

(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
2010年8月5日(05.08.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/087243 A1

PCT

(51) 国際特許分類:

A61K 38/00 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/050507

(22) 国際出願日: 2010年1月18日(18.01.2010)

(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 2009-018455 2009年1月29日(29.01.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 北海三共株式会社(Hokkaisankyo Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒0600042 北海道札幌市中央区大通西8丁目1番地 Hokkaido (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 松村健(MATSUMURA, Takeshi) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 安野理恵(YASUNO, Rie) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 杉本千尋(SUGIMOTO, Chihito) 田林紀子(TABAYASHI, Noriko) [JP/JP]; 〒0611111 北海道北広島市北の里27番地4 北海三共株式会社農業科学研究所内 Hokkaido (JP). 加賀谷羽衣子(KAGAYA, Uiko) [JP/JP]; 〒0611111 北海道北広島市北の里27番地4 北海三共株式会社農業科学研究所内 Hokkaido (JP). 宮代裕子(MIYASHIRO, Hiroko) [JP/JP]; 〒0611111 北海道北広島市北の里27番地4 北海三共株式会社農業科学研究所内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 葛和清司(KUZUWA, Kiyoshi); 〒1620067 東京都新宿区富久町8番21号 T & Tビル 葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).

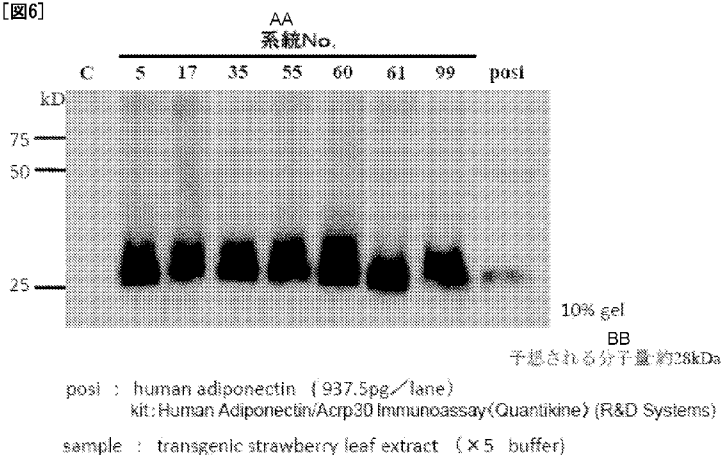
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

[続葉有]

(54) Title: ADIPONECTIN-CONTAINING EATING BEHAVIOR CONTROL AGENT FOR ORAL ADMINISTRATION

(54) 発明の名称: アディポネクチンを含有する経口用摂食調整剤

[図6]



AA... LINE No.
BB... PREDICTED MOLECULAR WEIGHT: ABOUT 28 kDa

(57) Abstract: Disclosed is a technique that facilitates the oral ingestion of adiponectin in a large quantity and enables the expansion of the range of use applications of adiponectin. Specifically disclosed is an eating behavior control agent for oral administration, which comprises adiponectin as an active ingredient. Particularly, the eating behavior control agent comprises a transformant capable of expressing adiponectin. Also specifically disclosed is a food composition for controlling eating behavior, which comprises the eating behavior control agent.

(57) 要約: 本発明の課題は、アディポネクチンの経口による大量摂取を容易にし、その利用の幅を広げる技術を提供することである。本発明は、アディポネクチンを有効成分として含有する、経口用摂食調整剤、とくにアディポネクチンを発現する形質転換体を含有する、前記の経口用摂食調整剤、および前記経口用摂食調整剤を含有する摂食調整用食品組成物に関する。



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.

(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, 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:

- (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, 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

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

明 細 書

発明の名称： アディポネクチンを含む経口用摂食調整剤

技術分野

[0001] 本発明は、アディポネクチンを含む摂食調整剤に関する。

背景技術

[0002] アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一種で、メタボリック症候群と密接な関係があることが指摘されている。これまで、メタボリック症候群を改善するため、アディポネクチン産生を促進することを目的として、乳酸菌（特許文献1）、酵母（特許文献2）、冬虫夏草の熱水抽出物（特許文献3）、トリグリセリド（特許文献4）、アシルアミド化合物（特許文献5）など、種々の物質について検討されている。また一方で、アディポネクチンやその断片などを体内に投与することによって、癌（特許文献6）、炎症性疾患（特許文献7）、動脈硬化症（特許文献8）などを治療または予防を行う試みもなされている。さらに、アディポネクチンが視床下部AMPキナーゼを活性化し摂食亢進することが報告され（非特許文献1）、アディポネクチンによって食欲がコントロールされるモデルが提案されている（非特許文献2）。

[0003] 本発明者らは、既に、アディポネクチンの経口投与の可能性を探り、経口投与時におけるアディポネクチンの生物活性について検討してきたが（非特許文献3）、その内容については、さらなる検討と実証が必要であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2008-63289号公報

特許文献2：特開2008-63293号公報

特許文献3：特開2007-31302号公報

特許文献4：特開2008-24647号公報

特許文献5：特開2008-105945号公報

特許文献6：特開2004-345968号公報

特許文献7：特許第3018186号公報

特許文献8：特許第4147220号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：N. Kubota et al. (2007) "Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake" Cell Metabolism Vol.6, p55-68.

非特許文献2：G. R. Steinberg and B. E. Kemp (2007) "Adiponectin: Starving for Attention" Cell Metabolism Vol.6, p3-4.

非特許文献3：安野ら (2007) 「ヒトアディポネクチン遺伝子組換え植物の作出と機能解析」、BMB 2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) 講演要旨集、350頁、2007年11月25日発行。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、アディポネクチンの経口による大量摂取を容易にし、その利用の幅を広げる技術を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく研究を進める中で、ヒトアディポネクチンを産生する形質転換イチゴを作出し、その果実をマウスに与えることによってアディポネクチンの経口投与による作用を確認していたところ、これまで知られている作用とは全く異質の作用、すなわち摂食による摂食調整作用を見出し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち本発明は、アディポネクチンを有効成分として含有する、経口用摂食調整剤に関する。

さらに本発明は、アディポネクチンを発現する形質転換体を含有する、前記の経口用摂食調整剤に関する。

また本発明は、アディポネクチンを発現する形質転換体が、

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA、または、
(b) (a) の塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチドをコードする DNA からなる遺伝子を導入した形質転換体である、前記の経口用摂食調整剤に関する。

[0009] さらに本発明は、アディポネクチンを発現する形質転換体が、
(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、
(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 個または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を導入した形質転換体である、前記の経口用摂食調整剤に関する。

また本発明は、アディポネクチンを発現する形質転換体の可食性組織を含有する、前記の経口用摂食調整剤に関する。

さらに本発明は、可食性組織が生食可能である前記の経口用摂食調整剤に関する。

[0010] また本発明は、形質転換体が、形質転換植物である、前記の経口用摂食調整剤に関する。

さらに本発明は、アディポネクチンが、形質転換植物において発現したものである、前記の経口用摂食調整剤に関する。

また本発明は、形質転換植物において発現したアディポネクチン以外の動物由来成分を含有しない、前記の経口用摂食調整剤に関する。

さらに本発明は、形質転換植物において発現したアディポネクチン以外は植物由来成分である、前記の経口用摂食調整剤に関する。

[0011] また本発明は、植物がイチゴであり、可食性組織がイチゴ果実である、前記の経口用摂食調整剤に関する。

さらに本発明は、前記の経口用摂食調整剤を含有する、摂食調整用食品組

成物に関する。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、アディポネクチンを含有する経口用摂食調整剤を提供することができ、かかる経口用摂食調整剤を摂食することにより、摂食亢進をもたらすなど摂食調整が可能である。

[0013] また本発明は、経口用摂食調整剤とすることによって経口によってアディポネクチンを取り入れることを可能にするものであって、例えば、血中に直接的に投与するような場合と異なり、血中のアディポネクチン濃度を急激に変化させるものではないので身体への負担も殆どない。すなわち、安全性、安定性に優れたアディポネクチンを含む食品組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] 図1は、アディポネクチン標品経口投与マウスの肝臓における遺伝子発現プロフィール比較（対照：PBS投与）を示す。

[図2] 図2は、アディポネクチン標品経口投与マウスの脾臓における遺伝子発現プロフィール比較（対照：PBS投与）を示す。

[図3] 図3は、植物発現ベクターpBE2113へヒトアディポネクチン遺伝子を組み込んで作製したpBE-hAdiを示す。

[図4] 図4は、ゲノミックPCRによるイチゴ形質転換株（Km耐性株）におけるヒトアディポネクチン遺伝子の導入を確認した電気泳動図である。

[図5] 図5は、ヒトアディポネクチン高発現系統のアディポネクチン濃度を示すグラフである。

[図6] 図6は、ヒトアディポネクチン高発現系統のウエスタンブロットを示す。

[図7] 図7は、イチゴ果実発現ヒトアディポネクチンのウエスタンブロットを示す。

[図8] 図8は、構築したレトロウイルスをアッセイ系細胞(Huh7)に感染させ、アディポネクチンを添加した場合のルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

。

[図9] 図 9 は、アディポネクチン発現イチゴ経口投与（摂食）マウスの肝臓における遺伝子発現プロファイル比較（対照：非組換えイチゴ投与）を示す。

[図10] 図 10 は、アディポネクチン発現イチゴ経口投与（摂食）マウスの脾臓における遺伝子発現プロファイル比較（対照：非組換えイチゴ投与）を示す。

[図11] 図 11 は、アディポネクチン発現イチゴ経口投与（摂食）マウスの小腸における遺伝子発現プロファイル比較（対照：非組換えイチゴ投与）を示す。

[図12] 図 12 は、アディポネクチン発現イチゴ経口投与（摂食）マウス血清の生化学的解析（グルコース含量）を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明に係るアディポネクチンを有効成分として含有する経口用摂食調整剤は、摂食することによって摂食亢進または摂食抑制に作用し、摂食調整が可能である。かかるアディポネクチンとしては、任意の動物由来のものを用いることができるが、経口にて摂取する観点から、ヒト、ウシ、ブタなど哺乳動物に由来するものが好ましい。

[0016] 本発明において、「経口用摂食調整剤」とは、例えば、「第 15 改正日本薬局方 製剤総則」に記載の方法に従った製剤の常法によって調製されるもので、経口用に適したものであればよい。剤型は、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、散剤、錠剤などをあげることができる他、経口用摂食調整剤の剤型に応じて、各種の添加剤、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、コーティング剤などを配合してもよい。また、経口用摂食調整剤は、人為的に配合した組成物だけに限定されるものではなく、例えば、食品用に用いられる各種の組成物はもちろん、葉、根、果実などの野菜や果物などの食品素材や、飲料料などの加工した最終製品（食品）をも含み、およそ摂食の対象となる任意のものを包含する概念を示している。

[0017] 本発明に係る経口用摂食調整剤は、アディポネクチンを発現する形質転換

体を含有してもよい。前記形質転換体は、摂食に問題がなく、形質転換によりアディポネクチンが発現しているものであれば、とくに限定されない。例えば、納豆菌、乳酸菌、酢酸菌、酵母、担子菌などの従来から食品に用いられる微生物の形質転換体や、アディポネクチンを高発現する形質転換動物であってもよいが、とくに経口で摂取することや、動物に感染性を有する病原体（ウイルス、菌類、細菌類、寄生生物等）の汚染の危険性を回避することが可能であるため、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、イチゴ、トマト、ジャガイモ、レタス、ダイズ、アズキなどの形質転換植物が好ましい。

[0018] また、前記形質転換体は可食性組織を有していることが好ましい。かかる可食性組織としては、例えば、担子菌の子実体（キノコ）、植物の果実（例えば、イチゴ果実、トマト）、根（大根、ジャガイモ）、葉（キャベツ、レタス）、種子（イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシなど穀物およびダイズ、アズキなど豆類）などが挙げられる。なかでも、加熱などの調理によってアディポネクチンが変性しないことや摂食が簡便であることから、生食が可能な可食性組織が好ましい。

[0019] 形質転換体の作成方法は、とくに限定されず、一般によく知られる方法で作出することができる。例えば、カルシウム法によるコンピテント化を利用する方法（主に細菌）、ファージやプラスミドなどのベクターを用いる方法（主に細菌）、プロトプラスターPEG法（主に糸状菌）、リチウム法（主に酵母）、エレクトロポレーション法、パーティクルガンによる方法、アグロバクテリウム法（植物）など、各種の対象に適した形質転換法を用いることができる。

[0020] 本発明のアディポネクチンを発現する形質転換体は、一態様において、（a）配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、または、（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチドをコードするDNA、からなる遺伝子を導入してなる。

[0021] 配列番号1に記載の塩基配列は、ヒトアディポネクチン遺伝子 (NCBI Acces

sion No. NM_004797)の翻訳領域および終止コドン(85番~819番まで)を表している。

[0022] また、ここでいう「ストリンジントな条件」とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。かかる条件は、当業者が理解するものであるが、例えば、99.5%以上であるような相同性が高い核酸同士はハイブリダイズするが、それより相同性が低いDNA同士はハイブリダイズしないような条件が挙げられる。

[0023] 本発明のアディポネクチンを発現する形質転換体は、一態様において、(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、(b)配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチド、をコードする遺伝子を導入してなる。

[0024] ここで、「1個もしくは数個」とは、アミノ酸が付加、欠失もしくは置換されるアミノ酸残基の前記ポリペプチドの立体構造における部位またはアミノ酸残基の種類によって異なり得るが、通常2~20個、好ましくは2~15個程度を指す。

また、「アディポネクチン活性を有する」とは、アディポネクチンの有する活性のうち少なくとも1つを有することを意味し、好ましくは、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の活性を有する。

[0025] かかるアディポネクチン活性としては、例えば、前記特許文献6(特開2004-345968号公報)などに記載されているような、アディポネクチンの作用としてよく知られた活性：

(1) C2C12細胞における、AMPK活性化作用およびACC抑制作用、グルコース取り込み促進活性、脂肪酸酸化促進活性(Nat. Med. 8:1288-1295, 2002)；

(2) 初代培養肝細胞におけるAMPK活性化作用(Nat. Med. 8:1288-1295, 2002)、グルコース放出抑制作用(Nat. Med. 7:947-953, 2001)；

(3) 血管内皮細胞におけるVCAM-1、ICAM-1、E-Selectin

t i n (Circulation 100:2473-2476, 1999) ;

(4) マクロファージにおける、コレステロールエステル量の低下 (Eur. J. Clin. Invest. 27:285, 1997) 、リピッドドロップレット蓄積低下 (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19:1333, 1999) 、スカベンジャーレセプター (Biochem. Biophys. Res. Commun. 22:277, 2000) 、またはリポ蛋白質リパーゼ (L P L) 発現抑制活性 (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 522, 1995) 、または T N F - α 産生抑制活性 ;

(5) 血管平滑筋細胞の増殖・遊走抑制活性 (Circulation 105:2893, 2002) ;

(6) コラーゲン I 、 I I I 、 V 結合活性 (Horm. Metab. Res. 32:47-50, 2000) 、
などが挙げられる。

[0026] また、本発明者らの構築した Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) プロモーターとルシフェラーゼを利用したアディポネクチンの評価系においても簡便に確認することができる (下記実施例「3. PEPCK プロモーター—ルシフェラーゼを利用したアディポネクチンの評価系」参照) 。

本発明のアディポネクチンを含有する経口用摂食調整剤を液体で投与する場合のアディポネクチンの投与濃度は、適宜設定することができるが、例えば、経口投与により有害性が認められないとの観点から、母乳における含有量である $10 \text{ ng/ml} \sim 20 \text{ ng/ml}$ (L. J. Martin et al., Am J Clin Nutr 2006, Vol. 83, p1106-1011) を基準として調整することが可能である。

[0027] また、本発明のアディポネクチンを含有する経口用摂食調整剤を固体または液体で投与する場合、アディポネクチンの投与量および含有量は、適宜調整することができる。とくにアディポネクチン源として、形質転換体イチゴ果実を利用する場合、次のように調整することができる。すなわち、収穫した果実を一まとめ (= 1 バッチ。なお、栽培区画、収穫期間、組換え体の系統などを勘案して、任意に 1 バッチを規定することができる) として、1 バ

ッチ毎の果実全体を凍結磨砕（もしくはジュース化）等の処理を施し、1バッチ中のアディポネクチン濃度を測定する。これに、適宜、非組換えイチゴ果実を任意に混合し、投与量および含有量の調整する。そして、利用者の健康状態に応じた組換えアディポネクチン含量を調整することができる。

以下に本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明は、これらの態様に限定されるものではない。

実施例

[0028] 1. アディポネクチンの経口投与による活性評価

精製アディポネクチン標品（recombinant human adiponectin、R & D Systems社製）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（組成：137mM 塩化ナトリウム、2.7mM 塩化カリウム、10mM リン酸水素2ナトリウム、1.8mM リン酸2水素カリウム pH 7.4）に10 μ g / 20 μ lの濃度で溶解し、得られたアディポネクチン水溶液を標準的な体型のマウス（Balb/c、メス8週齢）に1回あたり20 μ lを経口的に投与した。対照として、PBSのみを1回あたり20 μ lを経口的に投与した。これを5日間連続して行い、最終投与後6時間後に脊髄脱臼した後、内臓（肝臓、脾臓）を摘出し、試料とした。各試料をRNALater（Ambion, Inc）に浸漬後、-80℃に凍結した。凍結した試料からmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析をAffimetrix社Gene Chip（Mouse Genome 430 2.0、1-cycle target labeling プロトコール）を用いて行った。投与群と対照群とのデータを比較し、発現亢進、あるいは抑制が起きている遺伝子を同定した。

[0029] 投与群と対照群の遺伝子発現プロファイル比較をスクアッタープロットで示した（図1および2）。アディポネクチン受容体が存在する肝臓では、発現亢進（5倍以上）されたものは、150遺伝子であり、発現抑制（1/5以下）されたものは64遺伝子であった。

発現が亢進した遺伝子として、以下のものが認められた；ELAV-like 2、defensin beta 8、DEAD box polypeptide 24、CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2A、early B-cell factor 3、SH3-domain kinase bind

ing protein 1, olfactomedin 3, Kinesin family member 16B, leucine rich repeat containing 52, Septin 11, tripartite motif-containing 36, catenin delta 1, opioid receptor mu 1, phosphatase and actin regulator 1, protein phosphatase 1 regulatory (inhibitor) subunit 9A, transient receptor potential cation channel, regulator of G-protein signaling 18, Spire homolog 1 ,

[0030] zinc finger protein 423, chemokine ligand 15, junction adhesion molecule 2, ubiquitin-activating enzyme E1, Rho GTPase activating protein 23, Ssu72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog, Yip1 domain family member 6, Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich, DCP1 decapping enzyme homolog b , syndecan binding protein, F-box and WD-40 domain protein 19, nucleoporin 153, Thyroid hormone receptor beta, prolactin-like protein C 1, Shc SH2-domain binding protein 1, FAT tumor suppressor homolog 4, amiloride-sensitive cation channel 3, Eyes absent 3 homolog, testis expressed gene 13,

[0031] RGM domain family, member B, methyl-CpG binding domain protein 3-like 2, mesoderm posterior 2, prostaglandin F receptor, nucleolar complex associated 2 homolog, potassium voltage-gated channel (shaker-related subfamily member 4), ankyrin repeat domain 44, MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4, fibronectin type III domain containing 1, pantothenate kinase 2 (Hallervorden-Spatz syndrome), Lemur tyrosine kinase 2, cyclic nucleotide gated channel alpha 2, RAD54 like, carbonic anhydrase 3, PR domain containing 8, Chaperonin subunit 4 (delta), SAM domain and HD domain 1,

[0032] chromodomain helicase DNA binding protein 8, sperm associated antigen 1, Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1, ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible), six transmembrane epithelial antigen of prostate 2, Neural cell adhesion molecule 1, Ubiquitin-conjugating e

nzyme E2R 2、TAF11 RNA polymerase II、SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1、fibroblast growth factor 4、Rho guanine nucleotide exchange factor15、SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1、heparin-binding EGF-like growth factor、Calcium channel、Serine/arginine repetitive matrix 1、

[0033] protocadherin beta 15、DEAD box polypeptide 25、seminal vesicle antigen-like 2、similar to late cornified envelope protein、protein kinase cAMP dependent regulatory, type II beta、coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3、tetratricopeptide repeat domain 9、intraflagellar transport 57 homolog、IQ motif and Sec7 domain 1、diacylglycerol kinase iota、Protein kinase (cGMP-dependent type I)、cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 6、SWI/SNF related、vomeronasal 1 receptor D4、ATPase, Na⁺/K⁺ transporting(alpha 1 polypeptide)、cholinergic receptor、ELAV-like 4、solute carrier family 25 member 31。

[0034] また、発現が抑制された遺伝子として、以下のものが認められた；Histocompatibility 2K region、growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma、sema domain(semaphorin) 4D、transformation related protein 53、matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)、regulator of G-protein signaling 16、phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta、ATP-binding cassette sub-family F (GCN20) member 1、HCF-binding transcription factor Zhangfei、methionine aminopeptidase 2、ring finger protein 2、ubiquitin-conjugating enzyme E2C、prosaposin、arylacetamide deacetylase-like 1、nuclear factor I/X、glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked、vesicle-associated membrane protein、ADP-ribosylation factor 4-like、CCAAT/enhancer binding protein beta、

[0035] nuclear receptor subfamily 0 group B member 2、spastic paraplegia 20、DNA-damage-inducible transcript 4、cyclin-dependent kinase 5、regul

atory subunit (p35) 1、methyltransferase like 7A、sialic acid binding Ig-like lectin 1、insulin-like growth factor binding protein 1、solute carrier organic anion transporter family, member 1a1、PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A、GNAS complex locus、amyloid beta (A4) precursor-like protein 2、phosphoenolpyruvate carboxykinase 1、interleukin 2 receptor gamma chain、TSG22 domain family 3、solute carrier family 45 member 3、macrophage receptor with collagenous structure、ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1。

脾臓では52遺伝子が発現亢進され、また109遺伝子が発現抑制された。

[0036] この結果から、アディポネクチンを含む組成物を経口的に投与した場合、遺伝子発現に変化が生じることが明確に示された。すなわち、アディポネクチンを摂食した場合、食物消化作用によってアディポネクチンが分解、消化されてしまい何らの影響も与えないのではないかと一般的な考え方を否定し、アディポネクチンを摂食することが有意義であることが明確に示されたといえる。これは特に、例えば、腸溶性カプセルなどの薬物送達を念頭に置いた経口投与用医薬ではなく、通常の摂食である点でも有意義であり、アディポネクチンを含有する食品組成物を摂食することでアディポネクチンの効果を得ることができることを示唆するものである。

[0037] 2. ヒトアディポネクチン発現イチゴの作出

(1) ヒトアディポネクチン人工合成遺伝子の作製

ヒトアディポネクチン遺伝子(NCBI Accession No. NM_004797)の翻訳領域(Position 85-816)(以下、hAdiとも記す)をコードするロングプライマーを人工合成し、オーバーラップ法にて当該遺伝子の翻訳領域を作製した。この人工合成遺伝子をTAクローニング法でpGEM-T vector(Promega)に導入してpGEM-b α LAを作出した。大腸菌の形質転換を通じて導入プラスミドpGEM-b α LAを回収し、これをシーケンス解析に供して遺伝子配列を同定した。

[0038] (2) 植物発現用ヒトアディポネクチン遺伝子の作製

次に、配列確認後のクローンpGEM-hAdiを鋳型に用いてアダプタープライマーによるPCRを行い、制限酵素認識配列およびタグ配列を付加した。即ち、5'末端側にBam HI、Xba I認識配列、3'末端側にHis-Tag (6xHis)、KDEL配列、終止コドン、ならびにSac I認識配列を持つ遺伝子を作製した。これをpGEM-T Vector (Promega)にクローニングし、pGEM-hAdi/His+KDELを得た。

[0039] (3) ヒトアディポネクチン遺伝子の植物発現ベクターpBE2113への組み込み

植物発現ベクターpBE2113-GUS (Mitsuhara et al. (1996) Plant and Cell Physiology Vol. 37, No. 1, p49-59) を制限酵素Xba I・Sac Iで同時消化した後、CIAP処理を施した。一方、ヒトアディポネクチン遺伝子cDNA断片は、pGEM-hAdi/His+KDELを制限酵素Xba I・Sac Iで同時消化して当該遺伝子領域を切り出して回収した。これらベクター側とcDNA断片を混和してライゲース処理を行い、pBE-hAdiを作製した(図3)。

[0040] なお、図3中の各略号は、夫々、次のとおりである：Pnos：ノパリン合成酵素 プロモーター、nptII：neomycin phosphotransferase II、Tnos：ノパリン合成酵素 ターミネーター、eP35S：カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター、H. Adiponectin：ヒトアディポネクチン遺伝子(配列番号1)、AdiFW1：AdiFW1プライマー(配列番号3)認識領域、AdiRV1：AdiRV1プライマー(配列番号4)認識領域、His tag：ヒスチジン・タグ、KDEL：小胞体保留シグナル。

[0041] (4) イチゴ形質転換(Km耐性株の作出)

ヒトアディポネクチン遺伝子植物発現用ベクターpBE-hAdiを直接導入法にてアグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404)に導入した。得られたカナマイシン(Km)耐性株(導入プラスミド確認済み)を用いてイチゴの形質転換試験を行った。Km添加培地を用いてカルス誘導と再分化を行い、Km耐性個体を選抜した。

[0042] (5) イチゴ形質転換株(Km耐性株)におけるヒトアディポネクチン遺伝子の導入確認

ヒトアディポネクチン遺伝子両端部に設定した特異的プライマーAdiFW1(

順方向プライマー)とAdiRV1(逆方向プライマー)を用い、ゲノミックPCRを行った。ゲノムDNAの抽出には核酸抽出キットMagExtractor-Plant Genome-(TOYOBO)を用い、核酸精製システムMagExtractor MFX-6100 (TOYOBO)を使用するプロトコールに準じて行った。PCR産物は、1. 5 %TBEアガロースゲルを用いた電気泳動により検出した。その結果、供試した23個体のうち21個体で目的の増幅断片(732bp)が検出され、遺伝子の導入が確認された(図4)。

AdiFW1プライマー配列: 5' -ATGCTGTTGCTGGGAGCTGTTCTA-3' (配列番号3)

AdiRV1プライマー配列: 5' -GGTGTGTCATGGTAGAGAAGAAAGCC-3' (配列番号4)

[0043] (6) ヒトアディポネクチン高発現系統の選抜

Human Adiponectin/Acrp30 Immunoassay (Quantikine) (R&D Systems)を用い、添付のプロトコールに準じて、エライザ検定を行った。100系統の培養株(夫々、系統No. 1~系統No. 100と記す)より葉組織を採取し、液体窒素存在下で粉末化した後、生重量の5倍量の磨砕用緩衝液(リン酸カリウム緩衝液pH 7.0 1% Triton X-100, Protease inhibitor (Roche Diagnostics GmbH; 濃度 1tablet/25ml))を添加して得られた磨砕液の遠心上清を、検定試料として供試した。

その結果、200ng/gFW以上の発現量を示す株が確認された(図5)。なお、200ng/gFW以上の発現量があれば、標準的なイチゴの一果実(約10g)で、母乳100mlに含まれるアディポネクチン量が確保できる。

[0044] (7) ウエスタンブロットによる発現確認

イチゴ発現ヒトアディポネクチンのタンパク解析を行うために、ウエスタンブロットを行った。イチゴ試料はエライザ検定と同様(前記(6)に記述)に調製したものを供した。還元剤(2-Me)を添加したLaemmliバッファー系でプレキャストゲルSDS-PAGE Mini 10% (TEFCO)を用いてSDS-PAGEを行った後、分離したタンパク質をHybond-P (GE Healthcare, Inc.)へ転写した。得られ

たブロットをECL blocking agent (GE Healthcare, Inc.)でブロッキングし、1次抗体としてMouse anti-adiponectin, human monoclonal antibody (CHEMICON) 5,000倍希釈液を、2次抗体としてAnti-Mouse IgG-Peroxidase, Goat (SIGMA)の10,000倍希釈液を反応させ、ECL plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Inc.)で検出した。

解析の結果、推定分子量(28kDa)の位置にバンドが確認され、ヒトアディポネクチンの葉組織における発現が確認された(図6)。

[0045] (8) ヒトアディポネクチン高発現イチゴ系統果実における発現解析

イチゴ果実におけるヒトアディポネクチンの発現および多量体形成の有無の確認を試みた。ヒトアディポネクチン高発現系統No. 5(以下、単に系統No. 5ともいう)を栽培し果実を採取した。イチゴ果実試料を液体窒素存在下で粉末化後、生重量の3倍量の磨砕用緩衝液(リン酸カリウム緩衝液, pH7.0, 1% Triton X-100, Protease inhibitor (Roche Diagnostics GmbH; 濃度 1tablet/25ml))を添加して得られた磨砕液の遠心上清をタンパク抽出液とした。同試料に、Lamlliサンプルバッファー(BIO-RAD)を添加し、タンパク量16.5 μ g/laneとなるように調整し、プレキャストゲルSDS-PAGE Mini 12%(TEFCO)を用いてSDS-PAGEを行い、前記(7)と同様のプロトコール(還元処理)でウエスタンブロットを行った。その結果、葉試料の場合と同様に、単量体の推定分子量である約28kDaの位置に2本のバンドが確認された(図7)。

[0046] 次に、多量体解析を目的として、還元剤を含まないサンプルバッファー(2%SDS, 20M Tris-HCl pH6.8, 10%Glycerol, 0.05%BPB, 0.05% XC)をタンパク質抽出液に添加した。タンパク量は16.5 μ g/laneに調整し、30分間インキュベートした後、熱処理を行わず、4-20% gradient SDS gel (TEFCO)にてSDS-PAGEを行い、前記(7)と同様にウエスタンブロットを行った。その結果、単量体より大きな分子量域に複数のバンドが確認され、形質転換イチゴ果実においても多量体が形成されていることが示唆された(図7)。

[0047] 以上の結果から、イチゴ発現ヒトアディポネクチンが多量体を形成していることが確認された。アディポネクチン分子は、体内で単量体ではなく、3

量体、6量体、12量体以上の多量体を形成しており、これらの多量体が活性型となることが推定されている。したがって、上記の結果は、前記形質転換イチゴ葉組織内で発現したヒトアディポネクチンもまた活性型であることを示唆するものである。

[0048] 3. PEPCKプロモータールシフェラーゼを利用したアディポネクチンの評価系

アディポネクチンにより発現が抑制されるPEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) のプロモーターとルシフェラーゼをレポーター遺伝子とした蛍光による活性測定系を構築した。活性測定系はレンチウイルスベクターシステムを活用した。ベクターを構成するプラスミドコンストラクト（パッケージングプラスミド、エンベロープ&Rev プラスミドおよびSIN (Self Inactivating) ベクタープラスミド）は既存のものを活用し、これに以下の改変を加えてアディポネクチン活性測定系を構築した。すなわち、エンベロープは、VSV (Vesicular Stomatitis virus) のG糖タンパク質に変換し、宿主域を広げたものを使用した。SINベクタープラスミドにおいては、プロモーター領域にマウスおよびヒトのPEPCKプロモーターを導入し（それぞれgenomic DNAより取得）、その下流にルシフェラーゼ遺伝子（ヒト型コドンに改変したGaussia Luciferase ; GLuc）を組み込んだ。更に、GLuc下流には、薬剤選択性を付与するために、SV40プロモーターとハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。上記レトロウイルスベクターを構築し、パッケージング細胞にトランスフェクトし、感染性ウイルス粒子を得た。

[0049] このウイルスをアッセイ系細胞(Huh7)に感染させ、アディポネクチンを添加した場合のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図8に示す。

濃度依存性に発現抑制が起きることが確認できたことから、アディポネクチンの測定系として十分に利用できることが分かった。

[0050] 4. アディポネクチン経口投与（摂食）マウスにおけるDNAマイクロアレイ試験

標準的な体型のマウスを用いて、下記の対照群および投与群を用意し、実

験を行った。

対照群：イチゴ果実（非組換え体）

投与群：アディポネクチン発現イチゴ果実（凍結乾燥果実、アディポネ

クチン含量：42 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重量）

[0051] 対照群および投与群は、マウス5匹（Balb/c、オス7週齢）を同一ゲージに入れ、1日6時間の自由採食（0.2 g（乾燥重量））で、連続5日間投与した。なお、投与群のマウス1匹あたりの摂食した形質転換イチゴ果実に含まれるアディポネクチン含量は、約8.4 μg ／1日と推定される。

各グループとも連続5日間の投与の後、最終投与後6時間後に脊髄脱臼した後、内臓（肝臓、脾臓、小腸）を摘出し、試料とした。各試料をRNA Later (Ambion, Inc)に浸漬後、 -80°C に凍結した。凍結した試料からmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析をAffimetrix社Gene Chip (Mouse Genome 430 2.0、1-cycle target labeling プロトコール)を用いて行った。投与群と対照群とのデータを比較し、発現亢進、あるいは抑制が起きている遺伝子を同定した。

[0052] 投与群と対照群の遺伝子発現プロファイル比較をスクアッタープロットで示した（図9～11）。アディポネクチン受容体が存在する肝臓では、発現亢進（5倍以上）されたものは、10遺伝子であり、発現抑制（1／5以下）されたものは58遺伝子であった。

発現が亢進した遺伝子として、以下のものが認められた；parathyroid hormone receptor 2、sodium channel(voltage-gated)type II alpha 1、Chemokine (C-C motif) receptor 9、potassium voltage gated channel Shaw-related subfamily member 3、tankyrase TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase、thioredoxin-like 1、tumor necrosis factor receptor superfamily member 12a。

[0053] また、発現が抑制された遺伝子として、以下のものが認められた；RAD51 associated protein 1、pleckstrin homology domain interacting protein、FAST kinase domains 3、tryptase beta 2、solute carrier family 35 memb

er F2、hemoglobin Z beta-like embryonic chain、scrapie responsive gene 1、leucine rich repeat containing 34、coiled-coil domain containing 38、Nephronectin、calcium channel voltage-dependent N type alpha 1 B subunit、interleukin 7 receptor、ST6-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1、neurexophilin 1、cellular retinoic acid binding protein 1、Adult male hippocampus cDNA、layilin、Eph receptor A7、secretory blood group 1、lysyl oxidase、serine peptidase inhibitor clade A member 1f、trophoblast glycoprotein、anaplastic lymphoma kinase、cytochrome P450 family 26 subfamily a polypeptide 1、zinc finger protein 352、synapsin II、Catenin alpha 1、RUN and TBC1 domain containing 2、kinesin family member 2C。

[0054] その他の器官においては、脾臓では503遺伝子が、小腸では238遺伝子がそれぞれ発現亢進され、また脾臓では417遺伝子が、小腸では4遺伝子がそれぞれ発現抑制された。

以上のことから、アディポネクチンの摂食によって、極めて多数の遺伝子の発現状態に変化が起こり、なかでも糖代謝や摂食調整に関連した遺伝子発現においても変化が起こっていることが分かった。

[0055] 5. アディポネクチン経口投与（摂食）マウスにおけるペプチドマーカールレイ（肥満関連）試験

前記4の対照群および投与群から血清を採取し、これをペプチドマーカールレイ（肥満関係）に供した。ペプチドマーカールレイは、PHOENIX Pharmaceuticals社製 Obesity Peptide Biomarker ArrayおよびObesity Biomarker Chip (Rat, Mouse)を用い、製造者のプロトコールに準じて解析を行った。

[0056] ペプチドマーカールレイ（肥満関係）解析の結果、全体的な傾向として、投与群において、糖代謝に関連するペプチド、摂食調整に関連したペプチドの挙動を確認した。代表的なものを表1（形質転換イチゴの摂食により向上）および表2（形質転換イチゴの摂食により減少）に示す。なお、表中のペプチドはいずれもNCBI（National Center for Biotechnology Informati

on : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などの国際的なデータベースにより、そのペプチド配列、生体内での役割などについての情報が提供される。

[0057] [表1]

ペプチド名	投与群／対照群
Ghrelin	1.370298772
NPY	1.238886596
Bombesin	1.198294051

[0058] [表2]

ペプチド名	投与群／対照群
ACTH	0.738482065
MCH	0.760748062
Autotaxin	0.80963451

[0059] とくに、顕著な向上の見られたグレリン (Ghrelin)、NPY (neuropeptide Y) などは、摂食亢進に関与するペプチドである。また、顕著な減少の見られたACTHなどは、摂食抑制に関与するペプチドである。

以上のことから、アディポネクチンの摂食によって、糖代謝や摂食調整に関連したペプチドの挙動に変化が起こり、摂食した個体において摂食調整作用が生じると考えられる。

[0060] 6. アディポネクチン経口投与（摂食）マウスの血液における生化学的解析
標準的な体型のマウスを用いて、下記A～Cの各グループを用意し、実験を行った。

A : 通常飼料＋ヒトアディポネクチン発現イチゴ果実

B : 通常飼料＋非組換えイチゴ果実

C : 通常飼料（対照）

[0061] 各グループは、マウス14匹（B a l b／c、オス7週齢）を同一ゲージに入れ、1日6時間の自由採食で10日間あるいは20日間投与した。なお

、グループAおよびBは、通常飼料にイチゴホモジネートを添加した（2 ml / 匹相当量）。グループAのヒトアディポネクチン発現イチゴ果実のホモジネートには、1. 2 μ g / 2 ml の組換えアディポネクチンを含む。投与10日後に5匹のマウスより、投与20日後に残り9匹のマウスより、それぞれ最終投与後6時間後に血清を採取し、当該血清中のグルコース含量を測定した。

[0062] 血清中のグルコース含量を図12に示した。通常飼料+ヒトアディポネクチン発現イチゴを投与したグループAのグルコース含量が投与10日後及び20日後共に、他のグループと比較して最も低い値を示した。この結果より、イチゴにて発現した組換えヒトアディポネクチンの経口投与により、血糖値が低下促進されることが示唆された。

産業上の利用可能性

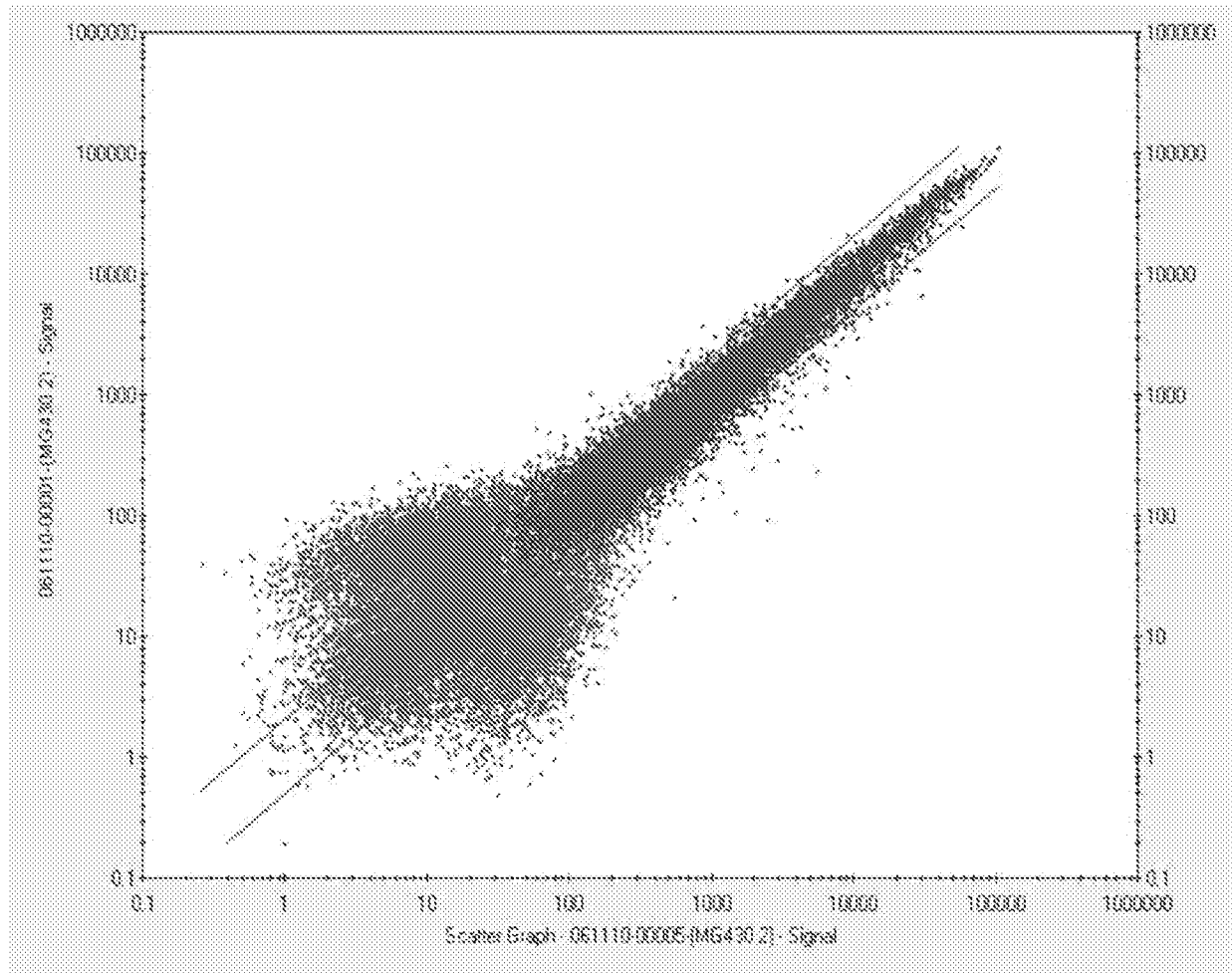
[0063] 本発明において、アディポネクチンを含有する食品組成物を摂食した場合、摂食亢進をもたらすなど摂食調整が可能である。とくにアディポネクチンの摂食により、グレリン分泌促進による摂食亢進効果は、本発明に関する研究の中で見出された新たな知見である。

請求の範囲

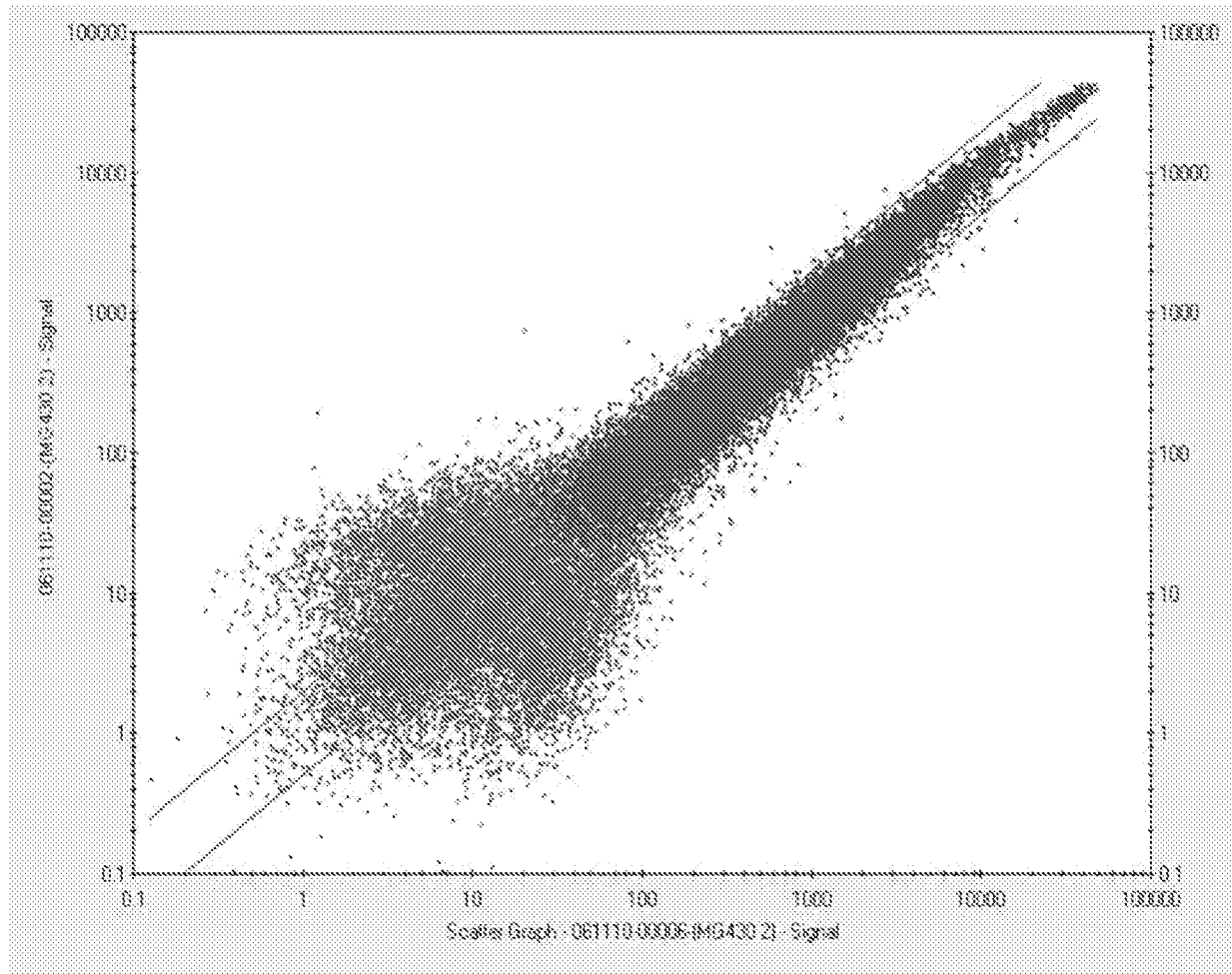
- [請求項1] アディポネクチンを有効成分として含有する、経口用摂食調整剤。
- [請求項2] アディポネクチンを発現する形質転換体を含有する、請求項1に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項3] アディポネクチンを発現する形質転換体が、
 (a) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、または、
 (b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチドをコードするDNAからなる遺伝子を導入した形質転換体である、請求項2に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項4] アディポネクチンを発現する形質転換体が、
 (a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、
 (b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を導入した形質転換体である、請求項2に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項5] アディポネクチンを発現する形質転換体の可食性組織を含有する、請求項2～4のいずれかに記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項6] 可食性組織が生食可能である請求項5に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項7] 形質転換体が、形質転換植物である、請求項2～6のいずれかに記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項8] アディポネクチンが、形質転換植物において発現したものである、請求項7に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項9] 形質転換植物において発現したアディポネクチン以外の動物由来成分を含有しない、請求項8に記載の経口用摂食調整剤。

- [請求項10] 形質転換植物において発現したアディポネクチン以外は植物由来成分である、請求項9に記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項11] 植物がイチゴであり、可食性組織がイチゴ果実である、請求項7～10のいずれかに記載の経口用摂食調整剤。
- [請求項12] 請求項1～11のいずれかに記載の経口用摂食調整剤を含有する、摂食調整用食品組成物。

[図1]

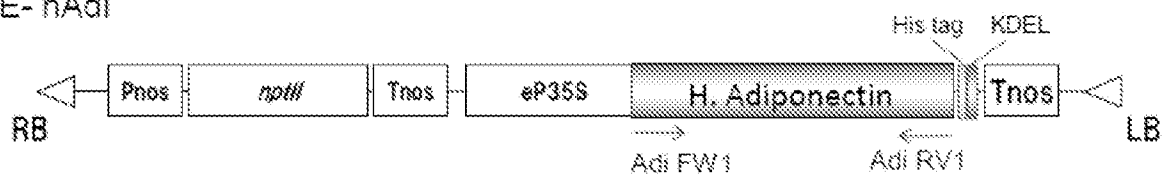


[図2]

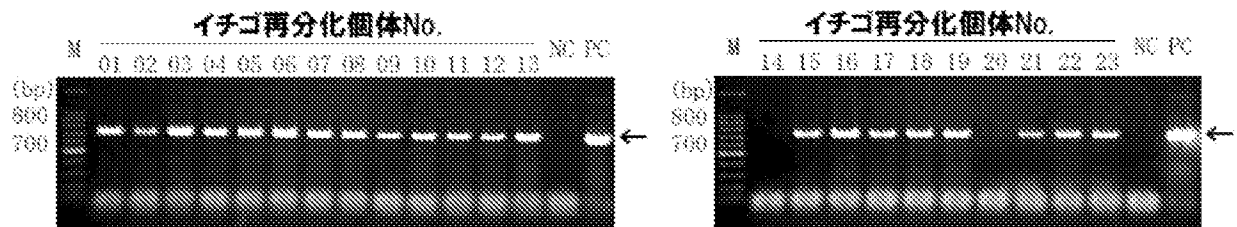


[図3]

pBE- hAdi



[図4]

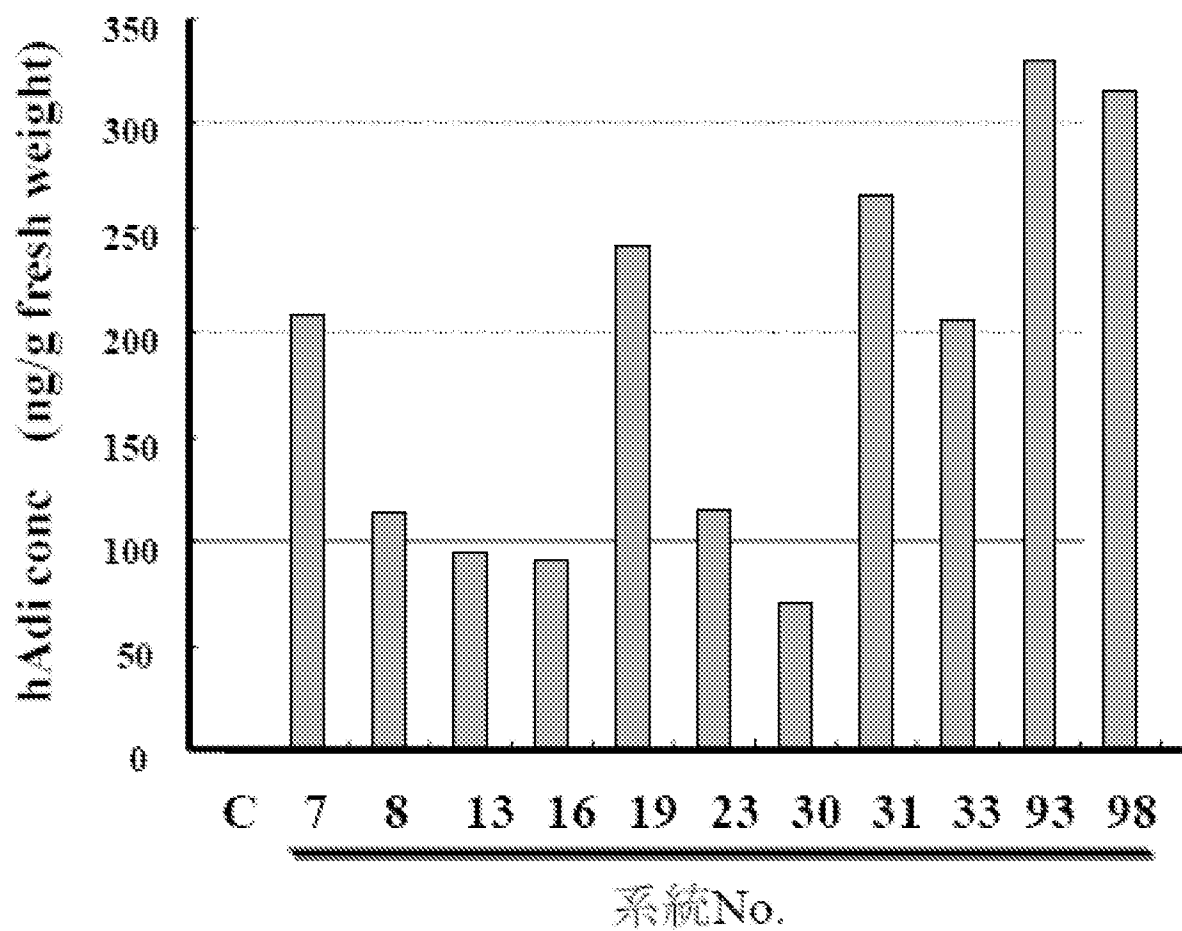


M: 100bp DNA ladder (TaKaRa)

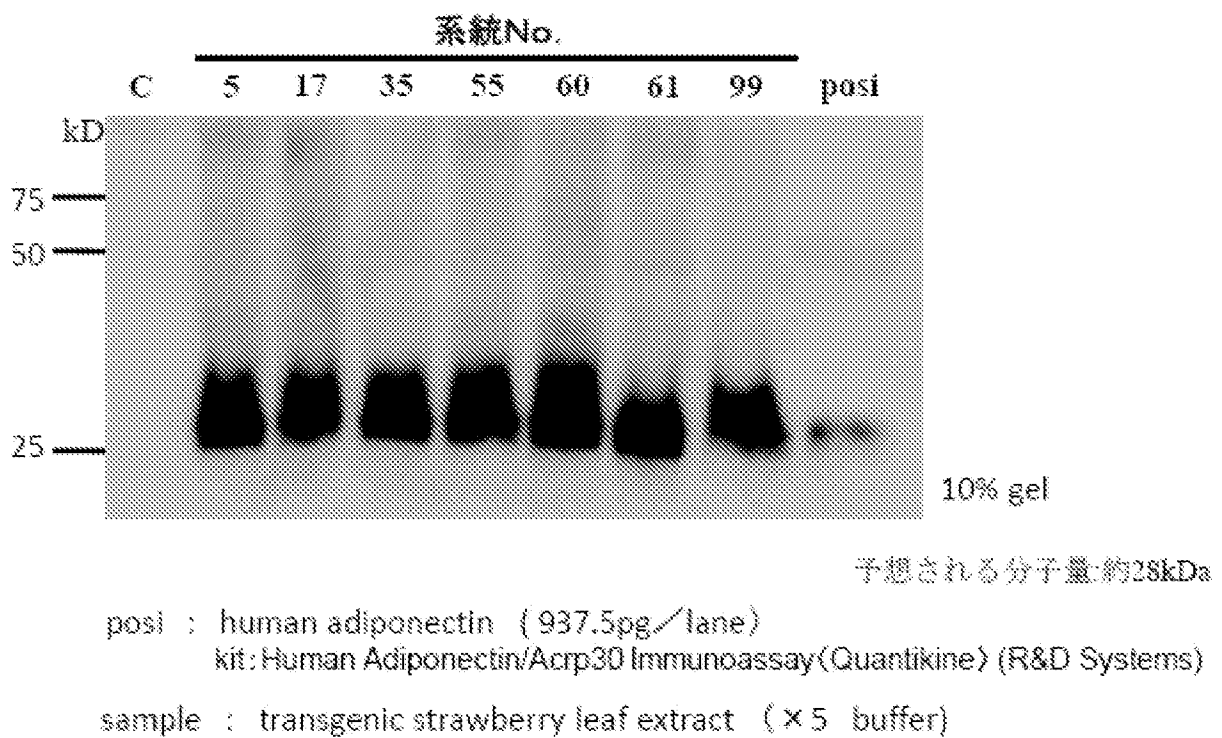
01-23: Regenerated Strawberry

NC: Non-Transgenic Strawberry PC: plasmid vector pBE-hAdi

[図5]



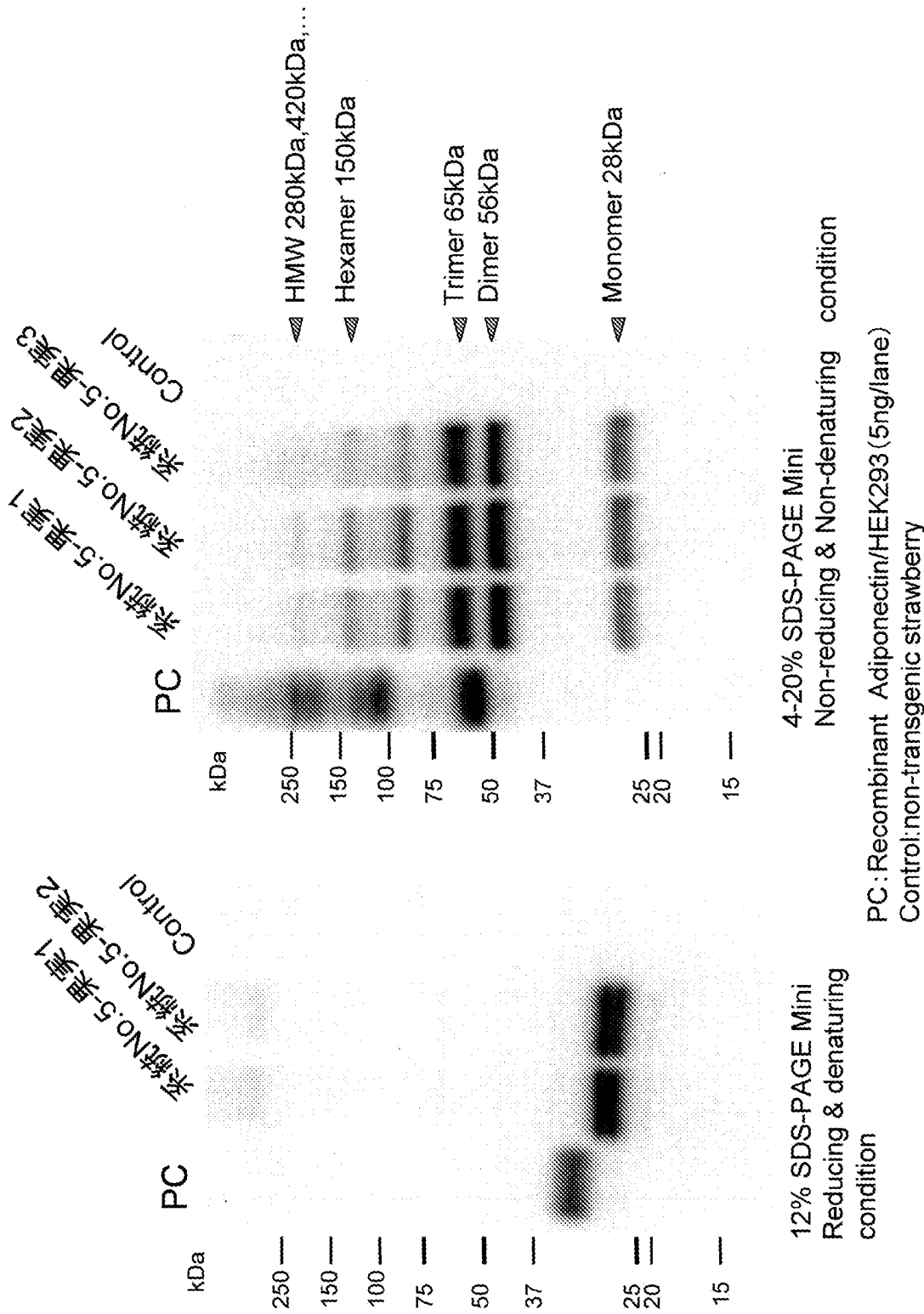
[図6]



[図7]

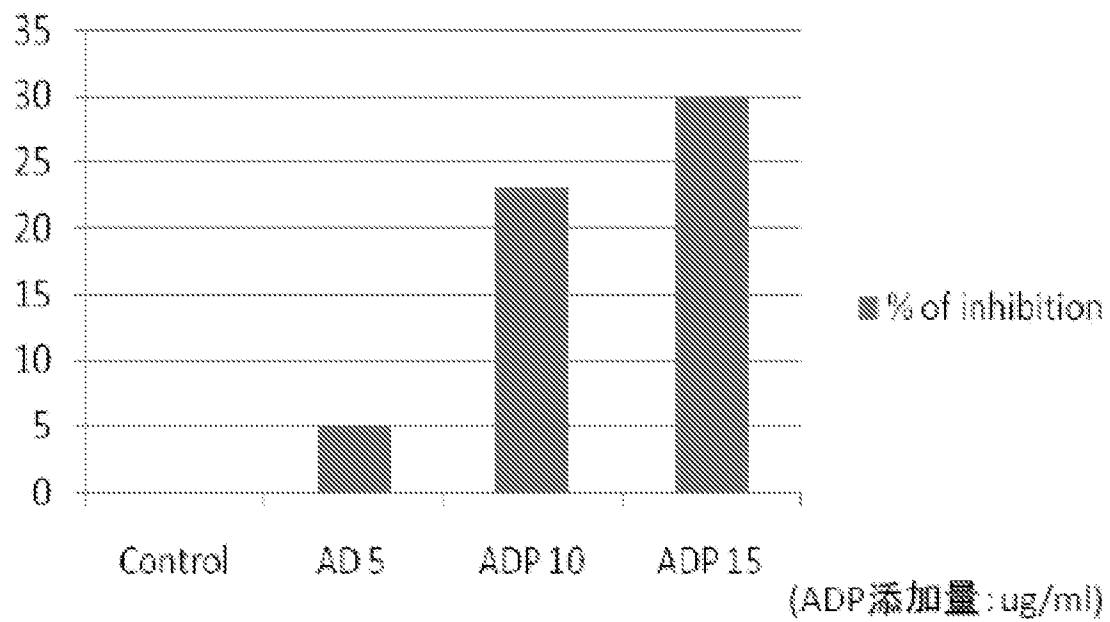
イチゴ果実発現産物の解析

イチゴ果実発現産物の多量体解析

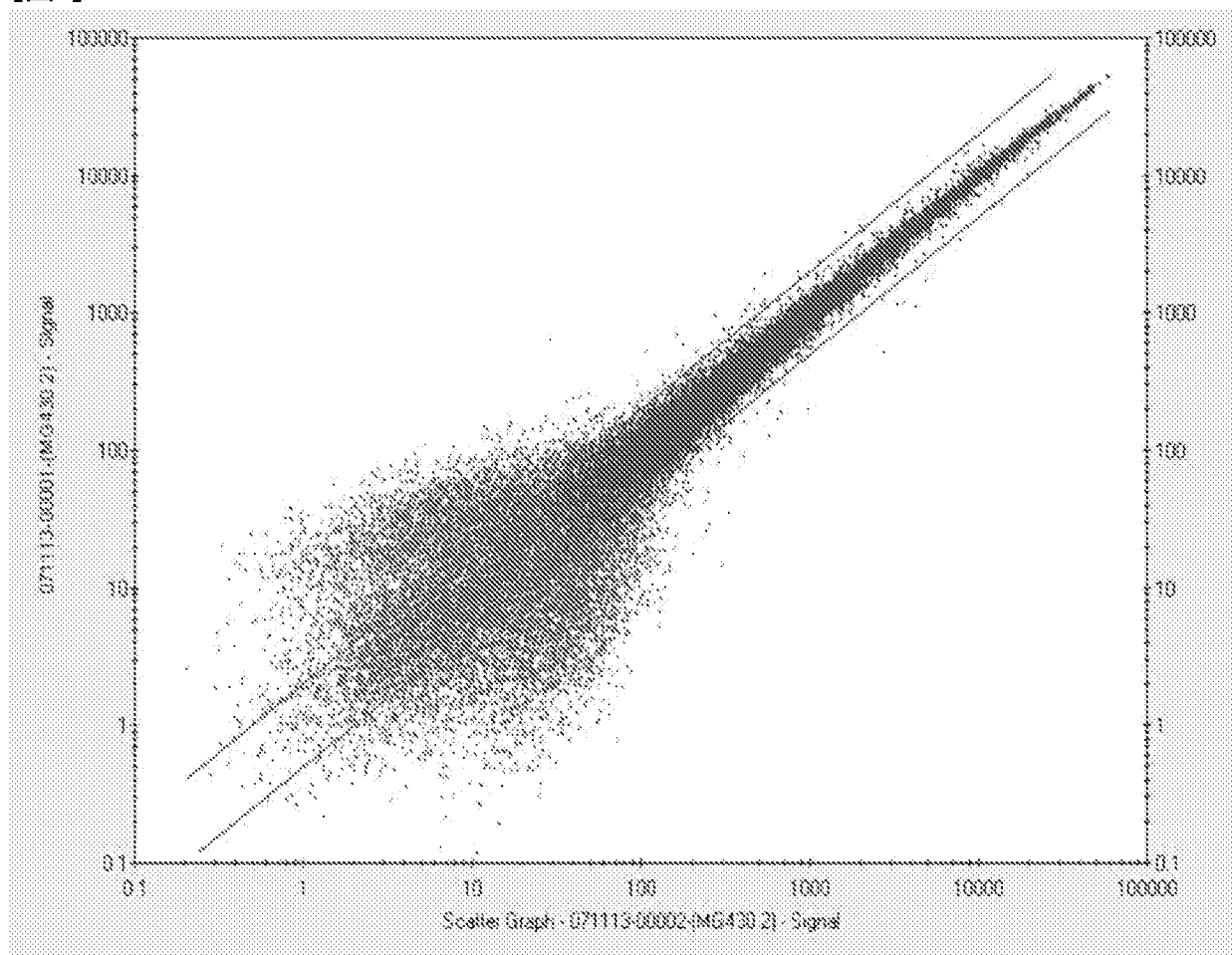


[図8]

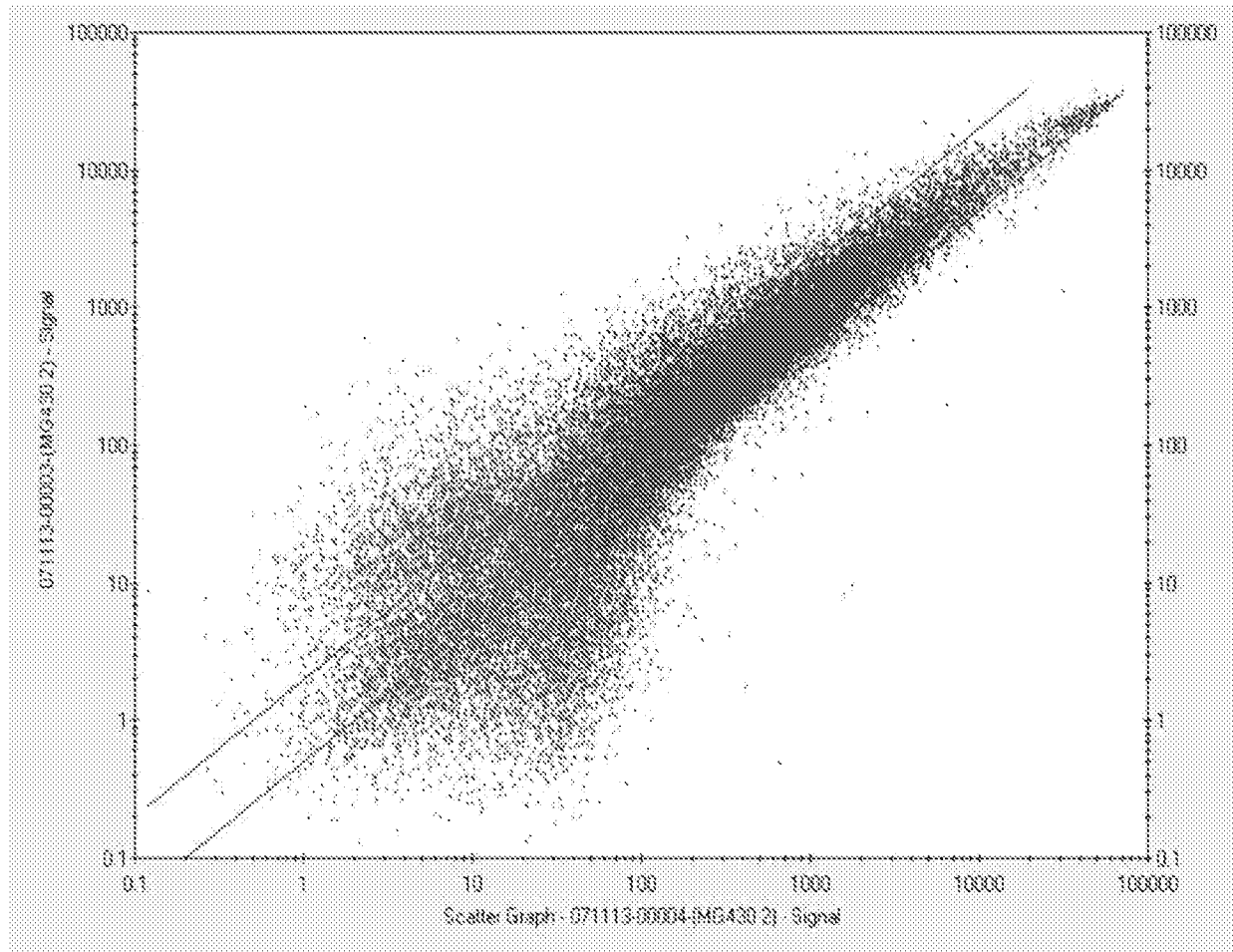
Effect of ADP on PEPCK-Luc expression inhibition



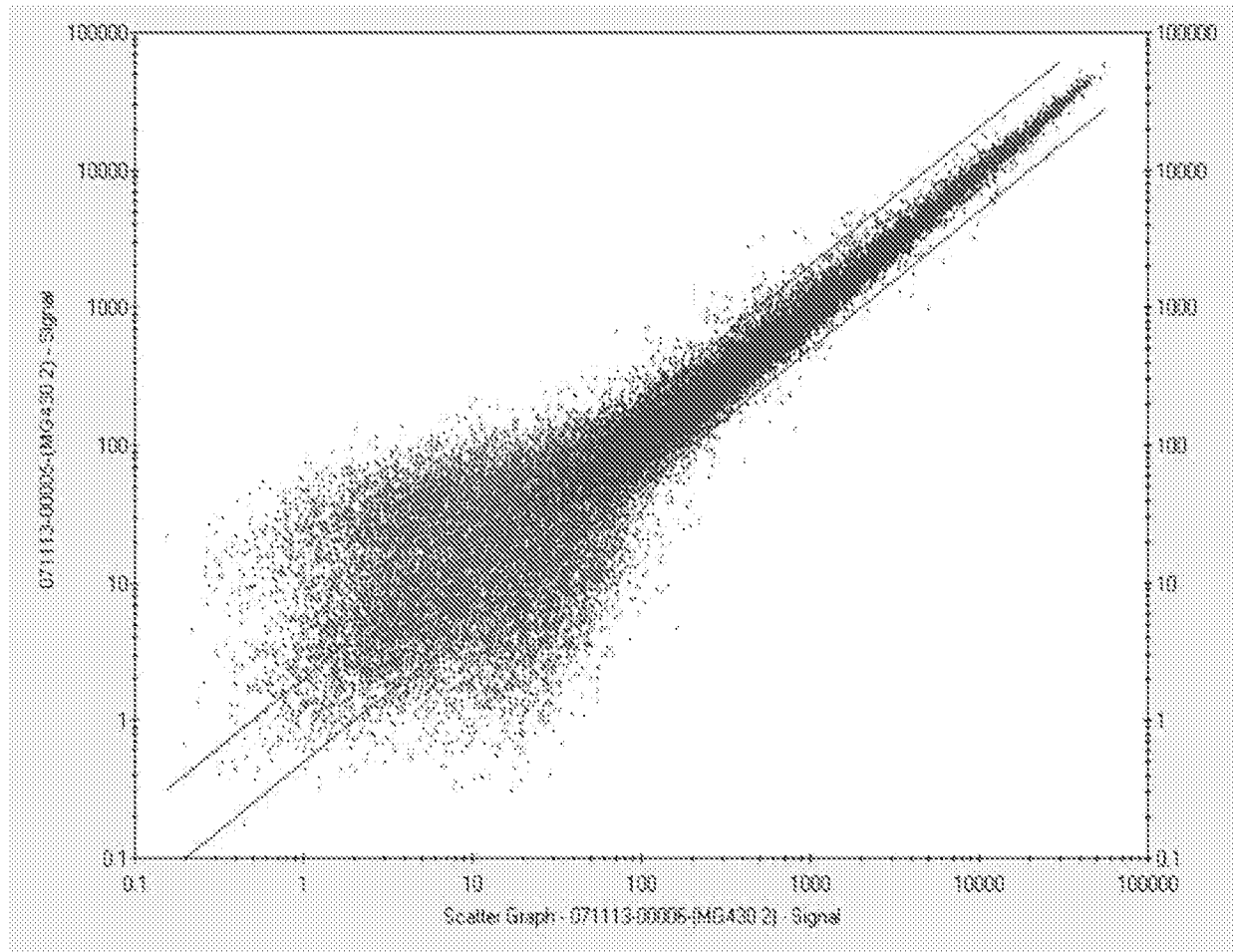
[図9]



[図10]

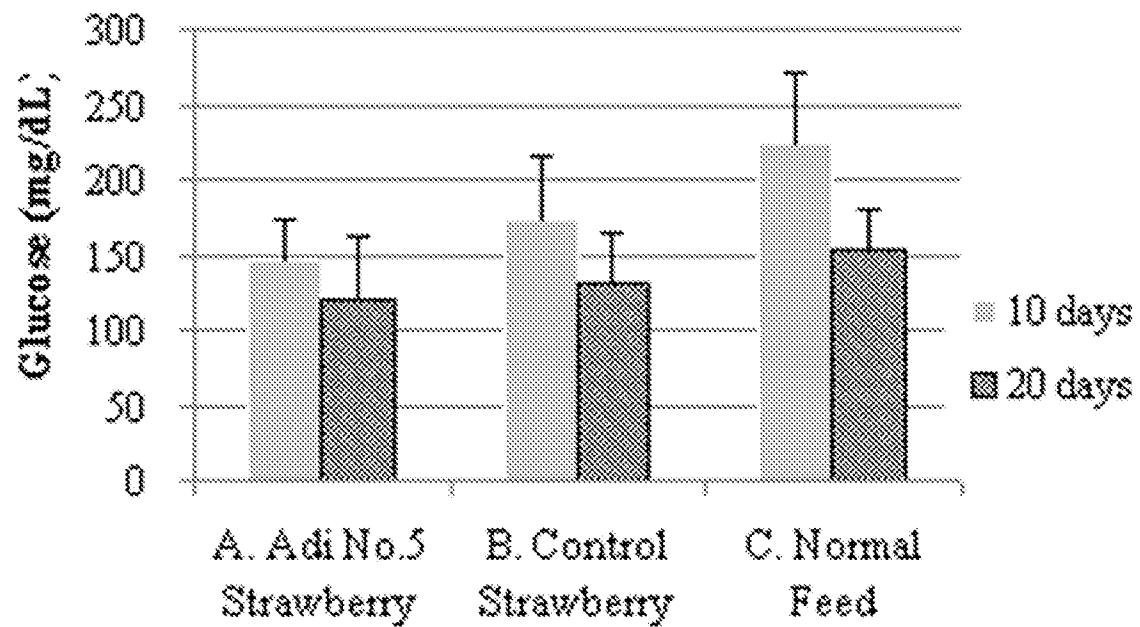


[図11]



[図12]

Glucose



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61P3/02(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(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)

A61K38/00, A23L1/30, A61K36/00, A61P3/02, A61P3/04, A61P3/06, C12N15/09, A01H5/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Takashi AOKI et al., "Idenshi Kumikae ni yoru Kinosei Ichigo no Sakushutsu", Biotechnology Symposium Yokoshu, 2008, vol.26, pages 32 to 35	1-12 1-12
X Y	Takashi AOKI et al., "Kokinosei Busshitsu Seisan Ichigo ni Kansuru Gijutsu Kaihatsu (sono 1) Kumikae Ichigo ni yoru Kokino Busshitsu Fukugo Seisan Gijutsu no Kaihatsu", Biotechnology Symposium Yokoshu, 2008, vol.26, pages 81 to 82	1-12 11,12
X Y	Rie ANNO et al., "Hito Adiponectin Idenshi Kumikae Shokubutsu no Sakushutsu to Kino Kaiseki", BMB2007 Koen Yoshishu, 2007, page 350	1-12 1-12

☒ 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
27 January, 2010 (27.01.10)

Date of mailing of the international search report
09 February, 2010 (09.02.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050507

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroaki UENO et al., "Himansho Metabolic Syndrome no Chiryo to Adipo Science, The relationship between feeding regulation and visceral fat accumulation", Adiposcience, 2007, vol.4, no.3, pages 231 to 238	1-12
Y	KUBOTA, N. et al, Adiponectin stimulates AMP-activated proteinkinase in the hypothalamus and increases food intake, Cell Metab, 2007, vol.6, no.1, p.55-68	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050507

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

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

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

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

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

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

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

The inventions in claims 1 - 12 cannot be considered to be novel and do not have a special technical feature, since the inventions are described in the following documents 1 - 3.

Document 1: Takashi AOKI et al., "Idenshi Kumikae ni yoru Kinosei Ichigo no Sakushutsu", Biotechnology Symposium Yokoshu, 2008, vol.26, pages 32 to 35

(continued to extra sheet)

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050507

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Document 2: Takashi AOKI et al., "Kokinosei Busshitsu Seisan Ichigo ni Kansuru Gijutsu Kaihatsu (sono 1) Kumikae Ichigo ni yoru Kokino Busshitsu Fukugo Seisan Gijutsu no Kaihatsu", Biotechnology Symposium Yokoshu, 2008, vol.26, pages 81 to 82

Document 3: Rie ANNO et al., "Hito Adiponectin Idenshi Kumikae Shokubutsu no Sakushutsu to Kino Kaiseki", BMB2007 Koen Yoshishu, 2007, page 350

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61P3/02(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00, A23L1/30, A61K36/00, A61P3/02, A61P3/04, A61P3/06, C12N15/09, A01H5/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	青木隆 他, 遺伝子組換えによる機能性イチゴの作出, バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2008, vol. 26, p. 32-35	1-12 1-12
X Y	青木隆 他, 高機能性物質生産イチゴに関する技術開発(その1)組換えイチゴによる高機能物質複合生産技術の開発, バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2008, vol. 26, p. 81-82	1-12 11, 12
X Y	安野理恵 他, ヒトアディポネクチン遺伝子組換え植物の作出と機能解析, BMB2007 講演要旨集, 2007, p. 350	1-12 1-12

☒ 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

2 7 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

平林 由利子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 6 3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	上野浩晶 他, 肥満症・メタボリックシンドロームの治療とアディポサイエンス 食欲と内臓脂肪蓄積, Adiposcience, 2007, vol.4, no. 3, p. 231-238	1-12
Y	KUBOTA, N. et al, Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake, Cell Metab, 2007, vol.6, no. 1, p. 55-68	1-12

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1－12に係る発明は、以下の文献1－3に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献1：青木隆 他，遺伝子組換えによる機能性イチゴの作出，バイオテクノロジーシンポジウム予稿集，2008，vol.26，p.32-35

文献2：青木隆 他，高機能性物質生産イチゴに関する技術開発(その1)組換えイチゴによる高機能物質複合生産技術の開発，バイオテクノロジーシンポジウム予稿集，2008，vol.26，p.81-82

文献3：安野理恵 他，ヒトアディポネクチン遺伝子組換え植物の作出と機能解析，BMB2007講演要旨集，2007，p.350

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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