で、発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドとして特定することができる。そしてこの特定されたポリヌクレオチドを以下、「インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチド」とする。ここで、「著しく異なる」とは、例えば、アフィメトリックス社の遺伝子チップを用いて、アフィメトリックス社のmicroarray Suite Ver. 3.0を用いて解析した場合、インスリン抵抗性改善剤を添加して培養した細胞由来のポリヌクレオチドのAverage difference値がインスリン抵抗性改善剤無添加の場合に比べて2倍以上増加している場合をいう。

40

【0055】

こうして特定されたインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドとしては具体的には配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチドおよび配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から

50

2950からなるポリヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950からなるポリヌクレオチドを含む組換えプラスミドpTARGET-R10は独立行政法人産業技術総合研究所・特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-1）に平成14年（2002年）4月5日付で受託番号FERM BP-8005で国際寄託されており、またGenBankにMus musculus chromosome 11 clone RP23-179C3 map 11（アクセッション番号：AC022780、バージョン：AC022780.17）内の2箇所（13866-13009, 10749-10224）に分かれて、ORFに相当するヌクレオチド配列の全長と一致する配列が存在する。また、2002年11月14日付で、GenBankにMus Musculus RIKEN cDNA 1300007F04 gene（1300007F04 Rik）, mRNA（アクセッション番号：XM_181294、バージョン：XM_181294.1）として、登録されている。

10

【0056】

1.2 相同性ポリヌクレオチドの検索

1.1の方法によって見出されたポリヌクレオチドについては、公知のデータベースとの間で相同性検索を行うことにより、同様の機能を有すると推定できるポリヌクレオチドを同定することができる。相同性検索によって同定されたポリヌクレオチドについても上記方法により、インスリン抵抗性改善剤投与による特異的発現を調べることでポリヌクレオチドの機能を解明することができる。相同性ポリヌクレオチドは同種生物間に限らず、他種生物間でも検索することができる。相同性ポリヌクレオチドの検索はGenBank等のデータベースに登録されているデータに対してBLAST等の検索プログラムを用いて行なうことができるが、その他、市販の検索ソフトを用いても検索することができる。このようなポリヌクレオチドとして、例えば、配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチドまたは配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354からなるヌクレオチド配列はcDNAの配列を示し、このうち、配列番号59から1462からなるヌクレオチド配列はアミノ酸配列をコードしている領域を示す。この配列を有するポリヌクレオチドはヒト全長cDNAライブラリーを用いて適

20

30

【0057】

1.3 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチド

上記1.1および上記1.2において特定されたポリヌクレオチドの他に、それぞれのポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、インスリン抵抗性改善剤によって発現が上昇するポリヌクレオチドも本発明のポリヌクレオチドに含めることができる。このようにして特定されたポリヌクレオチドを「インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチド」という。すなわち、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドは、以下の1)乃至5)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドである。

- 1) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 2) 配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 3) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 4) 配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド；
- 5) 上記1)乃至4)に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中の

40

50

グルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0058】

なお、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドについてシグナルペプチド切断部位予測プログラム *SPScan* を用いて解析すると、配列表の配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドについてはアミノ酸番号1から20までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号20と21のアミノ酸の間でシグナルペプチドが切断されと推定され、配列番号9に示されるアミノ酸配列についてはアミノ酸番号1から26までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号26番目と27番目のアミノ酸の間でシグナルペプチドが切断されると推定される。また、シグナル配列予測プログラム *SignalIP* (ver. 2) を用いて *neural network* (NN) および *hidden Markov models* (HMM) の2種類のアルゴリズムを用いて解析すると、配列表の配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドについてはアミノ酸番号1から28までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号28と29のアミノ酸の間でシグナルペプチドが切断されと推定され、配列番号9に示されるアミノ酸配列についてはアミノ酸番号1から26までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号26番目と27番目のアミノ酸配列の間でシグナルペプチドが切断されると推定される。すなわち、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列および、配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるヌクレオチド配列が成熟体タンパク質をコードするヌクレオチド配列と推定される。

10

20

【0059】

なお、本明細書中においてはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドによってコードされているポリペプチドのことを *R10* と呼ぶこともあり、ヒト由来のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドにコードされているポリペプチドのことを *HuR10* と呼ぶこともある。

【0060】

1. 4 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの検定

上記のようにして特定されたインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドは、*KK* マウス由来白色脂肪細胞においてインスリン抵抗性改善剤投与によって、投与しない場合に比べ発現量が著しく増加しており、インスリン抵抗性改善剤によって引き起こされる糖代謝および/または脂質代謝の変化に影響を与えるポリヌクレオチドであり、インスリン抵抗性改善剤を始めとした糖代謝および/または脂質代謝に影響を及ぼす物質のスクリーニングに有効である。

30

【0061】

まず、特定されたポリヌクレオチド断片をプローブとして、*KK* マウスまたはヒト *cDNA* ライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法等、公知の方法に従い、完全長 *cDNA* を取得する。この完全長 *cDNA* をマウスまたはヒト細胞に導入して高発現させ、糖代謝および/または脂質代謝に影響が生じるか否かを検討する。

40

【0062】

cDNA を動物個体内で発現させるためには、得られた完全長 *cDNA* をウイルスベクターに組み込み、動物に投与する方法が挙げられる。ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス等の *DNA* ウイルス、または *RNA* ウイルスに *cDNA* を組み込んで導入する方法が挙げられる。なかでも、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が好ましい。

【0063】

50

非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、なかでも、DNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0064】

また、培養細胞に対して、完全長cDNAをヒト、マウス、ラット等由来の筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、あるいは筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞に分化する細胞等のインスリン感受性を有する細胞へ導入し、高発現させ、各標的細胞の有する機能、具体的には、糖や脂質の産生や取り込み、あるいはグリコーゲンの蓄積等の糖脂質代謝を調節する機能にどのような影響が現れるかを検討することができる。逆に、試験する遺伝子の全RNAに対するアンチセンス核酸を、細胞に導入し、各標的細胞の機能にどのような影響が出るかを調べることもできる。また、遺伝子の発現を抑制する他の方法としては二本鎖の単鎖RNA（siRNA）を用いる方法を挙げることもできる（「*Genes and Developments*」）、2001年1月15日、第15巻、第2号、p. 188 - 200）。例えば、siRNAを文献記載の方法に従って導入し、siRNAの対象となる遺伝子の発現量及びグルコース濃度を調べることができる。

10

【0065】

完全長cDNAを動物または細胞に導入するにあたっては、適当なプロモーターおよび形質発現に関わる配列を含むベクターに該cDNAを組み込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換させる。脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の upstream に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr（Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854 - 864）、レトロウイルスベクターpLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR（クロンテック（Clontech）社製）、コスミドベクターpAxCw（タカラバイオ社製）等が挙げられるが、これに限定されない。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン法（Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295 - 1308）、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法（Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456 - 457）、および電気パルス穿孔法（Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841 - 845）などによりサルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175 - 182, ATCC: CRL - 1650）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC: CCL - 61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126 - 4220）、ヒト胎児腎臓由来293細胞（ATCC: CRL 1573）等に取り込ませることができるが、これらに限定されない。かくして所望の形質転換体を得ることができる。

20

30

40

また、遺伝子操作により、正常動物において対象とする遺伝子を破壊したノックアウト動物を作製し、糖脂質代謝を調節する機能にどのような影響が現れるかを検討することも可能である。逆に、肥満や糖尿病といった症状を呈する動物において、目的とする遺伝子が高発現するようにトランスジェニック動物を作製し、その病態が改善・治療されるか否かを検討することも可能である。前記トランスジェニック動物は、動物から受精卵を取得し、遺伝子導入の後、偽妊娠動物に移植し、発生させることにより得ることができ、その手順は公知の方法（発生工学実験マニュアル（野村達次 監修、勝木元也 編、1987年刊）、特開平5 - 48093号等参照）に従えばよい。具体的には、例えば、マウスの場合にはまずメスマウスに排卵誘起剤を投与後、同系統のオスと交配し、翌日メスマウスの卵管より前核受精卵を採取する。次いで、導入するDNA断片溶液を微小ガラス管を用いて

50

受精卵の前核に注入する。なお、導入する遺伝子を動物細胞内で発現させるためのプロモーターやエンハンサー等の調節遺伝子は、導入された動物の細胞内で機能するものであれば特に限定されない。DNAを注入した受精卵は、偽妊娠仮親メスマウス（S1c：ICR等）の卵管に移植し、約20日後に自然分娩または帝王切開により出生させる。

【0066】

こうして得られた動物が、導入遺伝子を保持していることを確認する方法としては、例えば、前記動物の尾等からDNAを抽出し、該DNAをこれに特異的なセンスおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅する方法、該DNAを制限酵素で消化後、ゲル電気泳動し、ゲル中のDNAをナイロン膜等にブロッティングした後、標識した導入遺伝子の全部または一部をプローブとしてサザンブロット解析を行なう方法等を挙げることができる。

10

【0067】

1.5 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドによる血中グルコース濃度及び/または血中インスリン濃度低下作用

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現させた動物では血中の、グルコース濃度及び/またはインスリン濃度の低下が観察される。例えば、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるDNA、配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるDNA、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするDNA又は配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードするDNAをアデノウイルスベクターpAxCw（タカラバイオ社製のアデノウイルス・エキスプレッション・ベクター・キットに付属。）に組み込んで、アデノウイルスを作製し、糖尿病モデルマウス（例えば、KK/Taマウス（日本クレア社より購入））に接種し、該DNAをマウスで発現させると該DNAを発現させなかったマウスに比べて、血中のグルコース濃度及びインスリン濃度が、有意に低下する。すなわち、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現産物である、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは血中のグルコース濃度及び/またはインスリン濃度を低下させる機能を有し、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは糖代謝異常及び/または脂質代謝異常の治療剤となり得る。

20

30

40

【0068】

1.6 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドによる脂肪分解抑制作用本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現させた細胞では腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor α ：TNF- α ）が有する脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能を有する。本明細書中において脂肪細胞において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能とは、脂肪細胞において遊離脂肪酸の放出量を減少させる機能をいう。

【0069】

例えば、マウス繊維芽細胞由来細胞株3T3-L1細胞に、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるDNA、配

50

列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなる DNA、配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 79 から 1455 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードする DNA 又は配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードする DNA をアデノウイルスベクター pAxCw (タカラバイオ社製のアデノウイルス・エキスプレッション・ベクター・キットに付属。) に組み込んだアデノウイルスを作製し、このアデノウイルスを 3T3-L1 細胞に感染させる。インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現する細胞を TNF- α 存在下で培養すると、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現しない細胞に比べて、培養上清中の遊離脂肪酸濃度が有意に低下していることが確認される。このことから、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現産物であるポリペプチドは脂肪組織において、インスリン抵抗性および糖尿病発症原因の一つとして報告されている TNF- α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を減弱させることにより、糖代謝改善に寄与する。

10

20

【0070】

1.7 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドによる糖産生量調節

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現させた細胞では糖産生量が減少することが確認される。

【0071】

本明細書中において、肝臓において糖産生を抑制する機能とは、肝臓や肝臓由来の培養細胞において糖新生等によって産生される糖の量を減少させる機能をいう。例えば、ラット肝癌細胞 H4-II-E-C3 に、配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 79 から 1455 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなる DNA、配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなる DNA、配列表の配列番号 4 のヌクレオチド番号 79 から 1455 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードする DNA 又は配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 8 のヌクレオチド番号 59 から 1462 に示されるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチドをコードする DNA をアデノウイルスベクター pAxCw (タカラバイオ社製のアデノウイルス・エキスプレッション・ベクター・キットに付属。) に組み込んだ、アデノウイルスを作製し、このアデノウイルスを H4-II-E-C3 細胞に感染させる。このインスリン

30

40

50

抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現する細胞を培養し、培地中のグルコース濃度を測定すると、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現しない細胞に比べて、インスリンの添加、無添加に関わらず、糖産生量が減少していることが確認できる。このことから、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現産物であるポリペプチドは肝臓において糖産生量を負に調節をする機能、すなわち、糖産生を抑制する機能を有する。

【0072】

2. インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド

本発明における「インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド」は、糖代謝および/または脂質代謝に影響する、本発明によって得られたポリペプチドを意味する。「インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを含有する組成物」とは上記ポリペプチドを含んでいる物質を意味する。本発明におけるインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドはKKマウス由来白色脂肪細胞において、インスリン抵抗性改善剤を投与すると投与しない場合に比べ発現量が著しく増加しており、糖代謝および/または脂質代謝に影響を与える遺伝子を検出するために有効であり、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである。

10

【0073】

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは、上記1.5から1.7に示したような、血中のグルコース濃度及び/またはインスリン濃度を低下させる機能、脂肪組織において、インスリン抵抗性および糖尿病発症原因の一つとして報告されているTNF- α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能を有する。

20

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは具体的には、以下の1)乃至5)のいずれか一つに記載のポリペプチドである。

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

3) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

30

4) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

40

5) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

6) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

7) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

50

8) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド。

【0074】

なお、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドについてシグナルペプチド切断部位予測プログラムSPScanを用いて解析すると、配列表の配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドについてはアミノ酸番号1から20までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号20と21のアミノ酸の間でシグナルペプチドが切断されと推定され、配列番号9に示されるアミノ酸配列についてはアミノ酸番号1から26までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号26番目と27番目のアミノ酸配列の間でシグナルペプチドが切断されと推定される。また、シグナル配列予測プログラムSignalIP(ver.2)を用いてneural network(NN)およびhidden Markov models(HMM)の2種類のアルゴリズムを用いて解析すると、配列表の配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドについてはアミノ酸番号1から28までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号28と29のアミノ酸の間でシグナルペプチドが切断されと推定され、配列番号9に示されるアミノ酸配列についてはアミノ酸番号1から26までのアミノ酸配列からなるペプチドがシグナル配列であり、アミノ酸番号26番目と27番目のアミノ酸配列の間でシグナルペプチドが切断されと推定される。すなわち、SignalIPの解析結果に従えば、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号163から1455に示されるヌクレオチド配列および、配列表の配列番号8のヌクレオチド番号137から1462に示されるヌクレオチド配列が成熟体タンパク質をコードするヌクレオチド配列と推定される。

【0075】

なお、本明細書中において「ポリペプチド」という言葉には、タンパク質、これに糖鎖が付加されたもの、塩も含むものとする。

【0076】

3. インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生産

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドはin vitroにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって生産することができる。具体的には、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることによって該ポリヌクレオチドを発現させることにより、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを得ることが出来る。

【0077】

ポリペプチドのin vitro合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス(Roche diagnostics)社製のラピッドトランスレーションシステム(RTS)が挙げられるが、これに限定されない。RTSを用いる場合を例に挙げると、目的の遺伝子をT7プロモーターにより制御される発現ベクターにクローニングし、これをin vitroの反応系に添加すると、最初に鋳型DNAよりT7RNAポリメラーゼによりmRNAが転写され、その後大腸菌溶解液中のリボソーム等により翻訳が行われ、目的のポリペプチドが反応液中に合成される(Biochemica、1、20-23(2001)、Biochemica、2、28-29(2001))。

【0078】

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌(Escherichia coli)や枯草菌(Bacillus subtilis)などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの

宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

【0079】

例えば、大腸菌としてはK12株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般にpBR322やpUC系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、およびベクターがいずれも使用できる。

【0080】

プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン（trp）プロモーター、ラクトース（lac）プロモーター、トリプトファン・ラクトース（tac）プロモーター、リボプロテイン（lpp）プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子Tu（tufB）プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

【0081】

枯草菌としては、例えば207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB228（Ohmura、K. et al. (1984) J. Biochem. 95、87-93）などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0082】

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman、Y. (1981) Cell 23、175-182、ATCC：CRL-1650）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC：CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub、G. and Chasin、L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77、4126-4220）等がよく用いられているが、これらに限定されない。

【0083】

脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、サイトメガロウイルス初期プロモーターを有するpCR3.1（インビトロジェン社製）、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr（Subramani、S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1、854-864）等が挙げられるが、これに限定されない。

【0084】

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、およびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン法（Luthman、H. and Magnusson、G. (1983) Nucleic Acids Res.、11、1295-1308）、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法（Graham、F. L. and van der Eb、A. J. (1973) Virology 52、456-457）、および電気パルス穿孔法（Neumann、E. et al. (1982) EMBO J. 1、841-845）などによりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo（Sambrook、J. et al. (1989) : "Molecular Cloning 30 40 50

A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) や pSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341) などをコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより、目的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0085】

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、鱗翅類やガ科の *Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞由来株化細胞 (Sf-9 または Sf-21) や *Trichoplusia ni* の卵細胞由来 High Five 細胞 (Wickham, T. J. et al, (1992) Biotechnol. Prog. 1: 391-396) などが宿主細胞としてよく用いられ、バキュロウイルスストランスファクターとしてはオートグラファ核多角体ウイルス (AcNPV) のポリヘドリンタンパク質のプロモーターを利用した pVL1392/1393 がよく用いられる (Kidd, I. M. and V. C. Emery (1993) The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology 42, 137-159)。この他にも、バキュロウイルスの P10 や同塩基性タンパク質のプロモーターを利用したベクターも使用できる。さらに、AcNPV のエンベロープ表面タンパク質 GP67 の分泌シグナル配列を目的タンパク質の N 末端側に繋げることにより、組換えタンパク質を分泌タンパク質として発現させることも可能である (Zhe-mei Wang, et al. (1998) Biol. Chem., 379, 167-174)。

【0086】

真核微生物を宿主細胞とした発現系としては、酵母が一般によく知られており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や石油酵母 *Pichia pastoris* が好ましい。該酵母などの真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター (Benetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025) や酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター (Miyano-hara, A. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5) などを好ましく利用できる。また、分泌型タンパク質として発現させる場合には、分泌シグナル配列と宿主細胞の持つ内在性プロテアーゼあるいは既知のプロテアーゼの切断部位を N 末端側に持つ組換え体として発現することも可能である。例えば、トリプシン型セリンプロテアーゼのヒトマスト細胞トリプターゼを石油酵母で発現させた系では、N 末端側に酵母の α ファクターの分泌シグナル配列と石油酵母の持つ KEX2 プロテアーゼの切断部位をつなぎ発現させることにより、活性型トリプターゼが培地中に分泌されることが知られている (Andrew, L. Niles, et al. (1998) Biotechnol. Appl. Biochem. 28, 125-131)。

【0087】

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、または細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記 COS 細胞であれば、RPMI 1640 培地やダルベッコ変法イーグル培地 (以下「DMEM」という) などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

【0088】

上記培養により、形質転換体の細胞内または細胞外に産生される組換えタンパク質は、該タンパク質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常のタンパク沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフ

イー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換えタンパク質に6残基からなるヒスチジンを繋げることにより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で本発明のポリペプチドを大量に製造できる。また、精製したポリペプチドの分子量は質量分析器、SDS-PAGE等通常の方法で決定することができる。なお、配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459からならポリペプチドはシグナル配列予測プログラムSignalIPを用いて検索すると、アミノ酸番号1から28がシグナル配列と推定されるので、成熟体ポリペプチドとしてはアミノ酸番号29から459からなるポリペプチドとして発現している可能性がある。また配列番号9に示されるアミノ酸配列についてはアミノ酸番号1から26番目がシグナル配列と推定されるので、成熟体ポリペプチドとしてはアミノ酸番号27から468からなるポリペプチドとして発現している可能性がある。そのほか、スプライシングバリエーションが存在する可能性もあるが、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと同一の機能（生物活性）（血中グルコース濃度の低下作用）を有する限りにおいてこれらのポリペプチドも本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに含まれる。

10

【0089】

このようにして得られた本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは血中のグルコース濃度及びインスリン濃度を低下させる機能を有するので、糖代謝異常及び/または脂質代謝異常の治療剤となり得る。

20

4. 糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドおよびインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは、血中グルコース濃度が正常動物に比べて高くなる糖代謝異常および/または脂質代謝異常を有する動物では、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を有さない動物に比較して発現量が有意に低下している。また、糖尿病モデル動物にインスリン抵抗性改善剤を投与すると血中グルコース濃度とともに血中中性脂質濃度も低下し、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドおよびインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量はインスリン抵抗性改善剤を投与しない場合に比べ有意に上昇している。したがって、検体中の該インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドまたはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量を定量することにより、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を判定し、インスリン抵抗性異常で引き起こされる2型糖尿病等の疾患の診断に利用することが可能である。

30

【0090】

また、糖尿病モデル動物にインスリン抵抗性改善剤を投与すると、血中の中性脂質濃度も低下するので、脂質代謝異常の診断にも利用することができる。

なお、「検体」とは、被験者や臨床検体、被験動物等から得られた、血液、体液、肝臓、筋肉、脂肪組織等の組織または排泄物等の試料を意味するが、本発明においては血液、肝臓または脂肪組織が好ましい。

【0091】

例えば、被験者から採取した検体中でのインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドまたはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量が正常人から採取した検体に比べ低い場合、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態を有するか、糖代謝異常および/または脂質代謝異常になる可能性が高いと判定される。また、個々の患者について、該インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドやインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現変動を経時的に観察すれば、該患者の予後を予測することもできる。

40

【0092】

本発明において、正常人および正常動物とは、糖代謝異常および脂質代謝異常を有さない人および動物を意味する。正常人あるいは正常動物であるか否かは、血糖値および血中中性脂質（トリグリセライド）濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かで判定することができる。血糖値および血中中性脂質濃度は通常の

50

方法によって測定できるが、例えば、血糖値はグルコローダー G X T (A & T 社製)、トリグリセライド濃度はトリグリセライド E - テストワコー (和光純薬社製) を用いて測定することができる。本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドまたはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量と、正常人または正常動物の血糖値および血中中性脂質濃度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者または被験動物から採取した検体における本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドまたはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量を測定することによって被験者または被験動物が、正常人または正常動物であるか否かを判定することができる。

【 0 0 9 3 】

4 . 1 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを利用した糖代謝異常および / または脂質代謝異常の検出方法 10

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを利用した糖代謝異常および / または脂質代謝異常の検出方法は、具体的には、4 . 1 . 1 または 4 . 1 . 2 に記載したとおりである。

【 0 0 9 4 】

4 . 1 . 1 以下の工程 1) 乃至 3) を含む :

- 1) 被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より、全 R N A を抽出する工程 ;
- 2) 上記 1) に記載の検体由来の全 R N A と正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より抽出した全 R N A の間における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現量の差を検出する工程 ; 20
- 3) 上記 2) に記載のポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記 1) に記載の被験者または被験動物の糖代謝異常および / または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

【 0 0 9 5 】

4 . 1 . 2 以下の工程 1) 乃至 4) を含む :

- 1) 被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より、全 R N A を抽出する工程 ;
- 2) 正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より、全 R N A を抽出する工程 ;
- 3) 上記 1) に記載の全 R N A と上記 2) に記載の全 R N A の間における本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現量の差を検出する工程 ; 30
- 4) 上記 3) に記載のポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記 1) に記載の被験者または被験動物の糖代謝異常および / または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

【 0 0 9 6 】

4 . 1 . 3 ここで、4 . 1 . 1 の工程 1) および 4 . 1 . 2 の工程 1) および工程 2) における全 R N A の抽出は上記、「1 . 1 インスリン抵抗性改善剤投与によって変動するポリヌクレオチドの特定方法」の項中「工程 1 全 R N A を調製する工程」の項に示した方法にしたがって実施することができ、抽出された全 R N A はさらに精製して m R N A として使用することが望ましい。また、4 . 1 . 1 の工程 2) および 4 . 1 . 2 の工程 3) におけるインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量の測定も上記、「1 . 1 インスリン抵抗性改善剤投与によって変動するポリヌクレオチドの特定方法」の項中「工程 2 インスリン抵抗性改善剤投与と非投与で発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを特定する工程」の項に記載の方法や、下記の 4 . 1 . 4 に示す R T - P C R 法、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、ランオン・アッセイに従って実施することができるが、特に遺伝子チップ、c D N A アレイ等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーションや R T - P C R を用いて実施することが望ましい。 40

【 0 0 9 7 】

4 . 1 . 4 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量を測定するためのその他の方法

4 . 1 . 4 . 1 R T - P C R

まず本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのmRNAを鋳型とする逆転写酵素反応を行ってから、PCRを実施して特異的にDNA断片を増幅する。この方法において、目的のヌクレオチド配列を特異的に増幅するためには、目的のmRNAの特定の部分配列に相補的なアンチセンスプライマーと、該アンチセンスプライマーから逆転写酵素により生成されるcDNAの配列中の特定の部分配列に相補的なセンスプライマーが用いられる。RT-PCRは市販のキット（例えば、RNA PCRキット AMV ver 2.1：タカラバイオ社製等）を用いて、キットに添付のマニュアルに従って行なうことができるが、以下の方法でもできる。

【0098】

逆転写酵素反応およびPCRの両方に用いられるアンチセンスプライマーは、実質的に本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の、連続した15ヌクレオチドから40ヌクレオチド、好ましくは少なくとも18ヌクレオチドから30ヌクレオチド、更に好ましくは23ヌクレオチドから30ヌクレオチドのヌクレオチド配列からなる。

10

【0099】

一方、PCRにおいて用いられるセンスプライマーの配列は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列において、上記アンチセンスプライマーの相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する配列中の連続した15から40ヌクレオチド、好ましくは18から35ヌクレオチド、更に好ましくは21から30ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、センスプライマーとアンチセンスプライマーに互いに相補的な配列が存在すると、プライマー同士がアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的なポリヌクレオチド検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたプライマーの設計を行うことが好ましい。

20

【0100】

これらアンチセンスプライマーおよびセンスプライマーには、いずれも上記で規定したそれらヌクレオチド配列の5'末端に、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列とは無関係のヌクレオチド配列がリンカーとして付加されていてもよい。ただし、特異的なポリヌクレオチド検出の妨げとならないよう、該リンカーは反応中に反応液内の核酸と非特異的なアニーリングを起こさないようなものであることが好ましい。

30

RT-PCRの反応は常法により行なうことができる。なお、RT-PCRによる検出のための試料は、通常ポリ(A)⁺RNAにまで精製されている必要はない。

【0101】

PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。定量的検出を行うためには、予め段階希釈したcDNAクローンを標準の鋳型DNAとして同条件でPCRを実施し、定量的検出が可能な温度サイクル数を定めておくか、または、例えば5サイクル毎に一部反応液をサンプリングしてそれぞれ電気泳動を行う。また例えばPCR反応時に放射標識dCTPを用いることにより、バンド中に取り込まれた放射能の量を指標に定量を行うこともできる。ポリヌクレオチド定量の信頼性を高めた方法として、上記RT-PCR法を改良した競合RT-PCR法(Souaze et al. (1996) BioTechniques 21, 280-285)や、TaqMan PCR法(Heid et al. (1996) Genom. Res. 6, 986-994)なども利用可能である。

40

【0102】

4.1.4.2 リボヌクレアーゼ保護アッセイ(RNase protection assay): RNA試料中の、上記1)乃至5)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するmRNA(ただし配列中のtはuに読み替える)のみに標識プローブをハイブリダイズさせ、二本鎖ポリヌクレオチドを形成させておいてから、試料にリボヌクレアーゼを添加してインキュベーションすると、プローブがハイブリダイズしたmRNAは

50

二本鎖を形成していることによってリボヌクレアーゼによる消化を免れ、それ以外のRNAは消化されるので、該二本鎖ポリヌクレオチドのみが残る（検出されるmRNAよりプローブが短ければ、プローブの鎖長に相当する二本鎖ポリヌクレオチドが残る）。この二本鎖ポリヌクレオチドを定量することにより、目的のポリヌクレオチドの発現量を測定する。具体的には、例えば以下に記載する方法に従う。

【0103】

二本鎖を形成せずに余った標識プローブを二本鎖ポリヌクレオチドと確実に分離して定量を容易にするために、余った標識プローブはリボヌクレアーゼに消化されることが好ましいが、リボヌクレアーゼとして一本鎖DNAも消化できるようなものを使用すれば、標識プローブはDNAでもRNAでもよい。標識プローブの調製方法は上記常法に従って行なうことができるが、リボヌクレアーゼアッセイにおいて用いられるプローブの長さは50から500ヌクレオチド程度が好ましい。また、二本鎖DNAを直接標識して熱変性したのみのプローブ等、相補鎖が混在するようなプローブは本法には好適ではない。

10

【0104】

RNAプローブは、例えば下記の方法に従って調製される。まず鋳型DNAをバクテリオファージのプロモーター（T7、SP6、T3プロモーター等）を有するプラスミドベクター（例えばpGEM-T（プロメガ社製）など）に挿入する。次にこの組換えプラスミドベクターを、制限酵素で、挿入断片のすぐ下流で一ヶ所だけ切断されるように消化する。得られた直鎖DNAを鋳型として、放射能標識されたリボヌクレオチド存在下で、インピトロ転写反応を行う。この反応には、ベクター中のプロモーターに合わせてT7、SP6またはT3ポリメラーゼ等の酵素を用いる。以上の操作は例えばリボプローブシステム-T7、同-SP6または同-T3（いずれもプロメガ社製）を用いて行うことができる。

20

【0105】

RNA試料を調製するまでの工程は「1.1 インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が変動するポリヌクレオチドの特定方法」の項中「工程1）全RNAを調製する工程」の項に示した方法にしたがって実施することができ、抽出された全RNAはさらに精製してmRNAとして使用することが望ましい。調製された全RNA試料10から20μg相当分と、 5×10^5 cpm相当の過剰量の標識プローブとを用いてリボヌクレアーゼ保護アッセイを行う。この操作は市販のキット（HybSpeed RPA Kit、アンピオン社製）を用いて行うことができる。得られたリボヌクレアーゼ消化後の試料を、8M尿素を含む4から12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムでオートラジオグラフィを行う。以上の操作により、リボヌクレアーゼ消化を免れた二本鎖ポリヌクレオチドのバンドを検出することができ、またその定量は常法に従って実施することができる。さらに、各試料間のRNA量の差等に起因するばらつきを補正する目的で、β-アクチン遺伝子の発現量を同時に測定しておけば、より精密な評価を行うことができる。

30

【0106】

4.1.4.3 ランオン・アッセイ（Run-on assay、Greenberg、M. E. and Ziff、E. B. B. (1984) Nature 311、433-438、Groudine、M. et al. (1981) Mol. Cell Biol. 1、281-288参照）：本方法は、細胞から核を単離して目的の遺伝子の転写活性を測定する方法であり、細胞内のmRNAを検出する方法ではないが、本発明においては「ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法」に包含される。単離された細胞核を用いて、試験管内で転写反応を行わせると、核を単離する前に既に転写が開始されmRNA鎖が生成されている途中のものが伸長していく反応のみが進行する。この反応時に放射標識したリボヌクレオチドを添加して、伸長していくmRNAを標識しておき、その中に含まれる、非標識プローブにハイブリダイズするmRNAを検出することにより、核を単離した時点における目的のポリヌクレオチドの転写活性を測定することができる。なお具体的操作方法は、標識しないプローブを調製する他は、上記参考文献の記載に準

40

50

ずる。被験者または被験動物から採取した検体由来の試料と、正常人または正常動物由来の試料との間で測定結果を比較し、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの転写活性が正常人または正常動物より低い場合、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を有すると判断することができる。

【0107】

4.1.5 判定

4.1.1の工程3)および4.1.2の工程4)におけるインスリン感受性異常の病態の判定は、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドが複数ある場合は、その発現量の差を総合的に評価して行なうことが望ましい。なお、「発現量の差」は、被験者または被験動物由来の検体と、正常人または正常動物由来の検体におけるインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量を定量的に比較できる限り、発現量差であっても発現量比であってもよい。

10

【0108】

上記分析の結果、被験者または被験動物から採取した検体由来の試料と、正常人または正常動物由来の試料との間で測定結果を比較し、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量が正常人または正常動物より低い場合、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を有すると判断することができる。

【0109】

4.2 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを利用した糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法

20

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを利用した糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法は、具体的には以下の4.2.1、4.2.2、4.2.3または4.2.4からなる。

4.2.1 以下の工程1)乃至2)を含む：

1)被験者または被験動物から採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程：

2)上記1)で検出されたポリペプチドの発現量と正常人または正常動物から採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、上記1)における被験者または被験動物の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

30

【0110】

4.2.2 以下の工程1)乃至3)を含む：

1)被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程：

2)正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における、上記1)に記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程：

3)上記1)に記載のポリペプチドの発現量と上記2)に記載のポリペプチドの発現量の差を解析し、上記1)に記載の被験者または被験動物の糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

40

【0111】

4.2.3 以下の工程1)乃至3)を含む：

1)被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より得た全ポリペプチドを固相化する工程：

2)上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程：

3)上記2)で検出されたポリペプチドの発現量と正常人または正常動物より採取した血

50

液、肝臓または脂肪組織を含む検体より得た全ポリペプチドにおける該ポリペプチドの発現量の差を解析し、上記１）における被験者または被験動物の糖代謝異常および／または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

【０１１２】

４．２．４ 以下の工程１）乃至５）を含む、糖代謝異常および／または脂質代謝異常の検出方法：

１）被験者または被験動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より得た全ポリペプチドを固相化する工程；

２）正常人または正常動物より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体より得た全ポリペプチドを固相化する工程；

３）上記１）に記載の固相化ポリペプチドにおける、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのうちのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；

４）上記２）に記載の固相化ポリペプチドにおける、上記３）で発現量を測定したポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

５）上記３）で検出したポリペプチドの発現量と上記４）で検出したポリペプチドの発現量の差を解析し、上記１）に記載の被験者または被験動物の糖代謝異常および／または脂質代謝異常の病態を判定する工程。

【０１１３】

以下、上記４．２．１乃至４．２．４に記載の検出方法について説明する。

【０１１４】

糖代謝異常および／または脂質代謝異常の病態の検出方法の好適な態様として、抗体を利用した方法について説明する。まず、試料中のポリペプチドを９６穴プレートや３８４穴プレート等のマルチウエルプレートのウエル内底面やメンブレン等に固相化しておいてから、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いた検出が行われる。このうち、９６穴プレートや３８４穴プレート等のマルチウエルプレートを用いるのは一般に固相酵素免疫定量法（ＥＬＩＳＡ法）や放射性同位元素免疫定量法（ＲＩＡ法）と呼ばれる方法である。一方、メンブレンに固相化する方法としては、試料のポリアクリルアミド電気泳動を経てメンブレンにポリペプチドを転写する方法（ウエスタンブロット法）か、または直接メンブレンに試料またはその希釈液を染み込ませる、いわゆるドットブロット法やスロットブロット法が挙げられる。

【０１１５】

（１）試料の調製

試料としては、ヒト全血、血清、肝臓または脂肪組織抽出液が好ましい。該全血、肝臓または脂肪組織抽出液は、必要に応じて高速遠心を行うことにより、不溶性の物質を除去した後、以下のようにＥＬＩＳＡ／ＲＩＡ用試料やウエスタンブロット用試料として調製する。

【０１１６】

ＥＬＩＳＡ／ＲＩＡ用試料としては、例えば回収した血清、肝臓や脂肪組織抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものをを用いる。ウエスタンブロット用（電気泳動用）試料は、例えば血清、肝臓や脂肪組織抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動用の２－メルカトリエタノールを含むサンブル緩衝液（シグマ社製等）と混合する。ドット／スロットブロットの場合は、例えば回収した血清、肝臓や脂肪組織抽出液そのもの、または緩衝液で適宜希釈したものを、プロットング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

【０１１７】

（２）試料の固相化

上記のようにして得られた試料中のポリペプチドを特異的に検出するためには、試料を免疫沈降法、リガントの結合を利用した方法等によって、沈殿させ、固相化せずに検出する

10

20

30

40

50

こともできるし、そのまま検出する該試料を固相化することもできる。ポリペプチドを固相化する場合において、ウエスタンブロット法、ドットブロット法またはスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン（例えば、バイオラッド社製等）、ナイロンメンブレン（例えば、ハイボンド-ECL（アマシャム・ファルマシア社製）等）、コットンメンブレン（例えば、ブロットアブソーベントフィルター（バイオラッド社製）等）またはポリビニリデン・ジフルオリド（PVDF）メンブレン（例えば、バイオラッド社製等）等が挙げられる。

【0118】

電気泳動後のゲルからメンブレンにポリペプチドを移す、いわゆるブロッティング方法としては、ウエット式ブロッティング法（CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober）、セミドライ式ブロッティング法（上記CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 参照）等を挙げることができる。ドットブロット法やスロットブロット法のための器材も市販されている（例えば、バイオ・ドット（バイオラッド）等）。 10

【0119】

一方、ELISA法/RIA法で検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート（例えば、イムノプレート・マキシソープ（ヌンク社製）等）に試料またはその希釈液（例えば0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という）で希釈したもの）を入れて4 から室温で一晩、または37 で1から3時間静置することにより、ウエル内底面にポリペプチドを吸着させて固相化する。 20

【0120】

（3）抗体

用いられる抗体は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものである。このような抗体としては、例えば、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれにも結合するが、他のいかなるマウスまたはヒト由来のタンパク質とも結合しないような抗体を挙げることができる。

【0121】

前記抗体は、常法を用いて（例えば、新生化学実験講座1、タンパク質1、p. 389-397, 1992）、抗原となるタンパク質、あるいはそのアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p. 365-367, 1980, Prenum Press, N.Y.）に従って、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。 30

【0122】

抗体を作製するための抗原としては、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドまたはその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。 40

【0123】

前記抗原ポリペプチドは本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドをin vitroにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることによって該ポリヌクレオチドを発現させることにより、該ポリヌクレオチドを得ることが出来る。 50

【0124】

抗原となるポリペプチドは上記、「3. in vitro インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生産」の項に記載した方法によって製造することができる。

【0125】

上記のようにして得られる抗体は、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法などの各種免疫学的測定法や免疫組織染色などに用いることができる。

【0126】

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと特異的に結合する抗体の例として、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

10

【0127】

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- (a) 抗原として使用する生体高分子の精製、
- (b) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- (c) 骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- (d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- (e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- (g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、またはハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- (h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、およびその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

20

【0128】

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞およびミエローマを使用することもできる。

【0129】

(a) 抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製した本発明の蛋白質またはその一部を使用することができる。さらに、本発明により本発明の蛋白質の一次構造が明らかにされたので、当業者に周知の方法を用いて、本発明の蛋白質の部分ペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。

30

【0130】

(b) 抗体産生細胞の調製

工程(a)で得られた抗原と、フロインドの完全または不完全アジュバント、またはカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、マウスが最も好適に用いられるが、これに限定されない。

【0131】

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射いずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。

40

【0132】

免疫は、一回、または、適当な間隔で（好ましくは1週間から5週間間隔で）複数回繰返し行なうことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を後の細胞融合に用いることが好ましい。

【0133】

ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「RIA法

50

」という)、固相酵素免疫定量法(以下「ELISA法」という)、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、および操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法またはELISA法がより好適である。

【0134】

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製または部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中のモノクローナル抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

10

【0135】

(c) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)ミエローマ株P3X63Ag8U.1(P3-U1)[Yelton, D. E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)[Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)]、Sp2/O-Ag14(SP-2)[Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3X63Ag8.653(653)[Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3X63Ag8(X63)[Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)]などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、およびウシ胎児血清(以下「FCS」という)を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という)、またはダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という)で継代培養するが、細胞融合の3から4日前に正常培地[例えば、10% FCSを含むASF104培地(味の素(株)社製)]で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

20

30

【0136】

(d) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、末梢血、またはこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

40

【0137】

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程(c)で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単なポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

【0138】

脾細胞とミエローマとを無血清培地(例えばRPMI1640)、またはリン酸緩衝生理食塩液(以下「PBS」という)でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5:1~10:1程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群を

50

よくほぐした後、攪拌しながら 1 ml の 50% (w/v) ポリエチレングリコール (分子量 1000 ~ 4000) を含む無血清培地を滴下する。その後、10 ml の無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (以下「HAT」という) 液およびマウスインターロイキン-2 (以下「IL-2」という) を含む正常培地 (以下「HAT培地」という) 中に懸濁して培養用プレート (以下「プレート」という) の各ウェルに分注し、5% 炭酸ガス存在下、37℃ で2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

【0139】

(e) ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、およびミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

【0140】

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノプテリンを除いた培地 (以下「HT培地」という) への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA法により抗体価を測定する。

【0141】

以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

【0142】

(f) クローニング

工程(b)の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便でありよく用いられる。

【0143】

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0144】

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス (例えば、上記のBALB/c)、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット (例えば、MAbTrap GIIキット; ファルマシア社製) 等を利用することもできる。

【0145】

10

20

30

40

50

かくして得られるモノクローナル抗体は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対して高い抗原特異性を有する。

【0146】

(h)モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスの設定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー (Ouchterlony) 法、ELISA法、またはRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法またはRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット (例えば、マウスタイパーキット; バイオラッド社製) 等を利用することもできる。

10

【0147】

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、および280nmにおける吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

【0148】

このようにして得られる本発明のモノクローナル抗体は、その特異性を利用した本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの検出や分離精製に用いることができる。

20

【0149】

(4)検出

上記(3)記載の方法で得られる抗体は、それを直接標識するか、または該抗体を一次抗体とし、該抗体を特異的に認識する(抗体を作製した動物由来の抗体を認識する)標識二次抗体と協同で検出に用いられる。

【0150】

標識の種類として好ましいものは酵素(アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)またはビオチン(ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる)であるが、これらに限定されない。標識二次抗体(または標識ストレプトアビジン)を使用する方法のための、予め標識された抗体(またはストレプトアビジン)は種々のものが市販されている。RIAの場合は I^{125} 等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンター等を用いて行う。

30

【0151】

これら標識された酵素の活性を検出することにより、抗原であるポリペプチドの量が測定される。アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼの場合、それら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

【0152】

発色する基質を用いた場合、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては目視で検出できる。ELISA法においては、好ましくは市販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度(測定波長は基質により異なる)を測定することにより定量する。また好ましくは上記(3)において抗体作製のために使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行って、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することが可能である。

40

【0153】

一方、発光する基質を使用した場合は、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においてはX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができ、デンシトメトリーやモレキュラー・イメージャーF $\times$ システム(バイオラッド社製)等を利用した定量も

50

可能である。また、E L I S A法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー（例えば、バイオラッド社製等）を用いて酵素活性を測定する。

【0154】

(5)測定操作

i)ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットの場合

まず、抗体の非特異的吸着を阻止するため、予めメンブレンをそのような非特異的吸着を阻害する物質（スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン等）を含む緩衝液中に一定時間浸しておく操作（ブロッキング）を行う。ブロッキング溶液の組成は、例えば5% スキムミルク、0.05から0.1% ツイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）またはトリス緩衝生理食塩水（TBS）が用いられる。スキムミルクの代わりに、ブロックエース（大日本製薬）、1から10%のウシ血清アルブミン、0.5から3%のゼラチンまたは1%のポリビニルピロリドン等を用いてもよい。ブロッキングの時間は、4で16から24時間、または室温で1から3時間である。

10

【0155】

次に、メンブレンを0.05から0.1% ツイーン20を含むPBSまたはTBS（以下「洗浄液」という）で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記（3）記載の方法で作製された抗体をブロッキング溶液で適宜希釈した溶液中に一定時間浸して、抗体をメンブレン上の抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記（3）記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のウエスタンブロッティング実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で2時間行う。抗体反応操作終了後、メンブレンを洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続いて二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合はブロッキング溶液で2000から20000倍に希釈して用いる（添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う）。一次抗体を洗浄除去した後のメンブレンを二次抗体溶液に室温で45分から1時間浸し、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずメンブレンを洗浄液中で15分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪することにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

20

30

【0156】

ii) E L I S A / R I A

まず、上記（2）の方法で試料を固相化させたプレートのウェル内底面への抗体の非特異的吸着を阻止するため、ウエスタンブロットの場合と同様、予めブロッキングを行っておく。ブロッキングの条件については、ウエスタンブロットの項に記載した通りである。

【0157】

次に、ウェル内を0.05から0.1% ツイーン20を含むPBSまたはTBS（以下「洗浄液」という）で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記（3）記載の方法で作製された抗体を洗浄液で適宜希釈した溶液を分注して一定時間インキュベーションし、抗体を抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記（3）記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のE L I S A実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で1時間程度行う。抗体反応操作終了後、ウェル内を洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続いて二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合は洗浄液で2000から20000倍に希釈して用いる（添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う）。一次抗体を洗浄除去した後のウェルに二次抗体溶液を分注して室温で1から3時間インキュベーションし、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずウェル内に洗浄液を分注して5分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪す

40

50

ることにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

【0158】

また本発明において、いわゆるサンドイッチ法のE L I S Aは例えば以下に記載する方法により実施することができる。まず、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか一つにおいて、親水性に富む領域を2箇所選んで、それぞれの領域中のアミノ酸6残基以上からなる部分ペプチドを合成し、該部分ペプチドを抗原とした2種類の抗体を取得する。このうち一方の抗体を上記(4)記載のように標識しておく。標識しなかった方の抗体は、上記(2)記載の方法に準じて96穴E L I S A用プレートのウェル内底面に固相化する。ブロッキングの後、試料液をウェル内に入れて常温で1時間インキュベーションする。ウェル内を洗浄後、標識した方の抗体希釈液を各ウェルに分注してインキュベーションする。再びウェル内を洗浄後、標識方法に合わせた検出操作を行う。

10

【0159】

(6) リガンド

抗体の他に、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに特異的に結合する基質、補酵素、調節因子等のリガンドを用いることによってインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを定量することができる。

【0160】

(7) 判定

以上に記載した方法で、被験者または被験動物から採取した検体と、正常人または正常動物から採取した検体との間で検出結果を比較し、その結果上記(3)記載の方法で作製された抗体またはリガンドが特異的に結合するポリペプチドの量を各インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量として、正常個体に比べインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量が低下している場合に糖代謝異常および/または脂質代謝異常があるか、糖代謝異常および/または脂質代謝異常になる可能性が高いと判定することができる。

20

【0161】

5. インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドおよび/またはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド検出用キット

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドおよび/またはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは、以下の1)乃至5)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含むキットを用いて検出することができる。

30

1) 配列表の配列番号4または8に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの一部乃至全部を特異的に増幅するための15から30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号4または8に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 上記)に記載のポリヌクレオチドが固定された固相化試料；

4) 下記の▲1▼乃至▲5▼から選択されるポリペプチドに特異的に結合し、該タンパク質を検出するための抗体；

40

▲1▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲2▼配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲3▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

▲4▼配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド。

▲5▼上記▲1▼乃至▲4▼に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは

50

数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

5) 上記4)に記載の抗体に結合する二次抗体。

【0162】

前記1)に記載のプライマーは、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの塩基配列(例えば、配列表の配列番号4または8に示されるヌクレオチド配列)に基づき市販のプライマー設計ソフト(たとえば、Wisconsin GCG package Version 10.2)を用いる等、常法により容易に設計し、増幅することができる。このようなプライマーとしては例えば、配列表の配列番号6に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドの組み合わせまたは配列表の配列番号20に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号21に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドの組み合わせを使用することができる。また、前記2)に記載のプローブは、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリペプチドであって、100から1500塩基長、好ましくは300から600塩基長である。これらのプライマーやプローブは、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてもよく、また、リンカーを付加していてもよい。

【0163】

上記3)に記載の固相化試料は、上記2)に記載のプローブをガラス板、ナイロンメンブレン等の固相に固定することにより作製される。このような固相化試料の作成方法については、既に「1.1 インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が変動するポリヌクレオチドの特定方法」の項中、「工程2」インスリン抵抗性改善剤投与と非投与で発現量が著しく異なるポリヌクレオチドを特定する工程」の項中、「(1)固相化試料を用いた解析方法」の項で説明した通りであり、例えば、遺伝子チップ、cDNAアレイ、オリゴアレイ、メンブレンフィルター等を挙げることができる。

【0164】

本発明のキットには、更に耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物)および緩衝液を含めることもできる。耐熱性DNAポリメラーゼとしてはTaq DNAポリメラーゼ、LA Taq DNA polymerase(タカラバイオ社)、Tth DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼなどが例示できる。緩衝液は使用するDNAポリメラーゼに応じて選ばれ、必要に応じてMg²⁺等が添加されている。

【0165】

前記、4)および5)に記載の抗体は「4.糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法」の項に記載した方法により作製することができる。該抗体は、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてもよい。

【0166】

本発明のキットはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドおよび/またはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの検出に用いることができ、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の病態の判定や、糖代謝異常および/または脂質代謝異常を改善する物質のスクリーニングにも用いることができる。

【0167】

6. インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドはインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇したポリペプチドがコードするポリペプチドとして見出されたタンパク質

10

20

30

40

50

であり、糖代謝および／または脂質代謝に関連するタンパク質であり、上記 1 . 5 乃至 1 . 7 に記載したように、血中のグルコース濃度及びインスリン濃度を低下させる機能、脂肪組織において、インスリン抵抗性および糖尿病発症原因の一つとして報告されている T N F - α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能を有する。

【 0 1 6 8 】

したがって、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進又は抑制する物質は糖代謝および脂質代謝に関連する物質として、糖代謝異常および／または脂質代謝異常を改善する物質ともなる得る。

【 0 1 6 9 】

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドまたはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの少なくとも一つの発現量を測定することによって糖代謝異常および／または脂質代謝異常を改善する物質のスクリーニングをすることができる。

【 0 1 7 0 】

なお、「被験物質」とは、本発明のスクリーニング方法で本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進又は抑制する効果を調べる対象となる物質をいう。被験物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。また、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量を増加するように設計された核酸またはその誘導体（アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、RNAi 等を含む）を、被験物質として使用することも可能である。被験物質の投与量や濃度は適宜設定するか、または例えば希釈系列を作成するなどして複数種の投与量を設定してもよく、個体、液体等適当な状態で投与することができる。適当なバッファに溶解したり、安定化剤等を加えてもよい。培養細胞を用いるスクリーニング方法の場合には、培地に添加して培養することができる。培地に添加する場合には培養開始時から添加してもよいし、培養途中で添加しても良く、また、添加の回数も 1 回に限らない。被験物質存在下で培養する期間も適宜設定してよいが、好ましくは 30 分から 48 時間である。哺乳動物個体に被験物質を投与する場合は、被験物質の物性等により経口投与、静脈注射、腹腔内注射、経皮投与、皮下注射等の投与形態を使い分ける。また、投与から、検体を得るまでの時間は適宜に選択することができる。

【 0 1 7 1 】

本発明における「糖代謝異常および／または脂質代謝異常を改善する物質」とは、インスリン抵抗性を改善する効果を有する物質および／または脂質代謝異常を改善する物質を意味する。

【 0 1 7 2 】

本発明のスクリーニング方法において用いられる培養細胞は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つまたはその一部のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを発現する哺乳動物細胞であればよく、肝臓または脂肪組織由来の培養細胞あるいは肝臓や脂肪組織に分化する培養細胞であるが、例えば本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つをそのプロモーター領域とともに導入した細胞など、人為的に形質転換された細胞も使用することが可能である。このような培養細胞としては、例えば、マウス繊維芽細胞由来細胞株 3 T 3 - L 1 細胞、ラット肝臓癌細胞株 H 4 - I I - E - C 3、マウス、ラットおよびヒト遊離脂肪細胞、マウス、ラットおよびヒト初代肝細胞等を挙げることができる。哺乳動物種としては、ヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましいが、これらに限定されない。

【 0 1 7 3 】

本発明のスクリーニング方法には、培養細胞を用いず、哺乳動物個体に被験物質を投与して、その後該動物個体から摘出されたその臓器または組織細胞における本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現を検出する方法も含まれる。ポリヌクレオチド発現の検出対象となる臓器または組織は、本発明のインスリン抵抗性

10

20

30

40

50

改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれかを発現するものであればよいが、好ましくは白色脂肪細胞、肝臓、筋肉である。哺乳動物種としてはヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。なお、糖尿病のモデル動物であるＫＫマウスを用いることもできる。

【０１７４】

本発明の方法において用いられる培養細胞は、被験物質を添加しない場合には本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つを発現可能な条件であれば、いかなる条件で培養してもよい。例えば、該培養細胞について確立された培養条件が知られており、該条件下において該細胞が本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現する場合は、該条件で培養してよい。また、哺乳動物個体から摘出した臓器または組織における本ポリヌクレオチド発現を検出する場合における、該動物の飼育条件も、被験物質を添加しない場合にインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを発現可能な条件であればよい。

10

【０１７５】

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを検出する実施態様において用いられる培養細胞の種類に関する条件は、上記したインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現を検出する実施態様の場合と同様である。また、何らかの事情により培養細胞を用いるよりも好適と判断される場合には、哺乳動物個体に被験物質を投与して、その後該動物個体から採取された臓器または組織等を試料として用いる方法も採用し得る。ヒトの場合は生体より採取された脂肪組織や肝臓を用いることもできる。

20

【０１７６】

哺乳動物種としてはヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。培養細胞の培養条件、動物の飼育条件、被験物質の投与方法についても、ポリヌクレオチド発現を検出する実施態様の場合と同様である。被験物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。

【０１７７】

本実施態様のための試料を調製するための材料としては、被験物質存在下または非存在下で培養した培養細胞の全細胞抽出液または核抽出画分が用いられ得るが、全細胞抽出液が好適である。全細胞抽出液は、必要により高速遠心することにより不溶性の物質を除去した後、ＥＬＩＳＡ／ＲＩＡ用試料やウエスタンブロット用試料の調製工程に供される。

30

【０１７８】

なお、被験物質の、糖代謝および／又は脂質代謝に対する影響を調べるためには、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの転写産物である、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量を測定する方法及びインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を利用した方法がある。

【０１７９】

培養細胞からの、全ＲＮＡの抽出、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量の測定、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量の測定については、上記１．１に既に記載した方法に従って行うことができる。

40

【０１８０】

６．１ インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドを用いる方法

本発明のスクリーニング方法としては例えば、哺乳動物由来培養細胞を用いる場合、哺乳動物個体を用いる場合についてそれぞれ以下になる。

【０１８１】

Ａ）哺乳動物由来培養細胞を用いる場合

Ａ－１）以下の工程１）乃至３）を含む。

１）被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全ＲＮＡを抽出する工程；

50

2) 1) 由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した哺乳動物培養細胞由来全RNAの間における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現量の差を検出する工程；

3) ポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

【0182】

A - 2) 以下の工程1)乃至4)を含む。

1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNAを抽出する工程；

2) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNAを抽出する工程； 10

3) 1) 由来の全RNAと2) 由来の全RNAの間における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現量の差を検出する工程；

4) 3) に記載のポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

【0183】

B) 哺乳動物個体を用いる場合

B - 1) 以下の工程1)乃至3)を含む。

1) 被験物質を投与した動物より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体より、全RNAを抽出する工程； 20

2) 1) 由来の全RNAと被験物質を投与しなかった動物より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体より得た全RNAの間における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つ発現量の差を検出する工程；

3) 2) に記載のポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の糖代謝異常および/または脂質代謝異常改善効果を判定する工程。

【0184】

B - 2) 以下の工程1)乃至4)を含む。

1) 被験物質を投与した動物より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体より、全RNAを抽出する工程；

2) 被験物質を投与しなかった動物より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体より、全RNAを抽出する工程； 30

3) 1) 由来の全RNAと2) 由来の全RNAの間における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドのいずれか一つの発現量の差を検出する工程；

4) 3) に記載のポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

【0185】

6. 2 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを用いる場合

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量を測定することを利用したスクリーニング方法については哺乳動物培養細胞を用いた場合と動物固体を用いた場合についてそれぞれ以下の工程を含む。 40

【0186】

A) 哺乳動物由来培養細胞を用いる場合

A - 1) 以下の工程1)および2)を含む：

1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；

2) 1) で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

【0187】

A - 2) 以下の工程 1) 乃至 3) を含む：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；
- 2) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、上記 1) に記載のポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；
- 3) 上記 1) で検出されたポリペプチドの発現量と、2) で検出されたポリペプチドの発現量の差を検出し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

10

【0188】

A - 3) 以下の工程 1) 乃至 3) を含む：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
- 2) 上記固相化ポリペプチドにおける、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；
- 3) 上記 2) で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全ポリペプチドにおける該ポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

20

【0189】

A - 4) 以下の工程 1) 乃至 5) を含む：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
- 2) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全ポリペプチドを固相化する工程；
- 3) 上記 1) に記載の固相化ポリペプチドにおける本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；
- 4) 上記 2) に記載の固相化ポリペプチドにおける上記 3) で測定したポリペプチドと同じポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；
- 5) 3) で測定されたポリペプチドの発現量と、4) で測定されたポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進または抑制効果を判定する工程。

30

【0190】

B) 哺乳動物個体を用いる場合

B - 1) 以下の工程 1) および 2) を含む：

- 1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した血液、肝臓および／または脂肪組織を含む検体における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；
- 2) 1) で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を投与されなかった哺乳動物個体から採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

40

【0191】

B - 2) 以下の工程 1) 乃至 3) を含む：

50

1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取された血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体における、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

2) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取された血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体における、該ポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

3) 1) で検出されたポリペプチドの発現量と、2) で検出されたポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

10

【0192】

B - 3) 以下の工程1)乃至3)を含む:

1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体中の全ポリペプチドを固相化する工程;

2) 上記固相化ポリペプチドにおける、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

3) 2) で検出されたポリペプチドの発現量と、被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体中における該ポリペプチドの発現量の差を解析し、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

20

【0193】

B - 4) 以下の工程1)乃至5)を含む:

1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した血液、肝臓および/または脂肪組織を含む検体中の全ポリペプチドを固相化する工程;

2) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した血液、肝臓または脂肪組織を含む検体中の全ポリペプチドを固相化する工程;

3) 上記1)に記載の固相化ポリペプチドにおける、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのいずれか一つの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

30

4) 上記2)に記載の固相化ポリペプチドにおける、上記3)で発現量を測定したのポリペプチドと同じポリペプチドの発現量を該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

5) 上記3)で検出されたポリペプチドの発現量と、上記4)で検出されたポリペプチドの発現量の差を解析し、被験物質の、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の促進または抑制効果を判定する工程。

【0194】

6. 3 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量の測定

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリヌクレオチドの発現量は1.1の項で記載した方法によって行なうことができる。

40

【0195】

6. 4 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの検出

次に、本発明の方法の別の実施態様としては、上記のポリヌクレオチドの発現を検出する実施態様において検出対象となった遺伝子(ポリヌクレオチド)がコードするポリペプチド(タンパク質)を検出する方法がある。「4. 糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法」の項中、「4. 2 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを利用した糖代謝異常および/または脂質代謝異常の検出方法」の項に記載した方法に従って、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量を測定することができる。

【0196】

被験物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被験物質非存在下で培養した細胞由来の試

50

料との間で検出結果を比較し、その結果インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの産生量を増加させた被験物質は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する物質であり、糖代謝異常および／または脂質代謝異常を改善させる機能を有し、インスリン抵抗性を改善させる機能を有し、糖代謝異常および／または脂質代謝異常の改善剤、2型糖尿病の治療または予防剤および／または高脂血症治療または予防剤となり得る。

【0197】

インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの産生量を低下させた被験物質は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を抑制する物質であり、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの発現量増加に起因する糖代謝異常および／または脂質代謝異常を改善させる機能を糖代謝異常の治療または予防剤および／または高脂血症治療または予防剤となり得る。

10

【0198】

6.5 インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を利用した方法

A. 血中のグルコース濃度及び／またはインスリン濃度を低下させる機能を利用したスクリーニング方法

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは血中グルコース濃度及び／または血中インスリン濃度を低下させる機能を有する。したがって、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する物質は血糖値および／または血中インスリン濃度を上昇させる機能を有する物質であり、一方、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を抑制する物質は血糖値および／または血中インスリン濃度を低下させる機能を有する物質である。これらの物質は具体的には以下の、A-1またはA-2の工程によって取得することができる。

20

【0199】

A-1. 下記の工程1)および2)を含む、下記のa)乃至c)から選択される少なくともいずれか一つのポリペプチドの機能を促進する物質または抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

b) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

30

c) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記a)乃至d)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

40

1) 非ヒト哺乳動物に、上記a)乃至e)から選択されるポリペプチドおよび被験物質を投与する工程；

2) 上記1)に記載の動物の血中のグルコース濃度および／またはインスリン濃度を測定する工程。

【0200】

A-2. 下記の工程1)乃至2)を含むことを特徴とする、下記のa)乃至e)に記載のポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

50

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、

10

肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

2) 1) に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する。

【0201】

血中グルコース濃度（血糖値）は、当業者が通常用いる方法によって測定することができるが、例えば、グルコース測定用キット（グルコース CII - テストワコー、和光純薬社製）を用いて測定することができる。また、血中のインスリン濃度も当業者が通常用いる方法によって測定することができるが、例えば、インスリン測定キット（森永生化学研究所製）を用いて血中インスリン値を測定することができる。その結果、コントロールに比べてグルコース濃度および／またはインスリン濃度を低下させた被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する物質であると判定することができる。また、コントロールに比べてグルコース濃度および／またはインスリン濃度を増加させた被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を抑制する物質であると判定することができる。

20

【0202】

B. TNF- α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能を利用したスクリーニング方法

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは脂肪組織において、インスリン抵抗性および糖尿病発症原因の一つとして報告されている TNF- α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能を有する。したがって、TNF- α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能を阻害する物質及び／または促進する物質は、糖代謝異常及び／または脂質代謝異常の改善剤となり得る。具体的には以下のようなスクリーニング方法によってこのような物質を入手することができる。

30

【0203】

下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) に記載の機能を促進又は抑制する機能を有する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

40

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能

50

、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を脂肪分解促進物質を含む溶液中で接触させる；

2) 1) に記載の溶液中の遊離脂肪酸濃度を測定する。

【0204】

本スクリーニング方法に用いられる細胞としては、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現している細胞で、脂肪分解アッセイに使用することができる細胞であれば、特に制限されず、脂肪細胞を用いることができ、例えば、3T3L1細胞を脂肪細胞に分化させた細胞を用いることができる。脂肪分解促進物質としては、脂肪の分解を促進する機能を有する物質であれば特に制限されないが、例えば、TNF- α を挙げることができる。

10

【0205】

具体的には、上記工程 1) においてはインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現する 3T3L1 脂肪細胞を脂肪分解アッセイ培地（フェノールレッド不含、2%ウシ血清アルブミン（BSA：シグマ社製）を含む低グルコース DMEM（インビトロジェン社製）に TNF- α （シグマ社製）を適当な濃度（例えば、終濃度 0.5 ng/ml）で添加し、被験物質の存在下で適当な時間培養する。

【0206】

上記工程 2) においては、培養後の培地上清中の遊離脂肪酸濃度を測定する。遊離脂肪酸の濃度は当業者が通常行う方法によって行うことができるが、例えば、遊離脂肪酸測定用のキット（NEFA-C テストワコー：和光純薬社製）をそのマニュアルにしたがって用いて測定することができる。同時に、コントロールとして本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現しない細胞についても同様に培養を行い遊離脂肪酸濃度を測定する。その結果、コントロールと比較して、遊離脂肪酸濃度が低くなっている場合には被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する物質であると判定することができ、逆に遊離脂肪酸濃度が高くなっている場合には、被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を抑制する物質であると判定することができる。

20

【0207】

C. 肝臓において糖産生を抑制する機能を利用したスクリーニング方法

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドは肝臓において糖産生を抑制する機能を有する。したがって、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現する細胞においてコントロールに比べて、糖産生量を有意に変化させる物質は糖代謝異常及び/または脂質代謝異常の治療剤となり得る。このような物質は具体的には以下の工程によって取得することができる。

30

【0208】

下記の工程 1) 乃至 2) を含むことを特徴とする、下記の a) 乃至 e) に記載のポリペプチドの機能を促進又は抑制する物質のスクリーニング方法：

a) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 1 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

40

b) 配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 29 から 459 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

c) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

d) 配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 27 から 468 に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；

e) 上記 a) 乃至 d) に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2 型糖尿病モデルマウスに投与すると血中の

50

グルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

1) 上記 a) 乃至 e) から選択される少なくともいずれか一つを発現する細胞と被験物質を溶液中で接触させる；

2) 1) に記載の溶液中のグルコース濃度を測定する。

【0209】

上記工程 1) において用いる細胞としては、上記 a) 乃至 e) から選択される本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現する細胞であり、糖産生量を測定することができる限り特に制限はなく、培地についても、糖産生量を測定することができる限りにおいて制限はない。例えば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを発現する H 4 - I I - E - C 3 肝癌細胞を糖新生アッセイ培地（[フェノールレッドを含まず、グルコースを含まず、L - グルタミンを含まず、ピルビン酸を含まない D M E - b a s e (S I G M A 社製) に終濃度 2 m M で L - グルタミンを添加したもの] にて 2 回細胞を洗浄後、各ウエルに 5 0 0 μ l の糖新生アッセイ培地及び被験物質を添加し、さらに必要なウエルには外因性基質としてピルビン酸 / 乳酸をそれぞれ終濃度 2 0 m M / 2 m M になるように添加して、インキュベートする。インキュベート時間は糖産生量を測定することができる限りにおいて特に制限はないが、例えば、1 分から 1 0 時間、好ましくは、3 0 分から 5 時間、より好ましくは 3 時間である。

工程 2) においては上記工程 1) の上清を用いてグルコース濃度を測定する。グルコース濃度の測定は当業者が通常用いる方法で行うことができるが、例えば、A m p l e x R e d キット（モレキュラープローブ社製）をその添付プロトコールに従って用いることにより測定することができる。その結果本発明の被験物質を添加することによってコントロールに比べ、糖産生量が低下している被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する物質であると判定することができ、糖産生量の増加に起因する疾患の治療剤となり得る。また、コントロールに比べ糖産生量が増加している被験物質は本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を阻害する物質であり、糖産生量の低下に起因する疾患の治療剤となり得る。

【0210】

6. 6 その他

なお、上記本発明のスクリーニング方法は被験物質の代わりに本発明のインスリン抵抗性改善剤の機能に影響することが明らかな物質を用いた検定試験に用いることもできる。

【0211】

7. 直接相互作用する物質の探索

本発明の他の一つの態様としては、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの活動を抑制するような物質を得ることを目的とした、該蛋白質の立体構造をベースとしたドラッグデザインの手法を含む。このような手法は、ラショナルドラッグデザイン法として知られており、酵素活性などの機能や、リガンド、コファクター、または D N A への結合などを効率よく阻害もしくは活性化させるような化合物の探索に利用されている。この例として、すでに上市されている抗 H I V 剤であるプロテアーゼの阻害剤がよく知られている。本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの三次元構造解析においても、X - 線結晶解析や核磁気共鳴法といった一般的によく知られている手法が利用できると考えられる。さらに、本発明のスクリーニングポリペプチドの機能を抑制する物質の探索には、コンピュータドラッグデザイン（C A D D）を活用した設計も可能である。この例としては、慢性関節リウマチ治療の新たなゲノム新薬として期待されている A P - 1 の働きを阻害する低分子化合物（国際特許出願公開 W O 9 9 / 5 8 5 1 5 号）などが知られている。このような方法により、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに直接結合したり、あるいは本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと他の因子との相互作用を阻害することにより、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を抑制するような物質を得ることができる。

【0212】

さらに、他の一つの態様は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドが会合するポリペプチド、すなわち本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドのパートナータンパク質に関する。すなわち、本発明は、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの活性を調節するパートナータンパク質のスクリーニング方法に関する。

【0213】

このスクリーニング方法の一つの態様は、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに被験タンパク質試料を接触させ、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに結合するタンパク質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、精製したインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを用いて、これに結合するタンパク質のアフィニティー精製を行う方法が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドにヒスチジン6個よりなる配列をアフィニティータグとして融合したものを作製して、これを細胞の抽出液（予めニッケル・アガロースカラムにチャージして、このカラムを素通りした画分）と4で12時間インキュベートし、次いで、この混合物に別途ニッケル・アガロース担体を加えて4で1時間インキュベートする。ニッケル・アガロース担体を洗浄バッファーで十分洗浄した後、100mMイミダゾールを加えることにより、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと特異的に結合する細胞抽出液中のタンパク質を溶出させて精製し、この構造を決定する。このようにして、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと直接結合するタンパク質、およびインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドとの結合活性は持たないが、サブユニットとしてインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに直接結合するタンパク質と複合体を形成することにより間接的にインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに結合するタンパク質が精製できる〔実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ5「転写因子研究法」pp215-219（羊土社刊）〕。

10

20

【0214】

別の方法としては、ファウエスタンブロット法〔実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp76-81（羊土社刊）〕や、酵母や哺乳類動物細胞を用いたツーハイブリッドシステム法〔実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp66-75（羊土社刊）、「チェックメイト・マンマリアン・ツーハイブリッドシステム」（プロメガ社製）〕によるクローニングも可能であるが、これらの方法に限定されない。

30

【0215】

このようにして、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと直接もしくは間接的に相互作用するパートナータンパク質のcDNAが得られれば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドと該パートナータンパク質との相互作用を阻害する物質の機能的スクリーニングに利用することができる。具体的には、例えば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドとグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を調製して、抗グルタチオンS-トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレートに結合させた後、ビオチン化した該パートナータンパク質をこの融合タンパク質と接触させ、該融合タンパク質との結合をストレプトアビジン化アルカリフォスファターゼで検出する。ビオチン化した該パートナータンパク質添加の際、被験物質も添加し、融合タンパク質と該パートナータンパク質との結合を促進あるいは阻害する物質を選択する。この方法では、融合タンパク質に直接作用する物質または該パートナータンパク質に直接作用する物質が得られる。

40

【0216】

融合タンパク質と該パートナータンパク質との結合が間接的であり、何らかの別の因子を介しているような場合には、例えば該因子を含むような細胞抽出液存在下で、同様に上記アッセイを行う。この場合には、該因子に対して作用するような物質も選択される可能性がある。

【0217】

また、得られたパートナータンパク質が、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの

50

機能を促進する活性を有している場合には、既に記載したインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド遺伝子の発現ベクターを応用した試験方法に従って、糖代謝異常および/または脂質代謝異常の改善剤または予防剤、例えば、インスリン抵抗性改善効果を有する2型糖尿病や高脂血症のの治療または予防剤として有用な候補物質のスクリーニングを行うことができる。また、得られたパートナータンパク質が、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能を促進する活性を有している場合には、このような促進因子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、糖代謝異常や脂質代謝異常、例えば、2型糖尿病や高脂血症の遺伝子治療に用いることができる。

【0218】

そのようなポリヌクレオチドは、例えば同定された阻害因子のアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成してcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの機能の阻害活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるDNAを化学合成する。

10

【0219】

遺伝子治療においては、そのようにして得られた阻害因子をコードする遺伝子を、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス（無毒化されたもの）を患者に感染させる。患者体内ではインスリン抵抗性改善因子が産生され、インスリン抵抗性が改善する機能を有するので、糖代謝異常や脂質代謝異常、例えば、2型糖尿病や高脂血症のの治療が可能となる。

20

【0220】

遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、実験医学増刊，12（15）（1994）、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」，羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。

【0221】

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクティン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

30

【0222】

また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（*in vivo*）法およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボ（*ex vivo*）法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、月刊薬事，36（1），23 - 48（1994）、実験医学増刊，12（15）（1994））。

40

【0223】

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス・リポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

【0224】

50

配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1 - 2950に示されるヌクレオチド配列または配列番号8のヌクレオチド番号1 - 3354に示されるヌクレオチド配列または部分配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列または配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15から30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リポソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列または配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列がコードするタンパク質の活性が増加しすぎることによって引き起こされる病気の治療または予防に有用である。

10

【0225】

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley-Liss, Inc.)に記載されている。そして、配列番号4のヌクレオチド番号1から2950に示されるヌクレオチド配列または配列番号8のヌクレオチド番号1から3354に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の発現やその遺伝子産物の活性に異常の認められる患者の治療に十分な量を各人に投与される。その有効量は、各人の状態、体重、性別、および年齢などの種々の因子や、皮下、局所、経口、および筋肉内といった投与方法の違いによって変化し得る。例えば、静脈注射する場合には、0.02から0.2mg/kg/時間で2時間、また、皮下投与の場合には、1から200mg/m²/日のように変化し得る。

20

【0226】

8. 本発明のポリペプチドを含有する医薬

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
2) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号29から459に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
3) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
4) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号27から468に示されるアミノ酸配列を含むことからなるポリペプチド；
4) 上記1)乃至2)に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、インスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド；

30

40

は医薬として用いることができ、糖代謝と関連する疾患、例えば、糖尿病、高脂血症等の糖代謝異常の治療剤として用いることができ、それ自体あるいは適宜の薬理学的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等により経口的に、又は、注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは、外用剤等により非経口的に投与することができる。

【0227】

これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、α澱粉、デキストリンの

50

ような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤を挙げることができる。）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

10

20

30

40

50

【0228】

本発明の化合物を患者へ導入する方法については、上記に加えてコロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば限定しないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げることができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である（Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698）。

0.2 - 0.4 μm のサイズ範囲をとる単膜リポソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化し得、化合物はこの水性内膜に被胞化され、生物学的に活性な形態で脳細胞へ輸送される（Fraleigh et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, 77）。リポソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質、とりわけ相転移温度の高いリン脂質を1種又はそれ以上のステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リポソーム生産に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物を包含する。特に有用なのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここでは脂質部分が14 - 18の炭素原子、特に16 - 18の炭素原子を含有し、

飽和している（１４ - １８ の炭素原子鎖の内部に二重結合を欠いている）。代表的なリン脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンを包含する。

【０２２９】

リボソームを包含するコロイド分散系の標的化は、受動的又は能動的のいずれかであってもよい。受動的な標的化は、洞様毛細血管を含有する臓器の網内系細胞へ分布しようとするリボソーム本来の傾向を利用することによって達成される。一方、能動的な標的化は、例えば、ウイルスのタンパク質コート（Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1993, 90, 8474）、モノクローナル抗体（又はその適切な結合部分）、糖、糖脂質又はタンパク質（又はその適切なオリゴペプチドフラグメント）のような特定のリガンドをリボソームへ結合させること、又は天然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞型への分布を達成するためにリボソームの組成を変えることによってリボソームを修飾する手法等を挙げる事ができる。標的化されたコロイド分散系の表面は様々なやり方で修飾され得る。リボソームで標的したデリバリーシステムでは、脂質二重層との緊密な会合において標的リガンドを維持するために、リボソームの脂質二重層へ脂質基が取込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドと結びつけるために様々な連結基が使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドのデリバリーが所望される細胞の上に支配的に見出される特定の細胞表面分子に結合する標的リガンドは、例えば、（１）デリバリーが所望される細胞によって支配的に発現される特定の細胞受容体と結合している、ホルモン、成長因子又はその適切なオリゴペプチドフラグメント、又は（２）標的細胞上で支配的に見出される抗原性エピトープと特異的に結合する、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はその適切なフラグメント（例えば、Fab' ; F(ab')₂）、であり得る。２種又はそれ以上の生物活性剤（例えば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドとその他の薬剤）は、単一のリボソーム内部で複合し、投与することもできる。内容物の細胞内安定性及び／又は標的化を高める薬剤をコロイド分散系へ追加することも可能である。

10

20

【０２３０】

その使用量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、１回当たり下限１ｍｇ（好適には、３０ｍｇ）、上限２０００ｍｇ（好適には、１５００ｍｇ）を、注射の場合には、１回当たり下限０．１ｍｇ（好適には、５ｍｇ）、上限１０００ｍｇ（好適には、５００ｍｇ）を皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

30

【０２３１】

９．本発明のポリペプチドに対する抗体を含有する医薬

本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを過剰に発現させた糖尿病モデルマウスでは、血糖値、血中インスリン濃度の低下が認められることから、本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対する抗体は、糖代謝異常により血糖値及び血中インスリン濃度が正常値より低下している動物及び／またはヒトにおいて、血糖値及び／または血中インスリン濃度を上昇させ、低血糖症の治療薬となり得る。本発明のインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対する抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、抗原性の問題からヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド抗体を作製することが望ましい。ヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド抗体の作製は、次に述べるような手法により得ることができる。即ち、▲１▼ヒト末梢血あるいは脾臓から採取したヒトリンパ球をin vitroでIL-4存在下、抗原であるヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドで感作し、感作したヒトリンパ球をマウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆H₆/B₅（ATCC CRL1823）と細胞融合させることにより目的の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングする。得られた抗体産生ハイブリドーマが生産する抗体は、ヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体である。これらの抗体の中からヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの活性を中和する抗体を選別する。しかしながら、このようにヒトリンパ球をin vitroで感作する方法では、一般的に抗原に対して高親和性の抗体を得

40

50

るのは困難である。従って、ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに高親和性のモノクローナル抗体を得るには、上記のようにして得られた低親和性のヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体を抗親和化する必要がある。それには、上記のようにして得られ、中和抗体であるものの低親和性であるヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体のCDR領域(特にCDR-3)にランダム変異を導入し、これをファージで発現させてヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを固相化したプレートを用いてファージディスプレイ法により、抗原であるヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに強力に結合するファージを選択し、そのファージを大腸菌で増やし、その塩基配列から高親和性を有するCDRのアミノ酸配列を決定すればよい。このようにして得られたヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体をコードする遺伝子を一般的に使用されている哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んで、発現させることによりヒト型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体が得られる。これらの中から、ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性を中和し、かつ高親和性である目的のヒト型抗インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体を選別することができる。また、▲2▼Balb/cマウスを用いて、本発明と同じように常法(Kohler et al.: Nature 256, p. 495-497, 1975)によりマウス型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体を作製し、ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性を中和し、かつ高親和性を有するモノクローナル抗体を選択する。この高親和性マウス型抗ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体のCDR-領域(CDR-1、2および3)をヒトIgGのCDR領域に移植するCDR-grafting(Winter and Milstein: Nature 349, p293-299, 1991)の手法を駆使することによりヒト型化が可能である。上記に加え、さらに▲3▼ヒト抹消血リンパ球をSevere combined immune deficiency(SCID)マウスに移植し、この移植されたSCIDマウスはヒト型抗体を生産する(Mosier D. E. et al.: Nature 335, p256-259, 1988; Duchosal M. A. et al.: Nature 355, p258-262, 1992)ので、抗原としてヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを抗原として感作し、スクリーニングすることにより、ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに特異的なヒト型モノクローナル抗体を生産するリンパ球をそのマウスから採取することができる。得られたリンパ球を前述のヒト型抗体の作製法▲1▼と同様に、マウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆H₆/B₅(ATCC CRL 1823)と細胞融合させ、得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。このようにして得られたハイブリドーマを培養することにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を大量に製造でき、該タンパク質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常のタンパク沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、目的のヒト型モノクローナル抗体をコードする遺伝子(cDNA)をクローニングし、この遺伝子を遺伝子工学的手法により適当なベクターに組み込み、各種動物細胞、混注細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現させることにより、遺伝子組換えヒト型モノクローナル抗体を大量に製造することができる。得られた培養液から上述と同様の方法により精製することにより、精製されたヒト型モノクローナル抗体を大量に得ることができる。更に、上述の方法で得られた抗インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドモノクローナル抗体の中から、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性を中和する

10

20

30

40

50

抗体は、生体内でのインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性、即ち、血糖値を低下する作用を阻害することから、医薬として、特に糖代謝異常および/または脂質代謝異常の治療剤として期待される。in vivoでの実験動物を利用した抗インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド抗体の低血糖及び/または低インスリン症状に対する治療及び/または予防効果は、例えば、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを過剰に発現しているトランスジェニック動物に同インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド抗体を投与し、血糖値の変化を測定することで確認することができる。

【0232】

このようにして得られたインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドの生物活性を中和する抗体は、医薬として特に血糖値及び/または血中インスリン濃度が低い症状の治療及び/または予防を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。本発明の抗体は製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。本発明抗体を含む製剤は、インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドを認識する抗体を有効成分として含有する医薬組成物として、ヒトあるいは動物に対し安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。モノクローナル抗体は高分子蛋白質であることから、バイアル瓶などのガラス容器や注射筒などへの吸着が著しい上に不安定であり、種々の物理化学的因子、例えば、熱、pH及び湿度とうにより容易に失活する。従って、安定な形で製剤化するために、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤などを添加する。安定化剤としてはグリシン、アラニン等のアミノ酸類、デキストラン40及びマンノース等の糖類、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等の糖アルコール等が挙げられ、またこれらの二種以上を併用してもよい。これらの安定化剤の添加量は、抗体の重量にたいして0.01~100倍、特に0.1~10倍添加するのが好ましい。これら安定化剤を加えることにより、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の保存安定性を向上することができる。緩衝剤としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水溶液のpHを調製し、抗体の安定性、溶解性に寄与する。緩衝剤の添加量としては、例えば液状製剤あるいは凍結乾燥製剤を採用解した後の水量に対し、1~10mMとするのが好ましい。界面活性剤としては、好ましくはポリソルベート20、プルロニックF-68、ポリエチレングリコール等、特に好ましくはポリソルベート80が挙げられ、またこれらの2種以上を併用してもよい。抗体のような高分子蛋白質は容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすい。従って、界面活性剤を添加することによって、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体の、容器への吸着を防止することができる。界面活性剤の添加量としては、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水重量に対して0.001~1.0%添加することが好ましい。以上のような安定化剤、緩衝剤、あるいは吸着防止剤を加えて本発明抗体の製剤を調製することができるが、特に医療用または動物用注射剤として用いる場合は、浸透圧として許容される浸透圧比は1~2が好ましい。浸透圧比は、製剤化に際して塩化ナトリウムの増減により調製することができる。製剤中の抗体含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができ、ヒトに対するヒト型抗体の投与量は、抗体のヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対する親和性、即ち、ヒトインスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチドに対する解離定数(K_d値)に対し、親和性が高い(K_d値が低い)ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発揮することができる。ヒト型抗インスリン抵抗性改善剤感受性ポリペプチド抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~30日間に1回投与すればよい。

【0233】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook、J.、Fritsch、E.F.及びManiatis、T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより198

10

20

30

40

50

9年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0234】

実施例1．KKマウスへの薬剤投与および血液生化学値測定

1) KKマウスの準備

通常の食餌(F2:船橋農場製)で飼育した18週齢の雄性KKマウス(高脂血症マウス:日本クレアより購入)の体重を測定し、次いで尾静脈から採血し、遠心分離により血漿を分離し、血糖値を測定した。血糖値が3.5g/L以上の個体を選抜し、体重および血糖値が群毎にほぼ等しくなるように3匹ずつ群分けし、実験に供した(表1)。本実験に用いた化合物A(5-[4-(6-メトキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イルメトキシ)ベンジル]チアゾリジン-2,4-ジオンの塩酸塩)は粉末の餌(F2:船橋農場製)に0.003%(薬剤重量/餌重量)の濃度で添加することによって食餌と一緒に投与した(混餌投与)。なお、コントロール群では化合物Aを添加しない食餌を与えた。

10

【0235】

【表1】

群	①	②	③	④	⑤	⑥
化合物A投与	—	+	—	+	—	+
日数	1日	1日	3日	3日	8日	8日

20

2) 薬剤投与及び皮下白色脂肪組織の採取

群分けの日を0日とし、化合物Aの投与を開始した。化合物Aの投与開始日を0日とし、1日後、3日後、8日後の午前中に体重を測定し、尾静脈よりヘパリン処理済みヘマトクリット管2本分およびEDTA処理したヘマトクリット管1本分を採血し、遠心により血漿を分離し、血漿中の血糖値、インスリン濃度、トリグリセライド濃度および遊離脂肪酸濃度を測定した。血糖値はグルコローダーGXT(A&T社製)、インスリン濃度はRat Insulin RIA キット(Linco Research Inc. (米国)製)、トリグリセライド濃度はトリグリセライドE-テストワコー(和光純薬社製)そして遊離脂肪酸濃度はNEFA C-テストワコー(和光純薬社製)を用いて測定を行った。同じ日の午後に断頭によってと殺し、皮下白色脂肪組織(subcutaneous white adipose tissue)を採取し、液体窒素により凍結した。なお、採血日の前日から当日にかけて体重と摂餌量を測定し、各個体における薬物投与量を計算した。化合物Aを投与しなかった群についても同様に行なった(表2)。

30

【0236】

表中、“pre”で示す値は、群分けの日(0日)における血漿中の血糖値、インスリン濃度およびトリグリセライド濃度を表し、“Day 1”、“Day 3”、“Day 8”で示す値は、それぞれ実験開始から1日、3日、8日後の血漿中の血糖値、インスリン濃度、トリグリセライド濃度および遊離脂肪酸濃度を表す。

40

【0237】

表2に示すように、化合物A非投与群では、実験開始1日後、3日後、8日後を通じて血漿中の血糖値、インスリン濃度、トリグリセライド濃度および遊離脂肪酸濃度の変動はほとんど無く、いずれも高値を示していた。これに対し化合物A投与群では、血糖値および血漿中トリグリセライド濃度は非投与群と比較して投与1日後では有意な差は認められなかったが、投与3日後、8日後ではいずれも有意に低下していた。また血漿中インスリン濃度および遊離脂肪酸濃度は、非投与群と比較して投与1日後から低下傾向が認められ、

50

投与 3 日後、8 日後ではいずれも非投与群と比較して有意に低下していた。

【 0 2 3 8 】

【 表 2 】

血中グルコース (g/L)					
	化合物A非投与			化合物A投与	
	No	Pre	Day1	No	Pre Day1
Day 1	1.00	5.75	6.27	2.00	4.43 4.82
	5.00	4.85	6.17	4.00	5.93 6.16
	7.00	4.22	6.08	5.00	4.77 5.79
平均		4.94	6.17		5.04 5.59
標準偏差		0.77	0.10		0.79 0.69
	No	Pre	Day3	No	Pre Day3
Day 3	3.00	4.42	4.30	2.00	6.07 3.49
	4.00	5.32	7.29	3.00	5.76 2.99
	5.00	4.42	5.73	5.00	5.62 2.04
平均		4.72	5.77		5.82 2.84
標準偏差		0.52	1.50		0.23 0.74
	No	Pre	Day8	No	Pre Day8
Day 8	1.00	5.74	5.54	1.00	5.57 2.30
	2.00	6.79	6.29	3.00	5.16 2.28
	3.00	5.63	5.95	4.00	5.63 2.60
平均		6.05	5.93		5.45 2.39
標準偏差		0.64	0.38		0.26 0.18

血中インスリン (ng/mL)					
	化合物A非投与			化合物A投与	
	No	Pre	Day1	No	Pre Day1
Day 1	1.00	207	213	2	206 150
	5.00	158	153	4	169 118
	7.00	163	133	5	185 119
平均		176	166		186 129
標準偏差		26.8	41.3		18.6 18.1
	No	Pre	Day3	No	Pre Day3
Day 3	3.00	172	138	2	165 100
	4.00	155	158	3	285 106
	5.00	181	112	5	200 82
平均		169	136		217 96
標準偏差		13.0	22.9		61.5 12.1
	No	Pre	Day8	No	Pre Day8
Day 8	1.00	157	121	1	248 89
	2.00	216	206	3	155 106
	3.00	220	174	4	135 99
平均		197	167		180 98
標準偏差		35.3	43.0		60.4 8.3

【 0 2 3 9 】

実施例 2 . マウス脂肪組織からの全 R N A の抽出

K K マウスの皮下白色脂肪組織から全 R N A の抽出を行った。実施例 1 で得た皮下白色脂肪組織を、速やかに液体窒素内に入れ急速冷凍した後、使用時まで - 8 0 に保存した。

皮下白色脂肪組織 0 . 2 g に対し約 2 m L の T R I z o l 試薬 (インビトロジェン社製)

を加え、超高速ホモジナイザー（ポリトロン：キネマティカ社製）を用いて氷上でホモジナイズを行った（目盛6で1分間）。ホモジナイズした皮下白色脂肪組織を12000×g、4で10分間遠心した後、水層を新たなチューブに移し、0.2容量のクロロホルムを加え、15秒間激しく転倒混和した。室温で3分間静置してから、12000×g、4で15分間遠心した。遠心後、上層を回収し、0.8容量のリボヌクレアーゼ含まないイソプロピルアルコールを加えて混和した。室温で10分間静置後、12000×g、4で15分間遠心分離した後、上清を除去してリボヌクレアーゼを含まない70%エタノールを加え、12000×g、4で10分間遠心分離した。上清を除去して、沈殿を乾燥させることにより、全RNAを得た。この全RNA試料は、使用時まで-80に保存した。

10

【0240】

実施例3．遺伝子チップ解析

遺伝子チップ解析は、アフィメトリクス社の発現解析技術マニュアル（Expression Analysis Technical Manual）に従って、以下に記載した方法により行った。

【0241】

a) cDNAの合成

上記実施例2記載の方法で得られた全RNA各5μgから、mRNA精製キット（Oligotex-MAG mRNA Purification kit、タカラバイオ社製）を用いて添付のプロトコルに従ってmRNAを精製した。mRNAの出発材料として、上記アフィメトリクス社の発現解析技術マニュアルの記載に従ってcDNAの合成および精製を行った（ファーストストランド合成の反応条件は、42、1時間とした）。

20

【0242】

b) cRNAの合成

a)で得られたcDNAを鋳型として、アフィメトリクス社の発現解析技術マニュアルの記載に従ってcRNAの合成を行った（反応条件は37、4.5時間とした）。合成されたcRNAは各群▲1▼～▲6▼ごと（3匹分）に等量ずつ混合した。この操作で得られた10μgのcRNAを40mM Tris-Acetate（pH8.1）、100mM 酢酸カリウム、30mM 酢酸マグネシウム存在下94で35分間断片化し、プローブ溶液に加えた。

30

【0243】

c) プローブ溶液の作製

プローブ溶液に加える各種コントロールcRNA（GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit）はアマシャム・ファルマシア社から購入した。

【0244】

d) ハイブリダイゼーション

上記のようにして得られたプローブとハイブリダイズさせる遺伝子チップとして、アフィメトリクス社製マウスゲノムU74セット（Murine Genome U74 ver.2 Set：MG-U74Av2、MG-U74Bv2、MG-U74Cv2）を用いた。ハイブリダイゼーションとその後の洗浄操作は上記マニュアル記載に従って行った（ハイブリダイゼーション条件は、45、16-20時間とした。）。

40

【0245】

e) 解析

上記d)でハイブリダイゼーション操作を行った遺伝子チップのデータ解析は、上記マニュアルの記載に従って、GeneChip Microarray Suite 5.0（アフィメトリクス社）にて行った。化合物A非投与マウスのデータを基準にして、化合物A投与マウスより得られたデータと比較検討した。その結果、MG-U74Bv2遺伝子チップにおいて下記の表3に示すように、107948_atというESTのSignal Log Ratio値が、化合物A投与マウスでは化合物A非投与マウスと

50

比較して投与後1日、3日、8日のいずれにおいても上昇していた。また、Changeも投与後1日、3日、8日のいずれにおいてもI (Increase)を示していた。ここで示す“Signal Log Ratio”値は化合物A非投与マウスを基準とした化合物A投与マウスの相対的発現量を2を底とするLogで表し、例えばある遺伝子のSignal Log Ratio値が3のとき、その遺伝子は化合物A投与マウスにおいて化合物A非投与マウスの2の3乗、つまり8倍多く発現していることを示す。また“Change”は、化合物A非投与マウスと比較して、化合物A投与マウスにおける発現量が有意に変動しているかどうかを表しており、例えばある遺伝子のChangeがI (Increase)のとき、その遺伝子は化合物A投与マウスにおいて化合物A非投与マウスより有意に発現が亢進していることを示す。表3では、投与後1日、3日、8日後のsignal Log Ratio値及びChangeを示す。 10

【0246】

107948__atのヌクレオチド配列は配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1から527に示す。

【0247】

【表3】

投与後日数	1日	2日	8日
シグナル・ログ・レシオ (signal log ratio)	0.6	1.0	1.4
チェンジ (change)	I	I	I

20

実施例4. 5'RACEによるcDNA配列の決定

30

a) 5'RACE PCR反応

実施例3のa)で得られたcDNAを用いて、MG-U74Bの107948__atというESTの5'cDNA配列を決定するため、以下のヌクレオチド配列：

5'-tggttccttgaggcccttcagcatctcttcctc-3'(R10L255：配列表の配列番号2)

5'-ctagtgagtgaggccagggcaccatgaa-3'(R10L419：配列表の配列番号3)

からなるオリゴヌクレオチドを合成し、5'RACEを行なった。

【0248】

5'RACEは、クロンテック社のSMART RACE cDNA Amplification Kitを用い、添付のマニュアルに従って行った。 40

【0249】

PCR反応は、まず94で5分加熱した後、引き続き94で5秒、72で3分の温度サイクルを5回繰り返し、次に94で5秒、70で10秒、72で3分の温度サイクルを35回繰り返し、最後に72で7分間保温してから、4に保存した。反応には、ジーンアンプPCRシステム9700(アプライドバイオシステムズ社製)を使用した。反応物は1.2%のアガロースゲルで電気泳動して、特異的断片の増幅を解析した。特異的断片の増幅が確認された反応物は、再度1.2%のアガロースゲルで電気泳動し、電気泳動後のゲルをSYBRGold nucleic acid gel stain (Molecular Probes社製)で染色した後、紫外線照射下で特異的断片部分のゲル片を剃刀刃で切り出した。アガロースゲルより切り出した断片を、QIAqui 50

ck Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。

【0250】

b) TAクローニング

上記a)により増幅・精製された特異的断片を含む溶液30 μ l中4 μ lをとり、TOPOTA Cloning Kit for Sequencing (インビトロジェン社製)をその添付プロトコールに従って用い、増幅されたDNA断片をプラスミドベクターにクローニングした。この組換えプラスミドベクターで大腸菌を形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、1.2mlの50 μ g/mlのアンピシリンを含む液体TBG培地で37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、Bio Robot 9600 (QIAGEN社製)を用いてQIAprep 96 turbo Miniprep Kit (QIAGEN社製)をその添付プロトコールに従って用いることによりプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAについてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製)をその添付プロトコールに従って用いることによりシーケンス反応を行った。反応にはGeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を使用した。シーケンス反応物をABI PRISM 3700 DNA Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社製)によりヌクレオチド配列解析を行い、107948__atの5'側上流のヌクレオチド配列を決定した(配列表の配列番号4)。cDNAは、2950塩基から成り、メチオニンで始まる459個のアミノ酸から成るオープン・リーディング・フレーム(ORF)を持つことが明らかとなった。また、ORFにコードされているアミノ酸配列について、GenBankのアミノ酸データベース、TrEMBL、およびGeneSeqプロテインデータベースを検索したところ、新規なポリペプチドをコードすることが明らかとなった。

10

20

【0251】

また、ORFに相当するヌクレオチド配列について、GenBankのマウスdraft genome sequenceデータベースを検索したところ、Mus musculus chromosome 11 clone RP23-179C3 マップ 11 (登録番号AC022780.17)内の2箇所(13866-13009、10749-10224)に分かれて、ORFに相当するヌクレオチド配列の全長と一致する配列が存在した。

30

【0252】

実施例5. マウスcDNAのクローニング

「実施例2. マウス脂肪組織からの全RNAの抽出」の項に記載の方法で得られた全RNAを出発材料として、下記の方法に従って「実施例4. 5' RACEによるcDNA配列の決定」の項で同定された、配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列を有するcDNAを取得した。

【0253】

a) ファーストストランドcDNA合成

ファーストストランドcDNAは、先に示したようにして調製した全RNA6 μ gを基にして、First-strand cDNA Synthesis Kit (アマシャム・ファルマシア社)をその添付プロトコールに従って用いることにより合成した。反応は40 μ lの容量で行なった。反応後、CHROMA SPIN 100 Columns (クロンテック社製)をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。

【0254】

b) PCR反応

以下のヌクレオチド配列：

5' - ggactgtccctgccaggcccat - 3' (R10F：配列表の配列番号

40

50

6)、

5' - g c c t c a c c t g g t g t a t g a a c g c t - 3' (R10B2:配列表の配列番号7)を有するオリゴヌクレオチドを合成した。ヌクレオチド配列は、実施例3で得られたヌクレオチド配列の結果をもとにして決定した。

【0255】

PCR反応はPLATINUM Pfx DNA Polymerase (インビトロジェン社製)を添付のプロトコールに従って用いることにより行った。具体的に以下に示す。得られたファーストストランドcDNA 1 μ lに、上記の合成プライマーR10Fと合成プライマーR10B2それぞれ0.3 μ M、10X Pfx Amplification Buffer 5 μ l、dATP 0.3mM、dGTP 0.3mM、dCTP 0.3mM、dTTP 0.3mM、MgSO₄ 1mM、PLATINUM Pfx DNA Polymerase 2.5 Units (全てキットに添付)を添加し、50 μ lのPCR溶液を作製した。PCR反応は、Peltier Thermal Cycler, PTC-200 DNA Engine (エムジェイジャパン(株)社製)により行った。まず94 で5分加熱した後、引き続き94 で15秒、60 で30秒、72 で1分30秒の温度サイクルを40回繰り返し、最後に72 で7分間保温してから、4 に保存した。目的cDNAは、反応物を1%のアガロースゲルで電気泳動し、目的cDNA (1402bp)の増幅を確認後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。目的cDNAの濃度は、吸光光度計 (Gene Spec I:日立計測器サービス(株))により測定した。

【0256】

c) TAクローニング

PLATINUM Pfx DNA Polymeraseにより増幅したcDNA断片は平滑末端であるので、TAクローニングするために、上記b)にて精製したcDNAの3'末端にdATPの付加を行なった。精製したcDNA 180ngに、10X PCR Buffer 1 μ l、MgCl₂ 1.5mM、recombinant Taq DNA Polymerase 2.5 Units (全てインビトロジェン社製、recombinant Taq DNA Polymeraseに添付)、dATP 0.2Mを添加し、10 μ lの反応液を作製した。反応液をPeltier Thermal Cycler, PTC-200 DNA Engine (エムジェイジャパン(株)社製)にて、70 で30分反応させた後、CHROMA SPIN 100 Columns (クロンテック社製)を添付のプロトコールに従って用いることによりcDNAを精製した。精製したcDNAを、pTARGET Mammalian Expression Vector System (プロメガ(Promega)社製)をその添付プロトコールに従って用いて、pTARGET Vector (プロメガ社製)にクローニングした。この組換えプラスミドベクターで大腸菌(JM109:タカラバイオ(株)社製)を形質転換し、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、2mlの50 μ g/mlのアンピシリンを含む液体LB培地で37 で一晩培養し、常法に準じてプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAについてABI PRISM 3700 DNA Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社製)によりヌクレオチド配列解析を行ない、上記実施例4で同定された配列表の配列番号4に示されるヌクレオチド配列のORFを有するcDNAがpTARGET Mammalian Expression Vectorに組み込まれていることを確認した。このプラスミドをpTARGET-R10と命名した。pTARGET-R10は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成14年(2002年)4月5日付で受託番号FERMBP-8005で国際寄託されている。

【0257】

実施例6. ヒトホモログの探索

配列表の配列番号5に示されるマウスポリペプチドに対応するヒトcDNAを取得するため、配列表の配列番号5に示されるアミノ酸配列について、GenBankのアミノ酸データベース、TrEMBL、およびGeneSeqプロテインデータベースを検索したところ、GenBankアミノ酸データベース上のsimilar to Unknown (protein for IMAGE: 4537124) (アクセッション番号: XP_057674、バージョン: XP_057674.2)と86%のホモロジーを有していることがわかった(図1)。ヒトホモログのcDNAのヌクレオチド配列は配列表の配列番号8に示されており、また、アミノ酸配列は配列表の配列番号9に示されている。

【0258】

実施例7. db/dbマウスへのtroglitazone投与時の遺伝子チップ解析
a) db/dbマウスへの薬剤投与および血液生化学値測定 10

6週齢の雄性C57BL/KsJ-db/dbJclマウス(以下、「db/dbマウス」とする。)およびC57BL/KsJ-db/+mJclマウス(以下、「db/+mマウス」とする。)(日本クレア社より購入)を、温度 23 ± 3 、湿度 55 ± 15 %に設定された動物室に搬入し、マウス用ブラケットケージ(有限会社新東洋製作所製)に個体収容した。マウスには粉末飼料(F2:株式会社船橋農場)と水道水を自由に摂取させ、5日間環境に馴化させた後、トログリタゾン(三共製)の投与を開始した。トログリタゾンを1%の濃度で粉末飼料(F2:株式会社船橋農場)に添加し、3箇月間自由に摂取させた。なお、対照群にはトログリタゾン非添加の粉末飼料を与えた。

【0259】

なお、db/dbマウスは、投与前日に尿検査試験紙(マルティスティックス:バイエルメディカル株式会社)により尿糖を検査し、糖尿病を誘発($\pm \sim 3+$)していることを確認した。群分けは投与前日に実施し、db/dbマウスは、群間で体重値および尿糖グレードの平均が近似するよう振り分けた。また、db/+mマウスは、群間で体重値の平均が近似するよう振り分けた。各群5匹で実験を行った。以下に群構成を示す(表4)

【0260】

【表4】

マウスの種類

db/dbマウス 添加濃度 (%)	0	1.0
個体名	01M06-01M10	03M06-03M10

db/+mマウス 添加濃度 (%)	0
個体名	04M06-04M10

b) 血液化学的検査

3箇月間の投与後に、エーテル麻酔下で大静脈より採血した。採取した血液は、ヘパリンリチウム入りの血漿分離用サンプル管(マイクロテイナ:日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)に注入した。遠心分離(3000rpm 、15分、4)後、血漿を分取し、自動分析装置(TBA-200FR:東芝メディカル株式会社)で酵素法によりグルコース濃度を測定した(表5)。また、トリグリセライド濃度はトリグリセライドE-テストワコー(和光純薬社製)を用いて測定した。

【0261】

表5に示すように、トログリタゾン非投与db/db群では、正常コントロールマウスであるdb/+m群と比較して、血糖値および血漿中トリグリセライド濃度の著しい上昇がみられ明らかに高血糖、高脂血症を呈する。これに対し、トログリタゾン投与db/db

群では、トログリタゾン非投与の d b / d b 群に認められた血糖値および血漿中トリグリセライド濃度の顕著な上昇が抑制され、ほぼ d b / + m 群と同等の血糖値および血漿中トリグリセライド濃度を示した。

【 0 2 6 2 】

【 表 5 】

db/db	
%	血中グルコース g/L
個体番号	
01M06	12.18
01M07	11.94
01M08	12.52
01M09	11.50
01M10	12.28
平均	12.08
標準偏差	0.39
トログリタゾン	
1.0%	
03M06	1.76
03M07	3.09
03M08	2.10
03M09	N.D.
03M10	2.65
平均	2.40
標準偏差	0.59
N.D.: データなし	

db/+m	
%	血中グルコース g/L
個体番号	
04M06	3
04M07	3
04M08	2
04M09	3
04M10	2
平均	2.4
標準偏差	0.3

【 0 2 6 3 】

c) マウス脂肪組織からの全 R N A の抽出

上記 b) で採血したマウスより、精巣周囲の脂肪組織を採取し、液体窒素により速やかに凍結し、使用時まで - 8 0 に保存した。各群 5 匹の脂肪組織を群ごとに一つにまとめ、臓器 1 g に対し約 1 0 m l の T R I z o l 試薬 (インビトロジェン社製) を加え、超高速ホモジナイザー (ポリトロン、キネマティカ社製) を用いて氷上でホモジナイズを行った (目盛 6 で 1 分間)。1 2 0 0 0 x g、4 で 1 0 分間遠心分離した後、水層を新たなチューブに移し、0 . 2 容量のクロロホルムを加え、1 5 秒間激しく転倒混和した。室温で 3 分間静置してから、1 2 0 0 0 x g、4 で 1 5 分間遠心分離した。遠心後、上層を回

10

20

30

40

50

収し、0.8容量のリボヌクレアーゼを含有しないイソプロピルアルコールを加えて混和した。これを室温で10分間静置後、12000×g、4℃で15分間遠心分離した後、上清を除去してリボヌクレアーゼを含まない70%エタノールを加えた。これを12000×g、4℃で10分間遠心分離し、上清を除去して、沈殿を乾燥させることにより、全RNAを得た。この全RNA試料は、使用時まで-80℃に保存した。

【0264】

d) 遺伝子チップ解析

遺伝子チップ解析は、アフィメトリクス社の発現解析技術マニュアル(Expressi on Analysis Technical Manual)に従って、以下に記載した方法により行った。

10

【0265】

1. cDNAの合成

上記実施例b)記載の方法で得られた各5μgの全RNAを出発材料として、上記マニュアル記載に従ってcDNAの合成および精製を行った(ファーストストランド合成の反応条件は、42℃、1時間とした)。

【0266】

2. cRNAの合成

上記のようにして得られたcDNAを鋳型として、上記マニュアルの記載に従ってcRNAの合成を行った。得られたcRNAを各群ごとに10μg断片化してプローブ溶液に加えた。

20

【0267】

3. プローブ溶液の作製

プローブ溶液に加える各種コントロールcRNA(GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit)はアマシャム・ファルマシア社から購入した。

【0268】

4. ハイブリダイゼーション

上記のようにして得られたプローブとハイブリダイズさせる遺伝子チップとして、アフィメトリクス社製マウスゲノムU74セット(Murine Genome U74 ver. 2 Set: MG-U74Av2、MG-U74Bv2、MG-U74Cv2)を用いた。ハイブリダイゼーションとその後の洗浄操作は上記マニュアル記載に従って行った(ハイブリダイゼーション条件は、45℃、16-20時間とした)。

30

【0269】

5. 解析

上記4.でハイブリダイゼーション操作を行った遺伝子チップのデータ解析も、上記マニュアルの記載に従って、GeneChip Microarray Suite 4.0(アフィメトリクス社)にて行った。まず、db/+mマウスのデータを基準にして、db/dbマウスより得られたデータと比較検討したところ、MG-U74B遺伝子チップの107948__atが示すヌクレオチド配列(配列表の配列番号1)のFold Change値は-2.6であった。ここで示す「Fold Change」値はdb/+mマウスを基準としたdb/dbマウスの相対的発現量を表し、例えばA遺伝子およびB遺伝子のFold Change値がそれぞれ-3および3のとき、db/dbマウスにおけるA遺伝子およびB遺伝子の発現はそれぞれ、db/+mマウスの3分の1および3倍となっていることを示す。従って、MG-U74B遺伝子チップの107948__atが示す配列は、db/dbマウスにおいてdb/+mマウスの2.6分の1に発現が抑制されていた。次にトログリタゾン非投与db/dbマウスのデータを基準にして、トログリタゾン投与db/dbマウスより得られたデータと比較検討した。その結果、MG-U74B遺伝子チップの107948__atが示す配列(配列表の配列番号1)のFold Change値は3.5であった。従って、MG-U74B遺伝子チップの107948__atが示す配列は、トログリタゾン投与db/dbマウスにおいてトログリタゾン非

40

50

投与db/dbマウスの3.5倍発現が増加していた。

【0270】

実施例8. In vitro translation法によるマウスポリペプチドの発現および精製

In vitro translation法によるマウスポリペプチドの発現は、ラピッド・トランスレーション・システム(Rapid Translation System)(RTS:ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて行った。発現プラスミド、pTARGET-R10より当該遺伝子のORFをコードするcDNA配列を制限酵素BamHIおよびSalI(いずれもタカラバイオ社製)による消化で切り出して末端をT4 DNA polymerase(インビトロジェン社製)を用いて平滑化した。このDNA断片をRTS専用発現ベクター、pIVEX-2.4c(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)のSmaIサイトへ読み枠が一致するように組み込み、RTS用発現ベクターとした。得られたプラスミドDNAについてABI PRISM 3700 DNA Analyzer(アプライド・バイオシステムズ社製)によりヌクレオチド配列解析を行ない、上記実施例4で同定された配列表の配列番号4に示されるヌクレオチド配列からなるORFを有するcDNAが、その5'上流側のベクター配列中に存在するポリヒスチジンタグ配列と同じ読み枠でpIVEX-2.4cに組み込まれていることを確認した。作製したプラスミドを用いて大腸菌、JM109(タカラバイオ製)を形質転換し、得られた形質転換体を大量培養した後、Wizard Purefection Plasmid Purification システム(プロメガ社製)を用いてプラスミドを大量調製した。

【0271】

発現はRTS500 E. coli HY キット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用い、添付のマニュアルに従って行った。反応槽中には、精製した上記プラスミドDNAを15μg、1mg/ml protein disulfide isomeraseを100μl、1mg/ml GroESを50μl、5mg/ml GroELを10μl(以上、タカラバイオ製)、100mM還元型グルタチオンを20μl、100mM酸化型グルタチオンを2μl(いずれもSigma社製)に加え、全量を1mlとした。供給槽中には、100mM還元型グルタチオンを200μl、100mM酸化型グルタチオンを20μl(いずれもSigma社製)に加え、全量を10mlとした。反応は30分、付属のマグネット式スターラーの回転数120rpmの条件で20時間行った。

【0272】

発現させたタンパク質はマウスポリペプチドに融合させたポリヒスチジンタグを利用し、Mag-Extractor His-タグ(東洋紡製)を用いて精製した。反応槽より反応液を回収し、12000rpm、10分間の遠心にて不溶物を除去し、回収された上清に400μlの磁性ビーズを加え、室温で30分間振盪し、タンパク質を吸着させた。磁性ビーズを磁石を用いて回収し、300mM塩化ナトリウム、20mMイミダゾール、0.1% 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate(CHAPS)を含む溶出液5mlで2回洗浄した。洗浄したビーズに200mMイミダゾール、0.1% CHAPSを含む溶出液2mlを加えて室温で10分間振盪した後、磁石を用いてビーズを回収し、目的のポリペプチドを含む上清を得た。得られたポリペプチドはSDS-PAGEにて展開した後、SYPRO Ruby protein gel Stain(Molecular Probes社製)を用いた染色により精製度を確認した。その後CENTRIFCON YM-30(Millipore社製)を用いて5000xg、1.5時間の遠心操作で濃縮し、1mg/ml程度の目的とするマウスポリペプチド溶液を得た。

【0273】

実施例9. 組換えアデノウイルスの作製

配列表の配列番号4のヌクレオチド番号79から1455に示されるヌクレオチド配列が

らなるマウス由来の cDNA (以下、「マウス R10 cDNA」とする。)を強制発現させるための組換えアデノウイルスは、市販のキット(アデノウイルス・エクスプレッション・ベクター・キット、タカラバイオ社製)を用いて作製した。すなわち、上記実施例 5 で得られたプラスミド DNA を鋳型とし、クローニングしたプラスミドベクター、pTARGE T の SV40 poly A シグナル配列とともにマウス R10 cDNA を増幅する PCR プライマーとして下記のヌクレオチド配列

5' - a t c c t t g c t a g c c t c g a g a c - 3' (R10 graft F : 配列表の配列番号 11) 及び

5' - t c c g g a a t c g a t c c t t a t c g - 3' (SV40 poly A 3' : 配列表の配列番号 10)

を有するオリゴヌクレオチドを合成し、アデノウイルスベクターへのマウス R10 cDNA クローニング用プライマーとした。PCR 反応には PLATINUM Pfx DNA Polymerase (インビトロジェン社製)を添付のプロトコールに従って用い、反応条件は実施例 5 に準じた。PCR 反応によって得られた約 1.9 kbp の DNA 断片の末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(タカラバイオ社製)を用いてリン酸化したものを挿入 DNA 断片として以下の操作に用いた。

【0274】

アデノウイルスベクターにおいて、ヒトエロンゲーションファクター 1 α プロモーターにより挿入 DNA が発現されるように、キット付属のコスミドベクター、pAxCw の S w a I サイトにヒトエロンゲーションファクター 1 α プロモーター配列を導入した。具体的には、ヒトエロンゲーションファクター 1 α プロモーター配列を含む DNA 断片を、pEF4 / Myc - His A (インビトロジェン社製)を鋳型とし、PCR 増幅用プライマーとして以下の配列、

5' - c t a g g t c t t g a a a g g a g t g c - 3' (EF1a 5' : 配列表の配列番号 12)

及び

5' - g c c a t t t a a a t c c t c a c g a c a c c t g a a a t g g a a g - 3' (EF1a 3' S w a : 配列表の配列番号 13)

を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これらプライマー及び PLATINUM Pfx DNA Polymerase (インビトロジェン社製)を用いて PCR 反応を行い、プライマー配列により導入された S w a I サイトを含む目的の DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を DNA ligation kit ver. 1 (タカラバイオ製)を用いてコスミドベクター pAxCw の S w a I サイトに導入し、コスミドベクター pAxEF を作成した。pAxEF の制限酵素 S w a I 認識部位(プライマー配列由来)に上記プライマー(R10 graft F と SV40 poly A 3')を用いて PCR 反応により増幅したマウス R10 cDNA の DNA 断片を DNA ligation kit ver. 1 (タカラバイオ製)を用いて挿入し、コスミド pAxEF - R10 を作製した。pAxCw - R10 DNA 若しくは対照用として発現遺伝子を導入していない pAxEF DNA および末端タンパク質結合ウイルス DNA (DNA - TPC、アデノウイルス・エクスプレッション・ベクター・キットに添付)をリン酸カルシウムトランスフェクションシステム(アマシャム・ファルマシア社製)を用いて、ヒト胎児腎臓由来 293 細胞(ATCC : CRL 1573)にコ・トランスフェクションして組換えアデノウイルスを単離し、さらに 293 細胞中で増幅させた。増幅させたウイルスの 293 細胞からの回収は、まずウイルス感染 293 細胞に 30 秒 × 4 回の超音波処理(ブランソン社製 B - 1200 を使用)を行い、次いで 4 M 塩化セシウム / 10 mM HEPES 緩衝液(pH 7.5) 10 ml を下層、2.2 M 塩化セシウム / 10 mM HEPES 緩衝液(pH 7.5) 5 ml を上層とした溶液をクッションとし、細胞破碎液 20 ml を重層し、スイング式ローター SW28 (ベックマン(Beckman)社製)を用いて密度勾配遠心分離を 25,000 rpm、4、2 時間の条件で行い、塩化セシウム溶液の 2 層の中間に現れるウイルス由来のバンドを回収した。この粗精製ウイルス液に等量の飽和塩化セシウム溶液を加え

10

20

30

40

50

、この混合液を最下層として4 M塩化セシウム / 10 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 2 ml、2.2 M塩化セシウム / 10 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 4 mlの順に重層し、スイング式ローターSW41Ti (ベックマン社製) を用いて密度勾配遠心分離を35,000 rpm、4、3時間の条件で行い、4 M - 2.2 M塩化セシウム溶液の中間に現れるウイルス由来のバンドを回収した。得られたウイルス液を、10%グリセロールを添加したPBSに対して4で2回透析した後、使用するまで-70以下で凍結保存した。本実験で得られたマウスR-10 cDNAを保持する組換えアデノウイルスをAd-R10と命名した。また、マウスR-10 cDNAを保持しないコントロールのアデノウイルスをAd/emptyと命名した。

【0275】

実施例10. 組換えアデノウイルスを用いたイン・ビボ (in vivo) での発現
上記のようにして精製された組換えアデノウイルスAd-R10またはAd/emptyを、 5×10^8 pfu/bodyとなるように生理食塩水で希釈し、それぞれ4匹の20週齢の雄KK/Taマウス (日本クレア社より購入) に200 μ lずつ尾静脈注射により接種した。接種3、7、14、21日後に各マウスの尾静脈よりヘパリン処理ヘマトクリット管で採血して、卓上遠心機で5200 rpmで15分、2回遠心して血漿を分離し、グルコース測定用キット (グルコースCII-テストワコー、和光純薬社製) を用いて血糖値を、インスリン測定キット (森永生化学研究所製) を用いて血中インスリン値を、トランスアミナーゼ測定用キット (トランスアミナーゼCII-テストワコー、和光純薬社製) を用いて血中ALT値 (アラニン・アミノ・トランスフェラーゼ値) をそれぞれ測定した。その結果、Ad/empty接種マウス群では血中の各測定値にコントロールと比較して有意な差が認められなかったのに対し、Ad/R10接種マウス群には血糖値、血中インスリン値に低下傾向が認められた。その際、体重変化は群間に大きな差を認めず、肝機能障害の指標となる血中ALT値は全く上昇を示さなかったことから、マウスR10 cDNA発現によるKK/Taマウスの血糖値、血中インスリン値の低下は毒性によるものではない事が明らかとなり、R10ポリペプチドは血中グルコース濃度低下作用及び血中インスリン濃度低下作用を有することが明らかとなった。(図2)。

【0276】

実施例11. TaqMan PCR法によるmRNA発現量の定量

「実施例2. マウス脂肪組織からの全RNAの抽出」の項に記載の方法で得られた全RNAを出発材料として、配列表の配列番号4に示されるヌクレオチド配列を有するmRNA (以後R10 mRNAという) の発現量の変化を、下記の方法に従ってTaqMan PCR法を用いて解析した。

【0277】

ファーストストランドcDNAは、先に示したようにして調製した全RNA 5 μ gをもとにして、First-strand cDNA Synthesis Kit (アマシャム・ファルマシア社) をその添付プロトコールに従って用いることにより合成した。反応は40 μ lの容量で行なった。反応後、CHROMA SPIN 100 Columns (クロンテック社製) をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。各精製溶液を20 μ lずつに分け、一方はそのまま全てのサンプルを混合し検量線作成用一本鎖cDNA溶液の原液とし、もう一方は各サンプルに純水180 μ lを加えて5倍希釈を行い発現定量用サンプルとした。

【0278】

R10 mRNA発現定量用TaqMan PCRの反応に用いるプライマーとして、以下の配列:

5' - a c a c c g g c a a g c t c t t c a g - 3' (配列表の配列番号14)

及び、

5' - a a c t c t t g g t g t g a c a g a a c a g g - 3' (配列表の配列番号15)

を有するオリゴヌクレオチド (oligoExpress, アマシャム・ファルマシア

10

20

30

40

50

社製)を、プローブとして、配列:

5' - a g t g g c t c c c t g c g a g a g t t t g a g g - 3' (配列表の配列番号16)

を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTAMRAを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を合成した。また発現量の補正のためにマウスβ-アクチンの定量を行うこととし、同様にプライマーとして、配列:

5' - g g c g c t t t t g a c t c a g g a t t t - 3' (配列表の配列番号17)

及び、

5' - g g a t g t t t g c t c c a a c c a a c t - 3' (配列表の配列番号18)

を有するオリゴヌクレオチド(oligoExpress, アマシャム・ファルマシア社製)を、プローブとして、配列:

5' - a a a a c t g g a a c g g t g a a g g c g a c a g - 3' (配列表の配列番号19)

を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTAMRAを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を合成した。

【0279】

これら調製した試料を用いてTaqMan PCR法によるR10 mRNA発現量の定量を行った。PCR反応はMicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (アプライドバイオシステムズジャパン社製)上で行った。反応溶液の組成は1ウェル中、調製したTaqMan PCR用ファーストストランドcDNA溶液5μl, TaqMan PCR用プライマー(50pmol/μl)を正方向側、逆方向側ともに0.1μl(最終濃度100nM), TaqMan PCR用プローブ(7.8μM) 1.5μl(最終濃度234nM), PCR増幅用混合液(TaqMan universal PCR master mix: アプライドバイオシステムズジャパン社製)25μl、超純水18.3μlとした。この際、検量線作成用一本鎖cDNA溶液は原液濃度を便宜的に625とし、以降5倍希釈を繰り返して濃度625, 125, 25, 5, 1の5段階の希釈系列を作製した。PCR反応はTaqMan PCR専用サーマルサイクラー・検出器(ABI 7700: アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いて行った。反応は、50℃で2分間、95℃で10分間保温の後、95℃で15秒間、60℃で1分間の反応を40回繰り返し、1サイクル毎にレポーター色素の発光量を測定した。各サイクル毎のレポーター色素の発光量からβ-アクチンおよびR10の増幅曲線を作成した。検量線作成用一本鎖cDNA溶液の希釈系列の増幅曲線から横軸に濃度、縦軸にサイクル数をとった検量線を作成し、各発現定量用サンプルについてはその対数増幅期において任意に設定した一定の発光量を超えたサイクル数を検量線上にプロットし、相対的な発現量を算出した。R10 mRNAの発現量は同一サンプルにおけるβ-アクチンの発現量の値で補正を行った。

【0280】

その結果、化合物Aを混餌投与されたKKマウスの脂肪組織では、コントロール群と比較し投与後1日目よりR10 mRNA発現量が亢進し、その傾向は投与後7日目まで継続した(図3)。KKマウスの血糖値は化合物A投与後1日目ではコントロール群と比較して差は無く、3日目より有意な低下が確認されることから、R10 mRNA発現はKKマウスの糖尿病改善に先行する形で誘導されていることが示された。

【0281】

実施例12. ヒトホモログcDNAのクローニング

ヒト脂肪組織の全RNA(BioChain社製)を出発材料として、下記の方法に従って「実施例6. ヒトホモログの探索」の項で同定された、配列表の配列番号8に示されるヌクレオチド配列のORF(配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列)を有するcDNAを取得した。

10

20

30

40

50

a) ファーストストランド cDNA 合成

ファーストストランド cDNA は、SUPER SCRIPT II RNase H Reverse Transcriptase (インビトロジェン社) を添付のプロトコールに従って用いることにより合成した。すなわち、先に示した全 RNA 1.25 µg をもとにしてプライマ - p (dT) 15 cDNA 合成用 (Roche Diagnostic 社製) 1 µg を、DNase and RNase free water (Sigma 社製) に溶解し 15 µl とし、70 °C で 10 分インキュベートする。その後氷上に移して急冷し、5 分間静置した後に 5x first strand buffer (SUPER SCRIPT II に添付) 5 µl、100 mM DTT (SUPER SCRIPT II に添付) 2.5 µl、25 mM dNTPs (25 mM each dATP、dCTP、dGTP、dTTP) (Invitrogen 社製) 1 µl、40 units/µl RNase inhibitor (Toyobo 社製) 0.5 µl、200 units/µl SUPER SCRIPT II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen 社製) 1 µl を加え 25 µl の反応溶液を作製した。42 °C で 90 分、70 °C で 10 分インキュベートした後、DNase and RNase free water を加え全量を 50 µl とし、これを first strand cDNA 溶液とした。

【0282】

b) PCR 反応

以下のヌクレオチド配列：

5' - ctctccagccttcgcccatgcc - 3' (Human R10-1：配列表の配列番号 20)、

5' - ctccaggccaggctctctcaccctt - 3' (Human R10-2：配列表の配列番号 21)

を有する 5' 末端がリン酸化されているオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、実施例 6 で得られたヌクレオチド配列の結果をもとにして決定した。

【0283】

PCR 反応は PLATINUM Pfx DNA Polymerase (INVITROGEN 社製) をその添付プロトコールに従って用いることにより行った。具体的に以下に示す。得られたファーストストランド cDNA 0.5 µl に、10X Pfx Amplification Buffer 5 µl、dATP 0.3 mM、dGTP 0.3 mM、dCTP 0.3 mM、dTTP 0.3 mM、MgSO₄ 1 mM、PLATINUM Pfx DNA Polymerase 2.5 Units (全てキットに添付) および上記の合成プライマー 2 種類をそれぞれ 0.3 mM になるように添加し、50 µl の PCR 溶液を作製した。PCR 反応は、Peltier Thermal Cycler, PTC-200 DNA Engine (エムジェイジャパン (株) 社製) により行った。まず 94 °C で 5 分加熱した後、引き続き 94 °C で 15 秒、60 °C で 30 秒、70 °C で 3 分の温度サイクルを 35 回繰り返し、最後に 72 °C で 7 分間保温してから、4 °C に保存した。目的 cDNA は、反応物を 1% のアガロースゲルで電気泳動し目的 cDNA (1436 bp) の増幅を確認後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。目的 cDNA の濃度は、吸光光度計 (Gene Spec I：日立計測器サービス (株)) により測定した。

【0284】

c) クローニング

ベクターにはセルフライゲーションさせた pTARGET Mammalian Expression Vector (Promega 社製) を用いた。PLATINUM Pfx DNA Polymerase により増幅し精製した cDNA 断片を、制限酵素 Sma I で消化し脱リン酸化したベクター DNA (pTARGET Mammalian

Expression Vector)と混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)をその添付プロトコールに従って用いることによりクローニングした。この組換えプラスミドベクターで大腸菌(JM109:宝酒造(株)社製)を形質転換し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、 2ml の $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む液体LB培地で37℃で一晩培養し、常法に準じてプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAについてABI PRISM 3700 DNA Analyzer(Applied Biosystems社製)によりヌクレオチド配列解析を行ない、上記実施例6で示された配列表の配列番号8に示されるヌクレオチド配列のORFを有するcDNAがpTARGET Mammalian Expression Vectorに組み込まれていることを確認した(以後、pTARGET-HuR10と呼ぶ)。

10

【0285】

実施例13. ヒトホモログポリペプチドの発現

a) FLAGタグ付加型ヒトホモログcDNAのクローニング

R10のヒトホモログの発現をタンパク質レベルで確認するために、検出用タグとしてFLAGタグをR10のヒトホモログORF(配列表の配列番号8のヌクレオチド番号59から1462に示されるヌクレオチド配列)のC末端に付加したcDNAをクローニングした。クローニングは実施例12で得られたヒトホモログORF全長のうち、C末端からN末端に向かい約0.5kbpのところにあるBst XI部位からC末端側のベクター配列内にあるKpn I部位を、PCRで増幅後Bst XIで消化したFLAGタグ付き断片と置き換えることにより行なった。詳細を以下に示す。

20

【0286】

a) FLAGタグ付きC末端側断片の取得

以下のヌクレオチド配列:

5'-gtggtaggaccccttggtgttcg-3'(Human R10-3:配列表の配列番号22)、

5'-tcattcaccttatcgtcgtcatcccttgtaattcccttggtgtatgatcgcttccagttaaagat-3'(Human R10FLAG:配列表の配列番号23)

30

を有するオリゴヌクレオチドを合成した。このうちHuman R10FLAGオリゴヌクレオチドは5'末端がリン酸化されているオリゴヌクレオチドである。

【0287】

PCR反応はPLATINUM Pfx DNA Polymerase(INVITROGEN社製)をその添付プロトコールに従って用いることにより行なった。実施例12で得られたpTARGET-HuR10プラスミドDNA75ngに、10X Pfx Amplification Buffer $5\mu\text{l}$ 、dATP 0.3mM、dGTP 0.3mM、dCTP 0.3mM、dTTP 0.3mM、MgSO₄ 1mM、PLATINUM Pfx DNA Polymerase 2.5Units(全てキットに添付)および上記の合成プライマー2種類をそれぞれ0.3mMになるように添加し、 $50\mu\text{l}$ のPCR溶液を作製した。PCR反応は、Peltier Thermal Cycler, PTC-200 DNA Engine(エムジェイジャパン(株)社製)により行なった。まず94℃で5分加熱した後、引き続き94℃で15秒、58℃で30秒、70℃で1分30秒の温度サイクルを35回繰り返す、最後に72℃で7分間保温してから、4℃に保存した。反応物を1%のアガロースゲルで電気泳動することにより目的cDNAが増幅されていることを確認後、目的cDNA(1017bp)をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。精製したcDNAをBst XIにて消化した後、3%のアガロースゲルにて電気泳動し、目的cDNA(530bp)のみゲルより切り出し、QIAquick Gel Purification Kit(QIAGEN社製)をその添付プロトコールに従って

40

50

用いることにより精製した。目的 cDNA の濃度は、吸光光度計 (Gene Spec I : 日立計測器サービス (株)) により測定した。

【0288】

b) ベクターの調製およびライゲーション

実施例 12 で得られた pTARGET - HuR10 プラスミド DNA を制限酵素 Kpn I で消化後、DNA ブランディングキット (タカラバイオ社製) をその添付プロトコールに従い、0.6% アガロースゲルにて電気泳動後、目的とする pTARGET - HuR10 プラスミド DNA からヒトホモログ ORF の C 末端側約 0.5 kbp を欠失した断片 (約 6.6 kbp) のバンドのみ切り出し、QIAquick Gel Purification Kit (QIAGEN 社製) をその添付プロトコールに従って用いることにより精製した。

【0289】

精製したベクター cDNA を脱リン酸化処理後、上記「a」FLAG タグ付き C 末端側断片の取得」で得られた、PCR で増幅後 Bst X I で消化した FLAG タグ付き断片と混合し、DNA ライゲーションキット (タカラバイオ社製) をその添付プロトコールに従って用いることによりヒトホモログ ORF の C 末端に FLAG タグを付加した cDNA をクローニングした。この組換えプラスミドベクターで大腸菌 (JM109 : 宝酒造 (株) 社製) を形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、2 ml の 50 µg/ml のアンピシリンを含む液体 LB 培地で 37 °C で一晩培養し、常法に準じてプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミド DNA について ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems 社製) によりヌクレオチド配列解析を行ない、上記実施例 6 で示された配列表の配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列の ORF の C 末端に FLAG 配列を有する cDNA が pTARGET Mammalian Expression Vector に組み込まれていることを確認した (以後、本プラスミドを「pTARGET - HuR10 FLAG」と呼ぶ)。

【0290】

実施例 14 . HEK293 細胞での発現およびウエスタンブロット解析

プラスミド DNA の HEK293 細胞へのトランスフェクションはインビトロジェン (株) の遺伝子導入試薬「リポフェクトアミン 2000」を用いて行なった。HEK293 細胞は、コラーゲンコートされた 9 cm シャーレにて 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 6 ml 中で培養した。まず精製した pTARGET - HuR10 FLAG プラスミド DNA 9.6 µg を溶解した 0.6 ml の Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (インビトロジェン (株) 社製) と、36 µl のリポフェクトアミン 2000 を溶解した 0.6 ml の Opti-MEM I Reduced-Serum Medium とを混合した。20 分後、セミコンフルエントになるまで増殖した HEK293 細胞の入ったシャーレに、先に混合したプラスミド・リポフェクトアミン 2000 混合液を添加し、そのまま 37 °C、5% CO₂ 下で 2 日間培養した。

【0291】

このようにして得られた細胞を PBS (-) 緩衝液 2 ml で洗浄した後、RIPA 緩衝液 (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% デオキシコレートナトリウム塩、0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 500 µl を加えスクレイパーで溶解し回収した。この溶液を 4 °C で 10 分間保持した後、遠心分離により上清のみ回収し、これを細胞溶解液とした。SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) は、ニューページゲルシステム (インビトロジェン (株) 社製) をその添付のプロトコールに従って用いることにより行った。

【0292】

電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからバンドをニューページトランスファーバッファー (インビトロジェン (株) 社製) 中でゲルメンブレン転写装置 (トランスブロット SD

10

20

30

40

50

セミドライゲルトランスファーセル、バイオラッド社製)を用いて60分、2mA/cm²の条件でイミュン-ブロットPVDFメンブレン(バイオラッド社製)に転写した。

【0293】

転写後のPVDFメンブレンをタイトボックス((株)池田理化社製)に入れ、5%スキムミルク(雪印乳業(株)社製)を含む0.1% Tween 20-PBS 50ml中で4、一晩静置した。翌日メンブレンを取り出し、0.1% Tween 20-PBS中で、10分間×3回洗浄した。洗浄後、パラフィルム上でメンブレンを、ペルオキシダーゼ結合抗FLAG M2モノクローナル抗体(1000倍希釈)、1%スキムミルクを含む0.1% Tween 20-PBS 3mlに浸し1時間反応させた。1時間後、メンブレンを取り出し0.1% Tween 20-PBS溶液で10分間×3回洗浄した。洗浄後、メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLプラスウエスタンブロッティング検出溶液(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いて、抗FLAG抗体が結合するバンドの検出を行った(メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLプラスウエスタンブロッティング検出溶液に5分間浸した後、X線フィルムを感光させた(20秒間))。その結果、コントロールである緑色蛍光色素(GFP)発現プラスミドpQBI25(タカラバイオ(株)社製)DNAを導入して得られたHEK293細胞溶解液では認められない約50kDaのバンド(FLAGタグ付きR10ヒトホモログの予想サイズは52.7kDaである)が、pTARGET-HuR10プラスミドDNAを導入して得られたHEK293細胞溶解液にのみ検出された(図4)。以下、R10ヒトホモログを「HuR10」という。

10

20

【0294】

実施例15.3T3-L1脂肪細胞を用いた脂肪分解作用を指標とした機能解析

a) 3T3-L1細胞の培養および脂肪細胞への分化

3T3-L1細胞(ATCCより購入、ATCC No: CCL-173)は、10% FCS(PAA Laboratories社製:以下すべてこのFCSを使用)を含むDMEM基本培地[DMEM(インビトロジェン社製)、1×抗生物質-抗真菌剤(インビトロジェン社製)、33μM d-Biotin(シグマ社製)、200μM アスコルビン酸(シグマ社製)、5mM HEPES]にて維持培養した。培養は維持・分化ともに37、10%CO₂インキュベーターにて行なった。

30

【0295】

トリプシン-EDTA(インビトロジェン社製)にて細胞をフラスコより剥離し、10% FCSを加えたDMEM基本培地に懸濁後、0.4% トリパンブルー染色液(インビトロジェン社製)にて生細胞数の計測を行い、2.5×10⁴細胞/mlになるように調整した。コラーゲンタイプIコート(スミロン社製)に1ウエル当たり1ml(2.5×10⁴細胞)ずつプレATINGし、1週間培養した。脂肪細胞への分化は、分化誘導培地[5%FCS、10μg/ml インスリン(SIGMA社製)、500nM 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBM:SIGMA社製)、1μM Dexamethazone(SIGMA社製)を含むDMEM基本培地]にて24時間ごとに2回培地交換し、その後インスリン培地[5%FCS、100ng/ml インスリンを含むDMEM基本培地]に交換し、6~7日後に実験に使用した。

40

【0296】

b) 組換えアデノウイルスの作製

マウスR10 cDNAおよび緑色蛍光タンパク質cDNA(GFP cDNA)を強制発現させるための組換えアデノウイルスは、上記実施例9「組換えアデノウイルスの作製」に記載した方法と同様にアデノウイルス・エキスプレッション・ベクター・キット(タカラバイオ社製)を用いて作製された。簡単に以下に記す。

【0297】

R10 cDNA断片として、上記実施例5で得られたプラスミドDNA「pTARGET-R10」を制限酵素SalIおよびBamHIにて消化したものを、またGFP c

50

DNA断片としてプラスミドpQBI25(タカラバイオ社製)をSacIおよびEcoRIにて消化したものを使用した。これらのcDNA断片を、DNA ligation kit ver. 2(タカラバイオ社製)を用いて、キット付随のコスミドベクター、pAXCAwtのSwaI部位へ導入し、コスミドpAXCA-R10およびpAXCA-GFPを作製した。作製したコスミドpAXCA-R10およびpAXCA-GFPを用いた組換えアデノウイルスの単離、増幅および精製は、上記実施例9に準じて行なった。本実験で得られたマウスR10 cDNAを保持する組換えアデノウイルスをAd-R10と、また、GFP cDNAを保持するコントロールアデノウイルスをAd-GFPと命名した。

【0298】

10

c) TNF- α 誘導性脂肪分解に対する作用解析

炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor α : TNF- α)誘導性の脂肪分解に対するマウスR10遺伝子の作用を、上記b-1)記載のアデノウイルスを用いて、上記a)に記載した方法にて分化させた3T3-L1脂肪細胞にて検討した。詳細を以下に示す。

【0299】

c-1) 組換えアデノウイルス感染

上記のようにして精製された組換えアデノウイルスAd-R10またはAd-GFPを、 1.6×10^9 pfu/mlおよび 4×10^8 pfu/mlとなるように10% FCSを含むDMEMで希釈した。それぞれmoi(multiplicity of infection: 重複感染率)が800と200に相当する。脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞を2回洗浄後、各ウエルにウイルス液を100 μ lずつ添加し37、10% CO $_2$ インキュベーター内で20分後毎に振り混ぜながら1時間感染させた。感染後各ウエルに0.9 mlのインスリン培地を添加し、その後2日間培養した。

20

【0300】

c-2) 組換えアデノウイルス感染によるR10 mRNA発現のTaqMan PCRによる検討

組換えアデノウイルスAd-R10およびAd-GFP感染2日後の3T3-L1脂肪細胞からの全RNA抽出は、RNeasy Mini Kit(QIAGEN社製)をその添付プロトコルに従って用いることにより行なった。得られた全RNAを出発材料として、実施例11に記載の方法に準じてR10 mRNA発現についてのTaqMan PCRを行なった。発現量の補正のため、実施例11と同様にマウス β -アクチンの定量もおこなった。その結果、コントロールであるAd-GFP感染群と比較して、Ad-R10感染群ではウイルス量依存的にR10 mRNA発現の増加が認められた(図5)。

30

【0301】

c-3) 組換えアデノウイルス感染によるR10ポリペプチド発現のウエスタンブロッティングによる検討

細胞溶解液の抽出およびウエスタンブロット解析は実施例14に記載の方法に準じて行なった。変更点のみ以下に示す。

【0302】

40

組換えアデノウイルスAd-R10およびAd-GFP感染2日後の3T3-L1脂肪細胞からの細胞溶解液の抽出はRIPA緩衝液40 μ lを用いて行なった。ウエスタンブロット解析には、1次抗体としてイオン交換カラムにて精製したウサギ抗R10Bペプチド:

Cys Leu Gly Gly Arg Arg Arg Trp Gly Gly
Leu Gln Lys Arg Glu Val Ser Pro Ser(配列表の配列番号24)

ポリクローナル抗体((株)スクラムに依頼して作製、1000倍希釈で使用)を、2次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体(1000倍希釈で使用)を用いた。その結果、コントロールであるAd-GFP感染細胞溶解液では認められない約50 K

50

D a のバンドが、A d - R 1 0 感染細胞溶解液ではウイルス量依存的に検出された（図 6）。

【0303】

c - 4) T N F - α 誘導性脂肪分解に対する作用解析

脂肪分解アッセイは脂肪分解アッセイ培地 [フェノールレッド不含、2 % ウシ血清アルブミン (B S A : S I G M A 社製) を含む低グルコース D M E M (インビトロジェン社製)] を用いて行い、T N F - α (S I G M A 社製) は終濃度 2 . 5 n g / m l で用いた。先ず分化させた 3 T 3 - L 1 脂肪細胞を脂肪分解アッセイ培地にて 2 回洗浄し、その後 T N F - α を含むかあるいは含まない、脂肪分解アッセイ培地を 5 0 0 μ l / ウエルに加え、2 4 時間培養した。培養後、上清中の遊離脂肪酸濃度を N E F A - C テストワコー (和光純薬社製) を用いてプロトコールに従って測定した。反応は、培養上清 4 0 μ l に対し発色試液 A : 8 0 μ l、発色試液 B : 1 6 0 μ l を用いて行った。測定の結果、組換えアデノウイルス感染により R 1 0 を発現した 3 T 3 - L 1 脂肪細胞では、コントロールである G F P を発現した 3 T 3 - L 1 脂肪細胞と比較して、T N F - α 誘導性の脂肪分解作用 (遊離脂肪酸放出) が有意に抑制されていた (図 7)。従って、R 1 0 遺伝子は、インスリン抵抗性および糖尿病発症原因の一つとして報告されている、脂肪組織における T N F - α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を抑制することが明らかになり、遊離脂肪酸放出作用の抑制によって糖代謝の改善に寄与することが明らかになった。

10

【0304】

実施例 1 6 . H 4 I I E C 3 肝細胞を用いた糖新生を指標とした機能解析

20

a) H 4 - I I - E - C 3 肝癌細胞の培養

H 4 - I I - E - C 3 細胞 (A T C C より購入、A T C C No : C R L - 1 6 0 0) は、1 0 % F C S (H y c l o n e 社製) および 1 x 抗生物質 - 抗真菌剤 (インビトロジェン社製) を含む低グルコース D M E M 培地 (インビトロジェン社製) にて維持培養した。培養は維持・分化ともに 3 7 、5 % C O ₂ インキュベーターにて行なった。

【0305】

トリプシン - E D T A (インビトロジェン社製) にて細胞をフラスコより剥離し、1 0 % F C S を加えた D M E M 培地に懸濁後、0 . 4 % トリパンブルー染色液 (インビトロジェン社製) にて生細胞数の計測を行い、1 . 5 x 1 0 ⁵ 細胞 / m l になるように調整した。2 4 穴プレート (スミロン社製) に 1 ウエル当たり 1 m l (1 . 5 x 1 0 ⁵ 細胞) ずつプレーティングし、3 ~ 4 日してコンフルエントな状態になったところで以下の実験に使用した。

30

【0306】

b) 外因性基質依存的糖新生およびインスリンによる糖新生抑制を指標とした機能解析
組換えアデノウイルス、A d - R 1 0 を H 4 - I I - E - C 3 細胞に感染させることにより、外因性基質依存的な糖新生およびインスリンによる糖新生抑制に対する R 1 0 の機能について解析した。用いた組換えアデノウイルスは、実施例 1 5 . b - 1) 記載のものと同一である。具体的に以下に示す。

【0307】

b - 1) 組換えアデノウイルス感染

40

精製された組換えアデノウイルス A d - R 1 0 または A d - G F P を、2 x 1 0 ⁸ p f u / m l となるように 1 0 % F C S を含む D M E M で希釈した。m o i (m u l t i p l i c i t y o f i n f e c t i o n : 重複感染率) は 1 0 に相当する。コンフルエントになるまで培養した H 4 - I I - E - C 3 細胞を 2 回洗浄後、各ウエルにウイルス液を 1 0 0 μ l ずつ添加し 3 7 、5 % C O ₂ インキュベーター内で 2 0 分毎に振り混ぜながら 1 時間感染させた。感染後各ウエルに 0 . 9 m l の 1 0 % F C S を含む D M E M 培地を添加し、その後 2 日間培養した。

【0308】

b - 2) 組換えアデノウイルス感染による R 1 0 m R N A 発現の T a q M a n P C R による検討

50

組換えアデノウイルス Ad - R 1 0 および Ad - G F P 感染 2 日後の H 4 - I I - E - C 3 細胞からの全 RNA 抽出および TaqMan PCR は、実施例 1 5 に記載の方法と全て同様に行なわれた。その結果、コントロールである Ad - G F P 感染群と比較して、Ad - R 1 0 感染群では R 1 0 mRNA 発現の増加が認められた (図 8)。

【0309】

b - 3) 組換えアデノウイルス感染による R 1 0 ポリペプチド発現のウエスタンブロッティングによる検討

細胞溶解液の抽出からウエスタンブロット解析まで、実施例 1 5 に記載の方法と全て同様に行なった。その結果、コントロールである Ad - G F P 感染細胞溶解液では認められない約 5 0 K D a のバンドが、Ad - R 1 0 感染細胞溶解液のみで検出された (図 9)。

10

【0310】

b - 4) 外因性基質依存的糖新生およびインスリンによる糖新生抑制を指標とした機能解析

コンフルエントにまで培養した H 4 - I I - E - C 3 細胞を 0 . 1 % B S A を含む D M E M にて洗浄し、0 . 1 n M インスリンを含むかあるいは含まない、0 . 1 % B S A を含む D M E M にて 1 8 時間培養した。翌日、糖新生アッセイ培地 [フェノールレッドを含まず、グルコースを含まず、L - グルタミンを含まず、ピルビン酸を含まない D M E - b a s e (S I G M A 社製) に終濃度 2 m M で L - グルタミンを添加したもの] にて 2 回細胞を洗浄後、各ウエルに 5 0 0 μ l の糖新生アッセイ培地を添加し、さらに必要なウエルには外因性基質としてピルビン酸 / 乳酸をそれぞれ終濃度 2 0 m M / 2 m M になるように添加した。3 時間後、上清 5 0 μ l を用いて、培養上清中のグルコース濃度を Amplex Red キット (モレキュラープロブ社製) をその添付プロトコールに従って用いることにより測定した。測定の際、全ての培養上清サンプルに乳酸 / ピルビン酸を終濃度 4 0 m M / 4 m M になるように加えた。測定の結果、組換えアデノウイルス感染により R 1 0 を発現した H 4 - I I - E - C 3 細胞では、コントロールである G F P を発現した H 4 - I I - E - C 3 細胞と比較して、インスリン添加時、非添加時ともに基質依存的糖新生量が減少していることが示された (図 1 0) 。従って、R 1 0 遺伝子は肝臓において糖産生量を抑制することが明らかになり、糖産生量を抑制することで糖代謝改善に寄与することが明らかになった。

20

【0311】

実施例 1 7 . ヒト R 1 0 ホモログのイン・ビボでの発現及び生物活性

a) ヒト R 1 0 ホモログの c D N A を保持するアデノウイルスの取得

ヒト R 1 0 ホモログを強制発現させたための組換えアデノウイルスは実施例 9 に記載したのと同様の方法によって取得することができる。すなわち、実施例 1 1 で得られた p T A R G E T - H u R 1 0 を鋳型として適当なプライマーを設計してヒト R 1 0 ホモログの c D N A を増幅する。この c D N A を実施例 9 に記載と同様の方法によってアデノウイルスに組み込み、ヒト R 1 0 ホモログの c D N A を保持するアデノウイルス Ad - H u R 1 0 が取得できる。

30

【0312】

b) ヒト R 1 0 ホモログの c D N A のマウスでの発現

上記 Ad - H u R 1 0 を実施例 1 0 に記載の方法と同様の方法によってマウスに尾静脈注射により接種し、接種 3、7、1 4、2 1 日後に尾静脈より採血し血糖値を測定するとコントロールに比べて、血糖値、血中インスリン濃度に低下傾向が認められる。このことから、H u R 1 0 ポリペプチドは血中グルコース濃度低下作用及び血中インスリン濃度低下作用を有することが明らかとなる。

40

【0313】

実施例 1 8 . 3 T 3 L 1 脂肪細胞を用いた脂肪分解作用を指標とした H u R 1 0 の機能解析

実施例 1 5 に記載したのと同様の方法により、ヒト由来の H u R 1 0 の c D N A を含むアデノウイルス Ad - H u R 1 0 に感染した細胞について T N F - α 誘導性脂肪分解に対す

50

る作用を解析するとH u R 1 0はT N F - α の脂肪分解促進による遊離脂肪酸放出作用を減弱させることが確認される。

【0314】

実施例19. H 4 - I I - E C 3肝細胞を用いた糖新生を指標としたH u R 1 0の機能解析

実施例16に記載したのと同様の方法により、ヒト由来のH u R 1 0のc D N Aを含むアデノウイルスA d - H u R 1 0に感染した細胞について糖産生量を測定すると、基質依存的糖新生量の減少が観察される。

【0315】

製剤例

10

本発明の医薬組成物の例として、

1) 配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

または、

2) 配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する機能、2型糖尿病モデルマウスに投与すると血中のグルコース濃度を低下させる機能、脂肪組織において遊離脂肪酸放出作用を抑制する機能、肝臓において糖産生を抑制する機能から選択される少なくとも一つの機能を有するポリペプチド、

20

を有する化合物とを水またはそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液または懸濁液のアンブルとして使用に供される。具体的には例えば、配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド0.5mgを1リットルの注射用水に溶解し、無菌的にアンブルに分注、封入する。

30

【0316】

また、無菌粉末製剤((1)配列表の配列番号5のアミノ酸番号1から459に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から468に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを凍結乾燥するのが好ましい)をアンブルに充填しておき、使用時に薬理学的に許容し得る溶液で希釈してもよい。

【0317】

【参考例】5-[4-(6-メトキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イルメトキシ)ベンジル]チアゾリジン-2,4-ジオン塩酸塩の製造

欧州特許出願公開第745600号に記載の方法によって合成した、5-[4-(6-メトキシ-1-メチルベンズイミダゾール-2-イルメトキシ)ベンジル]チアゾリジン-2,4-ジオン10.6g及び4規定塩酸-1,4-ジオキサン100mlの混合物を濃縮後、酢酸エチルを加え、析出した成績体を濾取し、酢酸エチルで洗浄して、融点275-277を有する目的化合物11.0gを得た。

40

¹H-核磁気共鳴スペクトル: δ (ppm): 重ジメチルスルホキシド中、内部標準にTMS(テトラメチルシラン)を使用して測定した¹H-核磁気共鳴スペクトル(400MHz): δ (ppm)は次の通りである。

【0318】

3.11 (1H, dd, J=14Hz及び9Hz), 3.34 (1H, dd, J=14Hz及び4Hz), 3.89 (3H, s), 3.98 (3H, s)

50

), 4.91 (1H, dd, J = 9 Hz 及び 4 Hz), 5.64 (2H, s), 7.14 (2H, d, J = 9 Hz), 7.15 (1H, d, J = 9 Hz), 7.25 (2H, d, J = 9 Hz), 7.50 (1H, s), 7.70 (1H, d, 9 Hz), 12.04 (1H, s, D₂O 添加により消失)。

【0319】

【発明の効果】

本発明によりインスリン抵抗性改善剤投与によって発現が上昇する遺伝子として見出された新規糖代謝及び/または脂質代謝に関連する遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該遺伝子および/またはポリペプチドの機能を促進するかまたは抑制する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって取得される物質、該スクリーニングに使用するキット、該遺伝子および/またはポリペプチドを利用した糖代謝及び/または脂質代謝異常を改善する物質の試験方法、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチド及び/または該抗体を含有する医薬組成物等が提供された。

10

【0320】

【配列表フリーテキスト】

配列番号10: PCRプライマー

配列番号11: PCRプライマー

配列番号12: PCRセンスプライマー

配列番号13: PCRアンチセンスプライマー

20

配列番号14: R10 mRNA用 TaqMan PCRプライマー

配列番号15: R10 mRNA用 TaqMan PCRプライマー

配列番号16: R10 mRNA用 TaqMan PCRプローブ

配列番号17: βアクチン用 TaqMan PCRプライマー

配列番号18: βアクチン用 TaqMan PCRプライマー

配列番号19: βアクチン用 TaqMan PCRプローブ

配列番号20: ヒトR10用 PCRセンスプライマー

配列番号21: ヒトR10用 PCRアンチセンスプライマー

配列番号22: ヒトR10用 PCRプライマー

配列番号23: ヒトR10 flag用 PCRプライマー

30

配列番号24: R10Bペプチド

【0321】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY LIMITED

<120> Glucose and/or lipid metabolism relating Genes

<130> 2003053SU

10

<140> JP 2002-127834

<141> 2002-04-30

<140> JP2002-293225

<141> 2002-10-07

<160> 24

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 527

<212> DNA

<213> Mus musculus

30

<223> Inventor: Tanaka, Jun; Hara, Ayako; Ohsumi, Jun; Abe, Manabu;
Araki, Kazushi

<400> 1

cccgagggt tagtgaaggc aatccaacta tttctgagtn tctcacatta cagctttgtc 60
tgttcaatta ttcaaaagac agaagcctgt ttccgaatc tgttcactca gccactaagt 120
gggcatttgg ttttgaggaa gaatgctgaa ggcccaagaa caataagcca tagctcccag 180
gatgacttac atggcttggg ttggattaag cttttacaaa tcattttgat agctggacat 240
ggagatccgt gtgttgtaa gattcaaaaa tctaccctga agttttgitt gttatttatt 300

40

catggigcct gggcctcact cactaggcaa acaaaacact ctaccgctga gctatacatc 360
 cagtcataaa ngttattttt cagtttatca gtgggaaaga agtcacctgt ttcigactta 420
 aggcngcaaa acagttcgac agagactctc acagccaagg acaaggatag caccaggta 480
 tactgggact tccatcccag ggggggataa tctggctctc tccagtt 527

<210> 2

10

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

igtcttggg ccttcagcat tcttctc 28

20

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ctagtgagtg agggccaggc accatgaa

28

<210> 4

<211> 2950

<212> DNA

<213> Mus musculus

10

<220>

<221> CDS

<222> (79)..(1455)

<400> 4

agaacgagga gcccgcagag aggcagctc cgctccccgc agcccagtc ctcctccgg 60

20

ggacgtcct gccaggcc atg cct ccg tgg gcg gcc gct cta gcg ctg cta 111

Met Pro Pro Trp Ala Ala Ala Leu Ala Leu Leu

1

5

10

ctg gcg gcg ctc gcc ttg ctc ctc ctg cga ccc tgg aag cgc gct gtc 159

Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Arg Pro Trp Lys Arg Ala Val

15

20

25

30

gga gcg cga acc tca gtc cgg gac cac gag gag cag gag gtg gcg agc 207

Gly Ala Arg Thr Ser Val Arg Asp His Glu Glu Gln Glu Val Ala Ser

30

35

40

40

gga ggc ccc gcg gat cag ttc agc gac cgg cgc gaa gcg ctc ccc gga 255

Gly Gly Pro Ala Asp Gln Phe Ser Asp Arg Arg Glu Ala Leu Pro Gly
 45 50 55

ggc tgc agc ctc att tgc aag ccg tgc gcg ctg gcc cag tgc ctg ctg 303
 Gly Cys Ser Leu Ile Cys Lys Pro Ser Ala Leu Ala Gln Cys Leu Leu
 60 65 70 75

cgc gct ctg cga cgc tgc gcg gcg ctg gaa ccc agc ccc cgc tcc tgg 351
 Arg Ala Leu Arg Arg Ser Ala Ala Leu Glu Pro Ser Pro Arg Ser Trp
 80 85 90

ctg tgc gga ccc cac ctg caa acc ttc tgc cac ttc atc ctg cca gtc 399
 Leu Ser Gly Pro His Leu Gln Thr Phe Cys His Phe Ile Leu Pro Val
 95 100 105

ggg ccc ggg cct gag cta gcc cgt gag tac ctg cag ctg gca gat gat 447
 Gly Pro Gly Pro Glu Leu Ala Arg Glu Tyr Leu Gln Leu Ala Asp Asp
 110 115 120

ggg ctg gtg gct ctg gat tgg gtc ata gga cct tgt gcc agg ggc cgc 495
 Gly Leu Val Ala Leu Asp Trp Val Ile Gly Pro Cys Ala Arg Gly Arg
 125 130 135

cgg gtc acc aac cct ggg agc ctc cct cca gtg ctg ttg gta atc ccc 543
 Arg Val Thr Asn Pro Gly Ser Leu Pro Pro Val Leu Leu Val Ile Pro
 140 145 150 155

aat gca tgg gga cgc ctc act cgc aat gta ctg ggg ctc tgc ctg ctc 591
 Asn Ala Trp Gly Arg Leu Thr Arg Asn Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu

10

20

30

40

160	165	170		
gcc ctg gag cgc ggc tac tac ccg gtc atc ttc cat cgc cgc ggc cac	639			
Ala Leu Glu Arg Gly Tyr Tyr Pro Val Ile Phe His Arg Arg Gly His				
175	180	185		
cac ggt tgc ccg cta gtc agc ccc aga cta cag cct ttc ggg gac ccg	687		10	
His Gly Cys Pro Leu Val Ser Pro Arg Leu Gln Pro Phe Gly Asp Pro				
190	195	200		
icc gac ctc aag gag gcg gtg act tac att cgc ttc cga cac ccg gcg	735			
Ser Asp Leu Lys Glu Ala Val Thr Tyr Ile Arg Phe Arg His Pro Ala				
205	210	215		
			20	
gcc ccc ctg ttc gcg gtg agc gag ggt tca ggg tcc gcg ctg ctg ctg	783			
Ala Pro Leu Phe Ala Val Ser Glu Gly Ser Gly Ser Ala Leu Leu Leu				
220	225	230	235	
icc tac ttg ggg gag tgt ggc tcc tcc agc tat gtg act ggc gcc gcc	831			
Ser Tyr Leu Gly Glu Cys Gly Ser Ser Ser Tyr Val Thr Gly Ala Ala				
240	245	250		30
igc atc tcg cca gtg cta cgc tgt cgc gag tgg ttc gag gct ggc ttg	879			
Cys Ile Ser Pro Val Leu Arg Cys Arg Glu Trp Phe Glu Ala Gly Leu				
255	260	265		
cct tgg ccc tat gaa cgt ggg ttc ttg ctg cac cag aaa atc tct ctc	927			
Pro Trp Pro Tyr Glu Arg Gly Phe Leu Leu His Gln Lys Ile Ser Leu				40
270	275	280		

agc agg tat gcc tcc gcc ctg gag gac aca gtg gac acc ggc aag ctc 975
 Ser Arg Tyr Ala Ser Ala Leu Glu Asp Thr Val Asp Thr Gly Lys Leu
 285 290 295

ttc agg agt ggc tcc ctg cga gag ttt gag gag acc ctg ttc tgt cac 1023
 Phe Arg Ser Gly Ser Leu Arg Glu Phe Glu Glu Thr Leu Phe Cys His
 300 305 310 315

10

acc aag agt tgc ccc atc agc tgg gat acc tac tgg gat ctc aac gac 1071
 Thr Lys Ser Cys Pro Ile Ser Trp Asp Thr Tyr Trp Asp Leu Asn Asp
 320 325 330

cca ctc cgg gat gtg gat gag gct gcg gta ccc gtg ctg tgc atc tgc 1119
 Pro Leu Arg Asp Val Asp Glu Ala Ala Val Pro Val Leu Cys Ile Cys
 335 340 345

20

agt gct gat gac ccg gtg tgt gga ccc cca gag cac act ctg cct gcg 1167
 Ser Ala Asp Asp Pro Val Cys Gly Pro Pro Glu His Thr Leu Pro Ala
 350 355 360

30

gaa ctc ttc cac agc aac ccg tac ttc ttc ctg ctg ctc agt cac cat 1215
 Glu Leu Phe His Ser Asn Pro Tyr Phe Phe Leu Leu Leu Ser His His
 365 370 375

gga ggc cac tgt ggc ttc ctg cgc cct gaa ccc ttg cca gca tgg agc 1263
 Gly Gly His Cys Gly Phe Leu Arg Pro Glu Pro Leu Pro Ala Trp Ser
 380 385 390 395

40

cac gag gtc atc ttg gag tcc ttc agg gcc ctg act gaa ttc ttc cga 1311
 His Glu Val Ile Leu Glu Ser Phe Arg Ala Leu Thr Glu Phe Phe Arg
 400 405 410

atg gaa gag aga atg aaa ggg ctg agc agg cgc agg act tca ttt tta 1359
 Met Glu Glu Arg Met Lys Gly Leu Ser Arg Arg Arg Thr Ser Phe Leu
 415 420 425

10

ggg ggc cgg cgt cgc tgg gga ggc ctg cag aag cga gag gtt tcc cct 1407
 Gly Gly Arg Arg Arg Trp Gly Gly Leu Gln Lys Arg Glu Val Ser Pro
 430 435 440

ict tcc aat ctg gag gag att ttc aac tgg aag cgt tca tac acc agg 1455
 Ser Ser Asn Leu Glu Glu Ile Phe Asn Trp Lys Arg Ser Tyr Thr Arg
 445 450 455

20

tgaggctcgc ctggggaagc ccttggact tgtgagaaag acccccacaa ggtatcacag 1515

cgaggggggg cctctgtgtt cctctcttgc taactggaga aagaacttca cctgtgcta 1575

cgctaccttg agaagagttg ccttggctct aagaaacatt gctcagccct gggccactat 1635

30

ticcgtcat caaagtccca agcagaatag cagccctggc gaagtccata gaccagagag 1695

aaattccggc tcaccagct gggagtccag gcaggatgaa ctgtgagag tcaatgggtg 1755

gttctgtccc acataaatat catcttgggtg actctatgtc tcgagctgga gccacttgggt 1815

40

acagaaaagga caggatgttt gtgtctctgt cccatttccc tcatgtgtc tgcggttgtg 1875

gttcgtctct gacttgcata tcagcagctg ggaagcagg ctgtcggitg cctagctctc 1935

ccctggciga gaagccagca gaggcaggag atgctgggct gaggccaggg tggaaagagc 1995

tagcaagggt agaattgtgt tgtctgtccc tgccctcat ggtagatgga agctctgac 2055

10

taggccaggc tctcaagctg gtacagctca tctcctaaaa gttatttttag gagtaagagg 2115

tgctattgcc cagggtctaa gggttccgtt aggtcatggt tgtggtagcc aggttaggcc 2175

agatacacac acaccttcag ttctgacctt ggagcttccct ccagagagcc gcagccagcc 2235

agatgcgttc ctccctgaagg gtgggccttc tcacagtcag tgggaagggt ggcaaccgtc 2295

20

acaatagctc ctgctcagtt ttcttctgggt actagcttct tctcccttcc cacagccagg 2355

caagaggctc gggagcggag cggagaaaac ccgagggtct agtgaaggca atccaactat 2415

ttctgagtgt ctacattac agctttgtct gtcaattat tcaaaagaca gaagcctgtt 2475

30

ttccgaatct gttcactcag ccactaagtg ggcatttgggt tttaggaag aatgctgaag 2535

gcccagaac aataagccat agctcccagg atgacttaca tggtttgggt tggattaagc 2595

ctttacaaat cattttgata gctggacatg gagatccgtg tgttgtaag attcaaaaat 2655

ctaccctgaa gttttgtttg ttatttatcc atggctgctg ggcctcactc actaggcaaa 2715

40

caaaacactc taccgctgag ctatacatcc agtccataaa gttatititc agtittatcag 2775

tgggaaagaa gtcacctggt tctgacttaa ggcagcaaaa cagttcgaca gagactctca 2835

cagccaagga caaggatagc acccaggtat actgggactt ccatcccagg ggtggataat 2895

ciggtccict ccagtttggg ggttgggtgg ttgtttggga gttttgcitt gtttt 2950

10

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 5

Met Pro Pro Trp Ala Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala

1

5

10

15

Leu Leu Leu Leu Arg Pro Trp Lys Arg Ala Val Gly Ala Arg Thr Ser

20

25

30

30

Val Arg Asp His Glu Glu Gln Glu Val Ala Ser Gly Gly Pro Ala Asp

35

40

45

Gln Phe Ser Asp Arg Arg Glu Ala Leu Pro Gly Gly Cys Ser Leu Ile

50

55

60

Cys Lys Pro Ser Ala Leu Ala Gln Cys Leu Leu Arg Ala Leu Arg Arg

40

65

70

75

80

Ser Ala Ala Leu Glu Pro Ser Pro Arg Ser Trp Leu Ser Gly Pro His
85 90 95

Leu Gln Thr Phe Cys His Phe Ile Leu Pro Val Gly Pro Gly Pro Glu
100 105 110

Leu Ala Arg Glu Tyr Leu Gln Leu Ala Asp Asp Gly Leu Val Ala Leu
115 120 125

Asp Trp Val Ile Gly Pro Cys Ala Arg Gly Arg Arg Val Thr Asn Pro
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Pro Val Leu Leu Val Ile Pro Asn Ala Trp Gly Arg
145 150 155 160

Leu Thr Arg Asn Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ala Leu Glu Arg Gly
165 170 175

Tyr Tyr Pro Val Ile Phe His Arg Arg Gly His His Gly Cys Pro Leu
180 185 190

Val Ser Pro Arg Leu Gln Pro Phe Gly Asp Pro Ser Asp Leu Lys Glu
195 200 205

Ala Val Thr Tyr Ile Arg Phe Arg His Pro Ala Ala Pro Leu Phe Ala
210 215 220

Val Ser Glu Gly Ser Gly Ser Ala Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Gly Glu

10

20

30

40

225	230	235	240
Cys Gly Ser Ser Ser Tyr Val Thr Gly Ala Ala Cys Ile Ser Pro Val			
	245	250	255
Leu Arg Cys Arg Glu Trp Phe Glu Ala Gly Leu Pro Trp Pro Tyr Glu			
	260	265	270
Arg Gly Phe Leu Leu His Gln Lys Ile Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Ser			
	275	280	285
Ala Leu Glu Asp Thr Val Asp Thr Gly Lys Leu Phe Arg Ser Gly Ser			
	290	295	300
Leu Arg Glu Phe Glu Glu Thr Leu Phe Cys His Thr Lys Ser Cys Pro			
305	310	315	320
Ile Ser Trp Asp Thr Tyr Trp Asp Leu Asn Asp Pro Leu Arg Asp Val			
	325	330	335
Asp Glu Ala Ala Val Pro Val Leu Cys Ile Cys Ser Ala Asp Asp Pro			
	340	345	350
Val Cys Gly Pro Pro Glu His Thr Leu Pro Ala Glu Leu Phe His Ser			
	355	360	365
Asn Pro Tyr Phe Phe Leu Leu Leu Ser His His Gly Gly His Cys Gly			
370	375	380	

10

20

30

40

Phe Leu Arg Pro Glu Pro Leu Pro Ala Trp Ser His Glu Val Ile Leu
 385 390 395 400

Glu Ser Phe Arg Ala Leu Thr Glu Phe Phe Arg Met Glu Glu Arg Met
 405 410 415

Lys Gly Leu Ser Arg Arg Arg Thr Ser Phe Leu Gly Gly Arg Arg Arg
 420 425 430

10

Trp Gly Gly Leu Gln Lys Arg Glu Val Ser Pro Ser Ser Asn Leu Glu
 435 440 445

Glu Ile Phe Asn Trp Lys Arg Ser Tyr Thr Arg
 450 455

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

30

<400> 6

ggactgtcct gccaggccat

20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

40

<213> Mus musculus

<400> 7

gcctcacctg gtgtatgaac gct 23

<210> 8

10

<211> 3354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(1462) 20

<400> 8

agctcgccga gtagacggcc ccgccgcccg ctgcacgccg gggctctcca gcttcgcc 58

atg ccg ccg tgg ggc gcc gcc ctc gcg ctc atc ttg gcc gtg ctc gcc 106

Met Pro Pro Trp Gly Ala Ala Leu Ala Leu Ile Leu Ala Val Leu Ala

1

5

10

15

30

ctt ctc ggc ctg ctc ggc ccg cgg ctc cgg gga ccc tgg ggg cgc gcc 154

Leu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Arg Leu Arg Gly Pro Trp Gly Arg Ala

20

25

30

gtc gga gag agg acc ctg ccg ggg gcc caa gac cga gac gac ggg gag 202

Val Gly Glu Arg Thr Leu Pro Gly Ala Gln Asp Arg Asp Asp Gly Glu

35

40

45

40

gag gcg gac ggc gga ggc ccg gcg gac cag ttc agc gac ggg cgc gag 250
 Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Ala Asp Gln Phe Ser Asp Gly Arg Glu
 50 55 60

cca ctg ccg gga ggg tgc agc ctt gtt tgc aag ccg tcg gcc ctg gcc 298
 Pro Leu Pro Gly Gly Cys Ser Leu Val Cys Lys Pro Ser Ala Leu Ala
 65 70 75 80

10

cag tgc ctg ctg cgc gcc ctg cgg cgc tca gag gcg ctg gag gcc ggc 346
 Gln Cys Leu Leu Arg Ala Leu Arg Arg Ser Glu Ala Leu Glu Ala Gly
 85 90 95

ccg cgc tcc tgg ttc tcc ggg ccc cac ctg cag acc ctc tgc cac ttc 394
 Pro Arg Ser Trp Phe Ser Gly Pro His Leu Gln Thr Leu Cys His Phe
 100 105 110

20

gtc ctg ccc gta gcg cct ggg cct gag ctg gcc cgg gag tac ctg cag 442
 Val Leu Pro Val Ala Pro Gly Pro Glu Leu Ala Arg Glu Tyr Leu Gln
 115 120 125

30

ttg gcg gac gat ggg cta gtg gcc ctg gac tgg gtg gta gga cct tgt 490
 Leu Ala Asp Asp Gly Leu Val Ala Leu Asp Trp Val Val Gly Pro Cys
 130 135 140

gtt cgg ggc cgc cgg atc acc agc gcc ggg ggc ctt cct gcg gtg ctt 538
 Val Arg Gly Arg Arg Ile Thr Ser Ala Gly Gly Leu Pro Ala Val Leu
 145 150 155 160

40

ctg gtg atc ccc aat gcg tgg ggt cgc ctc acc cgc aac gtg ctc ggc 586
 Leu Val Ile Pro Asn Ala Trp Gly Arg Leu Thr Arg Asn Val Leu Gly
 165 170 175

ctt tgc ttg ctc gcc ctg gag cgc ggc tac tac ccg gtc atc ttc cat 634
 Leu Cys Leu Leu Ala Leu Glu Arg Gly Tyr Tyr Pro Val Ile Phe His
 180 185 190

10

cgc cgc ggc cac cac ggt tgc cca ctg gtc agc ccc cgg ctg cag cct 682
 Arg Arg Gly His His Gly Cys Pro Leu Val Ser Pro Arg Leu Gln Pro
 195 200 205

ttc ggg gac ccg tcc gac ctc aag gag gcg gtc aca tac atc cgc ttc 730
 Phe Gly Asp Pro Ser Asp Leu Lys Glu Ala Val Thr Tyr Ile Arg Phe
 210 215 220

20

cga cac ccg gcg gcg ccg ctg ttc gcg gtg agc gaa ggc tcg ggc tcg 778
 Arg His Pro Ala Ala Pro Leu Phe Ala Val Ser Glu Gly Ser Gly Ser
 225 230 235 240

gcg ctg ctc ctg tcc tac ctg ggc gag tgc ggc tcc tcc agc tac gtg 826
 Ala Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Gly Glu Cys Gly Ser Ser Ser Tyr Val
 245 250 255

30

aca ggc gcc gcc tgc atc tcg ccc gtg ctg cgc tgc cga gag tgg ttc 874
 Thr Gly Ala Ala Cys Ile Ser Pro Val Leu Arg Cys Arg Glu Trp Phe
 260 265 270

40

gag gcc ggc ctg ccc tgg ccc tac gag cgg ggc ttt ctg ctc cac cag 922

Glu Ala Gly Leu Pro Trp Pro Tyr Glu Arg Gly Phe Leu Leu His Gln
 275 280 285

aag atc gcc ctc agc agg tat gcc aca gcc ctg gag gac act gtg gac 970
 Lys Ile Ala Leu Ser Arg Tyr Ala Thr Ala Leu Glu Asp Thr Val Asp
 290 295 300

acc agc aga ctg ttc agg agc cgt tcc ctt cga gag ttt gag gag gct 1018
 Thr Ser Arg Leu Phe Arg Ser Arg Ser Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala
 305 310 315 320

ctc ttc tgc cac acc aaa agc ttc ccc atc agc tgg gat gcc tac tgg 1066
 Leu Phe Cys His Thr Lys Ser Phe Pro Ile Ser Trp Asp Ala Tyr Trp
 325 330 335

gac cgc aac gac ccg ctc cgg gat gtc gat gag gca gcc gtg cct gtg 1114
 Asp Arg Asn Asp Pro Leu Arg Asp Val Asp Glu Ala Ala Val Pro Val
 340 345 350

ctg tgt atc tgc agt gct gac gac ccc gtg tgt gga ccc cca gac cac 1162
 Leu Cys Ile Cys Ser Ala Asp Asp Pro Val Cys Gly Pro Pro Asp His
 355 360 365

act ctg aca act gaa ctc ttc cac agc aac ccc tac ttc ttc ctc ctg 1210
 Thr Leu Thr Thr Glu Leu Phe His Ser Asn Pro Tyr Phe Phe Leu Leu
 370 375 380

ctc agt cgc cac gga ggc cac tgt ggc ttc ctg cgc cag gag ccc ttg 1258
 Leu Ser Arg His Gly Gly His Cys Gly Phe Leu Arg Gln Glu Pro Leu

10

20

30

40

385	390	395	400		
cca gcc tgg agc cat gag gtc atc ttg gag tcc ttc cgg gcc ttg act	1306				
Pro Ala Trp Ser His Glu Val Ile Leu Glu Ser Phe Arg Ala Leu Thr					
405	410	415			
gag ttc ttc cga acg gag gag agg att aaa ggg ctg agc agg cac aga	1354			10	
Glu Phe Phe Arg Thr Glu Glu Arg Ile Lys Gly Leu Ser Arg His Arg					
420	425	430			
gct tcc ttc ctt ggg ggc cgt cgt cgt ggg gga gcc ttg cag agg cgg	1402				
Ala Ser Phe Leu Gly Gly Arg Arg Arg Gly Gly Ala Leu Gln Arg Arg					
435	440	445			
				20	
gaa gtc tct tcc tct tcc aac ctg gag gag atc ttt aac tgg aag cga	1450				
Glu Val Ser Ser Ser Ser Asn Leu Glu Glu Ile Phe Asn Trp Lys Arg					
450	455	460			
ica tac aca agg tgagagacct ggccctgagaa cccccaagtc ctgcaaagaa	1502				
Ser Tyr Thr Arg					
465				30	
aaacagagct gggcaagggg gaggcttgga aagatggggc ggactgaaca gagggagctc	1562				
cagctctgtg ctccctattc agtccctctc tcctaaattg gtgacctgaa agagaaggaa	1622				
cgtcccgca gcccgcactc acctcatcct cagcagaact cctgcctggc ctctgctcaa	1682				
				40	
catatcccta ctcatccggt cagcagcggc gcgttccagt cactgtcacc tgtcactgac	1742				

atcacaagcc aaaggatagc actttttcaa tccatggact caggagaaaa tgccctctta 1802
ctggcagtgg ctagaggat gagacgtttg tgtaigtac tgggcagta ccccgattct 1862
caagctggag ccatttgatg tcatgaggac aggaigtgtg tgtctcgcc ccacttccct 1922
catttgctct gtggttgtgg cgccttgctt tgaccgaatg ctctggcaac tgcggcagca 1982
ggcttggtg tgtgagaagg gcggcagagg cagtggggct ggctcgctga gggctgagca 2042
ggtagagaat gtaagtgtc atctcaagga atgcgaagti ccaatctctc agaggagctc 2102
tgcaagtctc agctaggaat ggggctgac tggccccaa gcctcactgg agagatccca 2162
agggtatitt acaaatagga agcgctctca tgcaggatct gagggctttg ctagaccatg 2222
gttcaaggag tcagaatctt ggctacccta catgtccct ctggcaccat tttaggggat 2282
tactccagag agctgcagcc agaactgtt atctctgag atatggactt tctctaagtc 2342
aggaaaagca caaacctcat aacttaggtg tttctgggtt ggttgctccc tttctgac 2402
ctactactgg cctctccctt tccagagcca ggagacacat ctgggaccag aggaaacaaa 2462
agcaccaaga ggttgactag agctgaccag tgatttaca atatttcata ttccaatgct 2522
tcgtctgctc aattattcaa aaggccatcc ctgtaaaggc agaaaagctt cctcttagat 2582

10

20

30

40

ctggccactc agcaaataag tgggtatttg gtittatgaa gaataatgct gaggactaga 2642
gatatagiat atcagagata atatatagta tacaggttga tctaaatatt ctggtttggga 2702
ttaggcaatt aaaatttttt tggcaacagg acatatgttt ccatgtgttg ctaagattca 2762
aaaactttgc cctgaagttt tattttaatc gtcaatgaga aagagggctc ctgttctgac 2822
ctcaaaaaca gcaaagctgt tgtaaagaag agagctgctt atacgaaaac ccacattcca 2882
agactiggta taaggatttc ctgaggcctt gatttcaggt ttggataatc ttgccccaga 2942
ttctagaict tgttcttcta gatcaaatca gaagaaactt tgaataact ccaagaatct 3002
gcacigaaat gtagacagca ctgataatc taagggacat tatcttgttg tgaaaaatta 3062
tctccctcct ggcigggagc ggtggcacac acctataatc tcagcacitt gggaggccga 3122
ggigggttga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacag tgaaacctca 3182
tctctactaa aaatacaaaa aattagccgg gcgtggtagc gggtgccigt aatcccagtt 3242
actcaggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaaccggga ggcggagctt gcagtgagct 3302
gagatgcac cactgcactc cagcctgggc gacagagtaa gactgtgitt ca 3354

<210> 9

<211> 468

10

20

30

40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Pro Pro Trp Gly Ala Ala Leu Ala Leu Ile Leu Ala Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Arg Leu Arg Gly Pro Trp Gly Arg Ala
20 25 30

Val Gly Glu Arg Thr Leu Pro Gly Ala Gln Asp Arg Asp Asp Gly Glu
35 40 45

Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Ala Asp Gln Phe Ser Asp Gly Arg Glu
50 55 60

Pro Leu Pro Gly Gly Cys Ser Leu Val Cys Lys Pro Ser Ala Leu Ala
65 70 75 80

Gln Cys Leu Leu Arg Ala Leu Arg Arg Ser Glu Ala Leu Glu Ala Gly
85 90 95

Pro Arg Ser Trp Phe Ser Gly Pro His Leu Gln Thr Leu Cys His Phe
100 105 110

Val Leu Pro Val Ala Pro Gly Pro Glu Leu Ala Arg Glu Tyr Leu Gln
115 120 125

Leu Ala Asp Asp Gly Leu Val Ala Leu Asp Trp Val Val Gly Pro Cys

10

20

30

40

130

135

140

Val Arg Gly Arg Arg Ile Thr Ser Ala Gly Gly Leu Pro Ala Val Leu
145 150 155 160

Leu Val Ile Pro Asn Ala Trp Gly Arg Leu Thr Arg Asn Val Leu Gly
165 170 175

10

Leu Cys Leu Leu Ala Leu Glu Arg Gly Tyr Tyr Pro Val Ile Phe His
180 185 190

Arg Arg Gly His His Gly Cys Pro Leu Val Ser Pro Arg Leu Gln Pro
195 200 205

20

Phe Gly Asp Pro Ser Asp Leu Lys Glu Ala Val Thr Tyr Ile Arg Phe
210 215 220

Arg His Pro Ala Ala Pro Leu Phe Ala Val Ser Glu Gly Ser Gly Ser
225 230 235 240

Ala Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Gly Glu Cys Gly Ser Ser Ser Tyr Val
245 250 255

30

Thr Gly Ala Ala Cys Ile Ser Pro Val Leu Arg Cys Arg Glu Trp Phe
260 265 270

Glu Ala Gly Leu Pro Trp Pro Tyr Glu Arg Gly Phe Leu Leu His Gln
275 280 285

40

Lys Ile Ala Leu Ser Arg Tyr Ala Thr Ala Leu Glu Asp Thr Val Asp
 290 295 300

Thr Ser Arg Leu Phe Arg Ser Arg Ser Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala
 305 310 315 320

Leu Phe Cys His Thr Lys Ser Phe Pro Ile Ser Trp Asp Ala Tyr Trp
 325 330 335

10

Asp Arg Asn Asp Pro Leu Arg Asp Val Asp Glu Ala Ala Val Pro Val
 340 345 350

Leu Cys Ile Cys Ser Ala Asp Asp Pro Val Cys Gly Pro Pro Asp His
 355 360 365

20

Thr Leu Thr Thr Glu Leu Phe His Ser Asn Pro Tyr Phe Phe Leu Leu
 370 375 380

Leu Ser Arg His Gly Gly His Cys Gly Phe Leu Arg Gln Glu Pro Leu
 385 390 395 400

30

Pro Ala Trp Ser His Glu Val Ile Leu Glu Ser Phe Arg Ala Leu Thr
 405 410 415

Glu Phe Phe Arg Thr Glu Glu Arg Ile Lys Gly Leu Ser Arg His Arg
 420 425 430

Ala Ser Phe Leu Gly Gly Arg Arg Arg Gly Gly Ala Leu Gln Arg Arg
 435 440 445

40

Glu Val Ser Ser Ser Ser Asn Leu Glu Glu Ile Phe Asn Trp Lys Arg
450 455 460

Ser Tyr Thr Arg
465

10

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 10

iccgggaatcg atccttatcg

20

30

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

40

<400> 11

atccttgcta gcctcgagac

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense
primer

<400> 12

ctaggctctg aaaggagtgc

20

20

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense
primer

<400> 13

gccatttaaa tcctcacgac acctgaaatg gaag

34

40

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:TaqMan PCR
primer for R10 mRNA

<400> 14

acaccggcaa gctcttcag

19

20

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TaqMan PCR
primer for R10 mRNA

30

<400> 15

aactcttggg gtgacagaac agg

23

40

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TaqMan PCR
probe for R10 mRNA

10

<400> 16

agtggtctccc tgcgagagtt tgagg

25

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TaqMan PCR
primer for beta-actin

<400> 17

30

ggcgcttttg actcaggatt t

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TaqMan PCR
primer for beta-actin

<400> 18

ggatgtttgc tccaaccaac t 21

10

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: TaqMan PCR
probe for beta-actin

<400> 19

aaaaciggaa cggatgaaggc gacag 25

30

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense
primer for human R10

<400> 20

ctctccagct tcgccaatgcc

20

<210> 21

<211> 22

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR antisense
primer for human R10

20

<400> 21

ctcaggccag gtctctcacc tt

22

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
human R10

<400> 22

40

gtggtaggac ctgtgttcg

20

〈210〉 23

〈211〉 60

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

10

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:PCR primer for
human R10flag

〈400〉 23

tcacacatta tcgtcgatc ccttgtaac ccttggtgat gatcgcttcc agttaaagat 60

20

〈210〉 24

〈211〉 19

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

30

〈223〉 Description of Artificial Sequence:R10B peptide

〈400〉 24

Cys Leu Gly Gly Arg Arg Arg Trp Gly Gly Leu Gln Lys Arg Glu Val

1

5

10

15

Ser Pro Ser

40

【図面の簡単な説明】

【図1】マウス (mouse) とヒト (human) のホモロジー検索の図。* は同じアミノ酸を示す。番号はアミノ酸番号を示す。

【図2】Ad-R10、Ad/emptyまたは生理食塩水投与のマウスの体重、血中グルコース値、血中インスリン値及び血中ALT値に及ぼす影響を示す。

【図3】化合物A投与の有無による、KKマウス脂肪組織におけるR10 mRNA発現量の比較を示す。ctrlはコントロールを示す。

【図4】HEK293細胞におけるHuR10の発現を示す。

50

【図5】アデノウイルス感染による3T3-L1脂肪細胞におけるR10 mRNA発現を示す。

【図6】Ad-R10感染細胞溶解液ではウイルス量依存的に検出されたR10を示す。

【図7】3T3-L1脂肪細胞におけるTNF- α 誘導性脂肪分解に対するR10発現の効果を示す。

【図8】アデノウイルス感染によるH4-II-E-C3肝細胞におけるR10 mRNAの発現を示す。

【図9】Ad-R10感染細胞溶解液で検出されたR10を示す。

【図10】H4-II-E-C3肝細胞における基質依存性糖新生に対するR10発現の効果を示す。

10

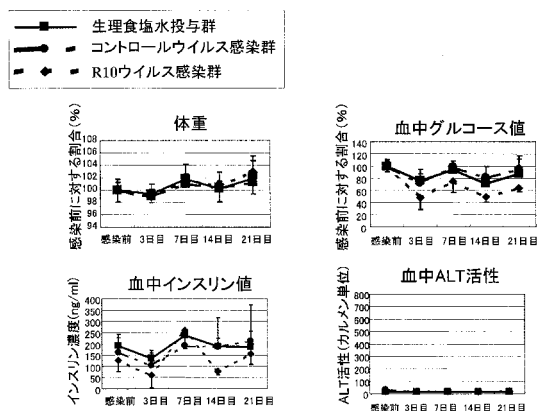
【図1】

```

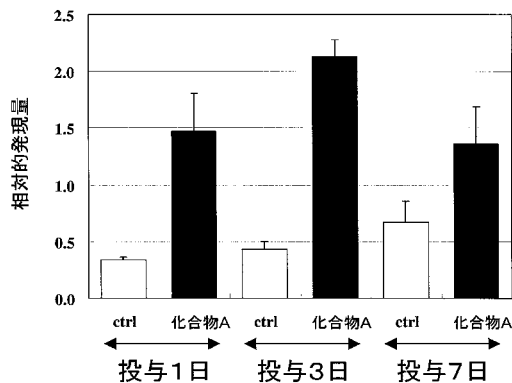
mouse 1: MPPMAAALALLAALL-LRP-----WKRAVGARTSVR--DHEEQEVAAGG-PADQFS 51
human 1: MPPMAAALALLAALLGGLGPRLPWGRAVGERTLPGAODDEDGEEADGGGPADQFS 60
      ****
mouse 52: DRREALPGCSLICKPSALAQCLLALRBSAALPSPRSULSGPHLQTTCHFILFVGPQP 111
human 61: DGREPLPGCSLICKPSALAQCLLALRBSAALPSPRSULSGPHLQTTCHFILFVGPQP 120
      ****
mouse 112: ELAREYLQADDDGLVALDVVIGPCARGRRVTNPGSLPVLVIFNAUCRLTNVLGLCLL 171
human 121: ELAREYLQADDDGLVALDVVIGPCARGRRVTNPGSLPVLVIFNAUCRLTNVLGLCLL 180
      ****
mouse 172: ALESGYYPVIFRRRHGCGPLVSFRLQFFGDPDDLKEAVTYIRFRHFAAPLFAVSEGG 231
human 181: ALESGYYPVIFRRRHGCGPLVSFRLQFFGDPDDLKEAVTYIRFRHFAAPLFAVSEGG 240
      ****
mouse 232: ALLLSYLGCGSSSYVTGAACISPVLRCREVFEAGLPUPVERGFLHOKISLSRYASALE 291
human 241: ALLLSYLGCGSSSYVTGAACISPVLRCREVFEAGLPUPVERGFLHOKIALSRVATALE 300
      ****
mouse 292: DTVNTGKLFSSGSLREFEETLPCHTKCFISNDVTDLANPLRDNVEAAVPLICISADD 351
human 301: DTVNTGKLFSSGSLREFEETLPCHTKCFISNDVTDLANPLRDNVEAAVPLICISADD 360
      ****
mouse 352: PWCOPPDHTLTTELFSNPNYFFLLSHNGGCGFLRPEPLPAUSHEVILESFALTEFFR 411
human 361: PWCOPPDHTLTTELFSNPNYFFLLSHNGGCGFLRPEPLPAUSHEVILESFALTEFFR 420
      ****
mouse 412: MEERNKGLSERRTSLFGRRRUG-GLQKREVSPSSNLEEIFNWKESYTR 459
human 421: TEERIKGLSRHRSFLGRRR-GGALQRREVSSSNLEEIFNWKESYTR 468
      ****

```

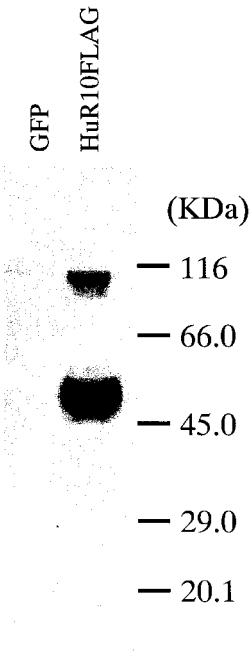
【図2】



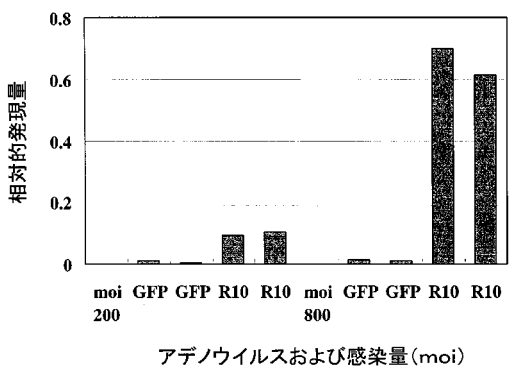
【図3】



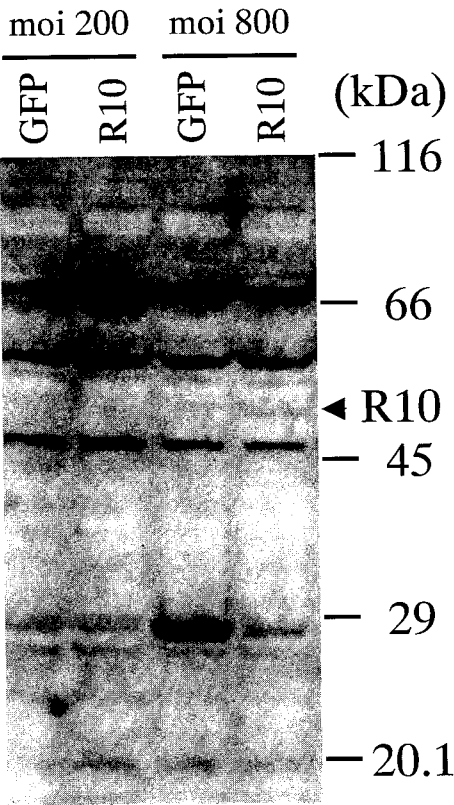
【 図 4 】



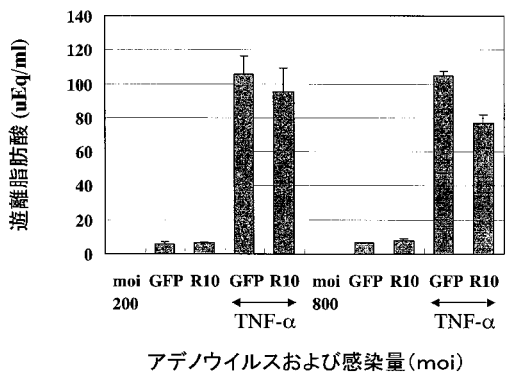
【 図 5 】



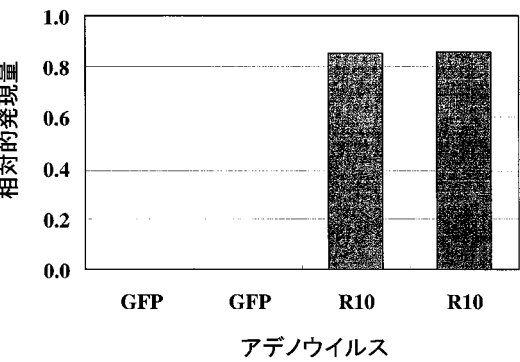
【 図 6 】



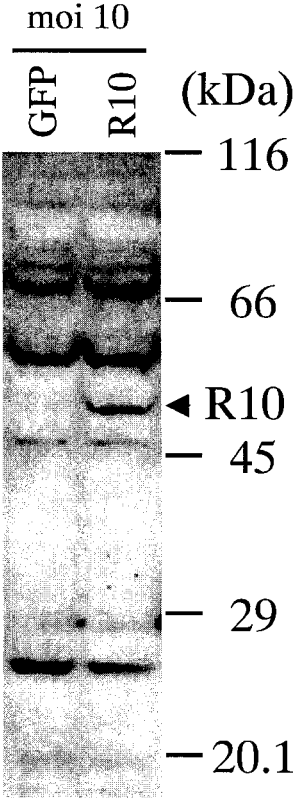
【 図 7 】



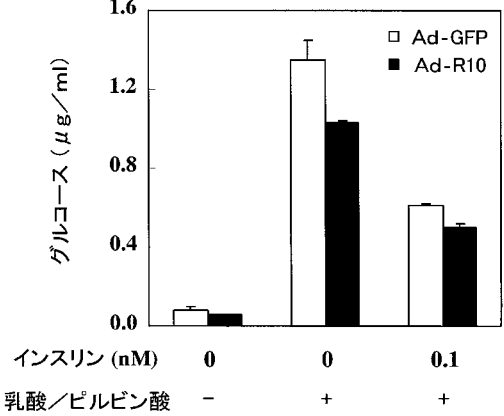
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 5
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 1/22	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 田中 純
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 原 亜矢子
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 大隅 潤
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 阿部 学
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 荒木 一司
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 DA02
DA06 EA02 EA04 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA12
HA14 HA19
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA12
4B063 QA00 QA18 QA19 QQ03 QQ20 QQ42 QQ52 QQ68 QQ70 QQ73
QR08 QR32 QR41 QR42 QR48 QR55 QR62 QR69 QR77 QR82
QS10 QS12 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX01 QX07
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 NA14 ZC332
ZC352
4C085 AA13 AA14 BB11 DD61
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	参与糖代谢和/或脂质代谢的基因		
公开(公告)号	JP2004180669A	公开(公告)日	2004-07-02
申请号	JP2003123461	申请日	2003-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	田中純 原亜矢子 大隅潤 阿部学 荒木一司		
发明人	田中 純 原 亜矢子 大隅 潤 阿部 学 荒木 一司		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 A61P3/06 A61P3/10 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/06 A61P3/10 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA00 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ68 4B063/QQ70 4B063/QQ73 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD61 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	矢口俊明 越后纪		
优先权	2002127834 2002-04-30 JP 2002293225 2002-10-07 JP		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

与糖代谢和/或脂质代谢有关的新基因，由该基因编码的多肽，该多肽的生产方法以及筛选促进或抑制该基因和/或多肽功能的物质的方法 通过筛选方法获得的物质，用于筛选的试剂盒，使用该基因和/或多肽改善葡萄糖代谢和/或脂质代谢异常的物质的测试方法，针对该多肽的抗体，提供含有多肽和/或抗体的药物组合物等。 溶液：多核苷酸等由特定序列代表的核苷酸序列组成，或者由多核苷酸编码的蛋白质等组成。[选择图]无

群	①	②	③	④	⑤	⑥
化合物A投与	-	+	-	+	-	+
日数	1日	1日	3日	3日	8日	8日