(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
2020年1月16日(16.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/013271 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6897 (2018.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/027480

(22) 国際出願日： 2019年7月11日(11.07.2019)

(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 2018-133627 2018年7月13日(13.07.2018) JP

(71) 出願人: 学校法人東京理科大学(**TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION**) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 樋上 賀一 (**HIGAMI Yoshikazu**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 小林 正樹(**KOBAYASHI Masaki**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 成田 匠(**NARITA Takumi**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 瀧 加菜里(**TAKI Kanari**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 正林真之，外(**SHOBAYASHI, Masayuki et al.**); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１－７－１２ サピアタワー 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, 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 2020/013271 A1

(54) **Title:** SCREENING METHOD FOR ANTI-OBESITY SUBSTANCE, AND KIT FOR SCREENING FOR ANTI-OBESITY SUBSTANCE

(54) 発明の名称： 抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キット

(57) **Abstract:** Provided are: a screening method for an anti-obesity substance, the method including selecting a substance capable of increasing the expression of the Pgc-1α gene and the Mipep gene; and a kit for screening that is used in this screening method. During screening, the level of Pgc-1α gene and Mipep gene expression may be determined, and the level of reporter gene expression may be determined by reporter assay.

(57) 要約：Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現を亢進させる物質を選択することを含む抗肥満物質のスクリーニング方法、及びそのスクリーニング方法に用いられるスクリーニング用キットを提供する。スクリーニングに際しては、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量を測定してもよく、レポーターアッセイによりレポーター遺伝子の発現量を測定してもよい。

明　細　書

発明の名称 ：

抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キット

技術分野

[0001] 本発明は、抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キットに関する。

背景技術

[0002] 肥満は、体脂肪が過剰に蓄積した状態と定義されている。肥満の主な原因は、摂取カロリーと消費カロリーとのアンバランスにあり、摂取カロリーが消費カロリーを上回ると、余剰カロリーが脂肪となって体内に蓄積され、やがて肥満となる。肥満は、糖尿病、高血圧、高脂血症等の生活習慣病の原因ともなる。このため、肥満の予防及び改善は、生活習慣病のリスクを低減する上で極めて重要であると考えられる。

[0003] ところで、近年、摂取カロリー制限（ｃａｌｏｒｉｃ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ；ＣＲ）により、エネルギー代謝に関係するミトコンドリアの生合成や機能が亢進することが報告されている。例えば、非特許文献１では、摂取カロリー制限（ＣＲ）により、白色脂肪組織選択的かつＳｒｅｂｐ－１ｃ依存的に、Ｐｇｃ－１αを介してミトコンドリア生合成が亢進することが報告されている。また、非特許文献２では、摂取カロリー制限（ＣＲ）によりＭｉｐｅｐの発現が亢進することや、ＭｉｐｅｐによりＳｉｒｔ３がプロセシングを受けて活性型となることが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｎ．Ｆｕｊｉｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｇｉｎｇ　Ｃｅｌｌ，２０１７，１６（３），ｐｐ．５０８－５１７

非特許文献2：Ｍ．Ｋｏｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ

ｅｒｓ，２０１７，５９１（２４），ｐｐ．４０６７－４０７３

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 摂取カロリー制限（ＣＲ）は、肥満の予防及び改善に有効であると考えられるが、継続的に摂取カロリー制限（ＣＲ）を行うことは一般に困難である。このため、摂取カロリー制限（ＣＲ）による表現型を模倣可能な抗肥満物質の探索が望まれる。

[0006] 本発明は、上記に鑑みて提案されたものであり、抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キットを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の両者の発現を亢進させる物質が抗肥満物質として有望であることを見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下のとおりである。

[0008] ＜１＞ Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現を亢進させる物質を選択することを含む抗肥満物質のスクリーニング方法。

[0009] ＜２＞ Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子を発現する細胞に被験物質を接触させる工程と、

前記被験物質を接触させない場合に比べて、前記細胞におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程と、

を含む＜１＞に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[0010] ＜３＞ 前記細胞として、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない細胞とを使用し、

前記被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞においてのみＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する＜２＞に記載の抗肥満

物質のスクリーニング方法。

[0011] ＜４＞　Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体に、被験物質を接触させる工程と、

前記被験物質を接触させない場合に比べて、前記第１のレポーター遺伝子及び前記第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程と、

を含む＜１＞に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[0012] ＜５＞　前記第１の形質転換体及び前記第２の形質転換体のそれぞれとして、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない形質転換体とを使用し、

前記被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体においてのみ前記第１のレポーター遺伝子及び前記第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する＜４＞に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[0013] ＜６＞　下記（ａ）～（ｃ）から選択される少なくとも１つを含む抗肥満物質のスクリーニング用キット：

（ａ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを増幅するためのプライマー、

（ｂ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを検出するためのプローブ、

（ｃ）Ｐｇｃ－１αタンパク質及びＭｉｐｅｐタンパク質のそれぞれに対する抗体。

[0014] ＜７＞　下記（ｄ）及び（ｅ）から選択される少なくとも１つを含む抗肥満物質のスクリーニング用キット：

（ｄ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子とを有する第１のベクター、及びＭ

ｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有する第２のベクター、

（ｅ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1A]野生型マウス（ＷＯマウス）及びＳｒｅｂｐ－１ｃノックアウトマウス（ＫＯマウス）のそれぞれの自由摂食群（ＡＬ群）及び摂取カロリー制限群（ＣＲ群）について、白色脂肪組織におけるＭｉｐｅｐのｍＲＮＡ発現量を解析した結果を示す図である。

[図1B]野生型マウス（ＷＯマウス）及びＳｒｅｂｐ－１ｃノックアウトマウス（ＫＯマウス）のそれぞれの自由摂食群（ＡＬ群）及び摂取カロリー制限群（ＣＲ群）について、白色脂肪組織におけるＰｇｃ－１αのｍＲＮＡ発現量を解析した結果を示す図である。

[図2]野生型のＭＥＦ細胞及びＰｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞について、Ｐｇｃ－１α、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ、及びＭｉｐｅｐのｍＲＮＡ発現量を解析した結果を示す図である。

[図3A]Ｍｉｐｅｐ遺伝子及びＰｇｃ－１α遺伝子の両者を過剰発現するＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α遺伝子を過剰発現するＰｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ遺伝子を過剰発現するＭｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びコントロールとしてのＭｏｃｋ細胞について、Ｐｇｃ－１αのタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図3B]Ｍｉｐｅｐ遺伝子及びＰｇｃ－１α遺伝子の両者を過剰発現するＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α遺伝子を過剰発現するＰｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅ

ｐ遺伝子を過剰発現するＭｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びコントロールとしてのＭｏｃｋ細胞について、Ｍｉｐｅｐのタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図4A]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｃｏｘ４のタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図4B]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｍｄｈ２のタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図4C]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｓｉｒｔ３のタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図5A]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｔｆａｍのタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図5B]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｔｏｍ２０のタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

[図6]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣＳ（ｃｉｔｒａｔｅ　ｓｙｎｔａｓｅ）活性を示す図である。

[図7A]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞をＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色液で染色したときの顕微鏡像を示す図である。

[図7B]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞をＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色液で染色したときの脂肪滴蓄積量の測定結果を示す図である。

[図8]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ

細胞について、Ｐｇｃ－１α、Ｍｉｐｅｐ、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎ、Ｐｐａｒγ、及びＡｄｉｐｏｑのｍＲＮＡ発現量を解析した結果を示す図である。

[図9]ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞について、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎのタンパク質発現量を解析した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] ＜抗肥満物質のスクリーニング方法＞

本実施形態に係る抗肥満物質のスクリーニング方法は、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現を亢進させる物質を選択することを含む。後述する実施例に示すとおり、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の両者の発現を亢進させることにより、白色脂肪細胞における脂肪滴蓄積量が顕著に減少する。したがって、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の両者の発現を亢進させる物質は、抗肥満物質として有望であると考えられる。

[0018] なお、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子はいずれも公知であり、それぞれの塩基配列情報及びアミノ酸配列情報は米国生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＧｅｎＢａｎｋデータベースから入手可能である。一例として、ヒトＰｇｃ－１αの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号１、２に示す。また、ヒトＭｉｐｅｐの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号３、４に示す。

[0019] スクリーニングに際しては、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量を測定してもよく、レポーターアッセイによりレポーター遺伝子の発現量を測定してもよい。以下、それぞれの態様について説明する。

[0020] 第１の態様に係るスクリーニング方法は、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子を発現する細胞に被験物質を接触させる工程（以下、「接触工程」ともいう。）と、被験物質を接触させない場合に比べて、細胞におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程（以下、「選択工程」ともいう。）と、を含む。

[0021] まず、接触工程では、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子を発現する細胞に被験物質を接触させる。

[0022] 被験物質を接触させる細胞としては、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子を発現するものであれば特に制限されない。後述する実施例に示すとおり、白色脂肪組織におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現は、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子の制御を受けている。このため、被験物質を接触させる細胞としては、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のほかにＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を発現する哺乳動物由来の細胞であることが好ましい。

[0023] 細胞に被験物質を接触させる方法は特に制限されず、例えば、被験物質を添加した培地で細胞を培養する方法が挙げられる。

[0024] 次いで、選択工程では、被験物質を接触させない場合に比べて、細胞におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する。

[0025] Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量を測定する際には、転写レベルの発現量（ｍＲＮＡ量）を測定してもよく、翻訳レベルの発現量（タンパク質量）を測定してもよい。すなわち、遺伝子の発現量には、転写産物の量と翻訳産物の量との両方が含まれる。

[0026] ｍＲＮＡ量の測定方法としては、対象遺伝子（Ｐｇｃ－１α遺伝子又はＭｉｐｅｐ遺伝子）のｍＲＮＡ量を測定できる方法であれば特に制限されず、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ法、定量ＰＣＲ法、ノーザンブロット法、ＤＮＡマイクロアレイ法等が挙げられる。

[0027] タンパク質量の測定方法としては、対象遺伝子（Ｐｇｃ－１α遺伝子又はＭｉｐｅｐ遺伝子）がコードするタンパク質を特異的に測定できる方法であれば特に制限されず、例えば、ウェスタンブロット法、酵素免疫測定法等が挙げられる。

[0028] 上記のようにＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量を測定した結果、被験物質を接触させない場合に比べて、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭ

ｉｐｅｐ遺伝子の発現量が有意に増加している場合には、該被験物質を抗肥満物質として選択することができる。

[0029] なお、上記のとおり、白色脂肪組織におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現は、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子の制御を受けている。このため、被験物質を接触させる細胞として、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない細胞とを使用し、被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞においてのみＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択するようにしてもよい。これにより、摂取カロリー制限（ＣＲ）に近似した作用を有する抗肥満物質を得ることが可能となる。

[0030] 一方、第２の態様に係るスクリーニング方法は、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体に、被験物質を接触させる工程（以下、「接触工程」ともいう。）と、被験物質を接触させない場合に比べて、第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程（以下、「選択工程」ともいう。）と、を含む。

[0031] まず、接触工程では、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体に、被験物質を接触させる。

[0032] 第１の形質転換体は、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する。また、第２の形質転換体は、Ｍｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する。

[0033] ここで、「機能的に連結された」とは、天然において対象遺伝子（Ｐｇｃ

－１α遺伝子又はＭｉｐｅｐ遺伝子）の発現を誘導する分子に応答して、対象遺伝子のプロモーターの制御下にレポーター遺伝子が発現するように連結されていることを意味する。

[0034] 第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子としては、特に制限されず、生命工学分野で知られている任意のレポーター遺伝子を使用することができる。レポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）遺伝子、ＧＵＳ（β－グルクロニダーゼ）遺伝子、ＣＡＴ（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子等が挙げられる。

[0035] 第１の形質転換体は、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子とを有する第１のベクターを宿主細胞に導入することによって得ることができる。また、第２の形質転換体は、Ｍｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有する第２のベクターを宿主細胞に導入することによって得ることができる。

[0036] 宿主細胞としては特に制限されないが、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を発現する哺乳動物由来の細胞であることが好ましい。

[0037] なお、第１の形質転換体及び第２の形質転換体は、別個の形質転換体に限定されるものではなく、単一の形質転換体であってもよい。例えば、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子と、Ｍｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有するベクターを宿主細胞に導入することによって、単一の形質転換体を得ることができる。第１の形質転換体及び第２の形質転換体を単一の形質転換体とする場合、第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子としては、識別可能な異種の遺伝子が使用される。

[0038] 第１の形質転換体及び第２の形質転換体に被験物質を接触させる方法は特に制限されず、例えば、被験物質を添加した培地で第１の形質転換体及び第

２の形質転換体を培養する方法が挙げられる。

[0039] 次いで、選択工程では、被験物質を接触させない場合に比べて、第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する。

[0040] 第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量は、レポーター遺伝子の種類に応じた方法で測定することができる。例えば、レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子であれば、発現産物であるルシフェラーゼの活性を、蛍光をもって検出することができる。レポーター遺伝子がＧＦＰ遺伝子であれば、発現産物であるＧＦＰを、蛍光をもって検出することができる。レポーター遺伝子がＧＵＳ遺伝子であれば、発現産物であるＧＵＳの活性を、グルクロン等の発色をもって検出することができる。レポーター遺伝子がＣＡＴ遺伝子であれば、発現産物であるＣＡＴの活性を、クロラムフェニコールのアセチル化をもって検出することができる。

[0041] 上記のように第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量を測定した結果、被験物質を接触させない場合に比べて、第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量が有意に増加している場合には、該被験物質を抗肥満物質として選択することができる。

[0042] なお、上記のとおり、白色脂肪組織におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現は、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子の制御を受けている。このため、第１の形質転換体及び第２の形質転換体のそれぞれとして、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない形質転換体とを使用し、被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体においてのみ第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択するようにしてもよい。これにより、摂取カロリー制限（ＣＲ）に近似した作用を有する抗肥満物質を得ることが可能となる。

[0043] 以上のようにして、細胞レベルでＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現を亢進する抗肥満物質が得られた後には、ｉｎ　ｖｉｖｏでのアッ

セイを行ってもよい。例えば、得られた抗肥満物質をＰｇｃ－１α欠損マウス及びＭｉｐｅｐ欠損マウスに投与し、その反応性を野生型マウスと比較することにより、該抗肥満物質の有効性を動物レベルで評価することができる。

[0044] ＜抗肥満物質のスクリーニング用キット＞

本実施形態に係る抗肥満物質のスクリーニング用キットは、上述した第１の態様に係るスクリーニング方法のように、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量を測定する際に使用してもよく、上述した第２の態様に係るスクリーニング方法のように、レポーターアッセイによりレポーター遺伝子の発現量を測定する際に使用してもよい。以下、それぞれの態様について説明する。

[0045] 第１の態様に係るスクリーニング用キットは、下記（ａ）～（ｃ）から選択される少なくとも１つを含む。

（ａ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを増幅するためのプライマー。

（ｂ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを検出するためのプローブ。

（ｃ）Ｐｇｃ－１αタンパク質及びＭｉｐｅｐタンパク質のそれぞれに対する抗体。

[0046] 上記（ａ）におけるプライマーは、対象遺伝子（Ｐｇｃ－１α又はＭｉｐｅｐ）の各塩基配列に基づき設計し、合成及び精製の各工程を経て調製することができる。プライマーの長さ（塩基数）は特に制限されないが、特異的なアニーリングを可能とするため、１５～４０塩基程度とすることが好ましい。

[0047] 上記（ｂ）におけるプローブとしては、対象遺伝子（Ｐｇｃ－１α又はＭｉｐｅｐ）の各塩基配列の連続する部分配列からなるポリヌクレオチド、又は対象遺伝子の各塩基配列に対する相補配列の連続する部分配列からなるポリヌクレオチドが用いられる。プローブの長さ（塩基数）は特に制限されな

いが、特異的なハイブリッド形成を可能とするため、１５塩基以上とすることが好ましい。これらのプローブは、標識物質を用いて適宜標識することができる。標識物質としては、蛍光色素、放射性同位体、酵素、アビジン、ビオチン等を用いることができる。

[0048] プローブは、マイクロアレイ等の固相担体に固定化して用いてもよい。マイクロアレイの作製方法は特に制限されず、例えば、固相担体表面で直接プローブを合成する方法（オン・チップ法）や、予め調製したプローブを固相担体表面に結合する方法等を採用することができる。

[0049] 上記（ｃ）における抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれであってもよく、抗体の活性フラグメントであってもよい。活性フラグメントとしては、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ等が挙げられる。これらの抗体は、標識物質を用いて適宜標識することができる。標識物質としては、酵素、放射性同位体、蛍光色素等を用いることができる。

[0050] 一方、第２の態様に係るスクリーニング用キットは、下記（ｄ）及び（ｅ）から選択される少なくとも１つを含む。

（ｄ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子とを有する第１のベクター、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有する第２のベクター。

（ｅ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体。

[0051] 上記（ｄ）における第１のレポーター遺伝子及び第２のレポーター遺伝子については上述したとおりであるため、詳細な説明を省略する。第１のベクター及び第２のベクターは、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー等を適宜有していてもよい。選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる

。

[0052] 第１のベクター及び第２のベクターは、別個のベクターに限定されるものではなく、単一のベクターであってもよい。例えば、第１のベクター及び第２のベクターは、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子と、Ｍｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有する単一のベクターであってもよい。

[0053] 上記（ｅ）における第１の形質転換体及び第２の形質転換体は、別個の形質転換体に限定されるものではなく、単一の形質転換体であってもよい。例えば、Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子と、Ｍｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有するベクターを宿主細胞に導入することによって、単一の形質転換体を得ることができる。

実施例

[0054] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、有意差検定は、試験例１、２ではスチューデントのｔ検定により行い、試験例４～６ではテューキーのｔ検定により行った（＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１）。

[0055] ＜試験例１＞

（モデルマウスの作製及び白色脂肪組織の採取）

米国のジャクソン研究所より購入したＳｒｅｂｐ－１ｃ$^{+/-}$（Ｂ６；１２９Ｓ６－Ｓｒｅｂｆ１^{tm1Mbr}）マウス（Ｇ．Ｌｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００２，２７７，ｐｐ．９５２０－９５２８）から、交配によりＳｒｅｂｐ－１ｃ$^{+/+}$マウス（以下、「ＷＴマウス」ともいう。）及びＳｒｅｂｐ－１ｃ$^{-/-}$マウス（以下、「ＫＯマウス」ともいう。）を作製した。東京理科大学薬学部動物実験施設内のＳＰＦ環境下、明暗サイクル１２時間で飼育し、自由摂食群（ＡＬ群）には飼料としてＣＲＦ－１（オ

リエンタル酵母工業（株））を十分量与えた。ＡＬ群の摂食量を測定し、摂取カロリー制限群（ＣＲ群）にはその７０％量を消灯前に与えた。３ヶ月齢より摂取カロリー制限（ＣＲ）を開始し、ＷＴ－ＡＬ群、ＷＴ－ＣＲ群、ＫＯ－ＡＬ群、及びＫＯ－ＣＲ群の計４群を作製した。８．５ヶ月齢から１０ヶ月齢において体重を測定後、イソフルランによる過麻酔で安楽死させた。安楽死後、精巣周囲の白色脂肪組織を採取し、臓器は液体窒素による急速凍結後、－８０℃で保存した。

[0056] （Ｍｉｐｅｐ及びＰｇｃ－１αのｍＲＮＡ発現量の解析）

－８０℃で凍結保存していた白色脂肪組織からＩＳＯＧＥＮ　ＩＩ（（株）ニッポンジーン）を用いて全ＲＮＡを抽出した。ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ　ＲＴ－ＰＣＲ　Ｋｉｔ（タカラバイオ（株））を用いて全ＲＮＡの逆転写反応を行い、ｃＤＮＡを得た。その後、ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤ　ＳＹＢＲ　ｑＰＣＲ　Ｍｉｘ（東洋紡（株））及びＢｌｅｎｄ　Ｔａｑ　Ｐｌｕｓ（東洋紡（株））を用いたリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより目的遺伝子（Ｍｉｐｅｐ又はＰｇｃ－１α）を増幅させた。ＰＣＲ産物は２．４％アガロースゲル電気泳動により分離し、０．０１％エチジウムブロマイド溶液で１５分間処理した後に、ルミノ・イメージアナライザーＬＡＳ３０００（富士フイルム（株））を用いて特異的バンドを可視化した。なお、各ｍＲＮＡ発現量は、Ｔｂｐ（ＴＡＴＡ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）のｍＲＮＡ発現量により補正した。使用したプライマーを下記表１に示す。

[0057] [表1]

	配列	配列番号
Mipep	Forward 5’-CAAAGGAGAGGTGTGGTGTAATG-3’	5
	Reverse 5’-GGAAGATTCAGCATGAGAACGAC-3’	6
Pgc-1α	Forward 5’-AGACGGATTGCCCTCATTTG-3’	7
	Reverse 5’-CAGGGTTTGTTCTGATCCTGTG-3’	8
Tbp	Forward 5’-CAGTACAGCAATCAACATCTCAGC-3’	9
	Reverse 5’-CAAGTTTACAGCCAAGATTCACG-3’	10

[0058] ＷＴ－ＡＬ群、ＷＴ－ＣＲ群、ＫＯ－ＡＬ群、及びＫＯ－ＣＲ群の白色脂

肪組織におけるＭｉｐｅｐ及びＰｇｃ－１αのｍＲＮＡ発現量を図１Ａ、図１Ｂに示す（ｎ＝３～５）。図１Ａ、図１Ｂに示すとおり、野生型（ＷＴ）マウスにおいては、摂取カロリー制限（ＣＲ）によって、Ｍｉｐｅｐ及びＰｇｃ－１αのｍＲＮＡ発現量が有意に増加した。一方、Ｓｒｅｂｐ－１ｃノックアウト（ＫＯ）マウスにおいては、摂取カロリー制限（ＣＲ）によっても、Ｍｉｐｅｐ及びＰｇｃ－１αのｍＲＮＡ発現量は増加しなかった。この結果から、摂取カロリー制限（ＣＲ）によるＭｉｐｅｐ遺伝子及びＰｇｃ－１α遺伝子の発現亢進は、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ依存的であることが示唆された。

[0059] ＜試験例２＞

（Ｐｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたマウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ細胞）の作製）

米国のジャクソン研究所より購入したＰｇｃ－１$\alpha^{+/flox}$（Ｂ６Ｎ；１２９（ＦＶＢ）－ＰＰＡＲＧＣ１$a^{tm2.1Brap}$）マウス（Ｊ．Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２００４，１１９，ｐｐ．１２１－１３５）とＣＡＧ－ＣＲＥマウスとの交配によりＰｇｃ－１$\alpha^{+/-}$マウスを得た。Ｐｇｃ－１$\alpha^{+/-}$マウス同士を交配させ、妊娠後１３．５日～１５．５日のマウスの子宮から胎児を取り出し、ＰＢＳで洗浄した後、頭、尾、手足、臓器を取り除き、０．０５％ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡを含有するＰＢＳを用いて３７℃で１０分間消化した。その後、７０μｍセルストレーナー（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で余分な細胞を除くことにより、Ｐｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞を作製した。

[0060] （野生型のＭＥＦ細胞及びＰｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞におけるＰｇｃ－１α、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ、及びＭｉｐｅｐのｍＲＮＡ発現量の解析）

野生型のＭＥＦ細胞及びＰｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞から全ＲＮＡを抽出し、試験例１と同様にして、Ｐｇｃ－１α、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のｍＲＮＡ発現量をリアルタイムＲＴ－Ｐ

ＣＲにより確認した。なお、各ｍＲＮＡ発現量は、Ｒｐｓ１８（ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓ１８）のｍＲＮＡ発現量により補正した。Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の増幅に使用したプライマーは上記表１のとおりである。Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子及びＲｐｓ１８遺伝子の増幅に使用したプライマーを下記表２に示す。

[0061] [表2]

	配列	配列番号
Srebp-1c	Forward 5'-GGAGCCATGGATTGCACATT-3'	11
	Reverse 5'-GGCCCGGGAAGTCACTGT-3'	12
Rps18	Forward 5'-TGCGAGTACTCAACACCAACAT-3'	13
	Reverse 5'-CTTTCCTCAACACCACATGAGC-3'	14

[0062] 野生型のＭＥＦ細胞及びＰｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞におけるＰｇｃ－１α、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ、及びＭｉｐｅｐのｍＲＮＡ発現量を図２に示す。図２に示すとおり、野生型のＭＥＦ細胞とＰｇｃ－１α遺伝子をノックアウトしたＭＥＦ細胞とで、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ及びＭｉｐｅｐのｍＲＮＡ発現量に差は認められなかった。この結果及び試験例１の結果から、摂取カロリー制限（ＣＲ）によるＭｉｐｅｐ遺伝子及びＰｇｃ－１α遺伝子の発現亢進は、互いに非依存的であることが示唆された。

[0063] ＜試験例３＞

（Ｍｉｐｅｐ過剰発現用ベクター及びＰｇｃ－１α過剰発現用ベクターの作製）

マウス白色脂肪組織のｃＤＮＡを鋳型とし、下記表３に示すプライマー及びＰｒｉｍｅ　ｓｔａｒ（東洋紡（株））を用いたＰＣＲによりＭｉｐｅｐのｃＤＮＡを増幅させた。ＰＣＲ産物をＥｃｏＲ　Ｉ及びＸｈｏ　Ｉで切断し、ＥｃｏＲ　Ｉ及びＸｈｏ　Ｉで切断済みのｐＭＸｓ－ＡＭＮＮ－Ｐｕｒｏベクターとライゲーションすることにより、ｐＭＸｓ－Ｍｉｐｅｐ－Ｐｕｒｏベクターを作製した。

[0064]

[表3]

	配列	配列番号
Mipep	Forward 5'-GTACGGGAATTCGCCACCATGCTGCTGGCGGCCGG-3'	15
	Reverse 5'-CGGCCGCTCGAGCTATTTAGAATCCAGGAAGAACG-3'	16

[0065] また、Ａｄｄｇｅｎｅより購入したｐｃＤＮＡ－ｆ：Ｐｇｃ－１ベクターをＥｃｏＲ Ｖ及びＰｍｅ Ｉで切断した。得られたＤＮＡ断片を、ＥｃｏＲ Ｉ処理後にＫｌｅｎｏｗ処理により平滑化し、ＣＩＰ処理により脱リン酸化したｐＭＸｓ－Ｎｅｏベクターとライゲーションすることにより、ｐＭＸｓ－Ｐｇｃ－１α－Ｎｅｏベクターを作製した。

[0066] （Ｍｉｐｅｐ過剰発現用ベクター及びＰｇｃ－１α過剰発現用ベクターのマウス白色脂肪前駆細胞株３Ｔ３－Ｌ１へのトランスフェクション）

１４．５μｇ／ｍＬのベクター（ｐＭＸｓ－Ｍｉｐｅｐ－Ｐｕｒｏベクター又はｐＭＸｓ－Ｐｇｃ－１α－Ｎｅｏベクター）を含む０．２５Ｍ $CaCl_2$溶液と、１．５ｍＭ Na_2HPO_4を含む２×ＨＢＳ（２８０ｍＭ ＮａＣｌ、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．１）とを等量で少しずつ混合し、その後すぐにボルテックスミキサーで１５秒間撹拌し、続いて室温で１５～３０分間放置した。得られた反応液でレトロウイルスパッケージング細胞Ｐｌａｔ－Ｅを処理することにより、Ｐｌａｔ－Ｅ細胞にベクターを導入した。

[0067] 次いで、ｐＭＸｓ－Ｍｉｐｅｐ－Ｐｕｒｏベクターを導入したＰｌａｔ－Ｅ細胞を１６時間培養した後、新しい培地に交換し、さらに２日間培養した後、培地を回収した。回収した培地をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にて濾過した後、回収した培地の１／３量の４×ＰＥＧ（３２％ ＰＥＧ６０００、０．４Ｍ ＮａＣｌ、４０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）を加えた。その後、３０００ｒｐｍで３０分間遠心し、上清を除去した後、さらに３０００ｒｐｍで５分間遠心した。上清をできるだけ除去した後、沈殿物にＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ライフテクノロジーズジャパン（株））を加えて懸濁した。得られた懸濁液を３Ｔ３－Ｌ１細胞の培地に加え、レ

トロウイルスを感染させることにより、ｐＭＸｓ－Ｍｉｐｅｐ－Ｐｕｒｏベクターを３Ｔ３－Ｌ１細胞に導入した。なお、培地をフィルター濾過する工程からは全て氷上にて行った。感染の２４時間後から２μｇ／ｍＬ　ピューロマイシンを含む培地で５～７日間セレクションを行うことにより、Ｍｉｐｅｐ遺伝子を過剰発現する３Ｔ３－Ｌ１細胞（以下、「Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株」ともいう。）を作製した。

[0068] 次いで、ｐＭＸｓ－Ｐｇｃ－１α－Ｎｅｏベクターを導入したＰｌａｔ－Ｅ細胞を１６時間培養した後、新しい培地に交換し、さらに２日間培養した後、培地を回収した。回収した培地をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にて濾過した後、回収した培地の１／３量の４×ＰＥＧ（３２％　ＰＥＧ６０００、０．４Ｍ　ＮａＣｌ、４０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）を加えた。その後、３０００ｒｐｍで３０分間遠心し、上清を除去した後、さらに３０００ｒｐｍで５分間遠心した。上清をできるだけ除去した後、沈殿物にＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ライフテクノロジーズジャパン（株））を加えて懸濁した。得られた懸濁液をＭｉｐｅｐ　ＯＥ株の培地に加え、レトロウイルスを感染させることにより、ｐＭＸｓ－Ｐｇｃ－１α－Ｎｅｏベクターを Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株に導入した。なお、培地をフィルター濾過する工程からは全て氷上にて行った。感染の２４時間後から１ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８（Ｃａｙｍａｎ）及び０．４μｇ／ｍＬ　ピューロマイシンを含む培地で５～７日間セレクションを行うことにより、Ｍｉｐｅｐ遺伝子及びＰｇｃ－１α遺伝子の両者を過剰発現する３Ｔ３－Ｌ１細胞（以下、「ＤＯＥ株」ともいう。）を作製した。セレクション後は、２００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８（Ｃａｙｍａｎ）及び０．４μｇ／ｍＬ　ピューロマイシンを含む培地で培養、維持した。

[0069] また、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株及びＤＯＥ株の他に、Ｐｇｃ－１α遺伝子を過剰発現する３Ｔ３－Ｌ１細胞（以下、「Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株」ともいう。）、及び空ベクターを導入した３Ｔ３－Ｌ１細胞（以下、「Ｍｏｃｋ細胞」ともいう。）を作製した。

[0070] （ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞の成熟白色脂肪細胞への分化誘導）

３Ｔ３－Ｌ１細胞（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞）を１．５×１０^{4}個／ｃｍ^{2}の細胞密度で播種し、２日後に１００％コンフルエントに達した時点を０日目とした。０日目から２日間は５００μＭ　３－イソブチル－１－メチルキサンチン及び１μＭ　デキサメタゾンを含む維持培地で培養することにより脂肪細胞へと誘導し、その後は２日おきに１０μｇ／ｍＬ　インスリン及び５０ｎＭ　トリヨードサイロニンを含む維持培地で培養することにより成熟脂肪細胞へと誘導した。以降の実験では、分化誘導開始後１２日目の細胞を使用した。

[0071] ＜試験例４＞

（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＰｇｃ－１α及びＭｉｐｅｐのタンパク質発現量の解析）

分化誘導開始後１２日目の細胞（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞）から、ＳＤＳサンプルバッファー（５０ｍＭ　ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ６．８）、２％　ＳＤＳ、３Ｍ　尿素、６％　グリセロール）を用いてタンパク質を抽出した後、ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ）によりタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度が１μｇ／μＬになるように調節し、０．５％　ＢＰＢ及び１００％　２－メルカプトエタノールの等量混合溶液をタンパク質溶液の１／１０量加えた後、９５℃で５分間インキュベートしてサンプルを調製した。調製したサンプルは、８％又は１０％アクリルアミドゲルを用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング溶液（２．５％　スキムミルク及び０．２５％　ＢＳＡをＴＴＢＳで溶解）中で１時間、室温でインキュベートした。その後、一次抗体反応液（Ｉｍｍｕｎｏ　ｓｈｏｔ　ｒｅａｇｅｎｔ　１（コスモ・バイオ（株））：ブロッキング溶液＝２：１）中で一晩、４℃で反応させた。反応後、メンブレンを十分量のＴＴＢＳで５分×２回、１０分×２回洗浄し

、二次抗体反応液（Ｉｍｍｕｎｏ　ｓｈｏｔ　ｒｅａｇｅｎｔ　ＩＩ（コスモ・バイオ（株））：ブロッキング溶液＝２：１）中で１時間、室温で反応させた。反応後、再びＴＴＢＳでメンブレンを洗浄し、ＩｍｍｕｎｏＳｔａｒ　ＬＤ（富士フイルム和光純薬（株））を用いた発光をＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ（Ｂｉｏ－ｒａｄ）にて検出した。検出したタンパク質量は、ＣＢＢ染色の結果により補正した。

[0072] なお、Ｐｇｃ－１αタンパク質の検出には、一次抗体としてマウス抗ＰＧＣ－１αモノクローナル抗体（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を使用し、二次抗体としてＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。また、Ｍｉｐｅｐタンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗ＭＩＰＥＰポリクローナル抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）を使用し、二次抗体としてＨＲＰ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。

[0073] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＰｇｃ－１α及びＭｉｐｅｐのタンパク質発現量を図３Ａ、図３Ｂに示す（ｎ＝４）。図３Ａ、図３Ｂに示すとおり、ＤＯＥ株においては、Ｐｇｃ－１αタンパク質及びＭｉｐｅｐタンパク質の過剰発現が確認された。

[0074] （ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣｏｘ４、Ｍｄｈ２、及びＳｉｒｔ３のタンパク質発現量の解析）

上記と同様にして、ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣｏｘ４、Ｍｄｈ２、及びＳｉｒｔ３のタンパク質発現量を、ウェスタンブロットにより解析した。Ｃｏｘ４タンパク質、Ｍｄｈ２タンパク質、及びＳｉｒｔ３タンパク質はいずれも、Ｍｉｐｅｐタンパク質の基質である。

[0075] なお、Ｃｏｘ４タンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗ＣＯＸ４

ポリクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用し、Ｍｄｈ２タンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗ＭＤＨ２ポリクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用し、Ｓｉｒｔ３タンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗ＳＩＲＴ３ポリクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用した。いずれも二次抗体としてはＨＲＰ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。

[0076] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣｏｘ４、Ｍｄｈ２、及びＳｉｒｔ３のタンパク質発現量を図４Ａ～図４Ｃに示す（ｎ＝４）。図４Ａ～図４Ｃに示すとおり、Ｓｉｒｔ３のタンパク質発現量はＰｇｃ－１α遺伝子の過剰発現に相関して有意に増加したが、Ｃｏｘ４及びＭｄｈ２のタンパク質発現量はいずれの細胞株においても殆ど変化していなかった。

[0077] （ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＴｆａｍ及びＴｏｍ２０のタンパク質発現量の解析）

上記と同様にして、ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＴｆａｍ及びＴｏｍ２０のタンパク質発現量を、ウェスタンブロットにより解析した。Ｔｆａｍタンパク質はミトコンドリアＤＮＡの転写因子であり、Ｔｏｍ２０タンパク質はミトコンドリアの外膜に存在するタンパク質である。

[0078] なお、Ｔｆａｍタンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗ＴＦＡＭポリクローナル抗体（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈ）を使用し、二次抗体としてＨＲＰ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。また、Ｔｏｍ２０タンパク質の検出には、一次抗体としてマウス抗ＴＯＭ２０モノクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ）を使用し、二次抗体としてＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。

[0079] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＴｆａｍ及びＴｏｍ２０のタンパク質発現量を図５Ａ、図５Ｂに示す（ｎ＝４）。図５Ａ、図５Ｂに示すとおり、Ｔｆａｍのタンパク質発現量はＰｇｃ－１α遺伝子の過剰発現に相関して増加傾向を示したが、Ｔｏｍ２０のタンパク質発現量はいずれの細胞株においても殆ど変化していなかった。

[0080] ＜試験例５＞

（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣＳ（ｃｉｔｒａｔｅ　ｓｙｎｔａｓｅ）活性の解析）

分化誘導開始後１２日目の細胞（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞）から、２００μＬのホモゲナイゼーションバッファー（５０ｍＭ　ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％　ホスファターゼ阻害剤カクテル、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％　プロテアーゼ阻害剤カクテル、１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、０．０５％　デオキシコール酸ナトリウム）を用いてタンパク質を抽出した。抽出後のサンプル溶液は、ホモゲナイゼーションバッファーを加えて１／１６倍に希釈し、測定に用いた。

[0081] １８０μＬの反応液（０．１ｍＭ　５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）、０．５ｍＭ　アセチルＣｏＡ、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０））に１０μＬのサンプル溶液を加え、２５℃で５分間インキュベートした。吸光度のベースラインを安定させた後、１０ｍＭ　オキサロ酢酸を１０μＬ加え、３０℃で波長４１２ｎｍにおける吸光度測定を行った。時間を横軸とし、各時間の吸光度からブランクを引いた値の自然対数を縦軸としたグラフの直線部分の傾きから速度定数ｋを求め、その速度定数ｋをタンパク質量で割った値をＣＳ活性とした。

[0082] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＣＳ活性を図６に示す。図６に示すとおり、Ｐｇｃ－１α遺伝子

の過剰発現に相関してＣＳ活性は増加傾向を示した。

[0083] ＜試験例６＞

（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞における脂肪滴蓄積の解析）

９０ｍｇのＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ（Ｓｉｇｍａ）を３０ｍＬの１００％　イソプロパノールに溶解した。この溶液を超純水で６０％に希釈した後、Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にて濾過し、Ｏｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色液とした。分化誘導開始後１２日目の細胞（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞）をＰＢＳで洗浄した後、１０％　ホルマリンを含むＰＢＳを用いて１０分間固定した。超純水で洗浄し、６０％　イソプロパノールで１分間処理した後、Ｏｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色液で２０分間染色した。超純水で３回洗浄し、撮影用のサンプルとした。さらに、超純水を除去して完全に乾燥させた後、１００％　イソプロパノール中で１時間振盪し、脂肪滴を染色したＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏを全て抽出した。抽出溶液を適宜希釈した後、波長４９０ｎｍの吸光度を測定し、脂肪滴量の指標とした。

[0084] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞をＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色液で染色したときの顕微鏡像を図７Ａに示し、脂肪滴蓄積量の測定結果を図７Ｂに示す（ｎ＝３）。図７Ａ、図７Ｂに示すとおり、Ｍｏｃｋ細胞と比較して、ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、及びＭｉｐｅｐ　ＯＥ株の全てで脂肪滴蓄積量が有意に減少し、特にＤＯＥ株における減少が顕著であった。ＤＯＥ株は、ミトコンドリア関連タンパク質の発現量（図４Ａ～図４Ｃ、図５Ａ、図５Ｂ）やＣＳ活性（図６）がＰｇｃ－１α　ＯＥ株と同程度であったにも関わらず、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株に比べて脂肪滴蓄積量が有意に減少していた。この結果から、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の両者の発現を亢進させる物質が抗肥満物質になり得ることが示唆された。

[0085] ＜試験例７＞

（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞の分化の確認）

分化誘導開始後１２日目の細胞（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞）から全ＲＮＡを抽出し、試験例１と同様にして、Ｐｇｃ－１α、Ｍｉｐｅｐ、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎ、Ｐｐａｒγ、及びＡｄｉｐｏｑのｍＲＮＡ発現量をリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより確認した。なお、各ｍＲＮＡ発現量は、Ｒｐｓ１８のｍＲＮＡ発現量により補正した。Ｐｇｃ－１α遺伝子、Ｍｉｐｅｐ遺伝子、及びＲｐｓ１８遺伝子の増幅に使用したプライマーは上記表１及び表２のとおりである。Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎ遺伝子、Ｐｐａｒγ遺伝子、及びＡｄｉｐｏｑ遺伝子の増幅に使用したプライマーを下記表４に示す。

[0086] [表4]

	配列	配列番号
Perilipin	Forward 5’-TGGGAAGCATCGAGAAGGTG-3’	17
	Reverse 5’-ATGGTGTGTCGAGAAAGAGTGTTG-3’	18
Pparγ	Forward 5’-CACAATGCCATCAGGTTTGG-3’	19
	Reverse 5’-GCGGGAAGGACTTTATGTATGAG-3’	20
Adipoq	Forward 5’-TGCCGAAGATGACGTTACTACAAC-3’	21
	Reverse 5’-CTTCAGCTCCTGTCATTCCAAC-3’	22

[0087] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＰｇｃ－１α、Ｍｉｐｅｐ、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎ、Ｐｐａｒγ、及びＡｄｉｐｏｑのｍＲＮＡ発現量を図８に示す。図８に示すとおり、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎ、Ｐｐａｒγ、及びＡｄｉｐｏｑのｍＲＮＡ発現量はいずれの細胞株においても殆ど変化していなかった。この結果及び試験例６の結果から、ＤＯＥ株における脂肪滴蓄積量の減少は、分化シグナルの低下によるものではなく、Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の過剰発現によるものであることが示唆された。

[0088] ＜試験例８＞

（ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細

胞におけるＰｅｒｉｌｉｐｉｎのタンパク質発現量の解析）

試験例４と同様にして、ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＰｅｒｉｌｉｐｉｎのタンパク質発現量を、ウェスタンブロットにより解析した。Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎタンパク質は脂肪滴表面に存在するタンパク質である。コントロールとして、Ｌａｍｉｎ　Ｂ１のタンパク質発現量も解析した。

[0089] なお、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎタンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎモノクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用し、Ｌａｍｉｎ　Ｂ１タンパク質の検出には、一次抗体としてウサギ抗Ｌａｍｉｎ　Ｂ１ポリクローナル抗体（Ｍｅｄｉｃａｌ　＆　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用した。いずれも、二次抗体としてはＨＲＰ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用した。

[0090] ＤＯＥ株、Ｐｇｃ－１α　ＯＥ株、Ｍｉｐｅｐ　ＯＥ株、及びＭｏｃｋ細胞におけるＰｅｒｉｌｉｐｉｎのタンパク質発現量を図９に示す。図９に示すとおり、ＤＯＥ株においては、Ｐｅｒｉｌｉｐｉｎのタンパク質発現量が顕著に減少していた。

請求の範囲

[請求項1] Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現を亢進させる物質を選択することを含む抗肥満物質のスクリーニング方法。

[請求項2] Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子を発現する細胞に被験物質を接触させる工程と、

前記被験物質を接触させない場合に比べて、前記細胞におけるＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程と、

を含む請求項１に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[請求項3] 前記細胞として、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない細胞とを使用し、

前記被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する細胞においてのみＰｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する請求項２に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[請求項4] Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体に、被験物質を接触させる工程と、

前記被験物質を接触させない場合に比べて、前記第１のレポーター遺伝子及び前記第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する工程と、

を含む請求項１に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[請求項5] 前記第１の形質転換体及び前記第２の形質転換体のそれぞれとして、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体とＳｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有しない形質転換体とを使用し、

前記被験物質を接触させることにより、Ｓｒｅｂｐ－１ｃ遺伝子を有する形質転換体においてのみ前記第１のレポーター遺伝子及び前記

第２のレポーター遺伝子の発現量が増加する場合に、該被験物質を抗肥満物質として選択する請求項４に記載の抗肥満物質のスクリーニング方法。

[請求項6] 下記（ａ）～（ｃ）から選択される少なくとも１つを含む抗肥満物質のスクリーニング用キット：

（ａ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを増幅するためのプライマー、

（ｂ）Ｐｇｃ－１α遺伝子及びＭｉｐｅｐ遺伝子のそれぞれを検出するためのプローブ、

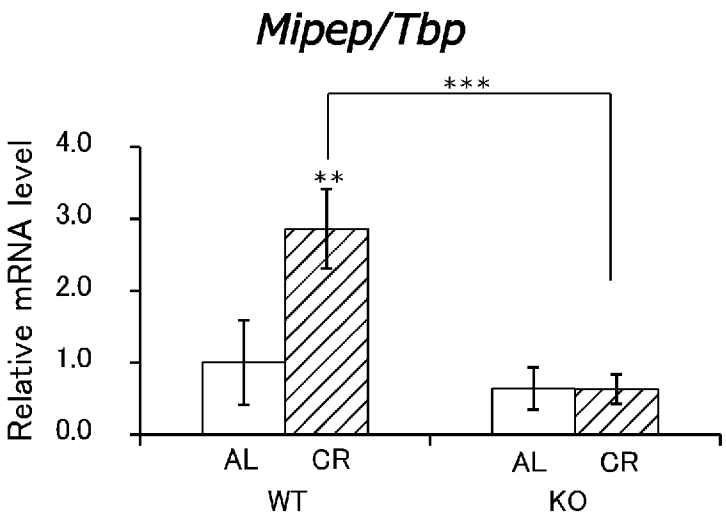
（ｃ）Ｐｇｃ－１αタンパク質及びＭｉｐｅｐタンパク質のそれぞれに対する抗体。

[請求項7] 下記（ｄ）及び（ｅ）から選択される少なくとも１つを含む抗肥満物質のスクリーニング用キット：

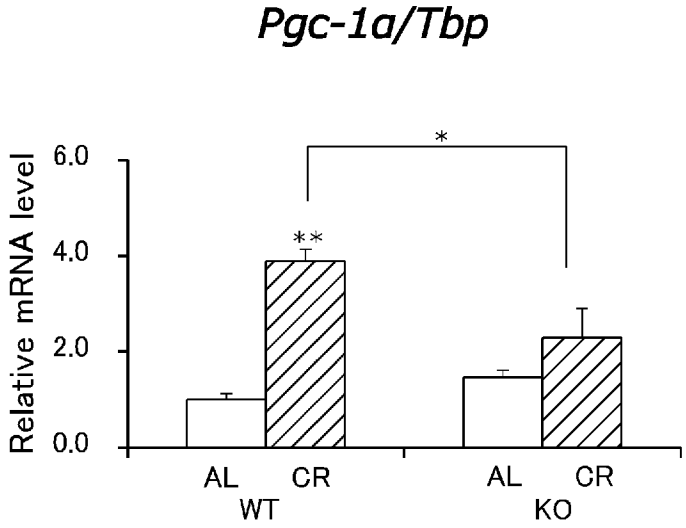
（ｄ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子とを有する第１のベクター、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子とを有する第２のベクター、

（ｅ）Ｐｇｃ－１α遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第１のレポーター遺伝子を有する第１の形質転換体、及びＭｉｐｅｐ遺伝子のプロモーターの下流に機能的に連結された第２のレポーター遺伝子を有する第２の形質転換体。

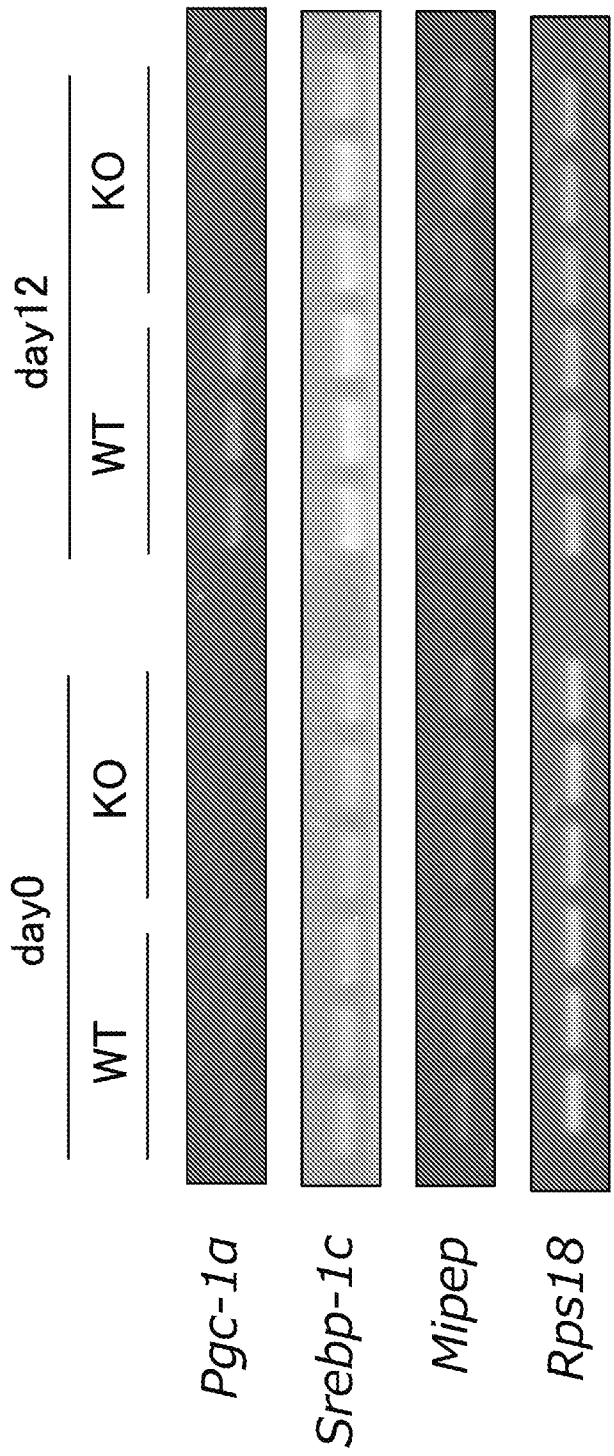
[図1A]


Mipep/Tbp
***
**
Relative mRNA level
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
AL
CR
AL
CR
WT
KO

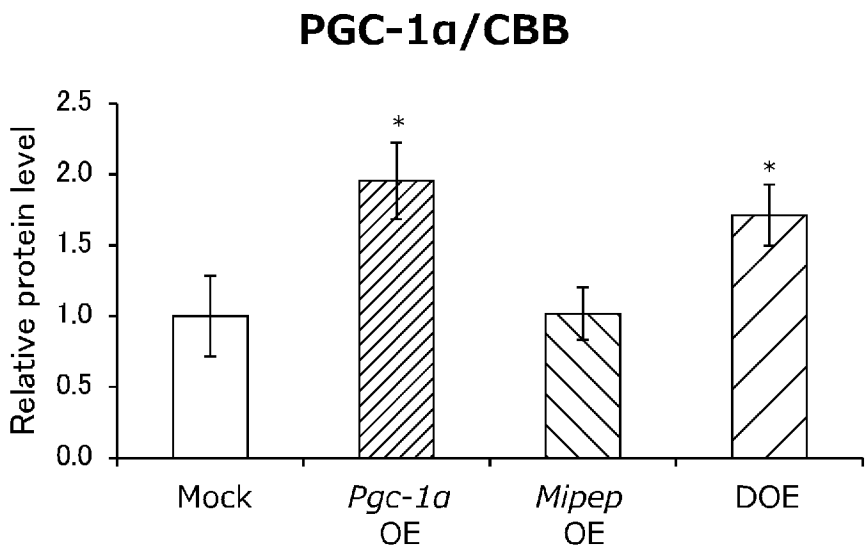
[図1B]


Pgc-1a/Tbp
*
**
Relative mRNA level
6.0
4.0
2.0
0.0
AL
CR
AL
CR
WT
KO

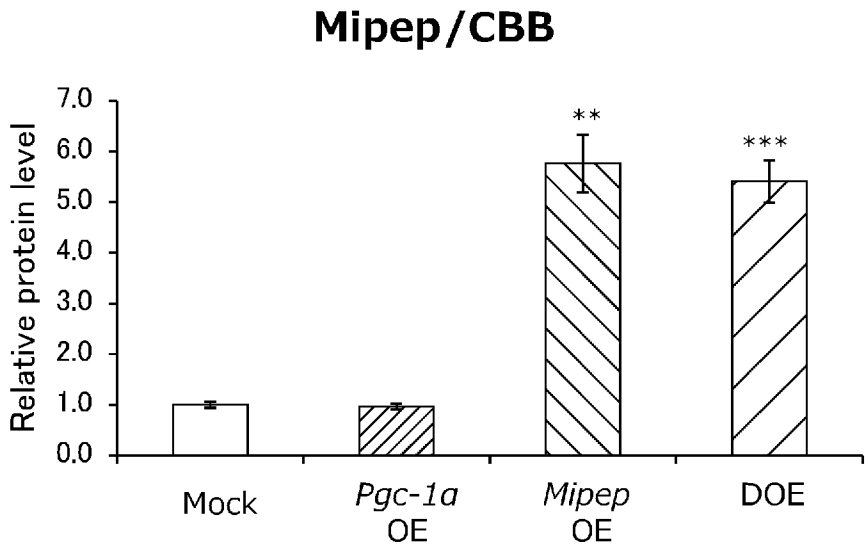
[図2]



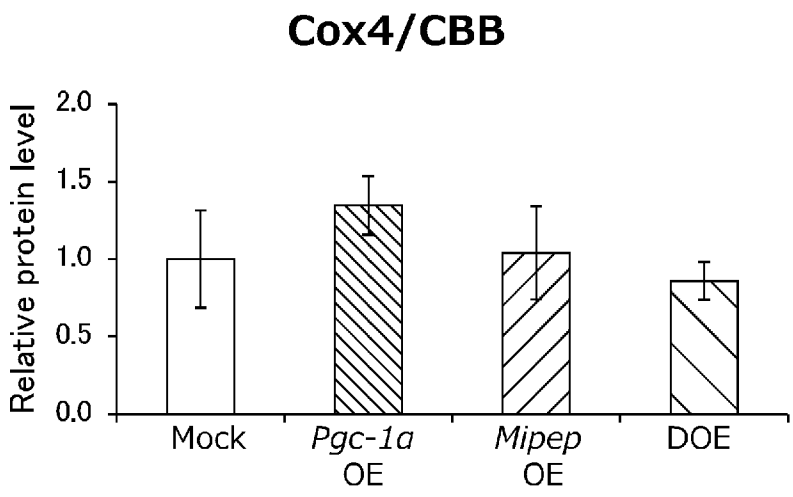
[図3A]


PGC-1α/CBB
Relative protein level
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

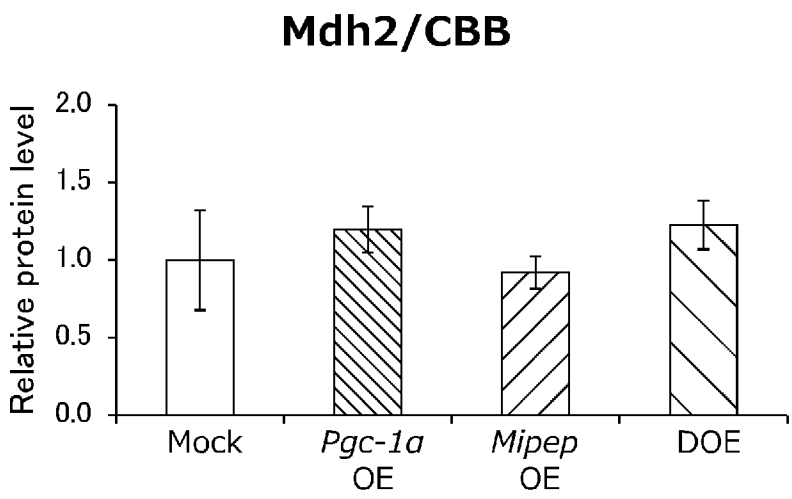
[図3B]


Mipep/CBB
Relative protein level
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
***
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

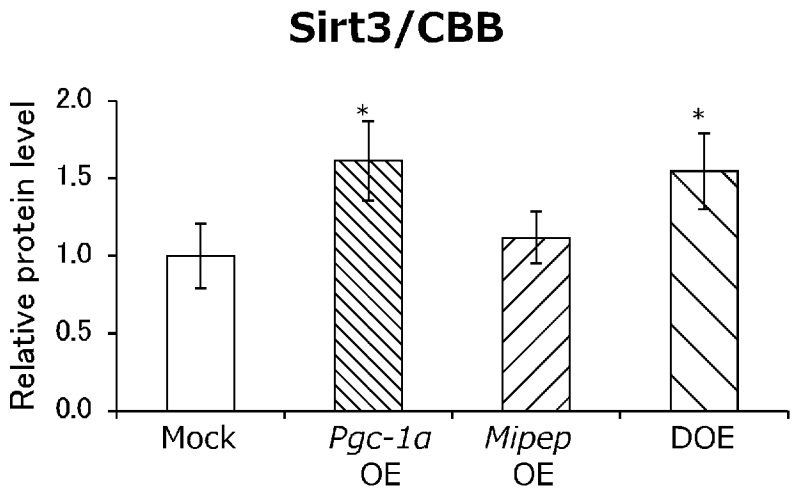
[図4A]


Cox4/CBB
Relative protein level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

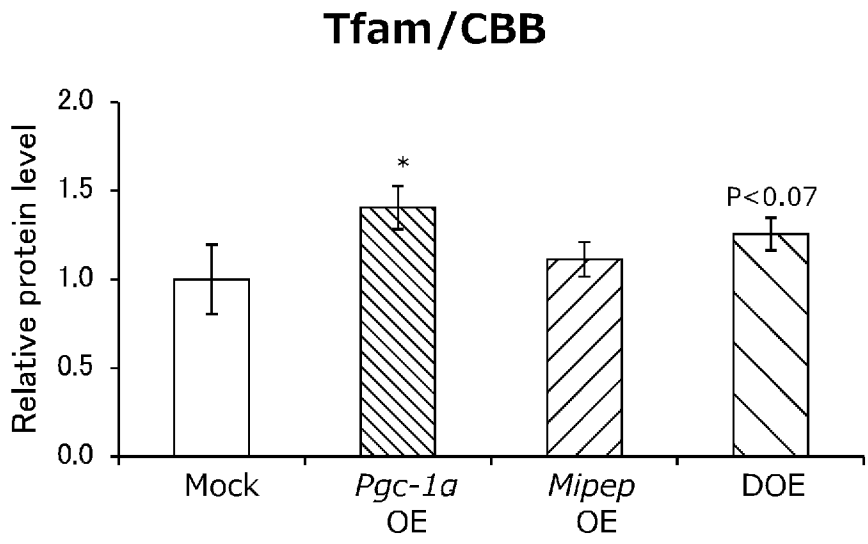
[図4B]


Mdh2/CBB
Relative protein level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

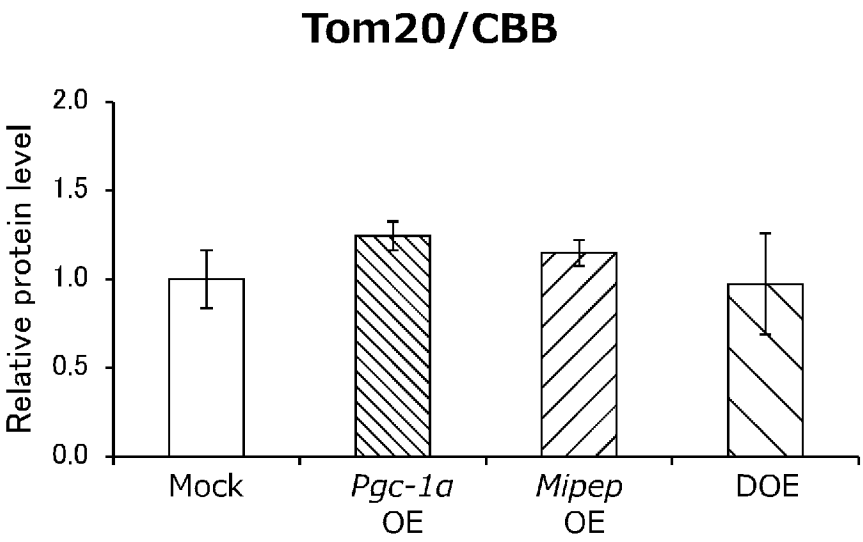
[図4C]


Sirt3/CBB
Relative protein level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

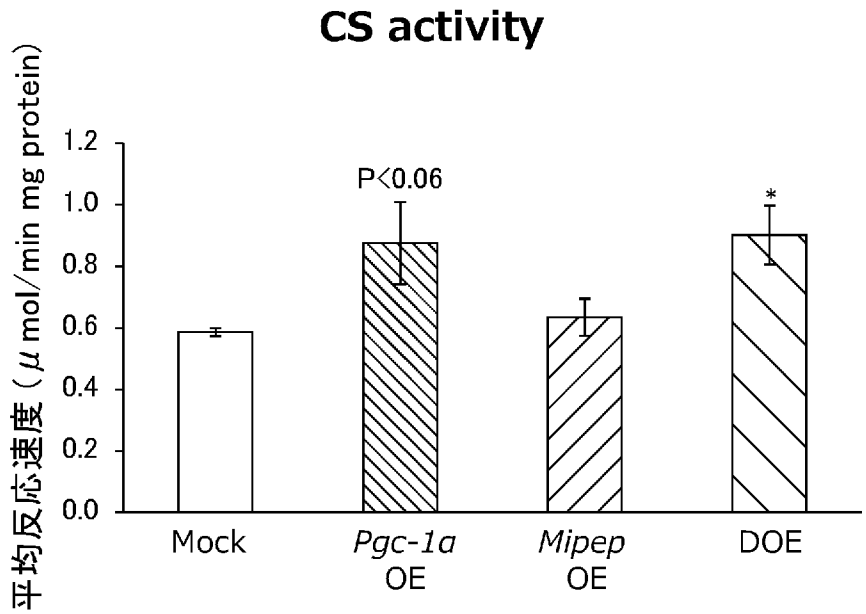
[図5A]


Tfam/CBB
Relative protein level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
P<0.07
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

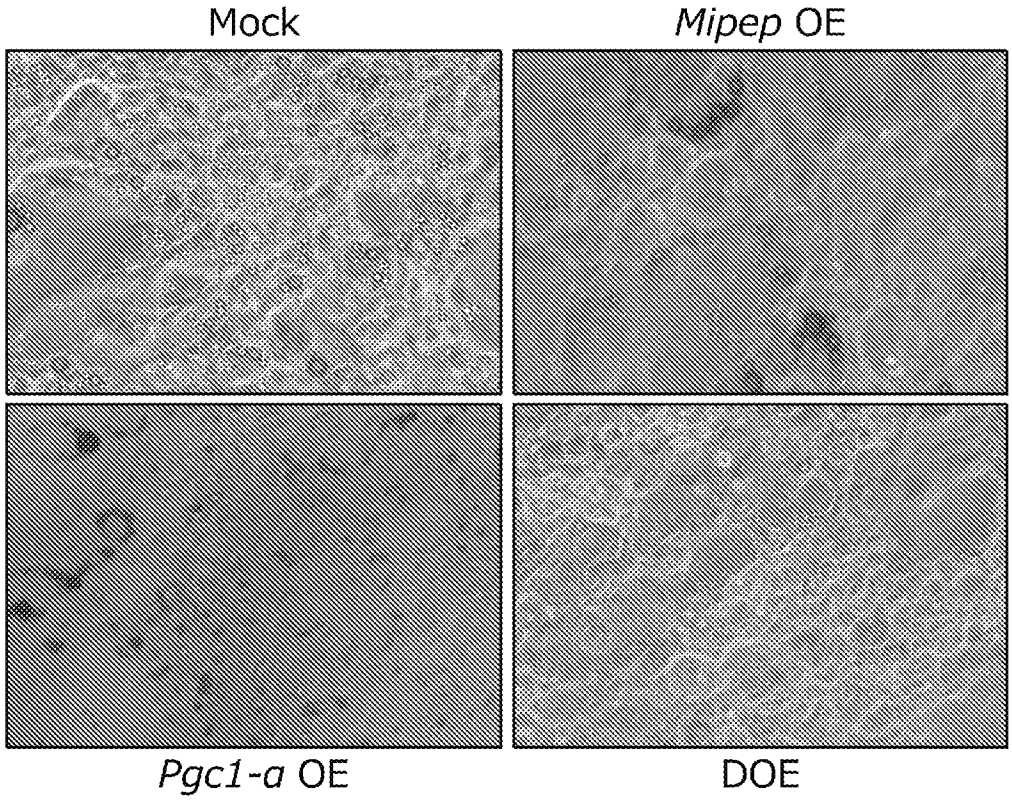
[図5B]


Tom20/CBB
Relative protein level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

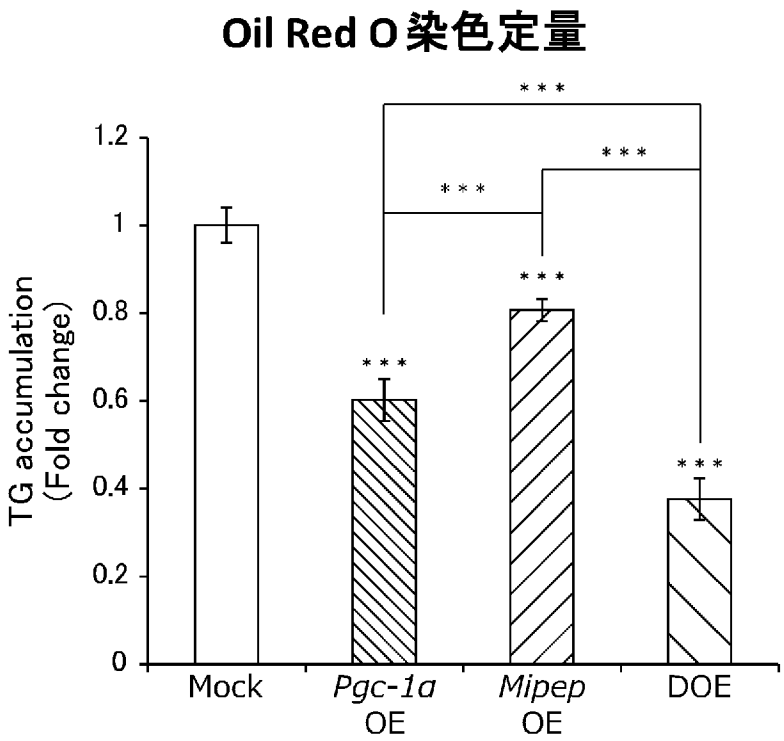
[図6]


CS activity
平均反応速度（μmol/min mg protein）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
P<0.06
*
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

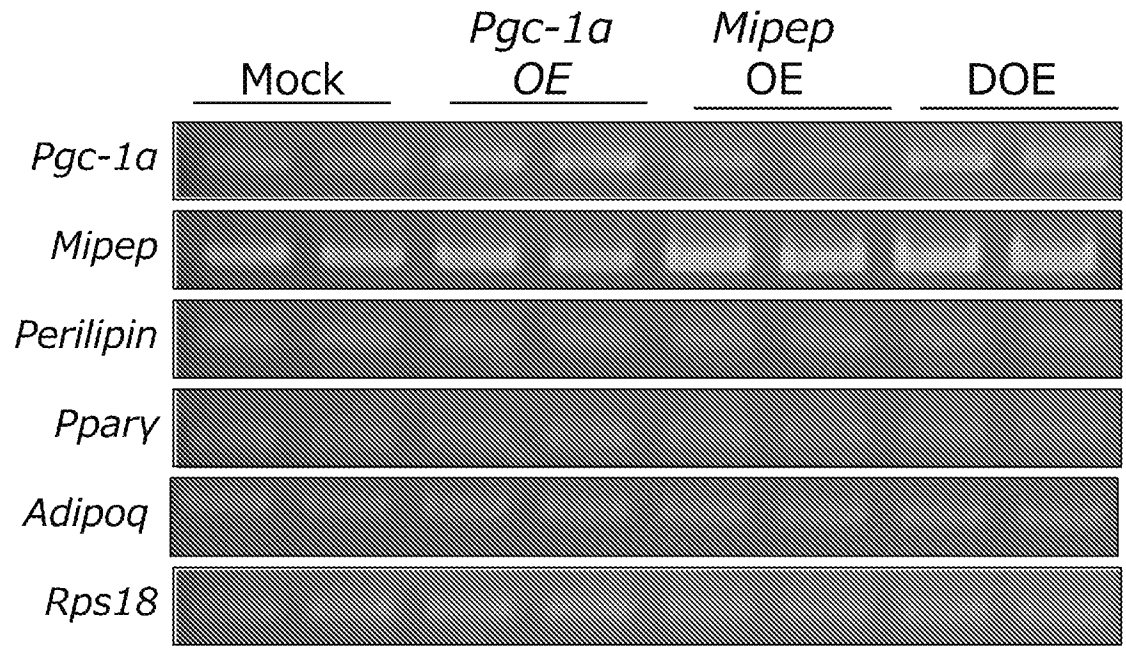
[図7A]


Mock
Mipep OE
Pgc1-a OE
DOE

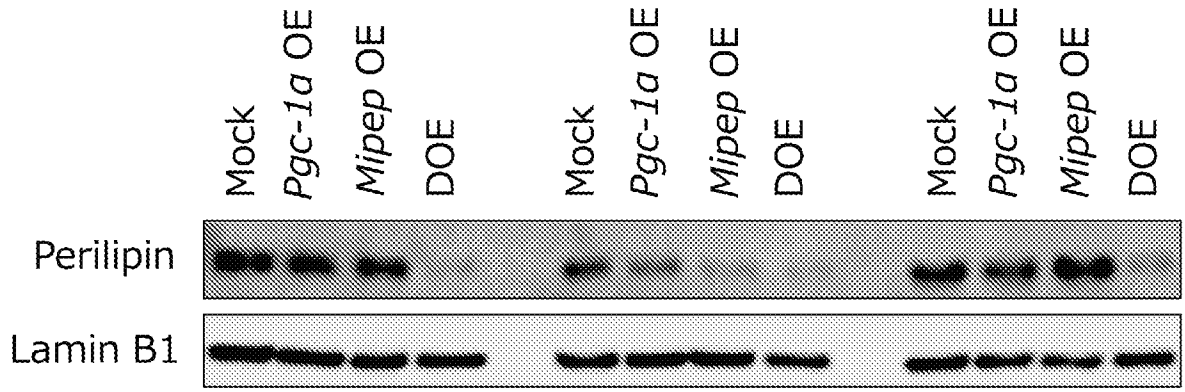
[図7B]


Oil Red O染色定量
TG accumulation (Fold change)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE

[図8]


Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE
Pgc-1a
Mipep
Perilipin
Pparγ
Adipoq
Rps18

[図9]


Mock
Pgc-1a OE
Mipep OE
DOE
Perilipin
Lamin B1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/027480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/6897(2018.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/686(2018.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/63(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)
Int.Cl. C12Q1/6897, C12Q1/02, C12Q1/686, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/63

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOBAYASHI, M. et al., "Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction", FEBS Letters, 28 November 2017, vol. 591, pp. 4067-4073, abstract, page 4067, left column, lines 1-9, fig. 2	1-7

☒ 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 26 September 2019 (26.09.2019)	Date of mailing of the international search report 08 October 2019 (08.10.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/027480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	樋上 賀一, 包括的なミトコンドリア品質管理制御機構の解明と代謝性疾患におけるその破綻, 科学研究費助成事業 研究成果報告書 [オンライン], 3版, 06 June 2016 [retrieval date 26 September 2019], Internet: <URL:http://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-26670193/26670193seika.pdf>, pp. 1-4, page 2, left column, lines 29-34, page 2, right column, lines 1-18, (HIGAMI, Yoshikazu, "Comprehensive mitochondrial quality control and its collapse in metabolic diseases", Grants-on-Aid for Scientific Research, Final research reporton grants-in-aid for scientific research [online], Third edition)	1-7
Y	FUJII, N. et al., "Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction", Aging Cell, 2017, vol. 16, pp. 508-517, summary, fig. 4	1-7
Y	ANDERSON, R. M. et al., "Dynamic regulation of PGC-1 a localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response", Aging Cell, 2008, vol. 7, pp. 101-111, summary, fig. 5	1-7
Y	MARTIN-MONTALVO, Alejandro & DE CABO, Rafael, "Mitochondrial Metabolic Reprogramming Induced by Calorie Restriction", ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, 2013, vol. 19, no. 3, pp. 310-320, abstract, page 315, right column, line 43 to page 316, right column, line 8, table 1	1-7
Y	WO 2017/052340 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 30 March 2017, claims 8, 12 & JP 2018-535247 A & US 2018/0289643 A1 & EP 3361250 A1 & KR 10-2017-0037557 A JP 2011-36223 A (NAGASAKI UNIVERSITY) 24 February 2011, claims (Family: none)	4,5,7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０２７４８０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/6897(2018.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/686(2018.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/63(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.　C12Q1/6897, C12Q1/02, C12Q1/686, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/63

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	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９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）

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), 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
Y	KOBAYASHI, M. et al., Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction, FEBS Letters, 2017.11.28, Vol.591, p.4067-4073, Abstract, 第4067頁左カラム1-9行, Fig.2	1-7

☑　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	国際調査報告の発送日
２６．０９．２０１９	０８．１０．２０１９

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　４４３８
牧野　晃久
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
Y	樋上　賀一，包括的なミトコンドリア品質管理制御機構の解明と代謝性疾患におけるその破綻，科学研究費助成事業　研究成果報告書［オンライン］，3版，2016.06.06［検索日 2019.09.26］，インターネット:<URL:http://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-26670193/26670193seika.pdf>，p.1-4，第2頁左カラム29-34行、第2頁右カラム1-18行	1-7
Y	FUJII, N. et al., Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction, Aging Cell, 2017, Vol.16, p.508-517, Summary, Fig.4	1-7
Y	ANDERSON, R. M. et al., Dynamic regulation of PGC-1α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response, Aging Cell, 2008, Vol.7, p.101-111, Summary, Fig.5	1-7
Y	MARTIN-MONTALVO, Alejandro & DE CABO, Rafael, Mitochondrial Metabolic Reprogramming Induced by Calorie Restriction, ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, 2013, Vol.19, No.3, p.310-320, Abstract, 第315頁右カラム43行-第316頁右カラム8行、表1	1-7
Y	WO 2017/052340 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 2017.03.30, 請求項8,12 & JP 2018-535247 A & US 2018/0289643 A1 & EP 3361250 A1 & KR 10-2017-0037557 A	1-7
Y	JP 2011-36223 A (国立大学法人　長崎大学) 2011.02.24, 特許請求の範囲（ファミリーなし）	4,5,7