

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-529502

(P2008-529502A)

(43) 公表日 平成20年8月7日(2008.8.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-554337 (P2007-554337)
 (86) (22) 出願日 平成18年2月8日 (2006.2.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月4日 (2007.10.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/004397
 (87) 国際公開番号 W02006/086454
 (87) 国際公開日 平成18年8月17日 (2006.8.17)
 (31) 優先権主張番号 11/053, 185
 (32) 優先日 平成17年2月8日 (2005.2.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592257310
 プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ
 ・ハーバード・カレッジ
 アメリカ合衆国02138 マサチューセッ
 ツ州ケンブリッジ、クウインシー・ストリ
 ート17
 (74) 代理人 100136630
 弁理士 水野 祐啓
 (72) 発明者 シンクレア, デイビッド, エー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2132 ウェスト ロックスベリー プ
 レストン ロード 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞及び生物の寿命を延ばし、ストレス耐性を高めるための方法及び組成物

(57) 【要約】

本発明は、真核及び原核細胞で寿命を調節したり、細胞をヒートショックなどの特定のストレスから防御したりするための方法及び組成物を提供するものである。ある方法は、例えばNPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2から成る群より選択される一種以上のタンパク質のレベル又は活性を調節するなどにより、細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを調節するステップを含む。別の方法は、細胞内のニコチンアミドのレベルを調節するステップを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを調節するステップを含む、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する方法。

【請求項 2】

前記細胞内のNAD+再利用経路を調節するステップが、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2 及び NAMPTから成る群より選択されるタンパク質のレベル又は活性を調節するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記調節が増加させることであり、そして前記方法がNPT1、PNC1、NMA1、NMA2 及び NAMPTから成る群より選択されるタンパク質のレベル又は活性を調節するステップを含む、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

NPT1、PNC1、NMA1、NMA2 及びNAMPTから成る群より選択されるタンパク質をコードする少なくとも一種の核酸を、又は、細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを増加させるために十分なその少なくとも一部分を、前記細胞に導入するステップを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

NPT1、PNC1、NMA1、NMA2 及びNAMPTから成る群より選択される一種以上のタンパク質をコードする少なくとも 5 つのヌクレオチド配列を含む少なくとも一種の核酸を、又は、細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを増加させるために十分なその少なくとも一部分を、前記細胞に導入するステップを含む、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

NPT1、PNC1、NMA1、NMA2 及びNAMPTから成る群より選択される少なくとも一種のタンパク質を、又は、細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを増加させるために十分なその少なくとも一部分を、前記細胞内に導入する、又は、前記細胞に接触させる、ステップを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞内のニコチンアミドのレベルを調節するステップを含む、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する方法。 30

【請求項 8】

前記調節が増加させることであり、前記方法が、細胞をニコチンアミド又はその類似体に接触させるステップを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞の寿命が少なくとも約 40 %、延ばされる、請求項 2 又は 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞がin vitroにある、請求項 1 又は 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 又は 7 に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞が酵母細胞である、請求項 1 又は 7 に記載の方法。

【請求項 14】

ストレスがヒートショック；浸透圧ストレス；DNA損傷性作用物質；不適切な塩レベル；不適切な窒素レベル；不適切な栄養分レベル；放射線又は毒性化合物への暴露である、請求項 1 又は 7 に記載の方法。

【請求項 15】

NAD+再利用経路を通るフラックスを調節するステップが、NAD+及びNADHの定常状態レベ 50

ルを基本的に変えることなく起きる、請求項 1 又は 7 に記載の方法。

【請求項 16】

細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物を同定する方法であって、(i) NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPRT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択されるたんぱく質を、検査化合物に、前記たんぱく質の活性に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記酵素の活性を判定するステップであって、前記検査化合物の存在下の、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記酵素の活性の違いは、前記検査化合物が、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物であることの指標である、ステップと、を含む、方法。

【請求項 17】

細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物を同定する方法であって、(i) NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPRT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択される遺伝子の転写調節性核酸をレポータ遺伝子に作動可能に連鎖させて含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節性核酸に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記レポータ遺伝子のレベル又は活性を判定するステップであって、前記検査化合物の存在下の、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記レポータ遺伝子のレベル又は活性の違いは、前記検査化合物が、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物であることの指標である、ステップと、を含む、方法。

【請求項 18】

細胞を検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命又はその対ストレス耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを更に含む、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

【請求項 19】

Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を同定する方法であって、(i) コンピュータ・モデリング・アプリケーションに、ある分子又は分子複合体の一組の構造座標を供給するステップであって、前記分子又は分子複合体が、Cポケットを含むSir2ファミリー・メンバの少なくとも一部分を含む、ステップと、(ii) 前記コンピュータ・モデリング・アプリケーションに、ある化学的実体の一組の構造座標を供給するステップと、(iii) 前記化学的実体が前記分子又は分子複合体に結合又は干渉することが予測される阻害剤であるかどうかを判定するステップであって、前記分子又は分子複合体への結合又は干渉は、前記Sir2ファミリー・メンバの活性の潜在的阻害の指標である、ステップと、を含む、方法。

【請求項 20】

前記化学的実体がニコチンアミドの類似体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を同定する方法であって、(i) 少なくともCポケットを含むSir2ファミリー・メンバのたんぱく質を、検査化合物に、前記Sir2ファミリーのたんぱく質のCポケットに前記検査化合物がおそらくは結合するのに十分な時間、接触させるステップと、(ii) たんぱく質の活性を判定するステップであって、前記検査化合物の非存在下に比較したときに前記検査化合物の存在下におけるたんぱく質の活性がより低いことは、前記検査化合物がSir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤であることの指標である、ステップとを含む、方法。

【請求項 22】

対象の細胞死又は老化に関連する障害を治療又は防止する方法であって、細胞死又は老化に易罹患性である又は細胞死又は老化の対象である細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させる、あるいは、ニコチンアミド・レベルを減らす、作用物質を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 23】

細胞の寿命を減らす、あるいは細胞をストレスに感受性にするのが有益であるような障害を治療又は防止する方法であって、前記対象の細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを減少させる、あるいは、ニコチンアミド・レベルを増す、作用物質を、それを必

10

20

30

40

50

要とする対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 2 4】

ストレス条件から対象を防御する方法であって、NAD+再利用経路を通るフラックスを増す作用物質を前記対象に投与することで、前記対象をストレス条件から防御するステップを含む、方法。

【請求項 2 5】

前記ストレス条件が放射線又は毒性化合物への暴露を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記作用物質が、細胞内のNAMPRTのレベルを増す作用物質である、請求項 2 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

前記作用物質がNAMPRTタンパク質を含む組成物である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記作用物質がニコチンアミドリボシド又はその類似体もしくはプロドラッグである、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、この言及をもってその全文をここに援用することとする、2005年2月8日出願の米国一連番号 11/053,185号に基づく優先権を主張するものである。

20

【0 0 0 2】

権利の声明

本発明は米国国立保健機関より付与された政府助成金R01 GM068072 の下になされた。政府は本発明においていくつかの権利を有するものである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

生理学的研究、そしてより最近では遺伝子発現パターンのDNAアレイ解析により、老化は複雑な生物学的プロセスであることが確認された。対照的に、モデル生物での遺伝子研究では、生物の環境又は遺伝子構成にとって比較的小さな変化があっても老化のプロセスが劇的に遅くなることがあることが実証された。例えば多くの多様な生物の寿命は、カロリー制限として知られる食餌療法で単にカロリー摂取を制限することでも大きく伸ばすことができる(1-3)。

30

【0 0 0 4】

では、簡単な変化が、どうして老化などの複雑なプロセスに対してこのような深遠な効果を有するのであろうか。全ての真核生物が、老化の速度を支配する、驚くほど保存された調節系を持つという画像が浮かび上がっている(4,5)このような調節系は、成長及び生殖から、ストレス耐性をもたらす経路へと資源を振り向けることにより、生物が逆境を生き延びられるようにするために進化の過程で発生したと考えられる。

【0 0 0 5】

40

老化の調節因子の同定において特に有用であることが立証されたモデルの一つは、出芽性酵母、S. セレビジエ(原語:S. cerevisiae)である。S. セレビジエの複製寿命は、典型的には、個々の「母細胞」が生じる芽、即ち「娘細胞」の数であると定義されている(7)。母細胞は、大きさの増大、細胞周期の鈍化、核小体の肥大、定常状態NAD⁺レベルの増加、糖新生及び貯蔵エネルギーの増加、並びにテロメア及び接合型遺伝子座のサイレンシング消失を原因とする繁殖不能性を含め、年齢依存的な変化を起こす(8-13)。暦老化として知られる酵母寿命のもう一つの尺度は、栄養分を枯渇させたときに非分裂性細胞集団が生きたままでいる時間の長さである(14)。暦寿命の増加が、熱ショック及び酸化ストレスに対する耐性増加と相関関係にあることは、細胞成分に対して損傷が蓄積していくことが、この種類の老化の主要な原因であることを示唆している(14,15)。複製老

50

化と暦老化との重なり の程度は現在のところ、不明である。

【 0 0 0 6 】

酵母の複製老化の原因の一つが、反復リボゾームDNA (rDNA) 遺伝子座の不安定性に起因することが示されている (16)。この不安定性により、ERCと呼ばれ、複製はするが分離して娘細胞に成れない環状型のrDNAができる。ERCは最終的には1 0 0 0を越えるコピー数まで蓄積して、必須な転写及び / 又は複製因子を滴定してしまうことで細胞を致死させると考えられている (16-18)。カロリー制限又はfob1枯渇など、DNA組換えを減らす養生法が複製寿命を伸ばす (17,19,20)。

【 0 0 0 7 】

酵母における老化の鍵となる調節因子は、Sir2サイレンシングたんぱく質 (17) という、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) - 依存的脱アセチル化酵素である (21-24)。Sir2は、テロメアと2箇所のサイレンと接合型遺伝子座におけるサイレントなヘテロクロマチン形成を触媒するヘテロ三量体Sir2/3/4 複合体の構成成分である (25)。Sir2はまた、rDNA遺伝子座でのサイレンシングと終期からの脱出に必要なRENT複合体の一部分でもある (26,27)。またこの複合体は最近、Pol IによるrRNAの転写を直接刺激すること、そして核小体構造の調節に関与していること、も最近示されている (28)。

【 0 0 0 8 】

生化学的研究では、Sir2がヒストンH3及びH4のアミノ末端側の尾を容易に脱アセチル化することができ、こうして1-0-アセチル-ADP-リボース及びニコチンアミドを形成させることができることが示されている (21-23,29)。SIR2 のコピーが付加的にある株はrDNAサイレンシングの増加 (30) や 3 0 % 長い寿命 (17) を示す。また最近、C. エレガンスのSIR2ホモログであるsir-2.1のコピーが付加的にあるとこの生物の寿命が大きく延びることも示されている (31)。このことは、老化の SIR2- 依存的調節経路が進化の早い時期に生じ、よく保存されていることを意味している (4)。後生生物と同様に、酵母の寿命も、カロリー制限に似た介入により延びる (19,32)。グルコース応答性 cAMP (アデノシン3'5'-モノホスフェート) - 依存的 (PKA) 経路の活性を低下させる変異は、野生型細胞では寿命を伸ばすが、変異型sir2 株では伸ばさないことから、SIR2 が、カロリー制限経路の鍵となる下流成分であることが実証される (19)。

【 0 0 0 9 】

大半の生物において、NAD⁺ 生合成には2つの経路がある (図1を参照されたい)。NAD⁺ はトリプトファンからde novo合成されるか、あるいは、NAD⁺ 再利用経路を介してニコチンアミドから4つの段階で再循環すると考えられている。細菌のNAD⁺ サルベージ経路の一番目の段階である、ニコチンアミドからニコチン酸及びアンモニアへの加水分解は、pncA 遺伝子産物によって触媒される (33)。pncAに対する相同性を持つS. セレビジエ遺伝子 YGL037が、最近、名称PNC1 (SGD) を与えられた (34)。S. セレビジエではNPT1遺伝子にコードされているニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼは、この反応でニコチン酸をニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) に転化する (35-38)。この時点でNAD⁺

再利用経路及びde novo NAD⁺ 経路は収斂し、NaMNがデスアミノ-NAD⁺ (NaAD) にニコチン酸モノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ (NaMNAT) により転化させられる。S. セレビジエにおいては、細菌のNaMNAT 遺伝子に対して相同性を持つ2つの推定ORF、即ちYLR328 (39) と、特徴付けの済んでいないORF、YGR010 (23,39) がある。我々はこれら2つのORFをそれぞれ NMA1 及びNMA2と言及する。サルモネラ属では、NAD⁺ の再生の最後の段階はNAD合成酵素によって触媒される (40)。まだ特徴付けの済んでいないORFであるQNS1はNAD合成酵素をコードしていると予測される (23)。

【 0 0 1 0 】

酵母において、NPT1 にnull変異があると定常状態NAD⁺ レベルが2分の1に減少し (23)、カロリー制限によりもたらされる長寿が損なわれる (19)。カロリー制限が複製寿命をどのように伸ばすかを説明する現在の仮説の一つは、代謝活性が低下すると、NAD⁺ レベルが増加し、ひいてはSir2 活性が刺激されるというものである (Campisi, 2000 及び Gu

arente, 2000にレビュー)。

【0011】

転写のサイレンシングには、ゲノム中の別個の部位におけるクロマチンの遺伝性修飾が関与している。サイレンシングは長期抑制であると言及されるが、それは、それがプロモータ非特異的であり、しばしば、ある一つのゲノム遺伝子座全体を包含するからである(1', 2')。酵母では、より高等な真核生物のヘテロクロマチンと同様であるDNAのうちのこれらのサイレント領域には、幅広い修飾が起きる(3')。これらの修飾のうちで最もよく研究されているのはヒストンの可逆性アセチル化である(4', 5'にレビュー)。

【0012】

ヒストンのアセチル化状態に影響する2つのクラスの酵素がある。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)と、それに対抗するヒストン脱アセチル酵素(HDAC)である。ゲノムのうちでより転写活性の高い区域に比較すると、クロマチンのサイレント領域内のヒストンは、特にコア・ヒストンH3及びH4のNH2末端の尾でアセチル化の程度が低いことが知られている(6')。三つのクラスのヒストン脱アセチル化酵素が、酵母たんぱく質への相同性に基づいて、解説及び分類されている。クラスI(Rpd3-様)及びクラスII(Hda1-様)のたんぱく質は、阻害剤トリコスタチンA(TSA)に対するそれらの感受性によって特徴付けられている(7', 8')。この阻害剤を用いた研究では、細胞周期、分化、及びアポトーシスの調節因子の発現へのそれらの関与を含め、これらのたんぱく質の細胞内での機能に関する豊富な情報が提供された(9'でレビュー)。

【0013】

酵母Sir2は、クラスIII HDACの始祖メンバーである。Sir2-I様脱アセチル化酵素はTSAにより阻害されず、NAD⁺依存性であるという固有の特徴を有する(10'-13')。このクラスのたんぱく質は、細菌からヒトに至るまで幅広い生物に見られる。酵母Hst2及びヒトSIRT2という少なくとも2つのSir2相同体が細胞質で位置特定されており、またヒトSIRT1が最近、p53を脱アセチル化の標的に決定することが示されている(11', 13'-15')。これらの結果は、このファミリーのメンバーすべてがヒストン又は他の核内基質に特異的な訳ではないことを示している。

【0014】

サイレント情報調節因子(SIR)という用語は、最初、S. セレビジエで接合型遺伝子座(HML 及び HM) の抑制に必要な一揃いの非必須遺伝子を言うために造語された(16')

。酵母でのサイレンシングは、テロメア及びリボゾームDNA(rDNA)遺伝子座でも観察されている(2', 17')。酵母テロメアの接合型遺伝子座やポリ(TG₁₋₃)路でのヘテロクロマチンの形成は、Sir2、Sir3 及び Sir4 のヘテロ三量体型複合体により媒介される(18', 19')。rDNA遺伝子座では、Sir2 はNet1及びCdc14 を含むRENT(核小体サイレンシング及び終期脱出の調節因子)複合体の一部である(20', 21')。これらのたんぱく質のうちでSir2は、三つのサイレント領域すべてでのサイレンシングに不可欠な唯一の因子である(22', 24')。

【0015】

酵母rDNA 遺伝子座 (RDN1)

は。リボゾームRNAをコードする100-200個のタンデムに反復する9 kb の単位から成る。酵母の老化の主要な原因は、これらの反復部分間での組換えが起き(25'-27')、染色体外rDNA環(ERC)の切り出しに至ることに由来とすることが示されている。ERCは複製はされるが、分離して娘細胞になることはできず、こうして細胞が分裂するに連れ、それらが指数関数的に増幅されることになる。ERCは、年老いた細胞では酵母ゲノム全体のそれよりも多数のDNA含有量になるまで蓄積する場合があります、必須な転写及び/又は複製因子を滴定してしまうことで細胞を致死させると考えられている(28')。Sir2 は、rDNAで一体化されたPol III-転写性遺伝子をサイレントにするが、この遺伝子座でのその主な働きは組換えを抑制することであるということの証拠がある。SIR2 を欠失させるとrDNAサイレンシングが消失し、マーカ遺伝子がrDNAの外で組み換えられる頻度が10倍に増す(29

10

20

30

40

50

’)。この結果、ERC形成が増加し、寿命が劇的に短縮する(29’,30’)。

【0016】

Sir2は酵母寿命の制限的成分である。SIR2遺伝子のコピーが一個、余分にあるだけで組換えが抑制されて寿命が40%、延びる(26’,31’,32’)。最近では、SIR2が、検査された全ての生物で寿命を延ばす養生法であるカロリー制限(31’’)のもとで寿命増加にとって必須であることが示されている。更に、Sir2相同体であるsir2.1の量を増加しても線虫C.エレガンスの寿命を延ばすことが示されており(33’)、最も近いヒトの相同体SIRT1がp53の脱アセチル化を通じてアポトーシスを阻害することが示されている(34’,35’)。これらの発見は、Sir2及びその相同体が細胞及び生物レベルで生存率調節において保存された役割を有していることを示唆するものである。

10

【0017】

最近では、大変な量の眼識がSir2-様脱アセチル化酵素の生化学について得られている(36’にレビュー)。In vitroでは、Sir2はヒストンH4のリジン16に、そしてヒストンH3のリジン9及び14に対して特異性を有する(10’,12’,13’)。TSA感受性HDACは子ファクタを要せずに脱アセチル化を触媒するが、Sir2反応にはNAD⁺が必要である。こうして、この共基質の利用可能性の変化を通じてSir2活性の調節が可能になっている(10’-13’)。Sir2脱アセチル化はNAD⁺のADP-リボース部分をニコチンアミドに接合する高エネルギーグリコシド結合の開裂に接続する。開裂があると、Sir2はアセチル基のADP-リボースへの移行を触媒する(10’,11’,15’,37’)。この移行反応の生成物はO-アセチル-ADP-リボースという新規な代謝産物であり、細胞周期の遅れ/ブロックや、胚の卵母細胞成熟を引き起こすことが最近、示されている(38’)。

20

【0018】

脱アセチル化の他の生成物はニコチンアミドという、ニコチン酸の前駆体であり、ビタミンB3の一つの形である(39’)。高用量のニコチンアミド及びニコチン酸が、不安、骨関節炎、精神病を含む範囲の状態を自己治療するためにしばしば、交換可能に用いられており、そしてニコチンアミドは癌及びI型糖尿病の治療法として現在、試験中である(40’)。これらの治療で用いられる高用量の長期安全性が疑問視されており(41’)、(41’)化合物の分子レベルでの効果の可能性は不明である。

【0019】

発明の概要

30

ある実施態様では、本発明は、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する方法であって、細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを調節するステップを含む、方法を提供するものである。本方法は、細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させるステップを含む、細胞の寿命を増加する又は延ばす、あるいはその対ストレス耐性を増加させることを包含するであろう。NAD⁺再利用経路を通るフラックスの調節は、基本的にはNAD⁺及びNADHの定常状態レベルを変えることなく起きると思われ、また、基本的に細胞内のNAD⁺/NADH比を維持することにより起きるであろう。

【0020】

NAD⁺再利用経路を通るフラックスの増加は、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択されるたんぱく質のレベル又は活性を増加させるステップを含むであろう。本方法は、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択されるたんぱく質をコードする少なくとも一つの核酸、又は、ある一つの遺伝子の少なくとも一つのコピーを含む核酸、を細胞に導入するステップを含むであろう。代替的には、本方法は、NPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択される少なくとも一種のたんぱく質を細胞内に導入するステップを含んでもよい。また本方法はNPT1、PNC1、NMA1及びNMA2から成る群より選択される遺伝子の発現を上方調節する作用物質に細胞を接触させるステップを含んでもよい。また細胞は少なくとも約40%長く生きても、あるいは少なくとも約60%長く生きてもよい。

40

【0021】

また本発明は、細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させるステップを含む、例えば熱ショック、浸透圧ストレス、DNA損傷性作用物質(例えば紫外線)、及び不

50

適切な窒素レベルなど、ストレスに対する細胞の耐性を高める方法も提供する。

【0022】

ある実施態様では、細胞の寿命を調節するステップは、細胞内のサイレンシングを調節するステップを含む。サイレンシングにはテロメアのサイレンシング及びrDNA組換えが含まれよう。

【0023】

その寿命を延ばすことのできる、あるいは、ストレスから防御することのできる、細胞は、酵母細胞などの真核細胞でも、あるいは、細菌細胞などの原核細胞であってもよい。細胞はin vitroにあっても、あるいはin vivoにあってもよい。

10

【0024】

別の実施態様では、細胞の寿命又は対ストレス耐性を調節するステップは、細胞内のニコチンアミドの量、及び/又は、NAD：ニコチンアミドの比、を調節するステップを含む。NAD：ニコチンアミドの比は、少なくとも約50%、2、3、5、10又はそれ以上の因子で調節されよう。例えば細胞の寿命の低下又は細胞の対ストレス感受性の亢進は、細胞内のニコチンアミドのレベルを増加させるステップを含むであろう。これは、細胞を約1乃至20mM、好ましくは約2乃至10mMの量のニコチンアミドに接触させるステップを含むであろう。また細胞内のニコチンアミドのレベルは、ニコチンアミドの生合成に關与する酵素のレベル又は活性を増加させる、あるいは、ニコチンアミドを分解又は失活させる酵素のレベル又は活性を減少させることによって、増加するであろう。ニコチンアミドを直接又は間接的に失活させる酵素には、PNC1；ニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼ (NNMT 及びNNT1)；NPT1、及びそのヒト相同体；ニコチンアミド ホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPT)；及び選択的にニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMNAT-1 及び 2)；NMA1 及び2並びにそのヒト相同体がある。

20

【0025】

反対に、細胞の寿命の伸長又は細胞の対ストレス耐性の向上（即ち感受性の低下）は、細胞内のニコチンアミドのレベルを減少させるステップを含むであろう。これは、ニコチンアミドの生合成に關与する酵素のレベル又は活性を低下させる、あるいは、ニコチンアミドを分解又は失活させる酵素のレベル又は活性を増加させることにより、達成されよう。従って、細胞の寿命又はストレス耐性の増加は、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択されるたんぱく質の活性又は発現レベルを増加させることにより、達成することができる。寿命又はストレス耐性の増加は、また、細胞をニコチンアミドリボシド、NAD⁺ 前駆体、又はこれらの生物学的に活性な類似体又はこれらのプロドラッグに接触させたり、そして選択的にはニコチンアミドリボシドキナーゼ、例えばNrK1 及びNrK2のたんぱく質レベル又は活性を増加させたりすることでも、達成することができる（Bieganski et al. (2004) Cell 117:495を参照されたい）。

30

【0026】

更に本発明は、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物を同定する方法を提供するものであり、同方法は (i) NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択されるたんぱく質を、検査化合物に、前記たんぱく質の活性に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記酵素の活性を判定するステップであって、前記検査化合物の存在下の、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記酵素の活性の違いは、前記検査化合物が、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節する化合物であることの指標である、ステップと、を含む。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、前記細胞の対ストレス耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。

40

【0027】

50

別の実施態様では、本発明は、細胞の寿命又は特定の種類のストレスに対するその耐性を調節する化合物を同定する方法を提供し、同方法は、(i) NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択される遺伝子の転写調節性核酸をレポータ遺伝子に作動可能に連鎖させて含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節性核酸に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記レポータ遺伝子のレベル又は活性を判定するステップであって、前記検査化合物の存在下の、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記レポータ遺伝子のレベル又は活性の違いは、前記検査化合物が、細胞の寿命又は特定の種類のストレスに対するその耐性を調節する化合物であることの指標である、ステップと、を含む。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、前記細胞の対ストレス耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。

10

【0028】

更にここでは、細胞内のニコチンアミド・レベルを調節する低分子などの作用物質を同定する方法も提供される。本方法は、(i) 細胞内のニコチンアミドのレベルに感受性のレポータ・コンストラクトを含む細胞又は細胞ライセートを提供するステップと、(ii) 前記細胞を検査作用物質に接触させるステップと、(iii) 前記検査作用物質に接触させた細胞内のニコチンアミドのレベルを判定するステップであって、前記検査作用物質で処理していない細胞に比較したときの、前記検査作用物質で処理された細胞内のニコチンアミドのレベルの違いは、前記検査作用物質が細胞内のニコチンアミドのレベルを調節することの指標である、ステップとを含むであろう。更に当該細胞は、DNA結合性要素に結合することのできる融合たんぱく質をコードするベクタを、レポータ遺伝子に作動可能に連鎖させて含んでもよい。該融合たんぱく質は、Sir2ファミリー・メンバなどのニコチンアミド感受性酵素の少なくともNAD⁺結合性ポケットと、異種のポリペプチドとを含むものでもよい。前記の異種のポリペプチドは、転写因子のトランス活性化ドメインであってもよい。更に本方法は、細胞を検査化合物に接触させるステップと、細胞の寿命又はその対ストレス耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。

20

【0029】

更に本発明の範囲には、Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を同定するコンピュータ支援された法もある。本方法は、(i) コンピュータ・モデリング・アプリケーションに、ある分子又は分子複合体の一組の構造座標を供給するステップであって、前記分子又は分子複合体が、Cポケットを含むSir2ファミリー・メンバの少なくとも一部分を含む、ステップと、(ii) 前記コンピュータ・モデリング・アプリケーションに、ある化学的実体の一組の構造座標を供給するステップと、(iii) 前記化学的実体が前記分子又は分子複合体に結合又は干渉することが予測される阻害剤であるかどうかを判定するステップであって、前記分子又は分子複合体への結合又は干渉は、前記Sir2ファミリー・メンバの活性の潜在的阻害の指標である、ステップとを含む。前記の化学的実体はニコチンアミドの類似体であってよい。Sir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤を同定するもう一つの方法は、(i) 少なくともCポケットを含むSir2ファミリー・メンバのたんぱく質を、検査化合物に、前記Sir2ファミリーのたんぱく質のCポケットに前記検査化合物がおそらくは結合するのに十分な時間、接触させるステップと、(ii) たんぱく質の活性を判定するステップであって、前記検査化合物の非存在下に比較したときに前記検査化合物の存在下におけるたんぱく質の活性がより低いことは、前記検査化合物がSir2ファミリー・メンバの活性の阻害剤であることの指標である、ステップとを含む。

30

40

【0030】

加えて、本発明は、対象の老化又は細胞死(例えばアポトーシス)に関連する疾患、あるいはカロリー制限の効果が有益であろう疾患、を治療又は防止する方法も提供する。ある方法は、細胞死に易罹患性である又は細胞死の対象である細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させる、あるいは、ニコチンアミド・レベル又はニコチンアミド/NA

50

D⁺の比を減らす、作用物質を、それを必要とする対象に投与するステップを含むであろう。疾患は慢性でも又は急性でもよいが、その中にはアルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、心筋梗塞又は代謝性疾患、例えばインシュリン耐性など、がある。寿命を延ばす又は対ストレス耐性を増すための本発明の方法は、美容目的のためなど、老化を減らすためにも用いることができる。本作用物質を局所的にも、又は全身的にも投与することができる。寿命を延ばす又は対ストレス耐性を増す方法は、例えば移植前の器官又は組織内など、対象の外にある細胞、組織又は器官に対しても用いることができる。

【0031】

更に本発明は、細胞の寿命を減らす、あるいは細胞をストレスに感受性にする 것이有益であるような疾患を治療又は防止する方法も提供するものである。このような疾患には、例えば癌及び自己免疫疾患など、細胞が好ましくないようなものがある。方法は、化学療法薬など、他の作用物質による致死に細胞を感作させるものであってもよい。

【0032】

更に本発明の方法を用いて、哺乳動物以外の生物の寿命及びストレス耐性を調節することもできる。例えば本方法を微生物及び植物に用いることができる。具体的には、本発明の方法は、例えばニコチンアミド・レベルを下げる化学物質でこれら进行处理することにより、あるいは、細胞内のNAD⁺再利用経路又はニコチンアミドのレベルを調節する遺伝子を遺伝子改変することにより、植物の高い塩、早魃又は疾病に対する耐性を増すことを可能にするものである。

【0033】

更に、対象の全身の健康を判定したり、あるいは対象がストレス状態に知らずに暴露するなど暴露したことがあるかどうかを判定したりする方法など、診断法も提供される。更にある診断法は、更に診断法を癌の存在又は発症可能性を診断するためにも用いてよい。ある方法は、(i)対象由来の血液又は血清などの細胞又は体液の試料を提供するステップと、(ii)NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NAMPRT、NMNAT-1、及びNMNAT-2から成る群より選択される遺伝子の発現レベル又はそれにコードされたたんぱく質のレベルもしくはその活性を判定するステップであって、コントロール試料に比較したときにある遺伝子の発現又はそれにコードされたたんぱく質のレベルもしくはその活性が高いことは、対象の全身の健康が充分でない、許容できない、又は至適でないことの指標である、ステップとを含むであろう。更にある診断法は、NAD⁺、NADH、ニコチンアミド、又は、NAD⁺再利用経路の他の中間化合物のレベルを判定するステップを含むであろう。ある実施態様では、本方法は、対象の血清中のNAMPRTのレベルを判定するステップを含む。

【0034】

発明の詳細な説明

本発明は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺) + 再利用経路を通るフラックスを増加させることにより、酵母細胞の寿命を少なくとも約60%延ばすことができるという発見に少なくとも部分的に基づく(図1に示す)。加えて、NAD⁺再利用経路を通るこのようなフラックスの増加は、基本的にNAD⁺及びNADHレベルの増加がなくとも、そして基本的にNAD⁺/NADH定数の比を維持することにより、起きることがここで示された。実施例で示すように、NAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させることで細胞の寿命を延ばすことは、細胞内にNAD⁺再利用経路に関与する遺伝子、例えばNPT1、PNC1、NMA1及びNMA2、の付加的なコピーを導入することにより、達成することができる。更に実施例では、NAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させると、熱ショックなどの特定の種類のストレスから酵母細胞が保護されることが示された。更に、PNC1を過剰発現させると、サイレンシング、寿命やストレス耐性が増し、例えば紫外線(UV)及び臭化エチジウム及び浸透圧ストレスにより引き起こされるDNAの損傷から細胞が保護される。他方、PNC1を欠失させると寿命の伸長が妨げられ、細胞がストレスに対して感受性になる。

【0035】

また本発明は、ニコチンアミドが酵母でサイレンシングを阻害することで細胞の寿命を減らすという発見にも、少なくとも部分的に基づく。更にニコチンアミドは、細胞をスト

レスに対して感受性にすることも示された。具体的には、細胞からのニコチンアミドの分泌に關与する酵素であるニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ (NNMT) を過剰発現させると、サイレンシングが刺激され、こうして寿命が延び、(放射線暴露などの) ストレスに対する寛容が増したが、この酵素を欠失させると反対の効果があったことが示された。

【0036】

原核生物から真核生物に至るまで、NAD⁺ 再利用経路及びde novo経路並びにサイレンシング事象が強く保存されていることに少なくとも基づくと、本発明の方法は、酵母細胞及び原核細胞に加え、いずれの真核細胞にも応用できることが予測される。

【0037】

1. 定義

ここで用いられる場合の以下の用語及び文言は、下に挙げる意味を有するものとする。他に定義しない限り、ここで用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。

【0038】

単一形「一つの(原語: "a")」、「一つの(原語: "an")」及び「その(原語: "the")」には、文脈からそうでないことが明らかな場合を除いて複数形の言及が包含される。

【0039】

用語「作用物質」はここでは、化合物、化合物の混合物、生物巨大分子(例えば核酸、抗体、たんぱく質、又はその部分、例えばペプチド)、あるいは、細菌、植物、真菌、又は動物(特に哺乳動物)細胞もしくは組織などの材料から作製された抽出物を指すために用いられている。

【0040】

このような作用物質の活性は、それを、対象で局所的又は全身的に作用する生物学的に、生理的に、又は薬理学的に活性な一物質(又は複数の物質)である「治療的作用物質」として適したものにするであろう。

【0041】

「糖尿病」とは、高血糖又はケトアシドーシスや、長期の高血糖状態又は糖耐性低下を原因とする慢性で全身性の代謝異常を言う。「糖尿病」はI型及びII型(非インシュリン依存性糖尿病又はNIDDM)型の当該疾患の両者を包含する。糖尿病のリスク因子には以下の因子がある: 男性の場合40インチ又は女性の場合35インチを超える胴囲、130/85 mmHg以上の血圧、150 mg/dlを越えるトリグリセリド、100 mg/dlを越える絶食時血糖、又は男性で40 mg/dl 又は女性で50 mg/dl 未満の高密度リポたんぱく質。

【0042】

用語「ED₅₀」は当業で公知である。いくつかの実施態様では、ED₅₀ は、その最大応答又は効果の50%を生ずる薬物の用量、又は代替的には、検査対象又は標品の50%で所定の応答を生ずる用量、を意味する。用語「LD₅₀」は当業で公知である。いくつかの実施態様では、LD₅₀ は検査対象の50%で致命的である薬物の用量を意味する。用語「治療指数」は、LD₅₀/ED₅₀で定義される、ある薬物の治療的指数を言う当業で公知の用語である。

【0043】

用語「インシュリン耐性」とは、正常量のインシュリンが、インシュリン耐性を有さない対象における生物学的応答に比較して正常以下の生物応答を生ずる状態を言う。

【0044】

ここで論じる「インシュリン耐性障害」とは、インシュリン耐性により引き起こされる、又は、インシュリン耐性に寄与する、いずれかの疾患又は状態を言う。例には: 糖尿病、妊娠性糖尿病、肥満、メタボリック症候群、インシュリン耐性症候群、X症候群、インシュリン耐性、高血圧、高血圧、高血中コレステロール、異脂肪血症、高脂血症、異脂肪血症、脳卒中、冠状動脈疾患又は心筋梗塞を含むアテローム硬化性疾患、高血糖症、高イ

10

20

30

40

50

ンシュリン血症及び／又は高プロインシュリン血症、糖耐性障害、インシュリン放出遅延、虚血性心疾患、狭心症、うっ血性心不全、脳卒中を含む糖尿病合併症、痴呆における認知機能、網膜症、末梢神経疾患、腎症、糸球体腎炎、

糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、高血圧性腎硬化症、特定の種類の癌（例えば子宮内膜、乳房、前立腺、及び結腸）、妊娠合併症、女性の生殖能不全（例えば月経不全、不妊、排卵異常、多嚢胞性卵巣疾患候群（PCOS））、脂肪異常、コレステロール関連障害、例えば胆石、胆嚢炎及び胆石症、通風、閉塞性睡眠時無呼吸及び呼吸器の問題、変形性関節症、並びに骨粗鬆症などの骨の喪失の防止及び治療、がある。

【0045】

ここでDNA又はRNAなどの核酸に関して用いられる用語「単離された」とは、巨大分子の天然源に存在する、それぞれ他のDNA又はRNAから分離された分子を言う。更にここで用いられる単離されたという用語は、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質、ウイルス物質、又は培養基を実質的に含まない、あるいは、化学合成された場合には化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない、核酸又はペプチドも言う。更に、「単離された核酸」は、天然では断片として生じず、天然状態では見られないような核酸断片も包含することを意図している。また用語「単離された」は、他の細胞内たんぱく質から単離されたポリペプチドを言うためにここで用いられており、精製されたポリペプチド及び組換えポリペプチドの両者を包含することを意図している。

10

【0046】

「ある細胞のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを調節する」とは、例えば図1に示すような、NAD⁺再利用経路により生じるNAD⁺分子の数を増加又は減少させることになるような作用を言う。

20

【0047】

ここで用いられる場合の用語「核酸」とは、デオキシリボ核酸（DNA）及び適当な場合にはリボ核酸（RNA）などのポリヌクレオチドを言う。更にこの用語は、均等物として、ヌクレオチド類似体から作成されるRNA又はDNAの類似体、そして解説する実施態様に該当する場合には一本鎖（センス又はアンチセンス）及び二本鎖ポリヌクレオチドも包含するものと、理解されたい。EST、染色体、cDNA、mRNA、及びrRNAは、核酸と言及する場合のある分子の代表的な例である。

【0048】

文言「ある遺伝子に相当する核酸」とは、例えば当該遺伝子に特異的にハイブリダイズすることのできる核酸など、当該遺伝子を検出するために用いることのできる核酸を言う。

30

【0049】

用語「パーセント、同一である」とは、2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の配列同一性を言う。同一性は、それぞれ、比較を目的としてアライメントしてもよい各配列中のある一つの位置を比較することにより、決定することができる。比較された配列中の均等な位置が同じ塩基又はアミノ酸で占められていれば、その分子はその位置において同一である。均等な部位が同じ又は類似のアミノ酸残基（例えば立体及び／又は電子の性質、類似であるなど）で占められていれば、その分子をその位置において相同（類似）であると言うことができる。相同性、類似性、又は同一性のパーセンテージでの表現とは、比較された配列に共通の位置にある同一又は類似のアミノ酸の数の関数を言う。FASTA、BLAST、又はENTREZを含め、多様なアライメント・アルゴリズム及び／又はプログラムを用いてよい。FASTA及びBLASTはGCG配列解析パッケージ（ウィスコンシン州マジソン、ウィスコンシン大学）の一部として入手することができ、デフォルト設定などして用いることができる。ENTREZはメリーランド州ベセスダの米国国立保健研究所、ナショナル・ライブラリー・オブ・メディスン、ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーションから入手することができる。ある実施態様では、2つの配列の同一性のパーセントは、例えば各アミノ酸ギャップを、それが2つの配列間の一個のアミノ酸又はヌクレオチドのミス対合であるかのごとくに重みをつけるなど、ギャップ・ウェ

40

50

イトを1にしたGCGプログラムにより決定することができる。アライメントのための他の技術は、米国カリフォルニア州サンディエゴ、Harcourt Brace & Co.社の一部門であるAcademic Press社、Doolittle 編Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996)に解説されている。好ましくは、配列中のギャップを許容するアライメント・プログラムを用いて配列をアライメントするとよい。Smith-Watermanは配列アライメントでギャップを許容するアルゴリズムの一種である。Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)を参照されたい。更に、Needleman 及びWunsch のアライメント法を用いたGAPプログラムを用いて配列をアライメントすることもできる。代替的な検索戦略はMASPARコンピュータで作動するMPSRCHを用いるものである。MPSRCHはSmith-Waterman アルゴリズムを用いて大規模配列コンピュータで配列を採点する。このアプローチは関係の遠い対合を拾い出す能力に優れており、小さなギャップやヌクレオチド配列エラーについて特に寛容である。核酸にコードされたアミノ酸配列を用いてたんぱく質及びDNAデータベースの両方を検索することができる。個々の配列を持つデータベースは上記のEnzymology、Doolittle編に解説されている。データベースにはGenbank、EMBL、及び日本のDNA データベース (DDBJ)がある。

10

【0050】

「肥満した」個人又は肥満に苦しむ個人とは、一般に、少なくとも25以上の体重指数(BMI)を有する個人である。肥満にはインシュリン耐性が伴っても、又は伴っていなくてもよい。

【0051】

20

ここで「寿命」又は細胞の「寿命」と交換可能に用いられている「複製寿命」とは、個々の「母細胞」が生じる娘細胞の数を言う。他方「暦老化」とは、栄養分を枯渇させたときに非分裂細胞集団が生きたままでいられる時間の長さを言う。細胞の寿命は本発明の方法を用いて少なくとも約20%、30%、40%、50%、60% 又は20% 乃至70%、30% 乃至60%、40% 乃至60% 又はそれ以上、増加させることができる。

【0052】

「Sir2ファミリー・メンバ」又は「Sir2たんぱく質ファミリー・メンバ」とは、S・セレビジエSir2たんぱく質や、Sir2に実質的な構造類似性を有するいずれかのヒストン脱アセチル化酵素、例えばヒト相同体 hSIRT1、hSIRT2、hSIRT3、hSIRT4、hSIRT5、hSIRT6 及びhSIRT7など；並びにSir-2.1を言う。

30

【0053】

ここで用いられる場合の「低分子」は、約5 kD 未満、そして最も好ましくは約4 kD未満の分子量を有する組成物を言うことを意図している。低分子は核酸でも、ペプチドでも、ポリペプチドでも、ペプチドミメティックでも、糖でも、脂質でも、又は他の有機(炭素を含有する)もしくは無機分子でもよい。数多くの製薬企業が、しばしば真菌、細菌又は藻類抽出物であり、ここで解説した検定のいずれかでスクリーニングすることのできる化学的及び/又は生物学的混合物の広範なライブラリを有する。

【0054】

あるプローブの、テンプレート核酸の標的部位への「特異的ハイブリダイゼーション」という用語とは、ハイブリダイゼーション・シグナルを明白に解釈できるような、プローブの主に標的へのハイブリダイゼーションを言う。更にここで解説するように、特異的ハイブリダイゼーションに至るような条件は、相同性領域の長さ、当該領域のGC含有量、ハイブリッドの融解温度「T_m」に応じて様々であろう。従ってハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション溶液及び洗浄液の塩濃度、酸性度、及び温度で異なるであろう。

40

【0055】

「ストレス」とは、成長、発達又は生殖のためのいずれかの非至適条件を言う。「ストレス条件」は熱ショック、浸透圧ストレス、DNA損傷性の作用物質、不適切な塩レベル、不適切な窒素レベル、不適切な栄養分レベル、放射線又は毒性化合物、例えば毒素又は化学戦争用の物質(例えば汚い爆弾や、バイオテロで用いられるであろう他の兵器)への暴

50

露でもよい。「不適切なレベル」とは成長、発達、又は生殖にとって非至適条件に至るレベルを言う。

【0056】

状態又は疾患を「治療する」とは、当該状態又は疾患の少なくとも一つの症状を治癒させたり、軽減することを言う。

【0057】

用語「治療的作用物質」は当業で公知であり、対象で局所的又は全身的に作用する生物学的に、生理学的に、又は薬理学的に活性な物質であるいずれかの化学的部分を言う。更にこの用語は、動物又はヒトにおける疾患の診断、治癒、軽減、治療又は防止や、望ましい身体的又は精神的発達及び/又は状態の促進に用いられることを意図したいずれかの物質も意味する。

10

【0058】

用語「治療効果」は当業で公知であり、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる、動物、特に哺乳動物、そしてより具体的にはヒト、における局所的又は全身的な効果を言う。文言「治療上有効量」は、いずれかに治療に当てはまる妥当な利益/リスク比で何らかの望まれる局所的又は全身的効果を生じるこのような物質の量を意味する。このような物質の治療上有効量は、治療しようとする対象及び疾患又は状態、対象の体重及び年齢、疾患又は状態の重篤度、投与の形態等、当業者であれば容易に決定することのできるものに依存して様々であろう。例えば、ここで解説されたいくつかの組成物を、このような治療に当てはまる妥当な利益/リスク比で所望の効果を生じるために十分な量、投与してもよい。

20

【0059】

あるポリペプチドの「バリエーション」とは、中の一つ以上のアミノ酸残基が変更されているような、当該ポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドを言う。バリエーションは、置換されたアミノ酸が類似の構造的又は化学的特性を有する「保存的」変更を有するものであろう(例えばロイシンのイソロイシンへの置換など)。バリエーションは「非保存的」変更を有する場合もある(例えばグリシンのトリプトファンとの置換など)。同様な小さな変更にはアミノ酸の欠失又は挿入、あるいは両者が含まれよう。生物学的又は免疫学的活性を損なわずにどのアミノ酸残基を置換、挿入、又は欠失させられるかを判断する際の指針は、例えばLASERGENE ソフトウェア(DNASTAR)など、当業で公知のコンピュータ・プログラムを用いて見出せよう。

30

【0060】

用語「バリエーション」は、ポリヌクレオチド配列の文脈で用いられる場合、特定の遺伝子又はそのコーディング配列のそれに関連するポリヌクレオチド配列を包含する場合がある。更にこの定義には、例えば「アレル」、「スプライス」、「種」、又は「多型」バリエーションなども含まれよう。スプライス・バリエーションは、基準分子に対して有意な同一性を有するであろうが、一般的には、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングのために、より多い又は少ない数のポリヌクレオチドを有するであろう。対応するポリペプチドは付加的な機能ドメインを持つか、あるいはドメインを無くしているであろう。種バリエーションは種間で異なるポリヌクレオチド配列である。その結果のポリペプチドは、一般に、互いに対して有意なアミノ酸同一性を有するであろう。多型のばらつきは、ある一つの種の個体間の特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列のばらつきである。多型バリエーションは、更にポリヌクレオチド配列が一つの塩基分異なるような「単一塩基多型(SNP)」も包含する。SNPの存在は、例えば特定の集団、疾患状態、又はある疾患状態への性向の指標である場合がある。

40

【0061】

用語「脂肪族の」は当業で公知であり、直線状、分枝状、環状のアルカン、アルケン、又はアルキンを言う。いくつかの実施態様では、本発明における脂肪族の基は直線状又は分枝状であり、1乃至約20個の炭素原子を有する。

【0062】

50

用語「アルキル」は当業で公知であり、直鎖アルキル基、分枝状アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基、及びシクロアルキル置換アルキル基を含む飽和脂肪族基を包含する。いくつかの実施態様では、直鎖又は分枝鎖アルキルは約30個以下の炭素原子をその骨格に（例えば直鎖の場合 C_1-C_{30} に、そして分枝鎖の場合 C_3-C_{30} に）有し、そして代替的には約20個以下を有する。同様に、シクロアルキルは約3個乃至約10個の炭素原子をそれらの環構造に有し、そして代替的には約5、6、又は7個の炭素を環構造に有する。用語「アルキル」はまたハロ置換アルキルも包含するものと定義しておく。

【0063】

用語「アラルキル」は当業で公知であり、一個のアリール基（例えば芳香族又はヘテロ芳香族の基）で置換されたアルキル基を言う。

10

【0064】

用語「アルケニル」及び「アルキニル」は当業で公知であり、上述のアルキルに長さ及び可能な置換の点で同様であるが、それぞれ少なくとも一つの二重又は三重結合を含有する不飽和脂肪族の基を言う。

【0065】

炭素数を他に明示しない限り、「低級アルキル」とは、上に定義した通りの、しかし一個乃至約10個の炭素、代替的には1個乃至約6個の炭素原子を、その骨格構造に有するアルキル基を言う。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」は同様の鎖長を有するものである。

20

【0066】

用語「ヘテロ原子」は当業で公知であり、炭素又は水素以外のあらゆる元素の原子を言う。ヘテロ原子の例には硼素、窒素、酸素、リン、硫黄及びセレンがある。

【0067】

用語「アリール」は当業で公知であり、5 -、6 - 及び7 - 員環の単一環芳香族の基を言い、この基にはゼロから4個のヘテロ原子が含まれていてもよく、例えばベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン及びピリミジン等である。環構造内にヘテロ原子を有するようなアリール基はさらに「アリールヘテロ環」又は「ヘテロ芳香族」と言及される場合もある。芳香族の環は、一つ又はそれ以上の環位で、例えばハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホンニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族又はヘテロ芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等、上述したような置換基で置換されていてもよい。「アリール」という用語には、さらに、二つ又はそれ以上の炭素が二つの隣り合った環に共通である（これらの環が「縮合環」である）二つ又はそれ以上の環を有すると共に、環のうちの少なくとも一つが芳香族であり、例えばその他の環がシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、及び/又は、ヘテロシクリルであるような、多環式の系が含まれる。

30

40

【0068】

オルト、メタ及びパラという用語は当業で公知であり、それぞれ1,2-、1,3-、及び1,4-二置換ベンゼンを言う。例えば1,2-ジメチルベンゼン及びオルト-ジメチルベンゼンという名称は同義である。

【0069】

「ヘテロシクリル」又は「ヘテロ環式の基」という用語は当業で公知であり、環構造が1個から4個のヘテロ原子を含むような、3員環から約10員環構造、代替的には3員環から約7員環を言う。ヘテロ環はまた多環であってもよい。ヘテロシクリル基には、例えば、チオフェン、チアントレン、フラン、ピラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサントエン、フェノキサントエン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソ

50

キサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フトラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、チノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、ピリミジン、フェナントロリン、フェナジン、フェナルサジン、フェノチアジン、フラザン、フェノキサジン、ピロリジン、オキサラン、チオラン、オキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、ラクトン、アゼチジノン及びピロリジノンなどのラクタム、スルタム、スルトン等がある。ヘテロ環式の環は、一つ又はそれ以上の位置で、上述したような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、一個のヘテロシクリル、一個の芳香族又はヘテロ芳香族の部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等で置換されていてもよい。

10

20

30

40

50

【0070】

「ポリシクリル」又は「多環式の基」という用語は、当業で公知であり、複数の環が「縮合環である」など、二つ又はそれ以上の炭素が二つの隣り合った環に共通であるような二つ又はそれ以上の環（例えばシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、及び/又はヘテロシクリル、など）を言う。隣り合っていない原子を通じて接合された環は「架橋」環と呼ばれる。多環の環のそれぞれは、例えばハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、一個のヘテロシクリル、一個の芳香族又はヘテロ芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等といった上述したような置換基で置換されてもよい。

【0071】

「炭素環」という用語は当業で公知であり、環の各原子が炭素であるような芳香族又は非芳香族の環を言う。

【0072】

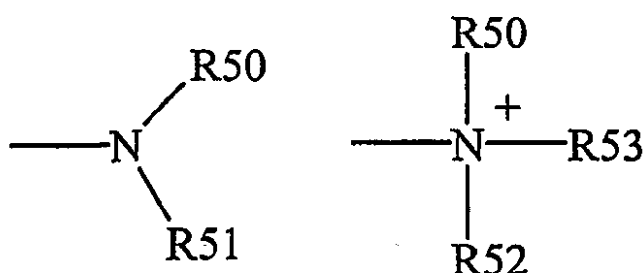
「ニトロ」という用語は当業で公知であり、 $-NO_2$ を言い、用語「ハロゲン」は当業で公知であり、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 又は $-I$ を言い；用語「スルフヒドリル」は当業で公知であり、 $-SH$ を言い；「ヒドロキシル」という用語は $-OH$ を意味し、そして「スルホニル」という用語は当業で公知であり、 $-SO_2$ を言う。「ハリド」は、ハロゲンの対応する陰イオンを指し、「プソイドハリド」は、Cotton and Wilkinson による“Advanced Inorganic Chemistry”の560に記載された定義を有する。

【0073】

「アミン」及び「アミノ」という用語は、当業で公知であり、例えば、一般式：

【0074】

【化1】



【0075】

（但し式中、R50、R51及びR52はそれぞれ独立に一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、 $-(CH_2)_m-R61$ を表すか、又はR50及びR51は、これら

が結合したN原子と一緒にあって、環構造内に4個から8個の原子を有するヘテロ環を完成するものであり、R 6 1は一個のアリール、一個のシクロアルキル、一個のシクロアルケニル、一個のヘテロ環、又は一個の多環を表し、そしてmはゼロか、又は1から8までの間の一整数である)で表すことができる部分など、非置換及び置換アミンの両方を言う。いくつかの実施態様では、R 5 0又はR 5 1の一方のみが、一個のカルボニルであってもよく、例えばR 5 0、R 5 1及びこの窒素と一緒にあって一個のイミドを形成していないなどである。他の実施態様では、R 5 0及びR 5 1(及び任意にR 5 2)はそれぞれ独立に一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、又は $-(CH_2)_m-R 6 1$ を表す。このように、「アルキルアミン」という用語は、置換又は非置換の一個のアルキルをそれに結合させて有する、即ちR 5 0及びR 5 1の少なくとも一方がアルキル基であるような、上に定義した通りのアミン基を包含する。

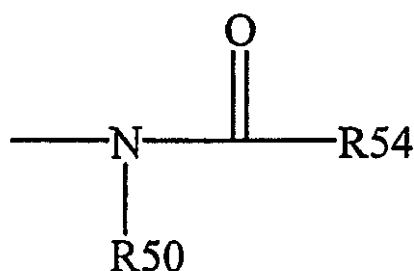
10

【0076】

用語「アシルアミノ」は当業で公知であり、一般式：

【0077】

【化2】



20

【0078】

(但し式中、R 5 0は上に定義した通りであり、そしてR 5 4は一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、又は、 $-(CH_2)_m-R 6 1$ (但し式中、m及びR 6 1は上に定義した通りである)を表す)で表すことのできる部分を言う。

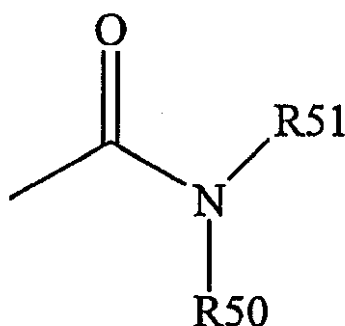
【0079】

「アミド」という用語はアミノ置換カルボニルとして当業で公知であり、一般式：

【0080】

30

【化3】



40

【0081】

(但し式中、R 5 0及びR 5 1は上に定義した通りである)によって表すことのできる部分を含む。アミドのいくつかの実施態様には不安定な可能性のあるイミドは含まれないであろう。

【0082】

「アルキルチオ」という用語は、それに硫黄ラジカルを付着させて有した、上に定義した通りのアルキル基を言う。いくつかの実施態様では、「アルキルチオ」部分は、 $-S-$ アルキル、 $-S-$ アルケニル、 $-S-$ アルキニル、及び $-S-(CH_2)_m-R 6 1$ (但し式中、m及びR 6 1は上に定義した通りである)のうちの一つで表される。代表的なア

50

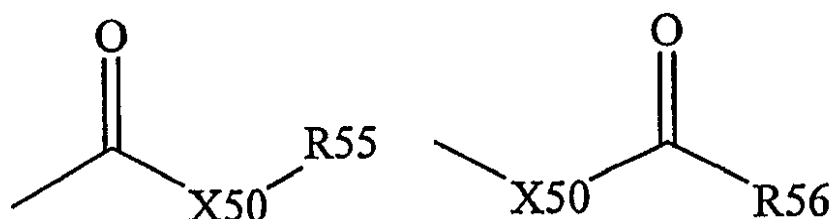
ルキルチオ基には、メチルチオ、エチルチオ等がある。

【 0 0 8 3 】

「カルボニル」という用語は当業で公知であり、一般式：

【 0 0 8 4 】

【化 4】



10

【 0 0 8 5 】

(但し式中、X 5 0 は一個の結合であるか、又は一個の酸素もしくは一個の硫黄を表し、そして R 5 5 及び R 5 6 は一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル、 $-(CH_2)_m-R 6 1$ 、又は薬学的に許容可能な塩を表し、R 5 6 は一個の水素、一個のアルキル、一個のアルケニル又は $-(CH_2)_m-R 6 1$ (但しこの式中、m 及び R 6 1 は上に定義した通りである)を表す)で表すことのできるような部分を含む。X 5 0 が一個の酸素であり、そして R 5 5 又は R 5 6 が水素でない場合、この式は一個の「エステル」を表すことになる。X 5 0 が一個の酸素であり、R 5 5 が上に定義した通りである場合、この部分はここではカルボキシル基と言及されており、特に R 5 5 が一個の水素である場合、この式は「カルボン酸」を表すものである。X 5 0 が一個の酸素であり、そして R 5 6 が水素である場合、この式は「ギ酸塩」を表すことになる。一般的には、上の式の酸素原子が硫黄に置換された場合、この式は「チオールカルボニル」基を表すことになる。X 5 0 が一個の硫黄であり、R 5 5 又は R 5 6 が水素でない場合、この式は「チオールエステル」を表すものである。X 5 0 が一個の硫黄であり、R 5 5 が水素であれば、この式は「チオールカルボン酸」を表すことになる。X 5 0 が一個の硫黄であり、R 5 6 が水素であれば、この式は「チオールホルメート」を表すことになる。他方、X 5 0 が一個の結合であり、そして R 5 5 が水素でない場合、上の式は一個の「ケトン」基を表すものである。X 5 0 が一個の結合であり、そして R 5 5 が水素である場合、上の式は「アルデヒド」基を表す。

20

30

【 0 0 8 6 】

用語「アルコキシル」又は「アルコキシ」は当業で公知であり、一個の酸素ラジカルを付着させて有する、上に定義した通りのアルキル基を言う。代表的なアルコキシル基には、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、t-ブトキシ等がある。「エーテル」は一個の酸素によって共有結合により連結された二つの炭化水素である。従って、アルキルをエーテルにするようなアルキルの置換基は、例えば、 $-O-$ アルキル、 $-O-$ アルケニル、 $-O-$ アルキニル、 $-O-(CH_2)_m-R 6 1$ (但し式中、m 及び R 6 1 は上に説明した通りである)のうちの一つで表すことができるものなど、アルコキシルであるか、又はアルコキシルに似ている。

40

【 0 0 8 7 】

いずれかの構造において2箇所以上あるような、例えばアルキル、m、n等の各表現の定義は、同じ構造の他の箇所でのその定義から独立であると意図されている。

【 0 0 8 8 】

トリフルリル、トシル、メシル、及びノナフルリルという用語は当業で公知であり、それぞれトリフルオロメタンスルホニル、p-トルエンスルホニル、メタンスルホニル、及びノナフルオロブタンスルホニル基を言う。トリフレート、トシレート、メシレート、及びノナフレートという用語は当業で公知であり、それぞれトリフルオロメタンスルホネートエステル、p-トルエンスルホネートエステル、メタンスルホネートエステル、及びノナフルオロブタンスルホネートエステル官能基、及びこれらの官能基を含有する分子を言う。

50

【 0 0 8 9 】

Me、Et、Ph、Tf、Nf、Ts、及びMsという略語は、それぞれメチル、エチル、フェニル、トリフルオロメタンスルホニル、ノナフルオロブタンスルホニル、p-トルエンスルホニル、及びメタンスルホニルを表す。当業の有機化学者が用いる省略のより包括的なリストは、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリの各巻の第一版に見られるが、このリストは典型的には、スタンダード・リスト・オブ・アプリケーションズという標題の表で提供されている。

【 0 0 9 0 】

本発明の組成物中に含まれるいくつかの化合物は、特定の幾何学的もしくは立体異性体形状で存在していてもよい。加えて、本発明の化合物は光学的に活性であってもよい。本発明は、cis-及びtrans-異性体、R-及びS-エナンチオマー、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、これらのラセミ混合体、並びにこれらの他の混合体を含め、あらゆるこのような化合物を、本発明の範囲に入るものとして考察する。更なる非対称の炭素原子がアルキル基などの置換基に存在していてもよい。このような異性体や、それらの混合物はすべて、本発明に包含される。

10

【 0 0 9 1 】

例えば、本発明のある化合物の特定のエナンチオマを欲しい場合、これは非対称合成又はキラル補助による誘導法で調製することができ、この場合、その結果得られたジアステレオマー混合物を分離し、補助基を開裂させて所望の純粋なエナンチオマを得る。あるいは、分子がアミノなどの塩基性の官能基を含有する場合、又はカルボキシルなどの酸性の官能基を含有する場合、適した光学的に活性な酸又は塩基でジアステレオマーの塩を形成した後、このように形成されたジアステレオマーを、当業で公知の分別晶出又はクロマトグラフィ手段で分離した後、純粋なエナンチオマを回収する。

20

【 0 0 9 2 】

「置換」又は「で置換された」には、このような置換が、置換される原子及び置換基にとって可能な原子価に従ったものであり、その置換の結果、例えば、転位、環化、除去又は他の反応といった変換を自発的には行わないなど、安定した化合物ができるという、暗黙の前提が含まれるものと理解されよう。

【 0 0 9 3 】

更に「置換された」という用語は、有機化合物のあらゆる許容できる置換基を含むものとして考察されている。広い意味では、この許容可能な置換基には、有機化合物の非環式及び環式、分枝状及び非分枝状、炭素環式及びヘテロ環式、芳香族及び非芳香族の置換基が含まれる。置換基の例には、例えば、上に説明したものがある。許容可能な置換基は、適当な有機化合物にとっては、一つ又はそれ以上であってもよく、同じ又は異なるものであってもよい。本発明の目的のためには、窒素などのヘテロ原子は水素置換基、及び/又は、そのヘテロ原子の原子価を満たす、ここに説明した有機化合物のいずれかの許容可能な置換基を有していてもよい。本発明は、いかなる態様でも、有機化合物の許容可能な置換基によって限定されることを意図してはいない。

30

【 0 0 9 4 】

本発明の目的のために、化学元素は、ハンドブック・オブ・ケミストリー・アンド・フイジックス、第67版、1986 - 87、表紙内側のC A Sバージョンの元素周期表に基づいて同定されている。更に本発明の目的のためには、用語「炭化水素」は、少なくとも一個の水素及び一個の炭素原子を有する、あらゆる許容可能な化合物を包含するものと、意図されている。広い局面では、前記の許容可能な炭化水素には、置換されていても、又は置換されていなくともよいが、非環式及び環式、分枝状及び非分枝状、炭素環指式及びヘテロ環式、芳香族及び非芳香族の、有機化合物が含まれる。

40

【 0 0 9 5 】

いずれかの構造において2箇所以上あるような、例えば低級アルキル、m、n、p等の各表現の定義は、同じ構造の他の箇所でのその定義からは独立であることが意図されている。

50

【0096】

用語「薬学的に許容可能な塩」は当業で公知であり、例えば本発明の組成物に含まれるものなど、化合物の比較的无非毒性の無機及び有機の添加塩を言う。

【0097】

用語「薬学的に許容可能な担体」は当業で公知であり、いずれか対象の組成物又はその成分を一つの器官又は身体部分から、別の器官又は身体部分に運ぶ又は輸送することに關与する、例えば液体又は固体の充填剤、希釈剤、医薬品添加物、溶媒又は封入剤など、薬学的に許容可能な物質、組成物又は賦形剤を言う。各担体は、当該の組成物及びその成分に対して適合性があり、かつ、患者にとって有害でないという意味において「許容可能」でなくてはならない。薬学的に許容可能な担体として役立つであろう物質のいくつかの例には：(1)乳糖、ブドウ糖及びショ糖などの糖類；(2)コーンスターチ及びいもでんぶんなどのでんぶん；(3)カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及びセルロースアセテートなどのセルロース及びその誘導体；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)タルク；(8)ココアバター及び座薬用ろうなどの医薬品添加物；(9)ピーナッツ油、綿実油、紅花油、ごま油、オリーブ油、コーン油及び大豆油などの油類；(10)プロピレングリコールなどのグリコール；(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなどのポリオール；(12)オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル；(13)寒天；(14)水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；(15)アルギン酸；(16)無発熱原水；(17)等張の生理食塩水；(18)リンガー液；(19)エチルアルコール；(20)リン酸緩衝溶液；及び(21)薬剤調合に用いられる他の非毒性適合性物質、がある。

10

20

【0098】

用語「全身投与」、「全身投与する」、「末梢投与」、及び「末梢投与する」は当業で公知であり、皮下投与など、それが患者の全身に入り、代謝及び他の同様のプロセスに遭うような、中枢神経系に直接投与する以外の当該組成物、治療薬又は他の物質の投与を言う。用語「非経口投与」及び「非経口投与する」は当業で公知であり、通常は注射による、腸管及び局所投与以外の投与形態を言い、その中には、限定はしないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、及び胸骨内注射及び輸注がある。

30

【0099】

2. 細胞の寿命を増加させる、あるいは、それを特定のストレスから防御する方法

ある実施態様では、NAD⁺再利用経路を通るフラックスを増加させることにより、細胞の寿命を増加させる、及び/又は、特定のストレスから細胞を防御する。これは、例えば NPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2 から成る群より選択されるたんぱく質など、NAD⁺再利用経路に關与する少なくとも一種のたんぱく質のレベル又は活性を増加させるなどにより、達成することができる。

【0100】

細胞内で当該たんぱく質の発現を命令する転写調節配列に作動可能に連結した当該たんぱく質をコードする核酸を細胞に導入するなどにより、細胞内でのたんぱく質レベルを増加させることができる。細胞内で核酸を発現させる方法や、それを行うために適した転写調節因子は当業で公知である。代替的には、通常はリポソームなど細胞内へのたんぱく質進入を容易にするベクタの存在下で、細胞内にたんぱく質を導入することができる。さらにたんぱく質をその目的用の細胞輸送ペプチドに連結することもできる。更に他の方法では、内因性遺伝子の発現を刺激する作用物質を細胞に接触させる。このような作用物質はここで更に解説する通りに同定することができる。

40

【0101】

S. セレビジエニコチネートホスホリボシルトランスフェラーゼ (NPT1) をコードするヌクレオチド配列と、それにコードされたたんぱく質をそれぞれ SEQ ID No: 1 及び 2 に記載する。NPT1 は「LSR2」としても知られる。S. セレビジエ NPT1 の完全 cDNA とコード

50

されたたんぱく質はそれぞれGenBank 受託番号NC_001147 及びAAB5931に提供されており、それぞれSEQ ID NO: 1 及び2として記載されている。受託番号L11274 及びAAB59317も、それぞれS. セレビジエヌクレオチド及びアミノ酸配列を言うもののようである。細菌でのNPT1 ホモログはPncBである(35、37 及び 38)。E.coliのNPT1 はGenBank 受託番号J05568として提供される。そのヒトヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれGenBank 受託番号BC006284及びAAH06284、並びに X71355 及びCAA50490として提供される。AH32466 及びBC032466 はChong et al. (1993) Genomics 18:355に解説されている。そのヒトヌクレオチド及びアミノ酸配列も、それぞれSEQ ID NO: 13 及び 14として提供され(そして GenBank 受託番号BC032466に相当する)ている。そのヒトたんぱく質は「腎リン酸ナトリウム輸送たんぱく質」とも呼ばれる。マウスNPT1ヌクレオチド及びアミノ酸配列はGenBank 受託番号 X77241及び CAA54459に提供され、Chong et al. (1995) Am. J. Physiol. 268:1038に解説されている。マウスNPT1のプロモータ領域はGenBank受託番号AF361762 として提供され、Soumounou et al. (2001) Am J. Physiol. 281: F1082に解説されている。NPT1 はまた IMAGE Cloneとして番号3957135としても記載されている。NPT1 ホモログのアライメントを図15に記載する。

10

【0102】

S. セレビジエPNC1 をコードするヌクレオチド及びそれにコードされたたんぱく質を、それぞれSEQ ID No: 3 及び 4に記載するが、これらはそれぞれGenBank 受託番号 NC_001139 及びNP_011478に相当する。PNC1 はニコチンアミドのニコチン酸及びアンモニアへの加水分解を触媒する細菌たんぱく質pncAの酵母ホモログである。開放読み取り枠(ORF) YGL037とも呼ばれる S. セレビジエPNC1は Ghislain et al. (2002) Yeast 19:215に解説されている。Arachis hypogaea PNC1のヌクレオチド及びアミノ酸配列は GenBank受託番号M37636 及びAAB06183 に提供されており、Buffard et al. (1990) PNAS 87:8874に解説されている。潜在的ヒトホモログのヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれGenBank 受託番号BC017344 及びAAH17344; それぞれAK027122 及びNP_078986; それぞれXM_041059 及び XP_041059; 並びにそれぞれNM_016048 及びNP_057132, に提供されている。潜在的ヒトPNC1のヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれSEQ ID NO: 15 及び 16に記載されており; GenBank 受託番号 BC017344に相当する。ヒト、ハエ及びS. セレビジエPNC1 のアライメントを図16に記載する。PNC1のヒト機能的ホモログは、更にここで解説するNAMPRTである。

20

30

【0103】

S. セレビジエNMA1をコードするヌクレオチド配列と、それにコードされたたんぱく質をそれぞれSEQ ID No: 5 及び6に記載するが、これらはそれぞれGenBank 受託番号NC_001144.2 及びNP_013432に相当する。S. セレビジエNMA1 はSmith et al. (2000) PNAS 97:6658に解説されたORF YLR328に相当する。NMA1 は細菌NaMNAT遺伝子のS. セレビジエホモログである。ヒトホモログのヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれGenBank 受託番号 NM_022787 及びNP_073624; それぞれAK026065 及び BAB15345; それぞれ AF459819 及びAAL76934; それぞれXM_087387 及びXP_087387; 並びにそれぞれAF345564 及び AAK52726、NP_073624; AAL76934; NP_073624; 及びAF314163に提供されている。ヒトNMA1のヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれSEQ ID NO: 17 及び18に記載されており、GenBank 受託番号NM_022787に相当する。IMAGE Cloneは番号4874147 及びHRC クローン hrc08458で提供されている。細菌ホモログは例えばZhang et al. (2002) Structure 10:69に解説されている。

40

【0104】

S. セレビジエNMA2をコードするヌクレオチド配列及びそれにコードされたたんぱく質はそれぞれSEQ ID No: 7 及び8に記載されており、これらはそれぞれ GenBank 受託番号NC_001139 及びNP_011524に相当する。S. セレビジエNMA2 はEmanuelli et al. (1999) F

50

EBS Lett. 455:13に解説されたORF

YGR010に相当する。NMA2 は細菌NaMNATホモログのS . セレビジエホモログである。ヒトホモログのヌクレオチド及びアミノ酸配列はそれぞれGenBank 受託番号 NM_015039 及びNP_055854に提供されている。ヒトNMA2のヌクレオチド及びアミノ酸配列をそれぞれSEQ ID NO: 19 及び 20に記載するが、これらはGenBank 受託番号 NM_015039に相当する。

【 0 1 0 5 】

当業であれば、完全長たんぱく質、又は、このようなたんぱく質をコードする核酸あるいはそれらの一部分をここで解説された方法に従って用いることができることは明白であろう。あるたんぱく質の一部分は、好ましくはその生物学的に活性な部分であるとよい。生物学的に活性な部分は当業で公知の方法に従い、かつ、特定のたんぱく質の活性を観察することのできる検定法を用いて、特定することができる。NPT1たんぱく質の活性を判定する検定法は、例えばPescanglini et al. (1994) Clin.

Chim. Acta 229: 15-25及び Sestini et al. (2000) Archives of

Biochem. Biophys. 379:277に解説されている。PNC1たんぱく質の活性を判定する検定法は、例えばGhislain et al. Yeast 19:215に解説されている。NMA1 及びNMA2 たんぱく質の活性を判定する検定法は、例えば上記のSestini et al.に解説されている。代替的には、このようなたんぱく質の活性を、細胞の寿命が判定される検定で検査することもできる。例えばある細胞に、NPT1、PNC1、NMA1 又は NMA2 たんぱく質の一部分をコードする配列の一つ以上のコピーを含む核酸が、あるいはコントロール核酸をトランスフェクトし、この細胞の寿命を比較する。当該たんぱく質のうちの一つの一部分をトランスフェクトされた細胞の寿命がより長くなれば、そのたんぱく質のその部分は生物学的に活性な部分であることの指標となる。細胞の寿命を判定する検定法は当業で公知であり、またここで更に解説されている。具体的には、哺乳動物細胞の寿命を判定する検定法は、例えばCell Growth, Differentiation and

Senescence: A Practical Approach. George

P. Studzinski (ed.) に解説された通りに行うことができる。寿命を測定する代わりに、あるたんぱく質の一部分が生物学的に活性な部分であるかどうかを判定するためなど、ヒートショックなどの特定のストレスに対するトランスフェクト細胞の耐性を測定することもできる。特定のストレスに対する耐性を測定する方法は当業で公知であり、また更にここで解説されている。具体的には、ヒートショックに対する哺乳動物細胞の耐性を判定する検定法は、例えばBunelli et al. (1999) Exp. Cell

Res. 262: 20に解説された通りに行うことができる。

【 0 1 0 6 】

NPT1、PNC1、NMA1 又はNMA2 たんぱく質の部分に加え、一箇所以上のアミノ酸の欠失、挿入又は追加を含有するたんぱく質など、他のバリエーションを、このたんぱく質が生物学的に活性であることを条件に、用いることができる。アミノ酸変更の例には保存的アミノ酸置換がある。他の変更には非天然型のアミノ酸への置換がある。NPT1、PNC1、 NMA1 又は NMA2 をコードする核酸に高い、又は中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸にコードされたたんぱく質 であって、生物学的に活性であるmのを用いることもできる。例えば 65 °C の0.2 乃至 1 × SSCでのハイブリダイゼーション、続いて 65 °C の0.2 × SSC での洗浄という高いストリンジェンシー条件下でNPT1、PNC1、NMA1 又はNMA2 をコードする遺伝子にハイブリダイズする核酸を用いることができる。室温の6 × のSSC、続いて室温の2 × のSSCでの洗浄という低いストリンジェンシー条件下でNPT1、PNC1、NMA1 又はNMA2 をコードする遺伝子にハイブリダイズする核酸も用いることができる。他のハイブリダイゼーション条件には、40又は50 の3 × SSC、続いて20、30、40、50、60、又は65 °Cの1又は2 × SSCでの洗浄、がある。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを更に高める、例えば10%、20%、30% 40% 又は50%などのホルムアルデヒドの存在下で行うことができる。核酸ハイブリダイゼーションの理論及び実際は、例えばS. Agrawal (ed.) Methods in Molecular Biology,

volume 20に解説されており；そしてTijssen (1993) Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes、例えば第1部2章の“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, New York 刊、は核酸ハイブリダイゼーションの基本的な指針を提供している。

【0107】

たんぱく質例は少なくとも約50%、70%、80%、90%、好ましくは少なくとも約95%、更により好ましくは少なくとも約98%、そして最も好ましくは少なくとも約99%の相同性又は同一性を野生型NPT1、PNC1、NMA1 又は NMA2 たんぱく質又はそのドメイン、例えば触媒ドメイン、に有するものであろう。他のたんぱく質例は、野生型 NPT1、PNC1、NMA1 又はNMA2 核酸、例えばここに解説したものなど、に対して少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、更により好ましくは少なくとも約98%、そして最も好ましくは少なくとも約99%、相同又は同一であるような核酸にコードされたものであろう。

【0108】

他の実施態様では、たんぱく質は、経細胞輸送ペプチドに融合させたたんぱく質など、融合たんぱく質である。融合たんぱく質は、更に、当該たんぱく質を精製する、及び/又は、それを検出するために用いることのできる異種ペプチドを含んでいてもよい。

【0109】

他の実施態様では、非天然発生型のたんぱく質バリエーションを用いる。このようなバリエーションはペプチドミメティックであってもよい。

【0110】

更に他の実施態様では、NPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2から成る群より選択される一種以上のたんぱく質の活性を亢進又は増加させる。これは、例えばこれらのたんぱく質のうちの一つの酵素活性など、当該活性を増加させる化合物に細胞を接触させるなどにより、達成することができる。このような化合物を同定する検定法は、ここで更に解説されている。

【0111】

好適な実施態様では、NAD⁺ 再利用経路を通るフラックスを、細胞内のNAD⁺、NADHのレベル及びNAD⁺/NADH比を実質的に変えることなく、増加させる。NAD⁺ 及び NADHの比、並びにこれらの2つの分子の比は、例えば実施例で解説する通りに、判定することができる。

【0112】

哺乳動物、ヒト又は非ヒト、又はこれらの細胞にポリヌクレオチドを導入するいずれの手段を、本発明の様々なコンストラクトを目的のレシピエントに送達するために、本発明の実施に適合させられよう。本発明のある実施態様では、トランスフェクション、即ち「裸の」DNAの送達や、あるいはコロイド状分散系との複合体に入れて、DNAコンストラクトを細胞に送達する。コロイド状の系には、巨大分子錯体、ナノカプセル、マイクロスフィア、ビーズ、並びに、水中油乳濁液、ミセル、混合ミセル、及びリボソームを含む脂質ベースの系がある。本発明の好適なコロイド状系は、脂質と錯体形成した、又は、リボソームで調合された、DNAである。前者の方法では、脂質などとのDNAの調合前に、所望のDNAコンストラクトを持つ導入遺伝子を含むプラスミドを、まず、発現に向けて経験的に最適化してもよい（例えば5'側非翻訳領域にイントロンを含めたり、不要な配列を削除するなど（Felgner, et al., Ann NY Acad Sci 126-139, 1995）。次に、多様な脂質又はリボソーム材料とのDNAの調合を、公知の方法及び材料を用いて行い、レシピエントの哺乳動物に送達してもよい。例えばCanonico et al, Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29, 1994; Tsan et al, Am J Physiol 268; Alton et al., Nat Genet. 5:135-142, 1993 及びCarsonらの米国特許第5,679,647号を参照されたい。

【0113】

リボソームの標的決定は、解剖学的因子及び機械的因子に基づいて分類することができる。解剖学的分類は、器官特異的、細胞特異的、及びオルガネラ特異的など、選択性のレベルに基づくものである。機械的標的決定は、それが受動的であるか、又は能動的であるかに基づいて区別することができる。受動的標的決定は、リボソームが、洞様毛細血管を含有する、器官内の細網内皮系組織の細胞に分布していく自然な傾向を利用するものである。他方、能動的な標的決定は、天然の局在発生部位以外の器官又は細胞種を標的に決定するために、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、又はたんぱく質などの特異的リガンドにリボソームを結合させたり、あるいは、リボソームの組成又はサイズを変更したりすることによる、リボソームの変更に関係する。

【0114】

10

標的決定された送達系の表面は、多様な方法で修飾できよう。リボソームにより標的決定された送達系の場合、リボソーム二重層と安定に結合した状態に標的決定リガンドを維持するために、リボソームの脂質二重層に脂質の基を取り込むことができる。脂質の鎖を標的決定リガンドに接合するには多様な結合基を用いることができる。裸のDNAや、又は、リボソームなどの送達賦形剤に結合させたDNAを、対象の複数の部位に投与することができる（下を参照されたい）。

【0115】

本発明の好適な方法では、ウィルスベクタを用いてDNAコンストラクトを送達する。導入遺伝子は、例えば組換えレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス（AAV）、及び1型単純疱疹ウィルス1など、遺伝子治療で有用な多種のウィルスベクタや、又は組換え細菌又は真核性プラスミドのいずれに取り入れてもよい。多様なウィルスベクタを本発明の実施に用いてもいいが、AAV-及びアデノウィルスベースの方法が特に関心が持たれる。このようなベクタは一般に、*in vivo*、特にヒトへの外因性遺伝子の移動に選択される組換え遺伝子送達系であると理解される。ウィルスベクタの選択及び使用に関する以下の付加的な指針が開業医には助かるであろう。以下で更に詳述するように、当該の発現コンストラクトのこのような実施態様は、多様な *in vivo* 及び *ex vivo* 遺伝子治療プロトコルでの使用に特に考察されるものである。

20

【0116】

本発明で有用なウィルス遺伝子送達系は、アデノウィルス由来ベクタを用いるものである。36kBの直線状及び二本鎖DNAウィルスであるというアデノウィルスの遺伝子的構成の知見により、アデノウィルスDNAの大型の一片を、最高8kBまでの外来配列に置換することが可能である。レトロウィルスとは対照的に、宿主細胞へのアデノウィルスDNAの感染は染色体組込みを引き起こさない。なぜならアデノウィルスDNAは、潜在的な遺伝毒性なしでエピソームの様に複製することができるからである。更にアデノウィルスは構造上安定であり、広範な増幅後でも何らゲノム再編成が検出されたことはない。アデノウィルスは、事実上すべての上皮細胞に、それらの細胞周期段階に関係なく、感染することができる。現在までのところ、アデノウィルス感染は、例えばヒトにおける呼吸器疾患など、軽度の疾患に関連するようである。

30

【0117】

アデノウィルスは、その中程度のゲノム・サイズ、操作容易性、高力価、幅広い標的細胞範囲、及び高い感染性のために、遺伝子移動ベクタとして特に好適である。このウィルス粒子は比較的安定であり、精製及び濃縮になじみ、そして上述したように、感染性の範囲に影響するように改変することができる。加えて、アデノウィルスは成長及び操作が容易であり、*in vitro* 及び *in vivo* で幅広い宿主範囲を示す。このグループのウィルスは、例えば $10^9 - 10^{11}$

40

プラーク形成単位（PFU）/ml など、高力価で得ることができ、またそれらは感染性も高い。アデノウィルスの生命周期には宿主細胞ゲノムへの組込みは必要でない。アデノウィルス・ベクタにより送達される外来遺伝子はエピソーム性であり、従って宿主細胞に対する遺伝毒性は低い。野生型アデノウィルスを用いたワクチンの研究では何ら副作用が報告されたことはない（Couch et al., 1963; Top et al., 1971）ことから、*in vivo* での

50

遺伝子移送ベクタとしてのそれらの安全性や治療上の可能性が実証されている。更に、外来のDNAについてのアデノウィルス・ゲノムの運搬能は他の遺伝子送達ベクタと比較しても高い（最高 8 キロベース）（上記の Berkner et

al. ; Haj-Ahmand and Graham

(1986) J. Virol. 57:267)。現在用いられており、従って本発明にとって好適な大半の複製欠陥アデノウィルスベクタはウィルスE1及びE3遺伝子の全部又は一部を欠失しながらもアデノウィルスの遺伝物質の 80 % もを保持するものである（例えば 上記の Jones et al ., (1979) Cell 16:683; Berkner

et al. ; 及び Graham et al., in

Methods in Molecular Biology, E.J. Murray,

Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. pp. 109-127を参照されたい)。本発明の挿入されるポリヌクレオチドの発現は、例えばE1Aプロモータ、主要後期プロモータ (MLP) 及び関連するリーダ配列、ウィルスE3プロモータ、又は外因的に加えられるプロモータ配列の制御下にあつてよい。

【 0 1 1 8 】

アデノウィルスのゲノムは、目的の遺伝子産物をコードしてはいるが、正常な溶解によるウィルス生命周期の点ではその複性能の点で不活化しているように操作することができる（例えば Berkner et al., (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al.,

(1991) Science 252:431-434; and Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155を参照されたい)。

アデノウィルス株 Ad 型 5 dl324 又は他のアデノウィルス株（例えば Ad2、Ad3、Ad7等）を由来とする適したアデノウィルスベクタが当業者に公知である。組換えアデノウィルスは、非分裂細胞には感染することができない点で特定の状況下で有利であると考えられ、気道上皮（上記の Rosenfeld et al., (1992) ）、内皮細胞（Lemarchand et al., (1992) PNAS USA

89:6482-6486 ）、肝細胞（Herz and Gerard, (1993) PNAS USA

90:2812-2816）及び筋細胞（Quantin et al., (1992) PNAS USA

89:2581-2584）を含め、幅広い細胞種に感染させるために用いることができる。

【 0 1 1 9 】

アデノウィルスはまた細胞種特異的であってもよく、即ち限られた種類の細胞にしか感染しない、及び/又は、限られた細胞種でしか導入遺伝子を発現しないようにすることができる。例えば、当該遺伝子は、1997年12月16日に発行されたHenderson and Schuurによる米国特許第5,698,443号などで解説されるように、ある遺伝子を標的ホスト細胞により特異的に調節される転写開始領域の転写制御下に含む。このように、例えば細胞特異的応答因子を挿入するなどにより、E1A 又はE1Bなど、複製に必要なたんぱく質の合成を調節することで、複製コンピテントなアデノウィルスを特定の細胞に限定することができる。

【 0 1 2 0 】

数多くのアデノウィルス種のDNA配列をGenbankから入手できる。例えば、5型ヒトアデノウィルスはGenBank

受託番号M73260を有する。アデノウィルスDNA 配列は現在同定されている42種のヒトアデノウィルス種のいずれから得てもよい。多様なアデノウィルス株がメリーランド州ロックビル、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから、あるいは、多くの商業的又は学術的ソースから要請により得ることができる。ここで解説する導入遺伝子は、制限消化、末端のリンカ・ライゲーション又は充填、及びライゲーションにより、いずれのアデノウィルス・ベクタ及び送達プロトコルでも、導入できよう。

【 0 1 2 1 】

アデノウィルス産生細胞系には、アデノウィルス遺伝子E1、E2a、及びE4 DNA 配列のうちの一つ以上を、例えばKadanらのPCT/US95/15947

(WO 96/18418) ; KovesdiらのPCT/US95/07341 (WO 95/346671) ; Imlerらの PCT/FR94/00624 (WO94/28152) ; PerrocaudetらのPCT/FR94/00851

10

20

30

40

50

(WO 95/02697)、WangらのPCT/US95/14793 (WO96/14061) が解説するように、これらの遺伝子のうちの一つ以上が変異又は欠失させられているようなアデノウィルス・ベクタをパッケージするために含めることができる。

【0122】

本ポリヌクレオチドの送達に有用な更に別のウィルスベクタ系はアデノ随伴ウィルス (AAV) である。アデノ随伴ウィルスは、例えばアデノウィルス又は疱疹ウィルスなど、別のウィルスを、効率的な複製及び生産的な生命周期のヘルパ・ウィルスをして要する天然発生型の欠陥ウィルスである。(レビューについてはMuzyczka et al., Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129を参照されたい)。

【0123】

AAVはいずれの疾患の原因とも関連付けられたことはない。AAVは形質転換性でも、又は腫瘍原性ウィルスでもない。ヒト細胞系の染色体へのAAV組込みは、その細胞の成長特性にも、あるいは形態学的特徴にも、何ら大きな変化を引き起こさない。AAVのこれらの特性からも、潜在的に有用なヒト遺伝子治療ベクタとしてそれを推奨することができる。

【0124】

更にAAVは、肺上皮細胞などの非分裂細胞にそのDNAを組み込ませると共に、高頻度の安定な組込みを示す数少ないウィルスのうちの一つでもある(例えばFlotte et al., (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al., (1989) J. Virol. 63:3822-3828; 及びMcLaughlin et al., (1989) J. Virol. 62:1963-1973を参照されたい)。300塩基対と少ない数のAAVを含有するベクタを梱包し、組み込むことができる。外因性のDNAのためのスペースは約4.5 kbに限られている。Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 などに解説されたAAVベクタを用いてDNAを細胞に導入することができる。多様な核酸が様々な細胞種にAAVベクタを用いて導入されてきた(例えばHermonat et al., (1984) PNAS USA 81:6466-6470; Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford et al., (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et al., (1984) J. Virol. 51:611-619; 及び Flotte et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790を参照されたい)。

【0125】

典型的に用いられるAAVベースの発現ベクタには、145個のヌクレオチドのAAV逆転末端反復配列 (ITR) が含まれるが、このITRは制限部位をフランクしており、この制限部位は、導入遺伝子のサブクローニングに、直接用いたり、あるいは、制限酵素で導入遺伝子を切り出した後、末端を平滑末端にし、適したDNAリンカをライゲートし、制限酵素、及びITR間の部位へのライゲートとすることで用いたりすることができる。AAVベクタの能力は約4.4 kb である(Kotin, R.M., Human Gene Therapy 5:793-801, 1994 及び Flotte, et al. J. Biol.Chem. 268:3781-3790, 1993)。

【0126】

AAVのストックはHermonat and Muzyczka (1984) PNAS 81:6466に解説された通りに、しかし Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822が解説したpAAV/Adを用いて改変することで、作製することができる。ウィルスの濃縮及び精製は、例えばin vivo でのAAVベクタ発現の最初の報告(Flotte, et al. J.Biol. Chem. 268:3781-3790, 1993) で用いられたような塩化セシウム勾配でのバンディングや、あるいは O'Riordan et al., WO97/08298に解説された通りのクロマトグラフィ精製など、報告された方法により、行うことができる。in vitro でAAVベクタをパッケージする方法も利用することができ、粒子にパッケージするDNAの大きさに制限がないという長所を有する(例えばZhou らによる1997年11月18日発行の米国特許第5,688,676号を参照されたい)。この方法は、無細胞パッケージング抽出物の調製が関係する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

アデノウィルスの一部分と、所定の導入遺伝子をプロモータ制御下でフランクする、AAV由来の5'側及び3'側ITR配列とを含む核酸を含有するアデノウィルス・カプシドにより表されるハイブリッドアデノウィルス-AAVベクタ。例えばWilsonらによる国際特許公報No. WO 96/13598を参照されたい。このハイブリッド・ベクタは宿主細胞への高力価の導入遺伝子送達と、rep遺伝子の存在下における宿主細胞染色体への該導入遺伝子の安定な組込み能とを特徴とする。このウィルスは事実上全ての細胞種（そのアデノウィルス配列によりもたらされる）に感染することができ、また宿主細胞ゲノムへの安定で長期の導入遺伝子組込み（そのAAV配列によりもたらされる）を起こさせることができる。

【 0 1 2 8 】

このベクタで用いられるアデノウィルス核酸配列は、ハイブリッドウィルス粒子を作製するためにヘルパウィルスの使用を要する最小配列量から、ハイブリッドウィルスプロセスでパッケージング細胞に欠失遺伝子産物を提供させることのできるような、アデノウィルス遺伝子のうちの僅かに選択された部分の欠失しか含まないものまで、様々な範囲にすることができる。例えば、ハイブリッドウィルスは一個のアデノウィルスの5'側及び3'側逆転末端反復配列（ITR）（複製開始点として機能する）を含むことができる。使用できるAd5ゲノムの左側末端配列（5'）配列は従来のアデノウィルスゲノムの塩基1から約360までの範囲（マップ単位0-1とも言及）に渡り、5'側ITR及びパッケージング/エンハンサドメインを含む。このハイブリッドウィルスの3'側アデノウィルス配列は、約580ヌクレオチド（おおよそマップ単位98.4-100とも言及する、アデノウィルスの塩基約35,353 - 末端右側末端3'側ITR配列）である右側末端3'ITR配列を含む。

【 0 1 2 9 】

ハイブリッドベクタの調製は、Wilkinsonらによる公開されたPCT出願である表題「Hybrid Adenovirus-AAV Virus and Method of Use Thereof」WO 96/13598 に詳述されている。導入遺伝子を導入する方法及び材料、導入遺伝子を含有する組換えウィルスの増殖及び精製、トランスフェクト細胞及び哺乳動物でのその使用を含め、本発明の実施において有用であろうアデノウィルス及びハイブリッドアデノウィルス-AAV技術の更なる詳細な指針については、更にWilsonらのWO 94/28938、WO 96/13597 及びWO 96/26285、並びにそこで引用された参考文献を参照されたい。

【 0 1 3 0 】

レトロウィルスベクタを構築するためには、対象の核酸を特定のウィルス配列の代わりにウィルスゲノム中に挿入して、複製欠陥ウィルスを作製する。ビリオンを作製するには、gag、pol、及びenv遺伝子を含有するがLTR及びpsi成分のないパッケージング細胞系を構築する（Mann et al. (1983) Cell 33:153）。ヒトcDNAを、レトロウィルスLTR及びpsi配列と一緒に含有する組換えプラスミドをこの細胞系に（リン酸カルシウム沈殿法などにより）導入する場合、psi配列により、組換えプラスミドのRNA転写産物がウィルス粒子内にパッケージされることが可能になり、こうして培養基に分泌される（Nicolas and Rubenstein (1988) "Retroviral Vectors", In: Rodriguez and Denhardt ed. Vectors:

A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses. Stoneham: Butterworth; Temin, (1986) "Retrovirus Vectors for Gene Transfer: Efficient Integration into and Expression of Exogenous DNA in Vertebrate Cell Genome", In: Kucherlapati ed. Gene Transfer. New York: 上記Plenum Press; Mann et al., 1983)。次にこの組換えレトロウィルスを含有する培地を採集し、選択的には濃縮し、遺伝子移送に用いる。レトロウィルスベクタは幅広い細胞種に感染することができる。組込み及び安定な発現には宿主細胞の分裂が必要である（Paskind et al. (1975) Virology 67:242）。この局面はPVRの処置には特に重要である。なぜならこれらのベクタは増殖する細胞の選択的標的決定、即ち、網膜上皮中の選択的標的決定、を可能にするものだからであり、これらはPVR対象の眼内で増殖する唯一のものだからである。

【 0 1 3 1 】

レトロウィルスの使用にとって大きな必須条件は、それらの使用の安全性、特に、細胞集団中の野生型ウィルスの伝播の可能性に関する安全性、を確認することである。複製欠陥レトロウィルスしか産生しない特化細胞系（「パッケージング細胞」と呼ばれる）の開発により、遺伝子治療用のレトロウィルスの実用性が増し、欠陥レトロウィルスは、遺伝子治療目的の遺伝子輸送での使用について良く特徴付けられている（レビューについては Miller, A.D. (1990) Blood 76:271を参照されたい）。レトロウィルスコーディング配列（gag、pol、env）の一部が、例えばレトロウィルスを複製欠陥にするような転写アクチベータなど、本発明のたんぱく質をコードする核酸に置換されているような組換えレトロウィルスを構築することができる。次にこの複製欠陥レトロウィルスをビリオンにパッケージすると、このビリオンを用いて、標準的な技術によりヘルパウィルスを用いて標的細胞を感染させることができる。組換えレトロウィルスを作製したり、このようなウィルスに *in vitro* 又は *in vivo* の細胞を感染させたりするプロトコルは、Current Protocols in

10

Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 及び他の標準的な研究室用手引きに見ることができる。適したレトロウィルスの例には、当業者に公知の pLJ、pZIP、pWE 及び pEM がある。好適なレトロウィルスは pSR

MSVtkNeo (Muller et al. (1991) Mol. Cell Biol. 11:1785 and pSR MSV(XbaI) (Sawyers et al. (1995) J. Exp. Med. 181:307) 及びこれらの由来株である。例えば、BamHI でこれらのベクタを消化してこれらのベクタの両方で非反復 BamHI 部位を削除することができ、クレノウで充填して再ライゲートすれば、それぞれ pSMTN2 及び pSMTX2 を Clackson らの PCT/US96/09948 に解説された通りに作製することができる。自己栄養性及び両栄養性レトロウィルス系の両者を調製するために適したパッケージングウィルス系の例には Crip、Cre、2 及び Am がある。

20

【 0 1 3 2 】

レンチウィルスを含むレトロウィルスが、神経細胞、上皮細胞、網膜細胞、内皮細胞、リンパ球、筋原細胞、肝細胞、骨髄細胞を含め、*in vitro* 及び / 又は *in vivo* の多種の遺伝子を数多くの様々な細胞種に多種の遺伝子を導入するために用いられてきた（例えば Federico

30

(1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:448によるレビュー; Eglitis et al., (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan, (1988) PNAS USA 85:6460-6464; Wilson et al., (1988) PNAS USA 85:3014-3018; Armentano

et al., (1990) PNAS USA 87:6141-6145; Huber et al., (1991) PNAS USA 88:8039-8043; Ferry et al., (1991) PNAS USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al., (1992) PNAS USA 89:7640-7644; Kay et al., (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., (1992) PNAS USA 89:10892-10895; Hwu et al., (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許第4,868,116号; 米国特許第4,980,286号; PCT 出願 WO 89/07136; PCT 出願 WO 89/02468; PCT 出願 WO 89/05345; 及び PCT 出願 WO 92/07573を参照されたい）。

40

【 0 1 3 3 】

更に、ウィルス粒子の表面上のウィルスパッケージングたんぱく質を改変することにより、レトロウィルスの感染範囲、そして結果的にはレトロウィルスベクタの感染範囲を制限できることが示されている（例えば PCT 公報 WO93/25234、WO94/06920、及び WO94/11524を参照されたい）。例えば、レトロウィルスベクタの感染範囲を改変するための戦略には、細胞表面抗原に特異的な抗体をウィルス env たんぱく質に結合させる; (Roux et al., (1989) PNAS USA 86:9079-9083; Julian et al., (1992) J. Gen Virol 73:3251-3255; 及び Goud et al., (1983) Virology 163:251-254); 又は、細胞表面リガンドをウィルス env たんぱく質に結合させる (Neda et al., (1991) J. Biol. Chem.

50

266:14143-14146)がある。結合はたんぱく質又は他の多種(例えばenvたんぱく質をアシアロ糖たんぱく質に転化させる乳糖)との化学的架橋の形で、融合たんぱく質作製(例えば一本鎖抗体/ env融合たんぱく質)の形でよい。この技術は、特定の組織種に感染を制限又は命令するために有用であるが、自己栄養性ベクタを両栄養性ベクタに変換するためにも用いることができる。

【0134】

本発明のポリヌクレオチドを送達するために用いることのできる他のウィルスベクタ系は、例えば単純疱疹ウィルス(1997年5月20日発行のWooらによる米国特許第5,631,236

号及びNeurovexによるWO 00/08191)などの疱疹ウィルス、ワクシニアウィルス(Ridgeway (1988) Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez R L, Denhardt D T, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth,; Baichwal and Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press; Coupar et al. (1988) Gene, 68:1-10)

及びいくつかのRNAウィルスから得られてきた。好適なウィルスには、アルファウィルス、ボックスウィルス、アレナウィルス、ワクシニアウィルス、ポリオウィルス等がある。

これらは魅力的な特徴を多種の哺乳動物細胞にもたらず (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1281 ; 上記のRidgeway, 1988 ; 上記のBaichwal and Sugden, 1986 ; Coupar et al., 1988; Horwich et al.(1990)

J.Virol., 64:642-650)。

【0135】

NPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2 又はその生物学的に活性なバリエーションから成る群より選択されるたんぱく質などのたんぱく質をコードする核酸などを投与した対象の細胞内の当該たんぱく質の発現は、例えばこの患者の細胞試料を得、コントロール試料に対するこの試料中のたんぱく質レベルを判定するなどにより、判定することができる。

【0136】

別の実施態様では、あるたんぱく質又はその生物学的に活性なバリエーションを、それが標的細胞に達して細胞膜を通過するように対象に投与する。ポリペプチドは原核生物又は真核生物又はそれらの細胞内で産生させ、当業で公知の方法に従って精製することができる。例えば組換えポリペプチドをヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、昆虫細胞、酵母細胞、及び植物細胞で合成することができる。更にポリペプチドを、例えば網状赤血球又は麦芽抽出物などの細胞抽出物中でも合成することができる。たんぱく質の精製は、例えばクロマトグラフィ法(例えばRobert K Scopes "Protein Purification: Principles and Practice"

Third Ed. Springer-Verlag, N.Y. 1994を参照されたい)など、多様な方法で行うことができる。ある実施態様では、当該ポリペプチドを、約6つの連続したヒスチジン残基から成るエピトープ・タグを含む融合ポリペプチドとして作製する。次にこの融合ポリペプチドをNi⁺⁺カラムで精製することができる。タグと当該ポリペプチドとの間にプロテアーゼ部位を挿入することで、Ni⁺⁺カラムで当該ペプチドを精製した後に、このタグを取り外すことができる。これらの方法は当業で公知であり、市販のベクタ及びアフィニティ・マトリックスは市販のものを利用することができる。

【0137】

ポリペプチドの投与は、上述したようにそれらをリボソームと混合することにより、行うことができる。リボソームの表面は、リボソームを所望の生理学的位置に標的決定するであろう分子を加えることで、改変することができる。

【0138】

ある実施態様では、たんぱく質の細胞膜透過速度が増すように、たんぱく質を改変する

。例えば、細胞による当該ペプチドの取り込みなどの「経細胞輸送」を促進する第二のペプチドに当該ポリペプチドを融合させることができる。ある実施態様では、当該ペプチドはHIVトランス活性化 (TAT) たんぱく質の一部であり、例えばTATの残基37-62又は48-60に相当するフラグメントなど、in

vitroで細胞により急速に取り込まれる部分である (Green

and Loewenstein, (1989) Cell 55:1179-1188)。別の実施態様では、この内部移行性ペプチドはドゥロソフィラ-アンテナペディータたんぱく質又はそのホモログを由来とする。ホメオたんぱく質アンテナペディータの60アミノ酸長のホメオドメインは生物膜を透過して転位することが実証されており、それを結合させた先の異種ポリペプチドの転位を容易にする。従って、経細胞輸送に向けて、ドゥロソフィラ-アンテナペディータの約アミノ酸42-58又はそれより短いフラグメントから成るペプチドにポリペプチドを融合させることができる。例えばDerossi

et al. (1996) J Biol Chem 271:18188-18193; Derossi et al. (1994) J Biol Chem 269:10444-10450; 及び Perez et al.

(1992) J Cell Sci 102:717-722を参照されたい。

【 0 1 3 9 】

別の実施態様では、細胞内のニコチンアミドの量を減らす。これは、例えばNAD⁺再利用経路、又は、ニコチンアミドを産生する他の経路の遺伝子発現を阻害するなどにより、達成することができる。遺伝子阻害は、例えばニコチンアミドを産生するNAD⁺再利用経路遺伝子に対してRNAiを行うなど、ここで更に解説する通りに行うことができる。また、ニコチンアミドのデノボ合成に関与する遺伝子を阻害することもできる。例えば細胞内のニコチンアミド・レベルは、ポリ (アデノシンジホスフェート - リボース) ポリメラーゼ-1 (PARP) のレベル又は活性を調節することにより、調節することができる。具体的には、PARPはニコチンアミドを産生するため、この酵素のレベル又は活性を減らすことにより、ニコチンアミド・レベルを減らすことができる。更に、NADを開裂させてニコチンアミドにするグリコヒドロラーゼ (例えば、好中球などの免疫細胞表面上で発現するエクト酵素であるヒトCD38 ; gi:4502665 及びGenBank 受託番号 NP_001766) のレベル又は活性を減らすことによって、細胞内のニコチンアミド・レベルを減らせよう。

【 0 1 4 0 】

更にニコチンアミド・レベルは、デノボニコチンアミド合成経路を阻害することでも減らせよう。この経路に関与する遺伝子にはS・セレビジエのBNA遺伝子 (BNA1-6) がある。代替的には、ポリ (アデノシンジホスフェート - リボース) ポリメラーゼ (PARP) ファミリー・メンバー、例えばPARP-1 及びPARPv 並びにタンキラーゼを阻害しても、ニコチンアミド・レベルを減らすことができる。

【 0 1 4 1 】

更に、ニコチンアミドトランスポータのレベル又は活性を減らして、細胞内に輸入されるニコチンアミドのレベルを下げることもできる。例えば酵母では、ニコチン酸はTna1 (ニコチネート / ニコチンアミドモノヌクレオチドトランスポート) たんぱく質により輸送される。酵母TNA1のヒトホモログは以下のGenBank

受託番号を有する : gi:9719374 及び AAF97769; gi:6912666 及び NP_036566;

gi:18676562 及び AB84933; gi:12718201 及びCAC28600; gi:19263934 及びAAH25312;

gi:9966811 及びNP_065079; 及び gi:22761334 及びBAC11546。調節することのできる他のヌクレオチド・トランスポータには細菌及びハエトランスポータや、それに対して相同

な以下のヒト遺伝子がある : gi:8923160 及び NP_060164; gi:14336678 及び AAK61212;

gi: 22749231 及びNP_689812; 並びにgi: 18603939 及びXP_091525。

【 0 1 4 2 】

代替的には、ニコチンアミドを代謝する、分解する又は阻害する酵素、例えばニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ (NNMT; EC 2.1.1.1 ; CAS登録番号 9029-74-7) ととも呼ばれるニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼなど、の活性を刺激する又はそのレベルを増すことなどにより、ニコチンアミドレベルを減らす又はニコチンアミドを失活させる

ことができる。この酵素は、S-アデノシル-L-メチオニン + ニコチンアミド = S-アデノシル-L-ホモシステイン + 1-メチルニコチンアミドの反応を触媒し、細胞からのニコチンアミドの分泌を促進する（更に Cantoni (1951) J. Biol. Chem.

203:216を参照されたい）。そのヒト抗毒素は NNMTと言及され、その完全配列はGenBank 受託番号 U08021 に、そしてそのヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 9 として、そしてそのたんぱく質についてはSEQ ID NO: 10として見るることができる (Aksoy et al. (1994) J. Biol.

Chem. 269:14835)。この酵素の酵母版はNNT1 (YLR258wとも言及される)と言及される。

【 0 1 4 3 】

ニコチンアミドを代謝し、ひいてはニコチンアミドのレベルを下げる更に別の酵素はニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPRT; E.C.2.4.2.12)である。そのヒト遺伝子はプレB細胞コロニー亢進因子 1(PBEF1) 及びヴィスファチンとも言及され、2つのアイソフォームで存在する（例えば Samal et

al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14:1431, Rongwaux et al. (2002) Euro. J. Immunol. 32:3225

及び Fukuhara et al.

Science 307:426-30 (2005); 米国特許第5,874,399号及び第6,844,163号を参照されたい

）。アイソフォームaの配列はGenBank 受託番号 NM_005746、NP_005737及び U02020で入手可能であり、そして アイソフォームbの配列は GenBank 受託番号 NM_182790、NP_877591 及びBC020691で入手可能である。ヒトNAMPRT アイソフォームa

(NM_005746) のヌクレオチド及びアミノ酸配列をSEQ ID

NO: 21 及び22として記載する。ヒトNAMPRT アイソフォームb (BC020691) のヌクレオチド及びアミノ酸配列をそれぞれSEQ ID NO: 11 及び 12として記載する。ヒトNAMPRT のゲノムクローンの配列は

GenBank 受託番号AC007032に提供されている。ヒト遺伝子の構造はOgnjanovic et al. (2001) J.

Mol. Endocrinol. 26:107に解説されている。酵母及びヒト細胞においては、PNC1 又は機能的ヒトホモログあるいはこれらの均等物のレベルを増加させてニコチンアミド・レベルを下げるができる。

【 0 1 4 4 】

ニコチンアミドを代謝することでニコチンアミドのレベルを下げるなど調節するであろうもう一つの酵素は、ヒト細胞のニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) アデニリルトランスフェラーゼである。このヒト酵素は NMNAT-1 (E.C.2.7.7.18)と言及される。以下のGenBank 受託番号がヒト酵素に提供されている：NP_073624; NM_022787; AAL76934; AF459819; 及び NP_073624; AF314163。このヒト遺伝子のバリエーションが NMNAT-2 (K1AA0479) というGenBank 受託番号 NP_055854 及び NM_015039

(Raffaelli et al. (2002) Biochem Biophys Res Commun 297:835)で見られるヒトバージョンである。酵母細胞においては、NAD+ 再利用経路中のその均等な酵素はニコチネートモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ 1 及び 2 (それぞれNMA1 及びNMA2)である (E.C. 2.7.7.1)。

【 0 1 4 5 】

増加させるとニコチンアミド・レベルが下がると思われる更に別の酵素は、リボース5-ホスフェートをPRPPという、NPT1の基質に転化させるホスホリボシルピロホスフェート (PRPP) シンターゼ(PRPS)である。以下：GenBank 受託番号：gi:4506127 及び NP_002755 (Prps1); gi:4506129 及びNP_002756 (Prps2); gi:20539448; gi:4506133 及び NP_002758

(Prps 関連たんぱく質 2); gi:24418495 及び Q14558 (Prps 関連たんぱく質1); gi:17644236 及びCAD18892; gi:2160401 及び BAA05675

(Prps アイソフォーム1); 並びに gi:2160402 及びBAA05676 (Prps アイソフォーム2)の番号を有するいくつかの関連酵素がある。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

細胞内のニコチンアミド・レベルを下げると、例えばDNA破壊の修復が刺激されるなど、他の利点ももたらされるであろう。実際、PARP はニコチンアミドにより調節される（ニコチンアミド は負の調節をPARPに対して行う）。このように、例えばここで更に解説するように細胞内のニコチンアミドのレベルを調節すると、PARPの活性が調節されるであろう。従って、PARPは、例えばDNA破壊の修復、テロメアの長さの調節、及びヒストンの修飾など、数多くの細胞機能に関与しているため、ニコチンアミド・レベルを調節するとこれらの活性が調節されるであろう。例えば細胞内のニコチンアミド・レベルを下げるとPARPの活性が増し、ひいては細胞のDNA破壊修復機序が更に亢進するであろう。

【 0 1 4 7 】

哺乳動物細胞及び酵母細胞など、真核細胞で本発明の方法を応用することに加え、本方法は更に、植物細胞にも、Sir2ファミリー・メンバーが植物に存在するという事実になくとも基づき、応用することができる。従って、本発明は更に、植物及び植物細胞の寿命を延長したり、そして植物及び植物細胞を過剰な塩条件などのストレスにより耐性にしたりする方法も提供するものである。これは、例えば酵母及び哺乳動物系で細胞の寿命及び/又はストレス耐性を増すとしてここで解説したたんぱく質に基本的に相同な、植物細胞内のたんぱく質のレベル又は活性を調節するなどにより、達成することができる。代替的には、植物細胞内のニコチンアミドのレベルを、具体的には他の真核細胞でそれらのレベルを調節するためにここで解説した通りに、減らすことができる。核酸は植物細胞に当業で公知の方法に従って導入することができる。

【 0 1 4 8 】

例えば、以下は、細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックスを調節する又はニコチンアミド・レベルを調節するために調節することのできる、上述した通りの遺伝子に相同な、アラビドプシス・サラニア（原語：Arabidopsis thaliana）由来の遺伝子である。酵母PNC1のホモログ：gi 18401044 NP_566539.1（推定上のヒドロラーゼ）；gi 15237256 NP_1977131；及び gi 15237258 NP_197714.1。酵母NPT1のホモログ：gi 2026021 AAM13003.1；gi 15234571 NP_195412.1；gi 25054896 AAN71931.1；及び gi 15227832 NP_179923.1。酵母NMA1/2のホモログ：gi 22327861 NP_200392.2 及びgi 9758615 BAB09248.1。酵母NNT1（YL285W）のホモログ：gi 20197178 AAC14529；gi 22325900 NP_565619.2；gi 15219438 NP_177475.1（腫瘍関連たんぱく質）；gi 12324311 AA65212 0.1；gi:22330409 NP_683465；gi:15240506 NP_199767；gi 8778835 AAF79834.1；及びgi 15231011 NP_188637。ヒトNNMTのホモログ：gi 15238203 NP_196623。酵母QNS1のホモログ（NAD+再利用経路のNMA1/2の下流にある遺伝子）：gi:15221990 NP_175906。酵母BNA6のホモログ：gi:18379203 NP_565259 及び gi:21555686 AAM63914。

【 0 1 4 9 】

Sir2ファミリー・メンバーが原核生物などの微生物にも存在するという事実に基づき、本発明の方法を用いて、これらの生物の寿命及びストレス耐性を増すことができる。上述したように、上記の完全長たんぱく質（例えばPARP、TNA1、NNMT、PBEF、NMN、NMNAT-1、PRPP、並びにこれらのたんぱく質のホモログ及び均等物）、あるいはこのようなものをコードする核酸、あるいはこれらのいずれかの部分、好ましくは生物学的に活性な部分、を用いることができる。ホモログは、上で更に解説したように、他の種由来の相同たんぱく質でも、あるいは、特定のたんぱく質に対して特定の程度又はパーセンテージの同一性を有するたんぱく質又は核酸であってもよい。上述したペプチドを含むものなどの融合たんぱく質、あるいは、このようなものをコードする核酸、も用いることができる。このたんぱく質又は核酸を細胞に接触させる、細胞に導入する、あるいは細胞内で発現させるこ

とができる。例えば、あるたんぱく質をコードする核酸を、上述した通りに細胞内に導入することができる。代替的には、細胞内であるたんぱく質のレベル又はその活性を増すことができる。例えば、当該たんぱく質をコードする遺伝子の発現を刺激する作用物質、あるいは、あるたんぱく質の活性を増す作用物質、を細胞に接触させることができる。

【0150】

ある具体的な実施態様では、NAMPRT 又はそのホモログ又は均等物、あるいはそれらの生物学的に活性なフラグメント（用語「バリエーション」に含まれる）を細胞に接触される。実施例で解説するように、NAMPRTは特定の条件下で動物の血清中に存在し、従って細胞に作用すると予測される。従って、細胞の寿命を延ばしたり、あるいは、それをストレスから防御したり、あるいはここで解説した他の生物活性のいずれかを誘導したりするために、細胞を有効量のNAMPRT又はそのバリエーションに接触させてもよい。動物においては、NAMPRTを、例えばここで更に解説するように、医薬の投与用の従来手段のいずれかにより、投与してもよい。

【0151】

用いてもよいNAMPRTの生物学的活性部分の例には、NAMPRTたんぱく質、又は、細胞の寿命又はその対ストレス耐性を調節することのできるペプチドフラグメント；酵素活性を有するもの、及び、インシュリン受容体アラヴィスファチン（原語：ala Visfatin）に結合及び/又は活性化することのできるもの、がある。更にフラグメントは、いずれかのアイソフォームの約少なくとも20、50、100、200 又は300 アミノ酸から成っていてもよい。NAMPRTたんぱく質のフラグメント例には、成熟型のこのたんぱく質であると考えられるアイソフォームaのアミノ酸 15 又は32 から491 まで（SEQ ID NO: 22）がある（米国特許第5,874,399号を参照されたい）。NAMPRT は、例えばAsn 29 及び/又は Asn 396で糖鎖付加していても、あるいは糖鎖付加していなくてもよい。

【0152】

ここで解説されたNAMPRTたんぱく質又は他の細胞外たんぱく質を、ポリエチレングリコールなどの水溶性のポリマで修飾してもよい。水溶性のポリマのたんぱく質の共有結合は、当業で公知の技術を用いて行ってもよく、また米国特許第4,179,937号に解説されている。修飾されたこのポリペプチドは、例えば水溶液中での高い溶解度、高い安定性、長いin vivo半減期、及び高い対生物活性などの望ましい特性を有しているであろう。

【0153】

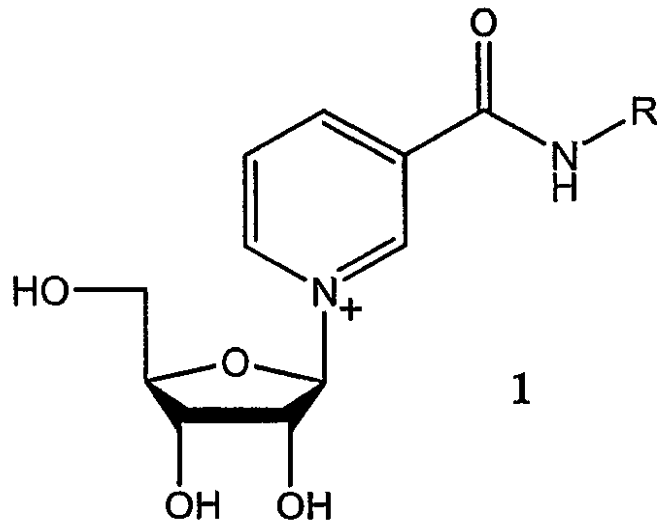
加えて、NAMPRT遺伝子の発現レベル又は該たんぱく質の活性を刺激する化合物又は作用物質を用いることができる。公知の誘導物質には、pokeweedマイトジェン、リポ多糖（LPS）、インターロイキン（IL）-1、腫瘍壊死因子（TNF）及びIL-6（Ognjanovic et al. (2001) J. Mol. Endocrinol. 26:107）がある。NAMPRT 発現レベルの更なる誘導物質は、例えば上記のゲノム・クローンに含まれるなどの当該遺伝子のプロモータ領域を用いた検定法により、同定することができる。

【0154】

別の実施態様では、細胞中のNAD⁺ 再利用経路を刺激するステップは、当該細胞をニコチンアミドリボシド、NAD⁺の前駆体、あるいはこれらの生物学的に活性な類似体及び、及び/又はプロドラッグに接触させるステップを含む。ニコチンアミドリボシドは、例えば Bieganski et al. (2004) Cell 117:495で解説されているように、ホスファターゼでNMN（例えばSigma社製）を処理することにより、調製することができる。ニコチンアミドリボシドは酸化した形でも、又は還元した形であってもよく、この後者はより安定であるようである（Friedlos et al. (1992) Biochem Pharmacol. 44:631。ニコチンアミドリボシド（1）を下に示す。

【0155】

【化 5】



10

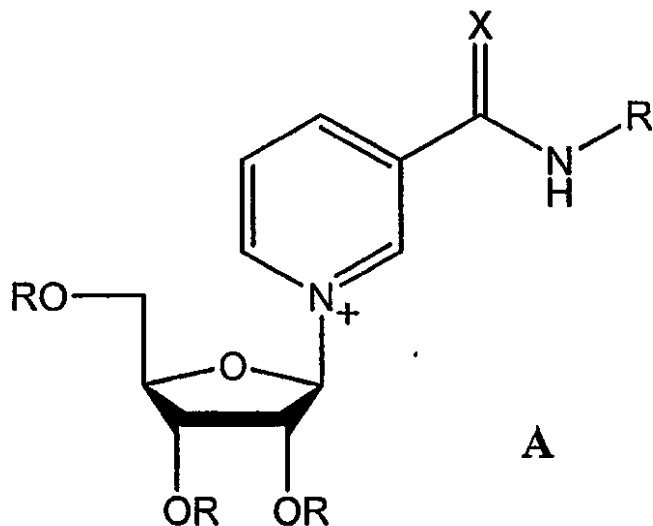
【 0 1 5 6】

ニコチンアミドリボシド及びその類似体のいくつかは式 A：

【 0 1 5 7】

【化 6】

20



30

【 0 1 5 8】

で表され、ただし式中、

R はそれぞれ独立にH、アセチル、ベンゾイル、アシル、ホスフェート、スルフェート、(アルキオキシ(原語: alkyoxy)メチル、トリアリールメチル、(トリアルキル)シリル、(ジアルキル)(アリール)シリル、(アルキル)(ジアリール)シリル、又は(トリアルキル)シリルを表し；そして

40

XはO 又はSを表す。

【 0 1 5 9】

ニコチンアミドリボシドを、約1nMから10 μ Mの濃度で細胞に接触させることができる。選択的には、細胞を、ニコチンアミドリボシドをリン酸化してニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)を形成するニコチンアミドリボシドキナーゼ(Nrk)酵素のたんぱく質又は活性レベルを増す作用物質に接触させてもよい。Nrkは酵母では一つの形Nrk1で、そしてヒトでは2つの形 Nrk1 (それぞれGenBank A受託番号 NM_017881.1; NP_060351; SEQ ID NO: 27 及び 28) 及び Nrk2 (GenBank 受託番号NM_170678; NP_733778; それぞれSEQ ID NO: 29 及び30)で存在する。

50

【 0 1 6 0 】

3. 細胞の寿命を減らす、又は、それを特定のストレスに対してより感受性にする、方法

ある実施態様では、細胞内でNPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2から成る群より選択されるたんぱく質の発現レベル又は活性を減少させる。これは、対応する遺伝子の発現を阻害する作用物質を細胞内に導入することにより、達成することができる。作用物質は、対応する遺伝子のプロモータに直接又は間接的に作用してその転写を減らす又は阻害するような低分子であってもよい。更に作用物質は、当該たんぱく質の対生物活性を阻害する化合物であってもよい。また作用物質は、アンチセンス分子、三重項分子又はsiRNAであってもよい。更に他の作用物質は、当該たんぱく質の対生物活性に干渉する、ドミナント・ネガティブ変異体又は細胞内抗体又は他のたんぱく質などのあるたんぱく質をコードする核酸である。このような方法は当業で公知である。方法例を以下に挙げる。

【 0 1 6 1 】

細胞内の遺伝子の発現レベルを減らす方法の一つは、標的遺伝子又はRNAの少なくとも一部分に相補的なアンチセンス分子を細胞内に導入することである。ここで用いられる「アンチセンス」核酸とは、コーディング及び/又は非コーディング領域に相補的ないくつかの配列のおかげで、翻訳開始領域など、標的RNAのうちの配列特異的（例えば非ポリA）部分にハイブリダイズすることができる核酸を言う。本発明のアンチセンス核酸は、二本鎖もしくは一本鎖でも、RNAもしくはRNAでも、あるいはこれらの修飾又は誘導体でもよいオリゴヌクレオチドであってよく、制御可能な態様で細胞に直接、投与することができるか、あるいは、標的RNAの翻訳を妨げるのに十分な制御可能な量を、外因性の導入された配列の転写により細胞内で産生され得るものである。

【 0 1 6 2 】

好ましくは、アンチセンス核酸が少なくとも約6ヌクレオチドであるとしてよく、そして好ましくはオリゴヌクレオチド（6乃至約200個のオリゴヌクレオチド）であるとしてよい。具体的な局面では、当該オリゴヌクレオチドは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、又は少なくとも200ヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドはDNA又はRNAでも、又はキメラ混合物又はこれらの誘導体又は修飾型でも、一本鎖又は二本鎖でもよい。当該オリゴヌクレオチドは塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格のいずれでも修飾することができる。当該オリゴヌクレオチドには、例えばペプチド、又は、細胞膜を透過する移送を促す作用物質（例えばLetsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652: 1988年12月15日公開のPCT 公報WO 88/09810を参照されたい）、ハイブリダイゼーション惹起性開裂剤（例えばKrol et al., 1988, BioTechniques 6: 958-976を参照されたい）又はインターカレート剤（例えばZon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549を参照されたい）など、他の付属基が含まれていてもよい。

【 0 1 6 3 】

本発明のある好適な局面では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、好ましくは一本鎖DNAとして提供する。当該オリゴヌクレオチドは、その構造上のいずれの位置でも、当業で公知の構成成分で修飾できよう。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定はしないが5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2

-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)_w、及び2,6-ジアミノプリンから成る群より選択される少なくとも一つの修飾塩基部分を含んでもよい。

【0164】

別の実施態様では、当該オリゴヌクレオチドは、限定はしないがアラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、及びヘキソースから成る群より選択される少なくとも一つの修飾糖部分を含む。

10

【0165】

更に別の実施態様では、当該オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホールアミドチオエート、ホスホールアミデート、ホスホールジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、及びホルムアセタール、あるいはこれらの類似体から成る群より選択される少なくとも一つの修飾リン酸骨格を含む。

【0166】

更に別の実施態様では、当該オリゴヌクレオチドは2'-アノマー型オリゴヌクレオチドである。2'-アノマー型オリゴヌクレオチドは相補RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、この場合、通常のベータユニットとは対照的に、そのストランドは互いに並行に走る (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。

20

【0167】

当該オリゴヌクレオチドを、例えばペプチド、ハイブリダイゼーション惹起性架橋剤移送物質、ハイブリダイゼーション惹起性開裂剤等の別の分子に結合させてもよい。アンチセンス分子は「ペプチド核酸 (PNA)」であってもよい。PNAとは、少なくとも約5ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを、リジン末端に持つアミノ酸残基のペプチド骨格に連結して含むアンチセンス分子又は抗遺伝子物質を言う。この末端のリジンは当該組成物に可溶性をもたらす。PNAは相補な一本鎖DNA又はRNAに優先的に結合して、転写産物の伸長を停止させるが、PEG化してそれらの細胞内の寿命を延ばしてもよい。

【0168】

本発明のアンチセンス核酸は標的RNA種の少なくとも一部分に相補な配列を含む。しかしながら絶対的な相補性は好ましいながらも必要ではない。ここで言及される「RNAの少なくとも一部分に相補的な」配列とは、RNAにハイブリダイズして安定な二重鎖を形成できるように十分な相補性を有する配列を意味し、従って二本鎖アンチセンス核酸の場合、当該二重鎖DNAの一本の鎖を検査してもよく、あるいは三重項形成を検定してもよい。ハイブリダイズ能は相補性の程度と、アンチセンス核酸の長さの両方に依存するであろう。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それが含有するであろう標的RNAとの塩基ミス対合が多くなり、それでも尚安定な二重鎖 (又は場合によっては三重鎖) が形成されることになる。当業者であれば、標準的な手法を用いてハイブリダイズ後の複合体の融解点を調べれば、許容可能なミス対合の程度を確認することができる。標的RNAの翻訳を阻害する上で有効であろうアンチセンス核酸の量は標準的な検定技術により、決定することができる。

30

40

【0169】

その後、合成されたアンチセンス・オリゴヌクレオチドを制御された態様で細胞に投与することができる。例えば、該アンチセンス・オリゴヌクレオチドを、これらが細胞に取り込まれるであろう制御されたレベルの細胞成長環境下に置くことができる。該アンチセンス・オリゴヌクレオチドの取り込みは、当業で公知の方法の使用により、支援することができる。

【0170】

代替的な実施態様では、本発明のアンチセンス核酸を、外因性の配列からの転写により

50

細胞内で制御可能に発現させる。例えば、ベクタが細胞に取り込まれ、この細胞内でそのベクタ又はその一部分が転写されて本発明のアンチセンス核酸 (RNA) が産生されるように、in

vivoにベクタを導入することができる。このようなベクタは、該アンチセンス核酸をコードする配列を含有するであろう。このようなベクタはエピソード性そのまま留まっても、あるいは、それが転写された所望のアンチセンスRNAを産生し得る限り、染色体に組み込ませることもできる。このようなベクタは当業で標準的な組換えDNA技術法により構築することができる。ベクタは、哺乳動物細胞での複製及び発現に用いられる、プラスミドでも、ウイルスでも、又は当業で公知の他のものでもよい。該アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、目的の細胞内で作用することが当業で公知であればいずれのプロモータによってもよい。このようなプロモータは誘導性でも、又は構成的でもよい。最も好ましくは、該アンチセンス・オリゴヌクレオチドの発現制御を達成するために、プロモータは、外因性成分の投与により制御可能又は誘導可能であるとよい。このような制御可能なプロモータにはTet プロモータがある。哺乳動物細胞用の他の使用可能なプロモータには、限定はしないが、SV40初期プロモータ領域

(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い末端反復配列に含まれたプロモータ(Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787-797)、疱疹チミジンキナーゼプロモータ (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42) 等 がある。

【 0 1 7 1 】

多種の癌に向けたアンチセンス治療法は臨床段階であり、文献では広範に議論されてきた。Reedは腫瘍でBcl-2 遺伝子を狙ったアンチセンス治療法をレビューした；腫瘍細胞株でBcl-2の遺伝子輸送媒介型過剰発現は数多くの種類の抗癌剤に対する耐性をもたらした。(Reed,

J.C., N.C.I. (1997) 89:988-990)。rasのアンチセンス阻害剤の臨床開発の可能性がCowers et al., L.M., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:359-371に論じられている。更なる重要なアンチセンス標的には白血病 (Geurtz, A.M., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:341-358)；ヒトC-refキナーゼ (Monia, B.P., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:327-339)；及びプロテインキナーゼC (McGraw et al., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:315-326がある。

【 0 1 7 2 】

別の実施態様では、細胞内の特定のmRNA又はポリペプチドのレベルは、あるリボ酵素又はこのようなものをコードする核酸を細胞内に導入することにより、減少させられる。mRNA転写産物を触媒作用により開裂させるようにデザインされたりリボ酵素分子を細胞に導入する、あるいは、細胞内で過剰発現させることで、遺伝子の発現を阻害することができる (例えばSarver et al., 1990, Science 247:1222-1225 及び米国特許第 5,093,246号を参照されたい)。よく用いられるリボ酵素モチーフの一つはハンマーヘッドであり、このハンマーヘッドの基質配列要件は小さい。ハンマーヘッドリボ酵素のデザインはUsman et al., Current Opin.

Struct. Biol. (1996) 6:527-533に開示されている。Usmanはさらにリボ酵素の治療的使用も論じている。更にリボ酵素をLong et al., FASEB J. (1993) 7:25; Symons, Ann. Rev. Biochem. (1992) 61:641;

Perrotta et al., Biochem. (1992) 31:16-17; Ojwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)

(1992) 89:10802-10806;

及び米国特許第 5,254,678号が解説した通りに調製及び使用することができる。リボ酵素によるHIV-I RNAの開裂は米国特許第5,144,019に解説されている；リボ酵素を用いてRNAを開裂させる方法は米国特許第5,116,742号に解説されており；そしてリボ酵素の特異性を増す方法は米国特許第5,225,337号及びKoizumi et

10

20

30

40

50

al., Nucleic Acid Res. (1989) 17:7059-7071に解説されている。ハンマーヘッド構造中のリボ酵素フラグメントの調製及び使用も Koizumi et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17:7059-7071に解説されている。ヘアピン構造中のリボ酵素フラグメントの調製及び使用はChowrira and Burke, Nucleic Acids Res. (1992) 20:2835に解説されている。更に、リボ酵素は D aubendiek and Kool, Nat. Biotechnol. (1997) 15(3):273-277が解説した通りのローリング転写でも作製することができる。

【 0 1 7 3 】

遺伝子発現を減らす又は遮断するもう一つの方法は、配列特異的mRNA分解を媒介する二本鎖低分子干渉性RNA (siRNA) を導入する方法である。RNA干渉 (RNAi) は動物及び植物で配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスであり、サイレントになる遺伝子に配列上相同な二本鎖RNA (dsRNA) により惹起される。In vivoでは長いdsRNAはリボヌクレアーゼIIIにより開裂させられて21- 及び22-ヌクレオチドの siRNAを生じる。21-ヌクレオチドのsiRNA 二重鎖が、ヒト胚性腎 (293) 及びHeLa細胞 (Elbashir et al. Nature 2001 ;411(6836):494-8)を含む様々な哺乳動物細胞株で内因性及び異種の遺伝子の発現を特異的に抑制することが示されている。従って、細胞内のある遺伝子の翻訳は、約15 乃至 30ヌクレオチド、好ましくは約18 乃至 21ヌクレオチド、そして最も好ましくは19 乃至 21のヌクレオチドの長さを有する短い二本鎖RNAに細胞を接触させることにより、阻害することができる。代替的には、このようなsiRNA、又は、代謝されてsiRNAになるようなヘアピンRNA、をコードするベクタを標的細胞に導入することができる (例えばMcManus et al. (2002) RNA 8:842; Xia et al. (2002) Nature Biotechnology 20:1006; and Brummelkamp et al. (2002) Science 296:550を参照されたい。用いることのできるベクタは、例えばOligoEngine 社から名称 pSuper RNAi System^T_Mなど、市販のものを利用することができる。

【 0 1 7 4 】

また、標的遺伝子の調節領域 (即ち遺伝子プロモータ及び / 又はエンハンサ) に相補なデオキシリボヌクレオチド配列をターゲティングして、体内の標的細胞中の当該遺伝子の転写を妨げる三重項らせん構造を形成させることでも、遺伝子発現を減らすことができる。 (概略的には、Helene, C. 1991, Anticancer Drug Des., 6(6):569-84; Helene, C., et al., 1992, Ann, N.Y. Accad. Sci., 660:27-36; 及びMaher, L.J., 1992, Bioassays 14(12):807-15を参照されたい) 。

【 0 1 7 5 】

更なる実施態様では、RNAアプタマーを細胞内に導入又は細胞内で発現させることができる。RNA アプタマーは、例えばTat 及びRev RNA (Good et al., 1997, Gene Therapy 4 : 45-54) などのたんぱく質の翻訳を特異的に阻害することのできる特異的RNAリガンドである。

【 0 1 7 6 】

ポリペプチドの対生物活性を減らす更に別の方法は、細胞内にドミナント・ネガティブ変異体を導入する方法である。ドミナント・ネガティブ変異型ポリペプチドは、当該ポリペプチドが通常相互作用する相手である分子と相互作用することで、この分子をめぐって競合を起こすが、それが生物学的には不活性であるために、当該ポリペプチドの対生物活性を阻害するものである。あるたんぱく質のドミナント・ネガティブ変異体は、例えば当該ポリペプチドの基質結合ドメイン、触媒ドメイン、又は細胞内局在化ドメインを変異させるなどにより、作製することができる。好ましくは変異型ポリペプチドが過剰産生するとよい。このような効果を有する点変異が作られている。加えて、多様な長さの様々なポリペプチドを、あるたんぱく質の末端に融合させることで、ドミナント・ネガティブ変異

体を生じさせることができる。ドミナント・ネガティブ変異体を作製するための一般的な戦略を利用することができる。

Herskowitz, Nature

(1987) 329:219-222を参照されたい。

【0177】

別の実施態様では、NPT1、PNC1、NMA1 及びNMA2から成る群より選択される一種以上のたんぱく質の活性を減らす。これは、例えばこれらのたんぱく質のうちの一つの酵素活性などの活性を阻害する化合物に細胞を接触させるなどにより、達成することができる。このような化合物を同定する検定法をここに更に解説する。

【0178】

別の実施態様では、細胞をニコチンアミドか、又は実質的の同じ対生物活性を有するそのバリエーションに接触させることにより、細胞内のNAD⁺再利用経路を通るフラックスを減らす。ある好適な実施態様では、細胞を約0.1 mM乃至約100 mM、好ましくは約1 mM乃至約20mM、更により好ましくは2 mM乃至約10 mM、そして最も好ましくは約5 mMの量のニコチンアミドに接触させる。ニコチンアミドは市販のものを利用することができる（例えば実施例で提供したソースを参照されたい）。細胞はニコチンアミドに、所望の効果を発揮させるために十分な時間、接触させる。例えば細胞を少なくとも60分間又は少なくとも約24時間、ニコチンアミドに接触させることができる。更に細胞をニコチンアミドに継続的に接触させてもよい。

【0179】

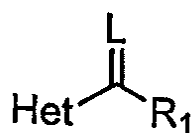
ニコチンアミドに加え、細胞をその類似体に接触させることができる。類似体の例には抗結核薬として販売されているピラジンアミドがある。類似体は、例えば類似体のコンビナトリアル・ライブラリを所望の活性を有するものを探してスクリーニングするなどにより、同定することができる。例えば寿命を測定する検定法を用いることができる。代替的には、ニコチンアミドの類似体、又は、Sir2ファミリー・メンバーのCポケットと相互作用する物質を、ここで更に解説するように合理的な薬物デザインにより同定することができる。

【0180】

ニコチンアミドの類似体又は誘導体の例には、式I

【0181】

【化7】



【0182】

の化合物があり、但し式中、

L はO、NR、又はSであり；

Rはアルキル又はフェニルであり；

R₁ は-NH₂、-O-alkyl、-N(R)₂、又は-NH(R)であり；そして

Het はヘテロアリアル又はヘテロシクロアルキルである。

【0183】

用いてもよい具体的な類似体には、式I及び付属の定義の化合物（但し式中、LはOである）；式I及び付属の定義の化合物（但し式中、R₁ は -NH₂である）；式I及び付属の定義の化合物（但し式中、Het はピリジン、フラン、オキサゾール、イミダゾール、チアゾール、イソキサゾール、ピラゾール、イソチアゾール、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、ピロール、テトラヒドロフラン、1:4 ジオキサン、1,3,5-トリオキサン、ピロリジン、ピペリジン、及びピペラジンから成る群より選択される）；式I及び付属の定義の化合物（但し式中、Hetはピリジンである）；式I及び付属の定義の化合物（但し式中、L は O

10

20

30

40

50

であり、そして R_1 は $-NH_2$ である；式 I 及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O であり、そして Het はピリジンである；式 I 及び付属の定義の化合物（但し式中、 R_1 は $-NH_2$

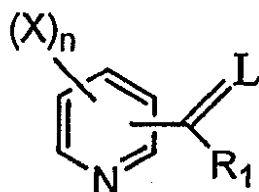
であり、そして Het はピリジンである；及び式 I 及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O であり、 R_1 は $-NH_2$ であり、そして Het はピリジンである）がある。

【0184】

用いることのできるニコチンアミドの他の類似体又は誘導体の例には、式II：

【0185】

【化8】



10

【0186】

の化合物があり、但し式中、

L は O 、 NR 、又は S であり；

R はアルキル又はフェニルであり；

R_1 は $-NH_2$ 、 $-O$ -アルキル、 $-N(R)_2$ 、又は $-NH(R)$ であり；

X は H 、アルキル、 $-O$ -アルキル、 OH 、ハリド、又は NH_2 であり；そして

n は1以上4以下の整数である。

20

【0187】

用いてもよい具体的な類似体には、式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O である）；式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 R_1 は $-NH_2$ である）；式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 X は H であり、そして n は 4である）；式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O であり、そして R_1 は $-NH_2$ である）；式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O であり、 X は H であり、そして n は 4である）；式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 R_1 は $-NH_2$ であり、 X は H であり、そして n は 4である）；及び式II及び付属の定義の化合物（但し式中、 L は O であり、 R_1 は $-NH_2$ であり、 X は H であり、そして n は 4である）がある。

30

【0188】

ここで解説された化合物の薬学的に許容可能な塩類及びプロドラッグも用いてよい。

【0189】

概略的には、Sir2ファミリー・メンバーのいずれの阻害剤を用いても、細胞の寿命を減らすことができる。好適な阻害剤は、例えばニコチンアミド又はその類似体など、Sir2ファミリー・メンバーのCポケットに結合する分子である。

【0190】

代替的には、ニコチンアミドを産生する酵素のレベル又は活性を、その寿命を減らしたい、又は、ストレスに対してそれをより感受性にしたい細胞内で増すことができる。例えば、 NAD^+ 再利用経路中又はデノボ合成経路中でニコチンアミドの生合成に参与する酵素のレベル又は活性を増すことができる。酵素の例は前の項で上述した通りである。細胞内のニコチンアミドのレベルを増す更に別の方法は、例えば酵母及びヒト細胞のニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ；ヒト細胞のニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（上に論じた）及び酵母 NPT1 又はそのヒトホモログ（やはり上に解説した）など、ニコチンアミドを直接的又は間接的に失活させる又は分解する阻害性酵素がある。遺伝子発現レベル又はたんぱく質活性を調節する方法はここで更に解説されており、また当業で公知である。

40

【0191】

50

NAMPRTの阻害剤にはFK866 (Hasmann and Schemainda, Cancer Research, 63:7436-7442, 2003) や、WO97/48397 及びWO03/080054に解説された化合物がある。

【0192】

更に他の実施態様では、NADを開裂させてニコチンアミドにするグリコヒドロラーゼのレベル又は活性を増すことにより、ニコチンアミドレベルを増すことができる。更に、細胞内のニコチンアミドのレベルを増すために、ニコチンアミド・トランスポータのレベル又は活性を増すこともできる。

【0193】

更に、細胞の寿命又はそれらの対ストレス耐性の低下は、上述した遺伝子に相当する植物遺伝子を調節することにより、植物細胞及び微生物内でも達成することができる。これらの遺伝子は前項で解説されている。

【0194】

4. 細胞内のNAD+再利用経路を通るフラックス又はニコチンアミドのレベルを調節する作用物質を同定する方法

作用物質には、低有機分子などの低分子、又は、いずれかの生物巨大分子、例えば一本鎖もしくは二本鎖のDNA又はRNAなどの核酸；たんぱく質又はペプチド；多糖；脂質；又はこれらの分子上の組合せ、がある。

【0195】

ある実施態様では、細胞の寿命、又は特定の種類のストレスに対するその耐性、を調節する化合物を同定する方法は、(i) NPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2から成る群より選択されるたんぱく質を検査化合物に、前記たんぱく質の活性に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記酵素の活性を判定するステップであって、但しこの場合、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記検査化合物の存在下における前記酵素の活性の違いは、前記検査化合物が細胞の寿命を調節する化合物であることの指標である、ステップとを含む。本方法は、更に、前記検査化合物に細胞を接触させるステップと、前記細胞の寿命が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。代替的には、本方法は更に、前記検査化合物に細胞を接触させるステップと、例えばヒートショック、浸透圧ストレス、高温、カロリー制限、DNA損傷物質（例えば紫外線及びミトコンドリア変異誘発物質である臭化エチジウム）、不適切な窒素条件など、特定のストレスに対する前記細胞の耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。酵素の活性の判定は、ここで更に解説する通りに行うことができる。更に、細胞の寿命又はヒートショック、浸透圧等のストレスに対するその耐性に検査化合物が及ぼす効果を測定するステップを含むこともできる。

【0196】

当業者であれば理解されるように、上記の検定法を、上述したものなどの上記のたんぱく質のうちの一つの生物学的活性な部分又はバリエーションで行うこともできる。例えば、あるたんぱく質の一部分はその触媒部位から成るかも知れない。S. セレビジエ及びヒトNPT1の触媒部位は、約アミノ酸209位と240位との間に位置する。S. セレビジエPNC1の触媒部位は約アミノ酸150-186位に位置する。ヒトNMNAT (NMA1 及びNMA2のホモログ) の触媒部位は約アミノ酸100-110

及び 280-310（両方の配列とも活性部位に寄与する）に位置する。

【0197】

別の実施態様では、本発明は、細胞の寿命又は特定の種類のストレスに対するその耐性を調節する化合物を同定する方法を提供するものであり、本方法は、(i) NPT1、PNC1、NMA1 及び NMA2 から成る群より選択される遺伝子の転写調節核酸をレポータ遺伝子に作動可能に連鎖させて含む細胞又はライセートを、検査化合物に、前記転写調節拡散に影響するのに充分であろう時間量、接触させるステップと、(ii) 前記レポータ遺伝子のレベル又は活性を判定するステップであって、前記検査化合物の非存在下に比較したときの前記検査化合物の存在下における前記レポータ遺伝子のレベル又は活性の違いは、前記検

査化合物が細胞の寿命又は特定の種類のストレスに対するその耐性を調節する化合物であることの指標である、ステップとを含む。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、前記細胞の寿命を調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。更に本方法は、細胞を前記検査化合物に接触させるステップと、ヒートショックなどの特定のストレスに対する前記細胞の耐性が調節されたかどうかを判定するステップとを含んでもよい。転写調節核酸は当業で公知であるか、あるいは、当業で公知の方法に従って容易に単離することができる。レポータ遺伝子は、蛍光活性化セルソーティングなど、その発現を検出することのできるたんぱく質をコードしていればいずれの遺伝子であってもよい。細胞は原核細胞でも、又は真核細胞でもよい。ライセートは、当業で公知の方法に従って調製された、ある一つの細胞の完全なライセートであってもよく、あるいは、ある細胞ライセートの一画分でも、又は、複数の細胞ライセートもしくは細胞ライセート画分の組合せでもよい。更にライセートは一種以上の組換えたんぱく質を含んでいてもよい。

10

【0198】

更に本発明は、細胞内のニコチンアミドのレベルを調節する方法も提供する。このような方法は、細胞内のニコチンアミド・レベルを直接又は間接的に増す又は減らす酵素を調節する作用物質を同定するステップを含んでもよい。酵素の例はここで解説されている。検定法は、基本的にはNAD⁺再利用経路を調節する作用物質の同定に関して上述した通り行うことができる。

20

【0199】

5. Sir2及びSir2ファミリー・メンバーの阻害剤を同定する方法

ここで示すように、ニコチンアミドはSir2及びヒトSRT1を阻害する。更に、ニコチンアミドは、Sir2のCポケットに結合することで非競合的にSir2を阻害することも示されている。従って、本発明は、Sir2や、Cポケットを含む他のSir2ファミリー・メンバーたんぱく質の阻害剤であるニコチンアミドの類似体を同定するための、合理的薬物デザインに基づくなどの検定法を提供するものである。

【0200】

従って、本発明は、例えば特定の細胞の寿命を減らすと有益であるであろう状態を治療するなどのために、細胞の寿命を減らすために用いることのできる作用物質を同定する方法を提供するものである。このような実施態様の一つは、Cポケットを含むSir2ファミリー・メンバーの少なくとも一部分の三次元座標を含むデータセットを用いて、Sir2ファミリー・メンバーの阻害剤として用いるための作用物質を同定する方法を含む。Sir2ホモログの結晶構造はMin et al. (2001) Cell 105 269 に解説されており、この構造はProtein Data Bank ID code 1ICIに提供されている。そのCポケットはヒトSIRT1の約アミノ酸70-90位及び127-167に位置している。Sir2のCポケットは約アミノ酸250-270位及び310-350位に位置している。該座標は更にニコチンアミド又はその類似体の座標を含んでもよい。ある具体的な実施態様では、その三次元座標はSir2ホモログのものである。他の実施態様では、検定は、Sir2ファミリー・メンバーのうちでCポケットを含む少なくとも一部分を、ニコチンアミド類似体などの化合物と共結晶させるステップを含む。共結晶化はNAD⁺の存在下でも、又は非存在下で行われてもよい。

30

40

【0201】

ある実施態様では、Sir2ファミリー・メンバーのうちで少なくともCポケットを含む一部分の三次元座標を用いて合理的薬物デザインを行うことにより、潜在的な作用物質を選択する。上述したように、好ましくは、この選択を、コンピュータ・モデリングと並行して行うとよい。次に、この潜在的な作用物質をSir2ファミリー・メンバーと接触させ、このSir2ファミリー・メンバーの活性を判定する（例えば測定する）。潜在的な作用物質は、このSir2ファミリー・メンバーについて判定された活性に減少があった場合に、Sir2ファミリー・メンバーを阻害する作用物質として同定される。

【0202】

ある好適な実施態様では、本方法は、あるSir2ファミリー・メンバーのうちでCポケッ

50

トを含む少なくとも一部分を含有する補助的な結晶が前記潜在的な作用物質に結合したものを調製するステップを更に含む。好ましくは、この補助的な結晶が、5.0オングストロームより良好な分解能まで、より好ましくは3.5オングストロームに等しいか、又はより良好な分解能まで、そしてより好ましくは3.3オングストロームに等しいか、又はより良好な分解能まで、原子座標が判定できるように効果的にX線を回折するとよい。次に、該補助的な結晶の三次元座標を分子置換解析で判定し、この補助的な結晶に判定された三次元座標を用いた合理的薬物デザインを行うことにより、第二世代作用物質を選択する。好ましくは、この選択をコンピュータ・モデリングと並行して行うとよい。前記の第二世代作用物質はニコチンアミドの類似体であってもよい。

【0203】

10

明白であるはずだが、補助的な結晶の三次元構造は、分子置換解析でも、あるいは多波長異常分散でも、あるいは多重同型置換でも、判定することができる。次に、補助的な結晶について判定された三次元構造を、好ましくはコンピュータ・モデリングと並行して用いた合理的薬物デザインを行うことにより、候補薬物を選択することができる。その後、ここで例示した標準的生化学法を用いた多数の薬物スクリーニング検定法で、候補薬物を検査することができる。

【0204】

本方法は、更に、異なる種のSir2ファミリー・メンバー又はその部分に前記第二世代作用物質を接触させるステップと、この他の種のSir2ファミリー・メンバー又はその部分の活性を判定（例えば測定）するステップとを含むことができる。こうして、第一の種のSir2ファミリー・メンバーで観察された活性に比較して他の種のSir2ファミリー・メンバーのものに有意に小さな変化（2以上の因数）があれば、ある潜在的な作用物質を、この第一の種のSir2ファミリー・メンバーの基本的な特異的な阻害剤として用いられる作用物質として同定する。好ましくは、他の種の活性に何ら、又は最小の変化（即ち15%未満）しか観察されないとよい。

20

【0205】

ある局面では、本発明は、Sir2ファミリー・メンバーの活性の阻害剤を同定するコンピュータ支援法を提供するものであり、本方法は、ある分子又は分子複合体の一群の構造座標をコンピュータ・モデリング・アプリケーションに供給するステップであって、前記分子又は分子複合体が、Sir2ファミリー・メンバーのうちでCポケットを含む少なくとも一部分を含む、ステップと、ニコチンアミドの類似体など、ある化学的実体一群の構造座標を前記コンピュータ・モデリング・アプリケーションに供給するステップと、前記化学的実体が、前記分子又は分子複合体に結合又は干渉することが予測される阻害剤であるかどうかを判定するステップであって、前記分子又は分子複合体への結合又は干渉は、Sir2ファミリー・メンバーの活性の潜在的阻害の指標である、ステップとを含む。好ましくは、前記化学的実体が前記分子又は分子複合体に結合又は干渉することが予測される阻害剤であるかどうかを判定するステップが、前記化学的実体と前記分子又は分子複合体の結合ポケットとの嵌合操作を行うステップと、それに続き、前記嵌合操作の結果をコンピュータで解析することで、前記化学的実体と結合ポケットの間の結合を定量するステップとを含むとよい。また本方法は、化学的実体のライブラリをスクリーニングするステップを更に含んでもよい。また本方法は、潜在的阻害剤を供給又は合成するステップと、次に、この潜在的阻害剤を検定して、それがSir2ファミリー・メンバーの活性を阻害するかどうかを判定するステップとを含んでもよい。

30

40

【0206】

別の局面では、本発明はSir2ファミリー・メンバーの阻害剤を作製する方法を提供するものであり、本方法は、ある化学的実体を化学的又は酵素的に合成して、Sir2ファミリー・メンバーの活性の阻害剤を生じさせるステップであって、前記化学的実体が、例えば上述した通りなど、コンピュータ支援されたプロセス中にデザインされている、ステップを含む。

【0207】

50

更に本発明は、Sir2ファミリー・メンバーと、ニコチンアミド又はその類似体との間の複合体の表示を含む装置を提供するものである。このような装置の一つがコンピュータ・メモリに前記複合体の表示を含むコンピュータである。ある実施態様では、該コンピュータは、当該複合体の原子座標を含む機械読み取り可能なデータで符号化されたデータ記憶材料を含有する機械読み取り可能なデータ記憶媒体を含む。該コンピュータは、更に、前記機械読み取り可能なデータを処理する指示を記憶するワーキングメモリと、前記ワーキングメモリ及び機械読み取り可能なデータ記憶媒体の両方に接続して前記機械読み取り可能なデータを処理して前記複合体の三次元表示にする中央処理装置とを含むであろう。ある好適な実施態様では、前記コンピュータは、前記三次元表示を表示するために前記中央処理装置に接続した表示部を含む。

10

【0208】

6. 発明の使用

ここで更に解説するように、NAD⁺再利用経路を通るフラックスを、例えば前記経路中のたんぱく質の活性又はレベルを増したり、あるいはニコチンアミド・レベルを減らしたりするなどにより増すと、カロリー制限が模倣され、ひいては細胞生存並びに細胞及び生物の健康が促進される。

【0209】

ある実施態様では、NAD⁺再利用経路を通るフラックスを増すこと、又は、ニコチンアミド・レベルを減らすこと、を用いて、*in vitro*で細胞の寿命を増し、少なくとも特定のストレスから細胞を防御する。例えば、培養細胞を、より長時間増殖性にするためなど、ここで解説する通りに処理することができる。これは、培養では限られた寿命しか有さないことが公知の初代細胞培養株（即ち、ヒトなどの生物から得られた細胞）に特に有用である。NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、ニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼ（NNMT 及びNNT1）、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（NAMPRT）、及び選択的にヒトニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ（NMNAT、NMAT-1 及び 2）から成る群より選択される一種以上の遺伝子の一つ以上の付加的なコピーを組み込むなどにより、本発明の方法に従ってこのような細胞を処理すると、細胞が培養で生きたままで維持される時間量が増すであろう。胚性幹（ES）細胞および多分化能細胞や、それらから分化した細胞も、例えば培養中の細胞又はその後代をより長時間維持するなどのために本発明の方法に従って改変することができる。細胞、ES細胞、多分化能細胞の初代培養株及びこれらの後代は、例えば、細胞に対して特定の生物学的効果を有する化合物を同定したり、あるいは、細胞に対する化合物の毒性を検査したり（即ち細胞毒性検定）ために、用いることができる。

20

30

【0210】

上記の遺伝子の一つ以上のコピーを細胞内に導入する代わりに、これらの遺伝子にコードされたたんぱく質に細胞を接触させてもよい。例えば、NAMPRT又はそのバリエーションを細胞の培養基に加えることができ、その培養基からそれは細胞と相互作用し、細胞に対してその活性を発揮するであろう。NAMPRT は、例えば約1 乃至1000 ng/ml、より好ましくは約 1 乃至 300 ng/ml そして最も好ましくは約 3 乃至 100 ng/mlの濃度など、細胞に対する生物学的効果を誘導するために十分な濃度で加えてよい。約10 及び100 ng/ml の濃度も用いてよい。NAMPRTは、本発明の方法に従って、例えば細菌発現系や、*in vitro*転写及び/又は翻訳系などの*in vitro*で産生させても、あるいは細胞内などの*in vivo*で産生させてもよい。

40

【0211】

別の実施態様では、ニコチンアミドリボシド又はその機能的ホモログもしくはプロドラッグを培養物に加える。

【0212】

他の実施態様では、長時間保存しようとする細胞をここで解説した通りに処理する。細胞は、例えば血球など、懸濁液中の細胞でも、又は組織又は器官中の細胞でもよい。例えばある個体に投与するために個体から採集された細胞を、例えば血球を長時間保存するな

50

どのために、本発明に従って処理することができる。寿命を延ばす、及び／又は、それらを特定の種類のストレスから防御する、ために処理してもよい他の細胞には、消費用の細胞、例えばヒト以外の哺乳動物（例えば肉）から採った細胞又は植物細胞（例えば野菜）がある。

【0213】

別の実施態様では、ヒト又は他の哺乳動物など、対象から得られた細胞を本発明の方法に従って処理し、その後、同じ又は異なる対象に投与する。従って、移植片として使用するためにドナーから得られた細胞又は組織を、この移植片のレシピエントへの投与前にここで解説した通りに処理することができる。例えば、骨髓細胞を対象から得、それらの寿命を延ばし、特定の種類のストレスから当該細胞を防御するために *ex vivo* で処理した後、レシピエントに投与することができる。いくつかの実施態様では、骨髓などの移植片の細胞に、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的にNMAT-1 又は 2 から成る群より選択される一種以上の遺伝子の一つ以上のコピーをトランスフェクトする。他の実施態様では、移植片をNAMPRTなどのたんぱく質を含む溶液と一緒にインキュベートする。移植片は器官でも、組織でも、又は疎性細胞（原語：loose cells）でもよい。

10

【0214】

更に他の実施態様では、細胞の寿命を増す及び／又はそれらを特定の種類のストレスから防御するために細胞を *in vivo* で処理する。例えば、上皮細胞などの皮膚をここで解説する通りに処理することにより、皺の発生などの加齢から皮膚を防御することができる。ある例示的な実施態様では、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的にNMAT-1 又は2から成る群より選択される一種以上の遺伝子の転写を増すことのできる化合物を含む医薬用又は美容用組成物に皮膚を接触させる。別の実施態様では、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的にNMAT-1 又は 2から成る群より選択されるたんぱく質、あるいはこのようなものをコードする核酸、と、前記核酸又はたんぱく質を細胞に送達する賦形剤とを含む組成物に皮膚細胞を接触させる。ニコチンアミドリボシド又はその機能的ホモログもしくはプロドラッグも *in vivo* に投与することができる。

20

【0215】

化合物、核酸及びたんぱく質は、細胞の寿命を延ばす、又は、特定のストレスから細胞を防御するために、対象の組織又は器官内に注射などでも送達することができる。

30

【0216】

更に別の実施態様では、例えばNPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT及び／又はNMAT-1もしくは2たんぱく質又は核酸又はこれらのたんぱく質の発現レベル又は活性を増す作用物質を、概略的には例えばその細胞の寿命を増す、その細胞を特定の種類のストレスから防御する、加齢による疾患、加齢自体のプロセス、細胞死、感染及び毒性物質に関連する疾患又は炎症、を防止又は治療する、ために対象に投与する。例えば、作用物質を食品添加物として対象に摂取させることができる。ある実施態様では、このような作用物質は、マルチビタミン・コンプレックスの成分である。

【0217】

全ての動物は、典型的には、一定の成長及び成熟期間を経た後、進行的及び不可逆的な生理的衰退期間を得て死に至る。誕生から死までの時間の長さは生物の寿命として知られ、各生物は特徴的な平均寿命を有する。老化は平均寿命のパーセントで測定したときに時間経過に根ざす変化の身体的徴候である。

40

【0218】

場合によっては、老化の特徴が極めて明白な場合がある。例えば、高齢者の特徴には皮膚の皺、白髪、禿、及びしろそこひや、黒皮症、骨粗鬆症、大脳皮質萎縮症、リンパ系の枯渇、胸腺の萎縮、II型糖尿病の発生率増加、アテローム性硬化症、癌、及び心疾患がある。

Nehlin et al. (2000), *Annals NY Acad Sci* 980:176-79. 哺乳動物の老化の他の局面には、体重減少、ロードキフォシス（原語：lordokyphosis

50

(ねこ背)、活力の消失、リンパ系の萎縮、骨密度の低下、皮膚の肥厚及び皮下脂肪組織、ストレス（熱又は低温、創傷、感覚消失、及び造血系前駆細胞の剥離を含む）寛容能の低下、肝臓の病理、腸絨毛の萎縮、皮膚の潰瘍、アミロイド沈着、及び関節の疾患、がある。Tyner et al. (2002), Nature 415:45-53。

【0219】

入念に観察すると、無脊椎動物も含め、他の真核生物でも老化の特徴が明らかになる。例えば、モデル生物であるC.エレガンス(C.elegans)における老化の特徴には、運動の鈍化、弛緩性、卵黄質の蓄積、腸管の自己蛍光（リポフシン）、摂食能又は排出能の消失、組織中の壊死性空洞、及び生殖細胞の出現、がある。

【0220】

当業者であれば、老化のプロセスは細胞レベルやミトコンドリアでも出現していることは認識されよう。細胞の老化は倍加能の喪失、アポトーシスレベルの増加、分化後表現型の変化、並びに、たんぱく質合成及びターンオーバーのレベル低下など、代謝の変化に顕れる。

【0221】

細胞及び生物の老化のプログラムされた性質を考えると、老化に相関する表現型上の特徴を利用して、細胞又は生物の「生物学的年齢」を評価することができる。例えば、生物学的年齢は、細胞の遺伝子発現パターン、対ストレス耐性（例えば酸化的又は遺伝毒性ストレス）、細胞増殖の速度、及び代謝上の特徴（例えばたんぱく質合成及びターンオーバーの速度、ミトコンドリアの機能、ユビキチノンの生合成、コレステロールの生合成、細胞内のATPレベル、細胞内のクレブス回路中間物のレベル、糖代謝、核酸代謝、リボソーム翻訳速度等）から推論することができる。ここで用いられる場合の、「生物学的老化」は、細胞又は生物の分子的特徴に基づく、細胞又は生物の年齢の尺度である。生物学的年齢は、日数、月数、及び年数で測定したときの、ある細胞又は生物の年齢を言う「時間的年齢」とは異なる。

【0222】

例えば無脊椎動物（例えば蠕虫又はハエ）又は脊椎動物（例えばマウスなどのげっ歯類）など、ある生物の老化の速度は、a)その細胞又は生物の寿命を評価する；(b)生物学的年齢依存的な発現パターンを有する、該細胞又は生物中の遺伝子転写産物又は遺伝子産物の存在又は豊富度を評価する；(c)例えば遺伝毒性ストレス（例えばエトポシド、紫外線照射、変異原への暴露等）又は酸化的ストレスなど、該細胞又は生物の対ストレス耐性を評価する；(d)該細胞又は生物の一つ以上の代謝パラメータを評価する；(e)該細胞の、又は、該生物中に存在する一組の細胞の、増殖能を評価する；及び(f)該細胞又は生物の肉体的外見又は挙動を評価する、のうちの一つ以上など、多種の方法により判定することができる。ある一例では、老化の速度を評価するステップは、一群の動物（例えば遺伝子的にマッチさせた一群の動物）の平均寿命を直接、測定するステップと、コントロール群の動物（例えば検査化合物を投与されなかったが、検査化合物を投与された動物群に遺伝子的にはマッチさせられている一群の動物）の平均寿命と、その結果の平均とを比較するステップとを含む。代替的には、年齢に関するパラメータを測定することにより、ある生物の老化の速度を判定することができる。年齢に関するパラメータの例には：外見、例えば年齢の視覚的兆候；一つ以上の遺伝子又はたんぱく質（例えば年齢に関する発現パターンを有する遺伝子又はたんぱく質）の発現；酸化的ストレスに対する耐性；代謝上のパラメータ（例えばたんぱく質合成もしくは分解、ユビキチノン生合成、コレステロール生合成、ATPレベル、糖代謝、核酸代謝、リボソーム翻訳速度等）；及び細胞増殖（例えば網膜細胞、骨細胞、白血球等の増殖等）がある。

【0223】

細胞の寿命を延ばし、それらをストレスから防御する作用物質は、例えば細胞を細胞死から防御するためなど、細胞死に関連するなどの慢性疾患など、例えば神経細胞死又は筋細胞死に関連する疾患など、の疾患の治療のためにも対象に投与することができる。具体的には、SIRT1がニューロンを軸索分解から防御するという事実にも基づくと(Ar

10

20

30

40

50

aki et al. (2004) Science 305:1010)、本発明を用いて、癌化学療法（例えばタキソール又はシスプラチン治療など）など、化学療法に伴う神経変性及び末梢ニューロパチーを防止又は軽減することができよう。神経変性疾患にはパーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病及び筋ジストロフィーがある。このように、当該の作用物質を神経保護薬として用いてもよい。当該の作用物質を、細胞死に見舞われる可能性のある組織又は器官に投与してもよい。

【0224】

更にこのような作用物質を、例えば脳卒中又は心筋梗塞に罹患した対象や、あるいは、脊髄損傷を被った対象など、器官又は組織への急性の損傷に苦しむ対象に投与することもできる。また作用物質を、アルコール肝を修復するためにも用いることもできる。

10

【0225】

より一般的には、ここで解説する作用物質を、カロリー制限又はその効果が有益であろう対象に投与してもよい。このような対象は、例えば脳卒中、心疾患、関節炎、高血圧など、加齢による疾患に苦しむ対象であるかも知れない。更にこれらを、例えばインシュリン耐性、あるいはⅠⅠ型糖尿病の他の前駆症状、ⅠⅠ型糖尿病又はこれらの合併症など、代謝疾患を治療するために用いてもよい。方法は、対象のインシュリン感受性を増すものでも、あるいは、対象のインシュリンレベルを下げるものでもよい。ある方法は、NAD⁺再利用経路に関与する、即ち、NAD⁺の合成及びニコチンアミドの分解に関与するたんぱく質の活性又はたんぱく質レベルを増す作用物質を薬学的に有効量、これを必要とする対象などの対象に投与するステップを含むであろう。このような治療を必要とする対象は、インシュリン耐性又はⅠⅠ型糖尿病の他の前駆症状を有する、ⅠⅠ型糖尿病を有する、あるいはこれらの状態のいずれかを発症する可能性のある、対象であろう。例えば、対象は、高脂血症、脂質生成不全、高コレステロール血症、グルコース許容値低下、高血糖レベル、X症候群の他の上昇、高血圧、アテローム性硬化症及び脂肪異常栄養症など、高い血中インシュリンレベル及び/又は関連する状態を有するなど、インシュリン耐性を有する対象であってよい。

20

【0226】

酸素欠乏症に晒された細胞でNAMPRTが上方調節されており、NAMPRT遺伝子のコピーが余分にあるとSIRT1活性が刺激されるという事実になくとも基づくと、治療できると思われる他の対象には、例えば虚血、心臓血管疾患、心筋梗塞、うっ血性心疾患などの心疾患に罹患した患者がある。治療又は防止の可能な心臓血管疾患には、心筋症又は心筋炎；例えば特発性心筋症、代謝性心筋症、アルコール性心筋症、薬物誘発性心筋症、虚血性心筋症、及び高血圧性心筋症がある。更に、ここで解説された方法を用いて治療可能又は防止可能なのは、例えば大動脈、冠状動脈、頸動脈、脳血管動脈、腎動脈、腸骨動脈、大腿動脈、及び膝窩動脈など、主要な血管のアテローム性障害（大血管疾患）である。治療又は防止の可能な他の血管疾患には、網膜の細動脈、糸球体細動脈、神経脈管、心臓の細動脈、並びに眼、腎臓、心臓、及び中枢及び末梢神経系の毛細血管床に係るものがある。更に本方法を、ある個体の血漿中のHDLレベルを増すために用いてもよい。

30

【0227】

サーチイン活性化剤で治療できると思われる更に他の障害には、冠状脈介入術後の再狭窄や、高密度及び低密度コレステロールの異常なレベルに係る障害がある。更に本方法は、インフルエンザ、疱疹又はパピロームウイルスの感染など、ウイルス感染を治療又は防止するために用いられよう。更に本作用物質は、SARS又はインフルエンザ大流行中などの、ある個体又は集団レベルに対する疾患/感染の広がりを防ぐことを支援するためにも用いられよう。

40

【0228】

SIRT1がNF-κBを脱アセチル化して調節するという事実になくとも基づくと、ここで解説した本方法は、関節炎、クローン病、炎症性腸疾患、リウマチ様関節炎、喘息、アテローム性硬化症、冠状動脈心疾患、心臓発作又は卒中後の再灌流損傷、潰瘍性大腸炎、及び進行性炎症性腸疾患（IBD）などの炎症状態を治療するために用いられよう。

50

【0229】

更にこれらを抗菌剤として用いてもよい。

【0230】

治療の可能な他の状態には、白内障、緑内障及び黄斑部変性など、眼の加齢に係るものなどの眼の障害がある。これはまた、例えばAIDS；劇症肝炎；脳の変性に係る疾患、例えばクロイツフェルトヤコブ病、色素性網膜炎及び小脳変性；再生不良性貧血などの異形成脊髄；心筋梗塞及び脳卒中などの虚血性疾患；アルコール性肝炎、B型肝炎及びC型肝炎などの肝臓疾患；変形性関節症などの関節疾患；アテローム性硬化症；脱毛症；紫外線による皮膚の損傷；扁平苔癬；皮膚の萎縮；白内障；及び移植片拒絶などの疾患の治療にも用いることができる。

10

【0231】

サーチュインが、例えばPPAR- を抑制するなどにより脂肪代謝に関与していることが示されたという事実 (Picard et al. (2004) Nature 430:921) に少なくとも基づくと、カロリー制限を模倣することに関してここで解説した方法は、例えば肥満及びそれを原因とするいずれかの状態を治療する、あるいは体重増加を減らすなどのため、脂肪動員を刺激するためにも用いることができる。代替的には、体重増加の刺激は、カロリー制限とは反対の、ここで解説する方法でも達成することができる。

【0232】

加えて、ここで解説する作用物質を、毒性物質、放射線又はいずれかの戦争化学物質への暴露からの防御又は治療のために、対象に投与してよい。例えば、ある線量の放射線を最近受けた、あるいは、受けそうな対象に当該作用物質を投与してもよい。ある実施態様では、該線量の放射線は、例えば原子力発電所、航空機の飛行、X線、CATスキャンで作業中など、職業関連又は医療法の一部として、あるいは、医療画像用の放射性線量の投与として受けるものであり；このような実施態様では、当該作用物質は予防対策の一部として投与される。別の実施態様では、前記の放射線暴露は、例えば放射性物質が関与する産業事故、テロリスト行為、又は戦争行為の結果など、不慮に被るものである。このような場合、アポトーシスや、その後の急性放射線症候群発症を阻害するために、当該作用物質は暴露後できるだけすぐに投与されるであろう。更にここで解説する作用物質を用いて、化学療法を原因とするニューロパチー、造血系の毒性、腎毒性、及び胃腸管の毒性を防止する場合の神経細胞保護など、化学療法の効果から非癌性細胞を防御することができるであろう。

20

30

【0233】

DNA修復はニコチンアミドでも阻害されるため、細胞内のニコチンアミド・レベルを下げる作用物質を用いれば、細胞内のDNA修復を促進することができる。従って、放射線及び臭化エチジウムなど、DNA損傷を惹起しかねない状態に暴露する細胞を、そのDNA損傷性因子への暴露前、暴露中、又は暴露後に、細胞内のニコチンアミド・レベルを下げよう作用物質にそれらを接触させることで、防御できよう。

【0234】

他の実施態様では、本発明の方法を酵母細胞に適用する。酵母細胞の寿命を延ばすとよい状況や、それらを特定の種類のストレスから防御するとよい状況には、ビール、ヨーグルトの製造やパンの製造など、酵母が用いられるあらゆるプロセスがある。寿命が延びた酵母を用いると、用いる酵母を減らしたり、あるいは、より長時間、酵母を活性にしたりすることができる。

40

【0235】

ここで解説された作用物質は、例えば植物の寿命、対ストレス耐性、及び対アポトーシス耐性を増すなど、植物でカロリー制限を模倣するためにも用いられよう。ある実施態様では、作用物質を植物に定期的に、あるいは、例えば旱魃、霜、又は昆虫又は真菌の外寄生などのストレス時に適用する。別の実施態様では、植物を遺伝子改変して作用物質を産生させる。別の実施態様では、摘み取り及び船積み前に植物及び果物を作用物質で処理して

50

、輸送中の損傷への耐性を高める。

【0236】

更に本作用物質を用いて、昆虫で寿命、ストレス耐性及び対アポトーシス耐性を増すことができよう。この実施態様では、例えば植物の受粉に關与する蜂及び他の昆虫などの有用な昆虫に本作用物質を適用することになるであろう。ある具体的な実施態様では、ハチミツの生産に關わる蜂に本作用物質を適用することになるであろう。

【0237】

高用量の作用物質を、発生中にサイレントになる遺伝子の調節やアポトーシスの調節に干渉することにより、殺虫剤として用いてもよい。この実施態様では、化合物が昆虫の幼虫には生物学的に取り込まれるが植物には取り込まれないように確実にする、当業で公知の方法を用いて、植物に作用物質を適用する。

10

【0238】

更に本発明は、細胞の寿命を減らす、あるいはそれをヒートショック、放射活性、浸透圧ストレス、紫外線などによるDNA損傷、及び化学療法薬などの特定のストレスに対してより感受性にする、方法を提供するものである。このような方法は、細胞の寿命を減らしたい場合にいつでも用いることができる。方法の例には、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的に NMAT-1 又は 2から成る群より選択されるたんぱく質のレベル又は活性を減らすステップがある。

【0239】

別の方法には、例えばNPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NMNAT、NNT1、NAMPRT、及び選択的には NMAT-1 又は 2のレベル又は活性を減らすなど、細胞をニコチンアミドに接触させる、あるいは、ニコチンアミド合成を刺激する酵素のレベル又は活性を増す、ニコチンアミドを阻害又は分解する酵素のレベル又は活性を下げるなどにより、細胞内のニコチンアミドのレベルを増す、及び/又は、NAD⁺/ニコチンアミドの比を減らすステップを含む。細胞の寿命を減らしたい、あるいは、特定のストレスに対してそれをより感受性にしたいような状況の例には、癌、自己免疫疾患の治療や、対象内の細胞を無くすることが好ましいようないずれか他の状況がある。本発明のニコチンアミド又は他の化合物もしくは作用物質は、癌患者の腫瘍など、望ましくない細胞を含有する区域に直接、投与することができる。更にこれらの方法を用いて、細胞を消失させたり、あるいは、疣、ほくろ及び線維腫などの非悪性腫瘍の細胞の更なる増殖を防いだりすることができる。例えば、ニコチンアミドを疣に注射することができ、あるいは代替的には、疣に塗る医薬組成物に含有させることもできる。更に本方法を用いて、化学療法薬など、腫瘍細胞の致死に依拠する作用物質に対し、それらをより感受性にすることができよう。

20

30

【0240】

細胞の寿命を減らす、あるいは、それらを特定のストレスにより感受性にする、方法は、対象に感染した酵母などの酵母に適用することができる。従って、ニコチンアミドなどの作用物質を含む組成物を、酵母感染の位置に適用することができる。

【0241】

ここで解説する通りに治療してもよい対象には、真核生物、例えばヒト、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、マウス、及びラットなどの哺乳動物など、がある。治療できそうな細胞には、例えば上述した対象由来などの真核細胞、又は植物細胞、酵母細胞、及び細菌細胞などの原核細胞がある。

40

【0242】

更にここでは対象の全身の健康を判定する方法など、診断法も提供される。ここで解説した遺伝子の発現は、絶食中の対象で、そして多様なストレスに晒された細胞で上昇しているという事実になくとも基づくと、その遺伝子発現レベルの測定は、ある対象がストレスに晒されている、又は、晒されたかどうか、あるいは、ストレスに関連する疾患、又は、ここで解説する疾患のいずれか、を発症している、又は発症する可能性があるかどうか、の指標とすることができるであろう。加えて、NAMPRTが細胞ストレスに応答して産生されるという事実になくとも基づくと、NAMPRTのレベルは癌の初期マーカと考えられる

50

。ある例示的な実施態様では、診断法は、対象由来の試料を提供するステップと、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NNT1、NAMPRT、NMNAT、NMAT-1 及び NMAT-2 のうちの一つ以上の、たんぱく質レベルなどの遺伝子発現レベルを判定するステップとを含む。コントロールと比較して、ある細胞内の遺伝子発現レベル、又は、血清中の当該たんぱく質レベルが高いことは、検査されたその対象が、例えばここで解説する疾患など、ストレス又はそれに関する疾患に晒されている、晒されたことがある、ことの指標である。コントロールは、当該診断で評価される特定の因子を上下させかねないいずれの条件下にもないと考えられる二体以上の個体から得られた平均レベルを表す数値であろう。コントロール値は、10体から又はそれ以上又は100体から又はそれ以上の個体から得られた平均値であってもよい。少なくとも約50%、2倍、3倍、5倍、10倍又はそれ以上が有意となるであろう。

10

【0243】

ある診断検定は、例えばNAMPRTなど、測定しようとするたんぱく質が可溶性の細胞外型で存在する場合には、血液又は血清などの体液試料を得るステップを含むであろう。またある診断検定は、細胞試料を得るステップと、mRNAなどの遺伝子転写産物又はたんぱく質のレベルを判定するステップとを含むであろう。細胞試料は、例えば末梢血単核細胞などの血球、皮膚細胞、又は毛嚢の細胞、頬スワブの細胞、組織生検の細胞、及び腫瘍摘出術の細胞などの試料であってよい。たんぱく質又は転写産物レベルを判定する方法は当業で公知である。たんぱく質レベルを判定する方法は、例えば抗体の使用を含むであろう。

20

【0244】

更に診断法は、例えばここで解説したものなど、特定の疾患又は障害の発生可能性の存在を判定するために用いられてもよい。加えて、ここで解説された診断法を用いて、放射線の結果など、ストレス状態に晒されたことのある、あるいは晒されている、対象を特定できよう。

【0245】

更にある診断法は、他の個体に対してストレス条件により感受性と思われる個体を特定するために用いられよう。このような診断法は、対象をストレス条件に晒すステップと、ストレス条件への暴露前及び暴露後に、この対象の特徴を評価するステップとを含むであろう。前記の特徴は、例えばNAMPRTなど、ここで解説したたんぱく質のレベル又は活性でも、あるいはNAD⁺/NADH又はニコチンアミドのレベルでもよい。

30

【0246】

NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NNT1、NAMPRT、NMNAT、NMAT-1 及び NMAT-2のうちの一つ以上のレベルが上昇していると診断された対象を、こうして、適宜治療してもよく、その後、第二の試料を得、それに対する前記診断法を行なってもよい。

【0247】

7. 医薬組成物及び方法

化合物、核酸、たんぱく質、細胞及び他の組成物は、当業で公知の方法に従って対象に投与することができる。例えば、あるたんぱく質をコードする核酸又はアンチセンス分子は、ウィルスベクタなど、上述の通りに対象に投与することができる。細胞は、シクロスポリンAなどの免疫抑制剤の投与などを伴うであろう移植片を対象に投与する方法に従って投与することができる。医薬調合の一般的原則に関しては、読者はCell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; 及び Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000を参照されたい。

40

【0248】

本方法に従って用いる医薬物質は、一種以上の生理学的に許容可能な担体又は医薬品添加物を用いて従来の態様で調合できよう。従って、ここで解説されたたんぱく質及び核酸や、ここで解説されたたんぱく質又は核酸の発現レベルを増す化合物又は作用物質、並び

50

にそれらの生理学的に許容可能な塩及び溶媒化合物は、例えば注射、吸入又は（口又は鼻腔を通じた）通気による投与、あるいは、経口、パッカル、非経口又は直腸投与に向けて調合できよう。ある実施態様では、本作用物質を、例えばパッチを用いるなど、標的細胞が存在する箇所など、局所的に投与する。

【0249】

作用物質は、全身及び局部又は局所投与を含め、多様な投与負荷に合わせて調合することができる。技術及び調合法は、概略的には、Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAに見られよう。全身投与の場合、筋肉内、静脈内、腹腔内、及び皮下を含め、注射が好ましい。注射の場合、本作用物質を、溶液、好ましくはハックス溶液又はリンガー液などの生理的に適合性ある緩衝剤に入れて、調合することができる。加えて、本作用物質を固体型で調合し、使用直前に再溶解又は懸濁させてもよい。凍結乾燥型も含まれる。

10

【0250】

経口投与の場合、本医薬組成物は、例えば錠剤、ロゼンジ、又はカプセルなど、例えば結合剤（例えばアルファ化させたとうもろこしでんぷん、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えばラクトース、微結晶セルロース又はリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク又はシリカ）；崩壊剤（例えばいもでんぷん又はでんぷんグリコール酸ナトリウム）；又は湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容可能な医薬品添加物と一緒に、従来の手段により調製される形を採っていてもよい。錠剤は、当業で公知の方法により被覆できよう。経口投与用の液体製剤は、例えば溶液、シロップ又は懸濁液などの形を採っていてもよく、あるいはこれらは、使用前に水又は他の適した賦形剤で構築される乾燥製品として提供されてもよい。このような液体製剤は、例えば懸濁剤（例えばソルビトール・シロップ、セルロース誘導体又は水和化食用油脂）；乳濁剤（例えばレシチン又はアラビアゴム）；非水性の賦形剤（例えばアチオンド（原語：atond）油、油性エステル、エチルアルコール又は精留植物油）；及び保存剤（例えばメチル又はプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸）などの薬学的に許容可能な添加剤と一緒に、従来の手段により調製できよう。更に本製剤は、適宜、緩衝塩、着香料、着色料及び甘味料を含んでもよい。経口投与用の製剤は、適宜、活性化合物の放出を制御できるように調合してもよい。

20

30

【0251】

酸化して、特に液体又は半液体型で対生物活性を失うかも知れないような作用物質は、窒素雰囲気中で調製するか、あるいは、酸素を除外する種類のカプセル及び／又はホイール・パッケージ（例えばCapsugelTM）内に密封するとよい。

【0252】

吸入による投与の場合、本作用物質を、便利なように、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適したガスなど、適した推進剤を用いて、加圧されたバック又はネブライザからエロゾル噴霧される形で送達してもよい。加圧されたエロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するバルブを設けることにより、決定できよう。吸入器又は通気装置で用いられる、ゼラチンなどのカプセル及びカートリッジを、本作用物質と、ラクトース又はでんぷんなどの適した粉末基剤との混合粉末を含有するように、調合してもよい。

40

【0253】

例えば大量注射又は継続輸注など、注射による非経口投与用に本作用物質を調合してもよい。注射用の調合物は、保存剤を加えて、アンプル又は複数回分用の容器などに入れて、単位剤形で提供されてもよい。本作用物質は、油性又は水性の賦形剤に入れた懸濁液、溶液又は乳液などの形を採っていてもよく、また、懸濁剤、安定化剤及び／又は分散剤などの調合用薬剤を含有していてもよい。選択的には、活性成分は、使用前に無菌の無発熱源水などの適した賦形剤で構築できる粉末形であってもよい。

【0254】

50

更に本作用物質を、ココアバター又は他のグリセリドなどの従来の座薬用基剤を含有するなど、座薬又は直腸浣腸剤などの直腸用組成物中に調合してもよい。

【0255】

前述した調合物に加え、本作用物質をデポー製剤として調合してもよい。このような長時間作用性の調合物は、（例えば皮下又は筋肉内など）移植や、又は筋肉内注射などによって投与できよう。従って、例えば本作用物質は、適したポリマー製又は疎水性の材料（例えば許容可能な油に入れた乳濁液として）又はイオン交換樹脂で、あるいは、節約型可溶性塩などの節約型可溶性誘導体として、調合できよう。制御放出調合物には、経皮用パッチなどのパッチもある。パッチは、固有の組合せの波形の超音波を用いて、通常は効果的には経皮送達させられない薬物分子を皮膚に導入する音波アプリケータと一緒に用いてもよい。

10

【0256】

（美容用製剤を含む）医薬組成物は、重量で約0.00001 乃至 100%、例えば0.001 乃至 10% 又は0.1% 乃至 5% の、ここで解説された一種以上の作用物質を含んでいてもよい。

【0257】

ある実施態様では、局所的薬物投与に概ね向き、当業で公知のいずれかのこのような物質を含む局所用担体を含有する局所用調合物に、ここで解説された作用物質を取り入れる。局所用担体は、例えば軟膏、ローション、クリーム、マイクロ乳液、ゲル、油、溶液等の所望の形で本組成物が提供されるように選択され、また天然で生じるか合成由来のいずれかの物質から成っていてもよい。選択される担体が、当該局所用調合物の活性な作用物質又は他の成分に悪影響を与えないことが好ましい。ここで用いられる適した局所用担体の例には、水、アルコール、及び他の無毒性有機溶媒、グリセリン、鉱物油、シリコーン、ワセリン、ラノリン、脂肪酸、植物油、パラベン、ろう等がある。

20

【0258】

調合物は無色、無臭の軟膏、ローション、クリーム、マイクロ乳液及びゲルであってよい。

【0259】

作用物質を軟膏に取り入れてもよく、この軟膏は一般的には半固体の製剤であり、典型的には石油又は他の石油誘導体をベースとする。用いるべき具体的な軟膏基剤は、当業者であれば明らかであろうが、最適な薬物送達に役立ち、そして好ましくは、例えば軟化性などの他の所望の特徴も提供するようなものである。他の担体又は賦形剤と同様に、軟膏基剤は、不活性で安定、非刺激性かつ非感作性でなくてはならない。前記の項で引用されたRemington 'sで説明されているように、軟膏基剤は四つのクラスに分類できよう：油性の基剤；乳化性の基剤；乳液基剤；及び水溶性の基剤。油性の軟膏基剤には、例えば植物油、動物由来の脂肪；及び石油由来の半固体炭化水素、がある。吸収性の軟膏基剤としても知られ、水をほとんど含まないか、又は全く含まない乳化性の軟膏基剤には、例えばヒドロキシステアリンスルフェート、無水ラノリン及び親水性ワセリンがある。乳液の軟膏基剤は油中水（W/O）乳液又は水中油（O/W）乳液のいずれかであり、例えばセチルアルコール、グリセリルモノステアレート、ラノリン及びステアリン酸がある。水溶性の軟膏基剤の例は、多様な分子量のポリエチレングリコール（PEG）から調製されるものである。更なる情報についてはやはり上記のRemington'sを参照されたい。

30

40

【0260】

作用物質をローションに取り入れてもよいが、このローションは一般的には摩擦なしで皮膚表面に塗られる製剤であり、典型的には、活性な作用物質を含む固体粒子が水中又はアルコール基剤中に存在する液体又は半液体の製剤である。ローションは通常、固体を懸濁させた懸濁液であり、水中油型の液体油性乳液を含んでいてもよい。ローションは、流動性の高い組成物の適用が容易になるため、大きな体表面積を治療するためには好適な調合物である。一般的には、ローション中の不溶性の物質は微細に分割されている必要がある。ローションは典型的には、分散をより良好に行わせ、例えばメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等、活性な作用物質を皮膚と接触した状態に位置決め

50

して保持するために有用な化合物を提供するために、懸濁剤を含有するであろう。本方法との関連で用いられるローション調合物の一例は、Beiersdorf社（コネチカット州ノーウォーク）から商標AquaphorTMで得られるものなど、親水性ワセリンと混合されたプロピレングリコールを含有するものである。

【0261】

一般的には水中油又は油中水のいずれかである粘性の液体又は半固体の乳液であるクリームに作用物質を取り入れてもよい。クリームの基剤は水で洗い流すことができ、油相、乳化剤及び水相を含有する。この油相は一般的にはワセリンと、セチルもしくはステアリルアルコールなどの脂肪アルコールとから成り、水相は通常、必ずしもではないが、体積の点で油相を超え、一般的には保湿剤を含有する。クリーム調合物中の乳化剤は、上記の Remington 'sで説明されている通りに、一般的には非イオン性、陰イオン性、陽イオン性又は両向性の界面活性剤である。

10

【0262】

一般的には熱力学的に安定であり、界面活性剤分子の界面膜により安定化させた、油及び水などの二つの不混和性の液体の等方的に透明な分散液であるマイクロ乳濁液に作用物質を取り入れてもよい(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (New York: Marcel Dekker,

1992), volume 9)。マイクロ乳濁液の調製に際しては、界面活性剤（乳化剤）、共界面活性剤（共乳化剤）、油相及び水相が必要である。適した界面活性剤には、例えばクリームの調製時に典型的に用いられる乳化剤など、乳液の調製に有用ないずれかの界面活性剤がある。共界面活性剤（又は「共乳化剤」）は、一般的には、ポリグリセロール誘導体、グリセロール誘導体及び脂肪アルコールから成る群より選択される。好適な乳化剤／共乳化剤の組み合わせは、必ずしもではないが一般的に、グリセリルモノステアレート及びポリオキシエチレンステアレート；ポリエチレングリコール及びエチレングリコールバルミトステアレート；並びにカプリル酸及びカプリン酸トリグリセリド及びオレオイルマクロゴルグリセリドから成る群より選択される。水相は、水だけでなく、典型的には緩衝剤、グルコース、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、好ましくは低分子量ポリエチレングリコール（例えばPEG 300及びPEG 400）、及び／又はグリセロール等を含むが、油相は一般的には、例えば脂肪酸エステル、加工植物油、シリコーン油、モノ-、ジ-及びトリグリセリドの混合物、PEGのモノ-及びジ-エステル（例えばオレオイルマクロゴルグリセリド）等を含むであろう。

20

30

【0263】

一般的には低無機粒子（二相系）又は高有機分子のいずれかが担体液体（単一相のゲル）全体に概ね均一に分散したもので成る懸濁液から成る半固体系であるゲル調合物に、作用物質を取り入れてもよい。単一相ゲルは、例えば活性な作用物質、担体液体、及び、適したゲル化剤、例えばトラガカント（2乃至5%）、アルギン酸ナトリウム（2乃至10%）、ゼラチン（2乃至15%）メチルセルロース（3乃至5%）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（2乃至5%）、カルボマー（0.3乃至5%）又はポリビニルアルコール（10乃至20%）を一緒にして配合し、特徴的な半固体の生成物が生ずるまで混合することにより、作製することができる。他の適したゲル化剤には、メチルヒドロキシセルロース、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン、ヒドロキシエチルセルロース及びゼラチンがある。ゲルは通常、水性の担体液体を用いるが、アルコール及び油類も、担体液体として用いることができる。

40

【0264】

当業者に公知の多様な添加剤を、局所用調合物などの調合物に含めてもよい。添加剤の例には、限定はしないが、可溶化剤、皮膚浸透促進剤、乳白剤、保存剤（例えば抗酸化剤）、ゲル化剤、緩衝剤、界面活性剤（特に非イオン性及び両向性界面活性剤）、乳化剤、軟化剤、増粘剤、安定化剤、保湿剤、着色剤、香料等がある。乳化剤、軟化剤及び保存剤と共に、可溶化剤及び／又は皮膚浸透促進剤の含有が特に好ましい。最適な局所用調合物は、ほぼ：2重量%乃至60重量%、好ましくは2重量%乃至50重量%の可溶化剤及び

50

／又は皮膚浸透促進剤；2重量%乃至50重量%、好ましくは2重量%乃至20重量%の乳化剤；2重量%乃至20重量%の軟化剤；及び0.01乃至0.2重量%の保存剤を、この調合物の残りを構成する活性な作用物質及び担体（例えば水）と一緒に含む。

【0265】

皮膚浸透促進剤は、治療的レベルの活性な作用物質が、損傷のない皮膚の妥当な面積部分を通る通過を促すのに役立つ。適した促進剤は当業で公知であるが、その中には、例えば：メタノール、エタノール及び2-プロパノールなどの低級アルカノール；ジメチルスルホキシド（DMSO）、デシルメチルスルホキシド（C₁₀MSO）及びテトラデシルメチルスルホキシドなどのアルキルメチルスルホキシド；2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン及びN-(-ヒドロキシエチル)ピロリドンなどのピロリドン；ウレア；N,N-ジエチル-m-トルアミド；C₂-C₆アルカンジオール；ジメチルホルムアミド（DMF）、N,N-ジメチルアセトアミド（DMA）及びテトラヒドロフルフリルアルコールなどのその他の溶媒；及び1-置換アザシクロヘプタン-2-オン、特に1-n-ドデシルシクロアザシクロヘプタン-2-オン（ラウロカプラム；商標名

10

Azone^{RTM}でヴァーモント州リッチモンドのWhitby Research社から入手可能）、がある。

【0266】

可溶化剤の例には、限定はしないが、以下のものがある：ジエチレングリコールモノエチルエーテル（エトキシジグリコール、Transcutol^{RTM}）として市販のものを入手可能）及びジエチレングリコールモノエチルエーテルオレエート（Softcutol^{RTM}として市販のものを入手可能）などの親水性のエーテル；ポリオキシ35ひまし油、ポリオキシ40硬化ひまし油等のポリエチレンひまし油誘導体；ポリエチレングリコール、特に、PEG 300及びPEG 400などの低分子量ポリエチレングリコール、並びに、PEG-8 カプリル酸/カプリン酸グリセリド（Labrasol^{RTM}として市販のものを入手可能）などのポリエチレングリコール誘導体；DMSOなどのアルキルメチルスルホキシド；2-ピロリドン及びN-メチル-2-ピロリドンなどのピロリドン；並びにDMA。数多くの可溶化剤を、吸収促進剤としても作用させることができる。単一の可溶化剤を本調合物に取り入れてもよく、あるいは、可溶化剤の混合物をそこに取り入れてもよい。

20

【0267】

適した乳化剤及び共乳化剤には、限定はしないが、マイクロ乳液調合物に関して解説された乳化剤及び共乳化剤がある。乳化剤には、例えば、プロピレングリコール、グリセロール、イソプロピルミリスレート、ポリプロピレングリコール-2（PPG-2）ミリスチルエーテルプロピオネート等がある。

30

【0268】

限定はしないが、アントラニレート、ベンゾフェノン（特にベンゾフェノン-3）、カンフル誘導体、桂皮酸（例えばオクチルメトキシ桂皮酸）、ジベンゾイルメタン（例えばブチルメトキシジベンゾイルメタン）、p-アミノ安息香酸（PABA）及びこれらの誘導体、及びサリチル酸塩（例えばオクチルサリチレート）を含め、例えば抗炎症剤、鎮痛薬、抗微生物剤、抗カビ剤、抗生物質、ビタミン、抗酸化剤、及び、サンスクリーン調合物に通常見られる日光遮断剤など、他の活性な作用物質を処方を含めてもよい。

【0269】

いくつかの局所用調合物においては、活性な作用物質は、当該調合物のほぼ0.25重量%乃至75重量%の範囲、好ましくは当該調合物のほぼ0.25重量%乃至30重量%の範囲、より好ましくは当該調合物のほぼ0.5重量%乃至15重量%の範囲、そして最も好ましくは当該調合物のほぼ1.0重量%乃至10重量%の範囲の量、存在する。

40

【0270】

局所用皮膚治療用組成物は、その粘性や、消費者が意図する用途に合うような適した容器に梱包することができる。例えばローション又はクリームは、ビン又はロール・ボール・アプリケーションャ、あるいは、推進剤で駆動されるエアゾル装置又は指で操作するのに適したポンプを備えた容器に、梱包することができる。組成物がクリームである場合は、

50

それを単に変形不能のピン、又は、チューブ又はフタ付きのピンなどの絞り出しピンに保存することができる。更に本組成物を、米国特許第5,063,507号に解説されたものなどのカプセルに容れてもよい。従って、ここで定義する通りに美容上許容可能な組成物を含有する密閉された容器も提供される。

【0271】

ある代替的な実施態様では、経口又は非経口投与用の医薬調合物が提供されるが、この場合、当該調合物に、上述したような活性化性化合物を含有するマイクロ乳液を含めてもよいが、経口又は非経口による薬物投与に特に適した代替的な薬学的に許容可能な担体、賦形剤、添加剤等を含めてもよい。選択的には、作用物質を含有するマイクロ乳液を、改変を行うことなく概ね上に記載した通りに経口又は非経口投与してもよい。

10

【0272】

作用物質の投与の後に、例えばここで解説した遺伝子のたんぱく質又は転写産物レベル、あるいは、NAD⁺、NADH 又はニコチンアミドのレベルを測定するなど、対象においてある一つの因子を測定してもよい。ある例示的な実施態様では、例えば生検を得るなどして、対象への作用物質投与後に対象から細胞を得、生検中の該因子を判定する。代替的には、血漿中生物マーカーなどの生物マーカーを追跡してもよい。細胞は対象のいずれの細胞であってもよいが、作用物質を局所投与する場合には、当該細胞は、投与部位の近位に位置する細胞であることが好ましい。

【0273】

観察してもよい他の因子には、老化の徴候、体重、肥満度、血糖レベル、血中脂質レベル、及び、ここで解説する疾患又は状態を観察するために測定してもよいいずれか他の因子、がある。

20

【0274】

8. キット

更にここでは、老化、アポトーシスを調節したり、ここで解説するものなどの疾患を治療したりするキットを含め、治療用のキットのなどのキットも提供される。あるキットは、ここで解説された一種以上の作用物質と、そして選択的には細胞を本作用物質に接触させるための器具とを含むであろう。器具には、シリンジ、ステント、及び、作用物質を対象に導入したり、あるいは、それを対象の皮膚に適用したりするための他の器具が含まれる。

30

【0275】

更に、あるキットは、組織試料中などのたんぱく質又は転写産物レベルなど、上記のものなどの因子を測定する成分も含むであろう。

【0276】

他のキットには、老化関連疾患、体重増加、肥満、インシュリン耐性、糖尿病、癌、これらの前駆症状又はこれらの二次状態を有する、又は発症する可能性を診断するためのキットがある。あるキットは、NPT1、PNC1、NMA1、NMA2、NNMT、NNT1、NAMPRT、NMNAT、NMA T-1 及びNMAT-2 の活性又は発現レベル、あるいはNAD⁺、NADH、ニコチンアミド及び / 又は、NAD⁺ 再利用経路中の他の中間化合物のレベルを測定するための作用物質を含むであろう。

40

【0277】

スクリーニング検定のためのキットも提供される。キットの例は、ここで解説したたんぱく質、又は、その生物学的活性部分、あるいはこのようなものを含む細胞又は細胞抽出物など、スクリーニング検定を行なうための一種以上の作用物質を含むものである。これらのキットのいずれも、使用に関する指示も含むであろう。

【0278】

更に本発明を以下の実施例で描出することとするが、以下の実施例はいずれの態様でも限定的なものと捉えられてはならない。(本出願全体を通じて引用された参考文献、発行済み特許、公開済み特許出願及びGenBank受託番号を含む)全参考文献の内容を、引用をもってここに援用することを明示しておく。

50

【 0 2 7 9 】

本発明の実施にあたっては、他に明示しない限り、当業者に公知の、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技術を利用することになるであろう。このような技術は文献に十二分に解説されている。例えばMolecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照されたい。

10

20

【 0 2 8 0 】

実施例

実施例 1 : 核内NAD⁺再利用経路を操作して老化を遅らせる

栄養物質を枯渇させた酵母は、NAD⁺依存的ヒストンデアセチラーゼSir2pの活性を必要とする著しい寿命の延びを示す。ここで我々は、NAD⁺再利用経路にとって重要なニコチネートホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするNPT1の量を増すと、Sir依存的サイレンシングが増加し、そのrDNA遺伝子座が安定化し、酵母複製寿命が最高60%、延びることを示す。NPT1及びSIR2は両者とも、ヒートショックに対する耐性をもたらすことから、これらの遺伝子は、細胞生存を促進する上でより一般的な態様で作用することが実証される。我々は、Npt1と、以前には特徴付けられていなかった再利用経路酵素Nma2が両者とも核内で濃縮されていることを示し、著しい量のNAD⁺がこのオルガネラで再生されることを示唆する。再利用経路遺伝子PNC1、NMA1 及び NMA2 のコピーが付加的にあるとテロメア及びrDNAサイレンシングが増加することから、複数の段階がこの経路の速度に影響することが示唆される。SIR2依存的プロセスはNPT1の添加により亢進するが、定常状態NAD⁺レベル及び NAD⁺/NADH 比は変わらないままである。この発見は、酵母寿命の延びは、定常状態レベルの単純な増加ではなくSir2にとってのNAD⁺の利用能の増加により促進されているのではないかということを示唆するものである。我々は、NAD⁺再利用経路を通るフラックスの増加がSir2依存的な寿命の延びを担っているというモデルを提案する。

30

40

【 0 2 8 1 】

実験の手法

プラスミド及び株 - この研究で用いた株を表2に挙げる。W303AR5 sir3::URA3 (16)、W303AR5 sir4::HIS3、W303AR5 sir2::TRP1 及び PSY316AT は(41)に解説されている。PSY316AT 中のSIR2の削除を Scal/PvuII linearized pC369 (41)を用いて行なった。JS209、JS241、JS237 及び JS218 はJ. Smith (42)からの提供である。NPT1のコーディング領域と上流配列の1.1kbを PCR (43) で増幅し、2.4 kb の産物断片を pRS306 ベースのベクタ pSP400に NotI 及び SacI (L. Guarente氏、M.I.T.からの提供)間と、2µベースのベクタ pDB20 (44) 中にサブクローニングしてそれぞれ pSPNPT1及びpDBNPT1 を作製した。

50

【 0 2 8 2 】

【表 2】

表 2. この研究で用いられた株。

Strain	遺伝子型
W303AR5	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>
YDS878	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir2-TRP1</i>
YDS924	W303AR5 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir3-HIS3</i>
YDS882	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir4-HIS3</i>
YDS1503	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>URA3/NPT1</i>
YDS1504	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir2-TRP1</i> , <i>URA3/NPT1</i>
YDS1505	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir3-HIS3</i> , <i>URA3/NPT1</i>
YDS1506	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir4-HIS3</i> , <i>URA3/NPT1</i>
YDS1496	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , pDBNPT1
YDS1494	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir2-TRP1</i> , pDBNPT1
YDS1587	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir3-HIS3</i> , pDBNPT1
YDS1495	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir4-HIS3</i> , pDBNPT1
YDS1572	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>LEU2/SIR2</i>
YDS1561	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>URA3/NPT1</i> , <i>LEU2/SIR2</i>
YDS1595	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RAD5</i>
YDS1596	W303 <i>MATa</i> , <i>ADE2</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RAD5</i>
YDS1568	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>URA3</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>
YDS1563	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>LEU2</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>URA3</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>
YDS1588	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>pSPYGL037</i>
YDS1589	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>pSPYGR010</i>
YDS1590	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>p306YLR328</i>
YDS1614	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>p306YHR074</i>
YDS1531	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>NPT1-HA</i>

10

20

30

W303cdc25-10	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10	
YDS1537	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10, NPT1-HA	
YDS1611	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NPT1-GFP	
YDS1625	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA1-GFP	
YDS1624	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA2-GFP	
PSY316AT	MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R	
YDS1594	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, sir2-TRP1	10
YDS1544	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, URA3/NPT1	
YDS1548	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, (4x) URA3/NPT1	
YDS1527	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pDBNPT1	
YDS1577	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, (4x) URA3/NPT1, LEU2/SIR2	
YDS1573	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, sir2::HIS3, URA3/NPT1	
YDS1591	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pSPYGL037	
YDS1592	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pSPYGR010	20
YDS1593	PSY316 MATb, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, p306YLR328	
JS209	MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167	
JS241	JS209 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, MET15	
JS237	JS209 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15	
JS218	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, sir2::HIS3	
YDS1583	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, LEU2/SIR2	
YDS1522	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, p2μSIR2	
YDS1580	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, npt1Δ::kan ^r	30
YDS1581	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET1, URA3/NPT1	
YDS1493	JS237 MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, pDBNPT1	

【 0 2 8 3 】

NPT1の付加的なコピーを URA3 遺伝子座に、StuIで直線化したプラスミドpSPNPT1を用いて組み込んだ。まず組込み体を PCRで識別した。次に NPT1 コピー数を、サザンブロットで NPT1 及び ACT1 DNA をプローブすることで判定した NPT1 バンドの濃度をACT1バンドに

ImageQuant ソフトウェア

(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)を用いて比較した。SIR2 の付加的なコピーを持つ株は、XcmIで直線化したプラスミド p306SIR2 又は p305SIR2 (17) を組み込むことで作製された。高コピーの

SIR2を2μベースのプラスミドであるp2μSIR2 (L. Pillus氏、UCSDより提供)に導入した。それぞれStuI 及び XcmIで直線化したpRS306 又は pRS305 (45) を組み込むことで、W303AR5 を形質転換させて Ura⁺ 及びLeu⁺ 原栄養性にした。ADE2 消失事象を起こしたコロニーを選抜することにより YDS1595 をW303AR5 から作製した。YDS1595 をStuI切断pRS402 (ADE2 遺伝子を持つ) で形質転換させて YDS1596を作製した。W303cdc25-10 はS. Lin氏 (M.I.T) (19)からの提供だった。解説された通りに (46) 野生型遺伝子をkan^r マーカで置換することにより、NPT1 欠失株である YDS1580を作製した。PNC1/YGL037

40

50

のコーディング領域及び650bp上流領域を PCRでゲノムDNAから増幅した。その1350 bp の SacI/NotI

断片をベクタ pSR400 中にクローニングして pSPYGL037を作製した。NMA2/YGR010のコーディング領域及び500bp上流をPCRでゲノム・テンプレートから増幅し、1730 bp のSacI/NotI断片をpSP400 中にクローニングして、pSPYGR010を作製した。NMA1/YLR328

のコーディング領域及び450

bp 上流をゲノム・テンプレートからPCR により増幅し、その2150 bp 断片をpRS306 中にクローニングして p306YLR328を作製した。QNS1/YHR074 のコーディング領域及び600bp上流をPCRで増幅し、2.8 kb のSacI/NotI断片を pSP400 中にクローニングして pSPYHR074を作製した。PNC1/YGL037、NMA1/YLR328、 NMA2/YGR010、及び QNS1/YHR074

10

の付加的なコピーを

W303AR5 及びPSY316AT のURA3 遺伝子座に形質転換により組み込んだ。増幅されたDNA はすべて、変異がないことを配列決定により確認されている。

【0284】

HAタグ付きNPT1 を、tag-kan^r 組込み法 (47) を株 W303AR5 及び W303cdc25-10で用いて作製した (19)。緑色蛍光たんぱく質 (GFP) カセットをNpt1、Nma1 及びNma2のカリボキシ末端に解説された通りに導入した(48)。タグ付きのこのたんぱく質の官能性を rDNAサイレンシングを検定することにより確認した。

【0285】

寿命の判定 - 複製寿命の判定を記載された通りに行なった (16)。他に記載しない限り、1回の実験当たり最小40個の細胞を用いて、細胞はYPD培地 (1% 酵母抽出物、2% バクトペプトン、2% グルコース w/v) で成長させた。各実験は個別に少なくとも2回、行なわれた。寿命の統計上有意な差はウィルコキソン順位和検定を用いて判定された。信頼度が95%より高いときに、差を「異なる」と述べている。

20

【0286】

mRNA 及びたんぱく質の判定 - ノーザン及びウェスタン・プロットは標準的な技術を用いて行なわれた。NPT1 転写産物はNPT1 遺伝子の完全解放読み取り枠から得られたプローブを用いて検出された。ACT1 mRNA は完全長 ACT1プローブ (G. Fink氏から提供、M.I.T)を用いて検出された。HA エピトープはモノクローナル抗体HA.11 (CRP社製、カリフォルニア州リッチモンド)を用いて検出された。アクチンはモノクローナル抗体 MAB1501R (Chemicon社製、カリフォルニア州テメキュラ)を用いて検出された。

30

【0287】

酵母検定及びGFP 局在化 - 他に明示しない限り、酵母株は30 で成長させた。リボゾームDNA遺伝子座でのサイレンシングの程度は2つの検定を用いて判定された。ADE2サイレンシング検定については、細胞を合成完全(SC)培地(1.67% 酵母窒素ベース、2% グルコース、40 mg/l のヒスチジン、ウリジン、トリプトファン、アデニン及びロイシン)で3日間、予め成長させた。細胞をSD 培地に再懸濁させ、リン酸緩衝生理食塩水で10倍に連続希釈し、アデニンを欠くSC培地上にスポットした。MET15 サイレンシング検定はPb²⁺含有プレート上で前に解説された通りに行なわれた (42)。テロメア・サイレンシングは 0.7 mg/l アデニンを含有するSC培地上で検定された。細胞を3日間、成長させ、4 で3日間、置いて着色を増強した。ヒートショック検定は基本的に解説された通りに行なわれた (14)。限られたヒスチジン(20 mg/ml)を加えたSC完全培地上で株を一晩、成長させ、1x10⁵ cells/ml になるまで3 ml の同じ培地で希釈し、5日間、成長させた。培養物を10倍に呼吸済み培地で希釈し、55 で1時間、インキュベートし、SCプレート上にスポットした。リボゾームのDNA組換え速度は前に解説された通りに判定された (49)。少なくとも 10,000個のコロニーを各株について調べ、各実験は三重にして行なわれた。

40

【0288】

NAD⁺ 及びNADH の判定は、他所で解説された通りに測定された (50)。GFPたんぱく質発現細胞を対数期中期まで YPD培地又はYPD 低グルコース (0.5% w/v) で成長させた後、20

50

μM のHoechst 33342 DNA 染料 (Sigma社製) を含有するPBS中で5分間、インキュベートした。画像をニコン社製E600の蛍光顕微鏡で10 \times の倍率で取り込み、フォトショップ 6.0 ソフトウェアを用いて解析した。

【0289】

結果

NPT1の量増加は寿命を増すが、定常状態 NAD^+ レベルは増さない - SIR2 は酵母では寿命の制限成分であり、触媒作用には NAD^+ を要する。E. coliでの研究で、PncBが、 NAD^+ を再循環させる再利用経路中の速度制限ステップを触媒することが示されている (35,37,38)。我々は、酵母 pncB ホモログである NPT1のコピーが付加的にあると、Sir2 に対する NAD^+ 産生が増えるかどうか、ひいては酵母寿命が延びるかどうかを疑問に思った。NPT1 をURA3 遺伝子座にその天然プロモータ制御下で組み込んだ。次に、NPT1の1つ又は4つのタンデム・コピーを持つ株をサザン・プロット法で識別した。我々はその結果の遺伝子型をそれぞれ2xNPT1 及び5xNPT1 と言及する。

10

【0290】

複製寿命検定に向けて、細胞を少なくとも2日間、新鮮な酵母抽出物/ペプトン/グルコース (YPD) 培地上で成長させて、これらが検定前のカロリー制限条件から確実に回復しているようにした。その後、以前には萌芽のなかった母細胞から出まれた娘細胞を、マイクロ操作で取り出し、計数した。図1Aに示すように、2xNPT1 株は野生型株よりも平均して最高40%、長く生き、そして5xNPT1 株は驚くべきことに最高60%長く、生きた。NPT1で誘導された寿命の延びは、sir2 欠失で完全に損なわれ、SIR2 のコピーが付加的にあってもあまり促進されなかった (図1B) ことから、NPT1 により提供される寿命の延びはSir2により媒介されていることが示された。

20

【0291】

最近、低グルコース培地 (0.5% w/v) で成長させた野生型細胞が、標準(2%) グルコース培地で成長させたものよりも著しく長い平均寿命を有することが示された (19,32)。図1Cに示すように、低グルコース培地では、5xNPT1 株の寿命は野生型株よりもさほど長くなかった。NPT1 及び低グルコースの効果が相加的でなかったという事実は、2つの措置が同じ経路を通じて作用することを示唆している。

【0292】

生化学研究ではSir2には NAD^+ がコファクタとして必要であることが示されている。このことから、複製寿命は NAD^+ レベルの増加により延びるのではないかという仮説が導かれた。この考えと合致して、 NAD^+ レベルは年老いた細胞で著しく増加していることが示されており、これはおそらくは老化に対する防御としてか、あるいは、代謝活性低下の結果としてであろう

30

(50)。今日までのところ、いずれの長命の株においても NAD^+ の細胞内レベルは報告されていない。我々は 2xNPT1 株における定常状態 NAD^+ レベル及び NAD^+/NADH 比が野生型とは大きく異ならなかったことを見出した (表1)。また我々は Dsir2 及び 2xNPT1 Dsir2 株を調べたが、やはり、野生型とは何の違いも見出せず、 NAD^+ レベルの増加を検出できなかったことはSir2活性が原因ではないことが示唆された。

40

【0293】

【表 1】

表 1. 多様な長命及び短命株の定常状態 NAD⁺ 及び NADH レベル。

遺伝子型	NAD ⁺	NADH	NAD ⁺ /NADH	ATP
	(amol/pg タンパク質) ¹	(amol/pg タンパク質) ¹	比	(amol/pg タンパク質) ¹
1xNPT1 (野生型)	23.7 (3.2)	9.3 (0.8)	2.8 (0.5)	15.5 (3)
2xNPT1	21.9 (2.0)	6.0 (0.6)	3.3 (0.3)	7.6 (1.6)
2xNPT1 sir2::TRP1	22.5 (1.6)	7.0 (0.3)	2.4 (0.9)	5.3 (1.1)
sir2::TRP1	23.6 (1.2)	7.0 (0.6)	2.8 (1.2)	7.9 (1.9)

¹ 5 つの独立した実験の平均 (s.e.)

10

【0294】

NPT1 及び SIR2 はヒートショックに対する耐性は高めるが、他のストレスに対する耐性は高めない - C. エレガンス及びドクロソフィラインシュリン/IGF-1 経路の成分に変異があると、動物はコントロールの最高 2 倍まで長生きする

(5)。C. エレガンスでは、この長寿はストレス耐性と結び付いている

(4)。対照的に、ドクロソフィラでホモ接合型になると寿命を最高 50 % 延ばす

chico 変異があっても、ヒートショックに対しても、又は酸化的ストレスに対しても防御が起きない

(51)。C. エレガンスにおける sir2.1 による寿命の延長とストレス耐性との間の関係は調べられていないが、酵母では Sir2/3/4 複合体がこのような応答に関与しているとの証拠がある。酵母

sir4-42 変異は複製寿命を延ばすだけでなく、飢餓及びヒートショックへの耐性も高める (52)。これにより、SIR2 長寿経路はストレス体制にも影響するのではないかという可能性が浮かび上がる。

【0295】

これを追求するために、我々は、NPT1 及び SIR2 の余分がコピーされるとヒートショック、飢餓、及びメチルメタンスルホネート (MMS) 又はパラコートへの暴露を含め、多種のストレスへの耐性がもたらされるかどうかを調べた。MMS は DNA 損傷物質であり、多種の DNA 病変を引き起こすが、他方パラコートは反応性酸素種を生じさせることにより酸化的ストレスを誘導する。NPT1、SIR2 のいずれか又は両者のコピーが付加的であっても、パラコート又は MMS に対する耐性が提供されず、またこれらは静止期で生存する能力を亢進することもなかった。

【0296】

ヒートショック耐性を検定するために、NPT1 又は SIR2 の付加的なコピーを持つ株を静止期まで SC 培地中で成長させ、55 で 1 時間、ヒートショックを与えた後、10 倍連続希釈液にして SC プレート上にスポットした。図 2 A に示すように、NPT1 又は SIR2 のコピーを付加的に一個持つ株は、他の同質遺伝子型の野生型コントロール株よりもヒートショックに対して著しく耐性であった。NPT1 及び SIR2 の相加的な効果は見たところなく、これらの遺伝子が同じ経路で作用することと合致した。この表現型のより定量的な測定値を提供するために、株にヒートショックを 1 時間、与え、コロニー一個ずつにしてプレートし、24 時間後のコロニー数を、未処理の試料のパーセンテージとして採点した。図 2 B に示すように、NPT1 及び SIR2 又は両者の付加的なコピーがあると、我々の先の発見と合致して、野生型よりも最高 8 倍、長い生存が提供された。

【0297】

付加的な NPT1 があるとサイレンシング及び rDNA 安定性が増す - 我々は、付加的な NPT1 がもたらす SIR2 依存的寿命伸長の分子基盤を判定したいと望んだ。簡単なモデルでは、

20

30

40

50

NPT1の量が増すとNAD⁺ 再利用経路が刺激され、ひいてはSir2活性が増すのではないかと予測される。従って我々は、NPT1 の付加的なコピーがrDNA遺伝子座でのサイレンシング及び安定性の SIR2依存的プロセスに及ぼす効果を調べた。

【 0 2 9 8 】

NPT1 がrDNA サイレンシングに及ぼす効果を判定するために、我々は ADE2 又はMET15 マーカのいずれかをrDNA 遺伝子座に組み込ませた株を用いた (RDN1)。我々は2つのマーカ遺伝子を用いて我々が観察した効果が単にアデニン又はメチオニンの生合成変化を原因とするものでないことを確認した。 ADE2 のサイレンシングの結果、アデニンを欠く培地上では細胞の成長が鈍化し、アデニン量の限られたプレート上では赤色の色素が蓄積する。MET15 がサイレントになると、Pb²⁺含有培地上で茶色の色素が産生される。SIR2 の付加的なコピーを持つ株が比較のために含まれた。ADE2検定 (図 3 A、アデニン上の成長をアデニン無しの場合の成長と比較する) 及び MET15 検定 (図 3 B) では、2xNPT1 株は野生型よりも高レベルのrDNA サイレンシングを示した。NPT1 の付加的なコピーを2x SIR2

10

株に導入してもサイレンシングは更には増加しなかったことから、やはり、これら 2 つの遺伝子が同じ経路にあることと合致した。高コピーの2μベースのプラスミド上にSIR2 及び NPT1を持つ株も、rDNA サイレンシング・レベルの増加を示した (図 3 B 及び C)。NPT1 のコピーが付加的にあると sir3 及び sir4 ヌル株でもサイレンシングが増加した (図 3 C)。高コピー

NPT1 は、sir3 株ではrDNAサイレンシングに破壊的な効果を有していたが、他方、この効果は sir4 株では観察されなかった。これは、sir4 変異体はSir2 をrDNAに再局在化させるという事実で説明することができ、このことが高レベルのNpt1と拮抗するのではないかと考えられる。NPT1 の付加的なコピーがsir2 変異体であると、rDNA サイレンシングに僅かな増加があったが、これは SIR2-依存的なサイレンシングよりもかなり弱かった。この見かけの増加の基盤は不明である。これがサイレンシングに対する全体的な効果であったかどうかを判定するために、我々はテロメア遺伝子座でのサイレンシングを調べた。NPT1 の付加的なコピーを、ADE2マーカを 5 番染色体のサブテロメア領域に挿入してあるPSY316ATに導入した(53)。図 3 D に示すように、NPT1 の付加的なコピーがあると、テロメアのサイレンシングが

20

SIR2-依存的に増加した。

30

【 0 2 9 9 】

rDNA の不安定性は酵母複製老化の主要な原因であることが示されている。NPT1 がこの遺伝子座での安定性を増加することにより寿命を延ばすのかどうかを検査するために、我々は、rDNA 組換えの速度を2xNPT1 及び2xSIR2 株で判定した。これは、rDNAに挿入されたADE2マーカの消失速度を測定することにより行なわれた。図 3 E に示すように、NPT1 の付加的なコピーがあると、2xSIR2 及び 2xNPT1 2xSIR2 株と同様に、rDNA 組換えが2分の1に減少した。sir2 を 2xNPT1 株から削除すると rDNA 組換えは劇的に増加して sir2 ヌル株のレベルにまでなった (図 3 F)。これらの結果は、NPT1 はSir2のrDNA組換え阻害能を増すことにより複製寿命を延ばすというモデルと合致する。

【 0 3 0 0 】

40

NPT1 の付加的なコピーに伴うrDNAサイレンシング増加を説明するあり得る説の一つは、これらの株でのテロメア

Sir2がrDNAに再局在化して、テロメアのサイレンシングが消失するというものである。我々は、NPT1 の付加的なコピーがあるとテロメアのサイレンシングSIR2-依存的に増加するというを示し、寿命の延びの機序としてのテロメアからのSir2の再局在化に反論した。もう一つの可能な説明は、付加的な

NPT1 があるとSir2発現が上方調節されるというものである。我々はウェスタン・ブロット法によりSir2の定常状態レベルが付加的な NPT1に応答しても変化しないことを見出した。rDNAサイレンシングの増加の3番目の可能性は、付加的な

NPT1 が全体的な Sir2 活性を刺激するというものである。現在ではこの活性をin vivoで

50

測定することはできないが、この考えは、付加的なNPT1があると、これまで調べられたSI R2-依存のプロセスのどれもが亢進されるという我々の発見と合致する。

【0301】

カロリー制限は NPT1 発現又は局在化を変化させない - 付加的な NPT1 及びカロリー制限は、同じ経路を通じて寿命を延ばすようであることを考え、我々は、カロリー制限がNPT1発現を増すことに作用するのかどうかを検査した。三重項ヘマグルチニン・エピトープ(3xHA) (SEQ ID NO: 49) タグをNpt1のカルボキシ末端に、3xHA-カナマイシン耐性カセットを天然型NPT1 遺伝子座 (3xHAタグは SEQ ID NO: 49に開示された通り) に組み込むことにより、加えた。我々は、その野生型レベルのrDNAサイレンシング維持能を検定することにより、その融合たんぱく質が機能的であることを確認した。次に、NPT1 レベルを、ブルコース培地 (0.5%) 上で成長させた株と、カロリー制限を遺伝的模倣と考えられる長命のcdc25-10 株で判定した (19)。図4A及びBに示すように、NPT1 発現の増加は mRNA レベルでも、又はたんぱく質レベルでも検出されなかった。実際、低グルコース条件下では、常にNPT1発現に最高2分の1の減少が観察された。我々はヒートショック後でも、あるいはMMSもしくはパラコートへの暴露後でも NPT1 発現に大きな変化は検出しなかった (図4C及びD)。我々はカロリー制限がNPT1発現を上方調節することに寿命を増すのではないと結論する。

10

【0302】

NPT1 発現はカロリー制限に応答して亢進されるわけではないとして、我々は、このたんぱく質の活性が他の手段により調節されている可能性を調べた。具体的には、我々は、完全又は低グルコース培地で成長させた生きた細胞中の GFPタグ付きNpt1 の細胞レベル下局在を調べた。驚くべきことに、Npt1は細胞全体に観察されたが、大半の細胞の核内でこのたんぱく質の見かけの濃縮があった (図4E)。排除された大きな領域は液胞に相当した。これらの発見から、NAD⁺の再部分が核内で再生されているという興味深い可能性が持ち上がる。低グルコース培地では、Npt1-GFP の局在化パターンに変化はなく、カロリー制限に応答したNpt1 の総体的な再局在化がないことを示唆している。

20

【0303】

NAD⁺ 再利用経路全体が核内区画に存在するという我々の仮説を考えると、この経路の他の酵素もNpt1と同様な局在化パターンを示すであろうと予測せざるを得ない。細菌の再利用経路に基づく、

30

NPT1 のすぐ下流のステップはニコチネートモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NaMAT) により触媒されるものと予測される。他の種由来のNaMATと同様な相同性を持つ二つの酵母ORF YLR0328 及び YGR010があり、それらはそれぞれ NMA1 及びNMA2と指名されている。これら2つのたんぱく質の位置を特定するために、GFPカセットを各ORFの停止コドンの前にインフレームで組み込んでC末端融合体を作製した。図4Fに示すように、Nma2-GFP は大半の細胞の核内に、Npt1-GFPと同一のパターンで濃縮していた。この発見は、NADプラスがニコチンアミドから完全に核内で再循環しているという我々の仮説を更に裏付けるものである。Nma1 の局在化パターンは発現レベルが低いために判定できなかった。

【0304】

40

NAD⁺ 再利用経路中の他の推定長寿遺伝子の同定 - Nma2 がNpt1と同様な局在を示すという発見に促されて、我々は、NAD⁺ 再利用経路中の他の遺伝子が、過剰発現した場合のNpt1に同様な効果を有するかどうかを調べた。NAD⁺ 再利用経路中の細菌遺伝子は詳細に研究されているが、S. セレブジエでは、この経路の鍵となる遺伝子のいくつかはまだ特徴付けられていない。最近同定された遺伝子であるPNC1は、ニコチンアミドのニコチン酸への転化を触媒するニコチナミダーゼをコードしており、このステップは NPT1のすぐ上流である。上に論じたように、2つの遺伝子 NMA1 及び NMA2 は、NPT1のすぐ下流のステップを触媒する NaMNATををコードしている。細菌では、この経路の次のステップであるNAD⁺の生成が NAD シンセターゼにより触媒される。まだ特徴付けられていないORFである QNS1/YHR074は、NAD シンセターゼに対して高い相同性を示す。これらの再利用経路

50

遺伝子のそれぞれを単一のコピーとしてW303AR5 及びPSY316AT のURA3 遺伝子座に組み込み、前述したようにサイレンシングについて検定した。PNC1、NMA1 又は NMA2 のいずれかの付加的なコピーがあると rDNA 及びテロメアのサイレンシングが 2xNPT1 株と同様なレベルまで増加する (図 5 B 及び C)。対照的に、QNS1の付加的なコピーがあっても rDNA サイレンシング (図 5 B) にも、又はテロメアのサイレンシングにも何の効果もなかった。上で論じたように、これらの結果はこの経路の速度に影響し得る複数のステップがあること、そして二つのホモログNMA1 及び NMA2 が重複する機能を有していると考えられることを示している。

【 0 3 0 5 】

議論

10

NPT1 はNAD⁺ を再循環させる酵母再利用経路の鍵となる成分であるSir2のコファクタをコードしている。我々は、NPT1 の付加的なコピーがあると寿命が最高 60 %、SIR2-依存的に増すことを示した。酵母の寿命はNAD⁺ レベルの増加と関連していそうだとすることが提案されている。しかしながら我々は、NPT1の付加的なコピーを持つ株において定常状態NAD⁺ レベルは変化がないことを示した。更に、NAD⁺/NADH 比も野生型細胞と同様であることから、全細胞レドックス状態も劇的に変化しているわけでないことが示される。

【 0 3 0 6 】

また我々はsir2 変異体が野生型 NAD⁺ レベルを有することを示したが、これは、Sir2 はNAD⁺の主要な消費因子ではないことを意味する。にもかかわらず、そのNAD⁺ のニコチンアミドへの転化能により、Sir2 は再利用経路を通るフラックス増加に応答的であるはずである (図 6)。このように、NAD⁺ の定常状態レベルは一定であるが、この分子のターンオーバーは上昇するのかも知れない。そのGFP-タグ付き酵素の局在化では、NAD⁺ 再利用経路中の酵素のうちの少なくとも二つが核内に濃縮していることが示された。これと一致して、Nma1 及び Nma2 は、高スループットのツーハイブリッド・スクリーニングにより、核内局在配列(NLS)の受容体として作用するたんぱく質であるSrp1と相互作用することが示された

20

(54)。この同じツーハイブリッド・スクリーニングで、Nma1 及び Nma2 がそれら自体と、そして互いに相互作用できることも示されている。おそらくNma たんぱく質は、バシラス-サチリス (原語: *Bacillus subtilis*) NaMNAT (55)と同様に二量体として存在するか、あるいはメタノコッカス-ジャナスキイ (原語: *Methanococcus jannaschii*) (56) 及びメタノバクテリウム-テルモオートトロフィカム (原語: *Methanobacterium*

30

thermoautotrophicum) NaMNATs (57)と同様に六量体として存在するのかも知れない。NMA1 又はNMA2 のいずれを破壊した株も生存すること (58)には注目する価値があり、コレラが機能的に重複していることが論じられる。

【 0 3 0 7 】

脊椎動物において、NaMNAT/NMNAT

活性は主に、生きた肝臓抽出物の核内区画で観察され (59)、この経路の核内区画化が真核細胞の全般的な特性ではないかということが示唆される。この再利用経路をクロマチンの近くに有することで、たんぱく質のサイレンシングに向けてNAD⁺ が急速に再生可能になっているのかも知れない。あるいは、これにより、核内NAD⁺ プールの変化を通じて多種の核活動の調和が可能になっているのかも知れない。これらの仮説の検証は容易な課題ではないが、細胞内NAD⁺ の分子プローブが開発されれば大きな助けとなるであろう。

40

【 0 3 0 8 】

酵母及び多くの後生生物では、数多くの長命の変異体がストレス耐性増加を示す。しかしながら、寿命は延ばすがストレスからは余り防御をもたらさないような変異の例が数多くあり、この関係が簡単ではないことが示される(4)。例えば、酵母においては、cdc25-10 変異によりもたらされる寿命の延びには、ヒートショック耐性が伴わない

50

(19)。我々は、NPT1 又は SIR2 の付加的なコピーがあると寿命は延びるが MMS、パラコート又は飢餓に対する防御が提供されないことを示した。このように、S. セレビジエにおいては、長寿はストレス耐性の一般的増加とは関係がない。我々が、長寿と関連することを見つけた唯一のストレス関連表現型はヒートショック耐性である。

sir2D 株での遺伝子発現のゲノム・ワイド解析に基づき、Sir2 は三つのサイレント遺伝子座以外にある遺伝子を調節することが提案されて(60)いるが、この解釈は議論を呼んでいる

(61)。この解釈が正しいのであれば、我々が 2xNPT1 及び2xSIR2 株で観察したヒートショック耐性は、ヒートショック耐性を抑制する遺伝子のSir2-媒介性サイレンシングが原因であるということもあり得る。

10

【0309】

細菌においては、Npt1ホモログPncB は NAD^+ 再利用経路の律速段階を触媒するsalvage pathway (35,37,38)。この研究で我々は、PNC1、NPT1、NMA1 又は NMA2 の付加的なコピーがあると、いずれも rDNA 及びテロメアのサイレンシングを増加させることを示す。それが意味するのは、酵母においては、複数の段階がこの経路の速度に影響している可能性である。このような提案は、大半の代謝経路を通るフラックスが、単一の律速段階でなく複数の酵素により制御されているという観察に基づく理論である代謝制御分析と一致する

(62)。この再利用経路の全ての遺伝子のうちで、QNS1 のみがサイレンシングに対して何の効果も有さなかったことから、これがこの経路のうちで基質の利用能の制限を受ける唯一の酵素であることが示唆される。

20

これはおそらく、予測される

Qns1の基質であるデスアミド-NAD⁺が、この再利用経路の外にあるソースから提供できない唯一の中間物であるという事実が原因であろう(図6を参照されたい)。

【0310】

酵母及び後生生物においては、Sir2ファミリーのメンバーが複数あるが、そのうちの多くが NAD^+ -依存的脱アセチル化酵素であることが示されている(あるいは予測される)(24,63)。この発見を、いくつかのSir2ファミリー・メンバーが細胞質内にあるという事実と組み合わせると(64,65)、可逆性のアセチル化は、以前に考えられているよりも遥かに重要な調節機序ではないかということが示唆される

30

(66)。これにより NAD^+ 再利用経路は、このグループのエフェクタたんぱく質の活性を細胞エネルギー状態に応答して調和させる枢軸位置に置かれる。

【0311】

今や、寿命の調節には保存された経路があることが広く受け容れられている(4,5)。この保存の程度はC. エレガンス

sir-2.1 の付加的なコピーがあってもこの生物の寿命を延びるという発見で例証されている

(31)。我々の発見で、酵母においていくつかの

SIR2-依存的プロセスは NAD^+ 再利用経路の操作により亢進することができたが、このことはより高等な生物にとっても真実であろう。我々は我々が調べたいずれのゲノムにもNPT1 ホモログを特定したが、そのすべてが、サルモネラではリン酸化したときに触媒作用を大きく刺激する保存領域をヒスチジン残基の周りに持つ

40

(67)。この調節形態により、変異やNpt1活性を増す低分子のデザインが可能になっているのであろう。まとめると、我々の発見は、Npt1及び該再利用経路の他のメンバーは、カロリー制限の有益な効果を模倣するである低分子にとって魅力的なターゲットであることを示すものである。

【0312】

参考文献

1. Masoro, E. J. (2000) Exp Gerontol 35(3),

50

299-305.

2. Vanfleteren,

J. R., and Braeckman, B. P. (1999) *Neurobiol*

Aging 20(5), 487-502

3. Zainal,

T. A., Oberley, T. D., Allison, D. B., Szveda, L. I., and Weindruch, R. (2000) *Faseb J* 14(12), 1825-36.

4. Kenyon,

C. (2001) *Cell* 105, 165-168

5. Guarente,

L., and Kenyon, C. (2000) *Nature* 408(6809), 255-62.

6. Kirkwood,

T. B., and Rose, M. R. (1991) *Philos*

Trans R Soc Lond B Biol Sci 332(1262), 15-24.

7. Barton,

A. (1950) *J Gen Microbiol* 4, 84-86

8. Sinclair,

D. A., Mills, K., and Guarente, L. (1997) *Science* 277(5330), 1313-6.

9. Mortimer,

R. K., and Johnston, J. R. (1959) *Nature* 183, 1751-1752

10. Kennedy, B. K., Austriaco, N.

R., Jr., and Guarente, L. (1994) *J Cell Biol* 127(6 Pt 2), 1985-93.

11. Kim, S., Villeponteau, B., and

Jazwinski, S. M. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 219(2), 370-6.

12. Ashrafi, K., Lin, S. S., Manchester,

J. K., and Gordon, J. I. (2000) *Genes Dev* 14(15), 1872-85.

13. Lin, S. S., Manchester, J. K.,

and Gordon, J. I. (2001) *J. Biol. Chem.*,

14. Longo, V. D. (1999) *Neurobiol Aging* 20(5), 479-86.

15. Jazwinski, S. M. (2001) *Mech Ageing Dev* 122(9), 865-82.

16. Sinclair, D. A., and Guarente,

L. (1997) *Cell* 91(7), 1033-42.

17. Kaeberlein, M., McVey, M., and

Guarente, L. (1999) *Genes Dev* 13(19), 2570-80.

18. Park, P. U., Defossez, P. A.,

and Guarente, L. (1999) *Mol Cell Biol*

19(5), 3848-56

19. Lin, S. J., Defossez, P. A., and

Guarente, L. (2000) *Science*

289(5487), 2126-8.

20. Defossez, P. A., Prusty, R.,

Kaeberlein, M., Lin, S. J., Ferrigno, P., Silver, P. A., Keil, R. L., and

Guarente, L. (1999) *Mol Cell* 3(4),

10

20

30

40

50

447-55

21. Tanner, K. G., Landry, J.,
Sternglanz, R., and Denu, J. M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14178-82.
22. Imai, S., Armstrong, C. M.,
Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) *Nature* 403(6771), 795-800
23. Smith, J. S., Brachmann, C. B.,
Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L.,
Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J. D. 10
(2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6658-63.
24. Landry, J., Sutton, A., Tafrov,
S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11),
5807-11.
25. Laurenson, P., and Rine, J.
(1992) *Microbiol Rev* 56(4), 543-60.
26. Straight, A. F., Shou, W., Dowd,
G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D., and Moazed, D. (1999) *Cell* 20
97(2), 245-56.
27. Shou, W., Seol, J. H.,
Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J.,
Charbonneau, H., and Deshaies, R. J. (1999) *Cell*
97(2), 233-44.
28. Shou, W., Sakamoto, K. M.,
Keener, J., Morimoto, K. W., Traverso, E. E., Azzam, R., Hoppe, G. J., Feldman,
R. M. R., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneaux, H., Nomura, M., and Deshaies,
R. J. (2001) *Mol. Cell.* 8(1), 45-55
29. Tanny, J. C., and Moazed, D. 30
(2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2), 415-20.
30. Smith, J. S., Caputo, E., and
Boeke, J. D. (1999) *Mol Cell Biol* 19(4), 3184-97.
31. Tissenbaum, H. A., and Guarente,
L. (2001) *Nature* 410(6825), 227-30.
32. Jiang, J. C., Jaruga, E.,
Repnevskaya, M. V., and Jazwinski, S. M. (2000) *Faseb J* 14(14), 2135-7.
33. Foster, J. W., Kinney, D. M., 40
and Moat, A. G. (1979) *J Bacteriol* 137(3), 1165-75.
34. Ghislain, M., Talla, E., and
Francois, J. M. (2002) *Yeast* 19(3),
215-224.
35. Wubbolts, M. G., Terpstra, P.,
van Beilen, J. B., Kingma, J., Meesters, H. A., and Witholt, B. (1990) *J Biol Chem* 265(29), 17665-72.
36. Vinitsky, A., Teng, H., and
Grubmeyer, C. T. (1991) *J Bacteriol* 50

173(2), 536-40.

37. Imsande, J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 85, 255-273

38. Grubmeyer, C. T., Gross, J. W.,
and Rajavel, M. (1999) *Methods Enzymol*
308, 28-48

39. Emanuelli, M., Carnevali, F.,
Lorenzi, M., Raffaelli, N., Amici, A., Ruggieri, S., and Magni, G. (1999) *FEBS Lett* 455(1-2), 13-7.

40. Hughes, K. T., Olivera, B. M.,
and Roth, J. R. (1988) *J Bacteriol*
170(5), 2113-20.

10

41. Mills, K. D., Sinclair, D. A.,
and Guarente, L. (1999) *Cell* 97(5),
609-20.

42. Smith, J. S., and Boeke, J. D.
(1997) *Genes Dev* 11(2), 241-54.

43. Lalo, D., Carles, C., Sentenac,
A., and Thuriaux, P. (1993) *Proc Natl
Acad Sci U S A* 90(12), 5524-8.

44. Becker, D. M., Fikes, J. D., and
Guarente, L. (1991) *Proc Natl Acad Sci U
S A* 88(5), 1968-72.

20

45. Sikorski, R. S., and Hieter, P.
(1989) *Genetics* 122(1), 19-27.

46. Guldener, U., Heck, S., Fielder,
T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. (1996) *Nucleic Acids Res* 24(13), 2519-24.

47. De Antoni, A., and Gallwitz, D.
(2000) *Gene* 246(1-2), 179-85.

48. Longtine, M. S., McKenzie, A.,
3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachet, A., Philippsen, P., and
Pringle, J. R. (1998) *Yeast* 14(10),
953-61.

30

49. Keil, R. L., and McWilliams, A.
D. (1993) *Genetics* 135(3), 711-8.

50. Ashrafi, K., Sinclair, D.,
Gordon, J. I., and Guarente, L. (1999) *Proc
Natl Acad Sci U S A* 96(16), 9100-5.

51. Clancy, D. J., Gems, D.,
Harshman, L. G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S. J., and
Partridge, L. (2001) *Science*
292(5514), 104-6.

40

52. Kennedy, B. K., and Guarente, L.
(1996) *Trends Genet* 12(9), 355-9.

53. Gottschling, D. E., Aparicio, O.
M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990) *Cell* 63(4), 751-62.

54. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G.,
Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V.,
Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover,
D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and
Rothberg, J. M. (2000) *Nature*

50

403(6770), 623-7.

55. Olland, A. M., Underwood, K. W., Czerwinski, R. M., Lo, M. C., Aulabaugh, A., Bard, J., Stahl, M. L., Somers, W. S., Sullivan, F. X., and Chopra, R. (2002) J Biol Chem 277(5), 3698-707.

56. D'Angelo, I., Raffaelli, N., Dabusti, V., Lorenzi, T., Magni, G., and Rizzi, M. (2000) Structure Fold Des 8(9), 993-1004.

57. Saridakis, V., Christendat, D., Kimber, M. S., Dharamsi, A., Edwards, A. M., and Pai, E. F. (2001) J Biol Chem 276(10), 7225-32. 10

58. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R. W., and et al. (1999) Science 285(5429), 901-6.

59. Hogeboom, G., and Schneider, W. (1950) J. Biol. Chem. 197, 611-620

60. Wyrick, J. J., Holstege, F. C., Jennings, E. G., Causton, H. C., Shore, D., Grunstein, M., Lander, E. S., and Young, R. A. (1999) Nature 402(6760), 418-21. 20

61. Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., and Simon, J. A. (2001) Proc Natl Acad Sci U S A 98(26), 15113-8.

62. Fell, D. (1997) Understanding the Control of Metabolism. Frontiers in Metabolism (Snell, K., Ed.), Portland Press, London

63. Landry, J., Slama, J. T., and Sternglanz, R. (2000) Biochem Biophys Res Commun 278(3), 685-90. 30

64. Perrod, S., Cockell, M. M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A. L., Bonnard, C., and Gasser, S. M. (2001) Embo J 20(1-2), 197-209.

65. Afshar, G., and Murnane, J. P. (1999) Gene 234(1), 161-8.

66. Shore, D. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97(26), 14030-2.

67. Rajavel, M., Lalo, D., Gross, J. W., and Grubmeyer, C. (1998) Biochemistry 37(12), 4181-8 40

【 0 3 1 3 】

実施例 2 : ニコチンアミドによるゲノム不安定性の増加及び老化の加速

サッカロミセス-セレビジエ (原語 : *Saccharomyces cerevisiae*) Sir2 たんぱく質はNAD⁺-依存的ヒストン脱アセチル化酵素であり、転写サイレンシング、ゲノム安定性及び寿命において重要な役割を果たす。Sir2のヒトホモログであるSIRT1は、p53腫瘍抑制因子の活性を調節し、アポトーシスを阻害する。Sir2 脱アセチル化反応は、2つの生成物 : O-アセチル-ADP-リボース及び、ニコチンアミドというニコチン酸の前駆体であり、ナイアシン/ビタミンB3の一つの形を生じる。我々はここでニコチンアミドが酵母のサイレンシングを完全に消失させ、複製寿命をsir2 変異体のそれまで短縮することを示す。ニコ

チン酸でなくニコチンアミドは、酵母のテロメア、rDNA及び接合型遺伝子座でのサイレンシングを強力に阻害する。ニコチンアミドはまた、rDNA遺伝子座の不安定性を増し、酵母寿命をsir2 変異体のそれまで短縮する。ニコチンアミドは更にG1停止期細胞でのサイレンシングも消失させることから、継続的なSir2活性がサイレンシングの維持に必要であることが実証される。ニコチンアミドの存在下では、Sir2 はもはや、テロメアとも、又は接合型遺伝子座とも結び付かず、rDNAと結び付く。ニコチンアミドの存在下ではSir2 はもはやテロメア及び接合型遺伝子座のクロマチンとも共沈殿せず、しかしSir2 の局在パターンに変化はない。我々は生理的濃度のニコチンアミドが Sir2 及びSIRT1の両者を非競合的に阻害することを

in vitroで示す。ニコチンアミドによるSIRT1の阻害の程度 ($IC_{50} < 50 \mu M$) はこのクラスのたんぱく質で最も効果的な公知の阻害剤に等しいか、あるいはそれより良好である。我々は、ニコチンアミド及び NAD^+ がSir2に同時に結合することで触媒作用を阻害できることを提案し、ニコチンアミドによりSir2の阻害が生理学的に重要であることを論じる。

【0314】

我々は、核内ニコチンアミドがin vivoのSir2活性に負の調節を及ぼしている可能性を論じる。我々の発見は、ニコチンアミドの临床上の使用には慎重な配慮が必要であることを示すものである。

【0315】

実験の手法

酵母検定 - 本研究で用いられた酵母株をすべて、表3に挙げる。他に記載しない限り、細胞は30でYPD培地(1%酵母抽出物、2%バクトペプトン、2%グルコース w/v)上で成長させた。リボゾームDNA遺伝子座でのサイレンシングの程度を、RDN1::MET15 株を Pb^{2+} -含有培地(0.3% ペプトン、0.5% 酵母抽出物、4% グルコース、0.02% (w/v) 酢酸アンモニウム、0.07% $Pb(NO_3)_2$ 及び2% 寒天)上で成長させることにより、判定した。ADE2-ベースのテロメア及び HM遺伝子座サイレンシング検定を、前述したように(実施例1を参照されたい)行なった。リボゾームDNA組換え頻度は前に記載された通り

(44')に判定された。

【0316】

10

20

【表 3】

表 3. この研究で用いられた株。

株	遺伝子型	
W303AR5	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>	
YDS878	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir2:TRP1</i>	10
YDS1572	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>LEU2/SIR2</i>	
YDS1595	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RAD5</i>	
YDS1596	W303 <i>MATa</i> , <i>ADE2</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RAD5</i>	20
YDS1097	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir4::URA3</i>	
YDS1099	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir3::LEU2</i>	30
YDS1109	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir3::LEU2</i> , <i>sir2:TRP1</i>	
YDS1078	W303 <i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>can1-100</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir2::LEU2</i> , <i>sir2:TRP1</i>	
PSY316AT	<i>MATα</i> , <i>ura3-53</i> <i>leu2-3,112</i> <i>his3-Δ200</i> <i>ade2-1,01</i> <i>can1-100</i> <i>ADE2-TEL</i> <i>V-R</i>	40
YDS1594	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53</i> <i>leu2-3,112</i> <i>his3-Δ200</i> <i>ade2-1,01</i> <i>can1-100</i> <i>ADE2-TEL V-R</i> , <i>sir2:TRP1</i>	
YDS970	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53</i> <i>leu2-3,112</i> <i>his3-Δ200</i> <i>ade2-1,01</i> <i>can1-100</i> <i>ADE2-TEL V-R</i> , <i>HMR::GFP</i>	

YDS1005	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100</i> <i>ADE2-TEL V-R, HMR::GFP</i>	
YDS1499	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100</i> <i>ADE2-TEL V-R, HMR::GFP, sir4::HIS3</i>	
YDS1690	PSY316 <i>MATα</i> , <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100</i> <i>ADE2-TEL V-R, HMR::GFP, Δhml::LEU2</i>	10
JS209	<i>MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167</i>	
JS241	JS209 <i>MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167,</i> <i>Ty1-MET15</i>	
JS237	JS209 <i>MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167,</i> <i>RDN1::Ty1-MET15</i>	20
JS218	JS237 <i>MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167,</i> <i>RDN1::Ty1-MET15, sir2::HIS3</i>	
YDS1583	JS237 <i>MATα, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167,</i> <i>RDN1::Ty1-MET15, LEU2/SIR2</i>	

【 0 3 1 7 】

複製寿命の判定は前述された通り (25') にマイクロ操作で行なわれた。最小 40 個の細胞を 1 回の実験辺り調べ、各実験は個別に少なくとも二回、行なわれた。寿命の統計学的有意差はウィルコキソンの順列和検定を用いて判定された。差は信頼度が 95% を越えたときに有意であると記載した。

【 0 3 1 8 】

GFP 蛍光は、蛍光活性化セルソーティング (FACS) により FACSCalibur フローサイトメータ (カリフォルニア州 Becton Dickinson 社) を用いて前述された (45') 通りに行なわれた。G1-停止期実験については、細胞を 10 μ g/ml アルファ因子で 3 時間、処理した。DNA 含有量はヨウ化プロビジウム (Sigma 社) で染色された固定細胞の FACS 分析により、前述された通りに (45') 判定された。典型的には一試料辺り 20,000 個の細胞を分析した。データの獲得及び分析は CELLQuest ソフトウェア (Becton Dickinson 社) を用いて行なわれた。

【 0 3 1 9 】

蛍光顕微鏡法及びクロマチン免疫沈降法 - GFP 蛍光を、合成完全 (SC) 培地 (1.67% 酵母窒素基剤、2% グルコース、それぞれ 40 mg/リットルのヒスチジン、ウリジン、トリプトファン、アデニン及びロイシン) 中で対数期まで成長させた生きた細胞中で観察した。画像を Nikon Eclipse E600 顕微鏡を用い、1000X の倍率でキャプチャし、Scion Image ソフトウェアで解析した。クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を前述された (45') 通りに、表 2 に挙げたプライマ・ペアを用いて行なった (46')。PCR 反応は、予め清澄させた全細胞抽出物からの投入 DNA の 1/5000 又は 1/12500 希釈液と、免疫沈降させた DNA の 1/50 希釈液を用いた 50 μ l の容量にして行なわれた。PCR の

30

40

50

パラメータは以下の通りだった。CUP1 及び 5S rDNA プライマ・ペアには、26 サイクルの PCR を、55 のアニーリング温度にして行なった。Tel 0.6、Tel 1.4 及び HM プライマ・ペアには、50 のアニーリング温度にした32 サイクルを用いた。PCR産物は、2.3%アガロース・ゲルで電気泳動法により分離し、臭化エチジウム染色法で視覚化した。

【0320】

【表4】

表4. オリゴヌクレオチド配列

オリゴヌクレオチド	配列	SEQ ID NO:	
TEL-0.6.Fwd	CAGGCAGTCCTTTCTATTTTC	31	
TEL-0.6.Rev	GCTTGTTAACTCTCCGACAG	32	
TEL-1.4.Fwd	AATGTCTTATCAAGACCGAC	33	
TEL-1.4.Rev	TACAGTCCAGAAATCGCTCC	34	
RDN-5S.Fwd	GAAAGGATTTGCCCGGACAGTTTG	35	
RDN-5S.Rev	CTTCTTCCCAGTAGCCTGTTCTT	36	
HMR-YA/ZL.Fwd	GTGGCATTACTCCACTTCAAGTAAG	37	
HMR-YA/ZL.Rev	CAAGAGCAAGACGATGGGG	38	
CUP1-Fwd	TTTTCCGCTGAACCGTTCCA	39	
CUP1-Rev	CATTGGCACTCATGACCTTC	40	

10

20

30

【0321】

In vitro脱アセチル化検定 - 組換えGST タグ付き酵母 Sir2p (D. Moazed氏より提供)及び組換えヒトSIRT1 (47') を脱アセチル化酵素活性についてHDAC 蛍光活性検定 / 薬物発見キット (AK-500, BIOMOL Research Laboratories)を用いて検定した。この検定システムにより、ヒストン基質の脱アセチル化時に顕色剤で処理すると蛍光シグナルを検出することができる。蛍光は蛍光分析リーダー (Cytofluor II 400 series PerSeptive Biosystems) で、励起を360 nm にし、放出検出を 460 nmに設定して測定された。反応液は5 µg の GST-Sir2 又は2.5 µg のSIRT1を、250 µMのアセチル化ヒストン基質、1 mM DTT 及び記載した通りの一定範囲のNAD⁺

濃度と一緒にインキュベートしたものを50 µlの検定緩衝液に入れたものから成った。酵母及びヒトたんぱく質との反応はそれぞれ30 及び37 で、30分間、行なわれた。阻害物質検定については、反応を200 µMのNAD⁺

と、ニコチンアミド (0、50、150 又は300 µM) (Sigma社)、又は、50 µMの以下の阻害剤；ニコチン酸(Sigma社)、シルチノール、M15 (Chembridge社)、スプリトミシン (47)、TSA (BIOMOL社)のうちのいずれかとの存在下で行なわせた。

【0322】

結果

ニコチンアミドはrDNA、テロメア及び接合型遺伝子座でのサイレンシングを消失させる。ニコチンアミドはSir2脱アセチル化の産物であり、NAD⁺ 再利用経路における重要な基質である。NAD⁺ 生合成を操作するとSir2依存的活性に影響することができるという我々

40

50

の前の観察に基づき（実施例 1 を参照されたい）、我々はどんな効果を NAD⁺ 前駆体はサイレンシングに対して有するのかを調べたいと考えた。ADE2 又は MET15 マーカのいずれかを rDNA 遺伝子座 (RDN1) に組み込ませて持つ株を調べた。

ADE2 をサイレントにすると、アデニンを制限したプレート上で赤色色素の蓄積が起こるが、他方、MET15 をサイレントにすると、茶色の色素を Pb²⁺-含有培地上で生じる。我々は 2 つのマーカ遺伝子を用いて、我々が観察した効果が単にアデニン又はメチオニン合成の変化が原因でないことを確認した。SIR2 (2X SIR2) の余分な一個のコピーを持つか、あるいは SIR2 (sir2::TRP1) を欠く株を、それぞれサイレンシングの増加及びサイレンシングの欠如用にコントロールとして含めた。図 8 A に示すように、5 mM ニコチンアミドの存在下で成長させた場合、サイレンシングは完全に損なわれる。この遺伝子座での ADE2 マーカのサイレンシングはニコチンアミドの添加でも同様に失われた。

【 0 3 2 3 】

ニコチンアミドの効果が rDNA に特異的なものかどうか、あるいはそれが他のヘテロクロマチン領域に影響するのかどうかを検査するために、我々はテロメアでのサイレンシングを調べた。テロメアのサイレンシングを観察するために、我々は、ADE2 遺伝子が 5 番染色体に右腕のサブテロメア領域 (Y') に組み込まれた株を用いた

(22')。アデニンを制限したプレートでは、ADE2 マーカがまだらに発現するためにコロニーは赤 / 白の部分をもつ。5 mM ニコチンアミドの存在下では、コロニーは白色であり、抑制が完全に失われていることが実証された（図 8 B）。また我々は接合型遺伝子のサイレンシングも観察し、ニコチンアミドがこの遺伝子座でもサイレンシングを完全に消失させることを見出した。

【 0 3 2 4 】

NAD⁺ 再利用経路の中間物であるニコチン酸は、ニコチンアミドに構造上、似ている（図 9 B を参照されたい）。ニコチン酸は酵母細胞に効率的に取り込まれるが、この化合物の特異的トランスポーターである Tna1 が最近、同定された (48', 49')。上記の検定のそれぞれにおいて、我々は、5 mM のニコチン酸が Sir2-依存的サイレンシングに及ぼす効果を調べ、いずれの場合でも、ニコチン酸は何ら効果を有さないことを見出した。

【 0 3 2 5 】

ニコチンアミドはゲノム安定性を増し、酵母寿命を縮める。

我々は、上記のサイレンシング消失が Sir2 活性の阻害が原因であるものかどうかを判定したと考えた。そうであればニコチンアミドで処理された細胞は sir2D 株を模倣するはずである。機能的 Sir2 を欠く酵母は、rDNA 組換え頻度の増加を示す。rDNA 遺伝子座での ADE2 マーカの消失を野生型、2X SIR2 及び sir2 株で、ニコチンアミドの存在下及び非存在下で観察した。図 9 A に示すように、野生型及び 2X SIR2 細胞をニコチンアミドで処理すると、sir2 変異体と同様に、マーカ消失頻度が最高 7 倍に増加した。重要なことに、この

sir2 株を処理してもそれ以上組換えは増えず、観察されたマーカの消失は Sir2 の阻害が原因であるかどうかには議論が生じる。

【 0 3 2 6 】

rDNA 遺伝子座の不安定性が、酵母複製老化の主要な原因であると示されている (25', 26')。そこで我々は、ニコチンアミドの酵母寿命に対する効果を調べた。細胞を 2 日間、新鮮な酵母 YPD 培地で成長させて、これらが検定前にカロリー制限条件から完全に回復していることを確実にした。次に、前には未萌芽の母細胞から出芽した娘細胞をマイクロ操作で取り出し、計数した。図 9 C は、野生型（三角）及び短命の sir2 変異型（丸）の両者の代表的な寿命曲線を示す。5 mM のニコチンアミドを含有する培地で成長させた細胞（塗りつぶしたダイヤモンド）は、平均で野生型の最高 45% の寿命を有し、これは sir2 変異株に匹敵した。sir2 株をニコチンアミドで処理して寿命をそれ以上、縮まなかった（四角）。これらの結果とは対照的に、我々は、5 又は 50 mM のニコチン酸の存在下では複製寿命に何の有害効果も観察しなかった（図 9 D、それぞれ塗りつぶした及び開放したダイヤモンド）。

【 0 3 2 7 】

ニコチンアミドは非分裂細胞でサイレンシングを阻害する - サイレントなクロマチンドメインの再樹立には、S 期を 5 回、通過することが必要で (50') であるが、そのトリガは DNA 複製ではないようである (51', 52')。温度感受性 SIR3 対立遺伝子を用いた実験では、Sir2/3/4

複合体の存在が、細胞周期全体を通じてサイレントな状態を維持するには必要であることが示されている

(50')。我々は、ニコチンアミドが周期中の細胞でサイレントなドメインを抑制解除し、複製寿命を減衰することを示した。我々は、ニコチンアミド処理が同様な効果を、周期から出た G1 停止期の細胞のサイレンシングに対しても有するかどうかを疑問に思った。我々は、GFP レポータを HMR 遺伝子座に組み込ませて含有することで、ニコチンアミドが単個細胞の

HM サイレニングに対して及ぼす効果を定量できるようにした株を用いた。我々はまず、周期中の細胞でこの系をバリデートした。図 10 A に示すように、GFP はこの遺伝子座でのサイレンシングの程度が高いために、未処理細胞では発現しなかった。しかしながら、5 mM ニコチンアミドに 60 分間置いた後では、我々は発現レベルの劇的な増加を観察し、この増加は 90 分後ではさらに著明なものとなった (図 10 A、それぞれ二番目及び三番目のパネル)。

【 0 3 2 8 】

サイレンシングのより定量的な測定値を得るために、細胞を蛍光活性化セルソーティング (FACS) で分析した。図 10 B の上側 2 枚のパネルは sir4 及び野生株の非同期培養株の GFP 発現プロファイルを示す。SIR4 を欠失させるとテロメア及び接合型遺伝子座の SIR 複合体が破壊され、Sir2 がこれらの部位から再配分されて rDNA 遺伝子座に向かった。このように、sir4 株のプロファイルは HMR 遺伝子座の完全な抑制解除を表している。図 10 B はニコチンアミド中の野生型細胞が成長したことから、sir4 変異体に比較して、この遺伝子座が完全に抑制解除されていることを示す (三番目のパネル)。5 mM のニコチン酸又は構造上関連するキノリン酸 (デノボ NAD プラス合成経路の基質) で処理した細胞では、GFP 発現に何の増加も示さなかった (図 10 B、下側二枚のパネル) から、この脱サイレンシング効果はニコチンアミドに特異的であることが実証された。

【 0 3 2 9 】

この検定系を用い、我々は、非周期中細胞のヘテロクロマチンに対するニコチンアミドの効果を観察することができた。GFP 導入遺伝子座を含有する MATa 株から HML 遺伝子座を欠失させて、a 及び 遺伝子の共発現が原因で細胞が G1 停止期を確実に出ないようにした。インシによる処理で G1 に停止させた後、細胞を 5 mM ニコチンアミドに暴露して FACS で 30 分毎に調べた。図 10 C は、ニコチンアミドの存在下及び非存在下における、停止細胞の発現プロファイルを示す。驚くべきことに、G1 で停止した細胞は、ニコチンアミドで処理された場合にサイレンシングの消失を示した。FACS で DNA 含有量を測定すると、この細胞は実験期間の間 G1 のままとどまったことが確認された (図 10 C、右側コラム)。これらの結果は、外因性のニコチンアミドが非分裂細胞においてもサイレントなクロマチンを抑制解除することを実証するものであり、ヘテロクロマチンが不安定で動的な構造であることを示唆している。これはまた、ヒストンが継続的に脱アセチル化していることが、サイレンシングの維持には必須であることも示している。

【 0 3 3 0 】

ニコチンアミドは Sir2 にテロメア及び接合型遺伝子座からは解離させるが、rDNA からは解離させない。我々は、ニコチンアミドがヘテロクロマチンを三つのサイレント部位全てで抑制解除することを酵母で示した。我々の観察を説明するもので最も確かなものは、Sir2 がニコチンアミドの触媒作用により失活したというものであるが、Sir2 が脱局在化したか、あるいはその発現が下方調節されたというものもあり得る。後者の可能性に対処するために、我々はニコチンアミド (1-5 mM) の存在下で Sir2 たんぱく質レベルを判定し、これらに変化がないことを見出した。次に、我々は、GFP でタグされた Sir2 の局在化に対する

ニコチンアミドの効果を調べた。同一に対数基培養株を 5 mM ニコチンアミド の存在下又は非存在下で 2 時間、成長させ、この間にGFP-Sir2の局在化を蛍光顕微鏡法により観察した。通常の条件下では、Sir2 は核周辺近傍の異なる焦点位置に観察することができるが、この各焦点は複数のテロメアのクラスタを表す (53')。sir2 変異体のバックグラウンドでは、Sir3 がテロメアから放出されて、拡散した核内パターンを示す (図 1 1 A)。この株をSirの脱局在化の基準として役立てた。ニコチンアミドの中での成長中に、我々は、処理済み細胞がサイレントな遺伝子座の最大の抑制解除を示す時点である二時間後ですら、Sir2-GFPパターンに何の変化も観察しなかった (図 1 1 C 及び D)。また我々は、Sirサイレンシング複合体の残りの二つのメンバーである Sir3 及び Sir4を調べた。図 5 E 及び G は、非処理細胞における、それぞれSir3-GFP 及びGFP-Sir4 の局在化パターンを示す。5 mM ニコチンアミドで 2 時間処理しても、これらのたんぱく質のいずれでも、GFP蛍光のパターンは変化しなかった (図 1 1 F 及び H)。これらの結果は、Sir2を阻害してもSIR複合体の総体的な再局在化は起きないことを初めて示すものである。

10

20

30

40

50

【0331】

ニコチンアミドの存在下におけるSir2及びサイレント遺伝子座の間の関係をより密接に調べるために、我々はクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を処理細胞及び非処理細胞の両者に対して行なった。sir2 変異株と、非サイレントCUP1 遺伝子をコントロールとして役立てた。図 1 2 は、5S rDNA-特異的プライマ・ペアを用いた投入及び免疫沈降後のDNAからのPCR産物を示す。細胞を5 mM ニコチンアミド で処理しても、これらのプライマを用いて得られたPCR産物の量に変化はなかった (レーン 5 及び 6 を参照されたい) ことから、Sir2 はこの化合物の存在下でもrDNAに結び付いたままであることが実証されたい。

【0332】

次に我々は、Sir2 と、6 サイレントな HMR 遺伝子座、並びに、6 番染色体の右側テロメア由来 DNA 0.6 及び 1.4 kb との結び付きを調べた。ニコチンアミドの存在下では、何のPCR 産物も、HMRに特異的なプライマを用いても得られなかった。同様に、サブテロメアDNA に特異的なプライマを用いてニコチンアミド処理細胞から得られる産物量も、バックグラウンドに同等だった。これらの結果は、Sir2 が、ニコチンアミドで処理された細胞中の

HMR とも、又はサブテロメアDNAとも結び付かないことを実証している。これはおそらく、rDNAでのRENT複合体と、テロメア及び接合型遺伝子座におけるヘテロ三量体型SIR複合体におけるSir2の役割の基本的な違いを反映したものであろう。

【0333】

ニコチンアミドは、in

vitroの酵母Sir2及びヒトSIRT1の両者の強力な非競合的阻害剤である - Sir2 はニコチンアミドに応答して脱局在化することも、あるいは下方調節されることもなかったため、我々の結果を説明する最も可能性ある解釈は、この化合物が Sir2 脱アセチル化酵素の直接的な阻害剤として作用した、というものだった。これを更に調べるために、そしてニコチンアミドにより誘導される脱サイレンシングの機序のより深い理解を得るために、我々は様々な量のこの化合物の存在下でSir2活性をin vitroで直接、測定した。我々は、ヒストン基質の脱アセチル化時に蛍光シグナルを生じる新規なクラス

III HDAC 活性検定を用いた。アセチル化した基質及びNAD⁺と一緒にインキュベートした場合には、組換えGSTタグ付きSir2 は、酵素なし及びNAD⁺なしのコントロールよりも10倍大きな強力な蛍光シグナルを生じる。この検定を用い、我々はニコチンアミドの脱アセチル化阻害能を多様な濃度のNAD⁺の存在下で検査した。データの二重回帰ラインウィーバー-パーク・プロット (図 1 3 A) では、ニコチンアミドがこの反応の強力な非競合的阻害剤であることが示される。同様な結果は最近、Hst2という、細胞質にある Sir2 ホモログでも得られた(54')。我々はニコチンアミドの阻害効果を、より高等な真核生物のSir2 ホモログにまで延ばせるかどうかを判定したいと望んだ。このように、我々は、ニコチンアミド

がヒ in vitroでヒトSIRT1も阻害できるかどうかを調べた。我々は組換えSIRT1を用いて

この基質の脱アセチル化を様々な濃度のニコチンアミド及びNAD⁺の存在下で観察した。Sir2と同様、そのデータのラインウィーバー-バーク・プロットは、ニコチンアミドはSIRT1も非競合的に阻害することを示した(図13B)。これらの結果は、ニコチンアミドはSir2/SIRT1への結合をめぐってNAD⁺と競合することにより脱アセチル化を阻害するのではないこと、そして

ニコチンアミド 及びNAD⁺ は同時にこの酵素に結合することができることを意味している。

【0334】

最近、いくつかのグループが、Sir2-様たんぱく質を阻害する化合物を *in vitro* 及び *in vivo* で単離した(55',56')。それらの中にはシルチノール、M15及びスプリトミシンがある。これらの化合物は、低分子ライブラリの高スループットの表現型スクリーニングで、サイレンシングの阻害剤として単離されたが、そのいずれも、SIRT1活性の阻害能についてはまだ調べられていない。これらの化合物の阻害効果をニコチンアミドのそれに比較するために、我々は、組換えSIRT1活性を、50 μ Mのこれらの阻害剤のそれぞれの存在下で測定した。更に我々は、クラス I/II HDAC 阻害剤TSAも陰性コントロールとして含めた。図13Cに示すように、ニコチンアミドはSIRT1を $IC_{50}<50 \mu M$ という、我々が検査した他の阻害剤のそれに等しいか、又は低い数値で阻害した。我々の *in vivo* での結果を更に裏付けるものとして、我々は、構造上関連する化合物であるニコチン酸が *in vitro* でSIRT1の活性に何の効果も有さないことを示した(図13C)。

【0335】

議論

我々は、Sir2脱アセチル化反応の生成物であるニコチンアミドが、*in vivo* 及び *in vitro*の両方でSir2活性の強力な阻害剤であることを示した。外因性ニコチンアミドを酵母細胞に添加すると三つのサイレントな遺伝子座すべてが抑制解除され、そのリボゾームDNA遺伝子座での不安定性が増し、酵母寿命をsir2変異体のそれまで縮める。ニコチンアミド処理細胞のrDNA不安定性及び短い寿命表現型は、sir2変異で増強されなかったことは、これらの表現型がSir2阻害の結果であることを示している。重要なことに、これらの結果は更に、rDNA不安定性及び寿命は他の酵母Sir2ファミリー・メンバーであるHstたんぱく質の影響を受けないことも示している。

【0336】

我々は最近、NAD⁺再利用経路遺伝子の余分なコピーを持つ株がサイレンシングの増加を示し、長命であるが、これらは定常状態 NAD⁺ 又はNADH レベルの増加を有さないことを示した(実施例1を参照されたい)。我々は、長寿は、NAD⁺ 利用能の局所的な増加か、又はこの再利用経路を通るフラックスの増加により媒介されるものとの仮説を建てた。後者のモデルは、NAD⁺のニコチンアミドへのSir2ファミリー・メンバー及び/又はNMNアデニリルトランスフェラーゼを介した継続的な再循環があるであろうことを意味している。我々は、ニコチンアミドがG1停止期細胞のサイレンシングを消失させることを示し、Sir2活性がヘテロクロマチンの維持には構成的に必要であること、そしてSir2はNAD⁺非周期中細胞でも消費することを論じる。これは、サイレントになったHML遺伝子座のe MAT 遺伝子がスプリトミシンで処理されたG1細胞で発現するという最近のBedelovらによる発見とも合致する(56')。

【0337】

ニコチンアミドを細胞に添加しても、われわれの調べたSir-GFP融合たんぱく質のいずれの局在化パターンも変化しない(図11)。このことは、Sir2がその活性とは独立にその局在化を維持する相互作用があることを示唆している。ChIPを用いたより緊密な調査では、この化合物の存在下では、Sir2は、たとえrDNAに結合したままでも、それはテロメア又は接合型遺伝子座のいずれとも結び付かないことを示される(図12)。Net1という、RENT複合体のDNA結合サブユニットがSir2とは独立にクロマチンに結合することができることが以前に示されている

10

20

30

40

50

(57')。これらの発見は、この複合体がSir2脱アセチル化酵素活性の非存在下でリボゾームDNA上で集合できることを示すものである。対照的に、我々は、ヘテロ三量体型のSir2/3/4 複合体がSir2触媒活性の非存在下でクロマチン上で集合できないことを示す。これらの結果は、触媒として不活性のSir2変異体を用いた2つの他のグループから出た最近のデータと合致する

(46',58')。両方のグループとも、触媒ドメイン(His-364)の保存ヒスチジンに変異があるとSir2がテロメア及び接合型遺伝子座と相互作用することを阻むことをin vivoで見出した。しかしながら、これらの変異がSir2の他のたんぱく質との相互作用能にも影響する可能性が残る。我々の結果は、Sir2の脱アセチル化酵素活性が、テロメア及び接合型遺伝子座とのその適正な結合に必要であることを結論的に示すものである。

10

【0338】

我々は、ニコチンアミドが酵母Sir2及びヒトのホモログSIRT1の両方の脱アセチル化酵素を強く阻害することをin vitroで示した。ニコチンアミドがSir2を阻害するのに非競合的に作用するのではないという事実は、この化合物が結合をめぐってNAD⁺と競合しないことを示唆するものである。Sir2脱アセチル化の反応機序と、原始Sir2ホモログの結晶構造を調べると、可能な阻害機序の手がかりが提供される。Sir2触媒性の脱アセチル化は、結び付いていると考えられる2つの加水分解ステップから成る。ニコチンアミドをNAD⁺のADP-リボース部分に接続しているグリコシド結合の開裂に続き、アセチル基とリジンの間のC-N結合が開裂する。最近の構造解析では、Sir2酵素が2箇所の空間的に離れた

20

NAD⁺結合部位s(B部位及びC部位)を含有し、その両者が触媒作用に関与していることが示されている(59')。本著者は、アセチルリジンの存在下で、B部位に結合したNAD⁺はコンホメーション変化を起こしてニコチンアミド基をC部位の近くに來させ、そこでそれが開裂するのだということを提案する。その後、この反応のADP-リボース生成物はB部位に戻り、そこでアセチルリジンの脱アセチル化が起きるのである。我々は、高い濃度では、ニコチンアミドは内側のC部位に結合してこれを遮断し、このことがコンホメーション変化や、その後のNAD⁺の開裂を妨げるのだと提案する。この説は、この化合物の阻害様式 of 非競合性を説明するであろう。

【0339】

我々は、ニコチンアミドの効力は、我々の検定で用いられた最も効果的なライブラリ単離化合物のそれに匹敵することを示した。SIRT1がin vitroでこのような低濃度のニコチンアミドにより阻害されるという事実から、この様式の阻害が生理的には重要なのだという可能性が持ち上がる。哺乳動物組織中のニコチンアミドのレベルは、11-400 μmの範囲内にあることが報告されている(39',60'-62')。最近、脳脊髄液中のニコチンアミドのレベルが高い精度で54.2 μMという(63')、ここで報告されるニコチンアミドのIC₅₀と同様な数値であることが判定された。我々は、細胞内ニコチンアミド・レベルの変動が、in vivoでのSir2たんぱく質の活性を直接、制御しているのではないかと提案するものである。これらの変動が、ひいては、ニコチンアミドの代謝に関与する酵素による調節を受けるのであろう。

30

【0340】

酵母PNC1遺伝子は、NAD⁺依存的脱アセチル化酵素を調節する鍵となる位置にあるニコチナミダーゼをコードしている。Pnc1は、ニコチンアミドをニコチン酸に転化させることにより、この阻害剤のレベルを減らし、NAD⁺が再生される速度を刺激しているのかも知れない(図7を参照されたい)。興味深いことに、PNC1はストレスやカロリー制限を模倣する条件に応答して最も高く誘導される遺伝子の一つである

40

(64',65')。更に、PNC1は、その転写産物が細胞周期依存的な変動を起こす唯一の再利用経路酵素をコードしている

(66')。PNC1のレベルはM/G1では最も高く、そしてS期では急激に落ちる。興味深いことに、これは

50

Sir- 依存的サイレンシングの確立と一致する (51',52',67')。これらの事実から、高レベルのPnc1がS期後か、あるいは、ストレス及びカロリー制限条件下で、ニコチンアミドの阻害効果を取り除くことによりサイレンシングを誘導しているという可能性が浮かび上がる。PNC1 のコピーが余分に一個あるとSir2- 依存的サイレンシングが増すという我々の以前の発見 (実施例1を参照されたい) は、このモデルの更なる裏付けとなるものである。細胞内ニコチンアミド・レベルが細胞周期、ストレス又はカロリー制限中に変化するのかどうかを判定することが興味深いであろう。

【0341】

ニコチンアミド及びニコチン酸は多様な状態を自己治療するために高用量 (最高 10 g/日) で用いられる (41')。両者とも、ビタミンB3の形であると考えられ、しばしば交換可能に用いられているが、ニコチンアミドは副作用が見かけ上ないために多くの場合で好まれるようになった。加えて、ニコチンアミドは現在、癌の再発及びインシュリン依存的 (I型糖尿病) を防止する療法として治験中である。ニコチンアミドがヘテロクロマチンを、非周期中の細胞においてでも破壊することがあり得ることを明らかに実証する我々の結果は、ヒトでニコチンアミド療法を長期行なった場合に有害な結果があるかも知れないという懸念が持ち上がる。

【0342】

参考文献

- 1'. Courey,
A. J., S. (2001) Genes Dev 15(21), 2786-96 20
- 2'. Moazed,
D. (2001) Mol Cell 8(3), 489-98.
- 3'. Gasser,
S. C. M. (2001) Gene 279(1), 1-16
- 4'. Eberharter,
A. B., PB. (2002) Embo
Reports 3(3), 224-9
- 5'. Kuo,
M. A., CD. (1998) Bioessays 20(8),
615-26 30
- 6'. Bernstein,
B. E., Tong, J. K., and Schreiber, S. L. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97(25),
13708-13.
- 7'. Fischle,
W. K., V. Dequiedt, F. Verdin, E. (2001) Biochem Cell Biol 79(3), 337-48
- 8'. Marks,
P. R., R A. Richon, V M. Breslow, R. Miller, T. Kelly, W K. (2001) Nature Rev Ca
ncer 1(3), 194-202
- 9'. Yoshida,
M. F., R. Nishiyama, M. Komatsu, Y. Nishino, N. Horinouchi, S. (2001) Cancer Che
mother Pharmacol 48(supp1), S20-6 40
- 10'. Smith,
J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J.,
Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and
Boeke, J. D. (2000) Proc Natl Acad Sci U
S A 97(12), 6658-63.
- 11'. Tanner,
K. G., Landry, J., Sternglanz, R., and Denu, J. M. (2000) Proc Natl Acad Sci U S
A 97(26), 14178-82.
- 12'. Landry,

- J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5807-11.
- 13'. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) *Nature* 403(6771), 795-800
- 14'. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D. (1995) *Genes Dev* 9(23), 2888-902.
- 15'. Tanny, J. C., and Moazed, D. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2), 415-20. 10
- 16'. Rine, J. H. I. (1987) *Genetics* 116(1), 9-22
- 17'. Wood, J. G., and Sinclair, D. A. (2002) *Trends Pharmacol Sci* 23(1), 1-4.
- 18'. Strahl-Bolsinger S, H. A., Luo K, Grunstein M. (1997) *Genes Dev* (11), 1 20
- 19'. Hecht, A. S.-B. S., Grunstein M. (1996) *Nature* 383(6595), 92-6
- 20'. Ghidelli, S. D. D., Dhillon N, Kamakaka RT. (2001) *EMBO* 20(16), 4522-35
- 21'. Shou, W., Sakamoto, K. M., Keener, J., Morimoto, K. W., Traverso, E. E., Azzam, R., Hoppe, G. J., Feldman, R. M. R., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneaux, H., Nomura, M., and Deshaies, R. J. (2001) *Mol. Cell.* 8(1), 45-55 30
- 22'. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990) *Cell* 63(4), 751-62.
- 23'. Smith, J. S., and Boeke, J. D. (1997) *Genes Dev* 11(2), 241-54.
- 24'. Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J., and Curcio, M. J. (1997) *Genes Dev* 11(2), 255-69.
- 25'. Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1997) *Cell* 91(7), 1033-42. 40
- 26'. Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999) *Genes Dev* 13(19), 2570-80.
- 27'. Park, P. U., Defossez, P. A., and Guarente, L. (1999) *Mol Cell Biol* 19(5), 3848-56
- 28'. Sinclair, D. A., Mills, K., and Guarente, L. (1998) *Trends Biochem Sci* 23(4), 131-4. 50

- 29'. Gottlieb,
S., and Esposito, R. E. (1989) *Cell*
56(5), 771-6.
- 30'. Kennedy,
B. K., Austriaco, N. R., Jr., Zhang, J., and Guarente, L. (1995) *Cell* 80(3), 485
-96.
- 31'. Lin,
S. J., Defossez, P. A., and Guarente, L. (2000) *Science* 289(5487), 2126-8.
- 32'. Anderson,
R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., Cohen, H., Lin, S. S., 10
Manchester, J. K., Gordon, J. I., and Sinclair, D. A. (2002) *J Biol Chem* 277(21)
, 18881-90.
- 33'. Tissenbaum,
H. A., and Guarente, L. (2001) *Nature*
410(6825), 227-30.
- 34'. Vaziri,
H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K.,
Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001) *Cell*
107(2), 149-59.
- 35'. Luo, 20
J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and
Gu, W. (2001) *Cell* 107(2), 137-48.
- 36'. Moazed,
D. (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13(2),
232-8.
- 37'. Sauve,
A. A., Celic, I., Avalos, J., Deng, H., Boeke, J. D., and Schramm, V. L. (2001)
Biochemistry 40(51), 15456-63.
- 38'. Borra,
M. T., O'Neill, F. J., Jackson, M. D., Marshall, B., Verdin, E., Foltz, K. R., 30
and Denu, J. M. (2002) *J Biol Chem*
277(15), 12632-41.
- 39'. Dietrich,
L. S. (1971) *Amer J Clin Nut* 24,
800-804
- 40'. Kaanders,
J. P. L., Marres HA, Bruaset I, van den Hoogen FJ, Merckx MA, van der Kogel AJ. (40
2002) *Int J Radiat Oncol Biol*
Phys 52(3), 769-78
- 41'. Knip, 40
M. D. I., Moore WP, Gillmor HA, McLean AE, Bingley PJ, Gale EA. (2000) *Diabetolo*
gia 43(11), 1337-45
- 42'. Foster,
J. W., Park, Y. K., Penfound, T., Fenger, T., and Spector, M. P. (1990) *J Bacter*
iol 172(8), 4187-96.
- 43'. Ghislain,
M., Talla, E., and Francois, J. M. (2002) *Yeast*
19(3), 215-224.
- 44'. Keil,
R. L., and McWilliams, A. D. (1993) *Genetics* 50

- 135(3), 711-8.
- 45'. Mills,
K. D., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999) *Cell* 97(5), 609-20.
- 46'. Hoppe,
G. T. J., Rudner AD, Gerber SA, Danaie S, Gygi SP, Moazed D. (2002) *Mol Cell Biol* 22(12), 4167-80
- 47'. Langley,
E. P. M., Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T.
(2002) *EMBO J* 21(10), 2383-2396
- 48'. Llorente, 10
B., and Dujon, B. (2000) *FEBS Lett*
475(3), 237-41.
- 49'. Sandmeier,
J. J., Celic, I., Boeke, J. D., and Smith, J. S. (2002) *Genetics* 160(3), 877-89.
- 50'. Miller,
A. N. K. (1984) *Nature* 312(5991),
247-51
- 51'. Kirchmaier,
A. L., and Rine, J. (2001) *Science*
291(5504), 646-50. 20
- 52'. Li,
Y. C., Cheng, T. H., and Gartenberg, M. R. (2001) *Science* 291(5504), 650-3.
- 53'. Gasser,
S. M., Gotta, M., Renauld, H., Laroche, T., and Cockell, M. (1998) *Novartis Found Symp* 214, 114-26
- 54'. Landry,
J., Slama, J. T., and Sternglanz, R. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 278(3), 685-90.
- 55'. Grozinger, 30
C. C. E., Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL. (2001) *J Biol Chem* 276(42),
38837-43
- 56'. Bedalov,
A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., and Simon, J. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26),
15113-8.
- 57'. Straight,
A. F., Shou, W., Dowd, G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D.,
and Moazed, D. (1999) *Cell* 97(2),
245-56.
- 58'. Armstrong, 40
C. K. M., Imai SI, Guarente L. (2002) *Mol Biol Cell* 13(4), 1427-38
- 59'. Min,
J. L. J., Sternglanz R, Xu RM. (2001) *Cell*
105(2), 269-79
- 60'. Hoshino,
J., Schluter, U., and Kroger, H. (1984) *Biochim Biophys Acta* 801(2), 250-8.
- 61'. Ijichi, 50
H. A. I., A. Hataishi, O. (1966) *J Biol*

Chem 241, 3701

62'. Hagino,

Y. L., J. Henderson, M. (1968) J Biol

Chem 243, 4980

63'. Smythe,

G. A., Braga, O., Brew, B. J., Grant, R. S., Guillemin, G. J., Kerr, S. J., and Walker, D. W. (2002) Anal Biochem

301(1), 21-6.

64'. Gasch,

A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) Mol

Biol Cell 11(12), 4241-57.

65'. Moskvina,

E. S. C., Maurer CT, Mager WH, Ruis H. (1998) Yeast 14(11), 1041-50

66'. Spellman,

P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998) Mol Biol Cell 9(12), 3273-97.

67'. Laurenson,

P., and Rine, J. (1992) Microbiol Rev

56(4), 543-60.

68'. Barton,

A. (1950) J Gen Microbiol 4, 84-86

69'. Kennedy,

B. K., Austriaco, N. R., Jr., and Guarente, L. (1994) J Cell Biol 127(6 Pt 2), 1 985-93.

【 0 3 4 3 】

実施例 3 : ニコチン酸は結合しないが、ニコチンアミドはSir2のCポケットに結合する

ニコチンアミドを、NAD⁺に結合させたアルケオグロブス-フルギドゥス（原語：Archaeoglobus fulgidus）のSir2(Sir2-Af1)の結晶構造にドッキングさせた（Protein Data Bank ID code 1ICI, Min et al. (2001). Crystal

structure of a SIR2 homolog-NAD complex. Cell 105, 269-279)。まずそれを Sir2-Af1 のC部位に QUANTA

(MSI, Inc.)を用いて手動でドッキングさせた。次に、エネルギー最小化計算を CHARMM (Brooks et al. (1983) J. Comput. Chem. 4, 187-217) で、Sir2-Af1 及び NAD⁺ (F = 2.4 Kcal/mol⁻²)の調和定数を用いて行なった。図 1 4 A - C は PYMOL (DeLano, W.L.

The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San

Carlos, CA, USA)を用いて作製された。

【 0 3 4 4 】

これらの研究は、ニコチンアミドがSir2を阻害すること（図 1 4 A - Cを参照されたい）、そして残基 D101（即ち酸性）が存在するために、ニコチン酸のSir2のCポケットへのドッキングが妨げられるために、ニコチン酸はSir2を阻害しないことを示している。

【 0 3 4 5 】

実施例 4 : PNC1 は寿命の延びを媒介する

図 1 7 A に示すように、PNC1 はNAD⁺再利用経路でアミド加水分解を触媒してニコチンアミドをニコチン酸に転化させる（図 1 7 B）。大半の野生型酵母株は21 - 23回の分裂という平均寿命を有し、最大の寿命は最高40回の分裂である。カロリー制限（0.5%のグルコース）又はヒートストレス（37℃）を与えた野生型株は非処理細胞（それぞれ2.0%グルコース又は30℃）よりも長い寿命を示した（図 1 7 C 及び D）。sir2D 株は短い寿命を有し、前の報告^{12,13}と合致するが、カロリー制限も熱もこの株の寿命を延ばさなかった（図 1 7 C 及び D）。pnc1D 株はこれらの条件のいずれでも寿命の延びを示さなかつ

10

20

30

40

50

たことから、

PNC1 は寿命の延びに必要であることが実証される。

【 0 3 4 6 】

驚くべきことに、非ストレス条件下（2% グルコース、30℃）では、PNC1（5xPNC1）のコピーを付加的に持つ株は野生型よりも70%長く生き、いくつかの細胞は70回分裂を超えて生き、これはこの生物で報告された最も長い寿命の延びである（図17E）。カロリー制限もヒートストレスもそれ以上、5xPNC1 株の寿命を増さなかった。5xPNC1 のバックグラウンドで SIR2 を欠失させると寿命が sir2D 株のそれにまで縮んだ（図17E）。pnc1D sir2D

二重変異体は、sir2D 変異体と同様な寿命を有しており（図17E）、その寿命はグルコース制限の影響を受けなかった。これは、PNC1 及び SIR2 が同じ経路で機能すること、そして PNC1 は

SIR2を通じて寿命を増すことを示すものである。

【 0 3 4 7 】

このように、これらの結果は、PNC1 が、カロリー制限及びヒートストレスの両者による寿命の延びに必要であること、そして、付加的なPNC1 があればこれらの刺激を模倣するには充分であることを実証している。我々のモデルによれば、PNC1 のコピーが付加的であると、ニコチンアミドが枯渇し、それによりSir2の阻害が外れて寿命が延びるのである。

【 0 3 4 8 】

実施例 5 : PNC1発現はストレス条件に応答して増す

S・セレビジエを様々なストレス条件下でインキュベートし、PNC1の発現レベルをウェスタン・プロットで測定した。2%グルコース完全培地（YPD）で成長させた酵母細胞で測定された PNC1量を1と設定した。下の表および図18は、この基準発現レベルと比較したときの様々な成長条件における倍誘導を示す：

【 0 3 4 9 】

【表5】

培養条件	比較したときの倍数
2.0% グルコース完全培地 (YPD)	1
0.5% グルコース完全培地 (YPD)	15
0.1% グルコース完全培地 (YPD)	25
規定完全培地 (SD)+ アミノ酸	5
規定完全培地 (SD)- アミノ酸	20
2% YPD でヒートショック (37 度で4時間)	20
浸透圧ストレス (0.1 M NaCl)	15

【 0 3 5 0 】

窒素制限によりPNC1発現が大きく誘導されたことも示されている。上記の「ストレス条件」、即ち0.2%グルコース完全培地（YPD）でない、の全てがS・セレビジエの寿命を延ばす（カロリー制限）ため、アミノ酸制限、塩ストレス及びヒートストレスを含め、PNC1の増加は検査したすべての条件で、そして酵母寿命を延ばすことが公知の全ての条件で、寿命の延びと相関する（図18C）。ストレス応答（Gash）のゲノム・ワイドなmRNAプロファイルを分析すると、PNC1がこの生物においてストレス及び飢餓に応答して最も応答性の高い遺伝子の一つであることが示された。PNC1レベルは、cAMPを低下させることによりカ

ロリ制限を模倣する *cdc25-10* 対立遺伝子を持つ細胞でも大きく誘導された (図 18B)。

【0351】

この応答が環境ストレスに特異的なものかどうかを検査するために、我々はPnc1レベルを、NAD⁺のデノボ合成に必要ではあるがカロリー制限による寿命の延びには必要でないBNA6/QPT1を欠失させた株で調べた¹²。この変異体ではPnc1レベルに変化はなかった (図 18B)。ウェスタン・プロット法では、処理細胞から採った抽出物中のPnc1活性はPnc1レベルに相関した (図 18D) ことから、これらの細胞でニコチンアミド加水分解が増加していることが実証された。このように、PNC1は、寿命を延ばす刺激によりその発現が調節される一番目の酵母長寿遺伝子である。

10

【0352】

従って、ここで更に解説する通りに、PNC1レベルを増加させて細胞の寿命を延ばす、又は、それらをストレスから防御する方法は、細胞内の天然事象を模倣するものである。

【0353】

実施例6：付加的なPNC1は急性ストレスに対する耐性をもたらす

他の種における寿命とストレス耐性との間の強い関係を念頭に、我々は、PNC1が付加的にあっても、ある範囲のストレスに対して耐性がもたらされるかどうかを検査した。よく特徴付けられている酵母のストレス耐性検査は、細胞の高濃度の塩許容能をである²⁶。我々は、5xPNC1株が高レベルのNaCl (600 mM) 及びLiCl (200 mM) の両者に対して野生型よりも劇的に耐性であることを見出した (図 19A)。また我々は、紫外線照射 (5 mJ/cm²) によるDNA損傷後の生存率も検査し、やはり、付加的なPNC1があると耐性がもたらされたことを見出した (図 19B)。ミトコンドリアDNAの損傷が哺乳動物の老化との関係を示唆されている²⁷ため、我々は更に、付加的なPNC1による、この種類のストレスからの防御能も調べた。絶対呼吸条件下 (炭素源として3% グリセロール) では、5xPNC1細胞は野生型よりも臭化エチジウムによるミトコンドリア変異誘発に対してより耐性であった (図 19C)。5xPNC1株のLiClに対する耐性増加はSIR2に依存的だった。驚くべきことに、この株のNaCl、紫外線及び臭化エチジウムに対する耐性はSIR2とは独立だった (図 19A - C)。これらの結果は、PNC1が長寿及びストレス耐性を促進することを実証するものであり、そしてSIR2はこの遺伝子の唯一の下流エフェクタではないことを示唆している。このように、ニコチンアミドはSir2以外のたんぱく質を調節している可能性が高い。

20

30

【0354】

実施例7：多種のストレス条件下におけるPNC1の細胞内局在化

我々は前に、NAD⁺再利用経路の二つの酵素、Npt1 (ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ) 及びNma2 (ニコチネートモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ) が核内に濃縮していることを示した²³。我々はもう一つの再利用経路酵素であるPnc1が同様な細胞内分布を有するかどうかを調べた。驚くべきことに、完全2% グルコース培地上で、Pnc1-GFPは細胞質、核、及び一個の細胞当たり3から6箇所の離散した細胞質内焦点位置に観察された (図 20A)。カロリー制限のある、又はストレスを受けた細胞は、蛍光強度に劇的な増加を示し、ウェスタンのデータと合致した。興味深いことに、アミノ酸制限又は塩ストレス条件下では、このパターンは変わり、蛍光は主に焦点位置に局在していた (図 20B)。このことは、Pnc1の局在化は異なるストレスにより個別の方法で調節されることを示している。

40

【0355】

該焦点位置の正体を判定するために、我々はPnc1-GFPと共局在化する細胞内マーカを探した。我々はペルオキシソーム標的化赤色蛍光たんぱく質 (REP) との著しい重複を観察した (図 20C)。更に、該Pnc1-GFP遺伝子座は、ペルオキシソームを形成できない *pex6D* 変異体ではもはや観察されなかった (図 20D)。我々のストレス研究ではPnc1のペルオキシソームへの局在化は調節を受けていると考えられることを示すため、我々は、このオルガネラへのその輸入を担うトランスポータを同定しようとした。Pex5は大半のペ

50

ルオキシソーム性たんぱく質を輸入するが、Pnc1 のペルオキシソームへの局在化には、余り用いられることのないトランスポータ Pex7 が必要であった（図 2 0 D）。核より外側の部位へのPnc1の局在化は、ニコチンアミドがSir2以外のたんぱく質を調節することを示した我々のストレス結果と合致する。ペルオキシソーム局在化は特に興味深い。なぜなら、これらのオルガネラは反応性酸素種の主要なソースであり、哺乳動物の老化に関与が示唆されてきたからである^{28, 29}。加えて、脂質代謝のうちの数多くの重要なステップがペルオキシソーム内で起き、最近、脂質シグナリングが塩許容に関係付けられている²⁶。付加的なPNC1があるときの塩耐性は、Pnc1のペルオキシソーム機能の結果かも知れない。

【 0 3 5 6 】

実施例 8 : 寿命及びストレス耐性は、細胞内ニコチンアミドにより負の調節を受ける

我々のモデルの予測の一つは、細胞内ニコチンアミド・レベルを何とかして操作すれば、Sir2活性を変化させるのに充分なはずである、というものである。Sir2活性のよくある指標は、rDNA (RDN1) に挿入されたレポータ遺伝子がサイレントになる程度である。NAD⁺レベルがサイレンシング効果に影響する可能性を除外するために、我々は細胞内ニコチンアミド・レベルを、NAD⁺再利用経路の外にある遺伝子を用いて操作することを試みた。ヒトにおいて、ニコチンアミド代謝の主要な経路はニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ (NNMT)³⁰を通じてである。NNMT はニコチンアミドを転化させてN'-メチルニコチンアミドにするが、このN'-メチルニコチンアミドは腎臓を通じて排出される³¹。相同性により、我々はS. セレビジエNNMT遺伝子を同定し、これを NNT1と命名した。Nnt1 は哺乳動物NNMTコア・ドメインに対して 23% 同一であり³⁰、S-アデノシルメチオニン (SAM)-依存のメチルトランスフェラーゼ³²の四つのシグナチャー・モチーフを含有する。

【 0 3 5 7 】

NNT1 を欠失させるとPNC1³³ の欠失と同様な脱サイレンシング表現型が起きた（図 2 1 A）。これらの結果は、rDNAサイレンシングが外因性ニコチンアミドの存在下で失われるという我々の発見と合致する（実施例 2）。予想通り、付加的な

NNT1 を持つ株は、付加的なPNC1²³を持つ株と同様にサイレンシングの増加を示した。我々は、寿命、ストレス耐性及びSir2活性は、細胞内ニコチンアミドやNNT1のレベルの変化により調節され得ると結論する。NNT1 は PNC1 表現型を模倣できるが、PNC1とは異なり、その発現は、寿命を延ばす刺激によって見かけ上、調節されることはない²⁵ことは注目に値する。

【 0 3 5 8 】

我々は、PNC1 を、細胞内ニコチンアミドを枯渇させることにより細胞の寿命及びストレス耐性を増すカロリー制限及びストレス応答性遺伝子として同定した（図 2 B）。我々は、カロリー制限による寿命の延びが、特異的な調節遺伝子により調和される能動的な細胞防御応答の結果であることを示す。この機序の魅力的な特徴は、それが細胞のホメオスタシスに関与する基本的なコファクターであるNAD⁺に基づかないことである。

【 0 3 5 9 】

まだ我々は、ニコチンアミド代謝に関与する遺伝子がどのようにして多くの急性ストレスに対する耐性をもたらすのかは知らない。おそらくは、Pnc1増加の利益は進化の代償として生じたのであろうが、いかなる淘汰上の不利益も我々は見出していない。我々のストレス及び局在化の両者の結果とも、ニコチンアミドにより調節される複数のエフェクターがあることを意味している。ニコチンアミドによるSir2阻害の酵素学に基づく（実施例 2 及び³⁴）、NAD⁺を二段階の反応で開裂させるたんぱく質が考えられる候補である。例には、Sir2 (Hst1-4) のホモログ及び Tpt1、折り畳まれていないたんぱく質応答を促進するNAD⁺-依存の2'-ホスホトランスフェラーゼ、がある³⁵。ニコチンアミド代謝が変化した細胞の発現プロファイリングは、これらのエフェクタや、ストレス耐性の下流の経路の同定に役立つはずである。

【 0 3 6 0 】

哺乳動物では、ニコチンアミドの代謝とストレス耐性との間の関係の証拠がある。Poly (アデノシンジホスフェート-リボース) ポリメラーゼ-1

10

20

30

40

50

(PARP) はNAD⁺
を開裂させて

poly(ADP-リボース) をアクセプタたんぱく質に共有結合させる核内酵素である。この二段階の反応によりニコチンアミドが生じるが、このニコチンアミドが阻害効果をPARP-1に及ぼして自己調節を可能にしている³⁶。PARP酵素は、DNA 損傷の修復、テロメア長の調節、ヒストンの修飾、及びICAM-1及び窒素氧化物シンターゼ³⁶を含む鍵となるたんぱく質の転写レベルでの調節を含め、数多くの細胞機能への関与が示唆されてきた。我々の結果は、PARP 酵素が、ニコチンアミド代謝により全体的ストレス応答の一部として調節を受けていると考えられることを示している。ニコチンアミドは更にヒト

SIRT1 を *in vitro* (実施例 2) 及び *in vivo*の両方で阻害する¹⁷。SIRT1 は p53 活性を負に制御するが、このことはニコチンアミド・レベルがアポトーシス及びDNA修復を調節している可能性を示唆するものである^{17,18}。これと合致して、ヒト細胞及び組織でのNMTの発現は腫瘍発生³⁷ 及び放射線抵抗性と相関する³⁸。

【 0 3 6 1 】

実施例 9 : 実施例 4 - 8 の材料及び方法

培地及び株 : 全ての株は、他に述べた場合を除き、30 で完全 2.0% (w/v) グルコース (YPD) 培地で成長させた。すべての実験で、我々は栄養要求性マーカが株間で一致していることを、空のベクタを組み込むことにより、確認した。欠失はすべて、kanMX6 PCR-ベースの技術³⁹ を用いて作られ、PCRで確認された。PNC1 の付加的なコピーを前述した通りに組み込んだ²³。開放読み取り枠全体及び700 塩基のNNT1 (YLR285w) 上流配列をゲノムDNA から PCRにより pSP400⁴⁰中にクローニングし、配列決定し、酵母ゲノム中に前に解説された通りに組み込んだ²³。組み込まれた遺伝子のコピー数はサザンプロット法で判定された。GFPカセットをインフレームで天然PNC1 遺伝子の3'側末端に前に解説された通りに導入した³⁹。RFP-PTS1 プラスミド(pSG421) はS.J. Gould 氏(Johns Hopkins U.)からの提供だった。PSY316AT由来株を寿命分析及びストレス耐性検定に用いた。PSY316ATから得た株 (MATa、ura3-53 leu2-3,112 his3-D200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R): pnc1D (YDS1741)、sir2D (YDS1750)、5xPNC1 (YDS1853)、5xPNC1 sir2D (YDS1851)、pnc1D sir2D (YDS1853)。W303由来株をウェスタンプロット分析、蛍光顕微鏡法及びSIR2 依存的サイレンシング検定に用いた。W303 (MATa、ade2-1、leu2-3,112、can1-100、trp1-1、ura3-52、his3-11,15、RDN1::ADE2、RAD5) 由来株には :

PNC1-GFP (YDS1742), pnc1D (YDS1911), nnt1D (YDS1747), 2xPNC1 (YDS1588), 2xNNT1 (YDS1926), ADE2 (YDS1596)がある。以下の株は PNC1-GFP (YDS1742) から得られた: bna6D (YDS1857)、pSG421 (YDS1916)、pex6D (YDS1869)、pex5D (YDS1870) 及び pex7D (YDS1871)。cdc25-10 株はL Guarente氏 (M.I.T.)からの提供だった。

【 0 3 6 2 】

酵母検定は以下の通りに行なわれた。寿命測定を前述した通りに²³ 行なったが、例外としてヒートストレス実験では、株を各剥離ごとに37 でインキュベートした。ストレス耐性検定は中間対数期細胞を用いて行なわれた。サイレンシングは前に解説した通りに検定された²³。

【 0 3 6 3 】

たんぱく質発現解析は以下の通りに行なわれた。株を予め、提示した条件下で処理し、中間対数期まで成長させた。ウェスタンプロットを前述した通り²³ に全細胞抽出物 (75 µg) を用いて行なった。たんぱく質を抗GFP 抗体 (Santa Cruz社) 又は抗アクチン抗体 (Chemicon社) を用いて検出した。蛍光顕微鏡画像を同じ露出(1 s) で100倍の倍率で Hamamatsu Orca100 CCD カメラを用いて取り込み、Openlab ソフトウェアで処理した。

【 0 3 6 4 】

ニコチンアミダーゼ活性検定を以下の通りに行なった。予め処理された中間対数期培養物から得られた抽出物中のPnc1の活性を前に解説された通りに判定した⁴¹。簡単に説明すると、0.16 mg のたんぱく質を 0 又は8 mM ニコチンアミドのいずれかと一緒に45分間、

30 で、10 mM

Tris pH 7.5、150 mM NaCl 及び 1 mM $MgCl_2$ から成る最終体積 400 μ l にしてインキュベートした。

Pnc1 活性は、反応性生物であるアンモニアの最終濃度をSigma社製アンモニア診断キットを用いて測定することにより、判定された。基線アンモニアは、ニコチンアミドなしのコントロールを減算することにより、斟酌された。ニコチンアミド活性は、生じたアンモニア nmol / / 分 / mg 総たんぱく質として表された。Pnc1 活性は、pnc1D 株のバックグラウンド値を減算することにより得られた (0.06 ± 0.004 nmol / 分 / mg)。

【0365】

実施例 4 - 9 の参考文献：

1. Masoro,
E. J. Exp Gerontol 35, 299-305.
(2000). 10
2. Masoro,
E. J. Exp Gerontol 33, 61-6. (1998).
3. Kirkwood,
T. B. & Holliday, R. Proc R Soc Lond
B Biol Sci 205, 531-46. (1979).
4. Holliday,
R. Food Bioessays 10, 125-7. (1989). 20
5. Kenyon,
C. Cell 105, 165-168 (2001).
6. Guarente,
L. & Kenyon, C. Nature 408,
255-62. (2000).
7. Kaeberlein, M. &
Guarente, Genetics 160, 83-95.
(2002).
8. Jiang et al. Faseb J 14, 2135-7. (2000).
9. Swiecilo et al. Acta Biochim Pol 47, 355-64 (2000). 30
10. Sinclair,
D. A. Mech Ageing Dev in press.
(2002).
11. Moazed,
D. Curr Opin Cell Biol 13, 232-8. (2001).
12. Lin et al. Science 289, 2126-8. (2000).
13. Kaeberlein et al. Genes Dev 13, 2570-80. (1999).
14. Sinclair,
D. A. & Guarente, L. Cell 91,
1033-42. (1997). 40
15. Tissenbaum, H. A. &
Guarente, L. Nature 410, 227-30. (2001).
16. Rogina
et al. Science, in press (2002).
17. Vaziri,
H. et al. Cell 107, 149-59. (2001).
18. Luo,
J. et al. Cell 107, 137-48. (2001).
19. Smith,
J. S. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 50

- 97, 6658-63. (2000).
20. Imai
et al. Nature 403, 795-800 (2000).
21. Tanny,
J. C. & Moazed, D. Proc Natl Acad Sci
U S A 98, 415-20. (2001).
22. Landry,
J. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 97,
5807-11. (2000).
23. Anderson, R. M. et al. J Biol Chem 277, 18881-90. (2002). 10
24. Bitterman et al. J. Biol. Chem. in press (2002).
25. Gasch, A. P. et al. Mol Biol Cell 11, 4241-57. (2000).
26. Betz et al. Eur J Biochem 269, 4033-9. (2002).
27. Melov,
S. Ann N Y Acad Sci 908, 219-25.
(2000).
28. Masters,
C. J. & Crane, D. I. Mech Ageing Dev
80, 69-83. (1995).
29. Perichon 20
et al. Cell Mol Life Sci 54, 641-52.
(1998).
30. Aksoy
et al. J Biol Chem 269, 14835-40.
(1994).
31. Matsubara
et al. Neurotoxicol Teratol 24, 593.
(2002).
32. Niewmierzycka,
A. & Clarke, S. J Biol Chem 274, 814-24. 30
(1999).
33. Sandmeier
et al. Genetics 160, 877-89. (2002).
34. Landry
et al. Biochem Biophys Res Commun
278, 685-90. (2000).
35. Spinelli
et al. J Biol Chem 274, 2637-44.
(1999).
36. Virag, 40
L. & Szabo, C. Pharmacol Rev 54,
375-429. (2002).
37. Lal,
A. et al. Cancer Res 59, 5403-7.
(1999).
38. Kassem
et al. Int J Cancer 101, 454-60.
(2002).
39. Longtine,
M. S. et al. Yeast 14, 953-61. 50

(1998).

40. Mills

et al. Cell 97, 609-20. (1999).

41. Ghislain

et al. Yeast 19, 215-224. (2002).

【0366】

実施例10: ヒトニコチンアミド

メチルトランスフェラーゼ (NMNAT) はヒト細胞に放射線抵抗性をもたらす

NMNAT (EC

2.1.1.1; CAS 登録番号 9029-74-7)は ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼとも呼ばれ、反応S-アデノシル-L-メチオニン + ニコチンアミド = S-アデノシル-L-ホモシステイン + 1-メチルニコチンアミドを触媒する酵素である (更に Cantoni (1951) J. Biol. Chem. 203-216を参照されたい)。放射線感受性ヒト細胞でヒトNMNATが過剰発現するとこの細胞の放射線抵抗性が増すことが見出された。

【0367】

実施例11: PBEF レベルはカロリー制限中のラットの血清で上方調節される

本実施例では、PBEFがカロリー制限を行なっているラット血清中に高レベル、存在することを解説する。

【0368】

オスのFischer-344

(F344) ラットをGerontology

Research Center (メリーランド州ボルチモア、GRC)で交配し、この動物育成施設で育成した。離乳(2週間)からラットを個々に標準的なプラスチック製ケージに容れ、床材はベータ・チップ・ウッドとした。コントロール動物には NIH-31標準食を適宜(AL)、与えた。生後1ヶ月齢で、カロリー制限(CR)した動物にビタミン及びミネラル補強した形の同じ食餌を

、前週にALラットが消費したより40% レベル少なくして(重量で)与えた。フィルタろ過し、酸性化した水は全グループで得られた。この飼育施設は25の温度、相対湿度は50%、12/12時間の明/暗周期(光は6:00 a.m.)に維持された。血清はすべて、絶食した麻酔下の動物から得られた。ラットを麻酔し、21番ゲージのカテーテルを尾の静脈に挿入した。その後、1.5 mlの全血を採集し、凝固(20-30分)させた後、20分間、2500 rpmで遠心分離した。AL又はCR試料から採った血清を遠心管から取り出し、プールした。2つの異なるプールのAL血清及び2つの異なるプールのCR血清を分析した。各プールした試料から採った2マイクロリットルの血清を、SDSを含有する試料緩衝液中で5分間、沸騰させることで変性させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)にかけた。たんぱく質をPVDFメンブレン(Immobilon(登録商標)-P、Sigma社、P2938)に移し、その後これを1時間、室温で5%脱脂粉乳のTBST溶液で遮断した。次にプロットを、NAMPRTモノクローナル又はポリクローナル抗体(Oberdan Leo博士より提供)を0.5%乳に入れてTBSTで希釈した1:1000希釈液で1時間、室温でプローブした。TBSTで5分間、3回洗浄した後、プロットを、適当な二次抗体を0.5%乳溶液中の西洋わさびペルオキシダーゼ

(Amersham Biosciences Anti-Mouse NA931V、又はr Molecular Probes Anti-Rabbit G21234)に結合させてTBSTに溶かしたものでプローブした。TBSTで10分間、3回洗浄した後、プロットを化学発光によりECL試薬(Amersham Biosciences, RPN2105)を用いて視覚化し、X線フィルム(Kodak BioMax XAR、1651454)で検出した。

【0369】

その結果を図22に示すが、この図では、カロリー制限したラットの血清中の高レベルのNAMPRTを示す。

【0370】

実施例12: PBEFレベルはストレス条件に応答して上方調節される

この実施例では、PBEFが、MEF細胞で血清飢餓及び酸化ストレスにより、そして心筋細胞で血清飢餓及び低酸素により、上方調節されることを示す。

【0371】

心筋細胞を1乃至2日齢のラットからNeonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical 社)を用いて調製し、5% FCS、10% ウマ血清 (HS) を含有するRPM I 1640 培地を入れた60 mm ペトリ皿で72時間、培養した。次に、培地を取り出し、血清を加えた、又は加えない培地に取り替えた。低酸素状態の場合、細胞を95% N₂/5% CO₂を飽和させた37℃の気密箱内に18時間、置いた。O₂飽和度は0.1% (Ohmeda 酸素モニタ、タイプ5120)だった。酸素正常状態の場合、細胞を37℃/5% CO₂インキュベータ内に18時間、入れておいてから採集した。MEFは、前に記載された通りに、妊娠マウスの13.5日齢胚から作製された (Razani et al., 2001)。コントロールMEF細胞を10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン/0.5% フンギゾンで補ったDMEMで24時間、培養した。細胞を飢餓状態にするために、MEFをPBSで洗浄し、2% BSA、1% ペニシリン/ストレプトマイシン/0.5% フンギゾンを含むDMEM中で24時間、培養した。更に酸化ストレス処理を施した細胞を、150マイクロモルのH₂O₂を含む同じ培地で1又は3時間、培養してから採集した。

10

【0372】

図23及び24に示すその結果は、NAMPRTが血清枯渇、酸化ストレス及び低酸素により上方調節されることを示している。

20

【0373】

実施例13: PBEF 転写はマウスのin vivo で絶食させることで上方調節される
8匹のオスの

Sprague-Dawley マウス、を各グループ (コントロール対絶食) 当り4匹にして用い、絶食によるNAMPRT遺伝子調節を比較した。コントロールマウスには適宜、Research Diets社により調製された78%のショ糖食を与えた。実験マウスは48時間、絶食させてからと殺した。新鮮な肝臓組織を取り出し、小さな切片にし、DNAlater試薬に浸してRNA調製を開始するまで4℃で保存した。

【0374】

全RNAはトリゾール (Invitrogen社) によりメーカーの推奨するプロトコルに従って組織から単離された。1µgのRNAをcDNAへの逆転写のプレートとして用いた。リアルタイムPCR LightCycler RT-PCR (Roche Molecular Biochemicals社) で非特異的 LightCycler DNA Master SYBR Green 染料を用いて行なってPCR産物を観察した。相対的NAMPRT mRNA コピーを -アクチンのそれに正規化した。NAMPRT断片を増幅するために用いたプライマは: AAATCCGCTCGACACTGTCCTGAA (SEQ ID NO: 23)、TTGGGATCAGCAACTGGGTCCTTA (SEQ ID NO: 24)だった。-アクチン断片を増幅するために用いたプライマは TTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGA (SEQ ID NO: 25)、TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC (SEQ ID NO: 26)だった。

30

【0375】

図25に示すその結果は、NAMPRT転写は、非絶食マウスに比較して絶食マウスでは上方調節されていることを示している。

40

【0376】

均等物

当業者であれば、ごく慣例的な実験を用いるのみで、ここに記載された本発明の具体的な実施態様の均等物を数多く認識され、又は確認できることであろう。このような均等物は以下の請求の範囲の包含するところと意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0377】

【図1】図1は、NPT1の量が増えるとカロリー制限を模倣することにより老化が遅れるこ

50

とを示す。細胞分裂停止までに各母細胞から生じる娘細胞の数を計数することにより寿命を判定した(7,10)。細胞は完全グルコース培地上で最小48時間、予め成長させた。A、

2%のグルコースを加えた培地上の野生型 (PSY316AT、丸)、2xNPT1(YDS1544、ダイヤモンド) 及び 5xNPT1 (YDS1548、三角) の死亡率曲線を。平均寿命はそれぞれ 21.9、30.8 及び35.1 世代だった。B、2%グルコース培地上の野生型 (PSY316AT、丸)、sir2::TRP1 (YDS1594、下向き三角)、2xNPT1 (YDS1544、四角)、sir2::TRP1 2xNPT1 (YDS1573、ダイヤモンド) 及び5xNPT1 2xSIR2 (YDS1577、上向き三角) の死亡率曲線。平均寿命はそれぞれ23.7、14.4、13.9、31.0 及び 31.9 世代だった。C、野生型の2%グルコース上 (PSY316AT、丸) 及び 0.5% グルコース培地上 (PSY316AT、四角) 並びに 2xNPT1 の0.5% グルコース培地上 (YDS1544、三角)の死亡率曲線。平均寿命はそれぞれ21.9、31.7 及び 34.5 世代だった。 10

【図2】図2は、NPT1 及び SIR2 がヒートショックに対する耐性を提供することを示す。A、株をジオーキシック (原語: diauxic) シフト後から3日間、SC培地で成長させ、55 で1時間、インキュベートしてから、SCプレート上に10倍希釈液にしてプレートした。B、株をAの通りに処理し、SC上に低密度でプレートした。24時間後に生じたコロニーを計数し、未処理の試料から生じたコロニーのパーセンテージで表した。数値は三つの独立した実験の平均を表す (+/- s.d.)。株: W303AR URA3 (YDS1568)、W303AR URA3 LEU2 (YDS1563) 及びW303AR、2xNPT1-URA3 (YDS1503)、2xSIR2-URA3 (YDS1572) 及び 2xNPT1-URA3 2xSIR2-LEU2 (YDS1561) の同質遺伝子由来株。

【図3】図3は、サイレンシング及びrDNA安定性が増すことを示す。A、ADE2 マーカをrDNA に持つ株をSCプレート上で予め成長させ、10倍連続希釈液にしてSCプレート上にスポットした。アデニンを欠く培地上での成長遅延により、サイレンシングが示されている。株: W303-1A ADE2 (YDS1596)、W303-1A RDN1::ADE2 (W303AR5) 及び W303AR5 由来株 2xNPT1 (YDS1503)、2xSIR2 (YDS1572) 及び 2xNPT1 2xSIR2 (YDS1561)。B、JS237の同型由来株を0.07% PbNO₃ を含有するリッチな培地に画線し5日間30 でインキュベートすることにより、rDNA 遺伝子座にある MET15 のサイレンシングを検定した。茶色の色素の蓄積によりサイレンシングの増加が示されている。関係する遺伝子型: met15D (JS209)、MET15 (JS241)、RND1::MET15 (JS237)、sir2::TRP1 (JS218)、2xSIR2 (YDS1583)、2mSIR2 (YDS1522)、npt1D::kan^r (YDS1580)、2xNPT1 (YDS1581) 及び 2mNPT1 (YDS1493)。C、rDNA遺伝子座にある ADE2 マーカのサイレンシングを、以下のバックグラウンド: 野生型 (W303AR5、YDS1503、YDS1496)、sir2::TRP1 (YDS878、YDS1504、YDS1494)、sir3::HIS3 (YDS924、YDS1505、YDS1587)、及び sir4::HIS3 (YDS882、YDS1506、YDS1495)に 1xNPT1、2xNPT1、及び 2 μ NPT1 を持つ株で判定した。D、テロメアに ADE2 マーカを持つ株を、限られた量のアデニンを含有するSC培地上に画線した。赤色の色素の蓄積によりサイレンシングの増加が示されている。関係する遺伝子型: (PSY316AT)、2xNPT1 (YDS1544)、5xNPT1 (YDS1548)、5xNPT1 2xSIR2 (YDS1577) 及び 5xNPT1 SIR2::TRP1 (YDS1573).sir2::TRP1 (YDS1594)。E、Aの株を、rDNA遺伝子座に組み込まれたADE2 マーカの消失速度を調べることに、rDNA安定性について検定した。細胞をYPD 培地上にプレートし、1回目の細胞分裂でのマーカ消失事象を反映する、半扇型になったコロニーの頻度を測定した。10,000個を超えるコロニーを各株について調べ、各実験を三重に行なった。一回の細胞分裂当りの平均組換え頻度 (+/- s.d.) を示す。F、野生型 (W303AR)、sir2::TRP1 (YDS878) 及び 2xNPT1 sir2::TRP1 (YDS1504) 株のリボゾームDNA組み換え率。検定は(E)の通りに行なわれた。 20 30 40

【図4】図4は、カロリー制限及びストレスに応答した NPT1 の発現を示す。A、3xHA(SEQ ID NO: 49) タグ配列をインフレームで、W303AR5 (YDS1531) 及び W303cdc10-25 (YDS1537)の天然NPT1 ORFの 3'側末端に挿入した。細胞をYPD培地で30 で成長させ、記載された通りに処理した。NPT1 mRNA のレベルを、YPD (0.5% 及び 2.0% グルコース)中で成長させた W303AR5と、YPD (2% グルコース)で成長させた W303cdc25-10 について調べた。1.8 kb のNPT1 転写産物を検出し、レベルをアクチン (ACT1) コントロールに正規化した。同様な結果は、PSY316 株バックグラウンドでも得られた(図示せず)。B、 50

A の培養物からのたんぱく質抽出物をウェスタンブロット法で分析して、HA-タグ付きNpt1 を -H A 抗体を用いて検出した。53kD 及び 40 kDの二本のバンドがNpt1-HA 株で検出され、タグのないコントロール株では何のバンドも検出されなかった（図示せず）。アクチン・レベルを充填コントロールとして役立てた。同様な結果は、PSY316株バックグラウンドでも得られた（図示せず）。C、NPT1 mRNA のレベルを野生型 W303AR5 (YDS1531) 対数期培養株で、以下：MMS (0.02% v/v)、パラコート (5mM)、又はヒートショック (55°C)に暴露してから1時間後に調べた。D、Cの培養物のタンパク質抽出株をBの通りに分析した。E及びF、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をインフレームでW303AR5 (それぞれ YDS1611 及び YDS1624)の天然 NPT1 及び NMA2 ORF の3'側に挿入した。細胞を30のYPD培地で対数期中期まで成長させ、生きたまま撮影した。画像を重ねると、GFP(緑色) 及び Hoechst DNA 染料(偽の赤色) が重なった領域は黄色に見える。

【図5】図5は、NAD⁺再利用率経路中の多重制限成分を示す。A、S.セレビジエにおけるNAD⁺生合成中の、サルモネラの公知のステップに基づく推定ステップ。各ステップを媒介すると考えられる酵母遺伝子をイタリックで示す。NaMN、ニコチン酸モノヌクレオチド；NaAD、デスアミド-NAD⁺；NaM、ニコチンアミド；Na、ニコチン酸。Smith et al. (2000)から適合させたもの。B、株ADE2 (YDS1596)、野生型 (W303AR5)、2xNPT1 (YDS1503)、2xPNC1 (YDS1588)、2xNMA2 (YDS1589)、2xNMA1 (YDS1590)、及び 2xQNS1 (YDS1614)におけるrDNA遺伝子座にあるADE2のサイレンシング。アデニンを欠く培地上の成長遅延により、サイレンシングの増加が示されている。C、テロメアにADE2マーカを持つ株を、制限量のアデニンを含有するSC培地上に画線した。赤色の色素の蓄積によりサイレンシングが示されている。検査された株：野生型 (PSY316AT)、2xNPT1 (YDS1544)、5xNPT1 (YDS1548)、sir2::TRP1 (YDS1594)、2xPNC1 (YDS1591)、2xNMA2 (YDS1592) 及び 2xNMA1 (YDS1593)。

【図6】図6は、NAD⁺再利用率経路を通るフラックスの増加による寿命の延びのモデルを示す。Sir2 及び Hst1-4などのタイプIヒストン脱アセチル化酵素は、NAD⁺をニコチンアミドに転化することで、この再利用率経路の鍵となる段階を触媒する。PNC1、NPT1、NMA1 及び NMA2 の付加的なコピーがあると、NAD⁺再利用率経路を通るフラックスが増加してSir2活性が刺激され、寿命が増す。QNS1 のコピーが付加的にあってもサイレンシングは増加しない。なぜなら、この経路の他のステップとは異なり、その基質は再利用率経路の外のソースから供給され得ず、従って反応が限られるからである。略語：NAD⁺、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド；NaMN、ニコチン酸モノヌクレオチド；NaAD、デスアミド-NAD⁺。

【図7】図7はNAD⁺再利用率経路を示す。Sir2により生じるニコチンアミドはPnc1によりニコチン酸に転化させるが、その後3段階でNAD⁺に戻される。略語：NAD⁺、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド；NaMN、ニコチン酸モノヌクレオチド；NaAD、デスアミド-NAD⁺。

【図8】図8は、ニコチンアミドがテロメア及びrDNAサイレンシングを阻害することを示す。A、rDNA 遺伝子座でのサイレンシングを JS237 (RDN1::MET15) の同種遺伝子型由来株を 0.07% PbNO₃と、0、1、又は5 mM ニコチンアミドのいずれかとを含有するリッチな培地に画線することにより、検定した。MET15 マーカのサイレンシングは茶色の色素の蓄積で示されている。RDN1::MET15 株での一つの暗褐色のコロニーはマーカ消失事象を表す。関係する遺伝子型：met15D (JS209)、MET15 (JS241)、RDN1::MET15 (JS237)、sir2::TRP1 (JS218)、2xSIR2 (YDS1583)。B、ADE2 マーカをテロメアに持つ株を、限られた量のアデニンと、0 又は5 mM ニコチンアミドのいずれかとを含有するSC培地上に画線した。ADE2 マーカがサイレントになると赤色の色素が蓄積する。関係する遺伝子型：(PSY316AT)、W303-1A ADE2 (YDS1596) 及び W303-1A ade2 (YDS1595)。

【図9】図9は、ニコチンアミドがrDNA 組換えを増し酵母寿命を縮めることを示す。A、株を、rDNA遺伝子座に組み込まれたADE2マーカの消失速度を調べることで、rDNA安定性について検定した。細胞を、5 mM ニコチンアミド (NAM) を加えた、又は加えない2%グルコースYPD培地にプレートし、一回目の細胞分裂でのマーカ消失事象を反映する、半扇形

になったコロニの頻度を測定した。10,000個を超えるコロニーを各株について調べ、各実験を三重に行なった。一回の細胞分裂当りの平均組換え頻度 (\pm s.d.) を示す。関係する株: W303-1A RDN1::ADE2 (W303AR5) 及びW303AR5 由来株 2xSIR2 (YDS1572) 及び sir2::TRP1 (YDS878)。B、ニコチンアミド (NAM) 及びニコチン酸 (NA) の構造の比較。C 及び D、細胞分裂停止までに各母細胞が生じる娘細胞を計数することにより、寿命を判定した (68', 69')。細胞は完全グルコース培地上で最小 48 時間、予め成長させた。C、野生型 (PSY316AT) 及び sir2::TRP1 (YDS1594) 株の 0 又は 5 mM ニコチンアミド (NAM) 上における死亡率曲線。平均寿命はそれぞれ wt: 22.4、12.1 及び sir2: 12.1、11.7 だった。D、C からの野生型及び sir2 株の、0、5 mM 又は 50 mM ニコチン酸 (NA) の存在下における死亡率曲線。平均寿命は wt: 22.4、26、25 及び sir2: 12.1、12.2 だった。

【図 10】図 10 は、ニコチンアミドが周期中及び G1 停止期の両方でサイレントな接合型遺伝子座 (HMR) を抑制解除することを示す。A、ADH 駆動性 GFP 転写産物を HMR 遺伝子座 (YDS970) に組み込ませて含有する PSY316 細胞を、30 の YPD 培地で対数期中期まで成長させ、5 mM ニコチンアミド (NAM) で提示した時間、処理した。細胞を生きたまま、撮影した。B、株 YDS970 又は同質遺伝子型株 sir4D 変異体 (YDS1499) を 5 mM ニコチンアミド (NAM)、5 mM ニコチン酸 (NA) 又は 5 mM キノリン酸 (QA) のいずれかで処理した。蛍光活性化セルソーティング (FACS) で細胞を分析して ADH-GFP 発現の程度を判定した。C、株 YDS970 (YDS1005) の MATa 由来株から HML を欠失させ、10 μ g/ml アルファ因子で 3 時間、処理した。その後細胞を 5 mM ニコチンアミドの存在下で提示した時間、成長させ、FACS で上述の通りに調べた。細胞周期の進行を各時点で、ヨウ化プロピジウム染色された細胞の FACS 分析により観察した。

【図 11】図 11 は、ニコチンアミドが Sirタンパク質の局在化を変化させないことを示す。SIR2-GFP (YDS1078) (C 及び D)、SIR3-GFP (YDS1099) (E 及び F)、又は GFP-SIR4 (YDS1097) (G 及び H) のいずれかを含有する野生型株と、SIR3-GFP (YDS1109) (A 及び B) を発現する同質遺伝子型の sir2 由来株とを、5 mM ニコチンアミドの存在下で 2 時間、成長させた。GFP 蛍光を生きた細胞で検出した。

【図 12】図 12 は、Sir2 がニコチンアミドの存在下ではテロメア由来の DNA とも、あるいは接合型遺伝子座由来の DNA とも結合しないことを示す。A 及び B、ポリクロナル Sir2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を、sir2 (YDS878) (A) 又は野生型 (W303AR5) (B) 株 のいずれかから採った抽出物で、5 mM ニコチンアミド (NAM) の存在下で行なった。全細胞抽出物及び免疫沈降させたクロマチンから採った両方の投入 DNA の PCR 増幅を示す。PCR は、CUP1 遺伝子 (一番上のパネル)、5S rDNA (2 番目のパネル)、HMR 遺伝子座 (3 番目のパネル)、又はテロメア由来のサブテロメア DNA 1.4 及び 0.6 kb (一番下のパネル) に特異的なプライマ・ペアを用いて行なわれた。プライマの配列を表 4 に挙げる。

【図 13】図 13 は、ニコチンアミドが in vitro で酵母 Sir2 及びヒト SIRT1 の強力な非競合的阻害剤であることを示す。A、組換え GST-タグ付き Sir2 をアセチル化した基質と一緒に、30 分間、30 で 1 mM DTT、200、350、500 又は 750 μ M の NAD⁺ 及び提示した濃度のニコチンアミドの存在下でインキュベートした。顕色剤を加えて反応を終了させ、試料を分光法で分析した (励起を 360 nm そして放出を 460 nm に設定)。実験は三重に行なわれた。データは、任意の蛍光単位 (AFUs) min⁻¹ 対 NAD⁺ (mM) のラインウィーバー - パーク二重逆数プロットで示す。B、実験は A の通りに行なわれたが、例外として、組換えヒト SIRT1 を使い、反応は 37 で行なわれた。C、脱アセチル化反応を三重にして 2.5 μ g の SIRT1、1 mM DTT、200 μ M NAD⁺ と、50 μ M の水ブランク、DMSO ブランク、ニコチン酸、シルチノール、M15、スプリトミシン又はニコチンアミドを用いて行なわせた。反応は 37 で 30 分間、行なわせ、蛍光は A の通りに測定された。

【図 14】図 14 A - C は、ニコチンアミドが Sir2-Af1 の保存 C ポケットにドッキングすることを示す。(A) 左側のパネルは、Sir2-Af1 の表面画像の前面図を示し、結合した NAD⁺ を紫色で、そして赤色の矢印はアセチル-リジン結合トンネルを指している。C 部位は点線の濃い青緑色の曲線で示す。右側のパネルは破線に沿って切断し、その垂直軸周り

に 90 度回転させた該タンパク質を示す。C 部位の保存残基の表面は濃い青緑色になっている。(B) A の右側パネルに描かれた黒色の矩形の近接図面であり、Sir2-Af1 の C ポケット深くにドッキングしたニコチンアミドを示す。(C) C ポケットの保存残基に取り囲まれた、ドッキングしたニコチンアミド(緑色)の立体図を示す。推定上の相互作用は、水素結合(青色)、静電的結合(マゼンタ)及びファンデルワールス(黄色)結合を含め、破線で示されている。

【図 15】図 15 は、NPT1 ホモログ(それぞれ出現の順序で SEQ ID NOS 41-44)のアライメントを示す。

【図 16】図 16 は、PNC1 ホモログ(それぞれ出現の順序で SEQ ID NOS 16、45-48、及び 4)のアライメントを示す。

【図 17】図 17 A - E は、カロリー制限及びヒートストレスが寿命を PNC1-依存的に延ばすことを示す。(A) Pnc1 はニコチンアミドのニコチン酸への転化を触媒する。(B) 酵母において NAD^+ はトリプトファンからデノボ合成され、ニコチンアミドから NAD^+ 再利用経路を通じて再循環させられる。(C) グルコース制限による寿命の延びには、PNC1 が必要である。2.0%(w/v) グルコースを含有する完全培地の上での平均寿命は：野生型、(21.6); pnc1D、(19.1); sir2D、(14.2)だった。0.5% グルコース上での平均寿命は：野生型、(32.7); pnc1D、(18.1); sir2D、(14.7)だった。(D) 弱いストレスへの暴露による寿命の延び。30 では、平均寿命は：野生型、(19.4); pnc1D、(18.5); sir2D、(12.0)だった。平均寿命は：野生型、(23.4); pnc1D、(17.5); sir2D、(10.6)だった。(E) PNC1 が付加的にあると寿命が SIR2-依存的に延びる。2.0% グルコース/30 での平均寿命：野生型、(19.7); 5xPNC1、(36.1); sir2D、(14.2); 5xPNC1 sir2D、(15.1); pnc1Dsir2D、(14.4)だった。

【図 18】図 18 A - D は、Pnc1 レベル及び活性がカロリー制限及びストレスに応答して上昇することを示す。(A) 抗-GFP抗体を用いた酵母全細胞抽出物中の Pnc1-GFP の検出。アクチン・レベルが充填コントロールとして含まれている。抽出物は、2.0%、0.5% 又は 0.1% グルコース (w/v) を加えた完全培地で成長させた対数期中期野生型株から作製された。(B) 対数期中期野生型の cdc25-10 又は bna6D 株から採られた抽出物中で、上記の通りに検出された Pnc1-GFP レベル。(C) 対数期中期野生型株から採られた抽出物中の、上述の通りの Pnc1-GFP レベルの検出。培養物は以下の条件下で成長させた：完全培地(処理なし)、規定培地(SD)、アミノ酸(a.a.)制限(非必須アミノ酸を欠くSD)、塩ストレス(NaCl、300 mM)、ヒートストレス(37)、ソルビトール(1M)。(D) 提示した条件下で成長させた対数期中期野生型株の細胞抽出物から採った Pnc1 によるニコチンアミドの脱アミン化の測定。図示の数値は三つの独立した実験の平均である。活性は、生じたアンモニアの nmol / 分 / 総タンパク質で表されており、 \pm s.d: 2.0% グルコース 0.90 ± 0.26 、0.1% グルコース 4.38 ± 0.43 、37 3.28 ± 0.32 、ソルビトール(1 M) 3.75 ± 0.65 。

【図 19】図 19 A - C は、PNC1 が急性ストレスに対する耐性をもたらすことを示す。

(A) 付加的な PNC1 があると塩ストレスへの耐性をもたらされる。対数期中期コロニーの細胞を 600 mM NaCl 又は 200 mM LiCl を含有する完全培地上にならし、4 日間、25 でインキュベートした。標準的な酵母培地(2% グルコース、25)上では、野生型、5xPNC1、又は 5xPNC1 sir2D 株間の成長速度に何の検出可能な違いもなかった。(B) 付加的な PNC1 があると紫外線誘導性損傷から SIR2 とは独立に防御される。対数期中期培養株の細胞を低密度で完全培地にプレートし、紫外線(5 mJ/cm²、254nm)に暴露した。30 の暗室内で 3 日間、成長させた後のコロニー形成能により、生存率を判定した。数値は生存率 \pm s.e. で表す。(C) PNC1 は SIR2 とは独立な防御をミトコンドリア DNA 損傷に対してもたらす。完全 3% (v/v) グリセロール培地及び 10 μ g/ml 臭化エチジウム(EtBr)上に画線した対数期細胞のミクロコロニー分析。少なくとも 100 個のミクロコロニーを 3 日後に 2 つの独立した実験で計数した。コロニー一個当りの細胞数 \pm s.e. は：野生型 6.92 ± 0.06 、5xPNC1 18.72 ± 0.53 、及び 5xPNC1 sir2D 16.15 ± 2.82 だった。臭化エチジウムを加えた完全 2% (w/v) グルコース培地上のこれらの株間には、成長に何の違いも検

10

20

30

40

50

出されなかった。

【図 2 0】図 2 0 A - D は、Pnc1-GFP が細胞質及び核に局在化しており、ペルオキシソームに濃縮されていることを示す。(A) Pnc1-GFP 蛍光が、2.0% グルコース (制限なし)、又は 0.5% もしくは 0.1% グルコース (Glu) を含有する完全培地で成長させた対数期中期野生型株から採った細胞で検出された。(B) 以下の条件下で成長させた野生型株から採った細胞中の Pnc1-GFP の検出：アミノ酸 (a.a) 制限 (非必須網の段を欠く SD)、塩ストレス (300 mM NaCl)、ヒートストレス (37)。(C) 対数期中期野生型株から採った細胞中の Pnc1-GFP (緑色) 及び RFP-PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal 1) (red) の同時局在化。黄色は重複を示す。株は、蛍光の視覚化が簡単になるように 0.5% グルコースを含有する培地で成長させた。(D) ペルオキシソーム変異株、pex6D、pex5D 及び pex7D の対数期中期株から採った細胞中の Pnc1-GFP の局在化。株は、蛍光の視覚化を促進するために 0.5% グルコースを含有する完全培地で成長させた。画像はすべて、1 秒という同じ露出にして撮影された。

10

【図 2 1】図 2 1 A - B は、ニコチンアミド代謝を操作すると SIR2 依存的サイレンシングに提供が出来ることを示す。(A) サイレncシングを測定するために、ADE2 レポータをリボゾーム DNA (rDNA) 遺伝子座に組み込んだ。この系では、アデニンを欠く培地での成長増加は ADE2 サイレncシングの低下を示している。株を 10 倍連続希釈液にして、アデニンを加えた、又は加えないプレート上にスポットした。Ade⁺ 株をコントロールとして役立てた。(B) ニコチンアミドによる寿命及びストレス耐性の調節のモデル。カロリー制限、熱及び浸透圧ストレスを含む非対応の環境刺激を長寿及びストレス耐性の共通経路への入力値として役立てた。細胞は、ニコチンアミドをニコチン酸に転化させる酵素をコードする PNC1 の転写を誘導することにより、これらの入力値に対する応答を調和させる。Sir2 の阻害を軽減し、長寿を促進することに加え、ニコチンアミドを枯渇させると、ストレス耐性やおそらくは他の細胞内ストレスにも関与する数多くの付加的な標的タンパク質が活性化する。

20

【図 2 2】図 2 2 は、細胞外 NAMPT タンパク質レベルが、カロリー制限を施したラットの血清中で高くなっていることを示す。

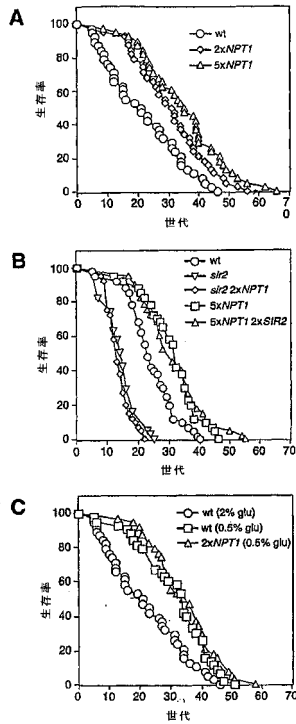
【図 2 3】図 2 3 A は、処置なし、血清枯渇、又は H₂O₂ による酸化的ストレスを加えた MEF 細胞中の NAMPT 及び ベータ-チューブリンの細胞内レベルを示すウェスタン・プロットである。図 2 3 B は、図 2 3 A のウェスタン・プロットから採った細胞内 NAMPT の相対的レベルを示す図である。

30

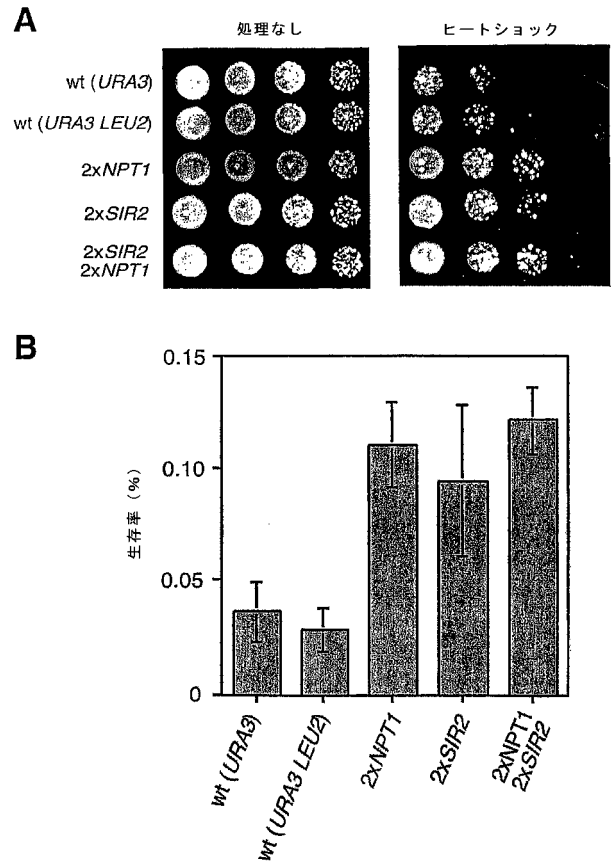
【図 2 4】図 2 4 A は、処置なし、血清枯渇又は低酸素に暴露した心筋細胞中の細胞内 NAMPT 又は GAPDH のレベルを示すウェスタン・プロットである。図 2 4 B は、図 2 4 A のウェスタン・プロットから採った NAMPT の相対的レベルを示す図である。

【図 2 5】図 2 5 は、通常食のマウスと 48 時間絶食マウスの細胞で、リアルタイム RT-PCR で測定したときの NAMPT の mRNA の相対的コピー数を、ベータ-アクチン mRNA コピー数に比較して示すヒストグラムである。

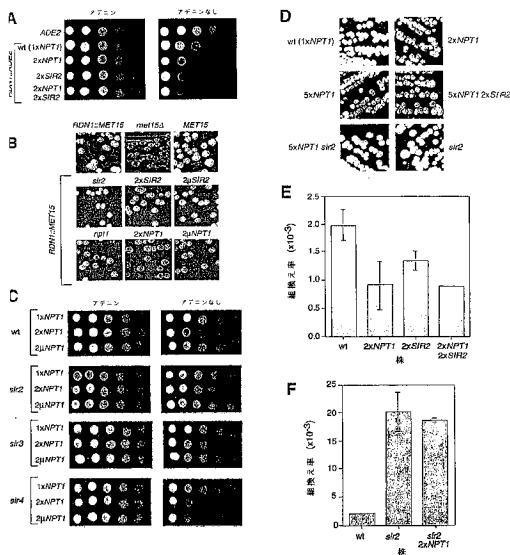
【図 1】



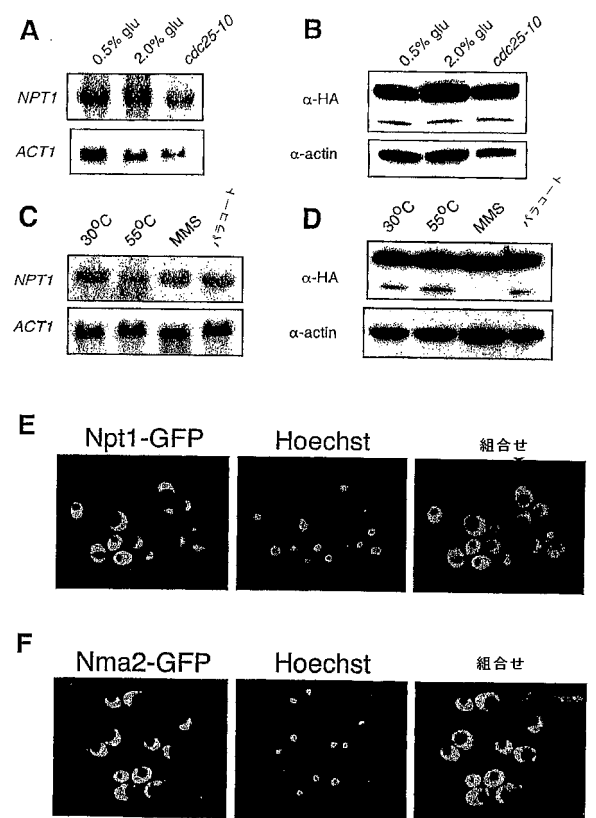
【図 2】



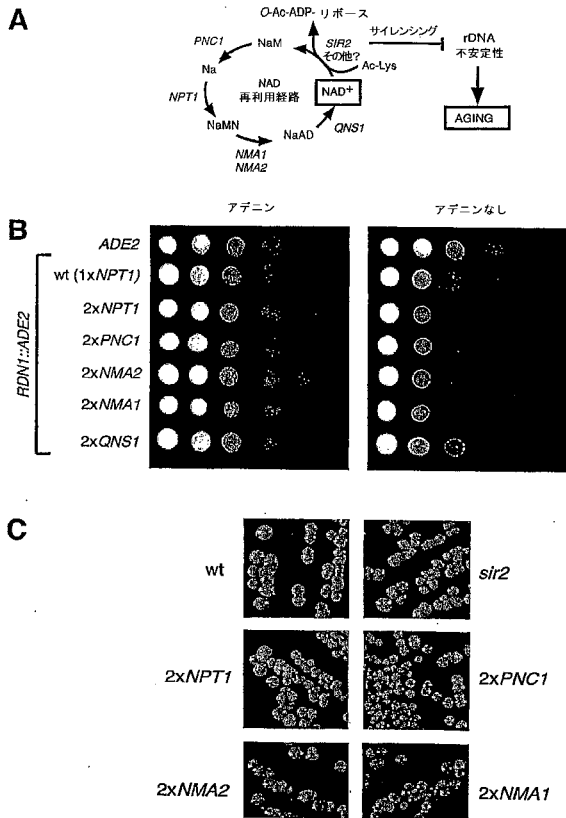
【図 3】



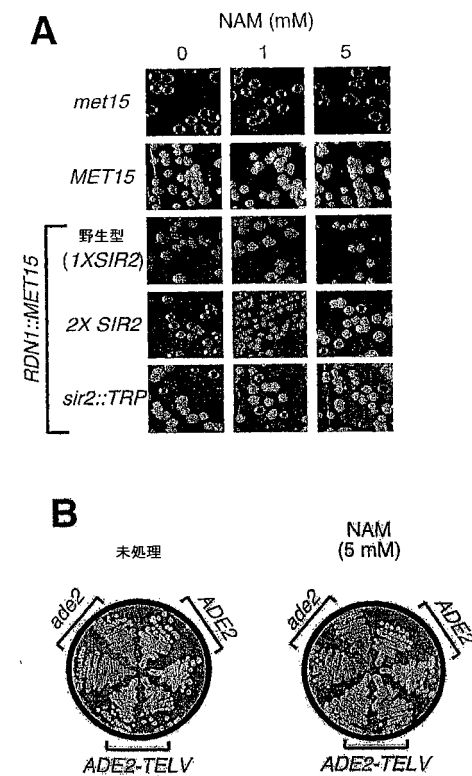
【図 4】



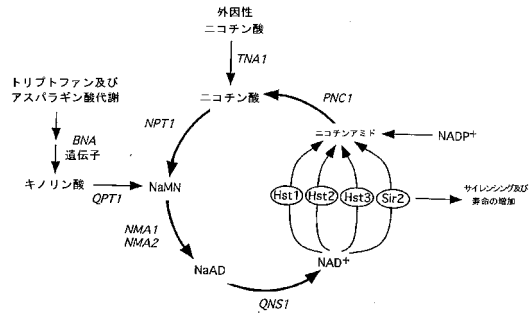
【 図 5 】



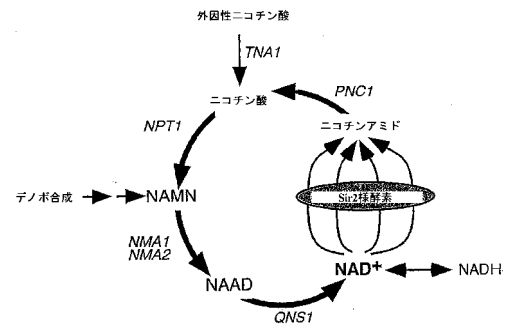
【 図 8 】



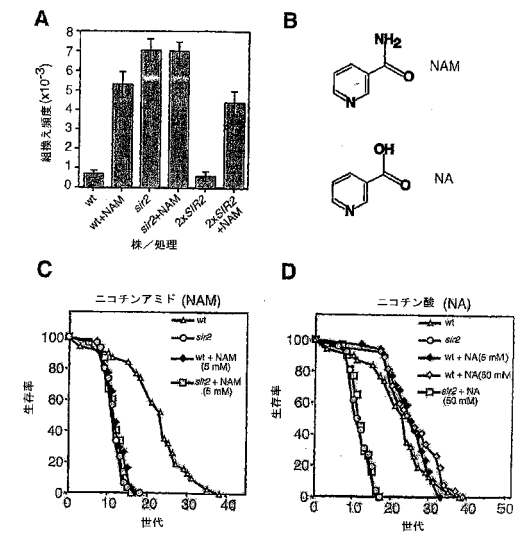
【 図 6 】



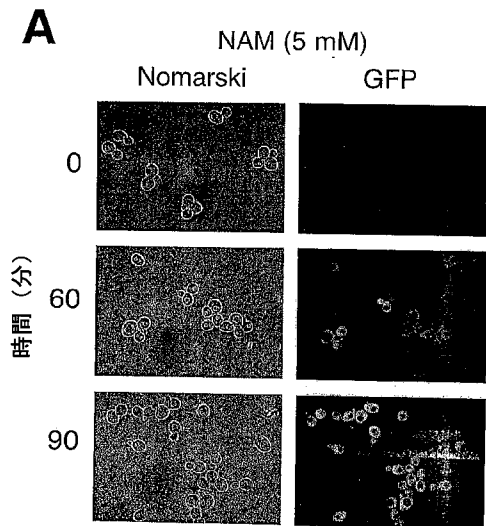
【 図 7 】



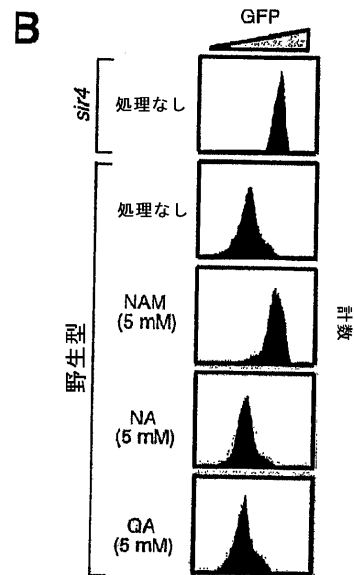
【 図 9 】



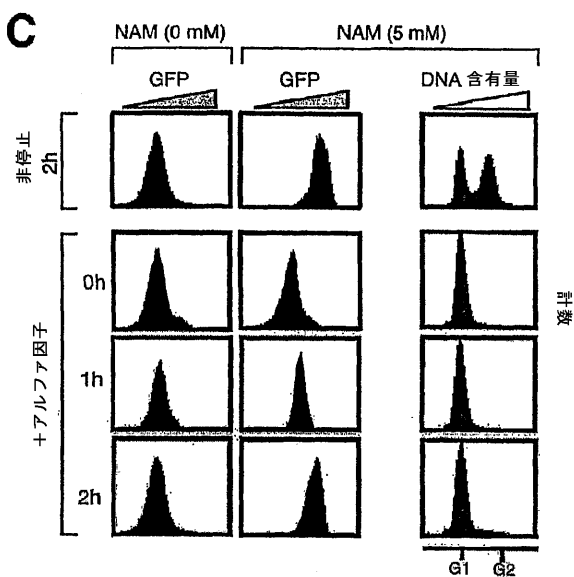
【図 10 A】



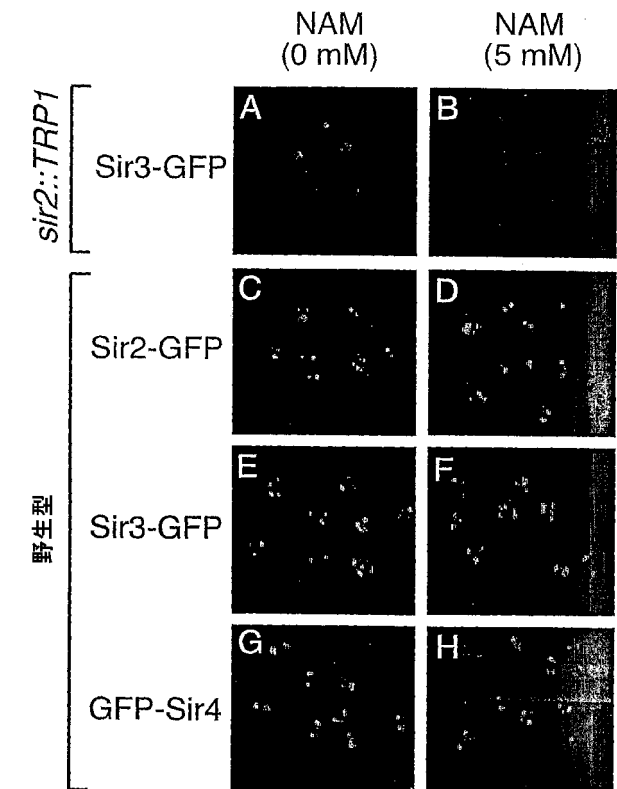
【図 10 B】



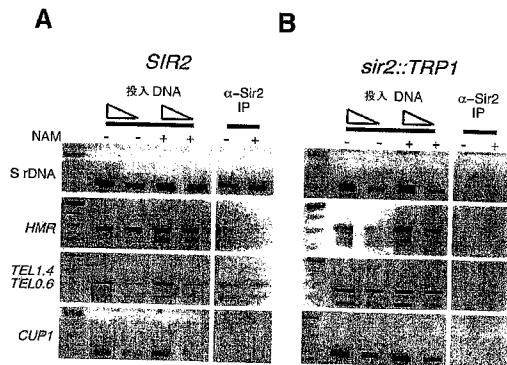
【図 10 C】



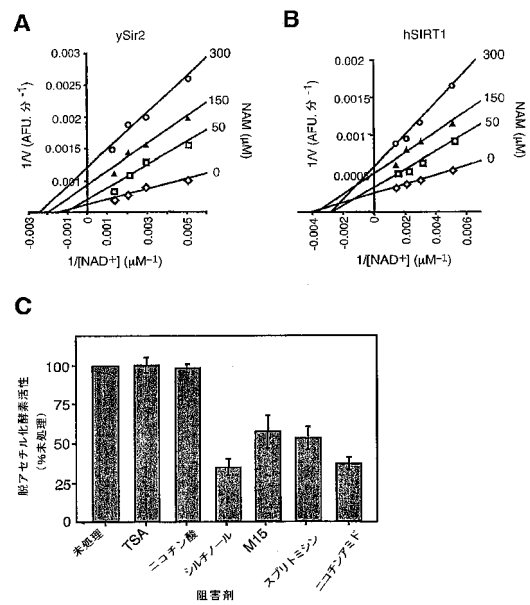
【図 11】



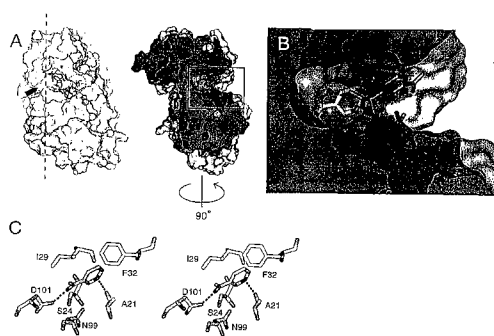
【 図 1 2 】



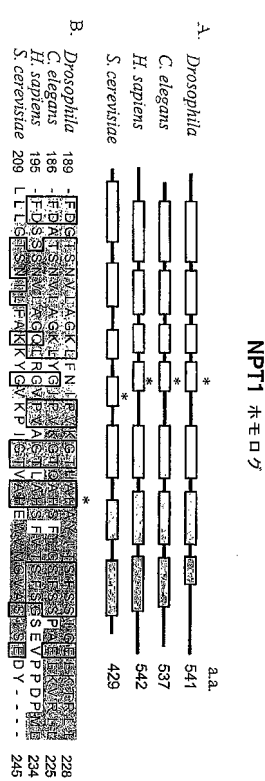
【 図 1 3 】



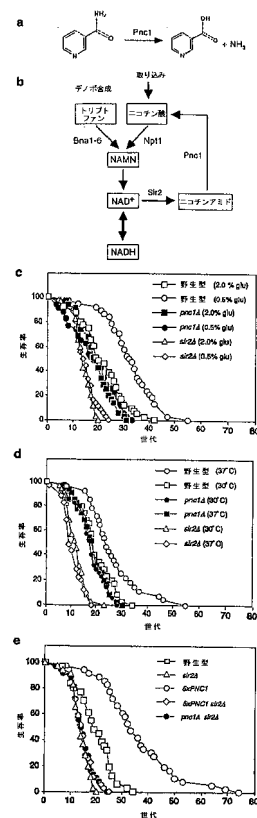
【 図 1 4 】



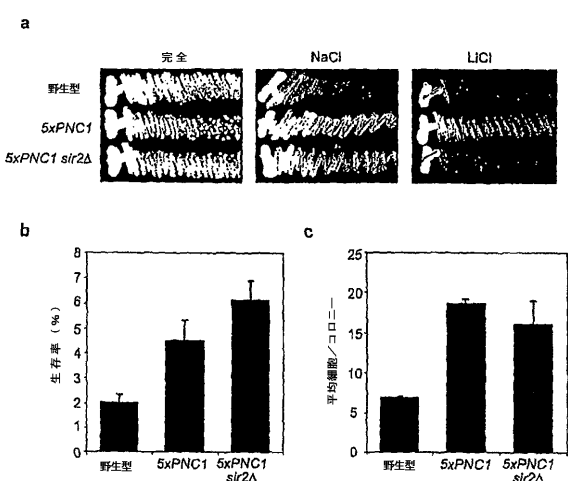
【 図 1 5 】



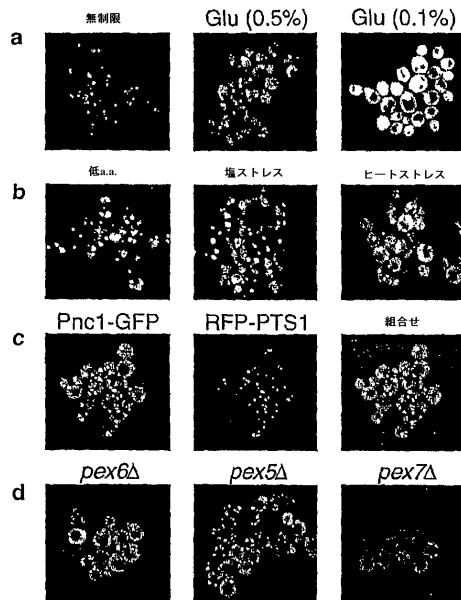
【 図 1 7 】



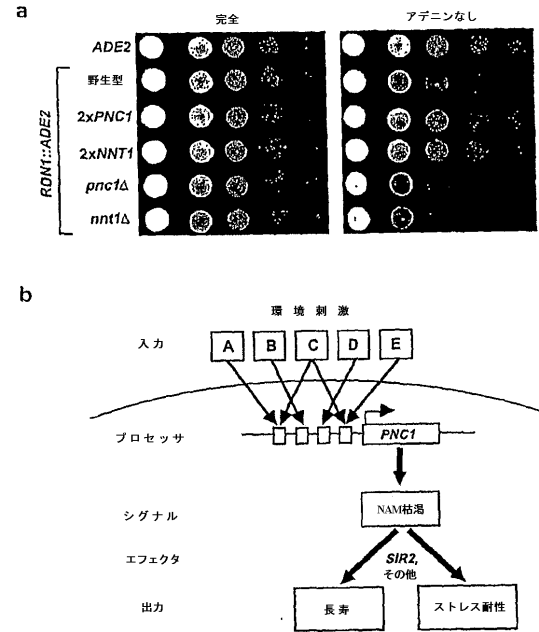
【 図 1 9 】



【図 20】



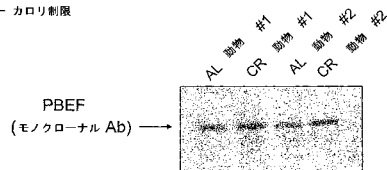
【図 21】



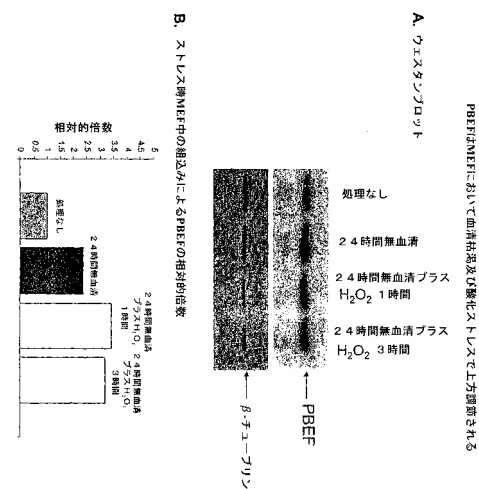
【図 22】

PBEFはカロリー制限を行なったラットの血清中でより高い
ウェスタンブロットBラット血清-mAb

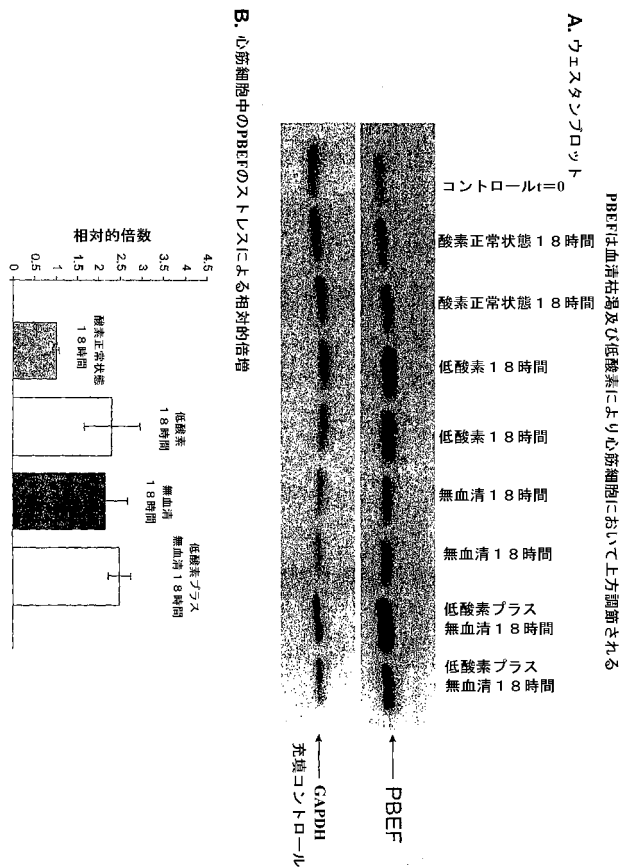
AL - 適宜食餌
CR - カロリー制限



【図 23】

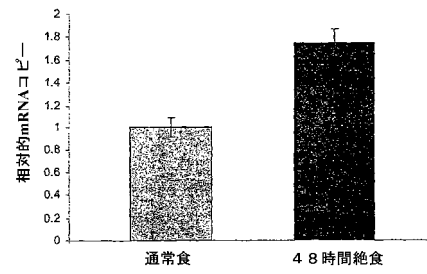


【図 2 4】



【図 2 5】

PBEF転写はラットのin vivoで絶食により上方調節される



相対的PBEF mRNAを、ベータ-アクチンによるmRNAコピーと比較したリアルタイムRT-PCRにより測定した

【配列表】

2008529502000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/004397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV. C07K14/47	A61K38/45	G01N33/50	A61K48/00	A61P43/00
C12N1/15	C12N1/16	C12N1/20	C12N5/00	C12N5/06
C12N5/10	C12N9/12	C12N15/09		
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) A61K G01N C07K A61P C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	WO 2004/016726 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; SINCLAIR, DAVID, A; BITTERMA) 26 February 2004 (2004-02-26) claims 1-23; figures 1-21; examples 1-10			1-28
X	ANDERSON R M ET AL: "MANIPULATION OF A NUCLEAR NAD+ SALVAGE PATHWAY DELAYS AGING WITHOUT ALTERING STEADY-STATE NAD+ LEVELS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 277, no. 21, 24 May 2002 (2002-05-24), pages 18881-18890, XP007900540 ISSN: 0021-9258 abstract ----- -/-			1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search 16 January 2007			Date of mailing of the international search report 02/02/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentleer 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Griesinger, Irina	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/004397

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLANDER G ET AL: "THE SIR2 FAMILY OF PROTEIN DEACETYLASES" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, PALTO ALTO, CA, US, vol. 73, 2004, pages 417-435, XP001206836 ISSN: 0066-4154 abstract -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/004397

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/004397

Box 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:
Although claims 1-9, 11, 12, 14, 15, and 22-28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/004397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004016726 A	26-02-2004	AU 2003264037 A1	03-03-2004
		CA 2421269 A1	09-02-2004
		CA 2495185 A1	26-02-2004
		EP 1551964 A2	13-07-2005
		JP 2005535342 T	24-11-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	31/706	(2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 P	17/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ビターマン , ケビン , ジェイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 5 ボストン ウェストランド アベニュー 9
1 アpartment 4 0 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA12 EA04 GA11

4B063 QA01 QQ07 QR06 QR33

4B065 AA80X AA80Y AB01 AC02 AC20 BA02 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA02 ZA16 ZA36 ZA89 ZB01 ZC35

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA16 ZA36 ZA89 ZB01

ZC35