(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2005-291767
(P2005-291767A)
(43)公開日　平成17年10月20日(2005.10.20)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/50	G01N 33/50	Z	2G045
A61K 39/395	A61K 39/395	Y	4B024
A61K 45/00	A61K 45/00		4B063
A61P 3/04	A61P 3/04		4C084
A61P 3/10	A61P 3/10		4C085

審査請求 未請求　請求項の数 33　ＯＬ　（全 18 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-103641 (P2004-103641)
(22)出願日　平成16年3月31日 (2004.3.31)

(71)出願人　000006725
三菱ウェルファーマ株式会社
大阪府大阪市中央区平野町２丁目６番９号
(74)代理人　100082511
弁理士　高柳　昌生
(72)発明者　四本　能尚
東京都中央区日本橋本町二丁目２番６号
三菱ウェルファーマ株式会社東京オフィス内

Fターム(参考)　2G045 AA25 DA12 DA13 DA14 DA36
DA37 DA77 FB02 FB03 FB07
4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA04
CA12 DA02 EA04 GA01 GA13
HA08 HA12

最終頁に続く

(54)【発明の名称】疾患関連遺伝子の用途

(57)【要約】
【課題】　本発明の課題は、糖尿病等の治療を行うために、有用な医薬及び有用な医薬を得るためのスクリーニング方法等を提供することにある。
【解決手段】　本発明者は、上記の課題を解決するために骨格筋由来細胞においてTubby遺伝子を発現させることにより、当該細胞の糖取り込みを促進することを明らかにした。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項２】
配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項３】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項４】
骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１から３記載のスクリーニング方法。
【請求項５】
請求項１から４記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。
【請求項６】
請求項１から４記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。
【請求項７】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項８】
配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項９】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特

徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項１０】

骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項７から９記載のスクリーニング方法。

【請求項１１】

請求項７から１０記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。

【請求項１２】

請求項７から１０記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。

【請求項１３】

配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項１４】

配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項１５】

配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項１６】

骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１３から１５記載のスクリーニング方法。

【請求項１７】

請求項１３から１６記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。

【請求項１８】

請求項１３から１６記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。

【請求項１９】

配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩

のスクリーニング方法。
【請求項２０】
配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項２１】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
【請求項２２】
骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１９から２１記載のスクリーニング方法。
【請求項２３】
請求項１９から２２記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。
【請求項２４】
請求項１９から２２記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。
【請求項２５】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
【請求項２６】
配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
【請求項２７】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
【請求項２８】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。
【請求項２９】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。
【請求項３０】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。
【請求項３１】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。
【請求項３２】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかをあるいは組み合わせることを特徴とする糖尿病の診断方法。

【請求項３３】
請求項２５から２７記載の抗体の何れかをあるいは組み合わせることを特徴とする肥満の診断方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、疾患関連遺伝子の用途に関する。さらに詳しくは、糖尿病、肥満の予防または治療として有用な疾患関連遺伝子産物を用いることを特徴とする薬剤のスクリーニング方法等に関する。
【背景技術】
【０００２】
従来、糖尿病治療は主にインスリン、SU剤、αグルコシターゼ、チアゾリジン系の薬剤によって行われている。しかしながら、これらの薬剤の効果は十分ではなく満足のいく治療は行われていないの現状である。すなわち、インスリンは日本における糖尿病患者の大半を占めるインスリン抵抗性糖尿病においては十分な効果が得られていない。またSU剤もインスリンを生産する能力を失った患者には効果がなく、インスリンを生産できても低血糖を引き起こす恐れがある。αグルコシターゼは糖の取りこみを抑制することによる血糖の改善作用であり、対処療法であり根本的な原因を改善することはできない。チアゾリジン系の薬剤は現在ある唯一のインスリン抵抗性糖尿病に対する治療薬であるが、肥満を引き起こすという副作用がある（非特許文献１）。
【０００３】
糖尿病、肥満は栄養の取りこみと消費のバランスが崩れ、栄養過多の状態から生ずると考えられる。エネルギーの消費は体の中でその多くは筋肉においてされることから、骨格筋でのエネルギー消費の拡大が糖尿病・肥満の治療において注目されている（非特許文献２）。
Tubby proteinは 1996年にTubby mouseから、その原因遺伝子としてポジショナルクローニング法により発見されたことが報告されている（非特許文献３,４）。Tubby mouseは生後3から6ヶ月で肥満になり始めることから、db/db mouse等のように発生後すぐに肥満となる他の糖尿病肥満モデルマウスと異なり、ヒトの肥満に近いと考えられていることが非特許文献４において報告されている。Tubby proteinは主に脳の視床下部で発現していることから、脳、神経に働きかけることにより肥満を抑制すると予想されているが、その機能は今のところ不明である。
【０００４】
Tubby proteinは脳以外では心臓、骨格筋等でも発現は確認されているが、その発現量は脳に比べると少ない（非特許文献５）。また、その機能についてはGタンパク質のシグナルがTubby proteinを介して伝達されるとの報告がある（非特許文献６）。
しかしながら、骨格筋において、Tubby proteinが糖尿病、肥満と関連するとの報告はない。
【非特許文献１】Nippon Rinsho. 2000 Feb;58(2):411-5
【非特許文献２】Nature. 2000 Jul 27;406(6794):415-8
【非特許文献３】Cell. 1996 Apr 19;85(2):281-90
【非特許文献４】Nature. 1996 Apr 11;380(6574):534-8
【非特許文献５】Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):3128-33
【非特許文献６】Science. 2001 Jun 15;292(5524):2041-50
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明の課題は、糖尿病、肥満の治療を行うために、有用な医薬及び有用な医薬を得る

ためのスクリーニング方法等を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、骨格筋由来細胞においてTubby遺伝子を発現させることにより、当該細胞の糖取込みを促進することを見出し、本発明を完成するに至った。
【発明の効果】
【０００７】
すなわち本発明は、
（１）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（２）配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（３）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（４）骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１から３記載のスクリーニング方法。
（５）請求項１から４記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。
（６）請求項１から４記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。
（７）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（８）配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（９）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いるこ

とを特徴とする、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進もしくは阻害することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（１０）骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項７から９記載のスクリーニング方法。
（１１）請求項７から１０記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。
（１２）請求項７から１０記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。
（１３）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（１４）配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（１５）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより糖尿病の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（１６）骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１３から１５記載のスクリーニング方法。
（１７）請求項１３から１６記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。
（１８）請求項１３から１６記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。
（１９）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（２０）配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡがコードするタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（２１）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置

換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現制御領域を用いることを特徴とする、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を挿入、欠失若しくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を制御することにより肥満の予防又は／及び治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
（２２）骨格筋由来細胞を用いることを特徴とする請求項１９から２１記載のスクリーニング方法。
（２３）請求項１９から２２記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。
（２４）請求項１９から２２記載のスクリーニング方法の何れかを用いて得られる化合物、その光学異性体、その薬学的に許容される塩、それらの水和物またはそれらの溶媒和物を有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。
（２５）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
（２６）配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡがコードするタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
（２７）配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
（２８）請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬。
（２９）請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬。
（３０）請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する糖尿病の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする糖尿病の予防または治療方法。
（３１）請求項２５から２７記載の抗体の何れかを有効成分として含有する肥満の予防及び／又は治療薬を投与することを特徴とする肥満の予防または治療方法。
（３２）請求項２５から２７記載の抗体の何れかをあるいは組み合わせることを特徴とする糖尿病の診断方法。
（３３）請求項２５から２７記載の抗体の何れかをあるいは組み合わせることを特徴とする肥満の診断方法を提供する。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００８】
配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、さらに好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。
【０００９】
本発明の遺伝子及びタンパク質はいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物由来のものがある。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に用いるのであればヒト由来のものであることが好ましい。本発明で用いられる配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸

配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する場合もある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウスなど）の細胞（例えば、神経細胞、グリア細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【００１０】

本発明で用いられるタンパク質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

本発明で用いられるタンパク質をコードするＤＮＡとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

【００１１】

配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１で表されるDNAと約５０％以上、好ましくは約６０％以上、さらに好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook etal., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９から４０ｍＭ、好ましくは約１９から２０ｍＭで、温度が約５０から７０℃、好ましくは約６０から６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９ｍＭで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

また、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列を挿入、欠失もしくは置換したアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１から３０個程度、好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１から３０個程度、好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１から３０個程度、好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１から３０個程度、好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、さらに好ましくは７０個以上、より好ましくは１００個以上、最も好ましくは２００個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２

個以上（好ましくは、１から２０個程度、より好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１から２０個程度、より好ましくは１から１０個程度、さらに好ましくは１から５個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１から１０個程度、より好ましくは１から５個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。
本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
本発明で用いられる部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

【００１２】
本発明で用いられる部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：１で表されるDNAがコードするアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列をコードするＤＮＡの一部分を有するＤＮＡ、配列番号：１で表されるDNAの相補鎖とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡの一部分を有するＤＮＡなどがあげられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は、それぞれ前記と同様な方法および条件が用いられる。
【００１３】
本発明のタンパク質が糖尿病の改善に有用であることを証明するためには、当該タンパク質が細胞の糖取り込みを促進させることを示せばよい。糖尿病は血糖値が高いために生ずる病気であり、細胞の糖取り込みを増加させることができれば血糖値を下げることができ、結果として糖尿病を改善することができるからである。
【００１４】
例えば、骨格筋由来細胞を本発明のタンパク質をコードする遺伝子で形質転換し、本発明のタンパク質の発現量を増加させることができる。これにより細胞の糖取り込みが増加すれば、本発明のタンパク質が糖尿病の改善に有効であることを示すことができる。
【００１５】
ここで用いる細胞は、糖代謝に関与している細胞を用いなければならない。糖代謝に関係しない細胞でこのような作用が確認できても、実際の作用を反映したことにはならないからである。
【００１６】
細胞において本発明の遺伝子が発現した時、細胞の糖取込み能が増加するかは例えば以下の方法により確認することができる。本発明の遺伝子を挿入したベクターで形質転換を行った細胞と、遺伝子を挿入していないベクターで形質転換を行った細胞（コントロール細胞）を作製する。培地中にラベルしたグルコースを加え、細胞の糖取込みの量を比較測定することにより確認できる。
【００１７】
本発明のタンパク質が肥満の改善に有用であることを証明するためには、当該タンパク質がエネルギー代謝に関与するタンパク質の発現を増加させることを示せばよい。肥満は食物等の取り込みがそれらの消費する量より多いために生ずる。このためエネルギー代謝を促進させることができれば、肥満を改善することができるからである。
【００１８】

例えば、骨格筋由来細胞においてエネルギー代謝に関与するタンパク質であるUCP2及びUCP3の発現量を増加させることにより、本発明のタンパク質が肥満の改善に有効であることを示すことができる。
ここで用いる細胞は、エネルギー代謝に関与している細胞を用いなければならない。エネルギー代謝に関係ない細胞でこのような作用が確認できても、実際の作用を反映したことにはならないからである。

【００１９】

細胞において本発明の遺伝子が発現した時、UCP2及びUCP3の遺伝子発現を増加させるかは以下の方法により確認できる。本発明の遺伝子を挿入したベクターで形質転換を行った細胞と遺伝子を挿入していないベクターで形質転換を行った細胞（コントロール細胞）を用いUCP2及びUCP3のｍRNAの量を測定することにより調べることができる。
TubbyのcDNA配列およびアミノ酸配列はすでに報告されている（Genbank/EMBL データベース Accession No. NM_021885；Noben-Trauth,Kら、Nature第380巻、6574号、第534から538頁、1996年）。

【００２０】

本発明のcDNAあるいは遺伝子は、上記のアミノ酸配列や塩基配列の情報などを基に設計し合成したプライマーやプローブを用い、通常のPCR法やあるいはDNAライブラリーからのスクリーニングにより単離することができる。これらを適当なベクターに組み込んで発現用ベクターを構築できる。

【００２１】

ベクターとしては適当なプロモーター（例えばCMVプロモーター、SV40プロモーター等）を含む動物細胞用のベクター（例えばレトロウイルス系ベクター、SV40系ベクター等）を使用できる。

【００２２】

細胞は、例えばヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物由来のものがある。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に用いるのであればヒト由来のものであることが好ましい。また、骨格筋における作用を調べているため、骨格筋由来のものである必要がある。

【００２３】

遺伝子の発現解析を網羅的に行うにはマイクロアレイ法、ＤＮＡチップ法、分子インデックス法、Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ｄｉｓｐｌａｙ法等によって行うことができる。また、遺伝子を個別に解析するには定量ＰＣＲ法、ノーザンブロット法等によって行うことができる。
以下に、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途を説明する。

【００２４】

本発明のタンパク質は骨格筋細胞における糖取込みを制御している。よって本発明のタンパク質の活性を促進若しくは発現量を増大する化合物、又はその塩は、糖尿病患者における骨格筋での糖取込みを促進することにより、糖尿病の医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質及び当該タンパク質をコードするＤＮＡは、本発明のタンパク質の活性を促進若しくは発現量を増大する化合物、又はその塩のスクリーニングを行うために有用である。
すなわち、本発明は本発明のタンパク質及び当該タンパク質をコードするＤＮＡを用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を促進若しくは発現量を増大する化合物、又はその塩のスクリーニング方法を提供する。

【００２５】

具体的には、例えば本発明のタンパク質と被検化合物の結合を基準としてスクリーニングを行うことができる。

本発明のタンパク質と被験化合物の結合は、いずれか一方を固相に固定し、他方を標識しておくことによって容易に検出することができる。したがって、たとえば支持体上に合成されたコンビナトリアルライブラリーは、本発明のスクリーニングに好適な被験化合物である。この場合は、蛍光標識した本発明のタンパク質を反応させることにより、両者の結合を容易に検出することができる。
本発明によって決定された遺伝子の情報を利用して、プロモーターやエンハンサーを単離することができる。例えば、ゲノムライブラリーを、遺伝子の塩基配列に基づくプローブでスクリーニングすることによって、本発明のタンパク質のゲノムDNAを単離することができる。単離されたゲノムDNAをもとに、プロモーターやエンハンサー等の発現制御領域を取得することができる。こうして取得された発現制御領域は、当該遺伝子の発現の制御を目的とする医薬品の開発に利用することができる。
【００２６】
具体的には、プロモーター等の下流にレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子を結合したベクターを構築し、適当な宿主細胞、例えば哺乳類動物細胞を該ベクターで形質転換することにより、スクリーニング用細胞を作製する。被験化合物を該細胞の培地中に添加し適当な時間の後、レポーター遺伝子が発現するか否かを測定することにより、本発明の遺伝子の発現を制御する医薬品を取得することができる。
本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるプロモーターもしくはエンハンサー等の発現制御領域、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞、または本発明で用いられるプロモーターもしくはエンハンサー等の発現制御領域を有するベクターで形質転換された細胞を含有するものである。
本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の活性を促進若しくは阻害する化合物又は本発明のタンパク質の発現を制御する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明で用いられるタンパク質の塩と同様のものが用いられる。本発明で用いられるタンパク質の活性を促進若しく阻害する化合物又は本発明のタンパク質の発現を制御する化合物は、糖尿病あるいは肥満に対する予防・治療剤などの医薬として有用である。
本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化し、経口的または非経口的に投与することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラットなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、例えば経口投与する場合、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき該化合物を約０.１から１００ｍｇ、好ましくは約１．０から５０ｍｇ、より好ましくは約１．０から２０ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人（６０ｋｇとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約０．０１から３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１から２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１から１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。
本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、例えばサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。また、本発明の抗体は本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時における各分画中の本発明タンパク質の検出、被検細胞内における本発明タンパク質の挙動の分析などに使用することもできる。

本発明の抗体を含有する医薬本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は低毒性であり、統合失調症に対する予防・治療剤として使用することができる。本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、など）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人に使用する場合には、本発明の抗体を１回量として、通常０.０１から２０ｍｇ／ｋｇ体重程度、好ましくは０.１から１０ｍｇ／ｋｇ体重程度、さらに好ましくは０.１から５ｍｇ／ｋｇ体重程度を、１日１から５回程度、好ましくは１日１から３回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【００２７】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（polyoxyethylene（５０mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常５から５００ｍｇ、とりわけ注射剤では５から１００ｍｇ、その他の剤形では１０から２５０ｍｇの上記抗体が含有されていることが好ましい。なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

遺伝子診断剤本発明のＤＮＡは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該ＤＮＡまたは該ｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該ＤＮＡまたは該ｍＲＮＡの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

以下に本発明を実施例で具体的に説明するが、これはその代表例を示すものであって、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【００２８】

骨格筋細胞において本発明の遺伝子が発現した時、UCP2,UCP3及びGLUT4の遺伝子発現が増加するかを調べることを目的として以下の実験を行った。

【実施例１】
【００２９】
（マウスTubby遺伝子のクローニング）
マウス骨格筋cDNAライブラリー(Staratagene社製)を鋳型とし、ＰＣＲ（polymerase chain reaction）法により、マウスTubbyのｃＤＮＡ断片を取得した。ＰＣＲに用いるプライマーは、マウスTubbyのｃＤＮＡ配列（Genbank/EMBL データベース Accession No. NM_021885；Noben-Trauth,Kら、Nature第380巻、6574号、第534から538頁、1996年）を基にして設計し、ＤＮＡ合成機で合成した。センスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（6塩基）及びマウスTubbyのｃＤＮＡの翻訳開始コドンとその下流の配列（２０塩基）からなる26マーの合成プライマー（配列番号2）を用い、アンチセンスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（8塩基）及びマウスTubbyのｃＤＮＡの終止コドンとその上流の相補配列（２０塩基）からなる28マーの合成プライマー（配列番号3）を用いた。
得られたｃＤＮＡ断片についてＤＮＡ配列を決定し、既知のマウスTubbyの全コーディング領域を含んでいることを確認した。
続いてプライマーに設けた制限酵素サイトに対応した制限酵素KpnI及びNotIで得られたcDNAを切断し、哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen社)に挿入した（以下pc3.1Tub(+)と略記する場合がある）。
コントロールとして逆ストランドになるように遺伝子を挿入したベクター（以下pc3.1Tub(－)と略記する場合がある）も作製した。
【実施例２】
【００３０】
（ラット骨格筋由来L6細胞の形質転換）
リポフェクトアミンプラス(Invitrogen社)を用いて、ラット骨格筋由来L6細胞（ATCC社）をpcDNA3.1ベクター及びマウスTubby遺伝子を挿入したpc3.1Tub(+)ベクター、pc3.1Tub(－)ベクターで形質転換を行った。形質転換はリポフェクトアミンプラス添付の説明書に従って行った。その後、Geneticinを培地中に添加して形質転換されていない細胞を除去した。
【実施例３】
【００３１】
（ラットUCP2,UCP3及びGLUT4の遺伝子発現の測定）
ラットUCP2,UCP3及びGLUT4の遺伝子発現の測定は定量PCR法によりおこなった（PerkinElmer社）。定量PCR用プライマー、タックマンプローブはPerkinElmer社のソフトを用いてラットUCP2,UCP3及びGLUT4についてそれぞれ設計した（配列番号4から12）。また、内部標準としてacidic ribosomal phosphoprotein P0の定量PCR用プライマー、タックマンプローブも設計した（後記配列番号13から15）。コントロール用GAPDHの定量PCR用プライマー、タックマンプローブはPerkinElmer社より購入した。
設計したプライマー、タックマンプローブはPerkinElmer社に委託して合成した。
【００３２】
上記細胞よりRNAzolを用いてmRNAを精製した。PerkinElmer社の説明書に従い、このmRNAと上記定量PCR用プライマー及びタックマンプローブを用いて、UCP2遺伝子等の発現量を定量PCR測定装置PR7700で測定した。
【００３３】
各サンプルは内部標準acidic ribosomal phosphoprotein P0で割ることにより、サンプル間の差を補正した。結果を図１から４に示す。pc3.1Tub(+)ベクター、pc3.1Tub(－)ベクターで形質転換した細胞においてGAPDHの発現量はpc3.1ベクターで形質転換した細胞と比較して有意な差は見られなかった（図１）。これより、これらの実験操作によっては遺伝子の発現量は変化しないことが確認できた。
次にUCP2,UCP3及びGLUT4の遺伝子の発現量を測定し、比較した。UCP2,UCP3の発現量は、マウスTubby遺伝子を挿入していないベクターで形質転換した細胞と比較してpc3.1Tub(+)

ベクターで形質転換した細胞においては2倍増加していることが示された。逆に、pc3.1Tub(-)ベクターで形質転換した細胞においてはUCP2,UCP3の発現量が減る傾向が見られた。GLUT４の発現量はUCP2、UCP3程有意な差は見られなかったが、マウスTubby遺伝子を挿入していないベクターで形質転換した細胞と比較して、pc3.1Tub(+)ベクターで形質転換した細胞においては1.5倍増加し、逆に、pc3.1Tub(－)ベクターで形質転換した細胞においては半分に減少した。

【００３４】

これらの結果より、Tubby遺伝子を骨格筋由来細胞において強制発現させることにより、エネルギー代謝に関与するUCP2、UCP3遺伝子の発現を増加し、糖取込みに主要な役割を持つGLUT４の発現量も増加することが示された。

【実施例４】

【００３５】

骨格筋細胞において本発明の遺伝子が発現した時、細胞の糖取込み能が増加するかを調べることを目的として以下の実験を行った。

【００３６】

糖取込み実験は（J Biol Chem. 2001 Nov 23;276(47):43829-35）記載の方法に従い行った。上記細胞を培養し、更にインスリンを加えたものと加えない細胞を用意した。培地中に2-デオキシ-[^{3}H]グルコース を添加し、その後培養上清を除去し、洗浄した後、細胞を回収し、シンチレーションカウンターで2-デオキシ-(^{3}H)グルコースの取込み量を測定した。

【００３７】

結果を図５に示す。pc3.1Tub(+)ベクターで形質転換した細胞はコントロール細胞と比較して、糖取込み量が増加していた。特にインスリンを添加した場合は添加しない場合に比較して糖取込み量が有意に増大していた。

【００３８】

一方、pc3.1Tub(－)ベクターで形質転換した細胞はコントロール細胞と比較して、糖取込み量の変化は見られなかった。

【００３９】

以上より、骨格筋由来ラットL6細胞において、Tubby遺伝子が発現することにより、糖取込み量が増大することが示された。

【００４０】

以上の実施例における結果より、Tubby遺伝子は骨格筋由来細胞において発現することにより、エネルギー代謝を促進し、糖取込みも促進されることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【００４１】

【図１】Tubby遺伝子を導入した骨格筋細胞におけるGAPDH遺伝子の発現量を示す図である。

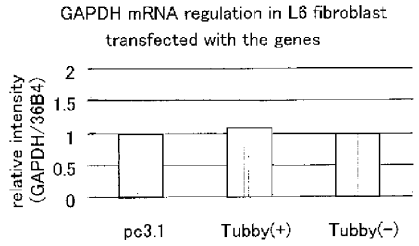
【図２】Tubby遺伝子を導入した骨格筋細胞におけるUCP2遺伝子の発現量を示す図である。

【図３】Tubby遺伝子を導入した骨格筋細胞におけるUCP3遺伝子の発現量を示す図である。

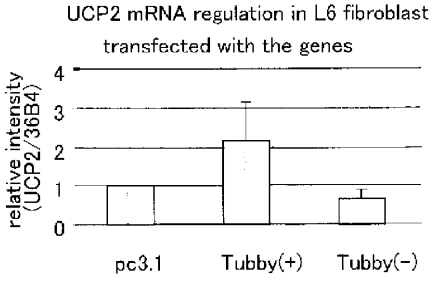
【図４】Tubby遺伝子を導入した骨格筋細胞におけるGLUT4遺伝子の発現量を示す図である。

【図５】Tubby遺伝子を導入した骨格筋細胞における糖取込みの量を示す図である。

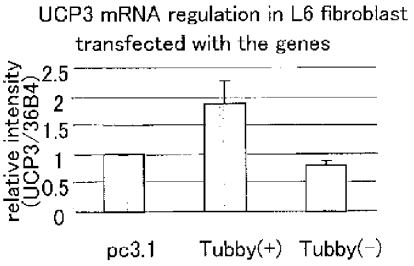
【図１】


GAPDH mRNA regulation in L6 fibroblast
transfected with the genes
relative intensity
(GAPDH/36B4)
2
1.5
1
0.5
0
pc3.1
Tubby(+)
Tubby(−)

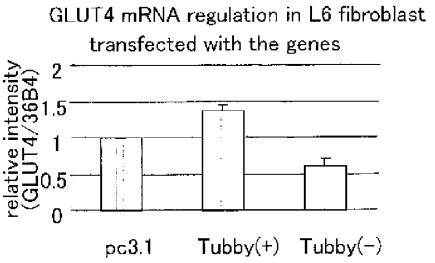
【図２】


UCP2 mRNA regulation in L6 fibroblast
transfected with the genes
relative intensity
(UCP2/36B4)
4
3
2
1
0
pc3.1
Tubby(+)
Tubby(−)

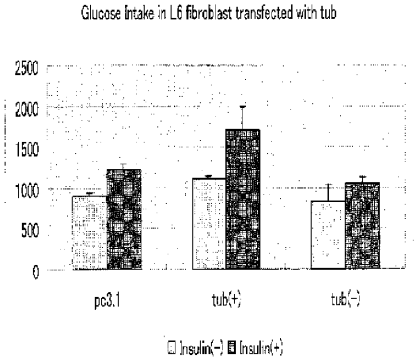
【図３】


UCP3 mRNA regulation in L6 fibroblast
transfected with the genes
relative intensity
(UCP3/36B4)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
pc3.1
Tubby(+)
Tubby(−)

【図４】


GLUT4 mRNA regulation in L6 fibroblast
transfected with the genes
relative intensity
(GLUT4/36B4)
2
1.5
1
0.5
0
pc3.1
Tubby(+)
Tubby(−)

【図５】


Glucose Intake in L6 fibroblast transfected with tub
2500
2000
1500
1000
500
0
pc3.1
tub(+)
tub(−)
Insulin(−) Insulin(+)

【配列表】
2005291767000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	16/18	Ｃ０７Ｋ	16/18		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｑ	1/02	Ｃ１２Ｑ	1/02		
Ｃ１２Ｑ	1/68	Ｃ１２Ｑ	1/68	A	
Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｇ０１Ｎ	33/15	Z	
Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｇ０１Ｎ	33/53	D	
// Ｃ１２Ｎ	15/09	Ｃ１２Ｎ	15/00	A	

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QQ91 QR08 QR32 QR42
QR50 QR51 QR62 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX01
4C084 AA17 NA14 ZA70
4C085 AA33 BB31 CC22
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74