

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2011年7月21日(21.07.2011)

(10) 国際公開番号  
WO 2011/087009 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
G01N 33/15 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/050331
- (22) 国際出願日: 2011年1月12日(12.01.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-006021 2010年1月14日(14.01.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人埼玉医科大学(Saitama Medical University) [JP/JP]; 〒3500451 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井上 聡 (INOUE, Satoshi) [JP/JP]; 〒3500451 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 池田 和博 (IKEDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒3500451 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外 (HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木2-2-13
- 新宿TRビル4階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2011/087009 A1

- (54) Title: REGULATORY GENE CONTROLLING SACCHAROMETABOLISM, LIPID METABOLISM, OBESITY AND LIFE, PROTEIN, AND SCREENING METHOD
- (54) 発明の名称: 糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命を制御する制御遺伝子、及びタンパク質、並びにスクリーニング方法
- (57) Abstract: Disclosed is a regulatory gene which is represented by (A) or (B) described below and controls at least one of saccharometabolism, lipid metabolism, obesity or life. (A) a DNA comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 (B) a DNA comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 and a DNA which hybridizes with one of the complementary strands of the above-described DNA under stringent conditions
- (57) 要約: 下記 (A) 及び (B) のいずれかで示され、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する制御遺伝子である。(A) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。(B) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリントな条件下でハイブリダイズするDNA。

## 明 細 書

### 発明の名称：

糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命を制御する制御遺伝子、及びタンパク質、並びにスクリーニング方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する制御遺伝子、及び該遺伝子によって発現するタンパク質、並びに糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法に関する。

### 背景技術

[0002] 社会的にアンチエイジングに関心が高まり、その介入法の開発が望まれている。また、近年特に増加が著しいメタボリック症候群、糖尿病、高脂血症、肥満に関する新しい予防や治療法の開発が希求されている。

[0003] 従来、健康な個体の寿命を延ばすために、確立された方法は無い。カロリー制限がこの夢に向けての希望となっているが、確実な対処法かどうかは未だ不明で、過度の食事制限は万人に勧められる方法とはいえないという問題がある。

メタボリック症候群に対しては、食生活や運動などの生活習慣の改善の他に、糖尿病や高血圧に対する薬物療法が行われている。糖尿病に対しては、インスリン投与やインスリン分泌を促進する薬及び消化管からの糖の吸収を抑制する薬が利用されている。また、高脂血症にはコレステロールや中性脂肪の合成阻害剤などが利用されている。しかし、血糖値、コレステロール値、中性脂肪値、血圧のコントロールの不良や低血糖を誘起したり、また薬剤が効かなくなる例も存在するという問題があり、そもそもこれらを共通して予防できる方法が待望されている。

これらの問題を克服するためには、新たな作用機序に基づく療法薬の開発が望まれている。

[0004] COX7RP (cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide) 遺伝子は、本発明者らによって、先に単離された遺伝子である（非特許文献1参照）。この遺伝子のアミノ酸配列は、ミトコンドリアに存在するシトクロムcオキシダーゼ（COX）のサブユニットであるCOX7Aと保存性が高いことから、この酵素が関与するミトコンドリアの酸化的リン酸化の反応に関わることが予想される。ミトコンドリアは、呼吸によってエネルギーを産生する主要な細胞内器官であり、糖代謝、脂質代謝などのエネルギー代謝に重要な役割を担っており、加齢、疾患に深く関わりとされている。

しかし、COX7RP遺伝子が、子宮癌、乳癌、及び膀胱癌に関わることが知られているものの（例えば、特許文献1参照）、糖代謝、脂質代謝、肥満、寿命を制御し、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、肥満症の分子標的となり得ることは、未だ知られていないのが現状である。

[0005] したがって、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の少なくともいずれかの分子標的となり得る、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができる制御遺伝子、及び該遺伝子によって発現するタンパク質、並びに糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法の提供が強く求められているのが現状である。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2008/156172号

#### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M.、「Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library

. J. Mol Cell Biol. , 18 (1) , 442-449, 1998

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の少なくともいずれかの分子標的となり得る、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができる制御遺伝子、及び該遺伝子によって発現するタンパク質、並びに糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 前記課題を解決するため、本発明者らは鋭意検討した結果、以下のような知見を得た。即ち、COX7RP遺伝子が、個体レベルで糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命を制御する機能を有しており、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の分子標的となるという新たな知見である。

[0010] 本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> 下記(A)及び(B)のいずれかで示され、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することを特徴とする制御遺伝子である。

(A) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

(B) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

<2> 糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御し、下記(A)及び(B)のいずれかで示される遺伝子によって発現すること

を特徴とするタンパク質である。

(A) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

(B) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

<3> 糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、前記<1>に記載の制御遺伝子の発現の抑制、及び前記<2>に記載のタンパク質の活性の抑制の少なくともいずれかを指標とすることを特徴とするスクリーニング方法である。

### 発明の効果

[0011] 本発明によると、前記従来における諸問題を解決することができ、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の少なくともいずれかの分子標的となり得る、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができる制御遺伝子、及び該遺伝子によって発現するタンパク質、並びに糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1] 図1は、COX7RPノックアウトマウスの作製に用いられたレトロウイルスベクターと、その挿入部位を示す図である。

[図2] 図2は、COX7RPがノックアウトされたことの確認ために行った、PCR産物の電気泳動の結果を示す図である。

[図3] 図3は、ウエスタンブロット解析の結果を示す図である。

[図4] 図4は、COX活性の測定結果を示す図である。

[図5] 図5は、ATP産生量の測定結果を示す図である。

[図6] 図6は、通常食飼育における野生型マウス(WT)及びCOX7RPノックアウトマウス(KO)マウスの生存曲線(Kaplan-Meier

survival curves) を示す図である。

[図7A] 図7Aは、通常食飼育におけるオスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の体重変化を示す図である。

[図7B] 図7Bは、通常食飼育におけるメスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の体重変化を示す図である。

[図8A] 図8Aは、高脂肪食飼育における、オスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の体重変化を示す図である。

[図8B] 図8Bは、高脂肪食飼育における、メスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の体重変化を示す図である。

[図9A] 図9Aは、オスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の肝臓、腎臓、心臓、骨格筋の重量を示す図である。

[図9B] 図9Bは、オスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の腎周囲、精巣上体周囲、及び鼠径部の脂肪組織の重量を示す図である。

[図9C] 図9Cは、メスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の肝臓、腎臓、心臓、骨格筋の重量を示す図である。

[図9D] 図9Dは、メスの野生型マウス (WT) 及びCOX7RPノックアウトマウス (KO) の腎周囲、子宮周囲、及び鼠径部の脂肪組織の重量を示す図である。

[図10A] 図10Aは、糖負荷試験の各採血時間におけるグルコース濃度示す図である。

[図10B] 図10Bは、糖負荷試験の各採血時間におけるインスリン濃度を示す図である。

[図11] 図11は、インスリン負荷試験の各採血時間におけるインスリン濃度を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0013] (制御遺伝子)

本発明の制御遺伝子は、下記 (A) 及び (B) のいずれかで示され、糖代

謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する。

(A) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

(B) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

[0014] 前記制御遺伝子は、COX7RP (cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide) 遺伝子である。後述する試験例1~3で示すように、COX7RP遺伝子をノックアウトしたマウスでは、野生型のマウスに比べて糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命が向上しており、COX7RP遺伝子によって、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命が制御されている。

前記COX7RP遺伝子の塩基配列は、例えば、GeneBank (NCBI) などの公共のデータベースを通じて容易に入手することができ、前記配列番号1で示される塩基配列は、NCBI accession number NM\_004718.2で入手することができる。

[0015] 前記ストリンジントな条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、ナトリウム濃度が25mM~500mMが好ましく、25mM~300mMがより好ましく、温度が42°C~68°Cが好ましく、42°C~65°Cがより好ましい。例えば、5×SSC (83mM NaCl、83mMクエン酸ナトリウム)、温度42°Cが挙げられる。

前記ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAは、配列番号1で示される塩基配列と高い配列同一性を有すると考えられる。前記高い配列同一性としては、塩基配列全体で、70%以上が好ましく、80%以上がより好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上が特に好ましい。このような高い配列同一性を有する塩基配列は、本発明の制御遺伝子と実質的に同等の機能を有していると考えられる。

[0016] 前記制御遺伝子の形態としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択

することができ、例えば、ゲノムDNA、cDNA、化学合成DNA、などが挙げられる。

[0017] 前記ゲノムDNAの調製方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、前記制御遺伝子を有する生物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリーを作製し、これを展開して、配列番号1に記載の塩基配列やゲノム上のその近傍の塩基配列を基に調製したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより調製する方法、配列番号1に記載の塩基配列やゲノム上のその近傍の塩基配列に特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRを行うことにより調製する方法、などが挙げられる。

[0018] 前記cDNAの調製方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、前記制御遺伝子を有する生物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、配列番号1に記載の塩基配列情報を基に作製したプローブやプライマーを用いて、コロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製する方法が挙げられる。

[0019] 前記化学合成DNAの調製方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、既存のDNA自動合成装置等を利用して合成することができる。また、合成受託会社に合成を依頼することにより入手することもできる。

[0020] 前記制御遺伝子の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、制御遺伝子のみからなる態様、ベクターに組み込まれた態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター、などが挙げられる。

[0021] (タンパク質)



本発明のタンパク質は、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御し、下記（A）及び（B）のいずれかで示される遺伝子によって発現する。

（A）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

（B）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

前記タンパク質は、前記制御遺伝子によって発現するものであるため、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができると考えられる。

[0022] 前記タンパク質の調製方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記タンパク質を有する生物から精製する方法、前記制御遺伝子が組み込まれたベクターを含有する細胞の培養物から精製する方法、などが挙げられる。

前記精製の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、硫酸分画、各種クロマトグラフィー、アルコール沈殿、限外ろ過などの方法が挙げられる。

[0023] 前記タンパク質の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記タンパク質のみからなる態様、精製用のタグを含有する態様、などが挙げられる。

前記精製用のタグとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、Hisタグなどが挙げられる。

[0024] （スクリーニング方法）

本発明のスクリーニング方法は、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、前記本発明の制御遺伝子の発現の抑制、及び前記本発明のタンパク質の活性の抑制の少なくともいずれかを指標とする。

前記スクリーニング方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選

択することができる。

[0025] <制御遺伝子の発現の抑制>

前記本発明の制御遺伝子の発現の抑制を指標とするスクリーニング方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、個体、及び細胞のいずれかに被験物質を投与する投与工程、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれか、及び、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれかにおける、前記制御遺伝子の発現量を測定する測定工程、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれかに比べ、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれかの方で、前記制御遺伝子の発現量が抑制されている場合に、その被験物質を選択する選択工程、を含む方法などが挙げられる。

[0026] ー投与工程ー

前記投与工程における被験物質としては、特に制限はなく、各種候補物質の中から、目的に応じて適宜選択することができる。前記被験物質の投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、経口投与、注射による投与、などが挙げられる。

[0027] ー測定工程ー

前記測定工程における、前記制御遺伝子の発現量を測定する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、mRNAレベルの発現量の測定、タンパク質レベルの発現量の測定、などが挙げられる。

mRNAレベルの発現量の評価方法、及びタンパク質レベルの発現量の測定方法としては、特に制限はなく、公知の方法の中から目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ノーザンブロット法、定量的RT-PCR法、ウエスタンブロット法、ELISA法、免疫染色法、などが挙げられる。

また、前記制御遺伝子の発現量の測定では、前記制御遺伝子のプロモーター活性を測定してもよい。前記プロモーター活性を測定する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ルシフェ

ラーゼアッセイなどが挙げられる。

[0028] ー選択工程ー

前記選択工程において、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれかに比べ、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれかの方で、前記制御遺伝子の発現量が抑制されている場合には、前記被験物質が糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質として、選択することができる。

[0029] <タンパク質の発現の抑制>

前記本発明のタンパク質の発現の抑制を指標とするスクリーニング方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、個体、及び細胞のいずれかに被験物質を投与する投与工程、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれか、及び、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれかにおける、前記タンパク質の活性を測定する測定工程、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれかに比べ、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれかの方で、前記タンパク質の活性が抑制されている場合に、その被験物質を選択する選択工程、を含む方法などが挙げられる。

[0030] ー投与工程ー

前記投与工程における被験物質としては、特に制限はなく、各種候補物質の中から、目的に応じて適宜選択することができる。前記被験物質の投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、経口投与、注射による投与、などが挙げられる。

[0031] ー測定工程ー

前記測定工程における、前記タンパク質の活性を測定する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、シトクロムcオキシダーゼ（COX）の活性の測定、などが挙げられる。

[0032] ー選択工程ー

前記選択工程において、被験物質を投与されない個体、及び細胞のいずれ

かに比べ、被験物質を投与された個体、及び細胞のいずれかの方で、前記タンパク質の活性が抑制されている場合には、前記被験物質が糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質として、選択することができる。

[0033] 前記指標は、前記制御遺伝子の発現の抑制を単独で使用してもよいし、前記タンパク質の活性の抑制を単独で使用してもよいし、両者を併用してもよい。

[0034] 前記スクリーニング方法により選択された物質は、COX7RP阻害剤としての機能を有すると考えられる。したがって、前記スクリーニング方法により、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができる、化合物、薬品、食品添加物、などを選択することができる。

### 実施例

[0035] 以下に本発明の実施例、及び試験例を説明するが、本発明は、これらの実施例、及び試験例に何ら限定されるものではない。

[0036] 下記実施例1では、COX7RPノックアウトマウスの作製を示し、下記試験例1～3では、前記COX7RPノックアウトマウスを解析することにより、COX7RPが、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することができることを示す。

[0037] (実施例1)

#### <COX7RPノックアウトマウスの作製>

COX7RPの生体における機能を解析するため、COX7RPノックアウトマウスを作製した。

前記COX7RPノックアウトマウスは、COX7RP遺伝子が産生されないように、COX7RP遺伝子の第1イントロンにレトロウイルスベクターが挿入されたES細胞を利用し、Lexicon Genetics (Woodlands, TX) によって作製された (Zambrowicz B P, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C, Sands AT.、「Disru

ption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells.」、Nature、392(6676)、608-611、1998)ものを使用した。

図1に、COX7RPノックアウトマウスの作製に用いられたレトロウイルスベクターと、その挿入部位を示す。

図1中、「LTR」は長末端反復を示し、「SA」はスプライシング受容部位を示し、「NEO」はネオマイシン耐性遺伝子を示し、「pA」はポリA付加シグナルを示し、「PGK」はホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子プロモーターを示し、「BTK」はブルトン型チロシンキナーゼを示し、「SD」はスプライシング供与部位を示し、「F」、「R」、及び「L」はプライマーを示す。

[0038] ノックアウトの確認

COX7RPがノックアウトされたことの確認は、COX7RP遺伝子のイントロン1に位置するプライマーF、又は挿入されたレトロウイルスベクター上に位置するプライマーLと、プライマーRとを用いてゲノムDNAをPCRすることにより野生型(WT: 489bp)と変異型(Mut: 289bp)の遺伝子型を判別し、COX7RP+/+ (+/+), COX7RP+/- (+/-)、及びCOX7RP-/- (-/-)のマウスを同定することにより行った。

前記プライマーF、R、Lの配列を以下に示す。

プライマーF: 5' - t c t g g t t g a g g t g g c c t t t g t g a c t t - 3' (配列番号2)

プライマーR: 5' - t t a t c c a g c a c c a a c c a t c t g c c a g a - 3' (配列番号3)

プライマーL: 5' - a a a t g g c g t t a c t t a a g c t a g c t t g c - 3' (配列番号4)

図2は、前記PCRによる産物を電気泳動した結果を示す図である。

## [0039] ー胎児線維芽細胞 (MEF) の調製ー

胎児線維芽細胞 (MEF) は胎生16日の胎児より調整し、10% fetal calf serum、100 units/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycinを含むDMEM (Dulbaco's modified Eagle's medium) 培地で、5% CO<sub>2</sub>、37°Cにて培養した。

## [0040] ーウエスタンブロット解析ー

胎児線維芽細胞 (MEF) のタンパク質の量を同一にしたサンプル (+/+、+/-、-/-) を SDS-PAGEゲルにて泳動後、Immobilion-P (Millipore) へブロットティングした。タンパク質の検出には、1次抗体としてCOX7RP、2次抗体としてHRP (horseradish peroxidase) -conjugated anti-rabbit IgG抗体 (Amersham Biosciences) を用い、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) により行った。その後、Stripping Buffer (62.5mM Tris-HCl、pH6.7、2% SDS、100mM 2-Mercaptoethanol) にて抗体を除去後、ローディングコントロールとして、一次抗体  $\beta$ -actin (SIGMA)、二次抗体HRP-conjugated anti-mouse IgG (Amersham Biosciences) を用いて検出した。

前記ウエスタンブロット解析の結果を図3に示す。図3に示すようにCOX7RPノックアウトマウス (COX7RP-/- (-/-)) の胎児線維芽細胞 (MEF) では、COX7RPタンパク質は検出されなかった。

## [0041] ーCOX活性の測定ー

COX活性の測定は、Chrzanowska-Lightowlers ZM, Turnbull DM, Lightowlers RN.、  
「A microtiter plate assay for cyto

chrome c oxidase in permeabilized whole cells.」、Anal Biochem.、214 (1)、45-49、1993に記載の方法に準じて行った。

即ち、胎児線維芽細胞 (MEF) を0.01% saponin、4nM 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride、100 $\mu$ M reduced cytochrome c、2 $\mu$ g/mL catalaseを含む0.1M phosphate buffer (pH7.0) 中で15分間インキュベートし、その後、450nmの吸光度を測定して求めた。

前記COX活性の測定結果を図4に示す。図4に示すようにCOX7RPノックアウトマウス (COX7RP-/- (-/-)) の胎児線維芽細胞 (MEF) では、野生型マウス (COX7RP+/+ (+/+)) の胎児線維芽細胞 (MEF) よりもCOX活性が低下していた。

[0042] -ATP産生量の測定-

ATP産生量の測定は、Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA.、「An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit.」、Mol Biol Cell.、13 (11)、3836-3844、2002に記載の方法に準じて行った。

即ち、胎児線維芽細胞 (MEF) を、150mM KCl、25mM Tris-HCl、pH7.4、2mM EDTA、10mM potassium phosphate、0.1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% bovine serum albumin、50 $\mu$ g/mL digitoninの組成の溶液に懸濁したものに、1mM malate、1mM pyruvate、1mM ADP、0.15mM adenylate kina

se inhibitor P1, P5-di (adenosine) pentaphosphateになるようにこれらの試薬を加え、37°Cで10分間インキュベートした。その後、2分間煮沸して反応を停止させ、Enliten assay system (Promega) を用いてATPを定量した。

前記ATP産生量の測定結果を図5に示す。図5に示すようにCOX7RPノックアウトマウス(COX7RP-/- (-/-))の胎児線維芽細胞(MEF)では、野生型マウス(COX7RP+/+ (+/+))の胎児線維芽細胞(MEF)よりもATP量が低下していた。

[0043] 前記COX活性の測定、及びATP産生量の測定結果から、COX7RP遺伝子は、COX活性を制御することによって、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生を促進することが示された。

[0044] (試験例1)

<通常食飼育における生存期間の測定：寿命>

COX7RPノックアウトマウスと、同腹の野生型マウスとを通常の餌で飼育し、生存期間を測定した。なお、ノックアウトマウスはn=10、野生型マウスはn=12で行った。

結果を図6に示す。図6は、野生型マウス及びCOX7RPノックアウトマウスの生存曲線(Kaplan-Meier survival curves)を示す。

図6から、注目すべきことに最大寿命が、野生型マウスでは777日であったのに対し、ノックアウトマウスでは830日に延長していた。

[0045] (試験例2)

<通常食飼育、及び高脂肪食飼育における体重変化の測定：肥満>

—通常食飼育—

6週齢から35週齢になるまで、COX7RPノックアウトマウスと、同腹の野生型マウスと(それぞれ、n=10)を、通常の餌で飼育し、週1回体重を測定した。



結果を図7A（オス）と図7B（メス）に示す。

図7Aと図7Bから、COX7RPノックアウトマウスは、通常食で飼育した状態において、統計学的に有意に野生型より体重が少ないことが明らかになった。なお、図7A及び図7B中、「\*」は、 $P < 0.05$ であることを示す。

[0046] ー高脂肪食飼育ー

17週齢から27週齢になるまで、COX7RPノックアウトマウスと、同腹の野生型マウスと（それぞれ、 $n = 10$ ）を、高脂肪食（High Fat Diet 32, Creal）を自由給餌にて飼育し、週1回体重を測定した。

結果を図8A、及び図8Bに示す。図8Aは、オスの野生型マウス及びCOX7RPノックアウトマウスの体重変化を示し、図8Bは、メスの野生型マウス及びCOX7RPノックアウトマウスの体重変化を示す。

図8A、及び図8Bから、COX7RPノックアウトマウスは、高脂肪食で飼育した状態においても、野生型より体重が少ないことが明らかになった。

なお、図8A中、「\*」は、 $P < 0.05$ であることを示し、図8B中、「\*\*」は、 $P < 0.01$ であることを示す。

[0047] また、前記高脂肪食飼育の測定終了時に、高脂肪食肥満モデルにおける野生型マウスとCOX7RPノックアウトマウス（それぞれ、 $n = 7$ ）の肝臓、腎臓、心臓、骨格筋、皮下脂肪組織（鼠径部）、腹腔内脂肪組織（腎周囲、精巣上体周囲、子宮周囲）の重量を測定した。

結果を図9A～図9Dに示す。図9Aは、オスの野生型マウス（WT）、及びCOX7RPノックアウトマウス（KO）の肝臓、腎臓、心臓、骨格筋の重量を示し、図9Bは、オスの野生型マウス（WT）、及びCOX7RPノックアウトマウス（KO）の腎周囲、精巣上体周囲、及び鼠径部の脂肪組織の重量を示し、図9Cは、メスの野生型マウス（WT）、及びCOX7RPノックアウトマウス（KO）の肝臓、腎臓、心臓、骨格筋の重量を示し、

図9Dは、メスの野生型マウス（WT）、及びCOX7RPノックアウトマウス（KO）の腎周囲、子宮周囲、及び鼠径部の脂肪組織の重量を示す。

図9A～図9Dから、COX7RPノックアウトマウスの各重量は、野生型マウスの各重量よりも軽くなっており、COX7RPノックアウトマウスは、脂肪食における肥満に対して抵抗性を有していることが明らかになった。

なお、図9B、図9D中、「\*」は、 $P < 0.05$ であることを示し、「\*\*」は、 $P < 0.01$ であることを示す。

[0048] (試験例3)

<糖負荷試験（OGTT）、インスリン負荷試験（ITT）、並びに、トリグリセライド（TG）、コレステロール、及び遊離脂肪酸（NEFA）の測定：糖代謝、脂質代謝>

—糖負荷試験（OGTT）—

マウスを16時間絶食させた後、グルコース（ $1.5 \text{ mg/g body weight}$ ）を経口投与し、0分後、30分後、60分後、120分後に尾静脈より採血した。前記マウスとしては、COX7RPノックアウトマウスと、同腹の野生型マウスと（それぞれ、 $n=7$ ）を用いた。

血糖値は、Glutest Pro R（株式会社三和化学研究所）を用いて測定した。また、インスリン濃度は、ELISA法（生化学工業株式会社）で測定した。

結果を図10A、及び図10Bに示す。図10Aは、各採血時間におけるグルコース濃度示し、図10Bは、各採血時間におけるインスリン濃度を示す。図10A中、「\*\*」は、野生型マウスに対して $P < 0.01$ であることを示し、図10B中、「\*」は、野生型マウスに対して $P < 0.05$ であることを示す。

図10A、及び図10Bから、絶食後の血糖値は、ノックアウトマウスが野生型マウスよりも低く、さらに糖負荷試験による血糖値の上昇がノックアウトマウスにおいて低く保たれていることが明らかになり、糖代謝の改善が

みられた。また、その時の血中インスリンの濃度も低く保たれていた。

[0049] —インスリン負荷試験 (ITT) —

マウスを2.5時間絶食させた後、インスリン (0.5 units/kg) を腹腔内投与し、0分後、30分後、60分後、120分後に尾静脈より採血した血液を用いてグルコース濃度を測定した。前記マウスとしては、COX7RPノックアウトマウス (KO、n=3) と、同腹の野生型マウス (WT、n=6) とを用いた。

前記インスリン濃度は、ELISA法 (生化学工業株式会社) で測定した。

結果を図11に示す。図11は、各採血時間におけるインスリン濃度を示す。

図11から、ノックアウトマウス (KO) の方が、インスリンに対する血糖低下の反応性が有意に良好であることが示され、インスリン感受性の改善が示唆された。

なお、図11中、「\*」は、 $P < 0.05$ であることを示す。

[0050] —通常飼育時の血糖濃度、及びインスリン濃度—

前記糖負荷試験を行ったマウスについて、絶食を行っていない通常飼育時の血糖濃度、及びインスリン濃度を測定した結果を表1に示す。

[0051] [表1]

通常食事下における血糖値とインスリン濃度

	体重(g)	グルコース (mg/dl)	インスリン (pg/ml)
WT	35.1 ± 5.4	154.3 ± 40.3	2829.7 ± 457.4
COX7RP KO	31.1 ± 2.9*	114.7 ± 36.9*	1484.9 ± 359.3*

(n = 7)

表1中、「\*」は、野生型マウスに対して $P < 0.05$ であることを示す。

[0052] 表1の結果から、絶食を行っていない通常飼育時においても、COX7R

Pノックアウトマウスでは、血糖濃度、及びインスリン濃度が低く保たれていることが明らかになった。

[0053] トリグリセライド (TG)、コレステロール、及び遊離脂肪酸 (NEFA) の測定—

前記マウスとして、COX7RPノックアウトマウスと、同腹の野生型マウスと (それぞれ、n=7) を用い、通常食事下、及び16時間絶食後の血中のトリグリセライド、コレステロール、遊離脂肪酸の濃度を測定した。結果を表2に示す。

前記トリグリセライドは、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。

前記コレステロールは、コレステロール E-テストワコー (和光純薬社製) を用いて測定した。

前記遊離脂肪酸は、NEFA C-テストワコー (和光純薬社製) を用いて測定した。

[0054] [表2]

		通常食事下		絶食後	
トリグリセライド (mg/dl)	WT	90.35 ± 36.35		78.90 ± 27.71	
	KO	114.58 ± 61.46		90.75 ± 58.79	
コレステロール (mg/dl)	WT	85.91 ± 14.23		88.16 ± 22.44	
	KO	119.65 ± 36.14**		103.96 ± 24.66	
遊離脂肪酸 (mEq/l)	WT	0.69 ± 0.15		1.32 ± 0.13	
	KO	0.70 ± 0.23		1.43 ± 0.21	

(n = 7) \*\*p<0.01

[0055] 表2の結果から、COX7RPノックアウトマウスにおいてコレステロールの有意な上昇が観察され、トリグリセライドについても上昇している傾向がみられたことから、COX7RPは脂質代謝にも関与していることが示された。

[0056] 前記試験例1~3の結果から、COX7RPは、糖代謝、脂質代謝、肥満

、及び寿命を制御することができる制御遺伝子であり、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の分子標的となり得ることが示された。

### 産業上の利用可能性

[0057] 本発明の制御遺伝子は、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命を制御することができるので、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の分子標的として好適に利用可能である。

本発明のタンパク質は、前記遺伝子によって発現するので、アンチエイジング、メタボリック症候群、糖・脂質代謝異常、及び肥満症の分子標的として好適に利用可能である。

また、本発明のスクリーニング方法により探索される物質は、アンチエイジング素材、薬剤、並びにメタボリックシンドロームとそれに関係の深い糖尿病、高脂血症、肥満症の改善及び予防に利用できる医薬や食品添加物などとして利用可能である。

## 請求の範囲

[請求項1] 下記（A）及び（B）のいずれかで示され、糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御することを特徴とする制御遺伝子。

（A）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

（B）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

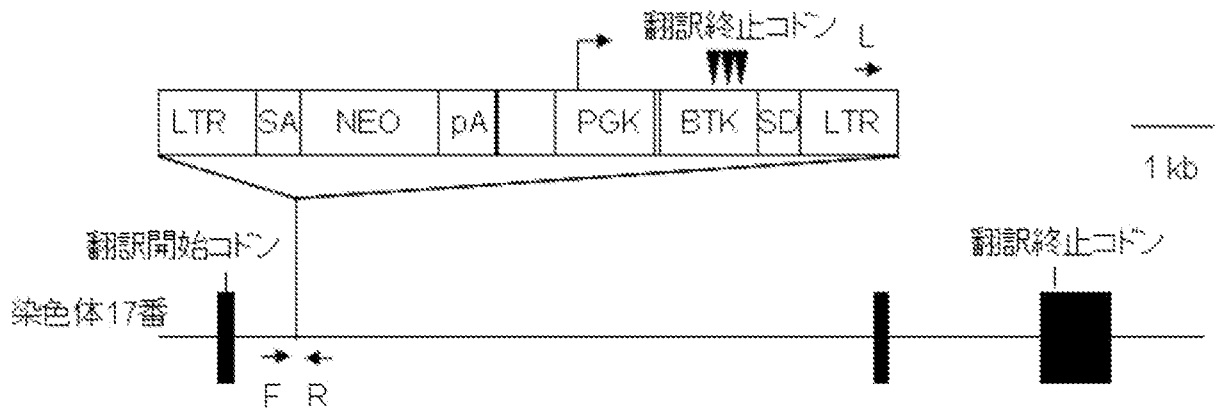
[請求項2] 糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御し、下記（A）及び（B）のいずれかで示される遺伝子によって発現することを特徴とするタンパク質。

（A）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

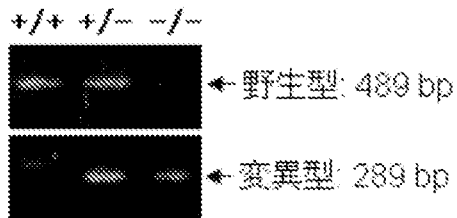
（B）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、及び、前記DNAの相補鎖のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

[請求項3] 糖代謝、脂質代謝、肥満、及び寿命の少なくともいずれかを制御する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、請求項1に記載の制御遺伝子の発現の抑制、及び請求項2に記載のタンパク質の活性の抑制の少なくともいずれかを指標とすることを特徴とするスクリーニング方法。

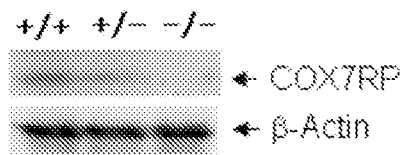
[図1]



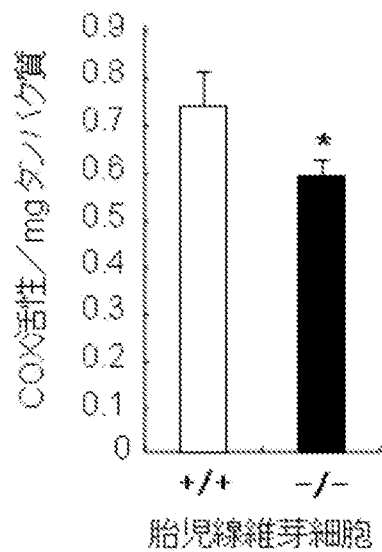
[図2]



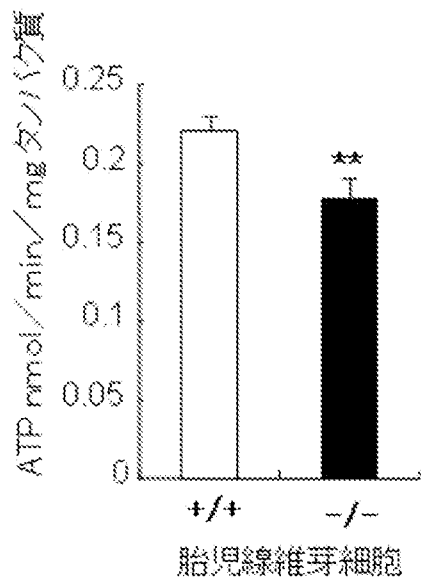
[図3]



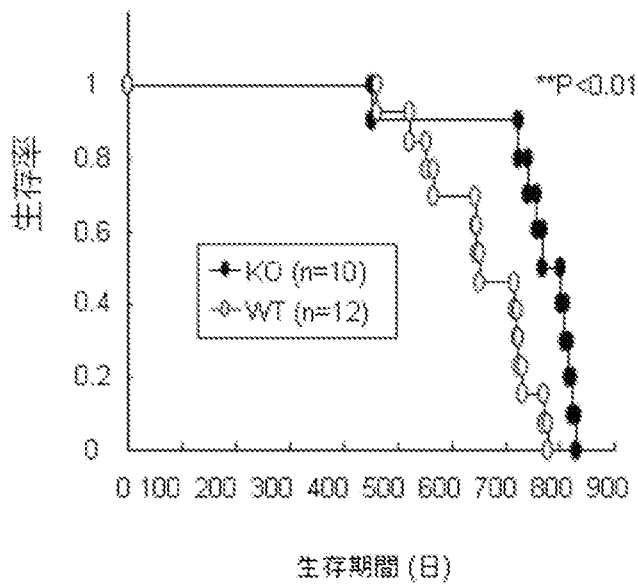
[図4]



[図5]

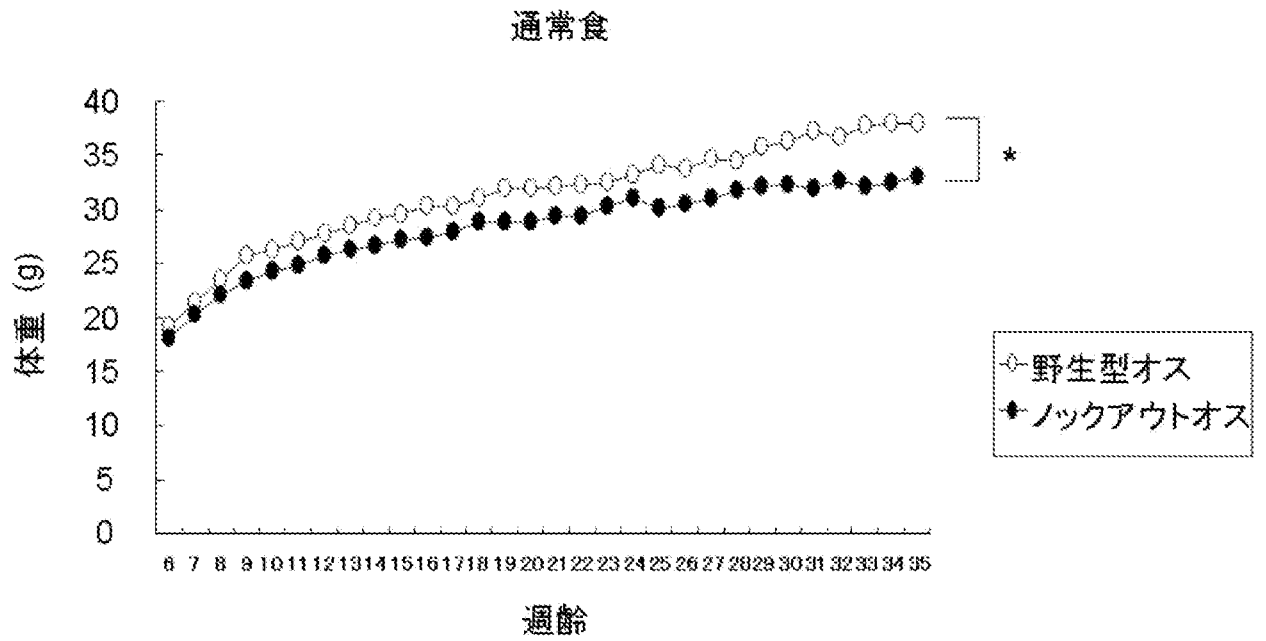


[図6]

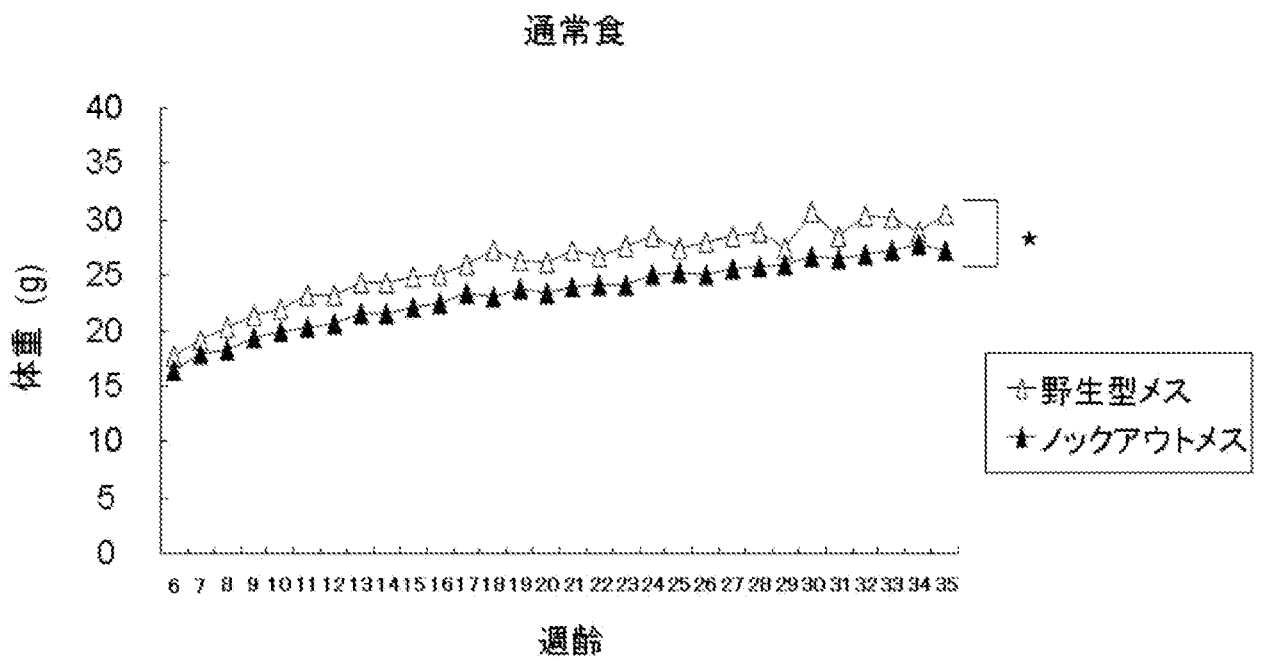




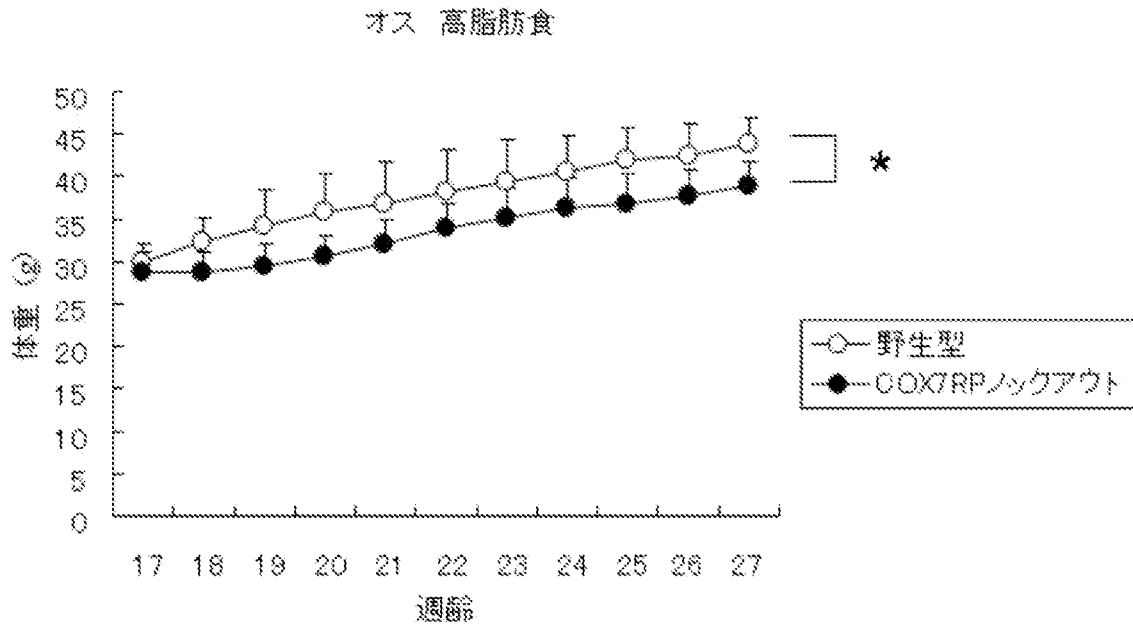
[図7A]



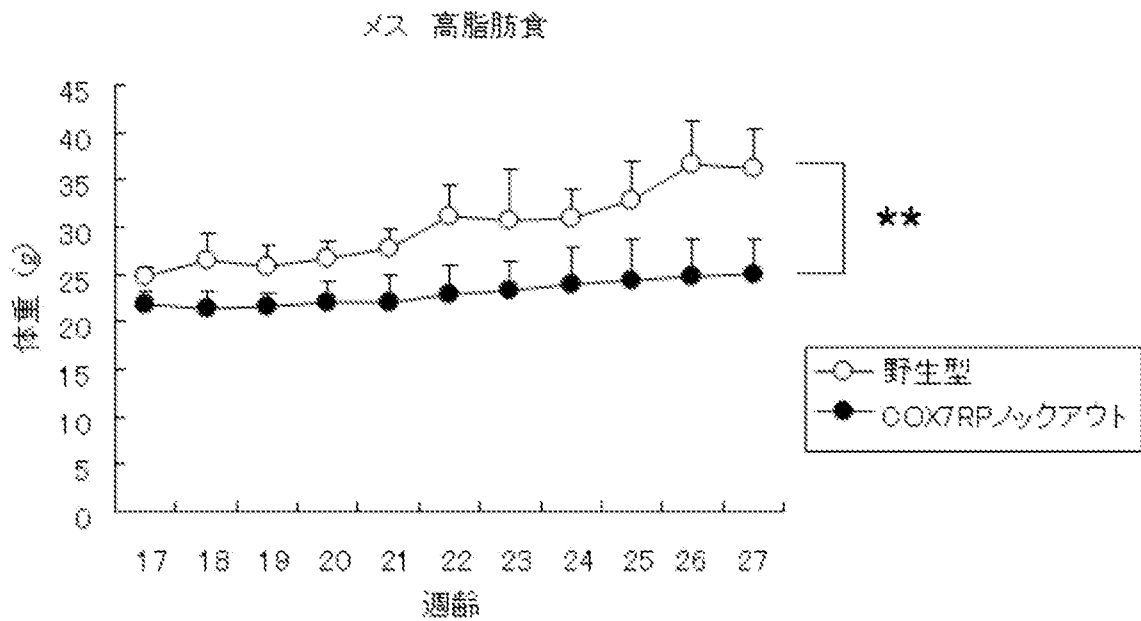
[図7B]



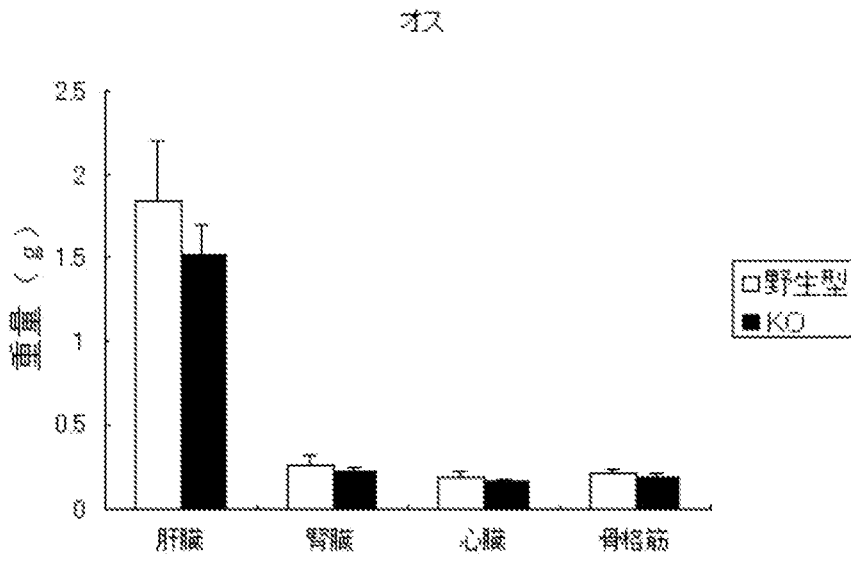
[図8A]



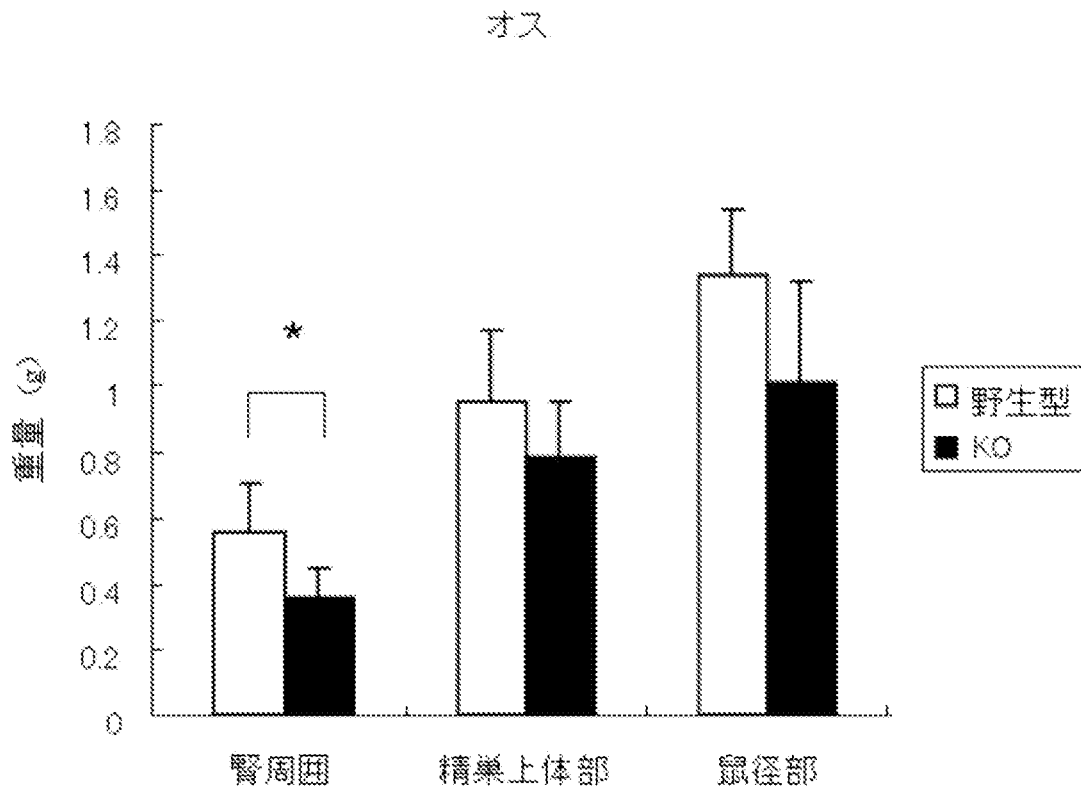
[図8B]



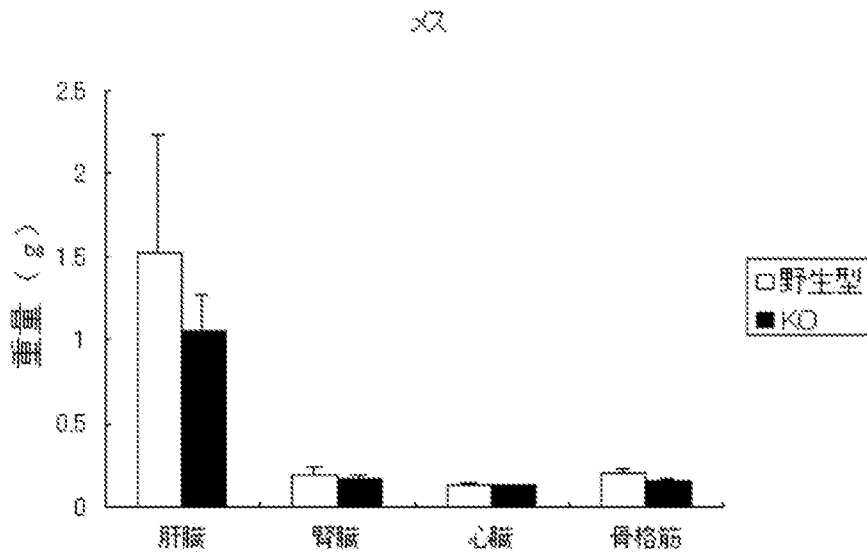
[図9A]



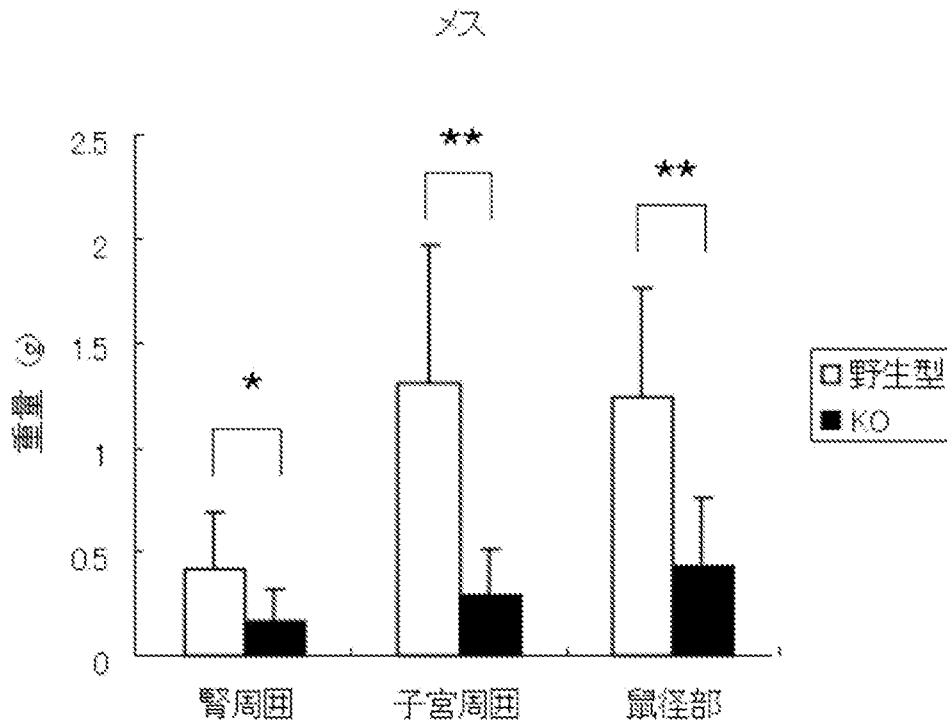
[図9B]



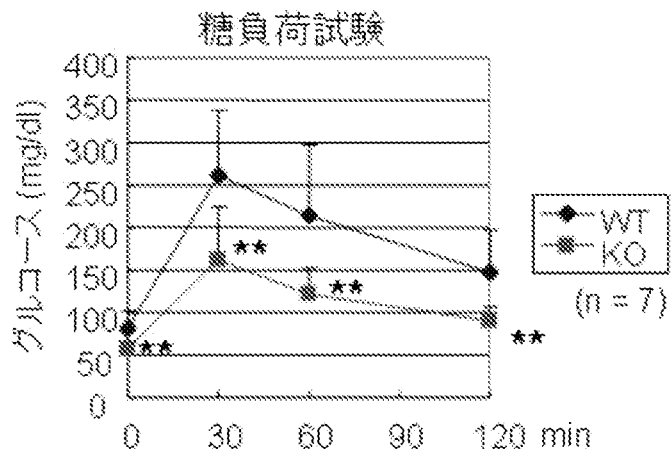
[図9C]



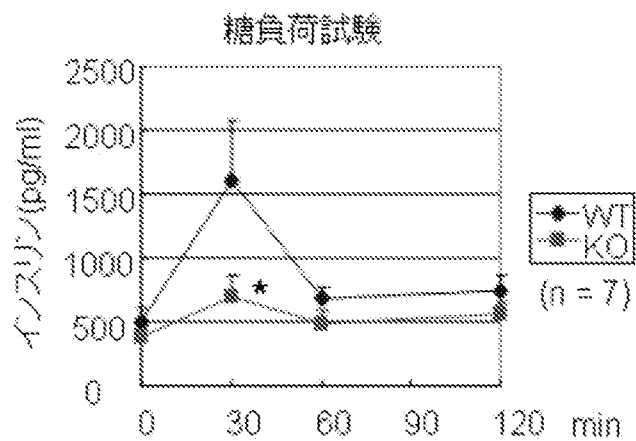
[図9D]



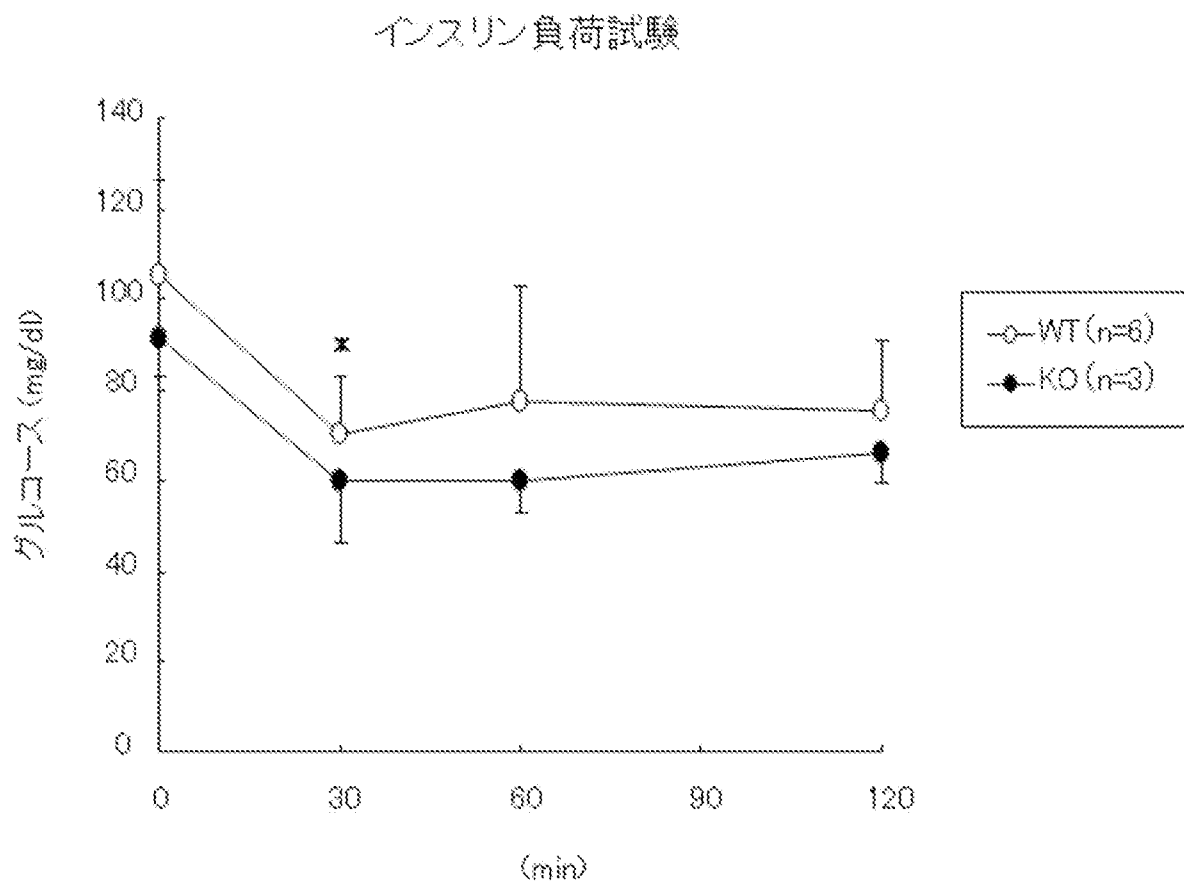
[図10A]



[図10B]



[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/050331

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)n, A61K38/00(2006.01)n, A61K48/00(2006.01)n, A61P3/04(2006.01)n, A61P3/06(2006.01)n, A61P3/10(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50, A61K31/713, A61K38/00, A61K48/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2008/156172 A1 (Saitama Medical University), 24 December 2008 (24.12.2008), sequence no: 41 & US 2010-0173405 A & EP 002184352 A1	1, 2/3
X/A	WO 2006/020269 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER), 23 February 2006 (23.02.2006), SEQ ID NO: 186 & JP 2008-506415 A & EP 001797425 A & CA 002574727 A & CN 101137903 A	1, 2/3
X/A	WATANABE T et al., Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library., Mol Cell Biol., 1998, Vol.18, No.1, p.442-449	1, 2/3

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 February, 2011 (16.02.11)

Date of mailing of the international search report  
01 March, 2011 (01.03.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/050331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	SCHMIDT TR et al., Retention of a duplicate gene through changes in subcellular targeting: an electron transport protein homologue localizes to the golgi., J Mol Evol., 2003, Vol.57, No.2, p.222-228	2/1,3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)n, A61K38/00(2006.01)n, A61K48/00(2006.01)n, A61P3/04(2006.01)n, A61P3/06(2006.01)n, A61P3/10(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50, A61K31/713, A61K38/00, A61K48/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	WO 2008/156172 A1 (埼玉医科大学) 2008.12.24, 配列番号:41 & US 2010-0173405 A & EP 002184352 A1	1, 2/3
X/A	WO 2006/020269 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 2006.02.23, SEQ ID NO:186 & JP 2008-506415 A & EP 001797425 A & CA 002574727 A & CN 101137903 A	1, 2/3

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

16.02.2011

国際調査報告の発送日

01.03.2011

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	4868
光本 美奈子		
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	WATANABE T et al., Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library., Mol Cell Biol., 1998, Vol.18, No.1, p.442-449	1,2/3
X/A	SCHMIDT TR et al., Retention of a duplicate gene through changes in subcellular targeting: an electron transport protein homologue localizes to the golgi., J Mol Evol., 2003, Vol.57, No.2, p.222-228	2/1,3